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

Im Blut zirkulierende methylierte DNA-Fragmente der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als Biomarker für die Erkrankungen Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) und Aortenklappenstenose

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Freia Gottfried

aus

Wilhelmshaven

Göttingen 2025

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

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:

Datum der mündlichen Prüfung: 13.08.2025

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Im Blut zirkulierende methylierte DNA-Fragmente der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als Biomarker für die Erkrankungen Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) und Aortenklappenstenose“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VIII**

1 Einleitung **1**

1.1 Klinische Relevanz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen 1
1.1.1 Herzinsuffizienz und HFpEF 1
1.1.2 Aortenklappenstenose 3

1.2 Fibrose 5
1.2.1 Herzfibrose 6
1.2.2 Bedeutung der Herzfibrose bei der Erkrankung HFpEF 6
1.2.3 Bedeutung der Herzfibrose bei der Erkrankung Aortenklappenstenose 7

1.3 Rolle der Epigenetik bei der kardialen Fibrogenese 8

1.4 Untersuchte Gene 10
1.4.1 *RASAL1* 11
1.4.2 *ATP2A2* 13
1.4.3 *B9D1* 17

1.5 Zirkulierende DNA-Fragmente im Blut als Biomarker 18

1.6 Zielsetzung 23

2 Material, Patienten und Methoden **24**

2.1 Material 24
2.1.1 Geräte 24
2.1.2 Gebrauchsmaterialien 24
2.1.3 Chemikalien 25
2.1.4 Ansatz für die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) 25
2.1.5 Primer für die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) 25
2.1.6 Kitsysteme 26
2.1.7 Software 26

2.2 Patienten 26
2.2.1 HFpEF-Kohorte 26
2.2.2 TAVI-Kohorte 27
2.2.3 DIAST-Kohorte 28

2.3 Methoden 29
2.3.1 Vorbereitung der Blutproben zur Messung der DNA-Methylierung 29
2.3.2 Aufreinigung der DNA 31
2.3.3 Messung der DNA-Konzentration 32
2.3.4 Anpassung der DNA-Konzentration 33
2.3.5 *Methylated DNA immunoprecipitation* (MeDIP) 33
2.3.6 Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) 35
2.3.7 Statistik 36

2.3.8 Patientenparameter 44

3 Ergebnisse 48

3.1 Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in den untersuchten Kohorten 48

3.1.1 HFpEF-Kohorte 48

3.1.2 TAVI-Kohorte 49

3.1.3 DIAST-Kohorte 50

3.2 Charakterisierung der untersuchten Kohorten anhand klinischer Parameter 51

3.2.1 HFpEF-Kohorte 51

3.2.2 TAVI-Kohorte 53

3.2.3 DIAST-Kohorte 55

3.3 Korrelation der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* mit klinischen Parametern 56

3.3.1 HFpEF-Kohorte 56

3.3.2 TAVI-Kohorte 64

3.4 Prognostische Vorhersagen anhand von Überlebensmodellen unter Einbezug der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* 74

3.4.1 Modellierung von Cox-Regressionen für prognostische Vorhersagen 77

3.4.2 Modellübertragungen auf die untersuchten Kohorten 79

4 Diskussion 122

4.1 Charakterisierung der untersuchten Kohorten 124

4.2 Bedeutung des Gens *B9D1* am Herzen 124

4.3 Prognostische Biomarker kardialer Erkrankungen 127

4.4 Überlegenheit der Messung der Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut 129

4.5 DNA-Methylierung im Blut als prognostischer Biomarker 130

4.6 Übertragung von Überlebensmodellen auf neue Kohorten 133

4.7 Ausbleiben einer sinnvollen prognostischen Vorhersage durch den Biomarker Promotormethylierung an der TAVI-Kohorte 135

4.8 Eignung der *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung als prognostischer Biomarker an der HFpEF-Kohorte 137

4.9 Die *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als neue prognostische Biomarker 140

4.10 Limitationen 145

4.11 Klinische Implikationen 148

5 Zusammenfassung 152

6 Literaturverzeichnis 154

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lognormale Verteilung der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in den drei untersuchten Kohorten. 39

Abbildung 2: Normalverteilung der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* nach Transformation mithilfe des natürlichen Logarithmus in den drei untersuchten Kohorten. 40

Abbildung 3: Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in der HFpEF-Kohorte. 48

Abbildung 4: Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in der TAVI-Kohorte. 49

Abbildung 5: Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in der DIAST-Kohorte. 50

Abbildung 6: Signifikante positive lineare Korrelation der *B9D1*-Promotormethylierung mit dem metrischen klinischen Parameter BNP in der HFpEF-Kohorte. 57

Abbildung 7: Präsentation von Überlebensdaten der HFpEF- und TAVI-Kohorte. 76

Abbildung 8: Forest-Plots der vier an der DIAST-Kohorte modellierten Cox-Regressionen. 78

Abbildung 9: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. 81

Abbildung 10: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. 82

Abbildung 11: TAVI-Kohorte – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven ohne signifikanten Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. 84

Abbildung 12: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. 87

Abbildung 13: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. 88

Abbildung 14: TAVI-Kohorte – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens mithilfe kumulativer Inzidenzkurven ohne signifikanten Unterschied in der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. 90

Abbildung 15: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. 95

Abbildung 16: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. 96

Abbildung 17: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven ohne signifikanten Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. 98

Abbildung 18: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. 101

Abbildung 19: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. 102

Abbildung 20: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens mithilfe kumulativer Inzidenzkurven ohne signifikanten Unterschied in der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten....104

Abbildung 21: HFpEF-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. 107

Abbildung 22: HFpEF-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen....108

Abbildung 23: HFpEF-Kohorte – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven ohne signifikanten Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. 110

Abbildung 24: HFpEF-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen.....114

Abbildung 25: HFpEF-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen...115

Abbildung 26: HFpEF-Subkohorte nach *Matching* – Risikozuteilung des Modells mit *B9D1*-Promotormethylierung mit signifikant kürzerem Überleben der Hochrisikopatienten, Risikozuteilung des Modells mit *RASAL1*-Promotormethylierung mit statistischem Trend für kürzeres Überleben der Hochrisikopatienten und ausbleibendes signifikantes Ergebnis im Modell mit *ATP2A2*- und ohne Promotormethylierung bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven....117

Abbildung 27: Unterschiede der Hochrisikopatientenvorhersage durch die vier Modelle in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*. 121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte 24
Tabelle 2: Gebrauchsmaterialien 24
Tabelle 3: Chemikalien 25
Tabelle 4: Zusammensetzung des Ansatzes für die qRT-PCR 25
Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR 25
Tabelle 6: Kitsysteme 26
Tabelle 7: Software 26
Tabelle 8: Metrische Parameter im Datensatz der HFpEF-Kohorte 37
Tabelle 9: Kategoriale Parameter im Datensatz der HFpEF-Kohorte 37
Tabelle 10: Metrische Parameter im Datensatz der TAVI-Kohorte 38
Tabelle 11: Kategoriale Parameter im Datensatz der TAVI-Kohorte 38
Tabelle 12: Metrische Parameter im Datensatz der DIAST-Kohorte 39
Tabelle 13: Kategoriale Parameter im Datensatz der DIAST-Kohorte 39
Tabelle 14: Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* 39
Tabelle 15: Natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2, B9D1* und *RASAL1* 40
Tabelle 16: Erläuterungen zu ausgewählten klinischen Parametern der untersuchten Kohorten 44
Tabelle 17: CKD-EPI-Formel zur Berechnung der Nierenfunktion 45
Tabelle 18: Erläuterungen zu den echokardiographischen Parametern der untersuchten Kohorten 46
Tabelle 19: HFpEF-Kohorte – deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* 49
Tabelle 20: TAVI-Kohorte – deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* 50
Tabelle 21: DIAST-Kohorte – deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* 51
Tabelle 22: HFpEF-Kohorte – deskriptive Charakterisierung metrischer Parameter 51
Tabelle 23: HFpEF-Kohorte – deskriptive Charakterisierung kategorialer Parameter 53
Tabelle 24: TAVI-Kohorte – deskriptive Charakterisierung metrischer Parameter 53
Tabelle 25: TAVI-Kohorte – deskriptive Charakterisierung kategorialer Parameter 54
Tabelle 26: DIAST-Kohorte – deskriptive Charakterisierung metrischer Parameter 55
Tabelle 27: DIAST-Kohorte – deskriptive Charakterisierung kategorialer Parameter 55
Tabelle 28: Darstellung der Ergebnisse linearer Regressionen der *ATP2A2*-Promotormethylierung und metrischer Parameter in der HFpEF-Kohorte 57
Tabelle 29: Darstellung der Ergebnisse linearer Regressionen der *B9D1*-Promotormethylierung und metrischer Parameter in der HFpEF-Kohorte 58
Tabelle 30: Darstellung der Ergebnisse linearer Regressionen der *RASAL1*-Promotormethylierung und metrischer Parameter in der HFpEF-Kohorte 59
Tabelle 31: Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte 61
Tabelle 32: Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte 62
Tabelle 33: Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte 62
Tabelle 34: Darstellung der Ergebnisse der ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte 63
Tabelle 35: Darstellung der Ergebnisse der ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte 63

Tabelle 36: Darstellung der Ergebnisse der ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte 64
Tabelle 37: Ergebnisse der Post-hoc-Tests zur ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte 64
Tabelle 38: Ergebnisse linearer Regressionen metrischer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 65
Tabelle 39: Ergebnisse linearer Regressionen metrischer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 66
Tabelle 40: Ergebnisse linearer Regressionen metrischer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 67
Tabelle 41: Darstellung der Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 69
Tabelle 42: Darstellung der Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 70
Tabelle 43: Darstellung der Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 71
Tabelle 44: Ergebnisse der ANOVA kategorialer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 72
Tabelle 45: Ergebnisse der ANOVA kategorialer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 73
Tabelle 46: Ergebnisse der ANOVA kategorialer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 73
Tabelle 47: Ergebnisse der Post-hoc-Tests zur ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte 74
Tabelle 48: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Kohorte zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt 80
Tabelle 49: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Kohorte zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt 80
Tabelle 50: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Kohorte ein Jahr nach Studieneintritt 86
Tabelle 51: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Kohorte vier Jahre nach Studieneintritt 86
Tabelle 52: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der TAVI-Kohorte 91
Tabelle 53: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der TAVI-Subkohorte nach *Matching* 92
Tabelle 54: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt 94
Tabelle 55: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt 94
Tabelle 56: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* ein Jahr nach Studieneintritt 100

Tabelle 57: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* vier Jahre nach Studieneintritt 100

Tabelle 58: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Kohorte ein Jahr nach Studieneintritt 106

Tabelle 59: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Kohorte vier Jahre nach Studieneintritt 106

Tabelle 60: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der HFpEF-Kohorte 111

Tabelle 61: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* ein Jahr nach Studieneintritt 113

Tabelle 62: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* vier Jahre nach Studieneintritt 113

Tabelle 63: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* 118

Tabelle 64: Vergleich klinischer Parameter der zwei Risikogruppen für die Modellübertragung mit *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* 119

Tabelle 65: Vergleich klinischer Parameter der zwei Risikogruppen für die Modellübertragung mit *RASAL1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* 120

Abkürzungsverzeichnis

6MGT	6-Minuten-Gehtest
AI	Aortenklappeninsuffizienz
AIC	*akaike information criterion*
ANOVA	Varianzanalyse
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATP2A2	*ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} transporting 2*
B9D1	*B9 protein domain 1*
BMI	Body-Mass-Index
BMP7	*bone morphogenetic protein 7*
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
Ca^{2+}	ionisiertes Calcium
CKD	*chronic kidney disease*
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DPBS	*Dulbecco's phosphate-buffered saline*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	*estimated glomerular filtration rate*
EndMT	*endothelial to mesenchymal transition*
ESC	European Society of Cardiology
EZM	extrazelluläre Matrix
GTPase	Guanosintriphosphatase
HFmrEF	*heart failure with mildly reduced ejection fraction*
HFpEF	*heart failure with preserved ejection fraction*
HFrEF	*heart failure with reduced ejection fraction*
HOCM	hypertroph-obstruktive Kardiomyopathie
IRX3	*Iroquois Homeobox 3*
JBTS	Joubert-Syndrom
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KHK	koronare Herzkrankheit
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MBSB	Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik
MeDIP	*methylated DNA immunoprecipitation*
MKS	Meckel-Syndrom
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
MRT	Magnetresonanztomographie
NT-proBNP	N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid
NYHA	New York Heart Association
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit

PBL	periphere Blutlymphozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative *Real-Time*-PCR
RASAL1	*RAS protein activator like 1*
RASSF1A	*RAS association domain family 1 isoform A*
SERCA	*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase*
SERCA2	*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase 2*
TAVI	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation
TEE	transösophageale Echokardiographie
TET	*ten eleven translocation*
TGF	*transforming growth factor*
TTE	transthorakale Echokardiographie
WHO	World Health Organization
Z. n.	Zustand nach

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

In Deutschland gelten Herz-Kreislauf-Erkrankungen als die häufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2023a). So waren im Jahr 2022 33,6% aller Todesfälle auf diese Erkrankungen zurückzuführen (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2023a). Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen darüber hinaus zu hohen Krankheitskosten, sodass im Jahr 2015 13,7% der Gesamtkrankheitskosten Deutschlands, in einer Höhe von 46,4 Milliarden Euro, durch diese Erkrankungsgruppe verursacht wurden (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017). Anhand dieser Zahlen wird die klinische aber auch volkswirtschaftliche Relevanz der Forschung zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen deutlich.

1.1.1 Herzinsuffizienz und HFpEF

Unter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielt die Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle. Sie gilt seit 2006 in Deutschland als der häufigste Grund für eine Einlieferung ins Krankenhaus (Neumann et al. 2009). Im Jahr 2022 waren in Deutschland 10,5% der durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedingten Todesfälle auf eine Herzinsuffizienz zurückzuführen, was mehr als 37000 Verstorbenen entsprach (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2023b).

In der aktuellen Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) zur Herzinsuffizienz aus dem Jahr 2021 wird die Herzinsuffizienz nicht als alleinstehende Diagnose beschrieben, sondern als ein klinisches Syndrom mit Kardinalsymptomen, die von klinischen Zeichen der Herzinsuffizienz begleitet sein können (McDonagh et al. 2021). Zu den Kardinalsymptomen werden u. a. eine Knöchelschwellung und Atemnot, zu den klinischen Zeichen werden neben einem erhöhten Jugularvenendruck u. a. auch periphere Ödeme gezählt (McDonagh et al. 2021). In der ESC-Leitlinie wird definiert, dass eine Herzinsuffizienz aufgrund einer funktionellen und/oder strukturellen Anomalie des Herzens entsteht, die in der Folge zu erhöhten intrakardialen Drücken und/oder einer unzureichenden Herzleistung in Ruhe und/oder bei Belastung führt (McDonagh et al. 2021). Die ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz empfiehlt eine Klassifizierung der Herzinsuffizienz in drei verschiedene Phänotypen, deren Einteilung anhand der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) erfolgt (McDonagh et al. 2021). Die Autoren unterscheiden hierbei zwischen der *heart failure with preserved ejection fraction* (HFpEF) mit erhaltener LVEF (LVEF ≥ 50%), der *heart failure with mildly reduced ejection fraction* (HFmrEF) mit mäßiggradig reduzierter LVEF (LVEF 41 – 49%) und der *heart failure with reduced ejection fraction* (HFrEF) mit reduzierter LVEF (LVEF ≤ 40%) (McDonagh et al. 2021). Verschiedene Studien liefern Hinweise darauf, dass bei etwa der Hälfte aller Patienten mit Herzinsuffizienz eine HFpEF vorliegt (Bursi et al. 2006; Owan et al. 2006). Gemäß den Empfehlungen der ESC-Leitlinie kann die Diagnosestellung einer Herzinsuffizienz im Allgemeinen erfolgen, wenn typische Symptome und/oder klinische Zeichen der Herzinsuffizienz

nachweisbar sind und ein objektiver Nachweis einer kardialen Dysfunktion vorliegt (McDonagh et al. 2021). Anders als bei Patienten mit HFrEF oder HFmrEF, bei denen der für die Diagnosestellung nötige objektive Nachweis einer kardialen Dysfunktion alleine anhand der reduzierten LVEF gelingt, liegt bei Patienten mit HFpEF definitionsgemäß eine erhaltene LVEF ≥ 50% vor (McDonagh et al. 2021). Aus diesem Grund erfordert die Diagnosestellung einer HFpEF zusätzlich einen objektiven Nachweis kardialer struktureller und/oder funktioneller Anomalien, die auf eine linksventrikuläre diastolische Dysfunktion oder einen erhöhten linksventrikulären Füllungsdruck hindeuten, wozu auch erhöhte natriuretische Peptide im Blut, wie B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) oder N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid (NT-proBNP), zählen (McDonagh et al. 2021). Erschwerend für den Prozess der Diagnosestellung kommt hinzu, dass insbesondere Patienten mit HFpEF in frühen Stadien der Erkrankung teilweise keine klinischen Zeichen aufweisen (McDonagh et al. 2021). Besonders bei stabilen ambulanten Patienten oder bei Patienten, die nur bei Belastung Symptome aufweisen, kann eine HFpEF schwer zu diagnostizieren sein (Dunlay et al. 2017). Zur Vereinfachung der Diagnosestellung einer HFpEF wurden u. a. der HFA-PEFF- und der H_2FPEF-*Score* entwickelt, deren breite klinische Anwendbarkeit allerdings eingeschränkt ist (McDonagh et al. 2021). Sanders-van Wijk et al. (2021) begründen dies u. a. damit, dass gleichen Patienten durch die zwei *Scores* unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für die Diagnose HFpEF zugeschrieben werden, woraus unterschiedliche Empfehlungen für zusätzliche Diagnostik resultieren. Die Diagnosestellung einer HFpEF bleibt damit eine Herausforderung (McDonagh et al. 2021).

Die Erkrankung HFpEF zeigt eine steigende Prävalenz (Owan et al. 2006) und Inzidenz (Tsao et al. 2018). Das Auftreten einer HFpEF unter den Herzinsuffizienzpatienten weist eine altersabhängige Verschiebung auf, was sich darin zeigt, dass Patienten mit HFpEF im Vergleich zu Patienten mit reduzierter LVEF typischerweise älter sind (Bursi et al. 2006; Owan et al. 2006; Tribouilloy et al. 2008). Upadhya et al. (2017) beschreiben eine hohe Prävalenz von HFpEF unter älteren Erwachsenen. Dabei betonen die Autoren, dass insbesondere bei Frauen, die älter als 80 Jahre sind, HFpEF fast 100% der neudiagnostizierten Fälle einer Herzinsuffizienz ausmacht (Upadhya et al. 2017). In Deutschland kommt es im Allgemeinen zu einer Alterung der Gesellschaft, sodass sich gegenüber 1960 u. a. der Anteil der über 80-Jährigen an der Gesamtbevölkerung vervierfacht hat (Demografieportal des Bundes und der Länder 2024). Auch weltweit betrachtet kommt es zu einer zunehmend alternden Gesellschaft (WHO 2024). Es ist zu erwarten, dass die Belastung der öffentlichen Gesundheit durch das Krankheitsbild HFpEF in Zukunft zunehmen wird (Owan et al. 2006; Tribouilloy et al. 2008). In Anbetracht dieser Zusammenhänge wird die Relevanz der Forschung zum Krankheitsbild HFpEF umso deutlicher.

Es existieren unterschiedliche potentielle kardiale und nicht-kardiale Ursachen für die Entwicklung einer HFpEF, wozu u. a. die arterielle Hypertonie, Klappenerkrankungen, Herzrhythmusstörungen und infektiöse Erkrankungen zählen (McDonagh et al. 2021). Die Pathophysiologie der verschiedenen HFpEF-Syndrome ist unterschiedlich, was eine jeweils individuelle Therapie erfordert (McDonagh et al. 2021). Die Therapieempfehlungen der ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz unterlagen zuletzt

Änderungen. In der 2021 veröffentlichten ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz beschrieben McDonagh et al. (2021), dass es noch keine therapeutische Option für HFpEF gibt, die die Mortalität und Morbidität überzeugend senken kann. Da keine krankheitsmodifizierende Therapie für HFpEF existierte, war die einzige pharmakotherapeutische Leitlinienempfehlung die Gabe von Diuretika zur symptomatischen Therapie einer Volumenüberladung (McDonagh et al. 2021). Des Weiteren gab es die Leitlinienempfehlung zur Therapie der Ursache der Herzinsuffizienz sowie kardiovaskulärer und nicht-kardiovaskulärer Komorbiditäten und Risikofaktoren (McDonagh et al. 2021). Über diese Ansätze hinaus gab es, im Gegensatz zur Therapie von HFrEF, keine empfohlenen Pharmakotherapien (McDonagh et al. 2021). Im Jahr 2023 wurde ein Update zur ESC-Leitlinie der Herzinsuffizienz veröffentlicht (McDonagh et al. 2023). Basierend auf den Studien von Solomon et al. (2022) und Anker et al. (2021) wurde für Patienten mit HFpEF erstmals eine Leitlinienempfehlung zur Pharmakotherapie mit SGLT-2-Inhibitoren zur Senkung der Herzinsuffizienz-bedingten Hospitalisierung bzw. kardiovaskulären Mortalität ausgesprochen (McDonagh et al. 2023). Gemäß der Aktualisierung der ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz setzt sich die Leitlinienempfehlung zur Therapie einer HFpEF damit aktuell aus den im Folgenden genannten drei Aspekten zusammen (McDonagh et al. 2023). Neben der Gabe der SGLT-2-Inhibitoren Dapagliflozin oder Empagliflozin wird die symptomatische Therapie einer Volumenüberladung mit Diuretika und die Therapie von Ursachen und Komorbiditäten der Herzinsuffizienz empfohlen (McDonagh et al. 2023).

1.1.2 Aortenklappenstenose

In der *Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease* wurde die Aortenklappenstenose als die häufigste Herzklappenerkrankung in Europa identifiziert (Iung et al. 2003). Als häufigste Ursache einer Aortenklappenstenose in Europa beschreiben Iung et al. (2003) die sogenannte degenerative Genese. Heute geht man von einem aktiven und vielschichtigen Prozess der Entstehung dieser auch als kalzifizierenden Aortenklappenstenose bezeichneten Erkrankung aus, bei der neben einer Beteiligung von Lipoproteinen und Entzündungsvorgängen auch eine aktive Verkalkung eine Rolle spielt (Otto et al. 1994; Warren und Yong 1997). Als Risikofaktoren für die Entstehung dieser degenerativen Aortenklappenstenose gelten die Risikofaktoren einer Atherosklerose, wozu u. a. die Faktoren Alter, Rauchen, Hyperlipidämie und arterielle Hypertonie zählen (Stewart et al. 1997). Die rheumatische Genese wird von Iung et al. (2003) als die zweithäufigste Ursache einer Aortenklappenstenose in Europa beschrieben, wohingegen sie in den vergangenen Jahrzehnten noch als die häufigste Ursache von Herzklappenerkrankungen galt. Ein akutes rheumatisches Fieber kann zu irreversiblen Klappenschäden und einer rheumatischen Herzkrankheit führen (Marijon et al. 2012). Watkins et al. (2017) berichten von einem weltweiten Rückgang der Prävalenz und Mortalität der rheumatischen Herzkrankheit in den letzten Jahrzehnten, wobei die Autoren auf die persistierende Bedeutung der Erkrankung in den ärmeren Regionen der Welt verweisen. Eine kongenitale Genese wird als dritthäufigste Ursache der Aortenklappenstenose in Europa beschrieben (Iung et al. 2003). Hierbei gilt die bikuspide Aortenklappe als der häufigste Grund für eine kongenitale Aortenklappenstenose (Baumgartner et al. 2021). Im

Vergleich zu Patienten mit trikuspider Aortenklappe weisen Patienten mit kongenitaler bikuspider Aortenklappe frühzeitiger altersabhängige sklerotische Veränderungen an der Aortenklappe auf und zeigen einen schnelleren Progress einer Aortenklappenstenose (Beppu et al. 1993).

Die Prävalenz der Aortenklappenstenose zeigt eine Abhängigkeit vom Alter in Form einer Zunahme mit steigendem Alter (Nkomo et al. 2006). Osnabrugge et al. (2013) fanden in einem Patientenpool aus Nordamerika und Europa für Patienten, die 75 Jahre alt oder älter waren, eine Prävalenz der Aortenklappenstenose von insgesamt 12,4%, wobei die Prävalenz der schweren Aortenklappenstenose bei 3,4% lag. Angesichts der demographischen Entwicklung hin zu einer zunehmend alternden Gesellschaft in Deutschland (Demografieportal des Bundes und der Länder 2024) und auch weltweit (WHO 2024), wird die Relevanz der Forschung zum Krankheitsbild Aortenklappenstenose deutlich. Zusammenfassend stellt die Aortenklappenstenose ein wachsendes Problem der öffentlichen Gesundheit dar (Nkomo et al. 2006; Osnabrugge et al. 2013).

Spitzer et al. (2019) beschreiben, dass Patienten mit Aortenklappenstenose klassischerweise lange symptomfrei bleiben. Als häufigstes Anfangssymptom einer Aortenklappenstenose gilt eine verminderte körperliche Belastbarkeit oder eine Belastungsdyspnoe (Otto et al. 2021). Zu schwereren klassischen Symptomen einer Aortenklappenstenose gehören Synkopen, Symptome einer Herzinsuffizienz oder eine Angina pectoris (Bach et al. 2009; Otto et al. 2021). Für die Diagnosestellung einer Aortenklappenstenose und die Bestimmung des Schweregrades der Stenose ist die Echokardiographie von entscheidender Bedeutung (Vahanian et al. 2022). Bei unklaren Ergebnissen hinsichtlich des Schweregrades der Aortenklappenstenose können u. a. die Dobutamin-Stress-Echokardiographie und die kardiale Computertomographie helfen (Vahanian et al. 2022).

Die leitliniengerechte Therapie, entsprechend der ESC-Leitlinie zu Herzklappenerkrankungen aus dem Jahr 2021, richtet sich u. a. nach dem Schweregrad der Aortenklappenstenose und dem Vorliegen von Symptomen (Vahanian et al. 2022). Zurzeit gibt es keine medikamentöse Therapie, die den natürlichen Verlauf der Aortenklappenstenose beeinflussen (Vahanian et al. 2022) oder das *Outcome* der Patienten verbessern kann (McDonagh et al. 2021). Für die nicht-medikamentöse Therapie der schweren Aortenklappenstenose stehen mit dem chirurgischen und dem kathetergestützten Aortenklappenersatz generell zwei interventionelle Behandlungsoptionen zur Verfügung (Vahanian et al. 2022). Im Vergleich zum nicht-interventionellen Management der Aortenklappenstenose konnte in verschiedenen Studien für beide interventionelle Behandlungsoptionen eine Senkung der Mortalität gezeigt werden (Ueyama et al. 2021; Vollenbroich et al. 2019). Verschiedene Studien konnten keinen signifikanten Unterschied der Mortalität zwischen den beiden interventionellen Behandlungsoptionen nachweisen (Gleason et al. 2018; Mack et al. 2015; Søndergaard et al. 2016; Ueyama et al. 2021; Virtanen et al. 2019). Die aktuelle ESC-Leitlinie empfiehlt hinsichtlich der interventionellen Behandlung eine individuelle Indikationsstellung unter Einbezug eines Herz-Teams und unter Beachtung des individuellen Schweregrades und der Symptomatik der Aortenklappenstenose (Vahanian et al. 2022). Im Allgemeinen sollen alle symptomatischen Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose frühzeitig eine

Klappenintervention erhalten, außer es ist keine Verbesserung des Überlebens oder der Lebensqualität zu erwarten oder es liegen Begleitumstände vor, die eine Lebenserwartung von unter einem Jahr erwarten lassen (Vahanian et al. 2022). Für asymptomatische Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose besteht eine eindeutige Empfehlung zur Klappenintervention bei Patienten mit einzig durch die Aortenklappenstenose erklärbarer Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion oder bei Patienten, die unter Belastungstests symptomatisch werden (Vahanian et al. 2022). Für alle übrigen asymptomatischen Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose ist die Entscheidungsfindung aktuell kontrovers (Rheude et al. 2024; Vahanian et al. 2022) und erfordert eine Abwägung der individuellen Vor- und Nachteile einer Klappenintervention gegenüber dem konservativen Prozedere (Vahanian et al. 2022). Für diese Patientengruppe wird im Allgemeinen bis zum Auftreten von Symptomen die Strategie *Watchful Waiting* empfohlen (Vahanian et al. 2022).

Es besteht ein Zusammenhang zwischen den Erkrankungen Aortenklappenstenose und Herzinsuffizienz, da eine Aortenklappenstenose im Krankheitsverlauf zu einer Herzinsuffizienz führen kann, was zugleich mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Czarny und Resar 2014). Auch McDonagh et al. (2021) verweisen in der ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz aus dem Jahr 2021 auf die besonders schlechte Prognose der Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose, die Symptome einer Herzinsuffizienz aufweisen. Die Autoren empfehlen für diese Patientengruppe zusätzlich die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz (McDonagh et al. 2021).

1.2 Fibrose

Das Fortschreiten chronischer Erkrankungen verschiedener parenchymatöser Organe, wie dem Herzen oder der Niere, ist mit Fibrose assoziiert, die dort eine Schlüsselrolle bei der Organschädigung spielt (Zeisberg und Kalluri 2013). Schätzungsweise ist ein Drittel der weltweiten natürlichen Todesfälle mit Fibrose assoziiert (Zeisberg und Kalluri 2013; Zeisberg und Zeisberg 2013), was die Fibrose zu einem weltweit relevanten Forschungsthema macht. Definiert wird Fibrose im Allgemeinen als nichtphysiologischer Vernarbungsprozess, bei dem es zu einer übermäßigen Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM) kommt (Boer et al. 2019; Zeisberg und Kalluri 2013; Zeisberg und Zeisberg 2013). Diese pathologische Fibrogenese muss von der physiologischen Wundheilung unterschieden werden. Bei beiden Prozessen kommt es, ausgelöst durch eine Parenchymverletzung, zur Aktivierung von Fibroblasten und zur Ablagerung von EZM (Zeisberg und Zeisberg 2013). Bei der physiologischen Wundheilung kommt es mit Abschluss der Heilung der Wunde zur Selbstlimitation der Prozesse einschließlich der Beendigung der Ablagerung von EZM (Gurtner et al. 2008; Zeisberg und Zeisberg 2013). Dagegen kommt es bei der pathologischen Fibrogenese zu einer übermäßigen Ablagerung von EZM ohne Selbstlimitation, die noch nach Ende des initial auslösenden Reizes persistiert (Krenning et al. 2010; Zeisberg und Zeisberg 2013). Grundsätzlich werden beide Prozesse von gleichen Signalen gesteuert, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen zur Entscheidung für einen der beiden Abläufe bis heute nicht vollständig geklärt sind (Krenning et al. 2010; Zeisberg und Zeisberg 2013).

1.2.1 Herzfibrose

Die Herzfibrose wird als eine übermäßige Akkumulation von EZM im Herzgewebe definiert (Berk et al. 2007), angetrieben von zu Myofibroblasten transdifferenzierten Fibroblasten (Kong et al. 2014). Die Herzfibrose tritt im Rahmen unterschiedlicher kardialer Erkrankungen auf, wozu beispielsweise Kardiomyopathien, die Herzinsuffizienz, der Myokardinfarkt (Boer et al. 2019) und auch Herzklappenfehler, wie die Aortenklappenstenose (Chin et al. 2017), zählen. Grundsätzlich wird die Herzfibrose in verschiedene Sorten mit typischen Auslösern klassifiziert (Boer et al. 2019; Kong et al. 2014), die parallel zueinander im Herzen auftreten können (Boer et al. 2019). Die *Replacement*-Fibrose tritt klassischerweise im Rahmen der Narbenbildung nach einem Myokardinfarkt auf (Boer et al. 2019). Die reaktive Fibrose, wozu die perivaskuläre und interstitielle Fibrose gezählt werden, wird klassischerweise im Rahmen eines fortschreitenden pathologischen kardialen *Remodelings* beobachtet (Boer et al. 2019). Sie wird durch langanhaltende schädliche Stimuli, wie Entzündungszellen oder oxidativen Stress, ausgelöst (Boer et al. 2019). Zu den Stimuli der kardialen Fibrose zählen neben reaktiven Sauerstoffspezies und Entzündungsvorgängen auch viele weitere fibrotische Reize, darunter der Untergang von Kardiomyozyten und eine kardiale Drucküberlastung, wie sie z. B. bei der arteriellen Hypertonie oder im Rahmen einer Aortenklappenstenose auftritt (Berk et al. 2007; Boer et al. 2019; Kong et al. 2014; Rossi 1998). Die exakten Mechanismen und Abläufe der pathologischen Fibrogenese im Herzen sind bisher nur teilweise verstanden (Boer et al. 2019). Einige beteiligte Moleküle konnten aber inzwischen identifiziert werden, wozu der Wachstumsfaktor *transforming growth factor*(TGF)-β gehört (Boer et al. 2019). Ein Ungleichgewicht in der Zusammensetzung der EZM, wie es im Rahmen der pathologischen Fibrogenese bei der Herzfibrose vorkommt, kann die kardiale Funktion in vielfältiger Hinsicht einschränken, sodass die systolische und diastolische Pumpfunktion gestört werden kann (Boer et al. 2019; Moreo et al. 2009; Ravassa et al. 2023). Auch Störungen der elektromechanischen Kopplung mit daraus resultierenden Herzrhythmusstörungen sind möglich (McLenachan und Dargie 1990; Spach und Boineau 1997). Gazoti Debessa et al. (2001) konnten in ihrer Studie zeigen, dass der Grad an Herzfibrose im Allgemeinen mit dem Alter zunimmt. Es besteht ein demographischer Wandel zu einer weltweit alternden Gesellschaft (Demografieportal des Bundes und der Länder 2024; WHO 2024). Die genannten Zusammenhänge verdeutlichen die weltweit zunehmende Relevanz der Herzfibrose.

1.2.2 Bedeutung der Herzfibrose bei der Erkrankung HFpEF

Im Vergleich zu Patienten ohne bekannte Herzerkrankung weisen Patienten mit HFpEF ein erhöhtes Ausmaß an Herzfibrose auf (Kanagala et al. 2019). Die Herzfibrose ist beim Krankheitsbild HFpEF pathophysiologisch bedeutsam (Kasner et al. 2011; Su et al. 2014). Es besteht eine Assoziation der Herzfibrose zur diastolischen Dysfunktion (Burlew und Weber 2002; Kasner et al. 2011; Moreo et al. 2009; Rommel et al. 2016; Su et al. 2014), die als definierend für das Krankheitsbild HFpEF gilt (McDonagh et al. 2021). Die Herzfibrose wird als Grund für die Entstehung der diastolischen Dysfunktion verantwortlich gemacht (Burlew und Weber 2002; Kasner et al. 2011; Rommel et al. 2016; Zile et al. 2015). Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Zusammenhänge werden

zusammenfassend so beschrieben, dass eine vermehrte Ablagerung von EZM im Rahmen der pathologischen Fibrogenese zu einem *Remodeling* der Herzmuskulatur mit erhöhter myokardialer Steifigkeit führt (Burlew und Weber 2002; Kasner et al. 2011; Zile et al. 2015). Diese erhöhte myokardiale Steifigkeit führt dann wiederum zu einer gestörten diastolischen Füllung und erhöhten diastolischen Füllungsdrücken, sodass schließlich eine diastolische Dysfunktion entsteht (Burlew und Weber 2002; Kasner et al. 2011; Zile et al. 2015). Sowohl bei Patienten mit bereits diagnostizierter HFpEF als auch bei Patienten, die sich unter Risiko für die Entwicklung einer HFpEF befinden, zeigen sich ähnliche Ausmaße der Herzfibrose, sodass die Herzfibrose mutmaßlich der klinischen Diagnose einer HFpEF vorausgeht (Schelbert et al. 2017). In der Untersuchung von Schelbert et al. (2017) war bei Patienten mit HFpEF und Patienten, die sich unter dem Risiko für die Entwicklung einer HFpEF befanden, ein höherer Grad der Herzfibrose mit einer höheren Krankheitsschwere, abgebildet durch die Höhe von BNP im Blut, assoziiert. Zudem war ein höherer Grad der Herzfibrose bei diesen Patienten mit mehr Herzinsuffizienz-bedingten Hospitalisierungen und einer höheren Gesamtmortalität assoziiert (Schelbert et al. 2017). Auch Kanagala et al. (2019) stellen in Ihrer Untersuchung die Herzfibrose als Prädiktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf der Erkrankung HFpEF heraus. Zudem verweisen die Autoren auf die potentielle Möglichkeit anhand der Bestimmung der Herzfibrose prognostische Vorhersagen für HFpEF-Patienten zu ermöglichen (Kanagala et al. 2019).

1.2.3 Bedeutung der Herzfibrose bei der Erkrankung Aortenklappenstenose

Beim Krankheitsbild Aortenklappenstenose ist die Herzfibrose pathophysiologisch bedeutsam (Treibel et al. 2019). Patienten mit Aortenklappenstenose zeigen im Vergleich zu gesunden Patienten ein erhöhtes Ausmaß an Herzfibrose (Chin et al. 2017). Bei einer Aortenklappenstenose kommt es als Antwort auf die Nachlasterhöhung zu einer kompensatorischen Hypertrophie und pathologischen Fibrogenese im Rahmen eines *Remodelings* des Myokards (Treibel et al. 2019). Die Herzfibrose kann bei Patienten mit Aortenklappenstenose sowohl die systolische als auch die diastolische Pumpfunktion des Herzens beeinträchtigen (Villari et al. 1993). Eine fortschreitende Herzfibrose kann zudem eine kardiale Dekompensation vorantreiben (Chin et al. 2017). Patienten mit einer Aortenklappenstenose können durch eine fortschreitende Herzfibrose im Verlauf eine Herzinsuffizienz entwickeln (Hein et al. 2003). Chin et al. (2017) verweisen auf eine Assoziation der Herzfibrose mit dem klinischen *Outcome* bei Patienten mit Aortenklappenstenose. Im Vergleich zu gesunden Patienten ohne Anzeichen einer kardiovaskulären Erkrankung zeigten Patienten mit Herzfibrose in ihrer Untersuchung ein schlechteres klinisches *Outcome* im Sinne einer höheren Gesamtmortalität (Chin et al. 2017). Azevedo et al. (2010), Dweck et al. (2011), Milano et al. (2012) und Galat et al. (2019) fanden in ihren Untersuchungen ebenfalls eine prognostische Relevanz der Herzfibrose, da ein höherer Grad an Herzfibrose mit einer höheren Mortalität assoziiert war. Die Herzfibrose konnte zudem als unabhängiger Prädiktor für die kardiovaskuläre Mortalität von Patienten mit Aortenklappenstenose nach Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) identifiziert werden (Puls et al. 2020). Auch für Patienten mit Aortenklappenstenose nach operativem Aortenklappenersatz gelang eine Assoziation eines höheren

Grades der Herzfibrose mit einem schlechteren klinischen *Outcome*, gemessen in Form der New York Heart Association(NYHA)-Klasse (Weidemann et al. 2009).

1.3 Rolle der Epigenetik bei der kardialen Fibrogenese

Epigenetik wird allgemein definiert als die Lehre von den Veränderungen der Genfunktion, die vererbt werden können und bei denen es zu keiner Änderung der Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Sequenz kommt (Egger et al. 2004; Wu und Morris 2001). Es sind verschiedene Mechanismen der epigenetischen Modifikation bekannt, wobei die Histonmodifikation und die DNA-Methylierung als die zwei Hauptmechanismen gelten (Bernstein et al. 2007; Zeisberg und Zeisberg 2013). Bei der DNA-Methylierung katalysieren als DNA-Methyltransferase (DNMT) bezeichnete Enzyme die Übertragung einer Methylgruppe an die C5-Position eines Cytosin-Rings, sodass 5-Methylcytosin entsteht (Herman und Baylin 2003; Neary et al. 2015). Diese Veränderung findet im Allgemeinen an sogenannten CpG-Dinukleotiden statt, also an Cytosin-Molekülen, die einem Guanosin in der DNA-Sequenz vorausgehen (Bernstein et al. 2007; Herman und Baylin 2003; Neary et al. 2015). Ansammlungen von CpG-Dinukleotiden, sogenannte CpG-Inseln, befinden sich gehäuft in der proximalen Promotorregion von Genen und liegen in normalen Zellen größtenteils im unmethylierten Zustand vor (Estécio und Issa 2011; Neary et al. 2015). Schätzungsweise in 70% der proximalen Promotorregionen befinden sich CpG-Inseln (Estécio und Issa 2011). Kommt es zur Methylierung der CpG-Inseln in der Promotorregion eines Gens, führt dies in der Regel zu einer Unterdrückung der transkriptionellen Genaktivität (Bird und Wolffe 1999; Herman und Baylin 2003; Neary et al. 2015; Tampe et al. 2015). Eine solche aberrante Promotormethylierung wird in der Literatur auch als Hypermethylierung bezeichnet (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2015). Zeisberg und Zeisberg (2013) stellen zusammenfassend fest, dass epigenetische Mechanismen die Transkriptionsaktivität aller Gene in jeder Zelle und zu jeder Zeit kontrollieren. Grundsätzlich spielen epigenetische Veränderungen sowohl in der normalen Physiologie des Menschen, beispielsweise bei der Zelldifferenzierung, als auch bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle (Bernstein et al. 2007; Bird und Wolffe 1999; Egger et al. 2004). So besteht u. a. eine Assoziation zu Krebserkrankungen (Egger et al. 2004; Tampe et al. 2015), da eine aberrante Promotormethylierung die Transkription von Tumorsuppressorgenen hemmen kann (Jones und Laird 1999; Neary et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2013).

In den nachfolgend dargestellten Studien konnten verschiedene Herzerkrankungen mit epigenetischen Veränderungen in Form der aberranten DNA-Methylierung spezifischer Gene assoziiert werden. Movassagh et al. (2011) konnten im Herzgewebe von Patienten mit Kardiomyopathie im Endstadium im Vergleich zu einer herzgesunden Kontrollkohorte ein verändertes Muster der DNA-Methylierung spezifischer Genloci feststellen. Haas et al. (2013) stellten Unterschiede im Muster der DNA-Methylierung im Herzgewebe von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (DCM) im Vergleich zu einer herzgesunden Kontrollkohorte fest und beschreiben die DNA-Methylierung als einen neuen Mechanismus in der Pathogenese der DCM und der

Herzinsuffizienz. Die Autoren stellen anhand ihrer Ergebnisse die Hypothese auf, dass die DNA-Methylierung mit der kardialen Funktion assoziiert sein könnte und damit den Phänotyp der DCM modulieren könnte (Haas et al. 2013). In einer Kohorte aus Patienten, die im Rahmen einer DCM eine Herzinsuffizienz entwickelt hatten, konnten Meder et al. (2017) im Vergleich zur herzgesunden Kontrollkohorte ein verändertes Muster der DNA-Methylierung im Herzgewebe und im peripheren Blut nachweisen. Zudem gelang es Veränderungen der DNA-Methylierung spezifischer Gene im Herzgewebe nachzuweisen, die bereits in vorherigen Studien mit der Herzinsuffizienz assoziiert werden konnten (Meder et al. 2017). Die Autoren stellen anhand ihrer Studienergebnisse resümierend die Hypothese auf, dass die Herzinsuffizienz mit bestimmten reproduzierbaren Veränderungen der DNA-Methylierung assoziiert sein könnte (Meder et al. 2017). Auch das Krankheitsbild HFpEF kann mit epigenetischen Veränderungen assoziiert werden (Rabkin und Wong 2023). Rabkin und Wong (2023) beschreiben in ihrer Arbeit zusammenfassend, dass bereits verschiedene epigenetische Mechanismen gefunden wurden, für die ein Einfluss auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz vermutet wird. Die Autoren resümieren, dass hierbei die DNA-Methylierung aufgrund ihrer regulatorischen Wirkung auf unterschiedlichen Ebenen beim Krankheitsbild HFpEF bedeutsam ist und verweisen u. a. auf den vermuteten pathophysiologischen Einfluss der DNA-Methylierung des Gens *ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ transporting 2 (ATP2A2),* das für die *sarcoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase 2* (SERCA2) kodiert, auf die Entstehung einer HFpEF (Rabkin und Wong 2023). Das Krankheitsbild Aortenklappenstenose kann ebenfalls mit epigenetischen Veränderungen assoziiert werden (Gošev et al. 2017). Anhand der Ergebnisse verschiedener Studien resümieren Gošev et al. (2017) in ihrer Arbeit, dass die DNA-Methylierung einen wichtigen Regulationsmechanismus in der Pathophysiologie der Aortenklappenstenose, sowohl bei der Entstehung als auch beim Fortschreiten der Erkrankung, darstellt. Radhakrishna et al. (2016) konnten in einem genomweiten Screening der DNA-Methylierung an Blutproben von Neugeborenen mit kongenitaler Aortenklappenstenose an 59 CpG-Stellen in der Promotorregion und/oder kodierenden Region von 52 Genen signifikante Unterschiede in der DNA-Methylierung im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte feststellen. Es konnten darunter auch Gene identifiziert werden, die bekannterweise eine Rolle in der Pathogenese der Aortenklappenstenose spielen (Radhakrishna et al. 2016). Anhand der Erkenntnisse ihrer Arbeit untermauern die Autoren ihre Hypothese, dass epigenetische Veränderungen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der kongenitalen Aortenklappenstenose spielen (Radhakrishna et al. 2016). Nasu et al. (2020) konnten im Blut von Patienten mit erworbener schwerer Aortenklappenstenose ein verändertes Muster der DNA-Methylierung im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte finden und stellen daher die Hypothese auf, dass diese Veränderung der DNA-Methylierung mit der Pathophysiologie der Aortenklappenstenose assoziiert sein könnte.

Epigenetische Mechanismen, insbesondere die aberrante DNA-Methylierung, zeigen Relevanz bei der pathologischen Fibrogenese (Neary et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2013). Als allgemeiner Unterschied zur physiologischen Wundheilung gilt, dass es bei der pathologischen Fibrogenese zu keiner selbstlimitierten, sondern zu einer persistierenden Aktivität von Fibroblasten mit persistierender

Ablagerung von EZM kommt (Neary et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2013). Eine aberrante Promotormethylierung bestimmter Gene kann, durch die Hemmung der Transkription dieser Gene, zur Aktivierung von Fibroblasten und der pathologischen Fibrogenese beitragen (Neary et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2013). Diese Assoziation der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene zur pathologischen Fibrogenese konnte bereits für verschiedene Organe, wie die Haut (Wang et al. 2006), die Lunge (Cisneros et al. 2012; Sanders et al. 2008) und die Niere (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2015) gezeigt werden. Aus dem Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen können sich sowohl therapeutische als auch diagnostische Ansätze ergeben (Neary et al. 2015; Xu et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2013). Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass die pathologische Fibrogenese in unterschiedlichen Organen, wie dem Herzen und der Niere, aufgrund des gleichen Erscheinungsbildes den gleichen zugrundeliegenden Mechanismen folgt (Zeisberg und Zeisberg 2013). In Anbetracht der bereits beschriebenen klinischen Relevanz der Organfibrose mit ihrer Schlüsselrolle bei der Organschädigung (Zeisberg und Kalluri 2013), stellt die Epigenetik ein weltweit relevantes Forschungsthema dar.

Wie in Kapitel 1.2 ausführlich erläutert wurde, ist die Herzfibrose bei den beiden schwerpunktmäßig in dieser Arbeit betrachteten Krankheitsbildern HFpEF und Aortenklappenstenose pathophysiologisch bedeutsam. Anhand der Ergebnisse verschiedener Studien gelingt eine Assoziation der aberranten DNA-Methylierung zur Aktivierung kardialer Fibroblasten im Rahmen der pathologischen Fibrogenese im Herzen (Grimaldi et al. 2017; Rabkin und Wong 2023). Die transkriptionelle Unterdrückung des Gens *RAS protein activator like 1* (*RASAL1*) durch eine aberrante Promotormethylierung konnte von Xu et al. (2015) mit der Herzfibrose in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden. Watson et al. (2014) gelang es, die Hypoxie-induzierte aberrante DNA-Methylierung und die Herzfibrose in einen Zusammenhang zu bringen. In der Untersuchung von Xu et al. (2016) ergab sich eine Assoziation der Hypoxie-induzierten Umwandlung von Endothel zu Mesenchym, der sogenannten *endothelial to mesenchymal transition* (EndMT), zu einer aberranten Promotormethylierung des Gens *RASAL1*. In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Zeisberg et al. (2007), die eine Assoziation der EndMT zur Herzfibrose feststellten, ergibt sich anhand der Ergebnisse von Xu et al. (2016) eine Verbindung der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung zur Herzfibrose. Tao et al. (2014) konnten eine Hypermethylierung des regulatorischen Tumorsuppressors *RAS association domain family 1 isoform A* (*RASSF1A*) in Verbindung mit der kardialen Fibrogenese und der Aktivierung von Fibroblasten bringen, sodass sich damit auch im Tiermodell eine Assoziation der aberranten DNA-Methylierung spezifischer Gene zur Herzfibrose ergab.

1.4 Untersuchte Gene

In der vorliegenden Arbeit wurde die epigenetische Modifikation in Form der aberranten Promotormethylierung der drei Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9 protein domain 1* (*B9D1*) im peripheren Blut analysiert. Die Auswahl der Gene erfolgte in Anlehnung an eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe

Zeisberg, in der sich eine Assoziation der im peripheren Blut gemessenen aberranten Promotormethylierung dieser drei Gene mit dem Überleben von HFpEF-Patienten ergeben hatte (Awe 2020). Nachfolgend werden die drei Gene detailliert beschrieben.

1.4.1 *RASAL1*

Das vom Gen *RASAL1* kodierte Protein RASAL1 gehört zur Guanosintriphosphatase(GTPase)-aktivierenden Proteinfamilie 1 (Takata et al. 2017). Als RAS-GTPase, die aktives RAS-GTP in inaktives RAS-GDP umwandelt, fungiert sie als Inhibitor des RAS-Signalweges (Takata et al. 2017; Xu et al. 2015). Der RAS-Signalweg reguliert über RAS-Proteine verschiedene Zellsignalwege, die u. a. die Zellproliferation und Zelldifferenzierung betreffen (Mitin et al. 2005).

Anhand der nachfolgend dargestellten Studien wird deutlich, dass das Gen *RASAL1* einer epigenetischen Regulation unterliegt. Xu et al. (2015) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung mit einer verminderten Expression auf *messenger ribonucleic acid*(mRNA)- und Proteinebene einhergeht und es infolgedessen zur Enthemmung des RAS-Signalweges mit verstärkter RAS-GTP-Aktivität kommt. Auch in der Arbeit von Bechtel et al. (2010) und Xu et al. (2016) gelang die Assoziation einer aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung mit einer verringerten Expression von *RASAL1* und einer erhöhten RAS-GTP-Aktivität.

Die aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung kann mit der Entstehung von Krebserkrankungen assoziiert werden (Jin et al. 2007). Bechtel et al. (2010) beschreiben zusammenfassend, dass eine RAS-Hyperaktivität die autonome Zellproliferation von Krebszellen anregt und diese RAS-Hyperaktivität u. a. durch einen Verlust der *RASAL1*-Funktion verursacht werden kann. Zugleich konnten die Autoren in ihrer Arbeit zeigen, dass eine aberrante Promotormethylierung von *RASAL1* mit einem epigenetischen *Silencing* des Gens assoziiert ist (Bechtel et al. 2010). Jin et al. (2007) bezeichnen *RASAL1* als Tumorsuppressorgen, da die Autoren eine aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung mit daraus resultierendem *Silencing* des Gens als ursächlichen Mechanismus der aberrant erhöhten RAS-Aktivität in Tumorzellen verschiedener Tumorarten nachweisen konnten. Eine aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung wurde auch bei Magenkrebs beschrieben (Chen et al. 2013; Seto et al. 2011).

Verschiedene Studien konnten die epigenetische Regulierbarkeit des Gens *RASAL1* durch eine aberrante Promotormethylierung in einen Zusammenhang mit der pathologischen Fibrogenese bringen (Bechtel et al. 2010; Feng et al. 2024; Tao et al. 2011). Bechtel et al. (2010) fanden in einem genomweiten Methylierungsscreening an menschlichen Fibroblasten eine aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung in Fibroblasten aus fibrotischen Nieren im Vergleich zu Fibroblasten aus nicht-fibrotischen Nieren. Die Autoren konnten in ihrer Arbeit einen Zusammenhang der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung zur Fibroblastenaktivierung und pathologischen Fibrogenese in der Niere herstellen (Bechtel et al. 2010). Tao et al. (2011) konnten im Tiermodell eine Assoziation der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung zur Leberfibrose herstellen. Die pathologische Fibrogenese im

Rahmen der Endometriose konnte ebenfalls in einen Zusammenhang mit der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung gebracht werden (Feng et al. 2024). Auch die Herzfibrose konnte mit einer aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung in Verbindung gebracht werden (Xu et al. 2015; Xu et al. 2016). Xu et al. (2015) konnten an fibrotischem Herzgewebe von Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen, dass eine verstärkte Herzfibrose mit einer aberranten Promotormethylierung von *RASAL1* und damit einhergehender verminderter Expression von *RASAL1* auf mRNA- und Proteinebene und verstärkter RAS-GTP-Aktivität korreliert. Gleichzeitig konnte die verstärkte RAS-GTP-Aktivität mit einer verstärkten EndMT in Zusammenhang gebracht werden (Xu et al. 2015). Die EndMT konnte von Zeisberg et al. (2007) mit dem Fortschreiten der Herzfibrose in einen Zusammenhang gebracht werden. Xu et al. (2015) schlussfolgern in ihrer Arbeit, dass die aberrante Promotormethylierung von *RASAL1* ursächlich zur EndMT und damit zur Herzfibrose beiträgt. In einer weiteren Arbeit von Xu et al. (2016) konnte eine aberrante Promotormethylierung von *RASAL1* ebenfalls mit der EndMT in Zusammenhang gebracht werden, sodass sich auch hier, in Zusammenschau mit den Ergebnissen von Zeisberg et al. (2007), eine Assoziation der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung zur Herzfibrose ergibt. In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Gosch (2020) gelang an murinen Kardiomyozyten aus fibrotischen Herzen eine Assoziation einer aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung zu einer verminderten *RASAL1*-Expression. Als wichtige profibrotische Stimuli der Herzfibrose, die über verschiedene Signalwege in einer aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung münden, konnten u. a. TGF-β1 (Xu et al. 2015), eine Hypoxie (Xu et al. 2016) und hohe Plasmawerte von anorganischem Phosphat (Tan et al. 2016) identifiziert werden.

Die Assoziation der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung zu den in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Krankheitsbildern HFpEF und Aortenklappenstenose gelingt, indem man den hier beschriebenen Zusammenhang der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung mit der Herzfibrose und die in Kapitel 1.2 beschriebene pathophysiologische Relevanz der Herzfibrose bei den zwei genannten Krankheitsbildern gemeinsam betrachtet. Zudem gelang es in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020), die aberrante Promotormethylierung des Gens *RASAL1* mit dem Krankheitsbild HFpEF und dem Progress der Erkrankung in Verbindung zu bringen. Die im peripheren Blut gemessene *RASAL1*-Promotormethylierung war in der untersuchten Kohorte aus HFpEF-Patienten uni- und multivariant signifikant mit dem Überleben assoziiert (Awe 2020). Bei höherer *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut zeigte sich eine schlechtere Prognose der Patienten, im Sinne eines kürzeren Überlebens (Awe 2020). Eine Verbindung des Gens *RASAL1* und seiner aberranten Promotormethylierung zum Krankheitsbild Aortenklappenstenose ergibt sich anhand der speziellen Methodik und der Ergebnisse der Arbeit von Xu et al. (2015). Bei der Aortenklappenstenose kommt es im Rahmen einer chronischen Drucküberlastung am Herzen als Antwort auf die Nachlasterhöhung zu einem *Remodeling* des Myokards in Form einer pathologischen Fibrogenese und kompensatorischen Hypertrophie des Myokards (Treibel et al. 2019). Xu et al. (2015) haben in ihrer Arbeit im Mausmodell das Verfahren *ascending aortic constriction* angewendet, das zu einer Drucküberlastung am Herzen und infolgedessen zu einer Herzfibrose führt. Die Autoren fanden in

diesem Tiermodell eine Assoziation der experimentellen Herzfibrose zu einer aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung und einer reduzierten Expression von *RASAL1* auf mRNA- und Proteinebene (Xu et al. 2015).

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg von Gosch (2020) und Awe (2020) in Zusammenschau mit den dargestellten Zusammenhängen des Gens *RASAL1* mit Herzerkrankungen, der pathologischen Fibrogenese im Herzen und der epigenetischen Regulierbarkeit des Gens, wurde das Gen *RASAL1* im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet.

1.4.2 *ATP2A2*

Das Gen *ATP2A2* kodiert für die *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase 2* (SERCA2) (Vangheluwe et al. 2005). Neben dem Gen *ATP2A2* sind beim Menschen die zwei Gene *ATP2A3* und *ATP2A1* bekannt, die ebenfalls für verschiedene Ca^{2+}-transportierende Proteine der *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase*(SERCA)-Familie kodieren (Vangheluwe et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wird nur die SERCA2 näher betrachtet, die als die am weitesten verbreitete Isoform der SERCA-Familie (Vangheluwe et al. 2005) und als wichtigster Subtyp der SERCA-Familie im Herzen gilt (Huang et al. 2022).

Von der SERCA2 sind die vier Isoformen SERCA2a, SERCA2b, SERCA2c und SERCA2d bekannt (Dally et al. 2010). Sie entstehen im Rahmen eines gewebespezifischen posttranskriptionellen alternativen Splicings der SERCA2, dem Genprodukt von *ATP2A2* (Dally et al. 2010; Vangheluwe et al. 2005). Das Protein SERCA2c konnte von Dally et al. (2006) in menschlichem Herzgewebe nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Expression in verschiedenen menschlichen Geweben ergab sich ein Nachweis von SERCA2c-mRNA hauptsächlich in Herz- und Skelettmuskulatur, auf niedrigerem Niveau aber auch in Geweben wie Plazenta, Leber, Lunge, Gehirn, Niere und Pankreas (Dally et al. 2006). Kimura et al. (2005) gelang der Nachweis von SERCA2d-mRNA in menschlicher Skelettmuskulatur, wobei das dazugehörige Protein bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Dally et al. 2010). Für die SERCA2b wird angenommen, dass sie im endoplasmatischen Retikulum fast aller Zelltypen vorkommt, weshalb sie auch als *housekeeping isoform* bezeichnet wird (Dally et al. 2006; Vangheluwe et al. 2005). So gelang Dally et al. (2006) ein Nachweis von SERCA2b-mRNA in unterschiedlichsten menschlichen Gewebearten ohne einen anteilmäßigen Schwerpunkt in der Herz- und Skelettmuskulatur, wie es für SERCA2c- und SERCA2a-mRNA der Fall war.

Die SERCA2a wird auch als Muskel-Isoform bezeichnet und kommt hauptsächlich in der Skelett- und Herzmuskulatur vor, konnte aber u. a. auch in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden (Dally et al. 2006; Verboomen et al. 1992). So fanden Dally et al. (2006) eine anteilmäßig starke Expression der SERCA2a-mRNA in menschlicher Herz- und Skelettmuskulatur. In anderen Gewebearten fanden die Autoren eine vorhandene aber anteilig niedrigere mRNA-Expression (Dally et al. 2006). Damit war das Expressionsmuster vergleichbar mit dem der SERCA2c (Dally et al. 2006). Die SERCA2a gilt in der Herzmuskulatur als die prädominante Isoform der SERCA2 (Moorman et al. 1995). Die SERCA2a spielt

eine Schlüsselrolle in der Calciumhomöostase des Herzens, die wiederum relevant für den Kontraktionszyklus des Herzens ist (Samuel et al. 2018; Zhihao et al. 2020). Beim Kontraktionszyklus des Herzens kommt es an den Kardiomyozyten, ausgelöst durch ein elektrisches Aktionspotential, zur Depolarisation der Zellmembran (Marks 2013). Die Depolarisation aktiviert spannungsgesteuerte Kanäle für ionisiertes Calcium (Ca^{2+}) in den sogenannten T-Tubuli, die den Einstrom einer kleinen Menge Ca^{2+} in das Sarkoplasma ermöglichen (Marks 2013). Dieses Ca^{2+} aktiviert den Ryanodinrezeptor 2 am Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), durch den im SR gespeichertes Ca^{2+} ins Sarkoplasma freigesetzt wird (Marks 2013). Der starke Konzentrationsanstieg von Ca^{2+} im Sarkoplasma führt in der Folge zur Kontraktion der Herzmuskulatur, indem Ca^{2+} an Troponin C bindet und die zur Kontraktion führende Aktin-Myosin-Interaktion ermöglicht (Marks 2013). Damit es im Anschluss an die Kontraktion zur Relaxation der Herzmuskulatur kommen kann, muss die Ca^{2+}-Konzentration im Sarkoplasma wieder auf ihr Ausgangsniveau sinken (Marks 2013). Dies geschieht u. a. durch die Aktivität der SERCA2a, die Ca^{2+} aktiv zurück ins SR pumpt (Marks 2013; Zhihao et al. 2020). Es wird angenommen, dass der Großteil des sich am Ende der Systole im Sarkoplasma befindlichen Ca^{2+} hierbei durch die SERCA2a zurück ins SR gepumpt wird, während ein kleinerer Anteil auf verschiedenen Wegen in den Extrazellularraum gepumpt wird (Bers et al. 1996; Frank et al. 2002; Zhihao et al. 2020). Resümierend wirkt die SERCA2a damit sowohl auf die diastolische Funktion des Herzens, da durch den Rückstrom von Ca^{2+} ins SR eine Relaxation der Herzmuskulatur ermöglicht wird, als auch auf die systolische Funktion des Herzens, da die SERCA2a durch die Füllung der Ca^{2+}-Speicher im SR ausreichend Ca^{2+} für die folgende Kontraktion bereitstellt (Marks 2013; Periasamy und Huke 2001). Die physiologische Funktion der SERCA2, in Form der Aufrechterhaltung niedriger Ca^{2+}-Spiegel im Sarkoplasma, ist darüber hinaus auch für die normale Funktion verschiedener Zellsignalwege und physiologischer Prozesse wichtig (Huang et al. 2022).

Für das Gen *ATP2A2*, das u. a. für die SERCA2a kodiert (Dally et al. 2010), wird von verschiedenen Autoren eine epigenetische Regulierbarkeit durch eine aberrante Promotormethylierung beschrieben (Kao et al. 2010; Kao et al. 2011). Kao et al. (2010) gelang es an murinen Kardiomyozyten eine verstärkte Promotormethylierung des SERCA2a kodierenden Gens mit einer verminderten Genexpression und einer verminderten Proteinkonzentration von SERCA2a in einen Zusammenhang zu bringen. Kao et al. (2011) veranschaulichten an murinen Kardiomyozyten die epigenetische Regulierbarkeit des SERCA2a kodierenden Gens, da Hydralazin demethylierend auf die Promotorregion wirkte und es in der Folge zu einer erhöhten mRNA- und Proteinexpression von SERCA2a kam. Auch in einem Herzinsuffizienzmodell an Ratten führte die Behandlung mit Hydralazin zu einer Verringerung der Promotormethylierung des SERCA2a kodierenden Gens und zu einer Erhöhung der Expression der SERCA2a-mRNA im Herzen (Kao et al. 2011).

Die Expression und Aktivität der SERCA2 ist bei verschiedenen Herzerkrankungen, wie der Herzinsuffizienz, der ischämischen Herzerkrankung oder auch bei Kardiomyopathien, verändert (Shareef et al. 2014). Von Nakayama et al. (2003) konnte an murinen Kardiomyozyten eine veränderte

SERCA2a-Aktivität zur kardialen Hypertrophie assoziiert werden. Im Vergleich zu einer herzgesunden Kontrollkohorte fanden Hasenfuss et al. (1994) im Myokard von Herzinsuffizienzpatienten eine verminderte Expression in Form eines reduzierten Proteinlevels der SERCA. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die Untersuchungen von Meyer et al. (1995) und Studer et al. (1994). In den Untersuchungen von Mercadier et al. (1990) und Takahashi et al. (1992) zeigte sich im Myokard von Herzinsuffizienzpatienten eine verminderte Expression in Form reduzierter mRNA-Level der SERCA. Störungen in der Aktivität der SERCA2a können sowohl die Kontraktion als auch die Relaxation der Herzmuskulatur beeinträchtigen (Braunwald 2015) und zur Progression der chronischen Herzinsuffizienz führen (Samuel et al. 2018). Der pathophysiologische Zusammenhang wird hierbei so zusammengefasst, dass bei einer Minderexpression des Proteins SERCA2a am Ende der Systole weniger Ca^{2+} aus dem Sarkoplasma ins SR gepumpt wird (Samuel et al. 2018). Für die nachfolgende Kontraktion steht eine geringere Menge an Ca^{2+} im SR zur Verfügung, was in einer schwächeren Kontraktion und damit in einer systolischen Funktionsstörung resultiert (Samuel et al. 2018). Zugleich führt das vermehrt im Sarkoplasma verbleibende Ca^{2+} zu einer gestörten Relaxation, was in einer diastolischen Funktionsstörung des Herzens resultiert (Samuel et al. 2018).

Wie bereits dargestellt, ist die Herzinsuffizienz mit einer verminderten Expression der vom Gen *ATP2A2* kodierten SERCA2 assoziiert (Hasenfuss et al. 1994; Mercadier et al. 1990; Meyer et al. 1995; Studer et al. 1994; Takahashi et al. 1992). In Kapitel 1.2 wurde ausführlich beschrieben, dass die Herzinsuffizienz eine mit der Herzfibrose assoziierte Erkrankung ist. Bei gemeinsamer Betrachtung dieser Studienergebnisse, kann das Gen *ATP2A2* zur pathologischen Fibrogenese des Herzens in Beziehung gesetzt werden. Darüber hinaus fanden Xiong et al. (2022) im Tiermodell Hinweise darauf, dass eine verminderte Expression der SERCA und eine daraus resultierende gestörte Calciumhomöostase mit Calciumüberladung zur Entstehung einer Herzfibrose führen kann. Auch die Ergebnisse von Katz et al. (2016) deuten darauf hin, dass die Herzfibrose auf eine Dysregulation der SERCA2a zurückzuführen ist. Die Autoren konnten in ihrer Arbeit in einem Tiermodell zur Herzinsuffizienz eine Eindämmung des Fortschreitens der Herzfibrose durch eine Gentherapie mit SERCA2a erreichen und sprechen dem Protein SERCA2a eine kardioprotektive Rolle zu (Katz et al. 2016). Die pathophysiologische Bedeutung der Dysregulation der SERCA2a wird hierbei so definiert, dass die in der Folge gestörte Calciumhomöostase mit Calciumüberladung im Sarkoplasma zur Aktivierung Calcium-abhängiger profibrotischer Signalwege führt, an denen unter anderem Angiotensin II und TGF-β1 beteiligt sind (Katz et al. 2016). Eine SERCA2a-Überexpression, wie sie im Rahmen der Studie als Gentherapie angewandt wurde, führt dagegen zu einer Normalisierung der Calciumhomöostase und einer reduzierten Stimulation Calcium-abhängiger profibrotischer Signalwege (Katz et al. 2016). Auch Huang et al. (2022) vermuten anhand ihrer Ergebnisse am Mausmodell einen Einfluss der Fehlfunktion der SERCA2 auf die Entstehung der Herzfibrose. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass es im Rahmen einer Fehlfunktion der SERCA2 zu einer Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration im Sarkoplasma und damit zu einer Aktivierung Calcium-abhängiger profibrotischer Signalwege kommt, bei denen u. a. TGF-β1 eine Rolle spielt (Huang et al. 2022). Diese

profibrotischen Signalwege münden in der Aktivierung kardialer Fibroblasten und der Entstehung von Herzfibrose (Huang et al. 2022).

Indem man die beschriebene epigenetische Regulierbarkeit des Gens *ATP2A2* durch eine aberrante Promotormethylierung und die beschriebene Assoziation einer verminderten Expression des Gens *ATP2A2* zur Herzfibrose gemeinsam betrachtet, ergibt sich hier eine allgemeine Assoziation des Gens *ATP2A2* und seiner epigenetischen Modifizierbarkeit zur pathologischen Fibrogenese im Herzen. Einen pathophysiologischen Zusammenhang der epigenetischen Regulierbarkeit des Gens *ATP2A2* in Form der aberranten Promotormethylierung und der Herzfibrose lassen auch die Ergebnisse einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Gosch (2020) vermuten. In einem Mausmodell für die Herzfibrose zeigte sich an Kardiomyozyten aus fibrotischen Herzen eine Assoziation einer aberranten *ATP2A2*-Promotormethylierung zu einer verminderten *ATP2A2*-Expression (Gosch 2020).

Das Gen *ATP2A2* und seine epigenetische Regulierbarkeit in Form der aberranten Promotormethylierung kann mit den beiden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Krankheitsbildern HFpEF und Aortenklappenstenose in einen Zusammenhang gebracht werden. In Anbetracht der in Kapitel 1.2 für beide Krankheitsbilder beschriebenen pathomechanistischen Bedeutung der Herzfibrose, lassen die zuvor beschriebenen Zusammenhänge des Gens *ATP2A2* mit der Herzfibrose eine allgemeine Assoziation der beiden Krankheitsbilder zum Gen *ATP2A2* vermuten. Anhand der zuvor beschriebenen Rolle des Gens *ATP2A2* bei der Herzinsuffizienz wird ein Zusammenhang des Gens sowohl zu HFpEF als auch zur Aortenklappenstenose hergestellt, da eine Aortenklappenstenose zu einer Herzinsuffizienz führen kann (Czarny und Resar 2014). Auf einen möglichen Zusammenhang der epigenetischen Regulierbarkeit von *ATP2A2* und der Rolle des Gens beim Krankheitsbild Herzinsuffizienz verweisen auch Angrisano et al. (2014) in ihrer Arbeit, die in einem Mausmodell Hinweise auf eine mögliche Assoziation der epigenetischen Modifizierung des Gens *ATP2A2* zur Entstehung einer Herzinsuffizienz finden konnten. In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) konnte die aberrante Promotormethylierung des Gens *ATP2A2* mit dem Krankheitsbild HFpEF und dem Progress der Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Die im peripheren Blut gemessene *ATP2A2*-Promotormethylierung war in der untersuchten Kohorte aus HFpEF-Patienten uni- und multivariant signifikant mit dem Überleben assoziiert (Awe 2020). Die Patienten wiesen bei höherer *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut eine schlechtere Prognose, im Sinne eines kürzeren Überlebens, auf (Awe 2020).

Aufgrund der beschrieben Ergebnisse der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) und Gosch (2020) und den dargestellten Studienergebnissen zu Zusammenhängen des Gens *ATP2A2* mit Herzerkrankungen, der pathologischen Fibrogenese und der epigenetischen Regulierbarkeit des Gens, wurde das Gen *ATP2A2* im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Hierbei wurde nur das Gen *ATP2A2* untersucht, ohne die einzelnen Isoformen des Genproduktes SERCA2 zu betrachten.

1.4.3 *B9D1*

Das Gen *B9D1* zeigt eine Assoziation zu verschiedenen Ziliopathien, wie dem Meckel-Syndrom (MKS) und dem Joubert-Syndrom (JBTS) (Dowdle et al. 2011; Garcia-Gonzalo et al. 2011; Hopp et al. 2011; Romani et al. 2014). Von Hopp et al. (2011) wurde das Gen *B9D1* als ein sogenanntes MKS-Gen identifiziert, das im Rahmen der Erkrankung MKS mutiert ist. Das MKS wird von den Autoren zusammenfassend als eine seltene, pleiotrope, autosomal rezessiv vererbte und embryonal tödlich verlaufende Erkrankung beschrieben, zu deren typischem Erscheinungsbild eine polyzystische Nierenerkrankung oder eine bilaterale zystische Nierendysplasie, eine Polydaktylie, Defekte des zentralen Nervensystems und eine biliäre Dysgenesie oder Leberfibrose gehören (Hopp et al. 2011). Da Defekte der primären Zilien als ursächlich für die Erkrankung angenommen werden, wird das MKS als Ziliopathie eingestuft (Hopp et al. 2011). Das Gen *B9D1* wird daher auch als Ziliopathie-Gen bezeichnet (Hopp et al. 2011), das Genprodukt als Ziliopathie-Protein (Garcia-Gonzalo et al. 2011). Von Garcia-Gonzalo et al. (2011) konnte das vom Gen *B9D1* kodierte Protein in der Transitionszone und dem Basalkörper von Zilien nachgewiesen werden. In der Transitionszone der Zilie, dem Bereich zwischen Basalkörper und ziliärem Axonem, ließ sich das vom Gen *B9D1* kodierte Protein in einem Komplex mit anderen Proteinen nachweisen (Garcia-Gonzalo et al. 2011). Dieser Komplex reguliert gewebeabhängig die Ziliogenese und Zusammensetzung der Zilienmembran (Garcia-Gonzalo et al. 2011). Wie beschrieben kann die Mutation des Gens *B9D1* mit der Entwicklung von Ziliopathien assoziiert werden (Hopp et al. 2011; Romani et al. 2014). Eine Assoziation des Gens *B9D1* zu Herzerkrankungen ergibt sich dadurch, dass Ziliopathien im Allgemeinen mit der Entstehung kongenitaler Herzerkrankungen und kardiovaskulärer Anomalien in einen Zusammenhang gebracht werden können (Kennedy et al. 2007). Dowdle et al. (2011) konnten anhand eines Modells an Mausembryonen mit *B9D1*-Mutation eine Assoziation des Gens zu Herzerkrankungen feststellen, da bei diesen Mäusen gehäuft Herzfehler auftraten. Bei 44% der Mäuse entstand eine Dextrokardie, einige Mäuse entwickelten einen Ventrikelseptumdefekt, bei anderen kam es zur Ausdünnung der myokardialen Wand (Dowdle et al. 2011). Li et al. (2015) vermuten anhand ihrer Genanalyse an Mäusen ebenfalls eine zentrale Rolle von Zilien und Zilien-vermittelten Signalwegen in der Pathogenese kongenitaler Herzerkrankungen, da sich in der Mausmutantenlinie zu kongenitalen Herzerkrankungen gehäuft Mutationen in Zilien-bezogenen Gene feststellen ließen. Klena et al. (2017) stellten in Zusammenschau der Ergebnisse von Li et al. (2015) und dem aktuellen Stand der Forschung schlussfolgernd die weitreichende Hypothese auf, dass kongenitale Herzerkrankungen eine neue Kategorie der Ziliopathien darstellen könnten. Eine weitere Assoziation des Gens *B9D1* zu Herzerkrankungen und darüber hinaus auch zu epigenetischen Regulationsmechanismen des Gens ergibt sich anhand der Arbeit von Meder et al. (2017). Die Autoren stellten fest, dass der Methylierungsstatus des Gens *B9D1* im peripheren Blut als diagnostischer Biomarker für die DCM dienen könnte und stellten auf diesem Wege einen Zusammenhang zwischen dem Gen *B9D1* und der Herzerkrankung DCM her (Meder et al. 2017).

Eine potentielle Assoziation des Gens *B9D1* zur pathologischen Fibrogenese im Herzen ergibt sich an dieser Stelle dadurch, dass die von Meder et al. (2017) mit dem Gen *B9D1* assoziierte Erkrankung DCM

eine grundsätzlich mit der Herzfibrose assoziierte Erkrankung ist (Cojan-Minzat et al. 2021) und daher eine Rolle des Gens *B9D1* bei der Herzfibrose möglich erscheint. Ein möglicher Zusammenhang des Gens *B9D1* mit der pathologischen Fibrogenese lässt sich außerdem deshalb vermuten, weil es im Rahmen des MKS und JBTS, die beide mit einer Mutation des Gens *B9D1* assoziiert sind (Garcia-Gonzalo et al. 2011), zur pathologischen Fibrogenese in der Leber kommen kann (Brancati et al. 2010; Hopp et al. 2011; Romani et al. 2014). Wie von Zeisberg und Zeisberg (2013) beschrieben, wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass die pathologische Fibrogenese in unterschiedlichen Organen aufgrund des gleichen Erscheinungsbildes den gleichen zugrundeliegenden Mechanismen folgt. Die Art des pathophysiologischen Einflusses von *B9D1* auf die Entstehung der beschriebenen pathologischen Fibrogenese in der Leber bei den Erkrankungen MKS und JBTS bleibt aufgrund fehlender Literatur zu dieser Thematik zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt. Auch die Frage, ob *B9D1* möglicherweise aufgrund gleicher pathomechanistischer Grundlagen auch bei der pathologischen Fibrogenese im Herzen eine derartige Rolle spielen könnte, lässt sich aufgrund fehlender Literatur zu dieser Thematik zum aktuellen Zeitpunkt nicht klären. In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) gelang es, eine Assoziation des Gens *B9D1* und seiner epigenetischen Modifikation durch eine aberrante Promotormethylierung zum Krankheitsbild HFpEF sowie zum Progress der Erkrankung herzustellen. Die im peripheren Blut gemessene *B9D1*-Promotormethylierung war in der untersuchten Kohorte aus HFpEF-Patienten univariant signifikant mit dem Überleben assoziiert (Awe 2020). Die Patienten wiesen bei höherer *B9D1*-Promotormethylierung im Blut eine schlechtere Prognose, im Sinne eines kürzeren Überlebens, auf (Awe 2020).

Aufbauend auf den dargestellten Ergebnissen der Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) und den beschriebenen Zusammenhängen des Gens *B9D1* mit Herzerkrankungen, der pathologischen Fibrogenese und der Epigenetik, wird das Gen *B9D1* im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet.

1.5 Zirkulierende DNA-Fragmente im Blut als Biomarker

Patienten mit HFpEF weisen im Allgemeinen eine schlechte Prognose und hohe Mortalität auf (Lee et al. 2009; Tribouilloy et al. 2008). Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung besteht für HFpEF-Patienten eine hohe Übersterblichkeit (Tribouilloy et al. 2008). Lee et al. (2009) beschreiben eine 5-Jahres-Mortalitätsrate nach Erstauftreten der Erkrankung HFpEF von über 70%. Mehr als jeder zweite HFpEF-Patient wird hospitalisiert (Nanayakkara et al. 2018), was wesentlich zur erhöhten Mortalität dieser Patientengruppe beiträgt (Carson et al. 2015; Nanayakkara et al. 2018). In der von Tribouilloy et al. (2008) untersuchten Kohorte ergab sich für Patienten nach erstmaliger Hospitalisierung aufgrund einer HFpEF eine 5-Jahres-Mortalitätsrate von über 50%. Um Krankenhausaufenthalte zu vermeiden und die Mortalität zu senken, ist die Identifizierung von Hochrisikopatienten mit HFpEF daher ein wichtiger Forschungsschwerpunkt (Nanayakkara et al. 2018). Meder et al. (2017) verweisen auf die Notwendigkeit neuer Biomarker zur besseren Risikoeinschätzung sowohl von Patienten, die sich unter Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz befinden, als auch von Patienten, die bereits an einer

Herzinsuffizienz leiden. Auch Patienten mit Aortenklappenstenose weisen im Allgemeinen eine schlechte Prognose und hohe Mortalität auf (Frank et al. 1973; Leon et al. 2010). In Europa zeigt sich eine insgesamt steigende Mortalität der Patienten mit Aortenklappenstenose (Hartley et al. 2021). Die Aortenklappenstenose bleibt als degenerative und fortschreitende Erkrankung klassischerweise jahrzehntelang asymptomatisch (Spitzer et al. 2019). Sobald allerdings Symptome auftreten, ist das Überleben der Patienten stark beeinträchtigt (Leon et al. 2010; Spitzer et al. 2019). Leon et al. (2010) fanden bei Patienten mit symptomatischer schwerer Aortenklappenstenose und konservativer Behandlung nach einem Betrachtungszeitraum von einem Jahr eine Sterblichkeitsrate von über 50%. Frank et al. (1973) verweisen zudem auf eine besonders schlechte Prognose der Patienten mit symptomatischer Aortenklappenstenose, die eine Kombination aus mehreren Symptomen aufweisen. Die Aortenklappenstenose zeichnet sich durch einen sehr variablen Progress aus, der in einigen Fällen sehr schnell verlaufen kann (Davies et al. 1991). Es konnten bereits verschiedene potentielle Risikofaktoren für ein schnelleres Fortschreiten der Erkrankung identifiziert werden (Palta et al. 2000). Zusammenfassend gelingt es bisher aber nicht, den Progress der Erkrankung für den einzelnen Patienten vorherzusagen (Davies et al. 1991; Palta et al. 2000). Als weitere Besonderheit des Krankheitsbildes gibt es unter den asymptomatischen Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose Fälle von plötzlichem Versterben, die häufig ohne vorausgehende Symptome auftreten (Taniguchi et al. 2018). Für verschiedene klinische und echokardiographische Parameter konnte eine Assoziation zu einem erhöhten Risiko des plötzlichen Versterbens gezeigt werden (Taniguchi et al. 2018). Bisher können die Patienten mit hohem Risiko für ein plötzliches Versterben aber nicht sicher identifiziert werden, sodass dies ein wichtiges Forschungsziel darstellt (Taniguchi et al. 2018). Zudem ist der optimale Zeitpunkt für eine potentiell mortalitätssenkende Intervention bei asymptomatischen Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose nach wie vor umstritten und wird kontrovers diskutiert (Gahl et al. 2020; Rheude et al. 2024; Vahanian et al. 2022). Weitere Forschung ist nötig, um die Bedeutung einer frühen Intervention bei asymptomatischen Patienten besser zu verstehen und anhand einer individuellen Risikoeinschätzung der Patienten den optimalen Zeitpunkt für eine Intervention zu finden (Gahl et al. 2020).

Für einige bereits klinisch etablierte im Blut messbare Biomarker, wozu u. a. die natriuretischen Peptide BNP und NT-proBNP zählen, wird die Eignung als prognostischer Biomarker für die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Erkrankungen HFpEF (Anjan et al. 2012; Myhre et al. 2018) und Aortenklappenstenose (Clavel et al. 2014; Hadziselimovic et al. 2022; Sarkar et al. 2023; White et al. 2021) diskutiert. Auch kardiales Troponin T wird als prognostischer Biomarker für HFpEF (Bayes-Genis et al. 2022) und die Aortenklappenstenose (Sarkar et al. 2023; White et al. 2021) diskutiert. In der klinischen Anwendung gibt es allerdings unterschiedliche Probleme, die zur Einschränkung der diagnostischen Genauigkeit dieser Biomarker führen, sodass beispielsweise unterschiedliche kardiale aber auch nicht-kardiale Ursachen zu einer Erhöhung der natriuretischen Peptide im Blut führen können und die diagnostische Genauigkeit hinsichtlich spezifischer kardialer Erkrankungen entsprechend einschränken (McDonagh et al. 2021). In der aktuellen Literatur werden für die Erkrankungen HFpEF und

Aortenklappenstenose auch verschiedene neue potentielle im Blut messbare Biomarker für prognostische Vorhersagen der zwei Erkrankungen diskutiert, sodass beispielsweise Tromp et al. (2017) in ihrer Studie mithilfe der im Blut messbaren Biomarker Osteopontin und Neuropilin das klinische *Outcome*, im Sinne der Gesamtmortalität und/oder der Herzinsuffizienz-bedingten Hospitalisierung, von Patienten mit HFpEF, vorhersagen konnten. White et al. (2021) beschreiben in ihrer Metaanalyse eine Assoziation erhöhter Ausgangswerte von Galectin-3 im Blut zur erhöhten Mortalität bei Patienten mit Aortenklappenstenose. Resümierend wird anhand der dargestellten aktuellen Literatur deutlich, dass es für die beiden Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose bisher keinen klinisch etablierten im Blut messbaren Biomarker gibt, der Hochrisikopatienten ausreichend detektieren und den individuellen Krankheitsprogress ausreichend prognostizieren kann, sodass für beide Erkrankungen weiterhin die beschriebene hohe Mortalität und schlechte Prognose besteht.

Wie in Kapitel 1.2 ausführlich erläutert, sind die Krankheitsbilder HFpEF und Aortenklappenstenose pathomechanistisch eng mit der Herzfibrose verknüpft und die Herzfibrose zeigt zudem eine enge Assoziation zur Mortalität und zum Progress beider Erkrankungen. Für bestimmte Gene, wie u. a. *RASAL1* (Xu et al. 2015), konnten bereits Hinweise auf eine kausale Assoziation der aberranten Promotormethylierung des Gens im Herzgewebe zur Herzfibrose festgestellt werden, wobei die zugrundeliegenden Zusammenhänge ausführlich in Kapitel 1.3 und Kapitel 1.4.1 dargestellt sind. Zeisberg und Zeisberg (2013) und Xu et al. (2015) haben auf die potentielle Möglichkeit verwiesen, die DNA-Methylierung, in Form der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene, aufgrund ihrer kausalen Verknüpfung zum Progress der pathologischen Fibrogenese diagnostisch zu nutzen. Tampe et al. (2015) konnten für die Niere zeigen, dass die im peripheren Blut gemessene *RASAL1*-Promotormethylierung mit dem Ausmaß der intrarenalen *RASAL1*-Promotormethylierung sowie dem bioptisch ermittelten Grad der Nierenfibrose korreliert. Im Tiermodell und an Humanproben gelang den Autoren damit die Etablierung der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als Biomarker für die Nierenfibrose (Tampe et al. 2015). In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Gosch (2020) ergab sich für Patienten mit hypertroph-obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM) und einer LVEF ≥ 55% eine signifikante Korrelation der im Blut gemessenen *ATP2A2*- und *RASAL1*-Promotormethylierung mit dem anhand von Magnetresonanztomographie(MRT)-Daten errechneten Grad an Herzfibrose, sodass ein höherer Grad an Herzfibrose jeweils mit einer höheren Promotormethylierung der Gene im Blut einherging. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *ATP2A2*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als möglicher Biomarker für Herzfibrose dienen könnten, wobei in der beschriebenen Arbeit keine Daten zur Promotormethylierung der zwei Gene im Herzgewebe vorlagen (Gosch 2020). Meder et al. (2017) konnten für Patienten mit einer durch eine DCM ausgelösten Herzinsuffizienz zeigen, dass spezifische Muster der DNA-Methylierung im Herzgewebe und Blut dieser Patienten gleichgerichtet sind und haben daher auf die potentielle Eignung der im peripheren Blut gemessenen DNA-Methylierung als Biomarker verwiesen. Die DCM ist eine mit der Herzfibrose assoziierte Erkrankung (Cojan-Minzat et al. 2021).

Wie anhand der Arbeiten von Tampe et al. (2015), Gosch (2020) und Meder et al. (2017) dargestellt, kommt die im Blut messbare aberrante DNA-Methylierung spezifischer Gene als Biomarker für Organerkrankungen in Frage, bei denen die pathologische Fibrogenese eine Rolle spielt. Hierbei wird das Prinzip der *Liquid Biopsy* genutzt, worunter man die Detektion von zirkulierender zellfreier DNA im Blut, anstelle der Durchführung herkömmlicher histopathologischer Gewebebiopsien, versteht (Schwarzenbach et al. 2011). Anhand einer Blutentnahme und der Analyse dabei gewonnener zirkulierender zellfreier DNA-Fragmente wird so ein Rückschluss auf bestimmte Organveränderungen möglich, wobei dieses Vorgehen in der onkologischen Forschung bereits für verschiedene Krebserkrankungen untersucht wurde (Schwarzenbach et al. 2011). Die Analyse der im Blut zirkulierenden DNA ermöglicht den Nachweis tumorbedingter genetischer und epigenetischer Veränderungen, die bei der Entstehung und dem Progress von Krebserkrankungen eine Rolle spielen, da die im Blut zirkulierende DNA diese Veränderungen der Tumorzellen widerspiegelt (Schwarzenbach et al. 2011). Es konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, wie es zur Freisetzung der im peripheren Blut detektierbaren zirkulierenden zellfreien DNA-Fragmente aus den ursprünglichen Zellen kommt (Schwarzenbach et al. 2011; Tampe et al. 2015). Bei Krebserkrankungen könnte u. a. die Apoptose und Nekrose von Krebszellen und auch die aktive Sekretion durch Krebszellen zur Freisetzung zellfreier DNA-Fragmente ins Blut führen (Schwarzenbach et al. 2011). Tampe et al. (2015) vermuten in ihrer Arbeit, dass DNA-Fragmente im Rahmen der pathologischen Fibrogenese unspezifisch aus verletzten Zellen freigesetzt werden, ähnlich wie es bereits von soliden Tumoren bekannt ist.

Für die Herzinsuffizienz wird die Messung zellfreier DNA im Blut, die aus dem Herzen stammt, als potentieller Biomarker bereits diskutiert (Mansueto et al. 2020; Yokokawa et al. 2020). Tampe et al. (2015) konnten in ihrer Arbeit Hinweise darauf finden, dass die im peripheren Blut messbare Promotormethylierung spezifischer Gene mit der Promotormethylierung dieser Gene im Nierengewebe sowie dem Ausmaß der Nierenfibrose korreliert und man somit anhand des beschriebenen Prinzips der *Liquid Biopsy* durch die Messung der Promotormethylierung im Blut einen Rückschluss auf DNA-Veränderungen in der Niere als Ursprungsorgan ziehen kann. Meder et al. (2017) konnten in ihrer Arbeit Hinweise darauf finden, dass die DNA-Methylierung spezifischer Gene im peripheren Blut mit der DNA-Methylierung dieser Gene im Herzgewebe übereinstimmt. Anhand des Prinzips der *Liquid Biopsy* ergibt sich die Möglichkeit durch die Messung der DNA-Methylierung im Blut Rückschlüsse auf entsprechende DNA-Veränderungen im Herzen als Ursprungsorgan ziehen zu können (Meder et al. 2017). Es wird davon ausgegangen, dass die pathologische Fibrogenese in unterschiedlichen Organen, wie dem Herzen und der Niere, aufgrund des gleichen Erscheinungsbildes den gleichen zugrundeliegenden Mechanismen folgt (Zeisberg und Zeisberg 2013).

In Zusammenschau der dargestellten Zusammenhänge wird als Grundlage dieser Arbeit angenommen, dass die im Rahmen einer *Liquid Biopsy* detektierbaren im Blut zirkulierenden DNA-Fragmente auch DNA-Veränderungen widerspiegeln, die bei Herzfibrose-assoziierten Herzerkrankungen im Herzgewebe auftreten. In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg konnte die im Blut gemessene

Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als möglicher Biomarker für den Progress von HFpEF, im Sinne des kürzeren Überlebens der Patienten, identifiziert werden (Awe 2020). In einer weiteren Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Kanwischer et al. (2023) wurde eine Kohorte aus Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose untersucht, die eine TAVI erhielten. Die im peripheren Blut gemessene Promotormethylierung des Gens *Iroquois Homeobox 3* (*IRX3)* zeigte sich dort als potentieller prognostischer Biomarker für das Krankheitsbild Aortenklappenstenose (Kanwischer et al. 2023). Anhand dieser Vorarbeiten verdichten sich die Hinweise darauf, dass sich die im Blut messbare aberrante Promotormethylierung spezifischer Gene als prognostischer Biomarker für verschiedene Herzerkrankungen eignen könnte, die sich die pathomechanistische Gemeinsamkeit der Herzfibrose teilen. Bis zur klinischen Etablierung geeigneter Biomarker bedarf es allerdings weiterer Forschung. Hier setzt die vorliegende Arbeit an.

1.6 Zielsetzung

Wie im vorherigen Kapitel erläutert, weisen Patienten mit HFpEF und Aortenklappenstenose im Allgemeinen eine hohe Mortalität und schlechte Prognose auf. Mit den aktuell zur Verfügung stehenden klinisch etablierten Biomarkern gelingt noch keine ausreichende Identifikation von Hochrisikopatienten und keine ausreichende Prognostizierung des individuellen Krankheitsprogresses, sodass für beide Erkrankungen weiterhin die beschriebene schlechte Prognose besteht. Untersuchungen einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) an einer Kohorte aus HFpEF-Patienten ergaben eine Korrelation des Gesamtüberlebens der Patienten mit der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut. Damit ergaben sich Hinweise auf die Eignung der im Blut messbaren Promotormethylierung dieser spezifischen Gene als Biomarker für die Progression, im Sinne eines kürzeren Überlebens, von Patienten mit der Erkrankung HFpEF (Awe 2020). Auch für das Krankheitsbild Aortenklappenstenose ergab eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg Hinweise auf die Eignung der im peripheren Blut gemessenen Promotormethylierung spezifischer Gene als prognostischen Biomarker (Kanwischer et al. 2023).

Vor dem beschriebenen Problemhintergrund, den Ergebnissen von Awe (2020) und Kanwischer et al. (2023) sowie den bis hierhin erläuterten Zusammenhängen beider Erkrankungen mit der pathologischen Fibrogenese im Herzen und der im Blut messbaren aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene, hat die vorliegende Arbeit die nachfolgende Zielsetzung.

Anhand des Prinzips der *Liquid Biopsy* soll untersucht werden, ob die Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als Biomarker für die klinische Progression und zur Risikostratifizierung bei Patienten mit kardialen Erkrankungen genutzt werden kann, die sich die pathomechanistische Bedeutung der Herzfibrose teilen. Zudem soll überprüft werden, ob bei der Messung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut Vorteile gegenüber der Erfassung anderer klinischer Parameter bestehen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll hierzu die Eignung der im Blut gemessenen Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als Biomarker für den Erkrankungsprogress von Patienten mit HFpEF sowie von Patienten mit Aortenklappenstenose überprüft werden. Diese zwei Grunderkrankungen teilen sich die bereits beschriebene pathomechanistische Bedeutung der Herzfibrose.

Es sollen folgende Fragen beantwortet werden:

a) Gibt es Zusammenhänge der potentiellen Biomarker mit klinischen Parametern bei Patienten mit HFpEF bzw. bei Patienten mit Aortenklappenstenose?
b) Ist die Messung der potentiellen Biomarker der Erhebung anderer klinischer Parameter überlegen?
c) Ermöglicht die Messung der potentiellen Biomarker im Blut prognostische Vorhersagen für Patienten mit HFpEF bzw. Patienten mit Aortenklappenstenose?

2 Material, Patienten und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipette Reference 0,5 − 10 µL, 2 − 20 µL, 100 − 100 µL	Eppendorf
Pipette Reference 2 0,5 − 2 µL, 0,5 − 10 µL, 10 − 100 µL, 100 − 1000 µL	Eppendorf
Pipette Research plus 0,1 − 2,5 µL, 0,5 − 10 µL, 2 − 20 µL, 10 − 100 µL, 100 − 1000 µL	Eppendorf
pipetus Pipettierhelfer	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Sonicator Misonix S-4000-010	Qsonica, Newtown, USA
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems by Life Technologies
Thermomixer comfort	Eppendorf
The Belly Dancer	Stovall Life Science, Greensboro, USA
Vortex-Genie 1	Scientific Industries, New York, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zurich, Schweiz
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf
Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich, Bäch, Schweiz

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die verwendeten Gebrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 2: Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Cellstar Polypropylen Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Oberösterreich
Kimtech Science Labortücher 7558	Kimberly-Clark Professional, Dallas, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific
S-Monovette 7,5 ml K3 EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-Lock-Röhrchen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml	Sarstedt
TipOne Filterspitzen (10/20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Starlab, Hamburg, Germany
TipOne Pipettenspitzen (10/20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Starlab

2.1.3 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Biocoll Separating Solution	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (1x), steril, Dichte 1,077 g/ml	Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific
Nukleasefreies Wasser	QIAGEN
RNaseZAP	Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Ansatz für die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

In der nachfolgenden Tabelle 4 ist der verwendete Ansatz für die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR), die in Kapitel 2.3.6 detailliert beschrieben wird, aufgelistet.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Ansatzes für die qRT-PCR

Bestandteil des Ansatzes	Volumen
Nukleasefreies Wasser	4 µL
Fast SYBR Green Master Mix	10 µL
Vorwärtsprimer 20 µM	0,5 µL
Rückwärtsprimer 20 µM	0,5 µL

Präsentation der Zusammensetzung des verwendeten Ansatzes für die qRT-PCR. qRT-PCR, quantitative *Real-Time*-PCR.

2.1.5 Primer für die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die verwendeten Primer für die qRT-PCR, die in Kapitel 2.3.6 detailliert beschrieben wird, aufgelistet.

Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR

Gen	DNA-Vorwärtsprimer (F), DNA-Rückwärtsprimer (R)	Primersequenz (5' → 3')
ATP2A2	F	GGGCCCAGAACCCGCTGGGG
	R	GGAGCTGGGAGCGCGGTCCAC
B9D1	F	CCGCCCGAGAAAGCCACGCCTG
	R	GAGAGCTTCATGGGGACGCGC
RASAL1	F	GCCAACTCACCAGGAGCCAGCGGC
	R	CTACCGGCACCCCAGTCATGCGC

Primer für die qRT-PCR für die Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* vom Hersteller Microsynth, Balgach, Schweiz. qRT-PCR, quantitative *Real-Time*-PCR.

2.1.6 Kitsysteme

In der nachfolgenden Tabelle 6 sind die verwendeten Kitsysteme aufgeführt.

Tabelle 6: Kitsysteme

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

2.1.7 Software

In der nachfolgenden Tabelle 7 wird die verwendete Software aufgeführt.

Tabelle 7: Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2021	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
StepOne v2.3	Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, USA
R: A Language and Environment for Statistical Computing v4.2.3 (R Core Team 2018)	The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
R-package survival v3.5.3 (Therneau 2015, Terry M. Therneau and Patricia M. Grambsch 2000)	The R Foundation for Statistical Computing
R-package cmprsk v2.2.11 (Gray 1988b)	The R Foundation for Statistical Computing
R-package MatchIt v4.5.5 (Ho et al. 2011)	The R Foundation for Statistical Computing
ixserv.4	ixmid Software Technologie, Köln, Deutschland

2.2 Patienten

2.2.1 HFpEF-Kohorte

Mit dem Ziel die im Blut messbare Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als Biomarker an Blutproben einer neuen Patientenkohorte zu überprüfen und Zusammenhänge mit Patientenparametern zu untersuchen, wurden von Januar bis März 2018 48 Patienten an der Universitätsmedizin Göttingen rekrutiert. Diese Kohorte wird in der vorliegenden Arbeit als HFpEF-Kohorte bezeichnet. Als Studieneintritt, dem Zeitpunkt der Rekrutierung, galt der Tag der Blutentnahme. Die Patienten wurden in den Ambulanzen der Klinik für Kardiologie und Pneumologie und auf verschiedenen internistischen Stationen rekrutiert. Ziel der Untersuchung waren Patienten mit dem Krankheitsbild HFpEF. Als Einschlusskriterien wurden die echokardiographischen Parameter LVEF ≥ 45% und E/e' mittel ≥ 12 (aufgerundet ab E/e' mittel ≥ 11,5) in einer aktuellen transthorakalen Echokardiographie (TTE) gewählt. Dies erfolgte in Anlehnung an eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) zu HFpEF-Patienten, in der die Patientenauswahl u. a. anhand dieser zwei Kriterien erfolgte. Die Einschlusskriterien dieser Vorarbeit wurden anhand der zum damaligen Zeitpunkt gültigen ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz aus dem Jahr 2016 festgelegt, in der für die Diagnosestellung einer HFpEF u. a. die echokardiographischen Kriterien LVEF ≥ 50% und E/e' mittel ≥ 13 empfohlen wurden (Ponikowski et al. 2016). Um bei damals vorbestehendem

Datensatz eine ausreichende Patientenanzahl zu erhalten, wurden die echokardiographischen Kriterien im Rahmen der Vorarbeit, wie oben genannt, angepasst. Für die vorliegende Arbeit galten die gleichen echokardiographischen Einschlusskriterien wie für die genannte Vorarbeit, um in einem angemessenen Zeitrahmen eine ausreichende Patientenzahl rekrutieren zu können und eine Vergleichbarkeit mit der Vorarbeit zu erreichen. Der Großteil der Patienten der HFpEF-Kohorte dieser Arbeit erfüllt dabei die oben genannten Grenzwerte aus der Leitlinie. Nur bei fünf Patienten betrug die LVEF 45 − 50%, bei vier Patienten war E/e' mittel ≤ 13 und ≥ 12 (aufgerundet ab ≥ 11,5). Formelle Voraussetzungen für den Einschluss eines Patienten waren die Volljährigkeit und eine uneingeschränkte Einwilligungsfähigkeit mit Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung zur Nutzung von Daten und Materialien. Zum Zeitpunkt der Rekrutierung wurden im Rahmen einer Routineblutentnahme zwei Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Blutentnahmeröhrchen mit jeweils 7,5 ml Volumen abgenommen. Die Blutproben wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung, die jeweils noch am selben Tag stattfand, im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Die Laboranalysen wurden parallel zur Rekrutierung durchgeführt. Bei Rekrutierung wurden die in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellten Parameter erhoben. Die Quelle für diese Daten war die elektronische Patientenakte der Universitätsmedizin Göttingen. Es wurde auf bestmögliche Aktualität geachtet. Einige der erhobenen Parameter bedürfen näheren Erläuterungen, die in Tabelle 16 bis Tabelle 18 zu finden sind. Echokardiographische Parameter wurden primär einer TTE mit bestmöglicher Aktualität entnommen. Für eine möglichst umfangreiche Datenerhebung wurden vereinzelt Parameter aus einer transösophagealen Echokardiographie (TEE) ergänzt. Bedingung hierfür war, dass die Untersuchung am selben Tag direkt im Anschluss an die TTE stattfand. Dies war bei neun Patienten der Fall. Die zwei Parameter „MK Pmax [mmHg]“ und „MÖF(planimetrisch) [cm²]“ entstammten nur der TEE, die Parameter „AI Vena contracta [mm]“ und „MI Vena contracta [mm]“ stammten aus TTE oder TEE. Bei drei Patienten wurden Daten aus einer zweiten TTE-Untersuchung ergänzt, die zeitlich eng an der ersten TTE-Untersuchung lag, um eine ausreichende Anzahl an echokardiographischen Parametern zu erhalten. Darüber hinaus lagen Daten zum Gesamtüberleben für einen maximalen Zeitraum von ca. fünf Jahren nach Studieneintritt vor. Als Gesamtüberleben war hier die Zeit vom Studieneintritt, also dem Tag der Blutentnahme, bis zum Tod jedweder Art definiert. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte im Rahmen eines laufenden Projektes der Arbeitsgruppe Zeisberg als Kontrollkohorte. Die Nummer des zugehörigen Ethikantrags lautet 22/2/14.

2.2.2 TAVI-Kohorte

Die Patienten dieser Kohorte kamen im Zeitraum Januar bis Oktober 2017 zur transfemoralen TAVI bei Aortenklappenstenose in die Universitätsmedizin Göttingen. Diese Kohorte wird in der vorliegenden Arbeit als TAVI-Kohorte bezeichnet. Die Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen stellte der Arbeitsgruppe Zeisberg von 57 Patienten Blutproben und ausgewählte Patientenparameter zum Zeitpunkt Null zur Verfügung (Tabelle 10 und Tabelle 11). Als Zeitpunkt Null, also Tag des Studieneintritts, galt der Tag der TAVI-Prozedur. Die Indikation zur TAVI

stellten Experten des Herzteams der Klinik, die sich an den zum damaligen Zeitpunkt aktuellsten ESC-Leitlinien zur Aortenklappenstenose orientierten (Baumgartner et al. 2017). Es lagen zudem Daten zum Gesamtüberleben und zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben für einen Zeitraum von ca. fünf Jahren nach Studieneintritt vor. Als Gesamtüberleben war die Zeit vom Studieneintritt, dem Zeitpunkt der TAVI, bis zum Tod jedweder Art definiert. Als kardiovaskulär-spezifisches Überleben war die Zeit vom Studieneintritt bis zum Tod aufgrund einer kardiovaskulären Ursache definiert. Vor der TAVI-Prozedur zum Zeitpunkt Null fand im Rahmen des stationären Aufenthaltes eine Blutentnahme statt und es wurden ausgewählte Patientenparameter erhoben. Es wurde auf bestmögliche Aktualität geachtet. Informationen zu den Patienten wurden zum Teil auch der elektronischen Patientenakte entnommen. Alle Patienten erhielten vor der TAVI-Prozedur eine TTE- und TEE-Untersuchung. Hierbei stammen fast alle in dieser Arbeit betrachteten echokardiographischen Parameter aus der TTE-Untersuchung, nur der Grad der Aortenklappen-, Mitralklappen- und Trikuspidalklappeninsuffizienz wurde im Rahmen der TEE-Untersuchung ermittelt. Entsprechend der echokardiographischen Klassifizierung der Aortenklappenstenose aus der Leitlinie von Baumgartner et al. (2017) konnte bei 53 der insgesamt 57 Patienten eine hochgradige Aortenklappenstenose im Rahmen der TTE-Untersuchung diagnostiziert werden, bei vier Patienten lag eine moderate bis schwere Aortenklappenstenose vor. Zu ausgewählten Patientenparametern der TAVI-Kohorte dieser Arbeit gibt es detailliertere Hinweise in Tabelle 16 bis Tabelle 18. Die zur Verfügung gestellten Blutproben, aus denen in dieser Arbeit die DNA isoliert wurde, bestanden jeweils aus 300 µL *Buffy Coat*, wovon 100 µL für diese Arbeit verwendet wurden (siehe auch Kapitel 2.3.1). Die Proben wurden von der Biodatenbank übergeben und befanden sich in 0,7 ml Lagergefäßen mit Schraubverschluss und 2D Barcode am Boden, die in einem 96er *Rack* mit 1D Barcode bei -80 °C gelagert wurden. Die Zuordnung der Proben zu ihrer jeweiligen Identifikationsnummer fand mithilfe eines Handscanners über den Barcode am Boden des Lagergefäßes statt. Die Patientenrekrutierung und Datenerhebung erfolgte im Rahmen einer Studie der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen. Von den Patienten lag jeweils eine Einwilligung zur Verwendung der Daten und Materialien vor. Die Nummer des zugehörigen Ethikantrags lautet 10/5/16.

2.2.3 DIAST-Kohorte

Im Rahmen einer Vorarbeit von Awe (2020) wurden der Arbeitsgruppe Zeisberg durch die Klinik für Kardiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Göttingen von 46 Patienten Vollblutproben, ausgewählte Patientenparameter zum Zeitpunkt Null, dem Tag des Studieneintritts, und Daten zum Gesamtüberleben für den Zeitraum bis elf Jahre nach Studieneintritt zur Verfügung gestellt. Das Gesamtüberleben war definiert als die Zeit vom Studieneintritt bis zum Tod jedweder Art. Diese Kohorte wird in der vorliegenden Arbeit als DIAST-Kohorte bezeichnet.

Die Patienten waren Teil der Studie „Prävalenz und Verlauf der diastolischen Dysfunktion und der diastolischen Herzinsuffizienz“ (Diast-CHF) des Kompetenznetzes Herzinsuffizienz. In der prospektiven multizentrischen Zwei-Kohortenstudie im Quer- und Längsschnitt wurden von 2004 bis

2006 insgesamt mehr als 1900 Patienten rekrutiert und *Follow-up*-Untersuchungen wurden bis 2016 durchgeführt. Es wurden zum Zeitpunkt Null und im Rahmen von *Follow-up*-Untersuchungen Blutproben asserviert und Patientenparameter erhoben. Als Einschlusskriterien für die Studienteilnahme wurden ein Alter zwischen 50 und 85 Jahren, eine schriftliche Einverständniserklärung und das Vorhandensein von Merkmalen der Gruppe A oder B definiert. Für den Einschluss in Gruppe A mussten die Patienten mindestens einen Risikofaktor für die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion aufweisen. Hierzu zählten die Parameter arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Schlafapnoesyndrom, arteriosklerotische Grunderkrankung (symptomatische periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), angiographisch nachgewiesene koronare Herzkrankheit (KHK), Carotisstenose, Zustand nach (Z. n.) Apoplex, Z. n. Myokardinfarkt). Die Patienten der Gruppe A hatten keine klinischen Zeichen oder vorbestehende Diagnose einer Herzinsuffizienz. Zu Gruppe B wurden alle Patienten mit Herzinsuffizienz zugeordnet. Diese Patienten hatten entweder bereits die ärztlich gestellte Diagnose einer Herzinsuffizienz oder sie wiesen klinische Zeichen der Herzinsuffizienz auf (mindestens ein Haupt- oder zwei Nebenkriterien der *Framingham*-Definition für Herzinsuffizienz). Als Ausschlusskriterien für die Studie waren eine unzureichende Kommunikationsfähigkeit aufgrund von Aphasien oder schlechten Deutschkenntnissen, eine mangelnde Kooperationsbereitschaft, geographische Gründe oder Erkrankungen mit Einschränkung der Einwilligungsfähigkeit definiert. Diese Informationen verdanke ich Herrn Prof. Dr. med. Rolf Wachter, der mir die Details aus dem Studienprotokoll per schriftlicher Mitteilung bekannt gemacht hat.

Alle 46 Patienten der in der vorliegenden Arbeit betrachteten DIAST-Kohorte erfüllten die Einschlusskriterien einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) von LVEF ≥ 45% und E/e' mittel ≥ 12. Zudem hatten diese Patienten entweder eine Belastungsdyspnoe und Ödeme oder die Diagnose Herzinsuffizienz war bereits ärztlich gestellt. Im Rahmen der Vorarbeit wurde, mit gleicher Methodik wie in dieser Arbeit, die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in EDTA-Vollblutproben gemessen. Die DNA-Isolation erfolgte direkt aus Vollblutproben (siehe auch Kapitel 2.3.1). Die gemessene Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*, ausgewählten Patientenparameter zum Zeitpunkt Null und Daten zum Gesamtüberleben wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Tabelle 12 und Tabelle 13). Zu einigen Patientenparametern gibt es detailliertere Hinweise (Tabelle 16 und Tabelle 18). Die Nummer des zugehörigen Ethikantrags lautet 22/2/04.

2.3 Methoden

2.3.1 Vorbereitung der Blutproben zur Messung der DNA-Methylierung

Aus den Blutproben der Patienten der HFpEF-Kohorte wurden zunächst Lymphozyten isoliert. Sie stellten die Quelle für die im Anschluss untersuchte DNA dar. Die Blutproben der Patienten bestanden jeweils aus zwei EDTA-Blutentnahmeröhrchen mit je 7,5 ml Blutvolumen. Sie wurden wenige Minuten

vor Beginn dieses Arbeitsschrittes aus dem Kühlschrank bei 5 °C entnommen. Zuerst überführte man das gesamte Blut in ein 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss. Zu dem Blut im 50 ml Röhrchen gab man zur Verdünnung 5 ml des sterilen Puffers *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) und schwenkte das Röhrchen einige Male waagerecht, um für eine ausreichende Durchmischung zu sorgen. In ein neues 50 ml Röhrchen wurden 4 ml des Lymphozytenseparationsmediums *Biocoll Separating Solution* gegeben. Das DPBS-Blut-Gemisch wurde dann auf das Lymphozytenseparationsmedium pipettiert. Dafür ließ man es langsam innen am Rand des Röhrchens herunterlaufen, sodass sich die zwei entstehenden Phasen aus DPBS-Blut-Gemisch oben und Separationsmedium unten möglichst nicht miteinander vermischten. Das Röhrchen wurde anschließend bei Raumtemperatur 15 min bei 1500 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ergab sich eine Aufteilung der Blutprobe in verschiedene Schichten. Von oben kommend waren die Hauptbestandteile dieser Schichten Plasma, Lymphozyten, Separationsmedium und ganz unten Erythrozyten. Die oberste Schicht im Röhrchen wurde nun bis kurz oberhalb des Lymphozytenrings abpipettiert und verworfen. Anschließend wurden die Lymphozyten in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Der restliche Inhalt des alten Röhrchens wurde verworfen. Das Röhrchen mit den abpipettierten Lymphozyten wurde nun bis zur 50 ml Markierung mit DPBS aufgefüllt, geschwenkt und dann 10 min bei 1200 U/min mit Bremse zentrifugiert. Dieser Schritt diente zum Waschen, um die Lymphozyten aufzureinigen. Durch die Zentrifugation bildete sich nun ein Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand über dem Pellet wurde abpipettiert und verworfen. Nun resuspendierte man das Pellet in 1 ml DPBS, überführte das Gemisch in ein 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen und zentrifugierte dieses erneut 10 min bei 1200 U/min. Auch dieser Schritt diente zum Waschen, um die Lymphozyten weiter aufzureinigen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem entstandenen Pellet mit der Pipette aufgenommen und verworfen. Das 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen enthielt nun das Pellet aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) und wurde bei -20 °C eingefroren.

Die Lymphozytenisolation beruhte in der vorliegenden Arbeit auf dem in der klinischen Forschung etablierten Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Das verwendete Lymphozytenseparationsmedium hatte eine definierte Dichte von 1,077 g/ml. Mithilfe dieses Separationsmediums konnten zusätzliche Dichtegradienten in der Probe erzeugt werden und es wurde daher eine feinere Aufteilung der Blutbestandteile, als bei der normalen Zentrifugation, möglich. Aus den unterschiedlichen Dichten der Blutzellen resultierte eine unterschiedliche Migration während der Zentrifugation und es ergaben sich somit verschiedene Schichten im Probengefäß. Da die Dichte der Lymphozyten etwas unter der des Separationsmediums lag, bildete sich ein Lymphozytenring direkt oberhalb des Separationsmediums. Dagegen lag beispielsweise die Dichte der Erythrozyten in einem viel höheren Bereich als die des Separationsmediums, sodass man die Erythrozyten nach der Zentrifugation als unterste Schicht im Probengefäß fand. Orientierend befanden sich nach der Zentrifugation in den einzelnen Schichten von oben kommend die Hauptbestandteile Plasma, Lymphozyten, Separationsmedium und Erythrozyten (Fuss et al. 2009; Kleiveland 2015).

Von den Patienten der TAVI-Kohorte wurden jeweils 300 µL *Buffy Coat* in einem 0,7 ml Lagergefäß von der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Hiervon wurden für die vorliegende Arbeit 100 µL *Buffy Coat* verwendet. Der *Buffy Coat* wurde nach einem abteilungsinternen standardisierten Protokoll aus EDTA-Vollblutproben separiert und bei -80 °C asserviert. Die Aufbereitung erfolgte durch die zuständige Studienassistentin der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Von den Patienten der DIAST-Kohorte wurden bereits bestehende Messwerte der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut zur Verfügung gestellt. Im Rahmen einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) wurde die DNA-Methylierung der drei Gene in EDTA-Vollblutproben bestimmt (siehe auch Kapitel 2.2.3). Es wurden dafür in der Vorarbeit die in Kapitel 2.3.2 bis 2.3.6 beschrieben Arbeitsschritte äquivalent an den Vollblutproben durchgeführt.

2.3.2 Aufreinigung der DNA

Nach der Isolation der Lymphozyten aus den EDTA-Vollblutproben der HFpEF-Kohorte, wurde im nächsten Schritt deren DNA isoliert, um sie gezielt untersuchen zu können. Zunächst wurden die 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen mit den PBL-Pellets bei Raumtemperatur wenige Minuten aufgetaut.

Auch aus dem zur Verfügung gestellten *Buffy Coat* der TAVI-Kohorte musste die DNA isoliert werden. Hierfür wurden die bei -80 °C gelagerten Lagergefäße auf Eis aufgetaut und der Inhalt wurde mit einer Pipette vorsichtig gemischt. Man gab 100 µL in ein neues 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen. Der Rest der Proben wurde wieder bei -80 °C eingefroren.

Zur Aufreinigung der DNA wurde das *DNeasy Blood & Tissue Kit* von QIAGEN verwendet. Zu Beginn mussten 20 µL Proteinase K und 200 µL AL Lysepuffer zu den Proben gegeben werden. Außerdem gab man zu den Proben der HFpEF-Kohorte mit PBL-Pellet 200 µL DPBS, zu den Proben der TAVI-Kohorte mit *Buffy Coat* gab man 100 µL DPBS. Die folgenden Schritte wurden für alle Proben identisch durchgeführt. Nach guter Durchmischung mithilfe des Vortex wurden die Proben bei 56 °C und 300 rpm für 10 min im *Thermomixer comfort* inkubiert. Zu den nun lysierten Zellen wurden im nächsten Schritt 200 µL 100%iges Ethanol zum Ausfällen der DNA gegeben. Mithilfe des Vortex wurden die Proben kurz durchmischt. Jetzt pipettierte man den Inhalt auf eine *DNeasy Mini spin column* (Säule), die in einem 2 ml *collection tube* (Röhrchen) steckte und zentrifugierte für 1 min bei 10000 rpm. Im Anschluss wurde das Röhrchen samt Inhalt, bestehend aus Zellresten und weiteren Kontaminationen, verworfen. Die Säule, mit der auf ihrer Membran gebundenen DNA, steckte man auf ein neues Röhrchen. Nun fanden zwei Waschungen statt, um die DNA von noch verbliebenen Kontaminationen zu reinigen. Die erste Waschung erfolgte mit 500 µL AW1 Waschpuffer während einminütiger Zentrifugation bei 10000 rpm. Das Röhrchen mit dem Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde auf ein neues Röhrchen gesteckt. Für die zweite Waschung gab man 500 µL AW2 Waschpuffer in die Säule und zentrifugierte 3 min bei 13200 rpm. Anschließend wurde die Säule in ein

1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen gesteckt. Um die DNA von der Membran der Säule zu lösen, gab man 100 µL AE Elutionspuffer auf die Membran und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit, die sich nach der Zentrifugation unten im Röhrchen gesammelt hatte, wurde aufgenommen und auf die Membran der Säule pipettiert, die man dann wieder in das Röhrchen zurücksteckte. Abschließend wurde erneut für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Nun verwarf man die Säule. Das Röhrchen mit der in der Flüssigkeit gelösten DNA wurde auf Eis gelagert.

2.3.3 Messung der DNA-Konzentration

Im nächsten Schritt musste die Nukleinsäurekonzentration der Proben bestimmt werden. Hierfür wurde das Gerät *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* verwendet. Über einen angeschlossenen PC ließ sich das Gerät durch die dazugehörige Software *Nano Drop 2000/2000c* bedienen.

Die Proben wurden zunächst mithilfe des Vortex durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der DNA zu gewährleisten. Die Messfläche auf dem Sockel, auf den die Proben gegeben wurden, und die zweite Messfläche am Hebel des Gerätes mussten zu Beginn jeder Messung mit einem fusselfreien trockenen Tuch gereinigt werden. Als Art der Probe, die vermessen werden sollte, wurde „*nucleated acid*“ in der Software ausgewählt. Zunächst musste eine Leermessung erfolgen, um einen Referenzwert zu den weiteren Messungen zu erhalten. Hierfür wurde der AE Elutionspuffer aus dem letzten Schritt der Aufreinigung der DNA verwendet, in dem die DNA in den Proben gelöst war. Man gab 1 µL AE Elutionspuffer auf die untere Messfläche und der Hebel wurde geschlossen, sodass die beiden Messflächen mit der Probe dazwischen übereinander lagen. In der Software wurde der Befehl „*Blank*“ gewählt. Es musste darauf geachtet werden, dass beim Pipettieren der Proben keine Luftbläschen auf der Messfläche entstanden. Der Typ der zu untersuchenden Proben wurde in der Software auf „DNA“ eingestellt und der Extinktionskoeffizient auf 50 als Standardeinstellung belassen. Jede Probe wurde nun in der Software benannt und man gab jeweils 1 µL der Probe auf die Messfläche. Mit dem Befehl „*Measure*“ wurde nach Absenken des Hebels die Messung über die Software gestartet. Die DNA-Konzentration der Probe konnte man aus der Software ablesen und exportieren.

Das Funktionsprinzip der Konzentrationsmessung mithilfe des Gerätes *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* beruht auf der Spektralphotometrie. In die Messflächen im Sockelbereich und am Hebel des Gerätes waren optische Lichtleiterkabel eingebracht. Durch die Oberflächenspannung der Probe bildete sich eine Flüssigkeitssäule zwischen den zwei Messflächen, es entstand also eine Verbindung zwischen den zwei optischen Lichtleiterkabeln. Eine Blitzlichtlampe sendete nun Lichtblitze im kompletten Wellenlängenbereich von 190 bis 840 nm durch die Probe. Mithilfe des Spektralphotometers wurde unter Einbezug der Referenzmessung über die Software ein Absorptionsspektrum generiert. Auf dem Absorptionskoeffizienten von 260 nm und dem gewählten Extinktionskoeffizienten beruhend, wurde die Konzentration der Probe ausgegeben. Um den Reinheitsgrad der Probe bewerten zu können, nutze man das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm, je auf eine 10 mm Schichtdicke genormt. Bei einer reinen Probe sollte sich etwa ein Verhältnis von 1,8 ergeben.

Abweichende Werte wiesen auf mögliche Verunreinigungen der Probe hin (Thermo Fisher Scientific 2009).

2.3.4 Anpassung der DNA-Konzentration

Damit alle Proben die gleiche DNA-Konzentration von 10 ng/µL aufwiesen, mussten die Proben entsprechend verdünnt werden. Als Verdünnungsmedium wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Um ein definiertes Endvolumen mit der gewünschten DNA-Konzentration von 10 ng/µL zu erhalten, wurde mithilfe der zuvor bestimmten DNA-Konzentration in der Probe die jeweils benötigte Menge der Probe und des nukleasefreien Wassers berechnet. Die entsprechenden Volumina wurden in ein 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Auch die Röhrchen mit der restlichen in AE Elutionspuffer gelösten DNA wurden bei -20 °C eingefroren.

2.3.5 *Methylated DNA immunoprecipitation* (MeDIP)

Die methylierte DNA musste aus den Proben extrahiert werden. Genutzt wurde dafür die erstmals von Weber et al. (2005) beschriebene Methode der Anreicherung methylierter DNA mithilfe eines monoklonalen Antikörpers, der an 5-Methylcytosin bindet. Diese Methode der Anreicherung beruht auf dem Prinzip der Immunpräzipitation (Weber et al. 2005). Hierfür wurde das *Methylamp Methylated DNA Capture (MeDip) Kit* der Firma Epigentek verwendet.

Die Proben in den 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen, mit der einheitlichen DNA-Konzentration von 10 ng/µL, wurden aufgetaut und kurz mithilfe des Vortex durchmischt, um die DNA wieder gleichmäßig in Lösung zu bringen. Mithilfe des *Sonicators Misonix* wurde die DNA zunächst in kleinere Fragmente gespalten. Es wurde die Technik des indirekten *Sonicators* genutzt. Dazu wurden die Proben im *Sonicator* auf Eiswasser in einem *Rack* installiert. Die vom Gerät erzeugte Ultraschallenergie wurde als Vibrationsenergie indirekt über die Flüssigkeit auf die Proben übertragen. Es wurde eine Amplitude von 20% gewählt, welche die Intensität der Energieübertragung auf die Proben auf einer Skala von 0% bis 100% widerspiegelt. Für die Prozesszeit wurde 5 min gewählt. Damit sich die im *Sonicator* entstehende Hitze nicht negativ auf die Proben auswirkte, wurde eine *Pulse-on-* und *Pulse-off-*Zeit von jeweils 15 s gewählt. So wurden die Proben während der *Pulse-off-*Zeit durch das Eiswasser gekühlt. Im Anschluss wurden die Proben für 2 min bei 95 °C ohne Rotation in den *Thermomixer comfort* gegeben, um die im *Sonicator* entstandenen DNA-Fragmente zu denaturieren. Danach wurden die Proben direkt auf Eis gelagert, um zu verhindern, dass sich die Doppelstränge wieder zusammenlagern. Während der *Sonicator* die DNA fragmentierte, wurde eine Platte mit der benötigten Anzahl *Wells* aus 8-*Well Assay Strips* des Kits bestückt. Zuvor musste die Platte durch Besprühen mit 70%igem Alkohol gereinigt und mit fusselfreien Tüchern getrocknet werden. Die *Wells* wurden mit je 100 µL MC1 Antikörperpuffer und 1 µL Anti-5-Methylcytosin beladen, mit *Strip Caps* des Kits verschlossen und 60 min bei Raumtemperatur auf dem *Belly Dancer* auf Stufe 3 (ca. 30 rpm) inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, den Antikörper an die *Wells* zu binden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand in den *Wells* verworfen. Um nicht gebundene Antikörper aus

den *Wells* zu entfernen, fanden zwei Waschungen statt. Die erste mit je 150 µL MC1 Antikörperpuffer und die zweite mit je 150 µL MC3 Waschpuffer. In die *Wells* wurde dann jeweils 100 µL der fragmentierten und denaturierten DNA-Verdünnung pipettiert. Nach Verschluss der *Wells* mit *Strip Caps*, wurde die Platte bei Raumtemperatur und maximaler Stufe (50 − 100 rpm) 120 min auf dem *Belly Dancer* inkubiert. In diesem Schritt wurde jetzt die methylierte DNA aus der Probe an die am *Well* befindlichen Antikörper gebunden. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und es fanden 3 Waschungen mit jeweils 150 µL MC3 Waschpuffer statt, um nicht gebundene DNA aus den *Wells* zu entfernen. Damit sich die methylierte DNA nun von den am *Well* gebundenen Antikörpern ablöste und in Lösung ging, gab man in jedes *Well* 60 µL eines zuvor hergestellten Ansatzes, der sich aus 60 µL MC4 DNA-Freisetzungspuffer und 1 µL Proteinase K zusammensetzte. Nach Verschluss der *Wells* mit *Strip Caps* wurde die Platte 60 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach diesem Schritt befand sich in den *Wells* die methylierte DNA in Lösung. Damit man im Folgenden Aussagen über den Grad der Promotormethylierung der jeweiligen Probe treffen konnte, mussten man als Vergleich zu jeder Probe ein Input anfertigen. Hierfür wurden jeweils 5 µl der fragmentierten und denaturierten DNA-Verdünnung in ein 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen pipettiert. Der Rest der DNA-Verdünnung wurde bei -20 °C eingefroren. Auch in jedes dieser Röhrchen wurden 60 µL eines zuvor hergestellten Ansatzes, der sich aus 60 µL MC4 DNA-Freisetzungspuffer und 1 µL Proteinase K zusammensetzte, pipettiert und die Röhrchen wurden ebenfalls 60 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Da in diesen Röhrchen die methylierte DNA nicht zuvor gezielt mithilfe von Antikörpern und Waschungen angereichert worden war, befand sich in ihnen nach der Inkubation genomische DNA in Lösung. Alle nachfolgenden Schritte wurden für die Proben in den *Wells* auf der Platte gleichermaßen durchgeführt wie für die Input-Proben in den *Safe-Lock*-Röhrchen. Zunächst wurde für jede Probe eine mit 100 µL MC5 Bindungspuffer befüllte *F-Spin Column* (Säule) in einem *F-Collection Tube* (Röhrchen) steckend vorbereitet. Die Proben in den *Wells* und die Input-Proben in den *Safe-Lock*-Röhrchen wurden jeweils in 180 µL 100%igem Ethanol resuspendiert und auf eine Säule pipettiert. Die Zentrifugationen im Anschluss dienten der Reinigung der DNA und ihrer Bindung an die Membran der Säule. Nach der ersten Zentrifugation für 20 s bei 12000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und die Säule wieder auf das Röhrchen gesteckt. Anschließend pipettierte man 200 µL 90%iges Ethanol auf die Säule und zentrifugierte 20 s bei 12000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde wieder auf das Röhrchen gesteckt. Dann wurde erneut 200 µL 90%iges Ethanol auf jede Säule pipettiert und die Proben wurden abschließend für 35 s bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Säule steckte man jetzt in ein neues 1,5 ml *Safe-Lock*-Röhrchen. Um die DNA von der Membran der Säule zu lösen, gab man je 20 µL MC6 Elutionspuffer auf die Säulenmembran und zentrifugierte anschließend 20 s bei 12000 rpm. Die Säule wurde nun verworfen. In den *Safe-Lock*-Röhrchen der antikörperbehandelten Proben befand sich jetzt die gelöste methylierte DNA. In den *Safe-Lock*-Röhrchen der Input-Proben befand sich dagegen gelöste genomische DNA, also methylierte und unmethylierte DNA. Um ein Gesamtvolumen von 100 µL für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu erhalten, gab man jeweils 80 µL nukleasefreies Wasser in die *Safe-Lock*-Röhrchen. Die *Safe-Lock*-Röhrchen wurden anschließend bei -20 °C eingefroren.

2.3.6 Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

Die hier genutzte quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR), die von Mullis und Faloona (1987) etabliert wurde, gründet auf der Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation gezielter Nukleinsäuresequenzen. Die PCR besteht aus den drei sich wiederholenden Phasen Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Hitzezufuhr in Einzelstränge denaturiert. Während des *Annealings* lagert sich nun ein der zu amplifizierenden DNA-Sequenz komplementäres Primerpaar, bestehend aus Oligonukleotiden definierter Länge, an die DNA an. Es gibt jeweils einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer, die bei ihrer definierten *Annealing*-Temperatur an den Vorwärts- bzw. Rückwärtsstrang der DNA binden. In der Elongationsphase wird die von den Primern flankierte Sequenz durch die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* amplifiziert und es kommt zur exponentiellen Zunahme des für die Primer spezifischen DNA-Segmentes (Saiki et al. 1988). Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR besteht bei der von Higuchi et al. (1992) etablierten qRT-PCR die Möglichkeit zur Quantifizierung doppelsträngiger DNA in Echtzeit. Dies gelingt durch Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffs, der an DNA-Doppelstränge bindet, und mit zunehmender Menge an DNA wird auch das Fluoreszenzsignal stärker (Higuchi et al. 1992). Aus diesem Grund lässt die Messung der Fluoreszenzstärke Rückschlüsse auf die vorhandene Menge an DNA in der Probe zu (Higuchi et al. 1992). Bei der von Higuchi et al. (1992) etablierten Methode der qRT-PCR mit dem Farbstoff Ethidiumbromid lag der Schwerpunkt v. a. auf der Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus, um die Menge der amplifizierten DNA-Sequenz zu bestimmen und so Rückschlüsse auf die anfängliche Konzentration ziehen zu können. In der hier durchgeführten qRT-PCR wurde dagegen der Farbstoff *SYBR Green* verwendet, der ebenfalls gezielt an Doppelstrang-DNA bindet. Wittwer et al. (1997) etablierten mithilfe dieses Farbstoffes die Fluoreszenzmessung nicht am Ende jedes Zyklus, sondern auch während der einzelnen Zyklen. Durch den proportionalen Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Menge der DNA, wurde folglich auch hier eine Quantifizierung der DNA möglich (Wittwer et al. 1997).

Zunächst wurde der Arbeitsplatz gründlich mit 70%igem Ethanol-Spray und RNase-Spray gereinigt. Die Röhrchen mit den Proben aus methylierter DNA, die Input-Röhrchen, die Primer (siehe auch Kapitel 2.1.5) und der *Fast SYBR Green Master Mix* wurden auf Eis aufgetaut. Während des Befüllens lagerten die Platten in einem *Rack* auf Eis. Für die qRT-PCR wurden die *Wells* einer neuen Platte jeweils mit insgesamt 20 µL befüllt. Man gab dazu jeweils 5 µL der Probe mit methylierter DNA bzw. 5 µL des Inputs in die *Wells* und befüllte dabei jeweils drei benachbarte *Wells*, sodass sich jeweils Tripletts von jeder Probe und jedem Input ergaben. Die restlichen 15 µl in den *Wells* setzten sich aus einem definierten Ansatz zusammen, bestehend aus 10 µl *Fast SYBR Green Master Mix*, 4 µL nukleasefreiem Wasser und jeweils 0,5 µL Vorwärts- und Rückwärtsprimer des zu untersuchenden Gens in einer Konzentration von 20 µM (siehe auch Kapitel 2.1.4). Um die Primer in der gewünschten Konzentration von 20 µM nutzen zu können, musste der Ausgangsprimer mit der Konzentration von 100 µM in einem Verhältnis von 1:4 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt werden. Die Platte wurde im Anschluss mit einem passenden Adhäsionsfilm verschlossen. Damit sich die Probenvolumina unten in den *Wells* der Platte sammelten,

wurde die Platte kurz zentrifugiert. Nun wurde die Platte in das *StepOne Plus Real-Time PCR System* eingelegt und über eine gleichnamige Software konnten Einstellungen vorgenommen werde. Beim Menüpunkt „*Experiment Properties*“ wählte man „*Quantitation – Comparative CT* (ΔΔCT)“, um den relativen Anteil methylierter DNA zu detektieren. Zudem musste *Fast SYBR Green Master Mix* als verwendetes Reagenz angegeben werden. Für die drei Primer wurde die *Annealing*-Temperatur eingetragen mit *B9D1*: 62 °C, *RASAL1*: 60 °C, *ATP2A2*: 66 °C. Der Ablauf der qRT-PCR sah eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 20 s vor. Es folgten 50 Zyklen mit 3 s Denaturierung bei 95 °C und 30 s bei der jeweiligen *Annealing*-Temperatur des Primers. Während dieser 30 s fand auch die Elongation statt. Nach Durchlaufen der Zyklen gab die Software für jedes *Well* der Platte den Ct-Wert an. Dieser Wert entsprach dem Zyklus, bei dem so viel *SYBR Green*-Farbstoff an die DNA gebunden hatte, dass sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich von der Hintergrund-Fluoreszenz abhob. Der Ct-Wert war umso kleiner, je mehr DNA sich zu Beginn der qRT-PCR in der Probe befunden hatte, da dann der Zeitpunkt des farblichen Hervorhebens der Probe bereits nach weniger Zyklen eher erreicht wurde. In der Probe befand sich nur methylierte DNA, im Input dagegen die gesamte genomische DNA, also sowohl methylierte als auch nicht methylierte DNA. Ein Vergleich der Ct-Werte von Probe und zugehörigem Input konnte nun Aufschluss über den relativen Grad der Promotormethylierung in der Probe geben. Hierzu wurde zunächst der Ct-Wert des Inputs vom Ct-Wert der Probe subtrahiert und man erhielt die Differenz ΔCt. Um nun den relativen Anteil methylierter DNA zu erhalten, setzte man den Wert in die Formel $2^{-\Delta Ct}$ ein. Dieser Schritt berücksichtigte den exponentiellen Verlauf der DNA-Amplifikation während der qRT-PCR und die dementsprechend linear, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge und dem Ct-Wert. Im nächsten Schritt wurde hiervon der Mittelwert über die jeweiligen Proben- und Inputtripletts gebildet. Um nun abschließend das Verhältnis des Ausgangsvolumens von 5 µL Input zu 100 µL Probe im *MeDip* zu berücksichtigen, dividierte man durch den Verdünnungsfaktor 20 und erhielt den relativen Anteil methylierter DNA in der Probe.

2.3.7 Statistik

Das statistische Vorgehen wurde in der statistischen Beratung der Wissenschaftlichen Serviceeinheit „Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik“ (MBSB) der Universitätsmedizin Göttingen besprochen. Die selbst durchgeführte statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme „Microsoft Office 2021“ und „GraphPad Prism 9“. Die Graphen wurden mithilfe der Software „GraphPad Prism 9“ erstellt. Die erhobenen Parameter wurden auf offensichtliche Mess- oder Dokumentationsfehler geprüft und entsprechende Falschwerte wurden aus dem Datensatz entfernt.

Im Folgenden erfolgt die getrennte Darstellung der metrischen und kategorialen Parameter der drei Kohorten, die in die statistische Auswertung eingingen. Nähere Erläuterungen zu den untersuchten klinischen Parametern und zugehörigen Abkürzungen sind in Kapitel 2.3.8 zu finden. Abkürzungen der klinischen Parameter, die nur in Tabellen und Abbildungen genannt werden und nicht im Fließtext

vorkommen, sind aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nur in Kapitel 2.3.8 und nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Die Geschlechtertrennung erfolgte in dieser Arbeit lediglich nach männlichem und weiblichem Geschlecht, ohne dass weitere Geschlechteridentitäten erfasst worden sind.

Von den 48 Patienten der HFpEF-Kohorte wurden die in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellten Parameter in die statistischen Analysen dieser Arbeit einbezogen.

Tabelle 8: Metrische Parameter im Datensatz der HFpEF-Kohorte

Metrischer Parameter	Einheit	Metrischer Parameter	Einheit
AI PHT	ms	LVOT	mm
AI Vena contracta	mm	MI EROA	cm²
AK Pmax	mmHg	MI PISA Rad.	mm
AK Pmean	mmHg	MI Regurg. Vol.	ml/Schlag
AK Vmax	m/s	MI Vena contracta	mm
Alter	Jahre	MK Pmax	mmHg
AÖF(Vmax)	cm²	MÖF(kontin)	cm²
AÖF(VTI)	cm²	MÖF(PHT)	cm²
AÖFI	cm²/m² KOF	MÖF(planimetrisch)	cm²
Aorta(sinus)	mm	MS Pmean	mmHg
BMI	kg/m²	NT-proBNP	pg/ml
BNP	pg/ml	PAPsys	mmHg
E	cm/s	PAT	ms
E/e' mittel		RR diastolisch	mmHg
e' lateral	cm/s	RR systolisch	mmHg
e' septal	cm/s	RVD 1	mm
eGFR	ml/min/1,73 m²	RVD 2	mm
Gesamtüberleben	Tage	RVD 3	mm
Gewicht	kg	RWD	
Größe	cm	SVI	ml/m² KOF
HW	mm	TAPSE	mm
IVS	mm	TI Pmax	mmHg
KOF	m²	TI Vena contracta	mm
Kreatinin(P)	mg/dl	TI Vmax	m/s
LA	mm	V(LVOT)max	m/s
LAVI	ml/m² KOF	VTI(Ao)	cm
LVEDD	mm	VTI(LVOT)	cm
LVEF visuell	%	VTI(MI)	cm
LVESD	mm	ZVD(geschätzt)	mmHg
LVMI	g/m² KOF		

Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8.

Tabelle 9: Kategoriale Parameter im Datensatz der HFpEF-Kohorte

Kategorialer Parameter	Kategorien	Kategorialer Parameter	Kategorien
Adipositas	ja, nein	exzentrische Hypertrophie LV	ja, nein
arterielle Hypertonie	ja, nein	Geschlecht	männlich, weiblich
CKD-Stadium	G1, G2, G3a, G3b, G4, G5	KHK	ja, nein
Diabetes mellitus	ja, nein	konzentrische Hypertrophie LV	ja, nein
Dialyse	ja, nein	konzentrisches Remodeling LV	ja, nein
Dihydralazin	ja, nein	normale Geometrie LV	ja, nein
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	ja, nein	Präadipositas	ja, nein
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	ja, nein		

Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8.

Von den 57 Patienten der TAVI-Kohorte wurden die in Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgeführten Parameter in die statistischen Analysen dieser Arbeit einbezogen.

Tabelle 10: Metrische Parameter im Datensatz der TAVI-Kohorte

Metrischer Parameter	Einheit	Metrischer Parameter	Einheit
6MGT Distanz	m	LAVI	ml/m² KOF
AK Pmean	mmHg	LDL-Cholesterin	mg/dl
AK Vmax	m/s	logistischer EuroSCORE	%
Alter	Jahre	LVEDD	mm
AÖF(VTI)	cm²	LVEDV	ml
AÖFI	cm²/m² KOF	LVEF nS	%
BMI	kg/m²	LVESD	mm
E	cm/s	LVESV	ml
E/e' mittel		LVMI	g/m² KOF
eGFR	ml/min/1,73 m²	MLHFQ	Punkte
EuroSCORE II	%	NT-proBNP	pg/ml
Gesamtüberleben	Tage	PAPsys	mmHg
globaler AP4 Strain	%	RWD	
GLS	%	STS-Score	%
HW	mm	SV mD	ml
IVS	mm	SV nS	ml
kardiovaskulär-spezifisches Überleben	Tage	SVI	ml/m² KOF
KOF	m²	TAPSE	mm
Kreatinin(P)	mg/dl		

Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8.

Tabelle 11: Kategoriale Parameter im Datensatz der TAVI-Kohorte

Kategorialer Parameter	Kategorien	Kategorialer Parameter	Kategorien
Adipositas	ja, nein	konzentrisches Remodeling LV	ja, nein
AI	ja, nein	Lungenfibrose	ja, nein
AI Grad	0, I, II, III	MI	ja, nein
arterielle Hypertonie	ja, nein	MI Grad	0, I, II, III
chronische Lungenerkrankung	ja, nein	normale Geometrie LV	ja, nein
CKD-Stadium	G1, G2, G3a, G3b, G4, G5	NYHA-Klasse	I, II, III, IV
CM(andere)	ja, nein	pAVK	ja, nein
COPD	ja, nein	Präadipositas	ja, nein
CRT-D	ja, nein	TI	ja, nein
DCM	ja, nein	TI Grad	0, I, II, III
Diabetes mellitus	ja, nein	Vorhofflimmern	ja, nein
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	ja, nein	Z. n. CABG	ja, nein
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	ja, nein	Z. n. Myokardinfarkt	ja, nein
exzentrische Hypertrophie LV	ja, nein	Z. n. PCI	ja, nein
Geschlecht	männlich, weiblich	Z. n. Schlaganfall	ja, nein
ICM	ja, nein	Z. n. TIA	ja, nein
KHK	ja, nein	Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	ja, nein
konzentrische Hypertrophie LV	ja, nein		

Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8.

Von den 46 Patienten der DIAST-Kohorte wurden die in Tabelle 12 und Tabelle 13 dargestellten Parameter in die statistischen Analysen dieser Arbeit einbezogen.

Tabelle 12: Metrische Parameter im Datensatz der DIAST-Kohorte

Metrischer Parameter	Einheit	Metrischer Parameter	Einheit
Alter	Jahre	Gesamtüberleben	Tage
BMI	kg/m²		

Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8.

Tabelle 13: Kategoriale Parameter im Datensatz der DIAST-Kohorte

Kategorialer Parameter	Kategorien	Kategorialer Parameter	Kategorien
Geschlecht	männlich, weiblich	KHK	ja, nein

Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8.

Für die drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* wurde im Labor von jedem Patienten in einer Blutprobe der Anteil der Promotormethylierung relativ zum Input gemessen. Diese Daten der drei Kohorten wurden, wie in Tabelle 14 dargestellt, in die statistischen Analysen einbezogen.

Tabelle 14: Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*

Parameter	Einheit
methylierte *ATP2A2*-DNA	relativ zum Input
methylierte *B9D1*-DNA	relativ zum Input
methylierte *RASAL1*-DNA	relativ zum Input

Die Promotormethylierung der drei untersuchten Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* ging wie dargestellt als Parameter in die statistischen Analysen der vorliegenden Arbeit ein.

In den drei Kohorten folgten die Werte der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut einer lognormalen Verteilung (Abbildung 1).

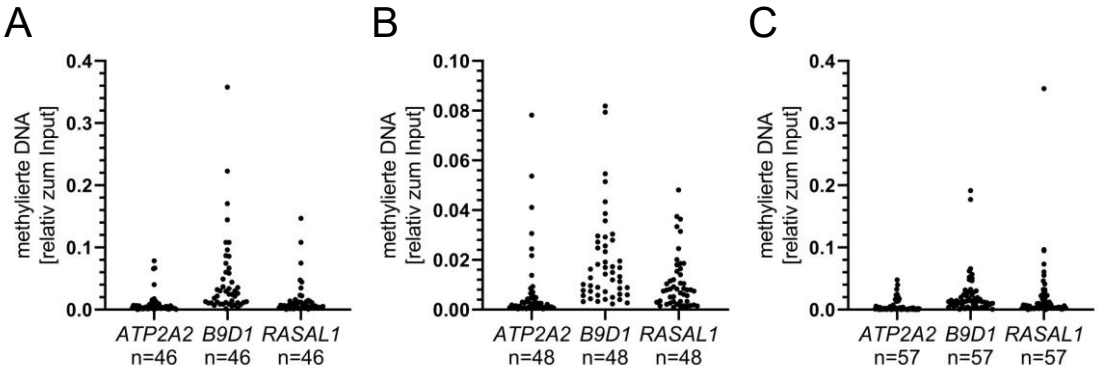

Abbildung 1: Lognormale Verteilung der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in den drei untersuchten Kohorten. Darstellung der Messwerte der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* für (**A**) die DIAST-Kohorte, (**B**) die HFpEF-Kohorte und (**C**) die TAVI-Kohorte. Darstellung der Messwerte der Promotormethylierung als Punktwolke für die drei untersuchten Gene in einem gemeinsamen Graphen je Kohorte. Auf der y-Achse ist die im Blut gemessene Promotormethylierung aufgetragen. Auf der x-Achse sind die drei untersuchten Gene aufgetragen. n, Anzahl.

Damit die Messwerte der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* für die geplanten statistischen Analysen die Bedingung der Normalverteilung erfüllten, wurden die Werte der Promotormethylierung aller drei Gene in den drei Kohorten logarithmiert. Anschließend stellten sich die Daten wie in Abbildung 2 zu sehen dar. Anhand der Betrachtung von QQ-Plots wurde die Normalverteilung der Werte überprüft und bestätigt.

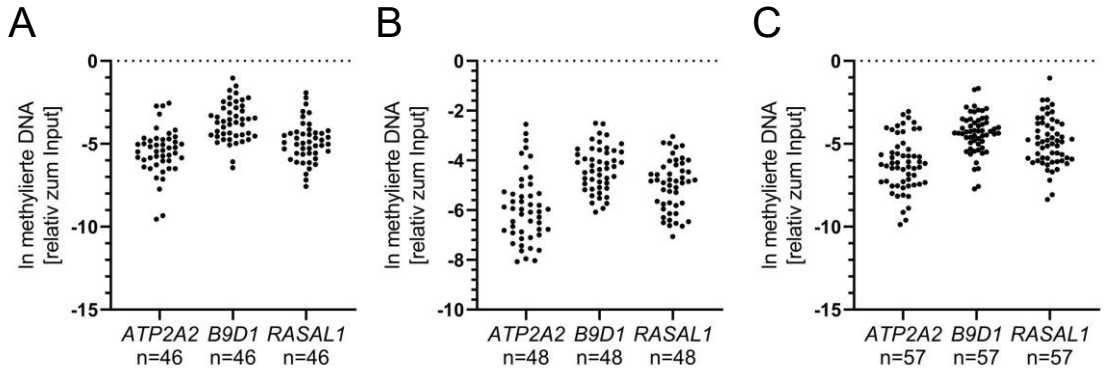

Abbildung 2: Normalverteilung der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* nach Transformation mithilfe des natürlichen Logarithmus in den drei untersuchten Kohorten. Darstellung der Messwerte der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* nach Transformation mithilfe des natürlichen Logarithmus für (**A**) die DIAST-Kohorte, (**B**) die HFpEF-Kohorte und (**C**) die TAVI-Kohorte. Darstellung der Messwerte der Promotormethylierung als Punktwolke für die drei untersuchten Gene in einem gemeinsamen Graphen je Kohorte. Auf der y-Achse ist die im Blut gemessene Promotormethylierung nach Transformation mithilfe des natürlichen Logarithmus aufgetragen. Auf der x-Achse sind die drei untersuchten Gene aufgetragen. ln, natürlicher Logarithmus; n, Anzahl.

Es wurde der natürliche Logarithmus genutzt, der in dieser Arbeit mit „ln“ abgekürzt wird. Die Entscheidung für den natürlichen Logarithmus beruht auf der besseren Vergleichbarkeit mit den Modellberechnungen in Kapitel 3.4, für die ebenfalls der natürliche Logarithmus verwendet wurde. Im Folgenden wird, wenn dort nicht anders erwähnt, auf die logarithmierten Werte der Promotormethylierung eingegangen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2, B9D1* und *RASAL1*

Parameter	Einheit
ln methylierte *ATP2A2*-DNA	relativ zum Input
ln methylierte *B9D1*-DNA	relativ zum Input
ln methylierte *RASAL1*-DNA	relativ zum Input

Der natürliche Logarithmus der Promotormethylierung der drei untersuchten Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* ging wie dargestellt als Parameter in die statistischen Analysen der vorliegenden Arbeit ein. ln, natürlicher Logarithmus.

In Kapitel 3.1 bis 3.3 dieser Arbeit wurden die statistischen Methoden deskriptive Statistik, lineare Regression, Welch-Test und einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-korrigierten Post-hoc-Tests genutzt, die im Folgenden näher erläutert werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert und in Tabellen und Abbildungen wurde ein $p < 0{,}05$ mit *, ein $p < 0{,}01$ mit ** und ein $p < 0{,}001$ mit *** markiert.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden die Parameter Anzahl (n), absolute Häufigkeit, relative Häufigkeit, Median, 25. Perzentil, 75. Perzentil, Mittelwert und Standardabweichung in Tabellen beschrieben. Im Fließtext erfolgte die Ergebnisdarstellung in Form von „Mittelwert ± Standardabweichung“ und in Form von „absoluter Häufigkeit (relativer Häufigkeit)“. Zur graphischen Präsentation ausgewählter Daten wurden Box-Plots genutzt. Die Box umfasste Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellte den Median dar. Ein Plus stellte den Mittelwert dar und wurde auf Höhe der Achse der Fühler der Box eingezeichnet. Die Fühler der Box endeten jeweils am Minimal- bzw. Maximalwert der Daten oder am Ende der Abbildung.

Anlehnend an Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg wurde mithilfe linearer Regressionen nach Zusammenhängen zwischen metrischen Parametern und der Promotormethylierung gesucht. Um die Bedingung der Normalverteilung der Residuen, die mithilfe von QQ-Plots visuell geprüft wurde, bestmöglich zu erfüllen, wurden die logarithmierten Werte der Promotormethylierung genutzt. Es wurden nur für metrische Parameter mit mindestens sechs Werten lineare Regressionen durchgeführt, da bei weniger Werten keine sinnvolle Testung auf eine Normalverteilung möglich war. Da multiple statistische Tests für die gleiche Hypothese durchgeführt wurden, wurde die Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur angewendet. Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen wurden in Tabellen unter Angabe von n, abhängiger und unabhängiger Variable, p-Wert, adjustiertem p-Wert nach Bonferroni-Korrektur, Steigung, oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls der Steigung und r^2 präsentiert. Im Fließtext erfolgte die Ergebnisdarstellung in Form einer Nennung signifikanter p-Werte. Ergaben sich signifikante Zusammenhänge nach der Bonferroni-Korrektur, wurden diese Ergebnisse graphisch als Punktwolke mit Regressionsgerade präsentiert. Die unabhängige Variable wurde auf der x-Achse und die abhängige Variable auf der y-Achse dargestellt. Zudem wurde zu jeder Regression jeweils n, r^2 und der p-Wert nach Bonferroni-Korrektur angegeben.

Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Promotormethylierung und kategorialen Parametern mit zwei Kategorien wurden einheitlich ungepaarte Welch-Tests durchgeführt, da die Bedingung der Varianzhomogenität der Gruppen für den ungepaarten t-Test nicht durchgehend erfüllt war. Um die Bedingung der Normalverteilung der Werte bestmöglich zu erfüllen, wurden die logarithmierten Werte der Promotormethylierung genutzt. Es wurden nur Parameter mit mindestens drei Werten je Kategorie betrachtet. Da auch hier multiple statistische Tests für die gleiche Hypothese durchgeführt wurden, wurde ebenfalls die Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur angewendet. Die Ergebnisse der Analysen wurden in Tabellen unter Angabe von n sowie Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe präsentiert. Zusätzlich wurde jeweils der im Test ermittelte p-Wert und der adjustierte p-Wert nach Bonferroni-Korrektur angegeben. Im Fließtext erfolgte die Ergebnisdarstellung in Form von „Mittelwert ± Standardabweichung“ mit Angabe signifikanter p-Werte.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs der Promotormethylierung und kategorialer Parameter mit mehr als zwei Kategorien wurde die einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Die Bedingung der

Varianzhomogenität der Gruppen wurde durch das Betrachten zugehöriger Box-Plots geprüft. Um die Bedingung der Normalverteilung der Werte bestmöglich zu erfüllen, wurden für die Analysen die logarithmierten Werte der Promotormethylierung genutzt. Bei signifikantem Ergebnis in der ANOVA wurden Bonferroni-korrigierte Post-hoc-Tests durchgeführt und es wurde für jeden einzelnen Gruppenvergleich der Bonferroni-adjustierte p-Wert angegeben. Da multiple statistische Tests für die gleiche Hypothese durchgeführt wurden, fand für jede ANOVA eine Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur statt. Die Ergebnisse der Analysen wurden in Tabellen unter Angabe von n sowie Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe präsentiert. Zudem wurde jeweils der in der ANOVA ermittelte p-Wert und der adjustierte p-Wert nach Bonferroni-Korrektur genannt. Im Fließtext erfolgte die Ergebnisdarstellung in Form von „Mittelwert ± Standardabweichung“ mit Angabe signifikanter p-Werte.

Die statistischen Berechnungen in Kapitel 3.4 wurden von der MBSB durchgeführt. Es wurde das Statistikprogramm „R“ mit den Erweiterungspaketen *„survival“*, *„cmprsk“* und *„MatchIt“* benutzt. Es wurden verschiedene statistische Methoden angewendet, die im Folgenden näher erläutert werden.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden die Parameter n, absolute Häufigkeit, relative Häufigkeit, Median, Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Im Rahmen der Untersuchung des Einflusses verschiedener Parameter auf das Überleben wurden Cox-Regressionen durchgeführt. Für jeden einfließenden Parameter wurden n, p-Wert, Hazard Ratio und 95%-Konfidenzintervall des Hazard Ratios beschrieben. Zu jedem Modell wurde die Anzahl an Events in der Kohorte angegeben. Als Event war das Versterben definiert. Zur Beschreibung der globalen Güte des Gesamtmodells gab es zu jedem Modell Angaben zum globalen p-Wert, *akaike information criterion* (AIC) und *concordance index*. Um die Bedingung der Normalverteilung der Residuen, als Voraussetzung der Cox-Regression, zu erfüllen, wurden die lognormal verteilten Rohdaten der Promotormethylierung mithilfe des natürlichen Logarithmus in eine Normalverteilung transformiert. Die Entscheidung für den natürlichen Logarithmus fiel aus Gründen der einfachen mathematischen Anwendbarkeit. In Kapitel 3.4 wird daher, wenn dort nicht anders erwähnt, auf die logarithmierten Werte der Promotormethylierung eingegangen. Die Ergebnisse der Cox-Regressionen wurden graphisch in Forest-Plots mit Darstellung des Hazard Ratios als Kästchen und des 95%-Konfidenzintervalls des Hazard Ratios als horizontale Linie durch das Kästchen veranschaulicht. Es wurde eine senkrechte Nulleffekt-Linie eingezeichnet, welche die x-Achse bei 1 schneidet. Auf der x-Achse wurde der positive Wertebereich des Hazard Ratios, beim Wert 1 beginnend, aufgetragen.

Im weiteren Verlauf wurden die Ergebnisse der Cox-Regressionen in Form von vier Modellen auf zwei neuen Kohorten, die HFpEF- und TAVI-Kohorte, übertragen. Hierbei wurde für jeden Patienten ein individueller Risikowert berechnet. Der in dieser Arbeit auch als „*risk*“ bezeichnete Risikowert blieb bei den folgenden Betrachtungen dimensionslos, da nur eine vergleichende Betrachtung der Risikowerte untereinander stattfand. Zum Vergleich metrischer Variablen von zwei Gruppen wurden ungepaarte Welch-Tests durchgeführt. Da innerhalb der Gruppen die Bedingung der Normalverteilung, nicht aber

die Bedingung der Varianzhomogenität, erfüllt war, kam hier der ungepaarte Welch-Test statt dem ungepaarten t-Test zur Anwendung. War neben der Bedingung der Varianzhomogenität auch die Bedingung der Normalverteilung nicht erfüllt, wurde bis zu einer Gruppengröße von $n \geq 10$ der Brunner-Munzel-Test genutzt und bei einer Gruppengröße von $n < 10$ wurde statt dem Brunner-Munzel-Test der studentisierte Permutationstest genutzt. Für den Vergleich metrischer Variablen von drei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt, da die Bedingungen der Normalverteilung und Varianzhomogenität für eine einfaktorielle ANOVA nicht erfüllt waren. Beim Vergleich kategorialer Variablen fanden Exakte Fisher-Tests Anwendung, da vom Chi-Quadrat-Test bei kleiner Stichprobengröße Abstand genommen wurde. Ergänzend zum p-Wert wurden auch Angaben zur deskriptiven Statistik der betrachteten Gruppen gemacht. Es wurden n, Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum je Gruppe genannt. Für einen Teil der Ergebnisse wurden Box-Plots zur graphischen Präsentation der Daten genutzt. Die Box umfasste Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellte den Median dar, die Fühler der Box endeten am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. In ausgewählten Abbildungen wurde zudem der p-Wert dargestellt. Es fand eine Betrachtung von Überlebensdaten statt. Daten zum Gesamtüberleben wurden nach Berechnung per Kaplan-Meier-Verfahren in Kaplan-Meier-Kurven präsentiert. Sprünge in der Kurve symbolisierten Events, senkrechte Striche in der Kurve Zensierungen, die mediane Überlebenszeit wurde als gestrichelte Linie veranschaulicht, das 95%-Konfidenzintervall der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde als Konfidenzband dargestellt. Das ereignisspezifische Überleben wurde in Abhängigkeit von den konkurrierenden Ereignissen kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben nach Berechnung per Aalen-Johansen-Schätzer in kumulativen Inzidenzkurven dargestellt. Sprünge in der Kurve symbolisierten Events. Das 95%-Konfidenzintervall der Eventwahrscheinlichkeit wurde je Kurve als Konfidenzband dargestellt. Kaplan-Meier-Kurven wurden mithilfe von Log-Rank-Tests analysiert, kumulative Inzidenzkurven mithilfe von nicht-parametrischen Gray-Tests. Es wurde jeweils der p-Wert angegeben. Mit der *number at risk* wurde die Anzahl der Patienten genannt, die zum jeweiligen Zeitpunkt noch kein Event hatten und die sich folglich zum jeweiligen Zeitpunkt unter dem Risiko für ein Event befanden.

Es wurde ein *Propensity Score Matching* zwischen DIAST- und TAVI-Kohorte sowie zwischen DIAST- und HFpEF-Kohorte durchgeführt. Das *Matching* fand auf der Basis einer logistischen Regression mit zwei *Outcome*-Levels statt, die jeweils einer der zwei Kohorten entsprachen. Einfließende Parameter waren Alter, Body-Mass-Index (BMI), Geschlecht, KHK und die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*. Für jeden Patienten ergab sich bei Anwendung des Regressionsmodells ein *Propensity Score*. Es fand anschließend ein *Caliper*-basiertes *Matching* statt. Es wurde ein *Cut-off* für den *Caliper* von $\pm 0{,}25$ Standardabweichungen des *Propensity Scores* gewählt. Alle Patienten ohne *Matching*-Partner wurden im entsprechenden Teil der Arbeit von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Anschließend wurden auch auf diese Subkohorten der TAVI- und HFpEF-Kohorte nach dem *Matching* die Cox-Regressionen in Form der vier Modelle übertragen.

Da die Originalergebnisse der MBSB in Englisch verfasst wurden, ist in den Originalabbildungen die englische Nomenklatur verwendet worden und ein Punkt als Dezimaltrennzeichen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert. Von einem statistischen Trend wurde in diesem Teil der Arbeit bei einem $p \leq 0{,}1$ gesprochen. In Tabellen wurde ein $p < 0{,}05$ mit *, ein $p < 0{,}01$ mit **, ein $p < 0{,}001$ mit *** markiert. Als signifikant markierte p-Werte von 0,05 entsprachen hier aufgerundeten Werten und sind der Angabe einer einheitlichen Anzahl an Nachkommastellen in diesem Abschnitt der Arbeit geschuldet. Wenn erforderlich, erfolgte die Adjustierung des p-Werts bei multiplem Testen im jeweiligen Abschnitt mit der Bonferroni-Holm Methode unter Angabe des p-Werts vor und nach Adjustierung.

2.3.8 Patientenparameter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 8 bis Tabelle 13 aufgeführten Patientenparameter untersucht. In Tabelle 16 sind nähere Erläuterungen zu ausgewählten klinischen Parametern aufgeführt.

Tabelle 16: Erläuterungen zu ausgewählten klinischen Parametern der untersuchten Kohorten

Parameter	Erläuterung
6MGT Distanz	6MGT, 6-Minuten-Gehtest
Adipositas	HFpEF-, TAVI-Kohorte: nach Vorgaben der WHO, BMI ≥ 30,0 kg/m² (WHO - Regional Office for Europe 2020)
BMI	Body-Mass-Index
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid; HFpEF-Kohorte: aus EDTA-Plasma; genereller Referenzbereich Männer ≤ 121,0 pg/ml, Frauen ≤ 266,0 pg/ml; zusätzliche alters- und geschlechtsabhängige Referenzbereiche: Männer ≤ 54 Jahre ≤ 40,0 pg/ml, Frauen ≤ 54 Jahre ≤ 111,0 pg/ml, Männer ≤ 64 Jahre ≤ 80,0 pg/ml, Frauen ≤ 64 Jahre ≤ 155,0 pg/ml, Männer ≤ 74 Jahre ≤ 150,0 pg/ml, Frauen ≤ 74 Jahre ≤ 159,0 pg/ml (UMG-Laborstandard)
chronische Lungenerkrankung	TAVI-Kohorte: COPD oder Lungenfibrose
CKD-Stadium	CKD, *chronic kidney disease;* HFpEF-, TAVI-Kohorte: Einteilung entsprechend der Leitlinie der KDIGO aus 2013 je nach eGFR in die Stadien G1, G2, G3a, G3b, G4, G5 (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group 2013)
CM(andere)	Kardiomyopathie; TAVI-Kohorte: nicht dilatative und nicht ischämische Kardiomyopathie
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRT-D	Kardiale Resynchronisationstherapie mit Defibrillator
DCM	dilatative Kardiomyopathie
Diabetes mellitus	HFpEF-, TAVI-Kohorte: keine Differenzierung in verschiedene Diabetestypen
eGFR	*estimated glomerular filtration rate;* HFpEF-, TAVI-Kohorte: mit der Kreatinin-basierten CKD-EPI-Formel von 2009 (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group 2013; Levey et al. 2009) berechnete geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (siehe auch Tabelle 17)
EUROScore	*European System for Cardiac Operative Risk Evaluation Score*
Gesamtüberleben	Zeitspanne in Tagen vom Studieneintritt bis zum Tod jedweder Art
ICM	ischämische Kardiomyopathie
kardiovaskulär-spezifisches Überleben	TAVI-Kohorte: Zeitspanne in Tagen vom Studieneintritt bis zum Tod kardiovaskulärer Ursache
KHK	koronare Herzkrankheit; HFpEF-, TAVI-Kohorte: mindestens eine Stenose der Koronararterien ≥ 50% in einer Herzkatheteruntersuchung; DIAST-Kohorte: 1) Fragebogen Seite B3: Hat Ihnen ein Arzt gesagt, dass Sie eine Erkrankung der Herzkranzgefäße haben? Ja 2) Z. n. PTCA 3) Z. n. Bypassoperation

Parameter	Erläuterung
KOF	Körperoberfläche; HFpEF-, TAVI-Kohorte: berechnet mit der DuBois-Formel KOF [m²] = 0,007184 · Größe [cm]^{0,725} · Gewicht [kg]^{0,425} (Du Bois und Du Bois 1916)
Kreatinin(P)	Kreatinin im Plasma; HFpEF-, TAVI-Kohorte: aus Heparinat-Plasma, Referenzbereich: Männer 0,7 − 1,2 mg/dl, Frauen 0,5 − 1,0 mg/dl (UMG-Laborstandard)
LDL-Cholesterin	*low-density lipoprotein;* TAVI-Kohorte: aus Heparinat-Plasma, Zielbereich < 115 mg/dl (UMG-Laborstandard)
MLHFQ	*Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire*
NT-proBNP	N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid; HFpEF-, TAVI-Kohorte: aus Heparinat-Plasma, Referenzbereich < 200 pg/ml (UMG-Laborstandard)
NYHA-Klasse	NYHA, New York Heart Association; TAVI-Kohorte: NYHA-Klassifikation zur Einteilung der Herzinsuffizienz
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
Präadipositas	HFpEF-, TAVI-Kohorte: nach Vorgaben der WHO, BMI 25,0 − 29,9 kg/m² (WHO - Regional Office for Europe 2020)
RR diastolisch, RR systolisch	RR, Blutdruck; HFpEF-Kohorte: nichtinvasive Messung des systolischen und diastolischen Blutdrucks mit der Methode nach Riva-Rocci und Korotkoff
STS-Score	*Society of Thoracic Surgeons-Score*
Z. n. CABG	CABG, Koronararterienbypass
Z. n. PCI	PCI, perkutane koronare Intervention
Z. n. TIA	TIA, transitorische ischämische Attacke
Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	TAVI-Kohorte: Z. n. Schlaganfall und/oder TIA

Ergänzende Erläuterungen zu ausgewählten klinischen Parametern, die in dieser Arbeit untersucht wurden, teilweise ergänzt um spezifische Details für die jeweils genannte Kohorte. Die in der Tabelle genannten Parameter und zugehörige Abkürzungen werden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht zusätzlich im Abkürzungsverzeichnis genannt. EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; KDIGO, Kidney Disease: Improving Global Outcomes; UMG, Universitätsmedizin Göttingen; WHO, World Health Organization.

Zur Berechnung der Nierenfunktion der Patienten in der TAVI- und HFpEF-Kohorte wurde die *estimated glomerular filtration rate* (eGFR) in der vorliegenden Arbeit mit der CKD-EPI-Formel von 2009 errechnet (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group 2013; Levey et al. 2009). Laut der Organisation Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) soll dabei für Patienten mit nicht hellem Hauttyp eine angepasste Formel verwendet werden (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group 2013). Dieses Merkmal betraf in den drei untersuchten Kohorten keinen der Patienten, sodass die Berechnung mit den in Tabelle 17 dargestellten Versionen der CKD-EPI-Formel erfolgte.

Tabelle 17: CKD-EPI-Formel zur Berechnung der Nierenfunktion

Geschlecht	Kreatinin(P)	CKD-EPI-Formel
weiblich	≤ 0,7 mg/dl	$144 \cdot (\text{Kreatinin(P)} : 0{,}7)^{-0{,}329} \cdot 0{,}993^{\text{Alter}}$
weiblich	> 0,7 mg/dl	$144 \cdot (\text{Kreatinin(P)} : 0{,}7)^{-1{,}209} \cdot 0{,}993^{\text{Alter}}$
männlich	≤ 0,9 mg/dl	$141 \cdot (\text{Kreatinin(P)} : 0{,}9)^{-0{,}411} \cdot 0{,}993^{\text{Alter}}$
männlich	> 0,9 mg/dl	$141 \cdot (\text{Kreatinin(P)} : 0{,}9)^{-1{,}209} \cdot 0{,}993^{\text{Alter}}$

Definition der in dieser Arbeit genutzten CKD-EPI-Formel von 2009 in Abhängigkeit der Ausprägung der Parameter Geschlecht und Kreatinin(P) zur Berechnung der Nierenfunktion. Kreatinin(P), Kreatinin im Plasma. Tabelle modifiziert nach Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2013).

In den Kohorten wurden echokardiographische Parameter mithilfe der TTE und der TEE erhoben. Hierfür wurde das gängige Vorgehen zur Echokardiographie der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen angewandt. Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Parametern sind in Tabelle 18 zu finden. Diese Informationen verdanke ich dem ärztlichen Team der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Tabelle 18: Erläuterungen zu den echokardiographischen Parametern der untersuchten Kohorten

Parameter [Einheit]	Erläuterung
AI	Vorhandensein einer Aortenklappeninsuffizienz, in der TEE bestimmt, Einordnung anhand des virtuellen echokardiographischen Eindrucks
AI Grad	Grad der Aortenklappeninsuffizienz, in der TEE bestimmt, Graduierung des Schweregrades der Klappeninsuffizienz nach dem virtuellen echokardiographischen Eindruck; Grad 0 = keine Klappeninsuffizienz, Grad I = leichtgradig, Grad II = mittelgradig, Grad III = schwergradig
AI PHT [ms]	Druckhalbwertszeit bei Aortenklappeninsuffizienz
AI Vena contracta [mm]	Vena contracta bei Aortenklappeninsuffizienz
AK Pmax [mmHg]	maximaler Druckgradient über der Aortenklappe
AK Pmean [mmHg]	mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe
AK Vmax [m/s]	maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe
AÖF(Vmax) [cm²]	Aortenklappenöffnungsfläche, berechnet nach der Kontinuitätsgleichung unter Einbezug von maximalen Flussgeschwindigkeiten
AÖF(VTI) [cm²]	Aortenklappenöffnungsfläche, berechnet nach der Kontinuitätsgleichung unter Einbezug von Geschwindigkeits-Zeit-Integralen
AÖFI [cm²/m² KOF]	Aortenklappenöffnungsflächen-Index, Berechnung = AÖF(VTI) : KOF
Aorta(sinus) [mm]	größter Durchmesser des Sinus Valsalva der Aorta
E [cm/s]	maximale frühdiastolische Einstromgeschwindigkeit über der Mitralklappe im PW-Doppler, maximale Geschwindigkeit der E-Welle
E/e' mittel	linksventrikulärer Füllungsindex, Berechnung = E : ((e' septal + e' lateral) : 2)
e' lateral [cm/s]	frühe diastolische Spitzengeschwindigkeit im Gewebedoppler im Mitralklappen-Anulus der lateralen Wand
e' septal [cm/s]	frühe diastolische Spitzengeschwindigkeit im Gewebedoppler im Mitralklappen-Anulus der septalen Wand
exzentrische Hypertrophie LV	vorhanden, wenn RWD ≤ 0,42 und LVMI > 95 g/m² KOF (Frauen) bzw. LVMI > 115 g/m² KOF (Männer)
globaler AP4 Strain [%]	AP4, apikaler 4-Kammer-Blick; Bestimmung per Speckle-Tracking-Echokardiographie, longitudinaler Strain des linken Ventrikels im apikalen 4-Kammer-Blick, Berechnung: Mittelwert aller Segmente des linken Ventrikels im apikalen 4-Kammer-Blick
GLS [%]	Bestimmung per Speckle-Tracking-Echokardiographie, globaler longitudinaler Strain des linken Ventrikels, Berechnung: Mittelwert aller Segmente des linken Ventrikels im apikalen 2-, 3- und 4-Kammer-Blick
HW [mm]	Hinterwand; enddiastolische Dicke der posterioren Wand des linken Ventrikels
IVS [mm]	interventrikuläres Septum; enddiastolische Dicke der anteroseptalen Wand des linken Ventrikels
konzentrische Hypertrophie LV	vorhanden, wenn RWD > 0,42 und LVMI > 95 g/m² KOF (Frauen) bzw. LVMI > 115 g/m² KOF (Männer)
konzentrisches Remodeling LV	vorhanden, wenn RWD > 0,42 und LVMI ≤ 95 g/m² KOF (Frauen) bzw. LVMI ≤ 115 g/m² KOF (Männer)
LA [mm]	linksatrialer endsystolischer Durchmesser
LAVI [ml/m² KOF]	linksatrialer Volumenindex, Berechnung = linksatriales Volumen : KOF
LVEDD [mm]	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEDV [ml]	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen, bestimmt mit der Scheibchensummationsmethode nach Simpson
LVEF nS [%]	linksventrikuläre Ejektionsfraktion nach Simpson, bestimmt mit der Scheibchensummationsmethode nach Simpson, Berechnung = ((LVEDV - LVESV) : LVEDV) · 100

Parameter [Einheit]	**Erläuterung**
LVEF visuell [%]	linksventrikuläre Ejektionsfraktion visuell bestimmt
LVESD [mm]	linksventrikulärer endsystolischer Diameter
LVESV [ml]	linksventrikuläres endsystolisches Volumen, bestimmt mit der Scheibchensummationsmethode nach Simpson
LVMI [g/m² KOF]	linksventrikulärer Massenindex, Berechnung = linksventrikuläre Masse : KOF
LVOT [mm]	Breite des linksventrikulären Ausflusstrakts
MI	siehe AI, äquivalent an der Mitralklappe
MI EROA [cm²]	EROA, *effective regurgitant orifice area;* effektive Regurgitationsöffnungsfläche bei Mitralklappeninsuffizienz nach der PISA-Methode
MI-Grad	siehe AI-Grad, äquivalent an der Mitralklappe
MI PISA Rad. [mm]	PISA, *proximal isovelocity surface area;* PISA-Radius, Radius der proximalen Flusskonvergenzzone bei Mitralklappeninsuffizienz
MI Regurg. Vol. [ml/Schlag]	Regurgitationsvolumen pro Schlag bei Mitralklappeninsuffizienz
MI Vena contracta [mm]	Vena contracta bei Mitralklappeninsuffizienz
MK Pmax [mmHg]	maximaler Druckgradient über der Mitralklappe
MÖF(kontin) [cm²]	Mitralklappenöffnungsfläche, berechnet nach der Kontinuitätsgleichung
MÖF(PHT) [cm²]	Mitralklappenöffnungsfläche, berechnet anhand der Druckhalbwertszeit
MÖF(planimetrisch) [cm²]	Mitralklappenöffnungsfläche, planimetrisch bestimmt
MS Pmean [mmHg]	mittlerer diastolischer Druckgradient über der Mitralklappe bei Mitral-klappenstenose
normale Geometrie LV	vorhanden, wenn RWD ≤ 0,42 und LVMI ≤ 95 g/m² KOF (Frauen) bzw. LVMI ≤ 115 g/m² KOF (Männer)
PAPsys [mmHg]	systolischer pulmonalarterieller Druck
PAT [ms]	pulmonalarterielle Akzelerationszeit
RVD 1 [mm]	rechtsventrikulärer Diameter 1, maximaler enddiastolischer Durchmesser des rechten Ventrikels innerhalb seines basalen Drittels
RVD 2 [mm]	rechtsventrikulärer Diameter 2, maximaler enddiastolischer Durchmesser des rechten Ventrikels innerhalb seines mittleren Drittels
RVD 3 [mm]	rechtsventrikulärer Diameter 3, enddiastolische longitudinale Abmessung von der Trikuspidalklappenebene bis zur rechten Ventrikelspitze
RWD	relative Wanddicke, Berechnung = (2 · HW) : LVEDD
SV nS [ml]	Schlagvolumen nach Simpson, berechnet mit der Scheibchensummationsmethode nach Simpson, Berechnung = LVEDV - LVESV
SV mD [ml]	Schlagvolumen mittels Dopplermethode bestimmt, berechnet am LVOT, Berechnung = Fläche(LVOT) · VTI(LVOT) mit Fläche(LVOT) = π · ((Durchmesser(LVOT) : 2)²
SVI [ml/m² KOF]	Schlagvolumenindex, mittels Dopplermethode bestimmt, Berechnung = SV mD : KOF
TAPSE [mm]	TAPSE, t*ricuspid annular plane systolic excursion;* systolische Aufwärtsbewegung des Trikuspidalklappenanulus
TI	siehe AI, äquivalent an der Trikuspidalklappe
TI-Grad	siehe AI-Grad, äquivalent an der Trikuspidalklappe
TI Pmax [mmHg]	maximaler Druckgradient über der Trikuspidalklappe bei Trikuspidalklappeninsuffizienz
TI Vena contracta [mm]	Vena contracta bei Trikuspidalklappeninsuffizienz
TI Vmax [m/s]	maximale Flussgeschwindigkeit über der Trikuspidalklappe bei Trikuspidalklappeninsuffizienz
V(LVOT)max [m/s]	maximale Flussgeschwindigkeit im linksventrikulären Ausflusstrakt
VTI(Ao) [cm]	Geschwindigkeits-Zeit-Integral über der Aortenklappe
VTI(LVOT) [cm]	Geschwindigkeits-Zeit-Integral im linksventrikulären Ausflusstrakt
VTI(MI) [cm]	Geschwindigkeits-Zeit-Integral des Mitralklappeninsuffizienz-Flusssignals
ZVD(geschätzt) [mmHg]	geschätzter zentralvenöser Druck

Ergänzende Erläuterungen zu den echokardiographischen Parametern, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Die in der Tabelle genannten Parameter und zugehörige Abkürzungen werden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht zusätzlich im Abkürzungsverzeichnis genannt. AI, Aortenklappeninsuffizienz; AK, Aortenklappe; LV, linker Ventrikel; MI, Mitralklappeninsuffizienz; MK, Mitralklappe; MS, Mitralklappenstenose; TI, Trikuspidalklappeninsuffizienz.

3 Ergebnisse

Für diese Arbeit wurde die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in Blutproben von Patienten der HFpEF-, TAVI- und DIAST-Kohorte bestimmt. Hierfür wurde zunächst die DNA aus Blutproben isoliert. Anschließend wurde antikörpervermittelt per MeDIP der Anteil methylierter DNA separiert, sodass daraufhin in einer qRT-PCR der Anteil der Promotormethylierung der drei Gene relativ zu einem Input gemessen werden konnte (siehe auch Kapitel 2.3).

3.1 Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in den untersuchten Kohorten

In den drei Kohorten wurde zunächst die Promotormethylierung der untersuchten Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut mithilfe von Methoden der deskriptiven Statistik betrachtet. Details zum statistischen Vorgehen sind in Kapitel 2.3.7 zu finden.

3.1.1 HFpEF-Kohorte

In der HFpEF-Kohorte zeigte sich eine lognormal verteilte Promotormethylierung der drei Gene im Blut, wie in Abbildung 3 dargestellt (siehe auch Abbildung 1 in Kapitel 2.3.7). Es ergab sich eine mittlere Promotormethylierung für *ATP2A2* von 0,0077 (± 0,0150) relativ zum Input, für *B9D1* von 0,0193 (± 0,0182) relativ zum Input und für *RASAL1* von 0,0109 (± 0,0109) relativ zum Input (Tabelle 19).

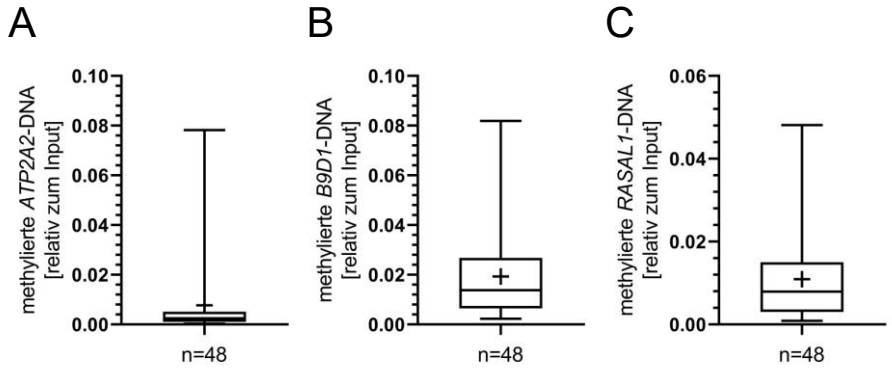

Abbildung 3: Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in der HFpEF-Kohorte. Darstellung der Promotormethylierung der drei Gene (**A**) *ATP2A2*, (**B**) *B9D1* und (**C**) *RASAL1*. Auf der y-Achse ist jeweils die im Blut gemessene Promotormethylierung eines der Gene aufgetragen. Darstellung der Daten als Box-Plot. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar. Ein Plus stellt den Mittelwert dar und wurde auf Höhe der Achse der Fühler der Box eingezeichnet. Die Fühler der Box enden jeweils am Minimal- bzw. Maximalwert der Daten oder am Ende der Abbildung. n, Anzahl.

Tabelle 19: HFpEF-Kohorte – deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*

	methylierte *ATP2A2*-DNA [relativ zum Input]	**methylierte *B9D1*-DNA [relativ zum Input]**	**methylierte *RASAL1*-DNA [relativ zum Input]**
n	48	48	48
M	0,0077	0,0193	0,0109
SD	0,0150	0,0182	0,0109
Md	0,0024	0,0138	0,0079
25. Perzentil	0,0010	0,0064	0,0030
75. Perzentil	0,0051	0,0268	0,0150

Für die Promotormethylierung der drei untersuchten Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median.

3.1.2 TAVI-Kohorte

In der TAVI-Kohorte zeigte sich ebenfalls eine lognormal verteilte Promotormethylierung der drei Gene im Blut, wie in Abbildung 4 dargestellt (siehe auch Abbildung 1 in Kapitel 2.3.7). Es ergab sich eine mittlere Promotormethylierung für *ATP2A2* von 0,0063 (± 0,0103) relativ zum Input, für *B9D1* von 0,0241 (± 0,0348) relativ zum Input und für *RASAL1* von 0,0219 (± 0,0501) relativ zum Input (Tabelle 20).

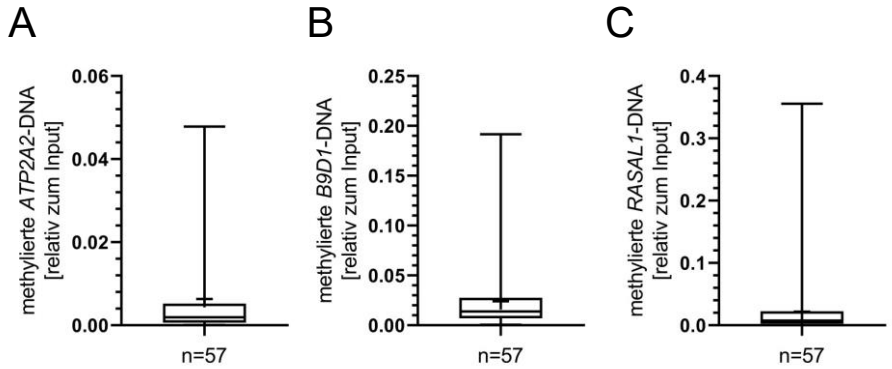

Abbildung 4: Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in der TAVI-Kohorte. Darstellung der Promotormethylierung der drei Gene (**A**) *ATP2A2*, (**B**) *B9D1* und (C) *RASAL1*. Auf der y-Achse ist jeweils die im Blut gemessene Promotormethylierung eines der Gene aufgetragen. Darstellung der Daten als Box-Plot. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar. Ein Plus stellt den Mittelwert dar und wurde auf Höhe der Achse der Fühler der Box eingezeichnet. Die Fühler der Box enden jeweils am Minimal- bzw. Maximalwert der Daten oder am Ende der Abbildung. n, Anzahl.

Tabelle 20: TAVI-Kohorte – deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*

	methylierte *ATP2A2*-DNA [relativ zum Input]	**methylierte *B9D1*-DNA [relativ zum Input]**	**methylierte *RASAL1*-DNA [relativ zum Input]**
n	57	57	57
M	0,0063	0,0241	0,0219
SD	0,0103	0,0348	0,0501
Md	0,0019	0,0139	0,0076
25. Perzentil	0,0006	0,0069	0,0026
75. Perzentil	0,0052	0,0276	0,0226

Für die Promotormethylierung der drei untersuchten Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median.

3.1.3 DIAST-Kohorte

Auch in der DIAST-Kohorte zeigte sich eine lognormal verteilte Promotormethylierung der drei Gene im Blut, wie in Abbildung 5 dargestellt (siehe auch Abbildung 1 in Kapitel 2.3.7). Es ergab sich eine mittlere Promotormethylierung für *ATP2A2* von 0,0101 (± 0,0174) relativ zum Input, für *B9D1* von 0,0492 (± 0,0662) relativ zum Input und für *RASAL1* von 0,0165 (± 0,0280) relativ zum Input (Tabelle 21).

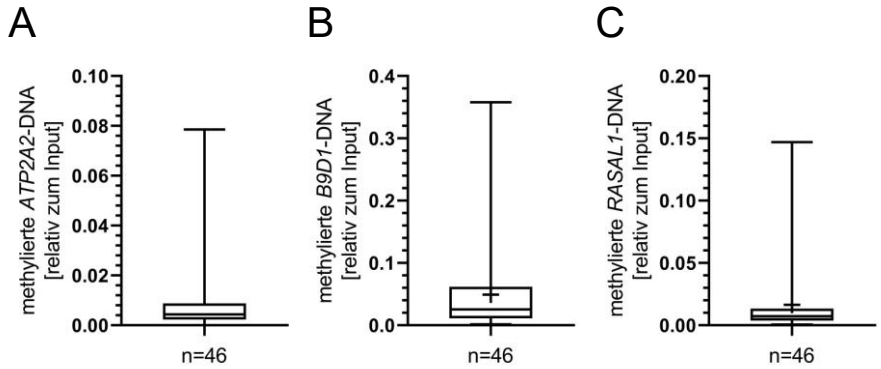

Abbildung 5: Deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in der DIAST-Kohorte. Darstellung der Promotormethylierung der drei Gene (**A**) *ATP2A2*, (**B**) *B9D1* und (C) *RASAL1*. Auf der y-Achse ist jeweils die im Blut gemessene Promotormethylierung eines der Gene aufgetragen. Darstellung der Daten als Box-Plot. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar. Ein Plus stellt den Mittelwert dar und wurde auf Höhe der Achse der Fühler der Box eingezeichnet. Die Fühler der Box enden jeweils am Minimal- bzw. Maximalwert der Daten oder am Ende der Abbildung. n, Anzahl.

Tabelle 21: DIAST-Kohorte – deskriptive Betrachtung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*

	methylierte *ATP2A2*-DNA [relativ zum Input]	methylierte *B9D1*-DNA [relativ zum Input]	methylierte *RASAL1*-DNA [relativ zum Input]
n	46	46	46
M	0,0101	0,0492	0,0165
SD	0,0174	0,0662	0,0280
Md	0,0044	0,0255	0,0072
25. Perzentil	0,0023	0,0110	0,0038
75. Perzentil	0,0088	0,0617	0,0134

Für die Promotormethylierung der drei untersuchten Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median.

3.2 Charakterisierung der untersuchten Kohorten anhand klinischer Parameter

Zur näheren Charakterisierung der drei untersuchten Kohorten, wurden die klinischen Parameter mithilfe von Methoden der deskriptiven Statistik näher betrachtet. Details zum statistischen Vorgehen werden in Kapitel 2.3.7 genannt. Nähere Erläuterungen zu den untersuchten klinischen Parametern und zugehörigen Abkürzungen sind in Kapitel 2.3.8 zu finden. Abkürzungen der klinischen Parameter, die nur in Tabellen und Abbildungen genannt werden und nicht im Fließtext vorkommen, sind aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nur in Kapitel 2.3.8 und nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

3.2.1 HFpEF-Kohorte

Die HFpEF-Kohorte setzte sich aus 48 Patienten zusammen, davon waren 31 (64,6%) weiblich und 17 (35,4%) männlich. Das mittlere Alter bei Blutentnahme betrug 76,6 (± 9,4) Jahre. In der Kohorte hatten alle Patienten eine LVEF ≥ 45%, die mittlere LVEF lag bei 54,7 (± 3,7) %, sodass im Durchschnitt eine erhaltene LVEF vorlag. Zudem war bei allen Patienten E/e' mittel ≥ 12 (aufgerundet ab E/e' mittel ≥ 11,5). Mit einem mittleren BMI von 27,4 (± 5,1) kg/m² lag im Durchschnitt eine Präadipositas vor. Die Nierenfunktion war bei einer mittleren eGFR von 60,7 (± 24,6) ml/min/1,73 m² im Durchschnitt erhalten. In Tabelle 22 und Tabelle 23 werden alle metrischen und kategorialen Parameter deskriptiv beschrieben, die von der Kohorte vorlagen.

Tabelle 22: HFpEF-Kohorte – deskriptive Charakterisierung metrischer Parameter

Parameter [Einheit]	n	M	SD	Md	25. Perzentil	75. Perzentil
AI PHT [ms]	5	554,8	81,0	546,0	478,5	635,5
AI Vena contracta [mm]	5	4,4	1,9	4,0	3,0	6,0
AK Pmax [mmHg]	48	30,0	24,5	21,0	12,3	41,3
AK Pmean [mmHg]	48	17,4	15,7	11,0	6,5	21,5
AK Vmax [m/s]	48	2,5	1,1	2,3	1,8	3,4
Alter [Jahre]	48	76,6	9,4	78,0	69,5	83,0
AÖF(Vmax) [cm²]	4	1,1	0,2	1,1	1,0	1,3
AÖF(VTI) [cm²]	26	1,3	0,7	1,1	0,8	1,7
AÖFI [cm²/m² KOF]	24	0,7	0,3	0,6	0,5	0,9
Aorta(sinus) [mm]	25	28,4	3,3	28,0	26,5	30,0
BMI [kg/m²]	48	27,4	5,1	27,0	24,1	29,9

Parameter [Einheit]	n	M	SD	Md	25. Perzentil	75. Perzentil
BNP [pg/ml]	11	498,1	473,6	325,0	112,5	797,9
E [cm/s]	48	108,6	28,8	105,9	93,4	127,0
E/e' mittel	48	18,9	6,0	17,2	14,8	21,3
e' lateral [cm/s]	48	6,9	2,2	7,0	5,0	8,4
e' septal [cm/s]	48	5,1	1,6	4,8	3,9	6,0
eGFR [ml/min/1,73 m²]	48	60,7	24,6	62,0	46,3	85,0
Gewicht [kg]	48	74,7	18,0	73,0	60,3	87,8
Größe [cm]	48	164,4	9,9	165,0	158,0	171,5
HW [mm]	47	13,0	2,1	13,0	12,0	14,0
IVS [mm]	47	14,1	2,4	13,0	12,0	16,0
KOF [m²]	48	1,8	0,2	1,8	1,6	2,0
Kreatinin(P) [mg/dl]	48	1,3	1,1	1,0	0,8	1,3
LA [mm]	21	39,5	8,1	43,0	34,5	45,0
LAVI [ml/m² KOF]	44	51,0	16,7	48,1	36,2	61,0
LVEDD [mm]	47	43,7	7,2	45,0	39,0	49,0
LVEF visuell [%]	48	54,7	3,7	55,0	55,0	55,0
LVESD [mm]	27	29,3	7,2	30,0	25,0	34,0
LVMI [g/m² KOF]	22	122,6	26,8	117,7	102,2	142,4
LVOT [mm]	27	20,6	1,6	21,0	20,0	21,0
MI EROA [cm²]	10	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
MI PISA Rad. [mm]	12	4,9	1,5	5,0	4,0	6,0
MI Regurg. Vol. [ml/Schlag]	11	23,1	10,4	21,0	14,0	30,0
MI Vena contracta [mm]	13	4,6	1,0	4,5	4,0	5,0
MK Pmax [mmHg]	8	7,9	1,2	8,0	7,0	8,8
MÖF(kontin) [cm²]	17	2,1	0,7	2,0	1,6	2,6
MÖF(PHT) [cm²]	4	2,6	0,7	2,6	2,0	3,2
MÖF(planimetrisch) [cm²]	6	2,0	0,7	1,8	1,6	2,2
MS Pmean [mmHg]	31	2,9	1,2	3,0	2,0	3,0
NT-proBNP [pg/ml]	34	1761,0	2520,0	693,6	285,3	1673,0
PAPsys [mmHg]	35	39,7	10,3	41,0	32,0	45,0
PAT [ms]	8	114,4	32,4	114,0	82,0	146,3
RR diastolisch [mmHg]	48	73,9	11,3	75,0	67,0	80,0
RR systolisch [mmHg]	48	130,5	17,9	130,0	120,0	140,0
RVD 1 [mm]	17	37,7	7,0	37,0	32,0	42,5
RVD 2 [mm]	17	24,4	5,4	24,0	20,0	28,5
RVD 3 [mm]	15	70,7	11,2	72,0	59,0	83,0
RWD	47	0,6	0,2	0,6	0,5	0,7
SVI [ml/m² KOF]	26	49,3	16,0	45,8	39,4	53,7
TAPSE [mm]	45	22,7	5,2	23,0	18,9	27,3
TI Pmax [mmHg]	39	31,3	6,8	31,0	27,0	36,2
TI Vena contracta [mm]	4	5,5	1,0	5,0	5,0	6,5
TI Vmax [m/s]	39	2,8	0,3	2,8	2,6	3,0
V(LVOT)max [m/s]	30	1,2	0,4	1,1	0,8	1,4
VTI(Ao) [cm]	48	61,4	29,1	51,5	39,9	80,0
VTI(LVOT) [cm]	30	27,9	10,1	25,7	21,0	33,3
VTI(MI) [cm]	11	188,2	44,5	193,0	147,0	215,0
ZVD(geschätzt) [mmHg]	31	8,1	5,4	5,0	5,0	10,0

Für jeden metrischen Parameter wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median.

Tabelle 23: HFpEF-Kohorte – deskriptive Charakterisierung kategorialer Parameter

Parameter	n	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
Adipositas	48	12	25,0%
arterielle Hypertonie	48	46	95,8%
CKD-Stadium G1	48	5	10,4%
CKD-Stadium G2	48	20	41,7%
CKD-Stadium G3a	48	12	25,0%
CKD-Stadium G3b	48	5	10,4%
CKD-Stadium G4	48	3	6,3%
CKD-Stadium G5	48	3	6,3%
Diabetes mellitus	48	21	43,8%
Dialyse	48	3	6,3%
Dihydralazin	48	4	8,3%
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	48	6	12,5%
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	48	23	47,9%
exzentrische Hypertrophie LV	22	1	4,5%
Geschlecht männlich	48	17	35,4%
Geschlecht weiblich	48	31	64,6%
KHK	48	27	56,3%
konzentrische Hypertrophie LV	22	16	72,7%
konzentrisches Remodeling LV	22	5	22,7%
normale Geometrie LV	22	0	0,0%
Präadipositas	48	19	39,6%

Für jeden kategorialen Parameter wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl.

3.2.2 TAVI-Kohorte

Die TAVI-Kohorte setzte sich aus 57 Patienten, 25 (43,9%) weiblichen und 32 (56,1%) männlichen, zusammen. Das mittlere Alter bei TAVI betrug 79,5 (± 6,3) Jahre. In der Kohorte lag im Durchschnitt mit 52,8 (± 14,0) % eine erhaltene LVEF vor. Der BMI lag im Mittel bei 28,3 (± 5,7) kg/m², womit im Durchschnitt eine Präadipositas vorlag. Die Nierenfunktion war bei einer mittleren eGFR von 59,4 (± 20,5) ml/min/1,73 m² im Durchschnitt fast normwertig. In Tabelle 24 und Tabelle 25 werden alle metrischen und kategorialen Parameter deskriptiv beschrieben, die von der Kohorte vorlagen.

Tabelle 24: TAVI-Kohorte – deskriptive Charakterisierung metrischer Parameter

Parameter [Einheit]	n	M	SD	Md	25. Perzentil	75. Perzentil
6MGT Distanz [m]	49	218,0	122,0	224,0	131,0	320,5
AK Pmean [mmHg]	57	37,7	17,0	38,0	25,5	43,5
AK Vmax [m/s]	57	3,9	0,8	4,1	3,3	4,3
Alter [Jahre]	57	79,5	6,3	80,0	76,0	84,0
AÖF(VTI) [cm²]	57	0,7	0,2	0,8	0,6	0,9
AÖFI [cm²/m² KOF]	57	0,4	0,1	0,4	0,3	0,5
BMI [kg/m²]	57	28,3	5,7	27,6	24,2	30,8
E [cm/s]	20	108,8	30,2	104,5	82,4	137,5
E/e' mittel	21	18,0	6,7	17,9	12,9	21,4
eGFR [ml/min/1,73 m²]	57	59,4	20,5	60,0	46,5	78,5
EuroSCORE II [%]	47	6,7	6,9	4,4	1,9	9,1
globaler AP4 Strain [%]	53	-15,9	5,3	-16,6	-20,1	-12,3
GLS [%]	53	-15,4	4,6	-16,1	-19,1	-12,3
HW [mm]	57	13,5	1,8	13,0	12,5	15,0
IVS [mm]	57	15,5	2,2	15,0	14,0	17,0
KOF [m²]	57	1,9	0,2	1,9	1,8	2,0
Kreatinin(P) [mg/dl]	57	1,2	0,8	1,1	0,9	1,3
LAVI [ml/m² KOF]	50	47,6	13,9	45,5	38,8	57,0

Parameter [Einheit]	n	M	SD	Md	25. Perzentil	75. Perzentil
LDL-Cholesterin [mg/dl]	44	100,5	38,9	102,0	68,0	123,0
logistischer EuroSCORE [%]	46	23,7	21,6	15,0	7,5	33,5
LVEDD [mm]	57	45,5	7,6	44,0	40,0	50,0
LVEDV [ml]	56	83,1	38,5	75,1	58,9	98,0
LVEF nS [%]	57	52,8	14,0	55,0	43,2	64,5
LVESD [mm]	56	34,6	9,1	34,0	29,0	39,0
LVESV [ml]	56	43,1	34,7	33,0	22,1	51,0
LVMI [g/m² KOF]	57	143,0	40,2	132,2	113,8	175,8
MLHFQ [Punkte]	56	39,3	18,8	44,0	22,3	51,0
NT-proBNP [pg/ml]	47	4237,0	6963,0	1938,0	657,6	4465,0
PAPsys [mmHg]	45	46,8	17,3	42,0	33,5	55,0
RWD	57	0,6	0,1	0,6	0,5	0,7
STS-Score [%]	46	3,9	3,5	2,5	1,2	6,0
SV mD [ml]	56	69,7	21,6	67,6	56,3	80,1
SV nS [ml]	56	40,0	13,0	37,6	32,0	44,8
SVI [ml/m² KOF]	56	36,5	10,9	34,4	28,8	43,7
TAPSE [mm]	49	20,1	4,5	19,0	16,5	23,0

Für jeden metrischen Parameter wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median.

Tabelle 25: TAVI-Kohorte – deskriptive Charakterisierung kategorialer Parameter

Parameter	n	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
Adipositas	57	17	29,8%
AI	57	36	63,2%
AI Grad 0	57	21	36,8%
AI Grad I	57	22	38,6%
AI Grad II	57	13	22,8%
AI Grad III	57	1	1,8%
arterielle Hypertonie	57	53	93,0%
chronische Lungenerkrankung	57	11	19,3%
CKD-Stadium G1	57	3	5,3%
CKD-Stadium G2	57	26	45,6%
CKD-Stadium G3a	57	15	26,3%
CKD-Stadium G3b	57	8	14,0%
CKD-Stadium G4	57	4	7,0%
CKD-Stadium G5	57	1	1,8%
CM(andere)	57	10	17,5%
COPD	57	9	15,8%
CRT-D	57	1	1,8%
DCM	57	1	1,8%
Diabetes mellitus	57	22	38,6%
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	57	5	8,8%
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	57	28	49,1%
exzentrische Hypertrophie LV	57	6	10,5%
Geschlecht männlich	57	32	56,1%
Geschlecht weiblich	57	25	43,9%
ICM	57	9	15,8%
KHK	57	42	73,7%
konzentrische Hypertrophie LV	57	42	73,7%
konzentrisches Remodeling LV	57	9	15,8%
Lungenfibrose	57	2	3,5%
MI	57	53	93,0%
MI Grad 0	57	4	7,0%
MI Grad I	57	36	63,2%
MI Grad II	57	14	24,6%
MI Grad III	57	3	5,3%
normale Geometrie LV	57	0	0,0%
NYHA-Klasse I	57	6	10,5%

Parameter	n	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
NYHA-Klasse II	57	13	22,8%
NYHA-Klasse III	57	33	57,9%
NYHA-Klasse IV	57	5	8,8%
pAVK	57	12	21,1%
Präadipositas	57	19	33,3%
TI	56	51	91,1%
TI Grad 0	56	5	8,9%
TI Grad I	56	34	60,7%
TI Grad II	56	13	23,2%
TI Grad III	56	4	7,1%
Vorhofflimmern	57	21	36,8%
Z. n. CABG	57	8	14,0%
Z. n. Myokardinfarkt	57	13	22,8%
Z. n. PCI	57	21	36,8%
Z. n. Schlaganfall	57	8	14,0%
Z. n. TIA	57	4	7,0%
Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	57	11	19,3%

Für jeden kategorialen Parameter wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl.

3.2.3 DIAST-Kohorte

Die DIAST-Kohorte setzte sich aus 46 Patienten, 31 (67,4%) weiblichen und 15 (32,6%) männlichen zusammen. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt Null betrug 72,9 (± 8,6) Jahre. Der BMI lag im Mittel bei 32,4 (± 7,2) kg/m², womit im Durchschnitt eine Adipositas vorlag. Da die Auswahl der Kohorte bereits im Rahmen einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg erfolgte, war zusätzlich bekannt, dass alle Patienten eine LVEF ≥ 45% und E/e' mittel ≥ 12 aufwiesen. In Tabelle 26 und Tabelle 27 werden alle metrischen und kategorialen klinischen Parameter deskriptiv beschrieben, die von der Kohorte vorlagen und in die statistischen Analysen von Kapitel 3.4 eingingen.

Tabelle 26: DIAST-Kohorte – deskriptive Charakterisierung metrischer Parameter

Parameter [Einheit]	n	M	SD	Md	25. Perzentil	75. Perzentil
Alter [Jahre]	46	72,9	8,6	72,5	67,8	79,5
BMI [kg/m²]	46	32,4	7,2	30,8	27,0	36,3

Für jeden metrischen Parameter wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median.

Tabelle 27: DIAST-Kohorte – deskriptive Charakterisierung kategorialer Parameter

Parameter	n	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
Geschlecht männlich	46	15	32,6%
Geschlecht weiblich	46	31	67,4%
KHK	46	14	30,4%

Für jeden kategorialen Parameter wurden Parameter der deskriptiven Statistik berechnet. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl.

3.3 Korrelation der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* mit klinischen Parametern

Die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut wurde auf Zusammenhänge mit verschiedenen klinischen Parametern der HFpEF- und TAVI-Kohorte untersucht. Zur Untersuchung metrischer klinischer Parameter wurden lineare Regressionen durchgeführt. Zur Untersuchung kategorialer klinischer Parameter mit zwei Kategorien wurden ungepaarte Welch-Tests durchgeführt. Kategoriale klinische Parameter mit mehr als zwei Kategorien wurde per einfaktorieller ANOVA analysiert und bei Signifikanz folgten Bonferroni-korrigierte Post-hoc-Tests. Weitere Details zum statistischen Vorgehen sind in Kapitel 2.3.7 zu finden. In Kapitel 2.3.8 sind nähere Erläuterungen zu den untersuchten klinischen Parametern und zugehörigen Abkürzungen zu finden. Abkürzungen der klinischen Parameter, die nur in Abbildungen und Tabellen genannt werden und nicht im Fließtext vorkommen, sind aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nur in Kapitel 2.3.8 und nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

3.3.1 HFpEF-Kohorte

In der HFpEF-Kohorte zeigte sich für den Großteil der metrischen klinischen Parameter kein signifikanter linearer Zusammenhang mit der Promotormethylierung der drei Gene (Tabelle 28 bis Tabelle 30). Ein signifikanter linearer Zusammenhang ergab sich für das Gen *ATP2A2* vor Adjustierung des p-Werts mit den Parametern LA ($p = 0{,}0176$) und RVD 2 ($p = 0{,}0191$) jeweils im Sinne einer niedrigeren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Zudem ergab sich für das Gen *ATP2A2* vor Adjustierung des p-Werts mit dem Parameter SVI ein signifikanter linearer Zusammenhang ($p = 0{,}0470$) im Sinne einer höheren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Für das Gen *B9D1* ergab sich vor Adjustierung des p-Werts mit den Parametern Aorta(sinus) ($p = 0{,}0137$) und BNP ($p = 0{,}0003$) ein signifikanter linearer Zusammenhang jeweils im Sinne einer höheren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Für das Gen *RASAL1* ergab sich vor Adjustierung des p-Werts nur mit dem Parameter BNP ($p = 0{,}0427$) ein signifikanter linearer Zusammenhang im Sinne einer höheren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Nach der Bonferroni-Korrektur zeigte sich nur für die Promotormethylierung des Gens *B9D1* und den Parameter BNP weiterhin ein signifikanter linearer Zusammenhang ($p = 0{,}0195$) im Sinne einer höheren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters (Abbildung 6).

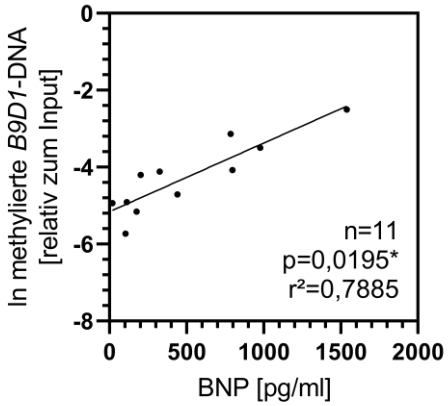

Abbildung 6: Signifikante positive lineare Korrelation der *B9D1*-Promotormethylierung mit dem metrischen klinischen Parameter BNP in der HFpEF-Kohorte. Nach der Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur ergab sich für die Promotormethylierung von *B9D1* und den Parameter BNP ein signifikanter positiver linearer Zusammenhang. Abgebildet ist der Graph zur linearen Regressionsanalyse in Form einer Punktwolke mit Regressionsgerade unter Angabe von n, adjustiertem p-Wert nach Bonferroni-Korrektur und r^2. Die unabhängige Variable, der Parameter BNP, ist auf der x-Achse und die abhängige Variable, die *B9D1*-Promotormethylierung, ist auf der y-Achse aufgetragen. Ein $p < 0,05$ ist mit * markiert. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl.

Tabelle 28: Darstellung der Ergebnisse linearer Regressionen der *ATP2A2*-Promotormethylierung und metrischer Parameter in der HFpEF-Kohorte

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r²
AK Pmax [mmHg]	48	0,0940	1,0000	0,0137	-0,0024	0,0297	0,0598
AK Pmean [mmHg]	48	0,0826	1,0000	0,0221	-0,0030	0,0472	0,0641
AK Vmax [m/s]	48	0,1279	1,0000	0,2858	-0,0852	0,6568	0,0497
Alter [Jahre]	48	0,3416	1,0000	-0,0205	-0,0634	0,0224	0,0197
AÖF(VTI) [cm²]	26	0,9770	1,0000	-0,0109	-0,7832	0,7614	0,0000
AÖFI [cm²/m² KOF]	24	0,9177	1,0000	-0,0789	-1,6450	1,4870	0,0005
Aorta(sinus) [mm]	25	0,9342	1,0000	0,0055	-0,1320	0,1431	0,0003
BMI [kg/m²]	48	0,4020	1,0000	-0,0330	-0,1115	0,0455	0,0153
BNP [pg/ml]	11	0,2413	1,0000	0,0012	-0,0009	0,0032	0,1488
E [cm/s]	48	0,7986	1,0000	-0,0018	-0,0159	0,0123	0,0014
E/e' mittel	48	0,6085	1,0000	-0,0173	-0,0846	0,0501	0,0057
e' lateral [cm/s]	48	0,4269	1,0000	0,0744	-0,1124	0,2611	0,0138
e' septal [cm/s]	48	0,7175	1,0000	0,0464	-0,2102	0,3031	0,0029
eGFR [ml/min/1,73 m²]	48	0,5280	1,0000	0,0052	-0,0112	0,0216	0,0087
Gewicht [kg]	48	0,3220	1,0000	-0,0111	-0,0333	0,0112	0,0213
Größe [cm]	48	0,5032	1,0000	-0,0137	-0,0544	0,0271	0,0098
HW [mm]	47	0,5285	1,0000	0,0620	-0,1347	0,2588	0,0089
IVS [mm]	47	0,4173	1,0000	-0,0699	-0,2420	0,1021	0,0147
KOF [m²]	48	0,3470	1,0000	-0,7780	-2,4260	0,8701	0,0193
Kreatinin(P) [mg/dl]	48	0,4426	1,0000	-0,1383	-0,4976	0,2211	0,0129
LA [mm]	21	0,0176*	1,0000	-0,0754	-0,1361	-0,0147	0,2622
LAVI [ml/m² KOF]	44	0,5688	1,0000	0,0073	-0,0183	0,0328	0,0078
LVEDD [mm]	47	0,3515	1,0000	-0,0265	-0,0831	0,0301	0,0193
LVEF visuell [%]	48	0,7793	1,0000	-0,0153	-0,1247	0,0941	0,0017
LVESD [mm]	27	0,3303	1,0000	0,0357	-0,0383	0,1096	0,0379
LVMI [g/m² KOF]	22	0,7850	1,0000	-0,0032	-0,0276	0,0212	0,0038
LVOT [mm]	27	0,8632	1,0000	0,0263	-0,2853	0,3380	0,0012

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r²
MI EROA [cm²]	10	0,4268	1,0000	7,5000	-13,1600	28,1600	0,0806
MI PISA Rad. [mm]	12	0,4572	1,0000	0,1665	-0,3133	0,6464	0,0564
MI Regurg. Vol. [ml/Schlag]	11	0,4651	1,0000	0,0258	-0,0507	0,1023	0,0607
MI Vena contracta [mm]	13	0,9457	1,0000	0,0181	-0,5542	0,5904	0,0004
MK Pmax [mmHg]	8	0,7104	1,0000	-0,1592	-1,1600	0,8414	0,0247
MÖF(kontin) [cm²]	17	0,3819	1,0000	0,3020	-0,4126	1,0170	0,0513
MÖF(planimetrisch) [cm²]	6	0,3497	1,0000	-0,6704	-2,4290	1,0890	0,2187
MS Pmean [mmHg]	31	0,6153	1,0000	-0,1093	-0,5494	0,3308	0,0088
NT-proBNP [pg/ml]	34	0,7673	1,0000	0,0000	-0,0002	0,0002	0,0028
PAPsys [mmHg]	35	0,1977	1,0000	-0,0271	-0,0691	0,0149	0,0498
PAT [ms]	8	0,8560	1,0000	0,0037	-0,0442	0,0516	0,0059
RR diastolisch [mmHg]	48	0,2338	1,0000	0,0212	-0,0142	0,0565	0,0307
RR systolisch [mmHg]	48	0,5158	1,0000	0,0073	-0,0152	0,0299	0,0092
RVD 1 [mm]	17	0,2254	1,0000	-0,0541	-0,1452	0,0371	0,0963
RVD 2 [mm]	17	0,0191*	1,0000	-0,1264	-0,2289	-0,0238	0,3149
RVD 3 [mm]	15	0,1489	1,0000	-0,0431	-0,1037	0,0176	0,1534
RWD	47	0,4187	1,0000	0,9663	-1,4180	3,3510	0,0146
SVI [ml/m² KOF]	26	0,0470*	1,0000	0,0301	0,0004	0,0597	0,1544
TAPSE [mm]	45	0,5213	1,0000	-0,0262	-0,1079	0,0555	0,0096
TI Pmax [mmHg]	39	0,2564	1,0000	-0,0334	-0,0921	0,0253	0,0347
TI Vmax [m/s]	39	0,1987	1,0000	-0,7889	-2,0100	0,4325	0,0442
V(LVOT)max [m/s]	30	0,2398	1,0000	0,6759	-0,4769	1,8290	0,0490
VTI(Ao) [cm]	48	0,1303	1,0000	0,0104	-0,0032	0,0240	0,0491
VTI(LVOT) [cm]	30	0,1379	1,0000	0,0371	-0,0127	0,0869	0,0769
VTI(MI) [cm]	11	0,8608	1,0000	-0,0017	-0,0235	0,0200	0,0036
ZVD(geschätzt) [mmHg]	31	0,9944	1,0000	0,0003	-0,0829	0,0835	0,0000

Für jeden metrischen Parameter sind die Ergebnisse einer linearen Regression mit der Promotormethylierung von *ATP2A2* dargestellt; abhängige Variable: methylierte *ATP2A2*-DNA [relativ zum Input]; unabhängige Variablen: jeweils der in der Tabelle dargestellte metrische Parameter; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; adjust., adjustierter; KI, Konfidenzintervall; u., untere; o., obere.

Tabelle 29: Darstellung der Ergebnisse linearer Regressionen der *B9D1*-Promotormethylierung und metrischer Parameter in der HFpEF-Kohorte

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r²
AK Pmax [mmHg]	48	0,4233	1,0000	0,0043	-0,0065	0,0151	0,0140
AK Pmean [mmHg]	48	0,5493	1,0000	0,0051	-0,0118	0,0220	0,0078
AK Vmax [m/s]	48	0,4079	1,0000	0,1026	-0,1447	0,3498	0,0149
Alter [Jahre]	48	0,2579	1,0000	0,0159	-0,0121	0,0439	0,0277
AÖF(VTI) [cm²]	26	0,9399	1,0000	-0,0182	-0,5099	0,4736	0,0002
AÖFI [cm²/m² KOF]	24	0,6299	1,0000	-0,2312	-1,2130	0,7501	0,0107
Aorta(sinus) [mm]	25	0,0137*	0,8905	0,1050	0,0236	0,1864	0,2366
BMI [kg/m²]	48	0,7284	1,0000	0,0090	-0,0428	0,0607	0,0026
BNP [pg/ml]	11	0,0003***	0,0195*	0,0018	0,0011	0,0025	0,7885
E [cm/s]	48	0,1165	1,0000	-0,0071	-0,0161	0,0018	0,0527
E/e' mittel	48	0,1341	1,0000	-0,0327	-0,0758	0,0105	0,0481
e' lateral [cm/s]	48	0,9919	1,0000	-0,0006	-0,1237	0,1224	0,0000
e' septal [cm/s]	48	0,7201	1,0000	0,0301	-0,1379	0,1981	0,0028
eGFR [ml/min/1,73 m²]	48	0,0952	1,0000	-0,0089	-0,0194	0,0016	0,0593
Gewicht [kg]	48	0,6175	1,0000	-0,0037	-0,0184	0,0110	0,0055
Größe [cm]	48	0,1533	1,0000	-0,0189	-0,0451	0,0073	0,0438
HW [mm]	47	0,4540	1,0000	0,0488	-0,0813	0,1788	0,0125

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r²
IVS [mm]	47	0,9511	1,0000	-0,0035	-0,1183	0,1113	0,0001
KOF [m²]	48	0,3702	1,0000	-0,4854	-1,5650	0,5942	0,0175
Kreatinin(P) [mg/dl]	48	0,4608	1,0000	0,0870	-0,1484	0,3223	0,0119
LA [mm]	21	0,6040	1,0000	0,0106	-0,0314	0,0525	0,0144
LAVI [ml/m² KOF]	44	0,2090	1,0000	0,0106	-0,0062	0,0273	0,0373
LVEDD [mm]	47	0,9275	1,0000	0,0017	-0,0361	0,0396	0,0002
LVEF visuell [%]	48	0,5833	1,0000	-0,0196	-0,0910	0,0518	0,0066
LVESD [mm]	27	0,7103	1,0000	-0,0093	-0,0605	0,0418	0,0056
LVMI [g/m² KOF]	22	0,1913	1,0000	0,0094	-0,0051	0,0240	0,0838
LVOT [mm]	27	0,6385	1,0000	-0,0506	-0,2699	0,1686	0,0090
MI EROA [cm²]	10	0,5280	1,0000	4,1860	-10,4500	18,8200	0,0516
MI PISA Rad. [mm]	12	0,7270	1,0000	-0,0607	-0,4370	0,3157	0,0127
MI Regurg. Vol. [ml/Schlag]	11	0,7104	1,0000	-0,0102	-0,0704	0,0500	0,0161
MI Vena contracta [mm]	13	0,8701	1,0000	-0,0449	-0,6349	0,5452	0,0025
MK Pmax [mmHg]	8	0,3304	1,0000	-0,2535	-0,8393	0,3323	0,1574
MÖF(kontin) [cm²]	17	0,7161	1,0000	0,0987	-0,4690	0,6663	0,0091
MÖF(planimetrisch) [cm²]	6	0,9606	1,0000	0,0263	-1,3620	1,4140	0,0007
MS Pmean [mmHg]	31	0,1668	1,0000	-0,1658	-0,4049	0,0733	0,0649
NT-proBNP [pg/ml]	34	0,6133	1,0000	0,0000	-0,0001	0,0002	0,0081
PAPsys [mmHg]	35	0,7370	1,0000	0,0055	-0,0276	0,0387	0,0035
PAT [ms]	8	0,7245	1,0000	-0,0040	-0,0307	0,0226	0,0222
RR diastolisch [mmHg]	48	0,2461	1,0000	0,0135	-0,0096	0,0367	0,0291
RR systolisch [mmHg]	48	0,6907	1,0000	0,0029	-0,0119	0,0177	0,0035
RVD 1 [mm]	17	0,9643	1,0000	-0,0016	-0,0754	0,0722	0,0001
RVD 2 [mm]	17	0,9916	1,0000	0,0005	-0,0949	0,0958	0,0000
RVD 3 [mm]	15	0,8397	1,0000	-0,0049	-0,0564	0,0466	0,0033
RWD	47	0,8137	1,0000	0,1870	-1,4030	1,7770	0,0012
SVI [ml/m² KOF]	26	0,5956	1,0000	0,0059	-0,0167	0,0284	0,0119
TAPSE [mm]	45	0,8635	1,0000	-0,0045	-0,0567	0,0477	0,0007
TI Pmax [mmHg]	39	0,9837	1,0000	-0,0005	-0,0461	0,0452	0,0000
TI Vmax [m/s]	39	0,9154	1,0000	0,0504	-0,9039	1,0050	0,0003
V(LVOT)max [m/s]	30	0,1796	1,0000	0,4868	-0,2376	1,2110	0,0634
VTI(Ao) [cm]	48	0,4731	1,0000	0,0033	-0,0058	0,0123	0,0113
VTI(LVOT) [cm]	30	0,2419	1,0000	0,0187	-0,0133	0,0507	0,0486
VTI(MI) [cm]	11	0,2689	1,0000	-0,0068	-0,0198	0,0062	0,1336
ZVD(geschätzt) [mmHg]	31	0,2365	1,0000	0,0378	-0,0262	0,1018	0,0480

Für jeden metrischen Parameter sind die Ergebnisse einer linearen Regression mit der Promotormethylierung von *B9D1* dargestellt; abhängige Variable: methylierte *B9D1*-DNA [relativ zum Input]; unabhängige Variablen: jeweils der in der Tabelle dargestellte metrische Parameter; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; adjust., adjustierter; KI, Konfidenzintervall; u., untere; o., obere.

Tabelle 30: Darstellung der Ergebnisse linearer Regressionen der *RASAL1*-Promotormethylierung und metrischer Parameter in der HFpEF-Kohorte

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r²
AK Pmax [mmHg]	48	0,0783	1,0000	0,0109	-0,0013	0,0230	0,0659
AK Pmean [mmHg]	48	0,0866	1,0000	0,0165	-0,0025	0,0356	0,0625
AK Vmax [m/s]	48	0,0869	1,0000	0,2426	-0,0366	0,5217	0,0624
Alter [Jahre]	48	0,3719	1,0000	0,0146	-0,0180	0,0471	0,0174
AÖF(VTI) [cm²]	26	0,6947	1,0000	-0,1108	-0,6864	0,4648	0,0065
AÖFI [cm²/m² KOF]	24	0,4717	1,0000	-0,3735	-1,4310	0,6843	0,0238
Aorta(sinus) [mm]	25	0,0532	1,0000	0,0899	-0,0014	0,1811	0,1530

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r^2
BMI [kg/m²]	48	0,7145	1,0000	-0,0110	-0,0708	0,0489	0,0029
BNP [pg/ml]	11	0,0427*	1,0000	0,0015	0,0001	0,0030	0,3819
E [cm/s]	48	0,3818	1,0000	-0,0046	-0,0152	0,0059	0,0167
E/e' mittel	48	0,6076	1,0000	-0,0131	-0,0641	0,0379	0,0058
e' lateral [cm/s]	48	0,9912	1,0000	0,0008	-0,1416	0,1432	0,0000
e' septal [cm/s]	48	0,6520	1,0000	-0,0438	-0,2381	0,1504	0,0045
eGFR [ml/min/1,73 m²]	48	0,5659	1,0000	-0,0036	-0,0160	0,0089	0,0072
Gewicht [kg]	48	0,3368	1,0000	-0,0081	-0,0250	0,0087	0,0201
Größe [cm]	48	0,1992	1,0000	-0,0197	-0,0502	0,0108	0,0356
HW [mm]	47	0,1777	1,0000	0,1009	-0,0475	0,2492	0,0400
IVS [mm]	47	0,5465	1,0000	0,0399	-0,0924	0,1722	0,0081
KOF [m²]	48	0,2572	1,0000	-0,7084	-1,9510	0,5345	0,0278
Kreatinin(P) [mg/dl]	48	0,7448	1,0000	0,0445	-0,2291	0,3182	0,0023
LA [mm]	21	0,9437	1,0000	0,0017	-0,0489	0,0524	0,0003
LAVI [ml/m² KOF]	44	0,1265	1,0000	0,0145	-0,0043	0,0333	0,0547
LVEDD [mm]	47	0,9400	1,0000	-0,0016	-0,0454	0,0422	0,0001
LVEF visuell [%]	48	0,5032	1,0000	-0,0277	-0,1102	0,0549	0,0098
LVESD [mm]	27	0,6809	1,0000	0,0118	-0,0467	0,0703	0,0069
LVMI [g/m² KOF]	22	0,1269	1,0000	0,0141	-0,0044	0,0325	0,1125
LVOT [mm]	27	0,8014	1,0000	-0,0294	-0,2677	0,2088	0,0026
MI EROA [cm²]	10	0,3076	1,0000	8,7790	-9,8020	27,3600	0,1292
MI PISA Rad. [mm]	12	0,2663	1,0000	0,2432	-0,2171	0,7034	0,1217
MI Regurg. Vol. [ml/Schlag]	11	0,6364	1,0000	0,0155	-0,0563	0,0873	0,0259
MI Vena contracta [mm]	13	0,3380	1,0000	0,2700	-0,3233	0,8634	0,0836
MK Pmax [mmHg]	8	0,1917	1,0000	-0,4094	-1,0910	0,2717	0,2650
MÖF(kontin) [cm²]	17	0,9378	1,0000	-0,0220	-0,6139	0,5698	0,0004
MÖF(planimetrisch) [cm²]	6	0,8188	1,0000	0,0851	-0,8811	1,0510	0,0147
MS Pmean [mmHg]	31	0,2294	1,0000	-0,1872	-0,4990	0,1246	0,0494
NT-proBNP [pg/ml]	34	0,4877	1,0000	0,0001	-0,0001	0,0002	0,0152
PAPsys [mmHg]	35	0,7851	1,0000	0,0046	-0,0296	0,0388	0,0023
PAT [ms]	8	0,5690	1,0000	-0,0082	-0,0415	0,0251	0,0570
RR diastolisch [mmHg]	48	0,2355	1,0000	0,0160	-0,0108	0,0428	0,0305
RR systolisch [mmHg]	48	0,1696	1,0000	0,0116	-0,0052	0,0284	0,0406
RVD 1 [mm]	17	0,3860	1,0000	-0,0291	-0,0987	0,0404	0,0505
RVD 2 [mm]	17	0,8565	1,0000	-0,0080	-0,1001	0,0842	0,0023
RVD 3 [mm]	15	0,7583	1,0000	-0,0067	-0,0527	0,0393	0,0075
RWD	47	0,4750	1,0000	0,6546	-1,1760	2,4850	0,0114
SVI [ml/m² KOF]	26	0,2730	1,0000	0,0132	-0,0110	0,0373	0,0498
TAPSE [mm]	45	0,8116	1,0000	0,0075	-0,0555	0,0705	0,0013
TI Pmax [mmHg]	39	0,5124	1,0000	0,0160	-0,0331	0,0651	0,0117
TI Vmax [m/s]	39	0,4712	1,0000	0,3683	-0,6568	1,3940	0,0141
V(LVOT)max [m/s]	30	0,2098	1,0000	0,4837	-0,2881	1,2550	0,0556
VTI(Ao) [cm]	48	0,0737	1,0000	0,0093	-0,0009	0,0194	0,0679
VTI(LVOT) [cm]	30	0,1847	1,0000	0,0224	-0,0113	0,0561	0,0620
VTI(MI) [cm]	11	0,5562	1,0000	-0,0043	-0,0202	0,0116	0,0399
ZVD(geschätzt) [mmHg]	31	0,5981	1,0000	0,0175	-0,0497	0,0848	0,0097

Für jeden metrischen Parameter sind die Ergebnisse einer linearen Regression mit der Promotormethylierung von *RASAL1* dargestellt; abhängige Variable: methylierte *RASAL1*-DNA [relativ zum Input]; unabhängige Variablen: jeweils der in der Tabelle dargestellte metrische Parameter; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; adjust., adjustierter; KI, Konfidenzintervall; u., untere; o., obere.

Bei der Untersuchung der kategorialen klinischen Parameter mit zwei Kategorien zeigte sich für den Großteil der Parameter kein signifikanter Zusammenhang mit der Promotormethylierung der drei Gene (Tabelle 31 bis Tabelle 33). Es ergab sich für das Gen *ATP2A2* vor Adjustierung des p-Werts eine signifikant niedrigere Promotormethylierung (p = 0,0024) bei Patienten mit der Diagnose Diabetes mellitus (-6,58 ± 1,15) als bei Patienten ohne die Diagnose (-5,42 ± 1,32). Zudem ergab sich für das Gen *ATP2A2* vor Adjustierung des p-Werts eine signifikant niedrigere Promotormethylierung (p = 0,0189) bei Patienten, die das Medikament Dihydralazin einnahmen (-7,34 ± 0,78), im Vergleich zu Patienten ohne diese Medikation (-5,80 ± 1,34). Nach der Bonferroni-Korrektur zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge mehr. Für die Gene *B9D1* und *RASAL1* gab es insgesamt keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 31: Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²)	12	-6,26	1,27	0,3198	1,0000
BMI < 30 kg/m²	36	-5,82	1,40		
Diabetes mellitus	21	-6,58	1,15	0,0024**	0,1560
kein Diabetes mellitus	27	-5,42	1,32		
Dialyse	3	-5,87	2,28	0,9654	1,0000
keine Dialyse	45	-5,93	1,33		
Dihydralazin	4	-7,34	0,78	0,0189*	1,0000
kein Dihydralazin	44	-5,80	1,34		
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	6	-6,23	1,59	0,6295	1,0000
eGFR ≥ 30 ml/min/1,73 m²	42	-5,88	1,35		
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	23	-6,27	1,30	0,0988	1,0000
eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m²	25	-5,62	1,38		
Geschlecht männlich	17	-6,17	1,47	0,3834	1,0000
Geschlecht weiblich	31	-5,79	1,31		
KHK	27	-6,04	1,39	0,5380	1,0000
keine KHK	21	-5,79	1,36		
konzentrische Hypertrophie LV	16	-6,28	1,33	0,4231	1,0000
keine konzentrische Hypertrophie LV	6	-5,66	1,62		
konzentrisches Remodeling LV	5	-5,41	1,68	0,3147	1,0000
kein konzentrisches Remodeling LV	17	-6,32	1,30		
Präadipositas (BMI 25,0 – 29,9 kg/m²)	19	-5,86	1,48	0,8564	1,0000
BMI < 25,0 kg/m²	17	-5,77	1,34		

Für jeden kategorialen Parameter mit zwei Kategorien sind die Ergebnisse eines Welch-Tests der Betrachtung der Promotormethylierung von *ATP2A2* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 32: Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²)	12	-4,22	0,92	0,6390	1,0000
BMI < 30 kg/m²	36	-4,36	0,89		
Diabetes mellitus	21	-4,47	1,04	0,3649	1,0000
kein Diabetes mellitus	27	-4,22	0,77		
Dialyse	3	-4,05	0,62	0,4994	1,0000
keine Dialyse	45	-4,34	0,91		
Dihydralazin	4	-4,83	1,03	0,3721	1,0000
kein Dihydralazin	44	-4,28	0,88		
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	6	-4,10	0,58	0,3760	1,0000
eGFR ≥ 30 ml/min/1,73 m²	42	-4,36	0,93		
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	23	-4,38	0,70	0,7161	1,0000
eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m²	25	-4,28	1,06		
Geschlecht männlich	17	-4,45	0,90	0,4966	1,0000
Geschlecht weiblich	31	-4,26	0,90		
KHK	27	-4,30	0,84	0,7959	1,0000
keine KHK	21	-4,37	0,98		
konzentrische Hypertrophie LV	16	-4,47	0,81	0,5521	1,0000
keine konzentrische Hypertrophie LV	6	-4,77	1,07		
konzentrisches Remodeling LV	5	-4,70	1,18	0,7562	1,0000
kein konzentrisches Remodeling LV	17	-4,51	0,80		
Präadipositas (BMI 25,0 – 29,9 kg/m²)	19	-4,43	0,81	0,6333	1,0000
BMI < 25,0 kg/m²	17	-4,28	1,00		

Für jeden kategorialen Parameter mit zwei Kategorien sind die Ergebnisse eines Welch-Tests der Betrachtung der Promotormethylierung von *B9D1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 33: Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²)	12	-5,00	1,07	0,9971	1,0000
BMI < 30 kg/m²	36	-4,99	1,04		
Diabetes mellitus	21	-5,19	1,01	0,2485	1,0000
kein Diabetes mellitus	27	-4,84	1,05		
Dialyse	3	-4,67	1,62	0,7486	1,0000
keine Dialyse	45	-5,02	1,01		
Dihydralazin	4	-5,50	1,24	0,4493	1,0000
kein Dihydralazin	44	-4,95	1,02		
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	6	-4,94	1,14	0,9027	1,0000
eGFR ≥ 30 ml/min/1,73 m²	42	-5,00	1,03		
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	23	-5,16	1,08	0,2951	1,0000
eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m²	25	-4,84	0,99		
Geschlecht männlich	17	-5,17	1,11	0,4124	1,0000
Geschlecht weiblich	31	-4,90	1,00		
KHK	27	-4,99	0,93	0,9606	1,0000
keine KHK	21	-5,00	1,18		
konzentrische Hypertrophie LV	16	-5,16	1,10	0,9776	1,0000
keine konzentrische Hypertrophie LV	6	-5,18	1,31		
konzentrisches Remodeling LV	5	-5,23	1,45	0,9035	1,0000
kein konzentrisches Remodeling LV	17	-5,15	1,06		
Präadipositas (BMI 25,0 – 29,9 kg/m²)	19	-5,06	1,12	0,6848	1,0000
BMI < 25,0 kg/m²	17	-4,92	0,98		

Für jeden kategorialen Parameter mit zwei Kategorien sind die Ergebnisse eines Welch-Tests der Betrachtung der Promotormethylierung von *RASAL1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Auch das *chronic kidney disease*(CKD)-Stadium, als kategorialer klinischer Parameter mit mehr als zwei Kategorien, wurde auf einen Zusammenhang mit der Promotormethylierung der drei Gene hin untersucht. Es ergab sich für das Gen *B9D1* vor Adjustierung des p-Werts ein signifikanter Unterschied der Promotormethylierung zwischen den sechs verschiedenen CKD-Stadien (p = 0,0440) (Tabelle 35). In den durchgeführten Bonferroni-korrigierten Post-hoc-Tests konnte nicht differenziert werden, welche CKD-Stadien sich statistisch signifikant in der Höhe der Promotormethylierung unterscheiden (Tabelle 37). Nach Bonferroni-Korrektur ergab die ANOVA der Parameter Promotormethylierung des Gens *B9D1* und CKD-Stadium kein signifikantes Ergebnis mehr (Tabelle 35). Für die Gene *ATP2A2* (Tabelle 34) und *RASAL1* (Tabelle 36) gab es insgesamt keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 34: Darstellung der Ergebnisse der ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
CKD-Stadium G1	5	-5,99	1,60	0,1719	1,0000
CKD-Stadium G2	20	-5,52	1,35		
CKD-Stadium G3a	12	-6,71	1,00		
CKD-Stadium G3b	5	-5,25	1,20		
CKD-Stadium G4	3	-6,59	0,84		
CKD-Stadium G5	3	-5,87	2,28		

Für den kategorialen Parameter CKD-Stadium mit mehr als zwei Kategorien sind die Ergebnisse einer ANOVA der Betrachtung der Promotormethylierung von *ATP2A2* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 35: Darstellung der Ergebnisse der ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
CKD-Stadium G1	5	-5,25	0,54	0,0440*	1,0000
CKD-Stadium G2	20	-4,04	1,02		
CKD-Stadium G3a	12	-4,70	0,70		
CKD-Stadium G3b	5	-3,93	0,51		
CKD-Stadium G4	3	-4,15	0,67		
CKD-Stadium G5	3	-4,05	0,62		

Für den kategorialen Parameter CKD-Stadium mit mehr als zwei Kategorien sind die Ergebnisse einer ANOVA der Betrachtung der Promotormethylierung von *B9D1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 36: Darstellung der Ergebnisse der ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
CKD-Stadium G1	5	-5,30	0,96	0,2415	1,0000
CKD-Stadium G2	20	-4,73	0,99		
CKD-Stadium G3a	12	-5,55	0,95		
CKD-Stadium G3b	5	-4,50	1,10		
CKD-Stadium G4	3	-5,21	0,64		
CKD-Stadium G5	3	-4,67	1,62		

Für den kategorialen Parameter CKD-Stadium mit mehr als zwei Kategorien sind die Ergebnisse einer ANOVA der Betrachtung der Promotormethylierung von *RASAL1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 37: Ergebnisse der Post-hoc-Tests zur ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte

Gruppenvergleich	adjust. p-Wert
CKD-Stadium G1 vs. G2	0,0862
CKD-Stadium G1 vs. G3a	> 0,9999
CKD-Stadium G1 vs. G3b	0,2357
CKD-Stadium G1 vs. G4	> 0,9999
CKD-Stadium G1 vs. G5	0,8148
CKD-Stadium G2 vs. G3a	0,5266
CKD-Stadium G2 vs. G3b	> 0,9999
CKD-Stadium G2 vs. G4	> 0,9999
CKD-Stadium G2 vs. G5	> 0,9999
CKD-Stadium G3a vs. G3b	> 0,9999
CKD-Stadium G3a vs. G4	> 0,9999
CKD-Stadium G3a vs. G5	> 0,9999
CKD-Stadium G3b vs. G4	> 0,9999
CKD-Stadium G3b vs. G5	> 0,9999
CKD-Stadium G4 vs. G5	> 0,9999

Darstellung der Ergebnisse der Bonferroni-korrigierten Post-hoc-Tests zur ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der Promotormethylierung des Gens *B9D1*; Angabe der Gruppenvergleiche mit dazugehörigem adjustierten p-Wert; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. adjust., adjustierter; vs., versus.

3.3.2 TAVI-Kohorte

Wie in der HFpEF-Kohorte (siehe auch Kapitel 3.3.1), zeigte sich auch in der TAVI-Kohorte für den Großteil der metrischen klinischen Parameter kein signifikanter linearer Zusammenhang mit der Promotormethylierung der drei Gene (Tabelle 38 bis Tabelle 40). Für das Gen *ATP2A2* ergab sich vor Adjustierung des p-Werts ein signifikanter linearer Zusammenhang mit dem Parameter Kreatinin(P) ($p = 0{,}0325$) im Sinne einer höheren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Für das Gen *B9D1* ergab sich vor Adjustierung des p-Werts mit dem Parameter 6-Minuten-Gehtest (6MGT) Distanz ($p = 0{,}0124$) ein signifikanter linearer Zusammenhang im Sinne einer höheren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Für das Gen *RASAL1* ergab sich vor Adjustierung des p-Werts mit den Parametern 6MGT Distanz ($p = 0{,}0374$) und AÖF(VTI) ($p = 0{,}0385$) ein statistisch signifikanter linearer Zusammenhang jeweils im Sinne einer höheren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Zudem ergab sich für

das Gen *RASAL1* vor Adjustierung des p-Werts mit dem Parameter E/e' mittel (p = 0,0418) ein signifikanter linearer Zusammenhang im Sinne einer niedrigeren Promotormethylierung bei höheren Werten des klinischen Parameters. Nach der Bonferroni-Korrektur zeigte die Promotormethylierung der drei Gene keine signifikanten linearen Zusammenhänge mit den klinischen Parametern mehr.

Tabelle 38: Ergebnisse linearer Regressionen metrischer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r²
6MGT Distanz [m]	49	0,5746	1,0000	0,0011	-0,0028	0,0051	0,0068
AK Pmean [mmHg]	57	0,8618	1,0000	-0,0023	-0,0281	0,0236	0,0006
AK Vmax [m/s]	57	0,8844	1,0000	-0,0413	-0,6085	0,5258	0,0004
Alter [Jahre]	57	0,7906	1,0000	0,0093	-0,0607	0,0793	0,0013
AÖF(VTI) [cm²]	57	0,3467	1,0000	1,2180	-1,3530	3,7880	0,0161
AÖFI [cm²/m² KOF]	57	0,1979	1,0000	3,1770	-1,7080	8,0630	0,0300
BMI [kg/m²]	57	0,2858	1,0000	0,0408	-0,0350	0,1166	0,0207
E [cm/s]	20	0,7362	1,0000	0,0038	-0,0195	0,0271	0,0065
E/e' mittel	21	0,0809	1,0000	-0,0839	-0,1792	0,0114	0,1517
eGFR [ml/min/1,73 m²]	57	0,2178	1,0000	-0,0131	-0,0342	0,0080	0,0275
EuroSCORE II [%]	47	0,4236	1,0000	-0,0274	-0,0958	0,0410	0,0143
globaler AP4 Strain [%]	53	0,0785	1,0000	-0,0757	-0,1603	0,0089	0,0594
GLS [%]	53	0,1088	1,0000	-0,0814	-0,1815	0,0187	0,0497
HW [mm]	57	0,8251	1,0000	-0,0272	-0,2730	0,2185	0,0009
IVS [mm]	57	0,2569	1,0000	-0,1104	-0,3034	0,0827	0,0233
KOF [m²]	57	0,9947	1,0000	0,0065	-1,9470	1,9600	0,0000
Kreatinin(P) [mg/dl]	57	0,0325*	1,0000	0,5974	0,0518	1,1430	0,0805
LAVI [ml/m² KOF]	50	0,6792	1,0000	-0,0071	-0,0415	0,0273	0,0036
LDL-Cholesterin [mg/dl]	44	0,7124	1,0000	0,0023	-0,0102	0,0149	0,0033
logistischer EuroSCORE [%]	46	0,6184	1,0000	-0,0056	-0,0280	0,0168	0,0057
LVEDD [mm]	57	0,2953	1,0000	-0,0300	-0,0869	0,0269	0,0199
LVEDV [ml]	56	0,1203	1,0000	-0,0089	-0,0203	0,0024	0,0441
LVEF nS [%]	57	0,4369	1,0000	0,0122	-0,0190	0,0434	0,0110
LVESD [mm]	56	0,3253	1,0000	-0,0241	-0,0728	0,0246	0,0179
LVESV [ml]	56	0,1357	1,0000	-0,0095	-0,0221	0,0031	0,0408
LVMI [g/m² KOF]	57	0,1163	1,0000	-0,0085	-0,0192	0,0022	0,0442
MLHFQ [Punkte]	56	0,8410	1,0000	0,0024	-0,0214	0,0261	0,0008
NT-proBNP [pg/ml]	47	0,0658	1,0000	-0,0001	-0,0001	0,0000	0,0732
PAPsys [mmHg]	45	0,8007	1,0000	0,0035	-0,0244	0,0314	0,0015
RWD	57	0,5746	1,0000	1,0520	-2,6810	4,7850	0,0058
STS-Score [%]	46	0,3453	1,0000	0,0649	-0,0722	0,2019	0,0203
SV mD [ml]	56	0,7809	1,0000	0,0029	-0,0178	0,0236	0,0014
SV nS [ml]	56	0,5829	1,0000	-0,0094	-0,0437	0,0248	0,0056
SVI [ml/m² KOF]	56	0,8161	1,0000	0,0048	-0,0361	0,0456	0,0010
TAPSE [mm]	49	0,3749	1,0000	0,0479	-0,0597	0,1554	0,0168

Für jeden metrischen Parameter sind die Ergebnisse einer linearen Regression mit der Promotormethylierung von *ATP2A2* dargestellt; abhängige Variable: methylierte *ATP2A2*-DNA [relativ zum Input]; unabhängige Variablen: jeweils der in der Tabelle dargestellte metrische Parameter; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; adjust., adjustierter; KI, Konfidenzintervall; u., untere; o., obere.

Tabelle 39: Ergebnisse linearer Regressionen metrischer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r^2
6MGT Distanz [m]	49	0,0124*	0,8184	0,0034	0,0008	0,0060	0,1259
AK Pmean [mmHg]	57	0,4868	1,0000	-0,0066	-0,0256	0,0123	0,0088
AK Vmax [m/s]	57	0,5814	1,0000	-0,1154	-0,5324	0,3016	0,0056
Alter [Jahre]	57	0,8680	1,0000	0,0043	-0,0473	0,0559	0,0005
AÖF(VTI) [cm²]	57	0,3638	1,0000	0,8664	-1,0300	2,7620	0,0150
AÖFI [cm²/m² KOF]	57	0,6466	1,0000	0,8396	-2,8100	4,4890	0,0039
BMI [kg/m²]	57	0,7659	1,0000	0,0084	-0,0480	0,0648	0,0016
E [cm/s]	20	0,2224	1,0000	0,0104	-0,0069	0,0278	0,0815
E/e' mittel	21	0,2518	1,0000	-0,0442	-0,1224	0,0340	0,0685
eGFR [ml/min/1,73 m²]	57	0,2215	1,0000	-0,0096	-0,0251	0,0060	0,0271
EuroSCORE II [%]	47	0,7104	1,0000	-0,0090	-0,0577	0,0397	0,0031
globaler AP4 Strain [%]	53	0,7265	1,0000	-0,0105	-0,0705	0,0495	0,0024
GLS [%]	53	0,7990	1,0000	-0,0093	-0,0827	0,0640	0,0013
HW [mm]	57	0,5044	1,0000	-0,0605	-0,2410	0,1200	0,0081
IVS [mm]	57	0,3154	1,0000	-0,0721	-0,2148	0,0706	0,0183
KOF [m²]	57	0,4608	1,0000	0,5312	-0,9019	1,9640	0,0099
Kreatinin(P) [mg/dl]	57	0,2646	1,0000	0,2332	-0,1814	0,6479	0,0226
LAVI [ml/m² KOF]	50	0,9243	1,0000	-0,0012	-0,0265	0,0241	0,0002
LDL-Cholesterin [mg/dl]	44	0,5751	1,0000	-0,0027	-0,0124	0,0070	0,0075
logistischer EuroSCORE [%]	46	0,3450	1,0000	-0,0074	-0,0232	0,0083	0,0203
LVEDD [mm]	57	0,6474	1,0000	0,0097	-0,0326	0,0520	0,0038
LVEDV [ml]	56	0,8833	1,0000	-0,0006	-0,0091	0,0079	0,0004
LVEF nS [%]	57	0,6790	1,0000	-0,0048	-0,0279	0,0183	0,0031
LVESD [mm]	56	0,7516	1,0000	0,0058	-0,0306	0,0421	0,0019
LVESV [ml]	56	0,9776	1,0000	0,0001	-0,0093	0,0096	0,0000
LVMI [g/m² KOF]	57	0,4885	1,0000	-0,0028	-0,0108	0,0052	0,0088
MLHFQ [Punkte]	56	0,6997	1,0000	-0,0033	-0,0206	0,0139	0,0028
NT-proBNP [pg/ml]	47	0,2412	1,0000	0,0000	-0,0001	0,0000	0,0304
PAPsys [mmHg]	45	0,6746	1,0000	0,0046	-0,0172	0,0263	0,0041
RWD	57	0,5084	1,0000	-0,9131	-3,6620	1,8360	0,0080
STS-Score [%]	46	0,9701	1,0000	-0,0018	-0,0997	0,0961	0,0000
SV mD [ml]	56	0,9932	1,0000	-0,0001	-0,0152	0,0151	0,0000
SV nS [ml]	56	0,5655	1,0000	-0,0072	-0,0323	0,0179	0,0062
SVI [ml/m² KOF]	56	0,7951	1,0000	-0,0039	-0,0339	0,0261	0,0013
TAPSE [mm]	49	0,1441	1,0000	0,0574	-0,0203	0,1352	0,0449

Für jeden metrischen Parameter sind die Ergebnisse einer linearen Regression mit der Promotormethylierung von *B9D1* dargestellt; abhängige Variable: methylierte *B9D1*-DNA [relativ zum Input]; unabhängige Variablen: jeweils der in der Tabelle dargestellte metrische Parameter; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; adjust., adjustierter; KI, Konfidenzintervall; u., untere; o., obere.

Tabelle 40: Ergebnisse linearer Regressionen metrischer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter [Einheit]	n	p-Wert	adjust. p-Wert	Steigung	95%-KI der Steigung u. Grenze	95%-KI der Steigung o. Grenze	r^2
6MGT Distanz [m]	49	0,0374*	1,0000	0,0034	0,0002	0,0066	0,0889
AK Pmean [mmHg]	57	0,1745	1,0000	-0,0155	-0,0381	0,0071	0,0333
AK Vmax [m/s]	57	0,2430	1,0000	-0,2940	-0,7933	0,2053	0,0247
Alter [Jahre]	57	0,7142	1,0000	0,0115	-0,0509	0,0738	0,0025
AÖF(VTI) [cm²]	57	0,0385*	1,0000	2,3490	0,1284	4,5700	0,0755
AÖFI [cm²/m² KOF]	57	0,0802	1,0000	3,8230	-0,4760	8,1220	0,0546
BMI [kg/m²]	57	0,4538	1,0000	0,0256	-0,0424	0,0935	0,0102
E [cm/s]	20	0,5039	1,0000	0,0076	-0,0158	0,0310	0,0252
E/e' mittel	21	0,0418*	1,0000	-0,0959	-0,1880	-0,0039	0,2005
eGFR [ml/min/1,73 m²]	57	0,1738	1,0000	-0,0129	-0,0316	0,0059	0,0334
EuroSCORE II [%]	47	0,5388	1,0000	-0,0177	-0,0753	0,0399	0,0085
globaler AP4 Strain [%]	53	0,1637	1,0000	-0,0530	-0,1282	0,0223	0,0377
GLS [%]	53	0,1072	1,0000	-0,0722	-0,1606	0,0162	0,0501
HW [mm]	57	0,6697	1,0000	-0,0468	-0,2656	0,1720	0,0033
IVS [mm]	57	0,4154	1,0000	-0,0709	-0,2439	0,1022	0,0121
KOF [m²]	57	0,4120	1,0000	0,7139	-1,0170	2,4450	0,0123
Kreatinin(P) [mg/dl]	57	0,1082	1,0000	0,4035	-0,0917	0,8988	0,0462
LAVI [ml/m² KOF]	50	0,5441	1,0000	-0,0092	-0,0394	0,0210	0,0077
LDL-Cholesterin [mg/dl]	44	0,7227	1,0000	-0,0020	-0,0134	0,0094	0,0030
logistischer EuroSCORE [%]	46	0,2344	1,0000	-0,0111	-0,0297	0,0075	0,0320
LVEDD [mm]	57	0,2595	1,0000	-0,0288	-0,0795	0,0219	0,0231
LVEDV [ml]	56	0,0692	1,0000	-0,0092	-0,0192	0,0008	0,0599
LVEF nS [%]	57	0,6508	1,0000	0,0063	-0,0216	0,0343	0,0038
LVESD [mm]	56	0,2031	1,0000	-0,0275	-0,0702	0,0153	0,0298
LVESV [ml]	56	0,1688	1,0000	-0,0078	-0,0190	0,0034	0,0348
LVMI [g/m² KOF]	57	0,0641	1,0000	-0,0089	-0,0183	0,0005	0,0609
MLHFQ [Punkte]	56	0,7236	1,0000	-0,0037	-0,0248	0,0173	0,0023
NT-proBNP [pg/ml]	47	0,1167	1,0000	-0,0001	-0,0001	0,0000	0,0538
PAPsys [mmHg]	45	0,7672	1,0000	0,0034	-0,0197	0,0265	0,0021
RWD	57	0,5269	1,0000	1,0560	-2,2680	4,3810	0,0073
STS-Score [%]	46	0,6701	1,0000	-0,0247	-0,1406	0,0913	0,0042
SV mD [ml]	56	0,7647	1,0000	0,0027	-0,0156	0,0211	0,0017
SV nS [ml]	56	0,0979	1,0000	-0,0249	-0,0546	0,0047	0,0499
SVI [ml/m² KOF]	56	0,9875	1,0000	-0,0003	-0,0365	0,0360	0,0000
TAPSE [mm]	49	0,4800	1,0000	0,0332	-0,0606	0,1270	0,0107

Für jeden metrischen Parameter sind die Ergebnisse einer linearen Regression mit der Promotormethylierung von *RASAL1* dargestellt; abhängige Variable: methylierte *RASAL1*-DNA [relativ zum Input]; unabhängige Variablen: jeweils der in der Tabelle dargestellte metrische Parameter; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; adjust., adjustierter; KI, Konfidenzintervall; u., untere; o., obere.

Bei der Untersuchung der kategorialen klinischen Parameter mit zwei Kategorien ergab sich für den Großteil der Parameter kein signifikanter Zusammenhang mit der Promotormethylierung der drei Gene (Tabelle 41 bis Tabelle 43).

Für das Gen *ATP2A2* ergab sich vor Adjustierung des p-Werts eine signifikant niedrigere Promotormethylierung ($p = 0{,}0281$) für Patienten mit Aortenklappeninsuffizienz (AI) (-6,57 ± 1,58) als für Patienten ohne die Diagnose (-5,60 ± 1,54). Zudem zeigte sich für das Gen *ATP2A2* vor Adjustierung des p-Werts eine signifikant höhere Promotormethylierung ($p = 0{,}0249$) bei Patienten mit einer eGFR < 30 ml/min/1,73 m² (-4,59 ± 1,20) im Vergleich zu Patienten mit einer eGFR ≥ 30 ml/min/1,73 m² (-6,37 ± 1,58). Für das Gen *B9D1* war vor Adjustierung des p-Werts die Promotormethylierung bei Patienten mit Trikuspidalklappeninsuffizienz (TI) (-4,48 ± 1,17) signifikant niedriger ($p = 0{,}0369$) als bei Patienten ohne TI (-3,65 ± 0,62). Bei Betrachten des Gens *RASAL1* war vor Adjustierung des p-Werts die Promotormethylierung bei Patienten mit Adipositas (-4,21 ± 1,44) signifikant höher ($p = 0{,}0238$) im Vergleich zu Patienten ohne Adipositas (-5,19 ± 1,37).

Nach der Bonferroni-Korrektur zeigten sich für alle drei Gene keine signifikanten Zusammenhänge mehr zwischen der Promotormethylierung und den klinischen Parametern.

Tabelle 41: Darstellung der Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²)	17	-5,52	1,86	0,0618	1,0000
BMI < 30 kg/m²	40	-6,51	1,44		
AI	36	-6,57	1,58	0,0281*	1,0000
keine AI	21	-5,60	1,54		
arterielle Hypertonie	53	-6,23	1,67	0,5996	1,0000
keine arterielle Hypertonie	4	-5,99	0,71		
chronische Lungenerkrankung	11	-6,42	1,79	0,6649	1,0000
keine chronische Lungenerkrankung	46	-6,16	1,60		
CM(andere)	10	-6,17	1,26	0,9081	1,0000
keine CM(andere)	47	-6,22	1,70		
COPD	9	-6,47	1,90	0,6551	1,0000
keine COPD	48	-6,16	1,59		
Diabetes mellitus	22	-6,16	1,92	0,8499	1,0000
kein Diabetes mellitus	35	-6,25	1,44		
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	5	-4,59	1,20	0,0249*	1,0000
eGFR ≥ 30 ml/min/1,73 m²	52	-6,37	1,58		
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	28	-6,24	1,87	0,9001	1,0000
eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m²	29	-6,19	1,38		
exzentrische Hypertrophie LV	6	-6,41	1,81	0,7869	1,0000
keine exzentrische Hypertrophie LV	51	-6,19	1,62		
Geschlecht männlich	32	-6,03	1,69	0,3424	1,0000
Geschlecht weiblich	25	-6,44	1,54		
ICM	9	-6,23	1,74	0,9676	1,0000
keine ICM	48	-6,21	1,62		
KHK	42	-6,18	1,48	0,8099	1,0000
keine KHK	15	-6,32	2,02		
konzentrische Hypertrophie LV	42	-6,22	1,59	0,9664	1,0000
keine konzentrische Hypertrophie LV	15	-6,20	1,77		
konzentrisches Remodeling LV	9	-6,06	1,83	0,7803	1,0000
kein konzentrisches Remodeling LV	48	-6,24	1,60		
MI	53	-6,29	1,62	0,2754	1,0000
keine MI	4	-5,25	1,54		
pAVK	12	-5,95	1,73	0,5514	1,0000
keine pAVK	45	-6,28	1,61		
Präadipositas (BMI 25,0 – 29,9 kg/m²)	19	-6,62	1,52	0,6403	1,0000
BMI < 25,0 kg/m²	21	-6,40	1,38		
TI	51	-6,37	1,59	0,1015	1,0000
keine TI	5	-4,87	1,58		
Vorhofflimmern	21	-6,09	1,46	0,6577	1,0000
kein Vorhofflimmern	36	-6,28	1,73		
Z. n. CABG	8	-6,32	1,49	0,8352	1,0000
kein Z. n. CABG	49	-6,20	1,66		
Z. n. Myokardinfarkt	13	-5,83	1,51	0,3256	1,0000
kein Z. n. Myokardinfarkt	44	-6,32	1,65		
Z. n. PCI	21	-6,39	1,54	0,5260	1,0000
kein Z. n. PCI	36	-6,11	1,68		
Z. n. Schlaganfall	8	-5,99	2,40	0,7792	1,0000
kein Z. n. Schlaganfall	49	-6,25	1,49		
Z. n. TIA	4	-5,63	1,28	0,4112	1,0000
kein Z. n. TIA	53	-6,26	1,65		
Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	11	-6,07	2,01	0,7885	1,0000
kein Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	46	-6,25	1,54		

Für jeden kategorialen Parameter mit zwei Kategorien sind die Ergebnisse eines Welch-Tests der Betrachtung der Promotormethylierung von *ATP2A2* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 42: Darstellung der Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²)	17	-4,03	1,03	0,1451	1,0000
BMI < 30 kg/m²	40	-4,50	1,25		
AI	36	-4,32	1,16	0,7875	1,0000
keine AI	21	-4,42	1,28		
arterielle Hypertonie	53	-4,42	1,21	0,0780	1,0000
keine arterielle Hypertonie	4	-3,60	0,65		
chronische Lungenerkrankung	11	-4,51	1,43	0,6897	1,0000
keine chronische Lungenerkrankung	46	-4,32	1,15		
CM(andere)	10	-4,39	1,16	0,9340	1,0000
keine CM(andere)	47	-4,35	1,22		
COPD	9	-4,78	1,19	0,2704	1,0000
keine COPD	48	-4,28	1,19		
Diabetes mellitus	22	-4,45	1,30	0,6733	1,0000
kein Diabetes mellitus	35	-4,30	1,14		
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	5	-3,99	0,63	0,2626	1,0000
eGFR ≥ 30 ml/min/1,73 m²	52	-4,39	1,24		
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	28	-4,30	1,16	0,7333	1,0000
eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m²	29	-4,41	1,25		
exzentrische Hypertrophie LV	6	-3,56	1,15	0,1220	1,0000
keine exzentrische Hypertrophie LV	51	-4,45	1,18		
Geschlecht männlich	32	-4,25	1,24	0,4286	1,0000
Geschlecht weiblich	25	-4,50	1,15		
ICM	9	-4,29	1,13	0,8400	1,0000
keine ICM	48	-4,37	1,22		
KHK	42	-4,26	1,16	0,3548	1,0000
keine KHK	15	-4,62	1,30		
konzentrische Hypertrophie LV	42	-4,43	1,17	0,4581	1,0000
keine konzentrische Hypertrophie LV	15	-4,15	1,29		
konzentrisches Remodeling LV	9	-4,54	1,28	0,6534	1,0000
kein konzentrisches Remodeling LV	48	-4,32	1,19		
MI	53	-4,39	1,22	0,4155	1,0000
keine MI	4	-3,98	0,83		
pAVK	12	-3,83	1,59	0,1932	1,0000
keine pAVK	45	-4,50	1,05		
Präadipositas (BMI 25,0 – 29,9 kg/m²)	19	-4,67	1,05	0,4111	1,0000
BMI < 25,0 kg/m²	21	-4,35	1,41		
TI	51	-4,48	1,17	0,0369*	1,0000
keine TI	5	-3,65	0,62		
Vorhofflimmern	21	-4,11	1,24	0,2438	1,0000
kein Vorhofflimmern	36	-4,50	1,16		
Z. n. CABG	8	-3,79	0,93	0,1045	1,0000
kein Z. n. CABG	49	-4,45	1,22		
Z. n. Myokardinfarkt	13	-4,16	1,39	0,5529	1,0000
kein Z. n. Myokardinfarkt	44	-4,42	1,15		
Z. n. PCI	21	-4,52	1,34	0,4656	1,0000
kein Z. n. PCI	36	-4,26	1,12		
Z. n. Schlaganfall	8	-4,77	1,12	0,2985	1,0000
kein Z. n. Schlaganfall	49	-4,29	1,21		
Z. n. TIA	4	-4,51	0,57	0,6371	1,0000
kein Z. n. TIA	53	-4,35	1,23		
Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	11	-4,70	1,00	0,2463	1,0000
kein Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	46	-4,28	1,24		

Für jeden kategorialen Parameter mit zwei Kategorien sind die Ergebnisse eines Welch-Tests der Betrachtung der Promotormethylierung von *B9D1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 43: Darstellung der Ergebnisse der Welch-Tests kategorialer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²)	17	-4,21	1,44	0,0238*	1,0000
BMI < 30 kg/m²	40	-5,19	1,37		
AI	36	-5,00	1,38	0,4876	1,0000
keine AI	21	-4,71	1,57		
arterielle Hypertonie	53	-4,93	1,47	0,3879	1,0000
keine arterielle Hypertonie	4	-4,38	1,08		
chronische Lungenerkrankung	11	-4,93	1,54	0,9247	1,0000
keine chronische Lungenerkrankung	46	-4,88	1,44		
CM(andere)	10	-5,38	1,07	0,1605	1,0000
keine CM(andere)	47	-4,79	1,50		
COPD	9	-5,09	1,39	0,6610	1,0000
keine COPD	48	-4,86	1,47		
Diabetes mellitus	22	-4,86	1,52	0,9071	1,0000
kein Diabetes mellitus	35	-4,91	1,42		
eGFR < 30 ml/min/1,73 m²	5	-3,69	1,60	0,1407	1,0000
eGFR ≥ 30 ml/min/1,73 m²	52	-5,01	1,39		
eGFR < 60 ml/min/1,73 m²	28	-4,79	1,53	0,6177	1,0000
eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m²	29	-4,99	1,39		
exzentrische Hypertrophie LV	6	-4,85	1,72	0,9477	1,0000
keine exzentrische Hypertrophie LV	51	-4,90	1,43		
Geschlecht männlich	32	-4,66	1,41	0,1736	1,0000
Geschlecht weiblich	25	-5,19	1,47		
ICM	9	-4,95	1,35	0,9017	1,0000
keine ICM	48	-4,88	1,48		
KHK	42	-4,92	1,40	0,8618	1,0000
keine KHK	15	-4,83	1,63		
konzentrische Hypertrophie LV	42	-4,96	1,29	0,6463	1,0000
keine konzentrische Hypertrophie LV	15	-4,72	1,85		
konzentrisches Remodeling LV	9	-4,63	2,03	0,6626	1,0000
kein konzentrisches Remodeling LV	48	-4,94	1,33		
MI	53	-4,98	1,45	0,0605	1,0000
keine MI	4	-3,72	0,91		
pAVK	12	-4,53	1,62	0,3839	1,0000
keine pAVK	45	-4,99	1,40		
Präadipositas (BMI 25,0 – 29,9 kg/m²)	19	-5,41	1,29	0,3175	1,0000
BMI < 25,0 kg/m²	21	-4,98	1,43		
TI	51	-5,08	1,34	0,0794	1,0000
keine TI	5	-3,48	1,54		
Vorhofflimmern	21	-4,62	1,24	0,2602	1,0000
kein Vorhofflimmern	36	-5,05	1,55		
Z. n. CABG	8	-4,88	1,39	0,9710	1,0000
kein Z. n. CABG	49	-4,90	1,47		
Z. n. Myokardinfarkt	13	-4,46	1,33	0,2059	1,0000
kein Z. n. Myokardinfarkt	44	-5,02	1,47		
Z. n. PCI	21	-5,03	1,66	0,6030	1,0000
kein Z. n. PCI	36	-4,81	1,32		
Z. n. Schlaganfall	8	-4,86	1,79	0,9542	1,0000
kein Z. n. Schlaganfall	49	-4,90	1,41		
Z. n. TIA	4	-5,24	0,85	0,4679	1,0000
kein Z. n. TIA	53	-4,87	1,48		
Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	11	-5,04	1,57	0,7334	1,0000
kein Z. n. zerebralem ischämischen Ereignis	46	-4,86	1,43		

Für jeden kategorialen Parameter mit zwei Kategorien sind die Ergebnisse eines Welch-Tests der Betrachtung der Promotormethylierung von *RASAL1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Es folgte die Untersuchung des Zusammenhangs der Promotormethylierung mit kategorialen klinischen Parametern mit mehr als zwei Kategorien. Hier ergab sich für den Großteil der Parameter kein signifikanter Zusammenhang mit der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2* (Tabelle 44), *B9D1* (Tabelle 45) und *RASAL1* (Tabelle 46). Nur beim Betrachten des Gens *ATP2A2* ergab sich vor Adjustierung des p-Werts ein signifikanter Unterschied der Promotormethylierung zwischen den CKD-Stadien (p = 0,0327) (Tabelle 44). Die CKD-Stadien G4 und G5 mussten für diese Analysen bei kleiner Gruppengröße zusammengefasst werden. In den Bonferroni-korrigierten Post-hoc-Tests zeigte sich im Vergleich zum Stadium G3a (-7,05 ± 1,54) eine signifikant höhere Promotormethylierung (p = 0,0296) im zusammengefassten Stadium G4, G5 (-4,59 ± 1,20) (Tabelle 47). Nach der Bonferroni-Korrektur ergab die ANOVA der Parameter Promotormethylierung des Gens *ATP2A2* und CKD-Stadium kein signifikantes Ergebnis mehr (Tabelle 44).

Tabelle 44: Ergebnisse der ANOVA kategorialer Parameter und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
AI Grad 0	21	-5,60	1,54	0,0654	1,0000
AI Grad I	22	-6,74	1,37		
AI Grad II, III	14	-6,30	1,89		
CKD-Stadium G1	3	-6,79	0,61	0,0327*	1,0000
CKD-Stadium G2	26	-6,12	1,43		
CKD-Stadium G3a	15	-7,05	1,54		
CKD-Stadium G3b	8	-5,75	2,08		
CKD-Stadium G4, G5	5	-4,59	1,20		
MI Grad 0	4	-5,25	1,54	0,1333	1,0000
MI Grad I	36	-6,57	1,52		
MI Grad II	14	-5,54	1,81		
MI Grad III	3	-6,28	1,08		
NYHA-Klasse I	6	-6,30	1,40	0,3596	1,0000
NYHA-Klasse II	13	-6,62	1,73		
NYHA-Klasse III	33	-5,91	1,56		
NYHA-Klasse IV	5	-7,03	1,99		
TI Grad 0	5	-4,87	1,58	0,2088	1,0000
TI Grad I	34	-6,39	1,70		
TI Grad II	13	-6,15	1,32		
TI Grad III	4	-6,92	1,57		

Für jeden kategorialen Parameter mit mehr als zwei Kategorien sind die Ergebnisse einer ANOVA der Betrachtung der Promotormethylierung von *ATP2A2* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 45: Ergebnisse der ANOVA kategorialer Parameter und der *B9D1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
AI Grad 0	21	-4,42	1,28	0,9292	1,0000
AI Grad I	22	-4,28	1,06		
AI Grad II, III	14	-4,39	1,35		
CKD-Stadium G1	3	-5,17	1,18	0,6599	1,0000
CKD-Stadium G2	26	-4,32	1,25		
CKD-Stadium G3a	15	-4,51	1,27		
CKD-Stadium G3b	8	-4,10	1,23		
CKD-Stadium G4, G5	5	-3,99	0,63		
MI Grad 0	4	-3,98	0,83	0,4900	1,0000
MI Grad I	36	-4,54	1,32		
MI Grad II	14	-4,01	1,01		
MI Grad III	3	-4,24	0,34		
NYHA-Klasse I	6	-4,01	0,62	0,5830	1,0000
NYHA-Klasse II	13	-4,74	1,48		
NYHA-Klasse III	33	-4,28	1,10		
NYHA-Klasse IV	5	-4,27	1,60		
TI Grad 0	5	-3,65	0,62	0,3009	1,0000
TI Grad I	34	-4,56	1,19		
TI Grad II	13	-4,18	0,88		
TI Grad III	4	-4,80	1,87		

Für jeden kategorialen Parameter mit mehr als zwei Kategorien sind die Ergebnisse einer ANOVA der Betrachtung der Promotormethylierung von *B9D1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 46: Ergebnisse der ANOVA kategorialer Parameter und der *RASAL1*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Parameter	n	M	SD	p-Wert	adjust. p-Wert
AI Grad 0	21	-4,71	1,57	0,7668	1,0000
AI Grad I	22	-4,98	1,20		
AI Grad II, III	14	-5,04	1,67		
CKD-Stadium G1	3	-5,87	1,20	0,2203	1,0000
CKD-Stadium G2	26	-4,89	1,39		
CKD-Stadium G3a	15	-5,22	1,61		
CKD-Stadium G3b	8	-4,69	1,01		
CKD-Stadium G4, G5	5	-3,69	1,60		
MI Grad 0	4	-3,72	0,91	0,3020	1,0000
MI Grad I	36	-5,10	1,53		
MI Grad II	14	-4,77	1,35		
MI Grad III	3	-4,51	0,85		
NYHA-Klasse I	6	-4,59	1,24	0,4074	1,0000
NYHA-Klasse II	13	-5,48	1,53		
NYHA-Klasse III	33	-4,71	1,46		
NYHA-Klasse IV	5	-4,92	1,30		
TI Grad 0	5	-3,48	1,54	0,1125	1,0000
TI Grad I	34	-5,03	1,32		
TI Grad II	13	-5,18	1,28		
TI Grad III	4	-5,17	2,01		

Für jeden kategorialen Parameter mit mehr als zwei Kategorien sind die Ergebnisse einer ANOVA der Betrachtung der Promotormethylierung von *RASAL1* dargestellt; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; adjust., adjustierter.

Tabelle 47: Ergebnisse der Post-hoc-Tests zur ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der *ATP2A2*-Promotormethylierung in der TAVI-Kohorte

Gruppenvergleich	adjust. p-Wert
CKD-Stadium G1 vs. G2	> 0,9999
CKD-Stadium G1 vs. G3a	> 0,9999
CKD-Stadium G1 vs. G3b	> 0,9999
CKD-Stadium G1 vs. G4, G5	0,5407
CKD-Stadium G2 vs. G3a	0,6467
CKD-Stadium G2 vs. G3b	> 0,9999
CKD-Stadium G2 vs. G4, G5	0,4600
CKD-Stadium G3a vs. G3b	0,5773
CKD-Stadium G3a vs. G4, G5	0,0296*
CKD-Stadium G3b vs. G4, G5	> 0,9999

Darstellung der Ergebnisse der Bonferroni-korrigierten Post-hoc-Tests zur ANOVA des kategorialen Parameters CKD-Stadium und der Promotormethylierung des Gens *ATP2A2*. Angabe der Gruppenvergleiche mit dazugehörigem adjustierten p-Wert; Adjustierung des p-Werts in Form der Bonferroni-Korrektur. Für Begriffs- und Abkürzungserklärungen siehe Kapitel 2.3.8. adjust., adjustierter; vs., versus.

3.4 Prognostische Vorhersagen anhand von Überlebensmodellen unter Einbezug der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse sind einer Auswertung der MBSB entnommen.

Anhand eines Datensatzes der DIAST-Kohorte einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg, wurden Überlebensmodelle in Form von Cox-Regressionen modelliert. Es lagen hierfür von den 46 Patienten der DIAST-Kohorte für den Zeitraum bis elf Jahre nach Studieneintritt Daten zum Gesamtüberleben sowie verschiedene klinische Parameter zum Zeitpunkt Null vor (siehe auch Kapitel 2.2.3 und Kapitel 3.2.3). Details zu ausgewählten klinischen Parametern sind auch in Kapitel 2.3.8 zu finden.

Vier dieser Überlebensmodelle wurden jeweils auf die Patienten der HFpEF- und TAVI-Kohorte übertragen und es ergab sich für jeden Patienten ein modellspezifischer individueller dimensionsloser Risikowert, der in dieser Arbeit auch als „*risk*“ bezeichnet wird. Anhand des Risikowertes ergab sich je Modell eine Zuteilung der Patienten in eine „Hochrisikogruppe“ oder „Nicht-Hochrisikogruppe“. Die Zuteilung zur Hochrisikogruppe erfolgte bei Erreichen eines zuvor an der DIAST-Kohorte festgelegten *Cut-offs*. Als *Cut-off* war für jedes Modell der Risikowert festgelegt worden, bei dem die Aufteilung der DIAST-Kohorte in Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten zum besten Ergebnis im Log-Rank-Test der zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven der zwei Risikogruppen führte.

Das Ziel der Modellübertragung war es, an den neuen Kohorten Risikovorhersagen für das Event Versterben treffen zu können und somit durch die Übertragung der Modelle auf neue Patienten eine Möglichkeit zur einfachen prognostischen Vorhersage zu gewinnen.

Um die Möglichkeit zur prognostischen Vorhersage durch die Modelle an den zwei neuen Kohorten zu evaluieren, wurden die Risikowerte und die Risikogruppenzuteilung gemeinsam mit Überlebensdaten betrachtet. Von der HFpEF-Kohorte lagen Daten zum Gesamtüberleben für einen Zeitraum bis ca. fünf

Jahre nach Studieneintritt vor. Für die TAVI-Kohorte lagen Daten zum Gesamtüberleben und zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben für einen Zeitraum bis ca. fünf Jahre nach Studieneintritt vor. Zwei Patienten der TAVI-Kohorte mit interventionsbedingtem Versterben, hier definiert als Versterben innerhalb der ersten 60 Tage nach TAVI, wurden der Gruppe mit nicht-kardiovaskulärem Event zugeordnet. Die Überlebensdaten der HFpEF- und TAVI-Kohorte sind in Abbildung 7 dargestellt.

Für den Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt wurden für jedes Modell die zugeordneten Risikowerte zusammen mit dem Überlebensstatus der Patienten unter Berücksichtigung des Gesamtüberlebens bzw. kardiovaskulär-spezifischen Überlebens betrachtet. Zudem wurden Überlebenskurven und kumulativen Inzidenzkurven aus vorliegenden Überlebensdaten von den durch die Modellübertragung in Hochrisiko und Nicht-Hochrisiko klassifizierten Patienten verglichen. Mit dem Ziel die Vergleichbarkeit der zwei neuen Kohorten mit der DIAST-Kohorte zu verbessern und damit die Übertragbarkeit der Modelle zu optimieren, wurde für die Patienten der HFpEF- und TAVI-Kohorte jeweils ein *Propensity Score Matching* mit den Patienten der DIAST-Kohorte durchgeführt. Anschließend wurden die vier Modelle auf diese Subkohorten übertragen.

Die HFpEF-Kohorte konnten in diesen Abschnitt der Arbeit vollständig mit einer Patientenzahl von n = 48 in die Berechnungen einfließen. Von der TAVI-Kohorte musste ein Patient ausgeschlossen werden, der einer Nachverfolgung zur Erhebung von Überlebensdaten im Verlauf der Studie widersprochen hatte, sodass sich für diesen Teil der Arbeit eine Patientenzahl von n = 56 ergab.

Für die Patienten der HFpEF-Kohorte (siehe auch Kapitel 2.2.1) galten die gleichen echokardiographischen Einschlusskriterien von LVEF ≥ 45% und E/e' mittel ≥ 12 wie für die Patienten der DIAST-Kohorte (siehe auch Kapitel 2.2.3). Das Ziel der Modellübertragungen auf die HFpEF-Kohorte war die Untersuchung der Übertragbarkeit der vorbestehenden vier Modelle zur prognostischen Vorhersage auf Patienten mit der gleichen Grunderkrankung HFpEF. Um zu untersuchen, ob die vier Modelle der DIAST-Kohorte zur prognostischen Vorhersage auch auf Patienten mit anderer Grunderkrankung, aber pathomechanistischer Gemeinsamkeit der Herzfibrose, übertragen werden können, wurden die vier Modelle auf die Patienten der TAVI-Kohorte mit der Grunderkrankung Aortenklappenstenose übertragen. Alle Patienten der TAVI-Kohorte erhielten aufgrund einer schweren oder in Einzelfällen moderaten bis schweren Aortenklappenstenose eine transfemorale TAVI (siehe auch Kapitel 2.2.2).

Weitere Details zum statistischen Vorgehen werden in Kapitel 2.3.7 beschrieben.

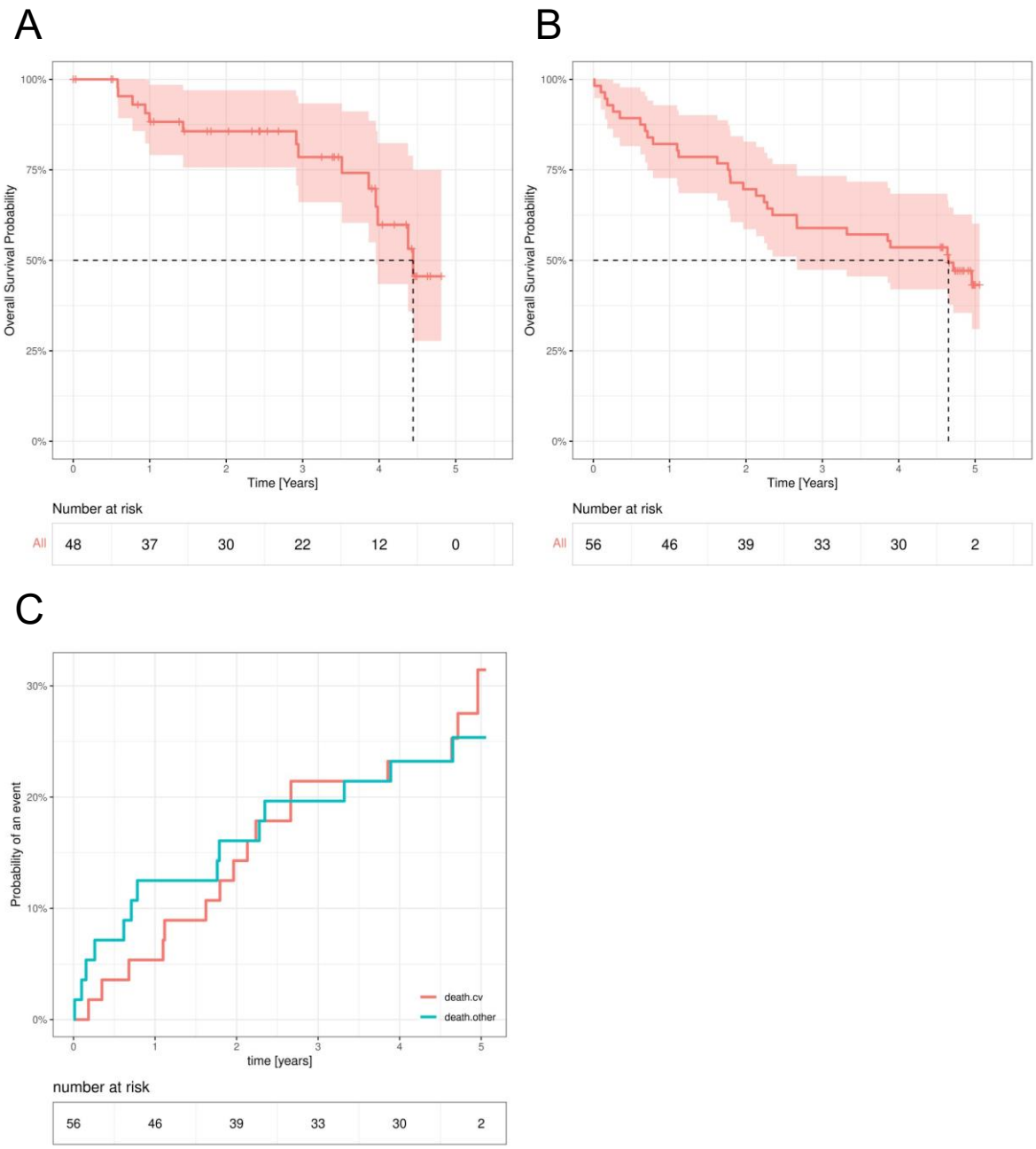

Abbildung 7: Präsentation von Überlebensdaten der HFpEF- und TAVI-Kohorte. Kaplan-Meier-Kurven der (**A**) HFpEF-Kohorte und (**B**) TAVI-Kohorte. Auf der y-Achse ist die im Kaplan-Meier-Verfahren berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent (*overall survival probability* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve, Zensierungen als senkrechter Strich in der Kurve, mediane Überlebenszeit als gestrichelte Linie, 95%-Konfidenzintervall der Überlebenswahrscheinlichkeit als Konfidenzband. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt. **(C)** kumulative Inzidenzkurven der TAVI-Kohorte mit jeweils eigener Kurve für die Gruppe der Patienten mit kardiovaskulärem Event (*death.cv*; rote Kurve) und die Gruppe der Patienten mit nicht-kardiovaskulärem Event (*death.other*; blaue Kurve). Das ereignisspezifische Überleben wurde in Abhängigkeit von den konkurrierenden Ereignissen kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben untersucht und es sind die jeweils dazugehörigen kumulativen Inzidenzkurven dargestellt. Auf der y-Achse ist die per Aalen-Johansen-Schätzer berechnete kumulative Wahrscheinlichkeit für ein Event in Prozent (*probability of an event* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve. Als Event war hier das Versterben definiert. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.1 Modellierung von Cox-Regressionen für prognostische Vorhersagen

Für die Modellberechnungen an der DIAST-Kohorte wurden Cox-Regressionen genutzt, um den Einfluss verschiedener Parameter auf das Überleben berücksichtigen zu können. Das betrachtete Event in den Modellen war als das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der vier an der DIAST-Kohorte berechneten Modelle dargestellt, die in dieser Arbeit Anwendung finden.

Das Modell A umfasste die vier klinischen Parameter BMI, Alter, Geschlecht und KHK. Modell B umfasste zusätzlich die im Blut gemessene *B9D1*-Promotormethylierung, Modell C die im Blut gemessene *RASAL1*-Promotormethylierung und Modell D die im Blut gemessene *ATP2A2*-Promotormethylierung. Die lognormal verteilten Rohdaten der Promotormethylierung wurde für diese Berechnungen mithilfe des natürlichen Logarithmus in eine Normalverteilung transformiert und die transformierten Daten der Promotormethylierung gingen in die Cox-Regressionen ein. Ziel der Transformierung war es, der Normalverteilung der Residuen, als Voraussetzung der Cox-Regression, gerecht zu werden (siehe auch Kapitel 2.3.7). Wenn nicht anders erwähnt, wird im Folgenden auf die logarithmierten Werte der Promotormethylierung eingegangen.

Anhand der in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse der vier Modelle konnte jeweils der Einfluss der verschiedenen Parameter auf das Überleben in der DIAST-Kohorte ermittelt werden. Die Promotormethylierung aller drei Gene zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben im Sinne einer Risikoerhöhung für das Versterben bei höherer Promotormethylierung. In allen Modellen zeigte der BMI einen signifikanten Einfluss auf das Überleben im Sinne einer Risikoerhöhung für das Versterben bei niedrigerem BMI. Das Geschlecht zeigte in allen Modellen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben im Sinne einer Risikoerhöhung für das Versterben bei männlichem Geschlecht. Für die Diagnose KHK ergab sich für Modell A, C und D ein signifikanter Einfluss auf das Überleben im Sinne einer Risikoerhöhung für das Versterben bei Vorliegen der Diagnose KHK. Im Modell B konnte kein signifikanter Einfluss auf das Überleben bei Vorliegen der Diagnose KHK nachgewiesen werden. Der Effekt auf das Überleben blieb damit in diesem Modell unklar. Für das Alter konnte in keinem der Modelle ein signifikanter Einfluss auf das Überleben nachgewiesen werden. Der Effekt des Alters auf das Überleben blieb damit in den vier Modellen insgesamt unklar.

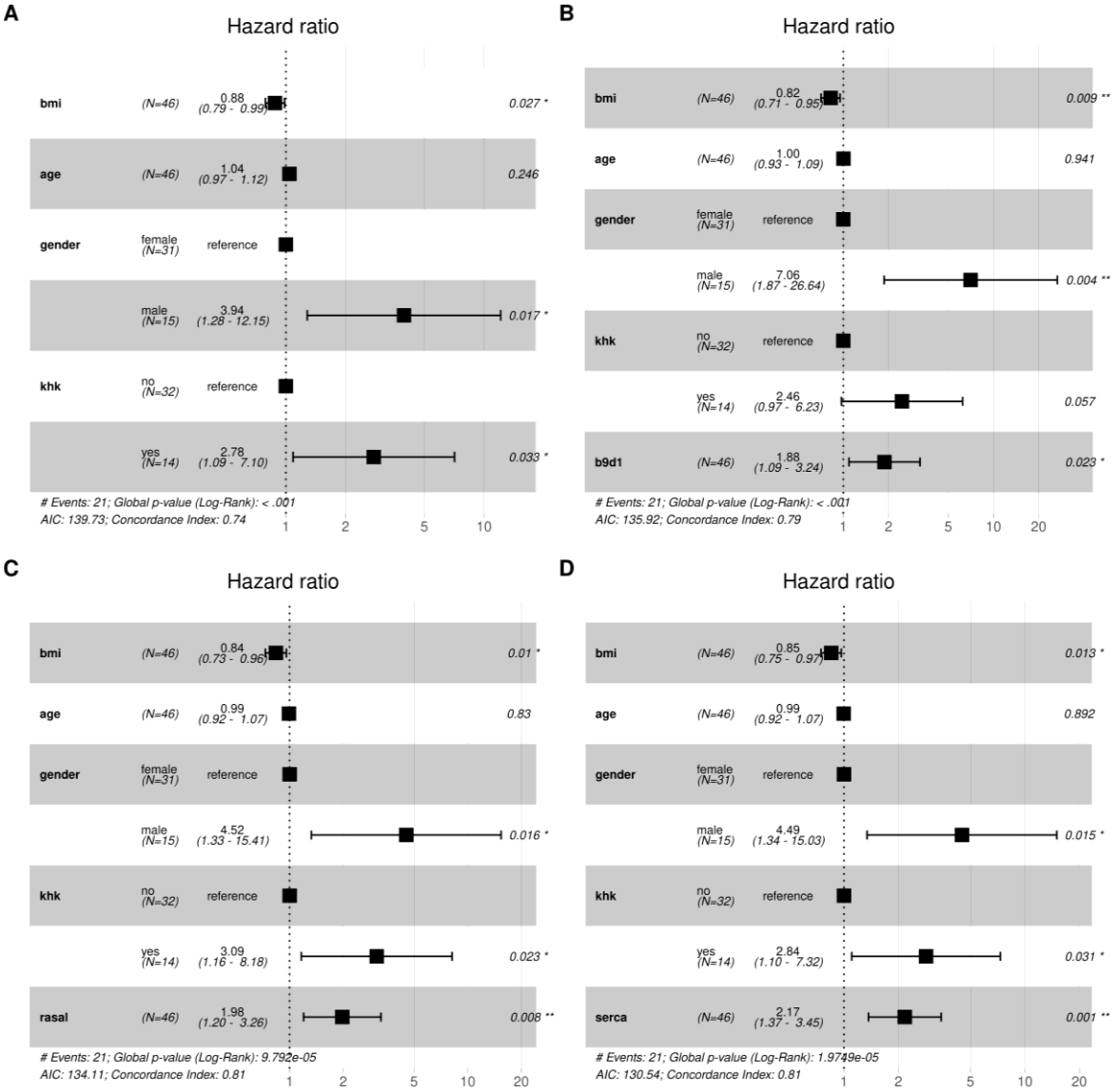

Abbildung 8: Forest-Plots der vier an der DIAST-Kohorte modellierten Cox-Regressionen. Darstellung der Ergebnisse der vier an der DIAST-Kohorte modellierten Cox-Regressionen (**A**) ohne Promotormethylierung, (**B**) mit *B9D1*-Promotormethylierung, (**C**) mit *RASAL1*-Promotormethylierung und (**D**) mit *ATP2A2*-Promotormethylierung unter Angabe von n, Hazard Ratio mit 95%-Konfidenzintervall des Hazard Ratios und p-Wert für jeden Modellparameter. Graphische Präsentation der Ergebnisse in Form von Forests-Plots. Das Kästchen stellt das Hazard Ratio dar, die horizontale Linie durch das Kästchen veranschaulicht das 95%-Konfidenzintervall des Hazard Ratios. Es ist eine senkrechte Nulleffekt-Linie eingezeichnet, welche die x-Achse bei 1 schneidet. Auf der x-Achse ist der positive Wertebereich des Hazard Ratios, beim Wert 1 beginnend, aufgetragen. Zur Beschreibung der globalen Güte des Gesamtmodells sind globaler p-Wert, AIC und *concordance index* für jedes Modell genannt. # *Events: 21*, es gab 21 Events in der DIAST-Kohorte im Betrachtungszeitraum, als Event war das Versterben definiert; *Global p-value (Log-Rank)*, modellspezifischer im Log-Rank-Test ermittelter globaler p-Wert; AIC, *akaike information criterion*; *bmi*, BMI; *age*, Alter; *gender*, Geschlecht; *female*, weiblich; *male*, männlich; *khk*, KHK; b9d1, *B9D1*-Promotormethylierung; rasal, *RASAL1*-Promotormethylierung; serca, *ATP2A2*-Promotormethylierung; n, Anzahl (Auswertung und Aufbereitung durchgeführt von der MBSB 2024).

Die Auswahl der klinischen Parameter BMI, Alter, Geschlecht, KHK und Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* für die Modelle erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg, in der sich uni- und zum Teil auch multivariant signifikante Zusammenhänge mehrerer klinischer Parameter und der Promotormethylierung der drei Gene mit dem Überleben in der DIAST-Kohorte gezeigt hatten. Für die Modellierung der vier Modelle der vorliegenden Arbeit wurden eine Auswahl klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der natürliche Logarithmus der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* in univarianten Cox-Regressionen mit dem Überleben getestet. Hierfür lagen von der DIAST-Kohorte für den Zeitraum bis elf Jahre nach Studieneintritt Daten zum Gesamtüberleben vor. Für jeden Parameter wurde die univariante Cox-Regression mit dem Null-Model mithilfe eines Likelihood-Quotienten-Tests verglichen. Alle Variablen mit $p < 0{,}2$ im Likelihood-Quotienten-Test wurden ausgewählt. Hierzu zählte auch die Promotormethylierung der drei Gene, sodass in drei Modellen jeweils die Promotormethylierung eines der Gene ein Modellparameter wurde. Ein viertes Modell wurde ohne Promotormethylierung etabliert. Die Kohorte war zu klein, um alle drei Gene in einem gemeinsamen Modell betrachten zu können. Die klinischen Parameter, die ein $p < 0{,}2$ im Likelihood-Quotienten-Test erzielt hatten und damit als Modellparameter in Frage kamen, wurden anhand ihrer Korrelation untereinander gruppiert. Von hochkorrelierenden Parametern wurde nur der Parameter mit der höchsten Assoziation zum Überleben in der univarianten Cox-Regression ausgewählt. Zudem erfolgte eine Selektion der Parameter, von denen in beiden neuen Kohorten vollständige Datensätze vorlagen. Die Auswahl fiel abschließend auf die vier klinischen Parameter BMI, Alter, Geschlecht und KHK.

3.4.2 Modellübertragungen auf die untersuchten Kohorten

3.4.2.1 TAVI-Kohorte

Die vier Modelle wurden auf die vollständige TAVI-Kohorte, bestehend aus 56 Patienten, übertragen.

3.4.2.1.1 Risikowertvorhersagen der vier Modelle unter Betrachtung des Gesamtüberlebens

Für alle vier Modelle wurden die ermittelten Risikowerte der Patienten mit und ohne Event zum Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt verglichen. Diese Untersuchung diente der Einschätzung wie gut die Modellübertragung zur prognostischen Vorhersage an der neuen Kohorte funktioniert. Das Event war hier definiert als Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens. Da für den betrachteten Zeitraum von allen Patienten vollständige Daten zum Überleben vorlagen, mussten keine Patienten zensiert werden.

Im Rahmen der Übertragung der vier Modelle konnte kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event ein Jahr (Abbildung 9) und vier Jahre (Abbildung 10) nach Studieneintritt festgestellt werden. Den Patienten mit Event wurde zu beiden Zeitpunkten kein signifikant höherer Risikowert zugeordnet als den Patienten ohne Event (Tabelle 48 und Tabelle 49).

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz war zum Zeitpunkt ein Jahr für das Modell ohne Promotormethylierung, das Modell mit *B9D1*- und das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung der Median der Risikowerte bei den Patienten mit Event höher als bei den Patienten ohne Event. Demgegenüber war zum Zeitpunkt ein Jahr für das Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung der Median der Risikowerte bei den Patienten ohne Event höher als bei den Patienten mit Event. Zum Zeitpunkt vier Jahre ergab sich für alle vier Modelle ein höherer Median der Risikowerte bei den Patienten ohne Event im Vergleich zu den Patienten mit Event.

Tabelle 48: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Kohorte zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 46)	1 (n = 10)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	17 ± 17	21 ± 20	0,54
		Md (Min; Max)	10 (0,35; 72)	11 (0,32; 53)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	36 ± 69	22 ± 27	0,83
		Md (Min; Max)	9,5 (0,10; 414)	9,6 (0,15; 71)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	37 ± 64	22 ± 25	0,72
		Md (Min; Max)	15 (0,16; 314)	12 (0,097; 72)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	19 ± 32	11 ± 12	0,70
		Md (Min; Max)	5,6 (0,056; 160)	7,1 (0,041; 32)	

Ergebnisse der Brunner-Munzel-Tests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im Brunner-Munzel-Test ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

Tabelle 49: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Kohorte zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 30)	1 (n = 26)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	20 ± 18	16 ± 16	0,48
		Md (Min; Max)	13 (0,35; 72)	9,0 (0,32; 53)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	45 ± 81	21 ± 29	0,17
		Md (Min; Max)	14 (0,10; 414)	4,4 (0,15; 109)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	47 ± 76	20 ± 25	0,16
		Md (Min; Max)	23 (0,16; 314)	6,3 (0,097; 90)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	22 ± 37	13 ± 18	0,27
		Md (Min; Max)	8,6 (0,12; 160)	4,4 (0,041; 80)	

Ergebnisse der Brunner-Munzel-Tests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im Brunner-Munzel-Test ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

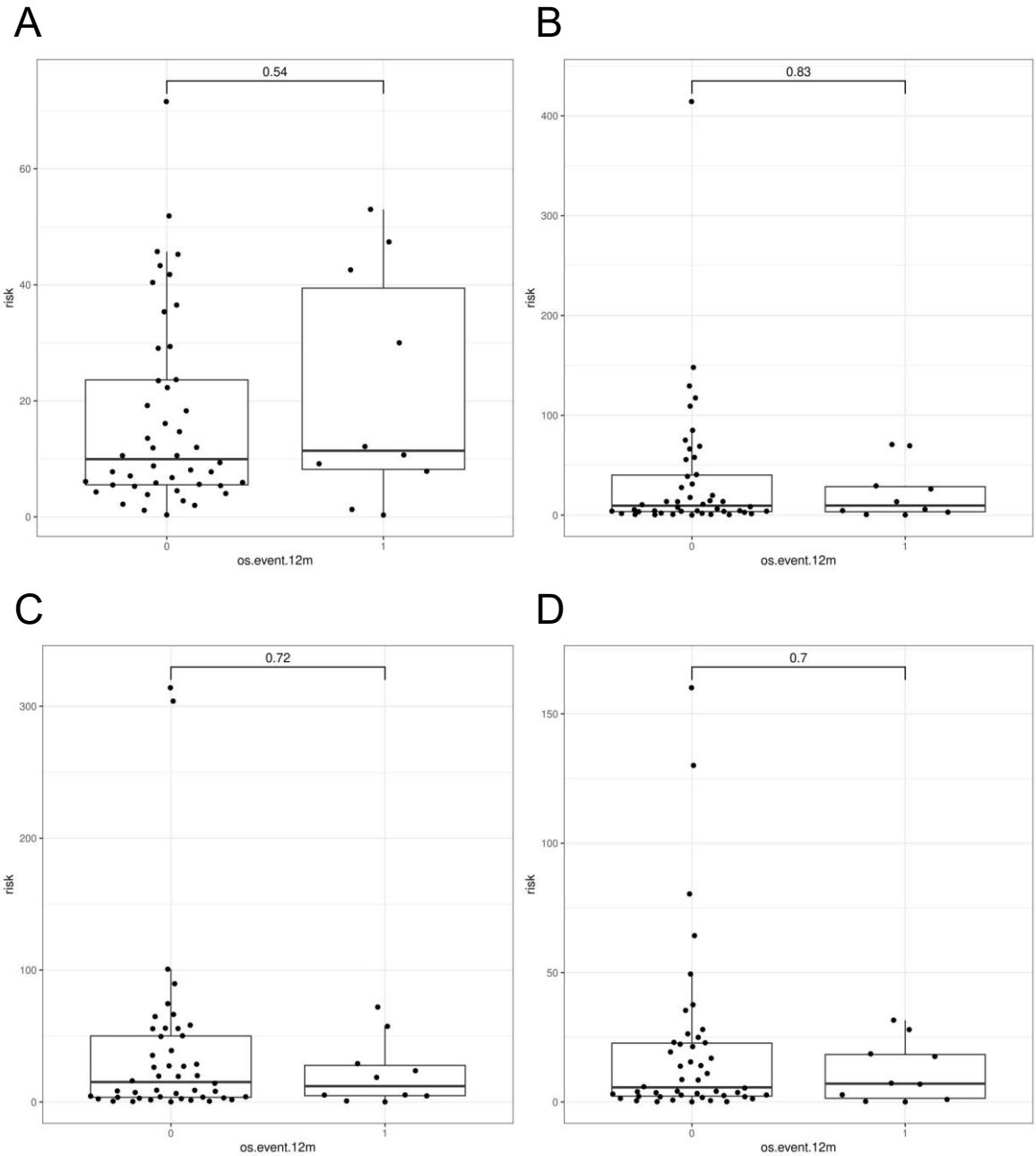

Abbildung 9: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in Brunner-Munzel-Tests. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im Brunner-Munzel-Test ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.12m*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

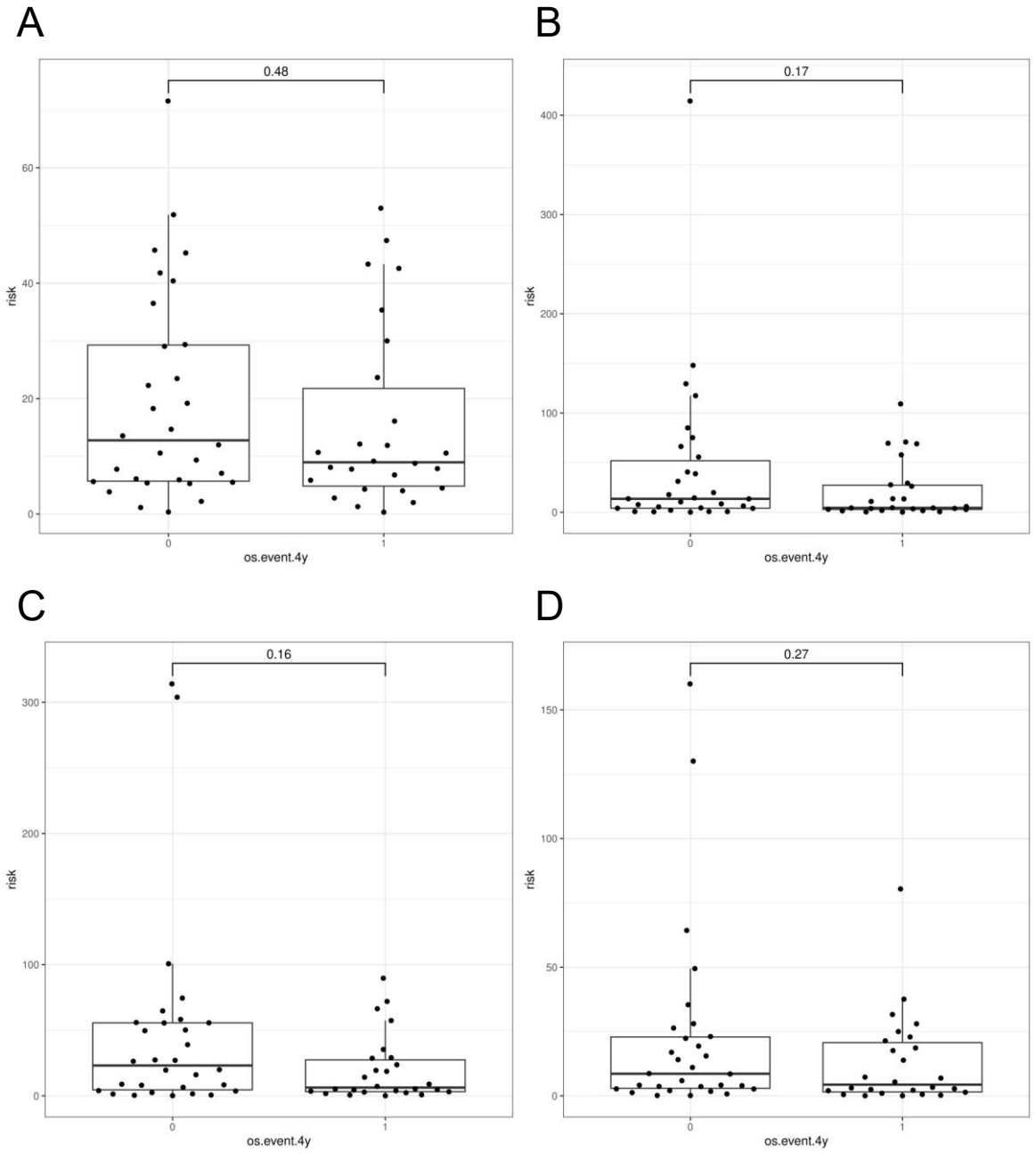

Abbildung 10: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in Brunner-Munzel-Tests. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im Brunner-Munzel-Test ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.4y*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.1.2 Betrachtung der Risikozuteilung durch die Modelle anhand von Überlebenskurven

Um die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht nur zu einzelnen Zeitpunkten zu evaluieren, wurden Überlebenskurven in Zusammenschau mit der Risikozuteilung durch die vier Modelle untersucht. Betrachtet wurde der Zeitraum bis ca. fünf Jahre nach Studieneintritt, für den Daten zum Gesamtüberleben der Patienten der TAVI-Kohorte vorlagen.

Für den betrachteten Zeitraum konnte für kein Modell ein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten nachgewiesen werden (Abbildung 11). Bei keinem der Modelle hatten die Hochrisikopatienten eine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Nicht-Hochrisikopatienten.

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz hatten bei der Modellübertragung ohne Promotormethylierung und bei der Modellübertragung mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung die Hochrisikopatienten eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Nicht-Hochrisikopatienten. Bei der Modellübertragung mit *ATP2A2*-Promotormethylierung konnte keiner der zwei Gruppen im betrachteten Zeitraum eine eindeutig höhere Überlebenswahrscheinlichkeit zugeordnet werden.

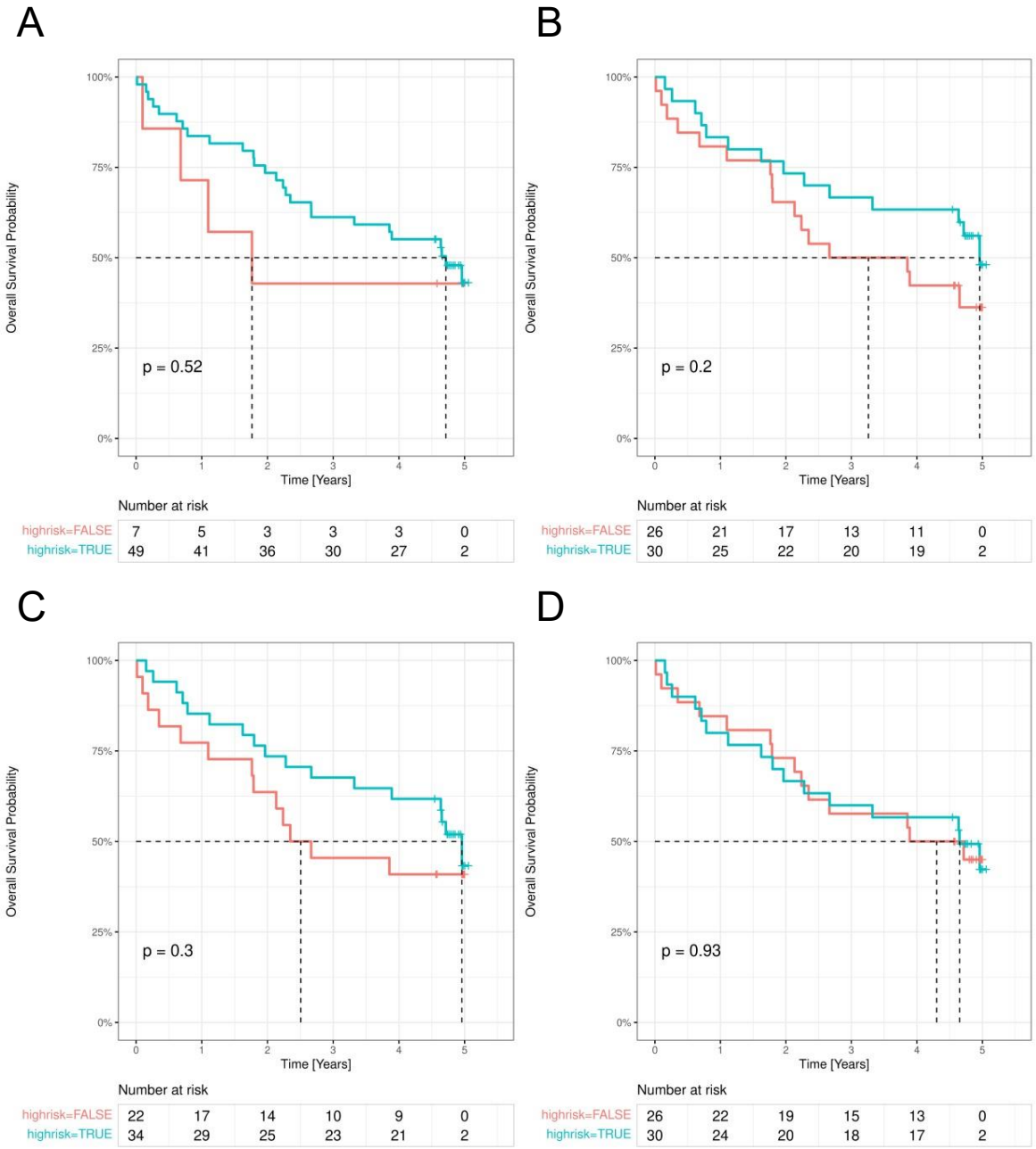

Abbildung 11: TAVI-Kohorte – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven ohne signifikanten Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven für Hochrisikopatienten (blaue Kurve) und für Nicht-Hochrisikopatienten (rote Kurve) der TAVI-Kohorte für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Es ergab sich für die vier Modelle kein signifikanter Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten in Log-Rank-Tests. Auf der y-Achse ist die im Kaplan-Meier-Verfahren berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent (*overall survival probability* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve, Zensierungen als senkrechter Strich in der Kurve, mediane Überlebenszeit als gestrichelte Linie. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Der angegebene p-Wert wurde im Log-Rank-Test der zwei Überlebenskurven ermittelt. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) für die Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikogruppe zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt. *highrisk* = *FALSE*, Nicht-Hochrisikopatienten; *highrisk* = *TRUE*, Hochrisikopatienten (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.1.3 Risikowertvorhersagen der vier Modelle unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens

Von der TAVI-Kohorte lagen neben Daten zum Gesamtüberleben auch Daten zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben vor. Für alle vier Modelle wurden die ermittelten Risikowerte der Patienten mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und der zensierten Patienten zum Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt verglichen. Wie die Betrachtung der Risikowerte gemeinsam mit Daten zum Gesamtüberleben in den zwei vorhergegangenen Kapiteln 3.4.2.1.1 und 3.4.2.1.2, diente auch diese Untersuchung der Einschätzung wie gut die Modellübertragung, in diesem Kapitel bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens, zur prognostischen Vorhersage an der neuen Kohorte funktioniert. Als Event war hier das Versterben definiert. Die zensierten Patienten entsprachen hier den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten, also Patienten ohne Event.

Bei keinem der vier Modelle konnte ein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten der drei betrachteten Gruppen ein Jahr (Abbildung 12) und vier Jahre (Abbildung 13) nach Studieneintritt festgestellt werden (Tabelle 50 und Tabelle 51). Bei kleiner Gruppengröße zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt war die statistische Aussagekraft entsprechend eingeschränkt.

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz war zu beiden Zeitpunkten der Median der Risikowerte für die vier Modelle bei den Patienten mit kardiovaskulärem Event niedriger als bei den zensierten Patienten. Zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt hatten die Patienten mit nicht-kardiovaskulärem Event in allen vier Modellen einen höheren Median der Risikowerte als die zensierten Patienten. Demgegenüber hatten zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in allen vier Modellen die Patienten mit nicht-kardiovaskulärem Event einen niedrigeren Median der Risikowerte als die zensierten Patienten.

Tabelle 50: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Kohorte ein Jahr nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	kardio-vaskuläres Event (n = 3)	nicht-kardio-vaskuläres Event (n = 7)	zensiert (n = 46)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	13 ± 15	25 ± 22	17 ± 17	0,40
		Md (Min; Max)	7,9 (0,32; 30)	12 (1,3; 53)	10 (0,35; 72)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	3,5 ± 2,9	30 ± 29	36 ± 69	0,38
		Md (Min; Max)	4,5 (0,15; 5,8)	26 (0,56; 71)	9,5 (0,10; 414)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	3,6 ± 3,0	29 ± 26	37 ± 64	0,25
		Md (Min; Max)	5,3 (0,097; 5,4)	24 (0,81; 72)	15 (0,16; 314)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	10 ± 15	12 ± 11	19 ± 32	0,80
		Md (Min; Max)	2,8 (0,041; 28)	7,3 (0,23; 32)	5,6 (0,056; 160)	

Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten ein Jahr nach Studieneintritt. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen. Angabe des im Kruskal-Wallis-Test ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Als Event war hier das Versterben definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

Tabelle 51: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Kohorte vier Jahre nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	kardio-vaskuläres Event (n = 13)	nicht-kardio-vaskuläres Event (n = 13)	zensiert (n = 30)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	10 ± 9	21 ± 20	20 ± 18	0,33
		Md (Min; Max)	8,1 (0,32; 30)	11 (1,3; 53)	13 (0,35; 72)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	11 ± 19	30 ± 35	45 ± 81	0,18
		Md (Min; Max)	4,3 (0,15; 69)	13 (0,56; 109)	14 (0,10; 414)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	18 ± 28	21 ± 23	47 ± 76	0,29
		Md (Min; Max)	5,3 (0,097; 90)	19 (0,81; 72)	23 (0,16; 314)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	16 ± 22	10 ± 12	22 ± 37	0,52
		Md (Min; Max)	3,3 (0,041; 80)	5,4 (0,23; 38)	8,6 (0,12; 160)	

Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten vier Jahre nach Studieneintritt. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen. Angabe des im Kruskal-Wallis-Test ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Als Event war hier das Versterben definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

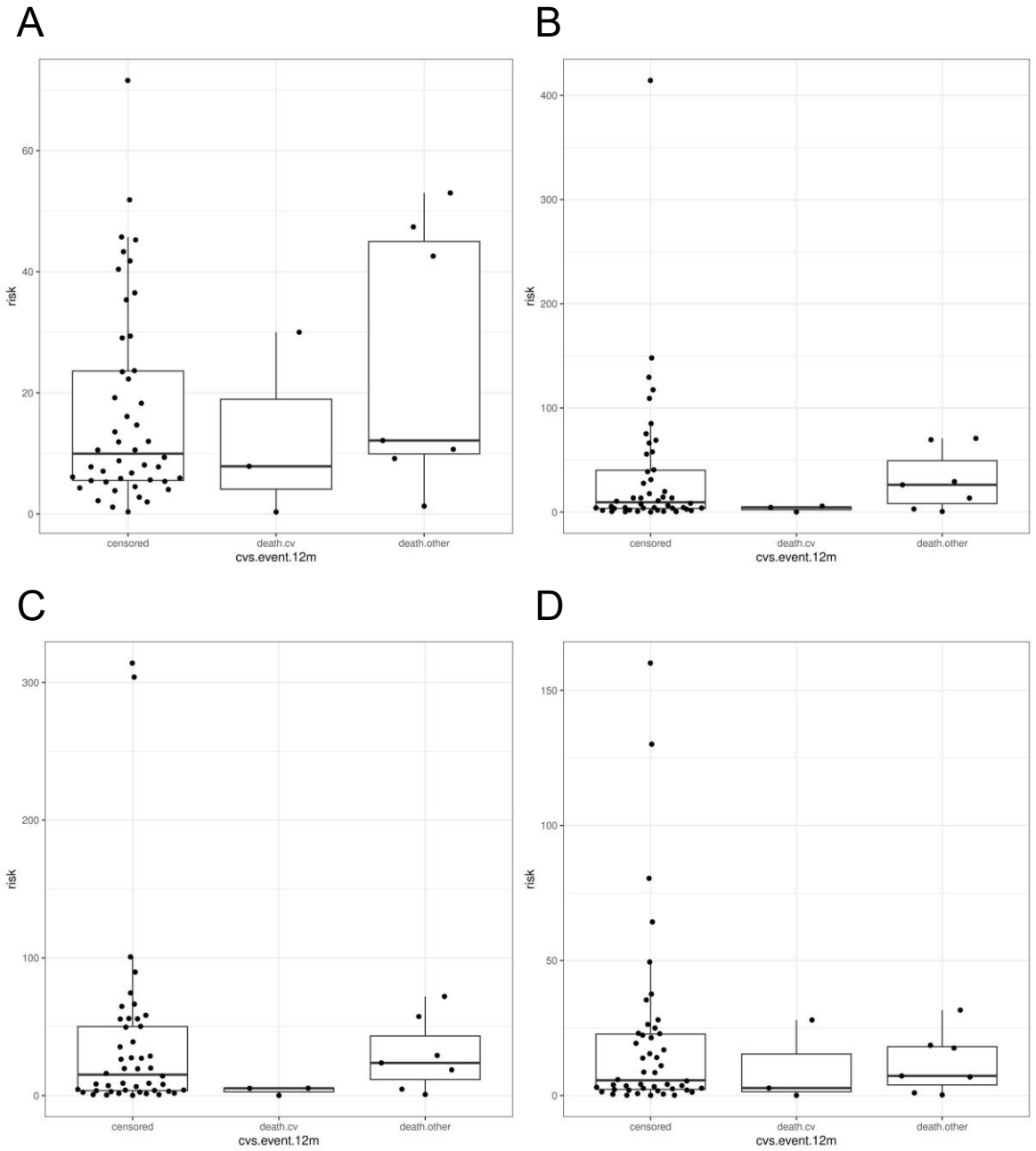

Abbildung 12: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten ein Jahr nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen in Kruskal-Wallis-Tests. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Als Event war hier das Versterben definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *cvs.event.12m*, Eventstatus bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt; *censored*, zensierte Patienten; *death.cv*, kardiovaskuläres Event; *death.other*, nicht-kardiovaskuläres Event (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

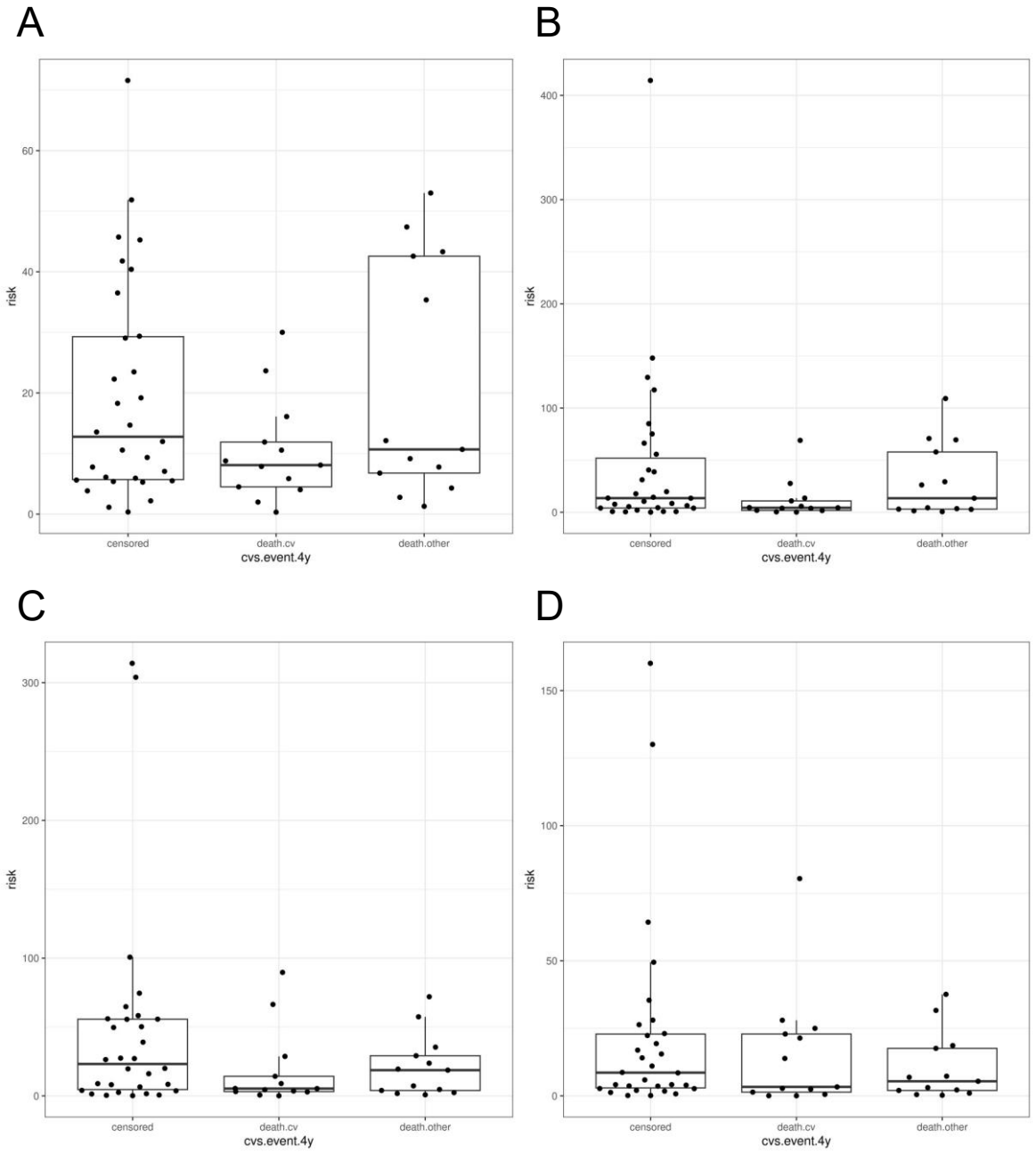

Abbildung 13: TAVI-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Kohorte mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten vier Jahre nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen in Kruskal-Wallis-Tests. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Als Event war hier das Versterben definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *cvs.event.4y*, Eventstatus bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt; *censored*, zensierte Patienten; *death.cv*, kardiovaskuläres Event; *death.other*, nicht-kardiovaskuläres Event (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.1.4 Betrachtung der Risikozuteilung durch die Modelle anhand von kumulativen Inzidenzkurven

Um die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung hinsichtlich des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens nicht nur zu einzelnen Zeitpunkten zu evaluieren, wurden kumulative Inzidenzkurven in Zusammenschau mit der Risikozuteilung durch die vier Modelle betrachtet. Das ereignisspezifische Überleben wurde in Abhängigkeit von den konkurrierenden Ereignissen kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben jeweils getrennt betrachtet. Untersucht wurde der Zeitraum bis ca. fünf Jahre nach Studieneintritt, für den Daten zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben der Patienten der TAVI-Kohorte vorlagen.

Für alle vier Modelle konnte im betrachteten Zeitraum, sowohl für kardiovaskuläres als auch für nicht-kardiovaskuläres Versterben, kein signifikanter Unterschied der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit zwischen Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten festgestellt werden (Abbildung 14). Für kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben hatten die Hochrisikopatienten bei keinem der Modelle im Vergleich zu den Nicht-Hochrisikopatienten eine signifikant höhere kumulative Eventwahrscheinlichkeit.

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz hatten im Modell mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung die Hochrisikopatienten eine niedrigere kumulative Wahrscheinlichkeit für Events bei Betrachtung des kardiovaskulären Versterbens. In den Modellen ohne Promotormethylierung und mit *ATP2A2*-Promotormethylierung ließ sich keiner der zwei Risikogruppen für kardiovaskuläres Versterben eine eindeutig höhere Wahrscheinlichkeit für Events zuordnen. Im Modell ohne Promotormethylierung hatten die Hochrisikopatienten eine niedrigere kumulative Wahrscheinlichkeit für Events bei Betrachtung des nicht-kardiovaskulären Versterbens. Für die anderen drei Modelle ließ sich bei Betrachtung des nicht-kardiovaskulären Versterbens keiner der zwei Risikogruppen eine eindeutig höhere Wahrscheinlichkeit für Events zuordnen.

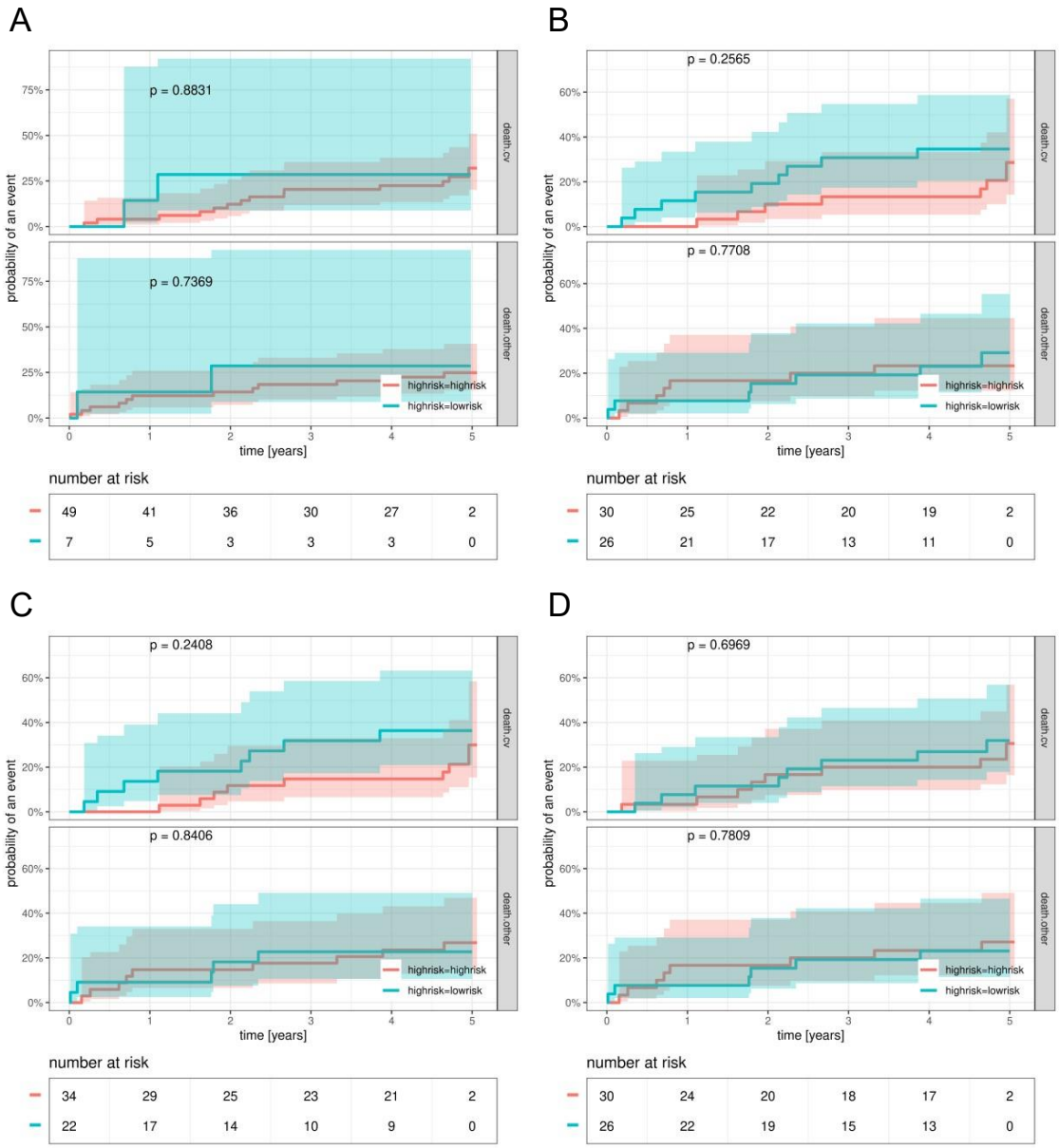

Abbildung 14: TAVI-Kohorte – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens mithilfe kumulativer Inzidenzkurven ohne signifikanten Unterschied in der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Vergleich der kumulativen Inzidenzkurven für die Gruppe der Hochrisikopatienten (rote Kurve) und für Nicht-Hochrisikopatienten (blaue Kurve) der TAVI-Kohorte für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Das ereignisspezifische Überleben wurde in Abhängigkeit von den konkurrierenden Ereignissen kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben untersucht und es sind die jeweils dazugehörigen kumulativen Inzidenzkurven dargestellt. In nicht-parametrischen Gray-Tests ergab sich für die vier Modelle sowohl für kardiovaskuläres als auch für nicht-kardiovaskuläres Versterben kein signifikanter Unterschied der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Auf der y-Achse ist die per Aalen-Johansen-Schätzer berechnete kumulative Wahrscheinlichkeit für ein Event in Prozent (*probability of an event* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve, Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls der Eventwahrscheinlichkeit je Kurve als Konfidenzband. Als Event war hier das Versterben definiert. Der angegebene p-Wert wurde im nicht-parametrischen Gray-Test ermittelt. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) für die Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikogruppe zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt. *highrisk* = *lowrisk*, Nicht-Hochrisikopatienten; *highrisk* = *highrisk*, Hochrisikopatienten; *death.cv*, Gruppe der Patienten mit kardiovaskulärem Event; *death.other*, Gruppe der Patienten mit nicht-kardiovaskulärem Event (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.1.5 Vergleich klinischer Parameter der DIAST- und TAVI-Kohorte

Die in die vier Modelle einfließenden klinischen Parameter wurden zwischen der TAVI- und DIAST-Kohorte verglichen. Ziel war es, die Vergleichbarkeit der zwei Kohorten zu bewerten und dadurch Hinweise für die Gründe der fehlenden Übertragbarkeit der Modelle zu finden. Außer für die *RASAL1*-Promotormethylierung, ergaben sich für alle klinischen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den zwei Kohorten. Die Patienten der TAVI-Kohorte waren älter und hatten einen niedrigeren BMI. Es gab mehr männliche und weniger weibliche Patienten. Mehr Patienten hatten eine KHK und die *ATP2A2*- und *B9D1*-Promotormethylierung war niedriger (Tabelle 52).

Tabelle 52: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der TAVI-Kohorte

Parameter	Messwert	DIAST-Kohorte	TAVI-Kohorte	p-Wert	statistischer Test
	n	46	56		
Alter [Jahre]				< 0,01**	Welch-Test
	M ± SD	73 ± 9	80 ± 6		
	Md (Min; Max)	72 (53; 87)	80 (62; 92)		
BMI [kg/m²]				< 0,01**	Welch-Test
	M ± SD	32 ± 7	28 ± 5		
	Md (Min; Max)	31 (22; 51)	27 (20; 46)		
Geschlecht				0,03*	Exakter Fisher-Test
männlich	a. H. (r. H.)	15 (32,6%)	31 (55,4%)		
weiblich	a. H. (r. H.)	31 (67,4%)	25 (44,6%)		
KHK				< 0,01**	Exakter Fisher-Test
nein	a. H. (r. H.)	32 (69,6%)	15 (26,8%)		
ja	a. H. (r. H.)	14 (30,4%)	41 (73,2%)		
lnM *ATP2A2*				0,01*	Welch-Test
	M ± SD	-5,5 ± 1,4	-6,2 ± 1,6		
	Md (Min; Max)	-5,4 (-9,5; -2,5)	-6,3 (-9,9; -3,0)		
lnM *B9D1*				< 0,01**	Welch-Test
	M ± SD	-3,7 ± 1,2	-4,4 ± 1,2		
	Md (Min; Max)	-3,7 (-6,4; -1,0)	-4,3 (-7,7; -1,7)		
lnM *RASAL1*				0,96	Welch-Test
	M ± SD	-4,9 ± 1,2	-4,9 ± 1,5		
	Md (Min; Max)	-4,9 (-7,6; -1,9)	-4,9 (-8,4; -1,0)		

Ergebnisse der Welch-Tests bzw. Exakten Fisher-Tests zum Vergleich jedes in die Modelle einfließenden klinischen Parameters zwischen der TAVI- und DIAST-Kohorte. Es ergab sich für alle Parameter, außer der *RASAL1*-Promotormethylierung, ein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten. Angabe des im jeweils genannten statistischen Test ermittelten p-Werts mit zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. n, Anzahl; lnM, natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung; a. H., absolute Häufigkeit; r. H., relative Häufigkeit; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.2 TAVI-Subkohorte nach *Propensity Score Matching*

Im Verlauf der Berechnungen zur Modellübertragung auf die TAVI-Kohorte wurde ein *Propensity Score Matching* zwischen den Patienten der TAVI- und DIAST-Kohorte durchgeführt. Ziel war es, die Vergleichbarkeit der zwei Kohorten zu erhöhen, um die Übertragbarkeit der Modelle zu optimieren. Die vier Modelle wurden auf die Subkohorte übertragen, die sich aus 18 Patienten zusammensetzte. Die Übertragung der vier Modelle auf die TAVI-Subkohorte nach *Matching* führte insgesamt zu ähnlichen Ergebnissen wie die Übertragung der Modelle auf die vollständige TAVI-Kohorte in Kapitel 3.4.2.1. Bei kleiner Gruppengröße nach dem *Matching* war die statistische Aussagefähigkeit der Modellübertragung entsprechend eingeschränkt.

3.4.2.2.1 Vergleich klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der TAVI-Subkohorte nach *Matching*

Um die Vergleichbarkeit der zwei Kohorten nach dem *Matching* zu bewerten, wurden die in die vier Modelle einfließenden klinischen Parameter zwischen der TAVI-Subkohorte nach *Matching* und der DIAST-Kohorte verglichen. Es ergaben sich für alle klinischen Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Kohorten (Tabelle 53).

Tabelle 53: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der TAVI-Subkohorte nach *Matching*

Parameter	Messwert	DIAST-Kohorte	TAVI-Subkohorte nach *Matching*	p-Wert	statistischer Test
	n	46	18		
Alter [Jahre]				0,09	Welch-Test
	M ± SD	73 ± 9	76 ± 7		
	Md (Min; Max)	72 (53; 87)	78 (62; 85)		
BMI [kg/m²]				0,38	Welch-Test
	M ± SD	32 ± 7	31 ± 7		
	Md (Min; Max)	31 (22; 51)	29 (21; 46)		
Geschlecht				0,15	Exakter Fisher-Test
männlich	a. H. (r. H.)	15 (32,6%)	10 (55,6%)		
weiblich	a. H. (r. H.)	31 (67,4%)	8 (44,4%)		
KHK				0,09	Exakter Fisher-Test
nein	a. H. (r. H.)	32 (69,6%)	8 (44,4%)		
ja	a. H. (r. H.)	14 (30,4%)	10 (55,6%)		
lnM *ATP2A2*				0,56	Welch-Test
	M ± SD	-5,5 ± 1,4	-5,7 ± 1,6		
	Md (Min; Max)	-5,4 (-9,5; -2,5)	-6,1 (-8,2; -3,0)		
lnM *B9D1*				0,18	Welch-Test
	M ± SD	-3,7 ± 1,2	-4,0 ± 0,9		
	Md (Min; Max)	-3,7 (-6,4; -1,0)	-4,0 (-5,5; -2,7)		
lnM *RASAL1*				0,84	Welch-Test
	M ± SD	-4,9 ± 1,2	-4,8 ± 1,4		
	Md (Min; Max)	-4,9 (-7,6; -1,9)	-5,1 (-6,6; -2,6)		

Ergebnisse der Welch-Tests bzw. Exakten Fisher-Tests zum Vergleich jedes in die Modelle einfließenden klinischen Parameters zwischen der TAVI-Subkohorte nach *Matching* und der DIAST-Kohorte. Es ergab sich für alle Parameter kein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten. Angabe des im jeweils genannten statistischen Test ermittelten p-Werts mit zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. n, Anzahl; lnM, natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung; a. H., absolute Häufigkeit; r. H., relative Häufigkeit; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.2.2 Risikowertvorhersagen der vier Modelle unter Betrachtung des Gesamtüberlebens

Für alle vier Modelle wurden die ermittelten Risikowerte der Patienten mit und ohne Event zum Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt verglichen. Diese Untersuchung diente der Einschätzung wie gut die Modellübertragung zur prognostischen Vorhersage an der neuen Kohorte funktioniert. Das Event war hier definiert als Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens. Da für den betrachteten Zeitraum von allen Patienten vollständige Daten zum Überleben vorlagen, mussten keine Patienten zensiert werden.

Wie schon bei der Übertragung der vier Modelle auf die vollständige TAVI-Kohorte (siehe auch Kapitel 3.4.2.1.1), konnte auch im Rahmen der Übertragung der vier Modelle auf die TAVI-Subkohorte nach *Matching* kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event ein Jahr (Abbildung 15) und vier Jahre (Abbildung 16) nach Studieneintritt festgestellt werden. Den Patienten mit Event wurde zu beiden Zeitpunkten kein signifikant höherer Risikowert zugeordnet als den Patienten ohne Event (Tabelle 54 und Tabelle 55).

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz war zum Zeitpunkt ein Jahr für das Modell ohne Promotormethylierung und das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung der Median der Risikowerte bei den Patienten mit Event höher. Demgegenüber war zum Zeitpunkt ein Jahr für die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung der Median der Risikowerte bei den Patienten ohne Event höher. Zum Zeitpunkt vier Jahre ergab sich für das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung ein höherer Median der Risikowerte bei den Patienten ohne Event. Demgegenüber war in den anderen drei Modellen der Median der Risikowerte bei den Patienten mit Event höher.

Tabelle 54: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 15)	1 (n = 3)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	12 ± 15	5,8 ± 4,8	0,97
		Md (Min; Max)	5,9 (0,35; 43)	7,9 (0,32; 9.2)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	25 ± 39	10 ± 14	0,64
		Md (Min; Max)	7,7 (0,10; 117)	4,5 (0,15; 26)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	19 ± 27	12 ± 15	0,75
		Md (Min; Max)	8,1 (0,16; 101)	5,4 (0,097; 29)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	10 ± 11	12 ± 15	0,97
		Md (Min; Max)	5,9 (0,12; 38)	7,3 (0,041; 28)	

Ergebnisse der studentisierten Permutationstests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

Tabelle 55: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 10)	1 (n = 8)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	9,0 ± 12,1	14 ± 16	0,41
		Md (Min; Max)	5,6 (0,35; 42)	7,3 (0,32; 43)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	19 ± 36	27 ± 39	0,68
		Md (Min; Max)	7,0 (0,10; 117)	7,7 (0,15; 109)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	22 ± 32	14 ± 13	0,93
		Md (Min; Max)	6,0 (0,16; 101)	9,8 (0,097; 35)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	8,0 ± 6,5	13 ± 14	0,81
		Md (Min; Max)	7,2 (0,12; 19)	6,3 (0,041; 38)	

Ergebnisse der studentisierten Permutationstests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

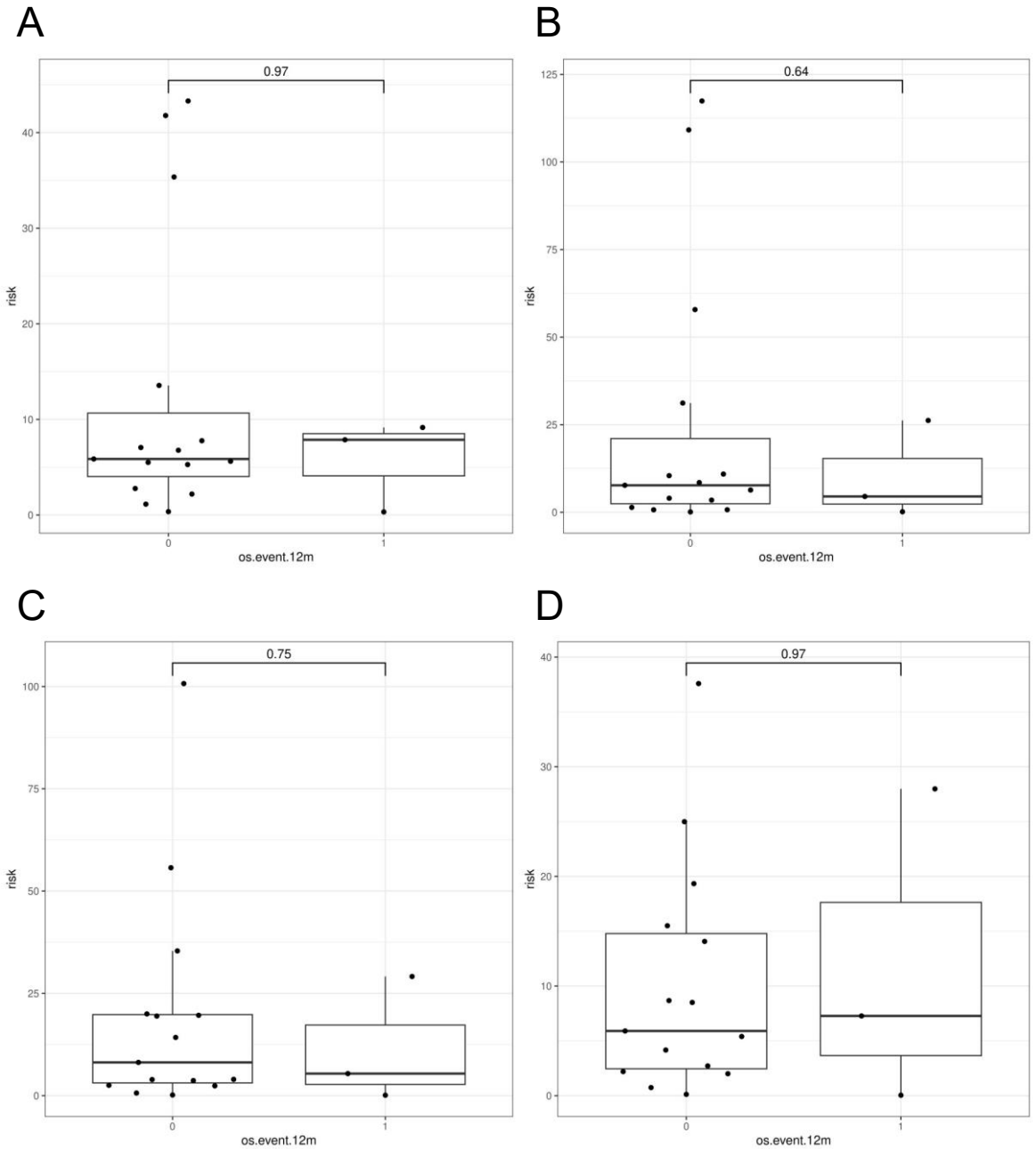

Abbildung 15: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in studentisierten Permutationstests. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.12m*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

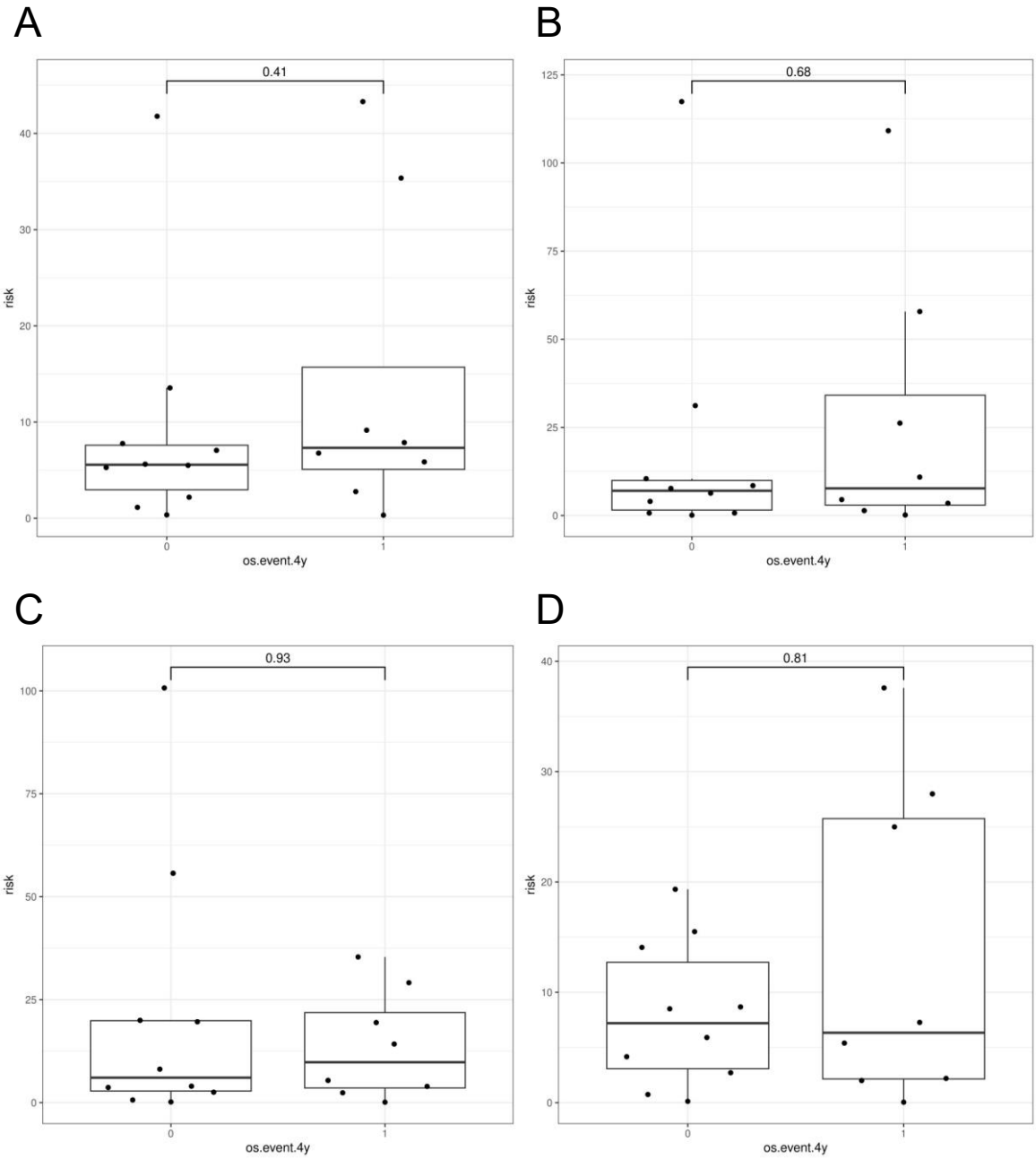

Abbildung 16: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in studentisierten Permutationstests. Es gab keine zensierten Patienten. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.4y*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.2.3 Betrachtung der Risikozuteilung durch die Modelle anhand von Überlebenskurven

Um die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht nur zu einzelnen Zeitpunkten zu evaluieren, wurden auch für die TAVI-Subkohorte nach *Matching* Überlebenskurven in Zusammenschau mit der Risikozuteilung durch die vier Modelle untersucht. Betrachtet wurde der Zeitraum bis ca. fünf Jahre nach Studieneintritt, für den Daten zum Gesamtüberleben vorlagen.

Wie schon für die vollständige TAVI-Kohorte (siehe auch Kapitel 3.4.2.1.2), konnte auch für die TAVI-Subkohorte nach *Matching* für den betrachteten Zeitraum für kein Modell ein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten nachgewiesen werden (Abbildung 17). Bei keinem der Modelle hatten die Hochrisikopatienten eine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Nicht-Hochrisikopatienten.

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz hatten bei der Modellübertragung mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung die Hochrisikopatienten eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Nicht-Hochrisikopatienten. Bei der Modellübertragung ohne Promotormethylierung und bei der Modellübertragung mit *ATP2A2*-Promotormethylierung konnte keiner der zwei Gruppen im betrachteten Zeitraum eine eindeutig höhere Überlebenswahrscheinlichkeit zugeordnet werden.

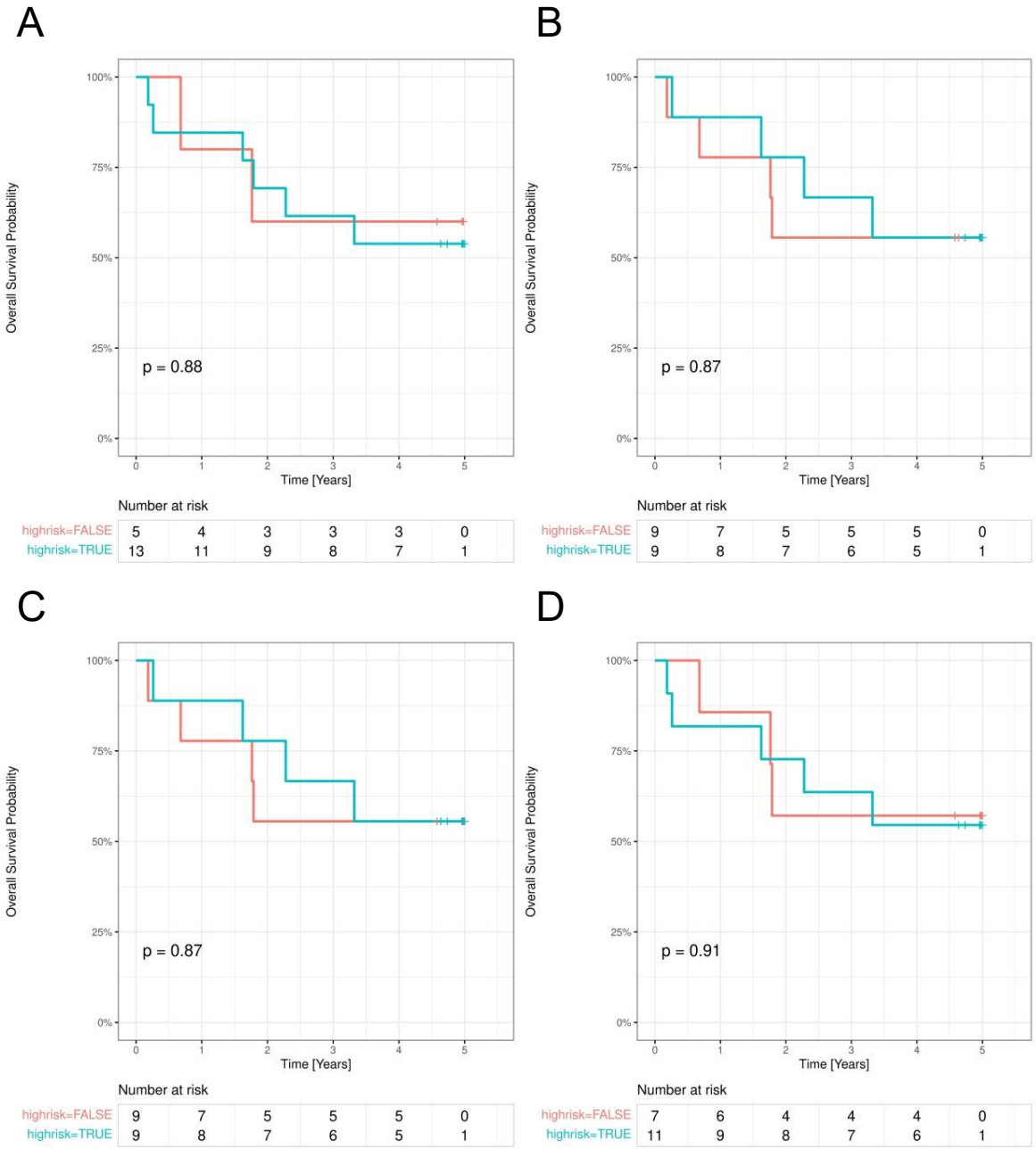

Abbildung 17: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven ohne signifikanten Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven für Hochrisikopatienten (blaue Kurve) und für Nicht-Hochrisikopatienten (rote Kurve) der TAVI-Kohorte für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Es ergab sich für die vier Modelle kein signifikanter Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten in Log-Rank-Tests. Auf der y-Achse ist die im Kaplan-Meier-Verfahren berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent (*overall survival probability* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve, Zensierungen als senkrechter Strich in der Kurve. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Der angegebene p-Wert wurde im Log-Rank-Test der zwei Überlebenskurven ermittelt. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) für die Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikogruppe zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt. *highrisk* = *FALSE*, Nicht-Hochrisikopatienten; *highrisk* = *TRUE*, Hochrisikopatienten (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.2.4 Risikowertvorhersagen der vier Modelle unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens

Für alle vier Modelle wurden die ermittelten Risikowerte der Patienten mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und der zensierten Patienten zum Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt verglichen. Diese Untersuchung diente der Einschätzung wie gut die Modellübertragung bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zur prognostischen Vorhersage an der neuen Kohorte funktioniert. Als Event war hier das Versterben definiert. Die zensierten Patienten entsprachen hier den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten, also Patienten ohne Event.

Bei keinem der vier Modelle konnte ein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten der drei betrachteten Gruppen ein Jahr (Abbildung 18) und vier Jahre (Abbildung 19) nach Studieneintritt festgestellt werden (Tabelle 56 und Tabelle 57).

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz war zum Zeitpunkt ein Jahr der Median der Risikowerte für alle Modelle bei den Patienten mit nicht-kardiovaskulärem Event höher als bei den zensierten Patienten. Zum Zeitpunkt ein Jahr hatten die Patienten mit kardiovaskulärem Event, außer im Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung, einen niedrigeren Median der Risikowerte als die zensierten Patienten. Zum Zeitpunkt vier Jahre hatten die Patienten mit nicht-kardiovaskulärem Event, außer im Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung, einen höheren Risikowert als die zensierten Patienten. Die Patienten mit kardiovaskulärem Event hatten in den Modellen mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung einen niedrigeren Risikowert als die zensierten Patienten, in den Modellen ohne Biomarker und mit *ATP2A2*-Promotormethylierung hatten die Patienten mit kardiovaskulärem Event einen höheren Risikowert als die zensierten Patienten.

Tabelle 56: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* ein Jahr nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	kardio-vaskuläres Event (n = 2)	nicht-kardio-vaskuläres Event (n = 1)	zensiert (n = 15)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	4,1 ± 5,3	9,2 ± NA	12 ± 15	0,56
		Md (Min; Max)	4,1 (0,32; 7,9)	9,2 (9,2; 9,2)	5,9 (0,35; 43)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	2,3 ± 3,1	26 ± NA	25 ± 39	0,34
		Md (Min; Max)	2,3 (0,15; 4,5)	26 (26; 26)	7,7 (0,10; 117)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	2,7 ± 3,7	29 ± NA	19 ± 27	0,28
		Md (Min; Max)	2,7 (0,097; 5,4)	29 (29; 29)	8,1 (0,16; 101)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	14 ± 20	7,3 ± NA	10 ± 11	0,99
		Md (Min; Max)	14 (0,041; 28)	7,3 (7,3; 7,3)	5,9 (0,12; 38)	

Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten ein Jahr nach Studieneintritt. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen. Angabe des im Kruskal-Wallis-Test ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Als Event war hier das Versterben definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

Tabelle 57: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event sowie für die zensierten Patienten unter Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens in der TAVI-Subkohorte nach *Matching* vier Jahre nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	kardio-vaskuläres Event (n = 3)	nicht-kardio-vaskuläres Event (n = 5)	zensiert (n = 10)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	4,7 ± 3,9	19 ± 18	9,0 ± 12,1	0,30
		Md (Min; Max)	5,9 (0,32; 7,9)	9,2 (2,8; 43)	5,6 (0,35; 42)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	5,2 ± 5,4	40 ± 45	19 ± 36	0,54
		Md (Min; Max)	4,5 (0,15; 11)	26 (1,4; 109)	7,0 (0,10; 117)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	6,6 ± 7,1	18 ± 15	22 ± 32	0,62
		Md (Min; Max)	5,4 (0,097; 14)	19 (2,4; 35)	6,0 (0,16; 101)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	18 ± 15	11 ± 15	8,0 ± 6,5	0,81
		Md (Min; Max)	25 (0,041; 28)	5,4 (2,0; 38)	7,2 (0,12; 19)	

Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten vier Jahre nach Studieneintritt. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen. Angabe des im Kruskal-Wallis-Test ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Als Event war hier das Versterben definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

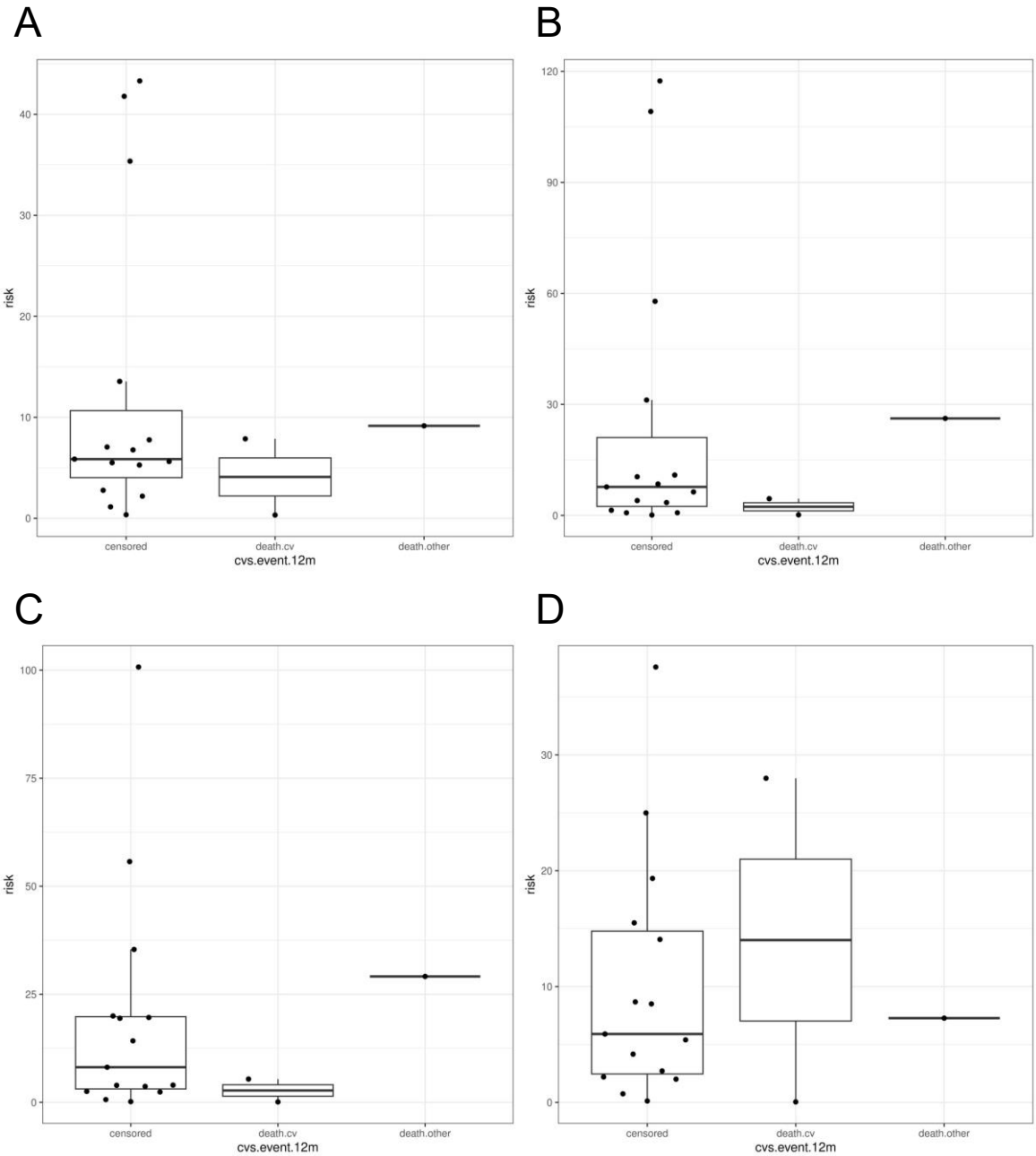

Abbildung 18: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten ein Jahr nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen in Kruskal-Wallis-Tests. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Als Event war hier das Versterben definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *cvs.event.12m*, Eventstatus bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt; *censored*, zensierte Patienten; *death.cv*, kardiovaskuläres Event; *death.other*, nicht-kardiovaskuläres Event (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

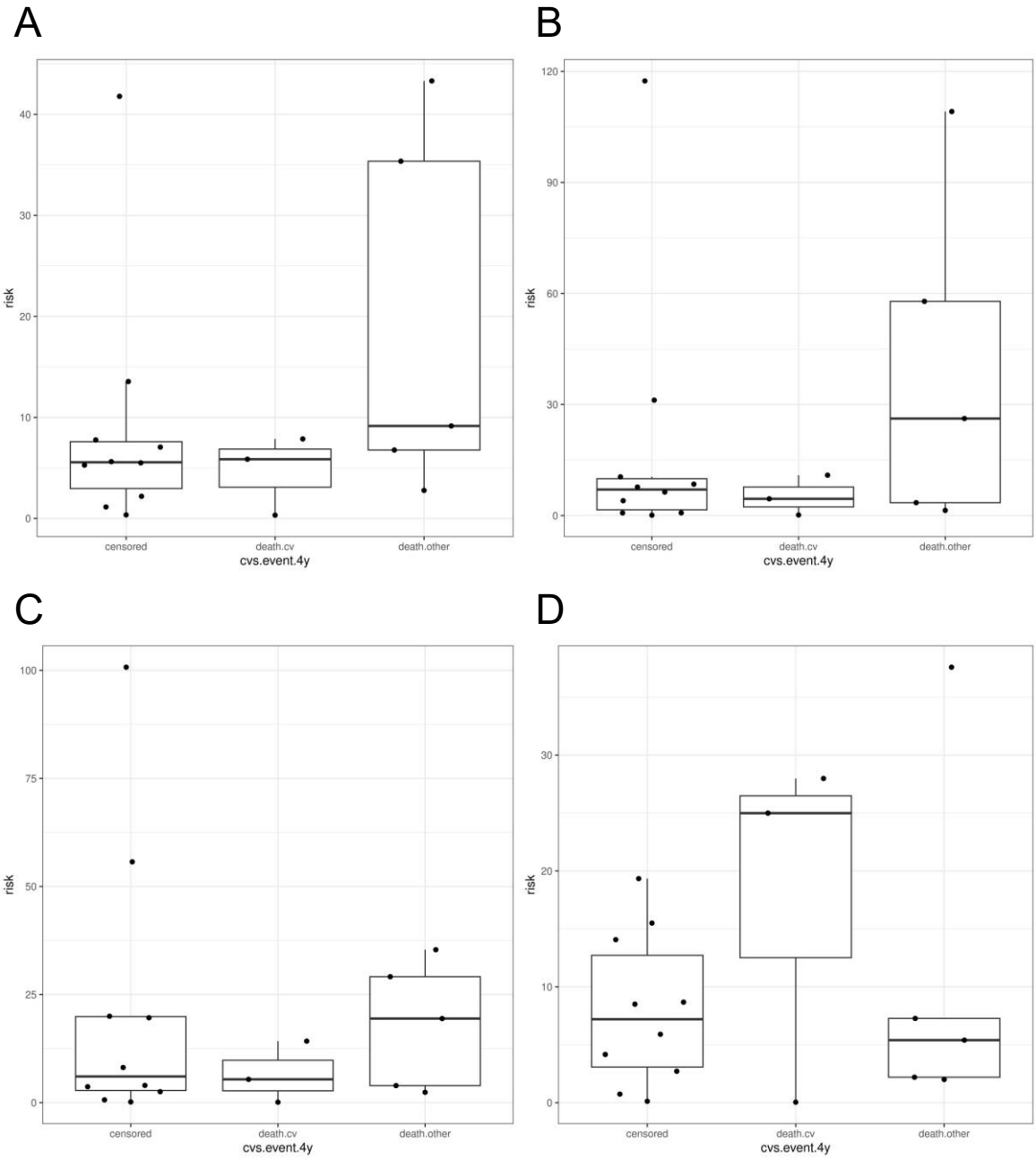

Abbildung 19: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event sowie zensierten Patienten bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der TAVI-Subkohorte nach *Matching* mit kardiovaskulärem Event, mit nicht-kardiovaskulärem Event und für die zensierten Patienten vier Jahre nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den drei Gruppen in Kruskal-Wallis-Tests. Die zensierten Patienten entsprachen den zum entsprechenden Zeitpunkt lebenden Patienten. Als Event war hier das Versterben definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *cvs.event.4y*, Eventstatus bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt; *censored*, zensierte Patienten; *death.cv*, kardiovaskuläres Event; *death.other*, nicht-kardiovaskuläres Event (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.2.5 Betrachtung der Risikozuteilung durch die Modelle anhand von kumulativen Inzidenzkurven

Um die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung hinsichtlich des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens nicht nur zu einzelnen Zeitpunkten zu evaluieren, wurden kumulative Inzidenzkurven in Zusammenschau mit der Risikozuteilung durch die vier Modelle betrachtet. Das ereignisspezifische Überleben wurde in Abhängigkeit von den konkurrierenden Ereignissen kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben jeweils getrennt betrachtet. Untersucht wurde der Zeitraum bis ca. fünf Jahre nach Studieneintritt, für den Daten zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben vorlagen.

Für alle vier Modelle konnte im betrachteten Zeitraum, sowohl für kardiovaskuläres als auch für nicht-kardiovaskuläres Versterben, kein signifikanter Unterschied der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit zwischen Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten festgestellt werden (Abbildung 20). Für kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben hatten die Hochrisikopatienten bei keinem der Modelle im Vergleich zu den Nicht-Hochrisikopatienten eine signifikant höhere kumulative Eventwahrscheinlichkeit.

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz hatten, außer im Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung, die Hochrisikopatienten eine niedrigere kumulative Wahrscheinlichkeit für Events bei Betrachtung des kardiovaskulären Versterbens. Im Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung bei Betrachtung des kardiovaskulären Versterbens und für alle vier Modelle bei der Betrachtung des nicht-kardiovaskulären Versterbens ließ sich keiner der zwei Risikogruppen eine eindeutig höhere Wahrscheinlichkeit für Events zuordnen.

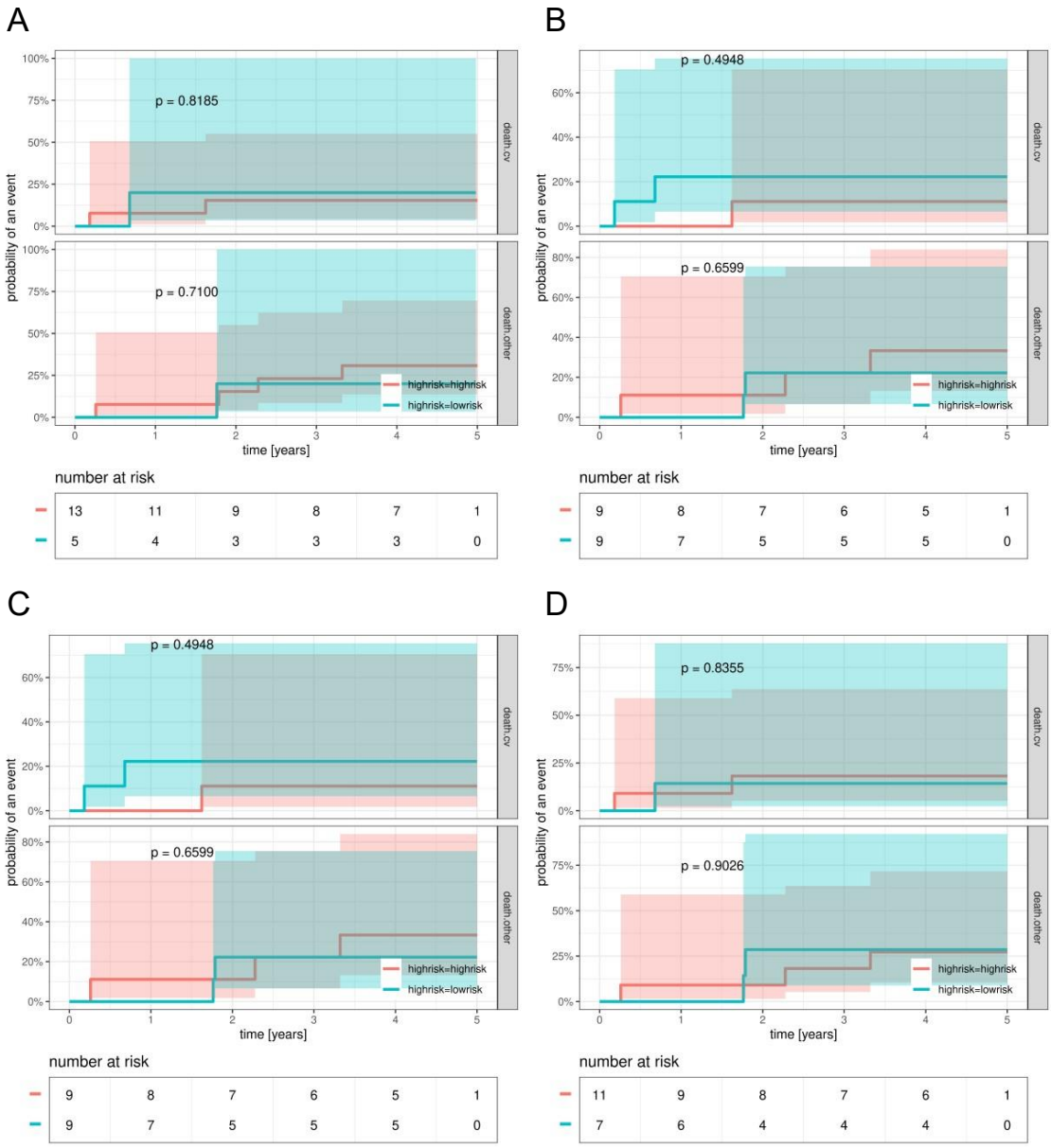

Abbildung 20: TAVI-Subkohorte nach *Matching* – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens mithilfe kumulativer Inzidenzkurven ohne signifikanten Unterschied in der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Vergleich der kumulativen Inzidenzkurven für die Gruppe der Hochrisikopatienten (rote Kurve) und für Nicht-Hochrisikopatienten (blaue Kurve) der TAVI-Subkohorte nach *Matching* für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Das ereignisspezifische Überleben wurde in Abhängigkeit von den konkurrierenden Ereignissen kardiovaskuläres und nicht-kardiovaskuläres Versterben untersucht und es sind die jeweils dazugehörigen kumulativen Inzidenzkurven dargestellt. Im nicht-parametrischen Gray-Test ergab sich für die vier Modelle sowohl für kardiovaskuläres als auch für nicht-kardiovaskuläres Versterben kein signifikanter Unterschied der kumulativen Eventwahrscheinlichkeit der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Auf der y-Achse ist die per Aalen-Johansen-Schätzer berechnete kumulative Wahrscheinlichkeit für ein Event in Prozent (*probability of an event* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve, Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls der Eventwahrscheinlichkeit je Kurve als Konfidenzband. Als Event war hier das Versterben definiert. Der angegebene p-Wert wurde im nicht-parametrischen Gray-Test ermittelt. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) für die Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikogruppe zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt. *highrisk* = *lowrisk*, Nicht-Hochrisikopatienten; *highrisk* = *highrisk*, Hochrisikopatienten; *death.cv*, Gruppe der Patienten mit kardiovaskulärem Event; *death.other*, Gruppe der Patienten mit nicht-kardiovaskulärem Event (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.3 HFpEF-Kohorte

Die vier Modelle wurden auf die vollständige HFpEF-Kohorte, bestehend aus 48 Patienten, übertragen.

3.4.2.3.1 Risikowertvorhersagen der vier Modelle unter Betrachtung des Gesamtüberlebens

Für die HFpEF-Kohorte sollte untersucht werden wie gut die Modellübertragung zur prognostischen Vorhersage an der neuen Kohorte funktioniert. Hierfür wurden für alle vier Modelle die ermittelten Risikowerte der Patienten mit und ohne Event zum Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt verglichen. Das Event war hier definiert als Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens. Es lagen nicht für alle 48 Patienten der HFpEF-Kohorte vollständige Daten zum Überleben vor, sodass für den Zeitpunkt ein Jahr sechs Patienten und für den Zeitpunkt vier Jahre 24 Patienten zensiert werden mussten. Deren Daten wurden von den folgenden Berechnungen ausgeschlossen.

Im Rahmen der Übertragung der vier Modelle konnte kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event ein Jahr (Abbildung 21) und vier Jahre (Abbildung 22) nach Studieneintritt festgestellt werden. Den Patienten mit Event wurde zu beiden Zeitpunkten kein signifikant höherer Risikowert zugeordnet als den Patienten ohne Event (Tabelle 58 und Tabelle 59).

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz war zum Zeitpunkt ein Jahr für die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung der Median der Risikowerte bei den Patienten mit Event höher. Zum Zeitpunkt vier Jahre war der Median der Risikowerte für die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung sowie für das Modell ohne Promotormethylierung bei den Patienten mit Event höher. Demgegenüber zeigte sich für den Zeitpunkt ein Jahr für das Modell ohne Promotormethylierung kein Unterschied im Median der Risikowerte. Für das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung war für beide Zeitpunkte der Median der Risikowerte bei den Patienten ohne Event höher.

Tabelle 58: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Kohorte ein Jahr nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 37)	1 (n = 5)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	13 ± 19	12 ± 15	0,92
		Md (Min; Max)	6,1 (0,42; 112)	6,1 (0,29; 36)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	21 ± 44	9,8 ± 9,9	0,82
		Md (Min; Max)	4,7 (0,26; 246)	9,6 (0,42; 24)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	20 ± 33	12 ± 11	0,91
		Md (Min; Max)	6,7 (0,27; 141)	11 (0,40; 23)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	21 ± 56	9,0 ± 13,1	0,52
		Md (Min; Max)	4,4 (0,14; 322)	0,91 (0,22; 30)	

Ergebnisse der studentisierten Permutationstests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Kohorte mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Es gab sechs zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

Tabelle 59: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Kohorte vier Jahre nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 12)	1 (n = 12)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	20 ± 31	13 ± 12	0,87
		Md (Min; Max)	9,9 (0,42; 112)	11 (0,29; 36)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	42 ± 72	15 ± 16	0,71
		Md (Min; Max)	8,9 (0,30; 246)	13 (0,26; 55)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	36 ± 51	19 ± 19	0,78
		Md (Min; Max)	9,3 (0,52; 141)	17 (0,27; 66)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	48 ± 94	13 ± 17	0,37
		Md (Min; Max)	8,3 (0,59; 322)	7,5 (0,14; 52)	

Ergebnisse der Brunner-Munzel-Tests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Kohorte mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im Brunner-Munzel-Test ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Es gab 24 zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

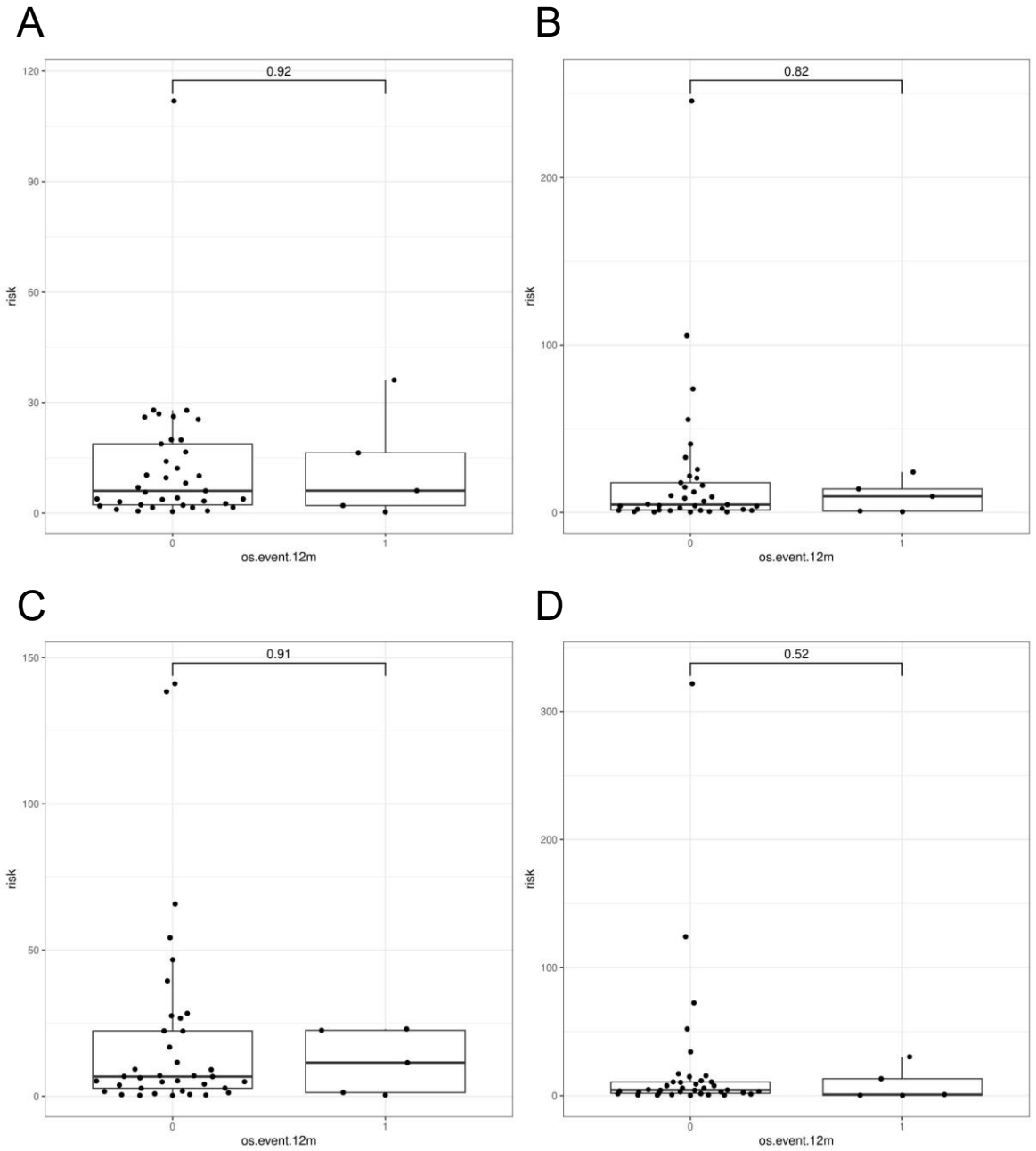

Abbildung 21: HFpEF-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Kohorte mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in studentisierten Permutationstests. Es gab sechs zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.12m*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

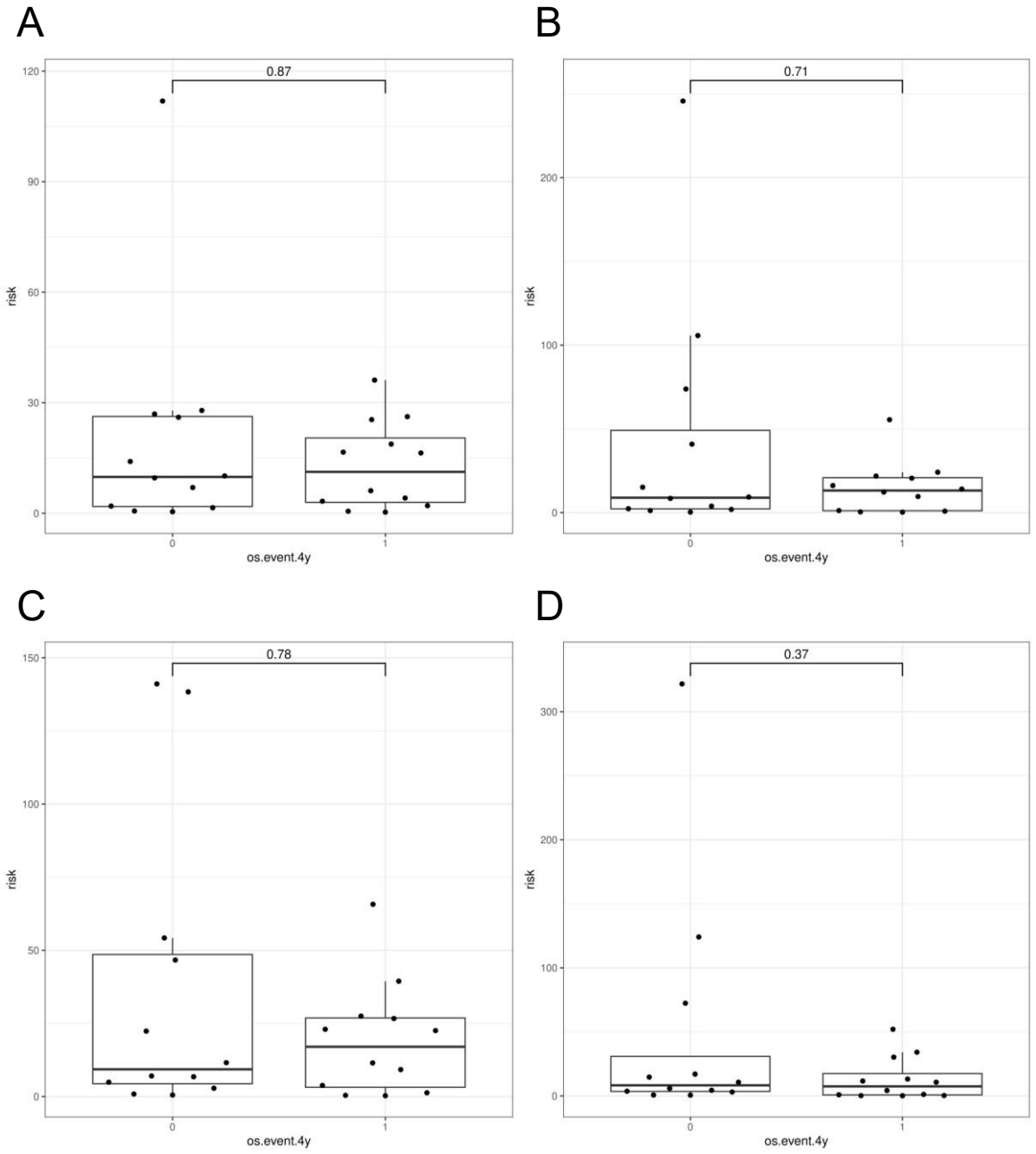

Abbildung 22: HFpEF-Kohorte – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Kohorte mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in Brunner-Munzel-Tests. Es gab 24 zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im Brunner-Munzel-Test ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.4y*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.3.2 Betrachtung der Risikozuteilung durch die Modelle anhand von Überlebenskurven

Um die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht nur zu einzelnen Zeitpunkten zu evaluieren, wurden Überlebenskurven in Zusammenschau mit der Risikozuteilung durch die vier Modelle untersucht. Betrachtet wurde der Zeitraum bis ca. fünf Jahre nach Studieneintritt, für den Daten zum Gesamtüberleben der Patienten der HFpEF-Kohorte vorlagen.

Für kein Modell konnten für den betrachteten Zeitraum signifikante Unterschiede im Überleben zwischen den Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten nachgewiesen werden. Bei keinem der Modelle hatten die Hochrisikopatienten eine signifikant kürzere Überlebenszeit (Abbildung 23).

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz hatten bei der Modellübertragung mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung die Hochrisikopatienten eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Nicht-Hochrisikopatienten. In den Modellen ohne Promotormethylierung und mit *ATP2A2*-Promotormethylierung konnte keiner der zwei Gruppen im betrachteten Zeitraum eine eindeutig höhere Überlebenswahrscheinlichkeit zugeordnet werden.

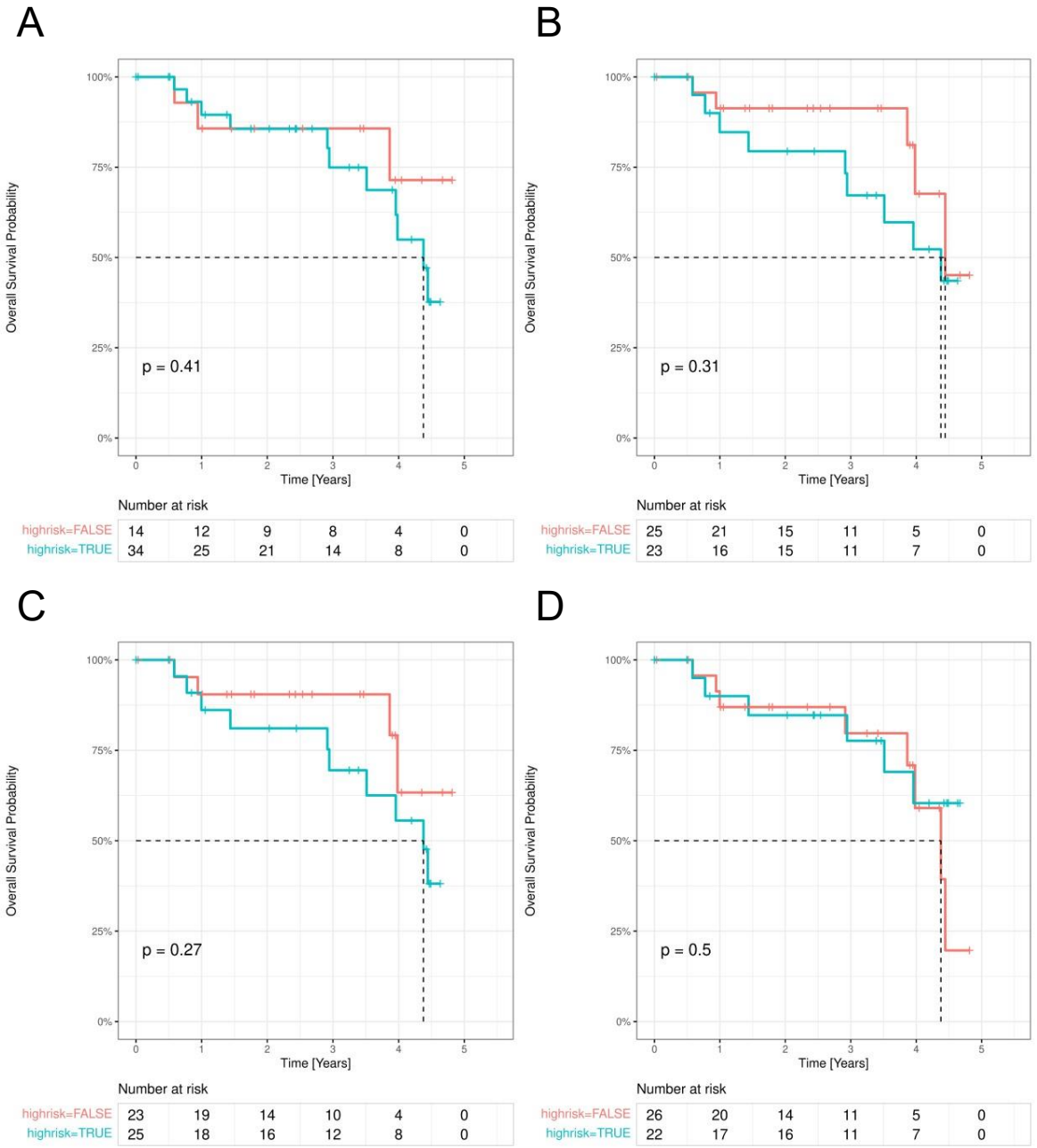

Abbildung 23: HFpEF-Kohorte – Risikozuteilung durch die vier Modelle bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven ohne signifikanten Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven für Hochrisikopatienten (blaue Kurve) und für Nicht-Hochrisikopatienten (rote Kurve) der HFpEF-Kohorte für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. In Log-Rank-Tests der Überlebenskurven ergab sich für die vier Modelle kein signifikanter Unterschied im Überleben der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Auf der y-Achse ist die im Kaplan-Meier-Verfahren berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent (*overall survival probability* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve, Zensierungen als senkrechter Strich in der Kurve, mediane Überlebenszeit als gestrichelte Linie. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Der angegebene p-Wert wurde im Log-Rank-Test der zwei Überlebenskurven ermittelt. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) für die Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikogruppe zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt. *highrisk* = *FALSE*, Nicht-Hochrisikopatienten; *highrisk* = *TRUE*, Hochrisikopatienten (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.3.3 Vergleich klinischer Parameter der DIAST- und HFpEF-Kohorte

Die in die vier Modelle einfließenden klinischen Parameter wurden zwischen der HFpEF- und DIAST-Kohorte verglichen. Ziel war es die Vergleichbarkeit der Kohorten zu bewerten und dadurch Hinweise für die Gründe der fehlenden Übertragbarkeit der Modelle zu finden.

Für den Großteil der Parameter ergab sich ein signifikanter Unterschied zur DIAST-Kohorte (Tabelle 60). Die Patienten der HFpEF-Kohorte waren älter, ihr BMI war niedriger, mehr Patienten hatten eine KHK und die *B9D1*-Promotormethylierung war niedriger. Für die übrigen Parameter zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten.

Tabelle 60: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der HFpEF-Kohorte

Parameter	Messwert	DIAST-Kohorte	HFpEF-Kohorte	p-Wert	statistischer Test
	n	46	48		
Alter [Jahre]				0,05*	Welch-Test
	M ± SD	73 ± 9	77 ± 9		
	Md (Min; Max)	72 (53; 87)	78 (54; 93)		
BMI [kg/m²]				< 0,01**	Welch-Test
	M ± SD	32 ± 7	27 ± 5		
	Md (Min; Max)	31 (22; 51)	27 (19; 40)		
Geschlecht				0,83	Exakter Fisher-Test
männlich	a. H. (r. H.)	15 (32,6%)	17 (35,4%)		
weiblich	a. H. (r. H.)	31 (67,4%)	31 (64,6%)		
KHK				0,01*	Exakter Fisher-Test
nein	a. H. (r. H.)	32 (69,6%)	21 (43,8%)		
ja	a. H. (r. H.)	14 (30,4%)	27 (56,2%)		
lnM *ATP2A2*				0,12	Welch-Test
	M ± SD	-5,5 ± 1,4	-5,9 ± 1,4		
	Md (Min; Max)	-5,4 (-9,5; -2,5)	-6,0 (-8,1; -2,5)		
lnM *B9D1*				< 0,01**	Welch-Test
	M ± SD	-3,7 ± 1,2	-4,3 ± 0,9		
	Md (Min; Max)	-3,7 (-6,4; -1,0)	-4,3 (-6,1; -2,5)		
lnM *RASAL1*				0,64	Welch-Test
	M ± SD	-4,9 ± 1,2	-5,0 ± 1,0		
	Md (Min; Max)	-4,9 (-7,6; -1,9)	-4,8 (-7,1; -3,0)		

Ergebnisse der Welch-Tests bzw. Exakten Fisher-Tests zum Vergleich jedes in die Modelle einfließenden klinischen Parameters zwischen der HFpEF- und DIAST-Kohorte. Es ergab sich für die Parameter Alter, BMI, KHK und *B9D1*-Promotormethylierung ein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten. Angabe des im jeweils genannten statistischen Test ermittelten p-Werts mit zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. n, Anzahl; lnM, natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung; a. H., absolute Häufigkeit; r. H., relative Häufigkeit; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.4 HFpEF-Subkohorte nach *Propensity Score Matching*

Im Verlauf der Berechnungen wurde zwischen den Patienten der HFpEF- und DIAST-Kohorte ein *Propensity Score Matching* durchgeführt. Ziel war es, die Vergleichbarkeit der zwei Kohorten zu erhöhen, um die Übertragbarkeit der Modelle zu optimieren. Die vier Modelle wurden auf die Subkohorte, bestehend aus 22 Patienten, übertragen.

Im Vergleich zu den in Kapitel 3.4.2.3 dargestellten Ergebnissen der Modellübertragung auf die vollständige HFpEF-Kohorte ergaben sich für die HFpEF-Subkohorte nach *Matching* abweichende Ergebnisse, die im Folgenden ausführlich präsentiert werden.

3.4.2.4.1 Risikowertvorhersagen der vier Modelle unter Betrachtung des Gesamtüberlebens

Die Möglichkeit zur prognostischen Vorhersage durch die Modellübertragung sollte an der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurden für alle vier Modelle die ermittelten Risikowerte der Patienten mit und ohne Event zum Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt verglichen. Das Event war hier definiert als Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens. Es lagen nicht für alle Patienten vollständige Daten zum Überleben vor. Aus der Subkohorte mussten daher für den Zeitpunkt ein Jahr zwei Patienten und für den Zeitpunkt vier Jahre elf Patienten zensiert werden. Deren Daten wurden von den folgenden Berechnungen ausgeschlossen.

Wie bei der Betrachtung der vollständigen HFpEF-Kohorte vor dem *Propensity Score Matching* in Kapitel 3.4.2.3.1, ergab sich hier nach dem *Propensity Score Matching* im Rahmen der Übertragung der vier Modelle für den Zeitpunkt ein Jahr (Abbildung 24) und vier Jahre (Abbildung 25) nach Studieneintritt kein signifikanter Unterschied der vom Modell zugeordneten Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Den Patienten mit Event wurde zu beiden Zeitpunkten kein signifikant höherer Risikowert zugeordnet als den Patienten ohne Event (Tabelle 61 und Tabelle 62).

Rein deskriptiv betrachtet und ohne statistische Signifikanz war für beide Zeitpunkte und alle vier Modelle der Median der Risikowerte einheitlich bei den Patienten mit Event höher als bei den Patienten ohne Event. Bei kleiner Gruppengröße nach dem *Matching* war die statistische Aussagefähigkeit entsprechend eingeschränkt.

Tabelle 61: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* ein Jahr nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 18)	1 (n = 2)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	5,3 ± 6,9	8,3 ± 11,4	0,90
		Md (Min; Max)	2,8 (0,42; 25)	8,3 (0,29; 16)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	5,8 ± 8,7	7,2 ± 9,6	1,00
		Md (Min; Max)	1,7 (0,26; 33)	7,2 (0,42; 14)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	6,8 ± 10,1	12 ± 16	0,95
		Md (Min; Max)	3,3 (0,27; 39)	12 (0,40; 23)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	6,1 ± 12,0	15 ± 21	1,00
		Md (Min; Max)	2,7 (0,14; 52)	15 (0,22; 30)	

Ergebnisse der studentisierten Permutationstests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Es gab zwei zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

Tabelle 62: Gegenüberstellung der Risikowertvorhersagen der vier Modelle für die Patienten mit und ohne Event unter Betrachtung des Gesamtüberlebens in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* vier Jahre nach Studieneintritt

Parameter	Modell (Gen)	Messwert	0 (n = 5)	1 (n = 6)	p-Wert
Risikowert	A (kein Gen)	M ± SD	2,8 ± 3,8	8,3 ± 10,2	0,51
		Md (Min; Max)	1,5 (0,42; 9,6)	3,7 (0,29; 25)	
Risikowert	B (*B9D1*)	M ± SD	1,9 ± 1,3	7,4 ± 7,5	0,75
		Md (Min; Max)	1,9 (0,30; 3,8)	6,7 (0,26; 16)	
Risikowert	C (*RASAL1*)	M ± SD	3,2 ± 2,7	13 ± 16	0,63
		Md (Min; Max)	2,8 (0,52; 6,8)	6,5 (0,27; 39)	
Risikowert	D (*ATP2A2*)	M ± SD	2,8 ± 2,2	16 ± 21	0,75
		Md (Min; Max)	3,1 (0,59; 5,9)	6,4 (0,14; 52)	

Ergebnisse der studentisierten Permutationstests zum Vergleich der von den vier Modellen vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event. Angabe des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts und zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Es gab elf zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. A, Modell ohne Promotormethylierung; B, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; C, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung, D, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum; n, Anzahl; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

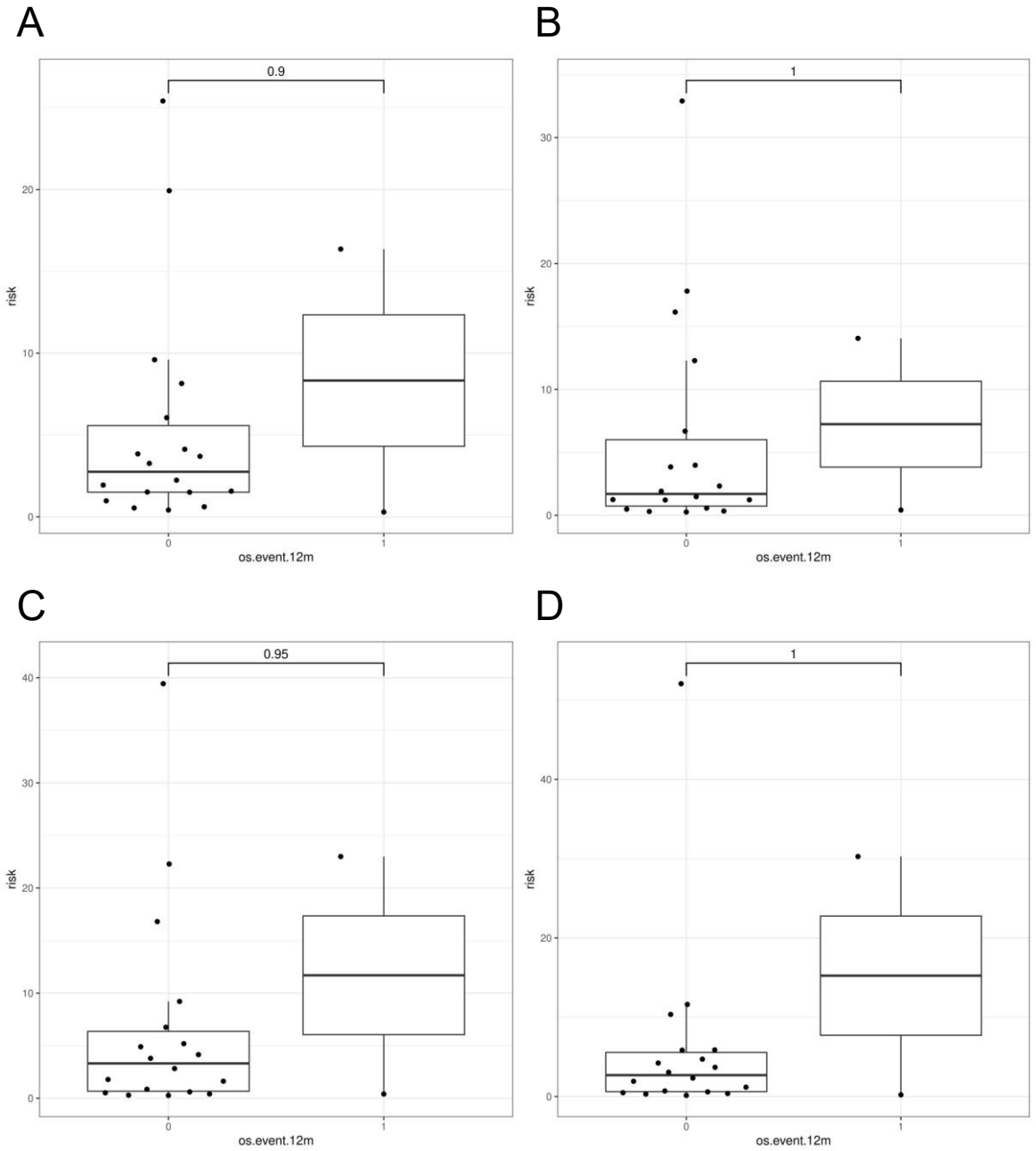

Abbildung 24: HFpEF-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event ein Jahr nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in studentisierten Permutationstests. Es gab zwei zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.12m*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt ein Jahr nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

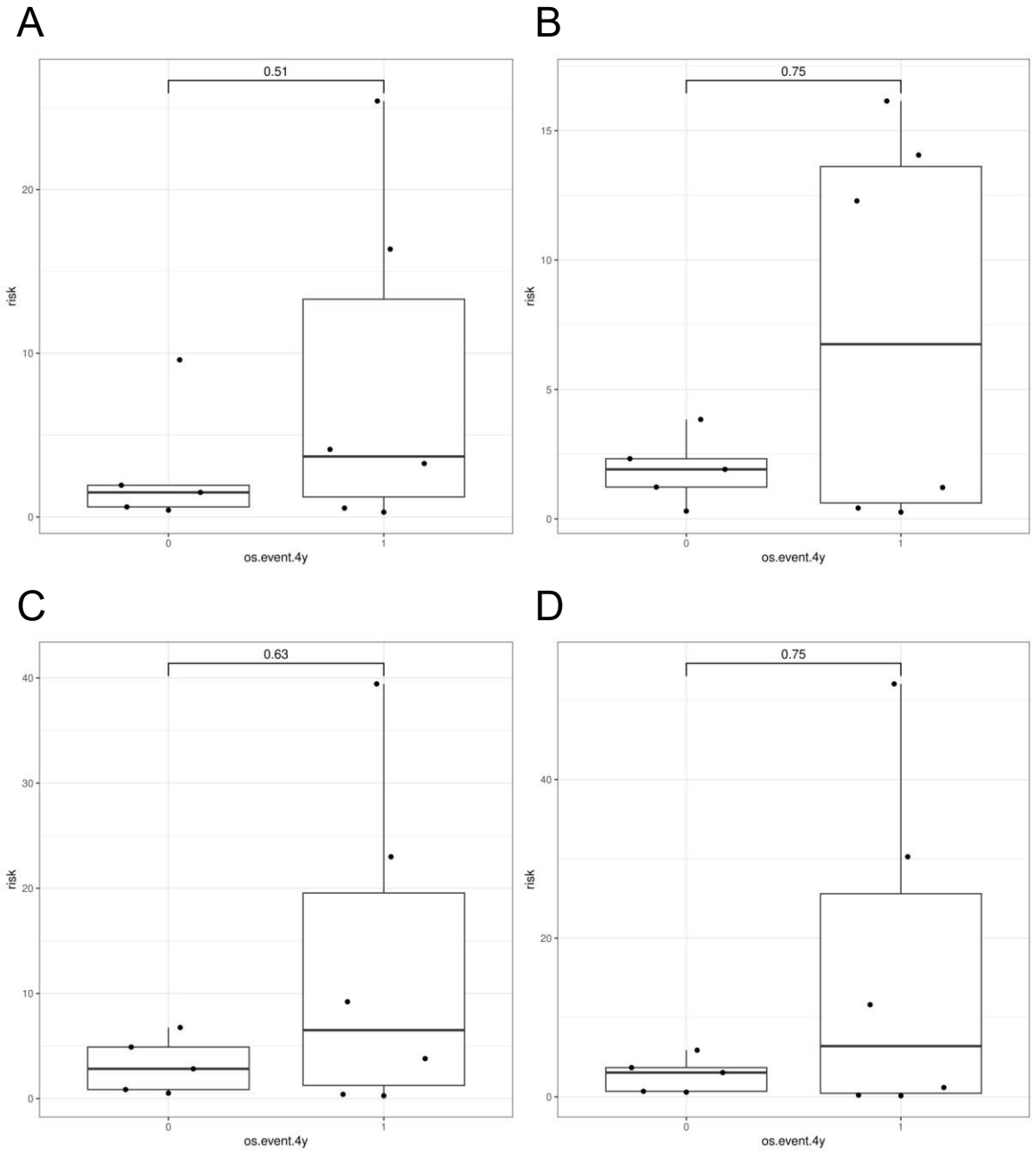

Abbildung 25: HFpEF-Subkohorte nach *Matching* – kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen Patienten mit und ohne Event bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt in den vier Modellen. Darstellung der durch die Modelle vorhergesagten Risikowerte für die Patienten der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* mit und ohne Event vier Jahre nach Studieneintritt für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Für die vier Modelle ergab sich kein signifikanter Unterschied der Risikowerte zwischen den Patienten mit und ohne Event in studentisierten Permutationstests. Es gab elf zensierten Patienten, deren Daten nicht dargestellt sind und von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Darstellung der Daten als Box-Plot. Für jeden Patienten ist auf der y-Achse der vorhergesagte Risikowert und auf der x-Achse der Eventstatus aufgetragen. Die Box umfasst Daten vom 25. bis zum 75. Perzentil. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, die Fühler der Box enden am 1,5fachen des Interquartilsabstands oder am Ende der Abbildung. Darstellung des im studentisierten Permutationstest ermittelten p-Werts oberhalb der Klammer. *risk*, der im Modell ermittelte Risikowert; *os.event.4y*, Eventstatus bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt vier Jahre nach Studieneintritt; 0, kein Event im Betrachtungszeitraum; 1, Event im Betrachtungszeitraum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.4.2 Betrachtung der Risikozuteilung durch die Modelle anhand von Überlebenskurven

Um die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht nur zu einzelnen Zeitpunkten zu evaluieren, wurden auch für die HFpEF-Subkohorte nach dem *Propensity Score Matching* Überlebenskurven in Zusammenschau mit der Risikozuteilung durch die vier Modelle untersucht. Betrachtet wurde der Zeitraum bis ca. fünf Jahre nach Studieneintritt, für den Daten zum Gesamtüberleben der Patienten vorlagen.

Für das Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung zeigte sich eine signifikant ($p = 0{,}023$) niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten. Das Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung ergab einen statistischen Trend ($p = 0{,}074$) zur niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten. Die Modelle mit *ATP2A2*-Promotormethylierung und ohne Promotormethylierung zeigten, rein deskriptiv und ohne statistische Signifikanz, eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten (Abbildung 26).

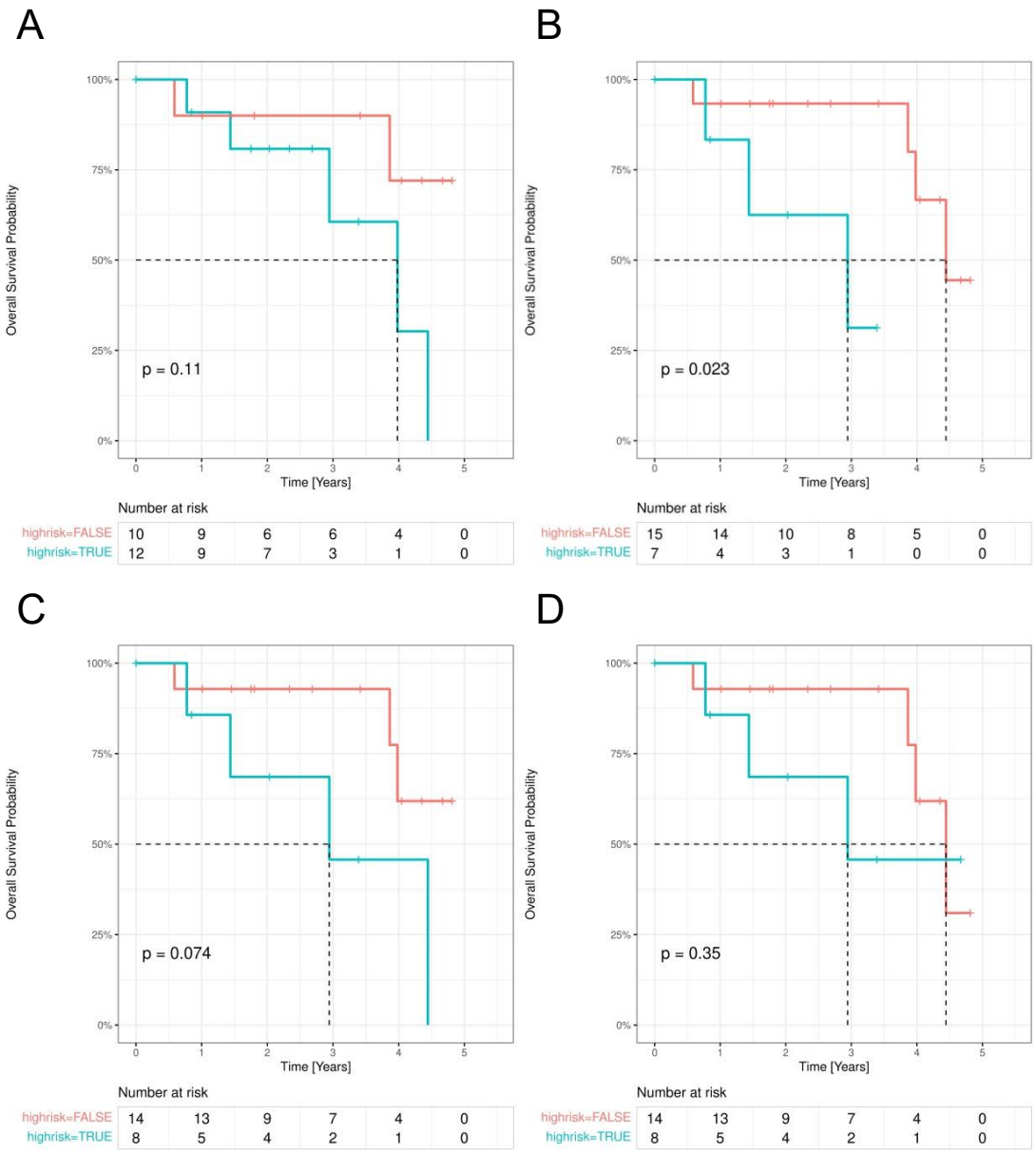

Abbildung 26: HFpEF-Subkohorte nach *Matching* – Risikozuteilung des Modells mit *B9D1*-Promotormethylierung mit signifikant kürzerem Überleben der Hochrisikopatienten, Risikozuteilung des Modells mit *RASAL1*-Promotormethylierung mit statistischem Trend für kürzeres Überleben der Hochrisikopatienten und ausbleibendes signifikantes Ergebnis im Modell mit *ATP2A2*- und ohne Promotormethylierung bei Betrachtung des Gesamtüberlebens mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven. Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven für Hochrisikopatienten (blaue Kurve) und für Nicht-Hochrisikopatienten (rote Kurve) der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* für (**A**) das Modell ohne Promotormethylierung, (**B**) das Modell mit *B9D1*-, (**C**) das Modell mit *RASAL1*- und (**D**) das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung. Im Log-Rank-Test der Überlebenskurven ergab sich für das Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung eine signifikanter niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten. Für das Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung ergab sich ein statistischer Trend zur niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten. Für die übrigen Modelle ergab sich kein signifikantes Ergebnis. Auf der y-Achse ist die im Kaplan-Meier-Verfahren berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent (*overall survival probability* [%]) aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren (*time* [*years*]) aufgetragen. Darstellung von Events als Sprung in der Kurve, Zensierungen als senkrechter Strich in der Kurve, mediane Überlebenszeit als gestrichelte Linie. Als Event war hier das Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens definiert. Der angegebene p-Wert wurde im Log-Rank-Test der zwei Überlebenskurven ermittelt. Angabe der Patienten unter Risiko (*number at risk*) für die Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikogruppe zu den Zeitpunkten 0 – 5 Jahre nach Studieneintritt. *highrisk = FALSE*, Nicht-Hochrisikopatienten; *highrisk = TRUE*, Hochrisikopatienten (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.4.3 Vergleich klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*

Die in die vier Modelle einfließenden klinischen Parameter der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* wurden mit der DIAST-Kohorte verglichen. Ziel der Betrachtung war es die Vergleichbarkeit und damit die Übertragbarkeit der an der DIAST-Kohorte berechneten Modelle auf die neue Subkohorte zu untersuchen. Entgegen dem Vergleich der vollständigen HFpEF-Kohorte mit der DIAST-Kohorte (Tabelle 60) zeigte sich hier nur für die *B9D1*-Promotormethylierung ein signifikanter Unterschied zur DIAST-Kohorte (Tabelle 63). Die *B9D1*-Promotormethylierung war in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* signifikant niedriger, die Werte lagen für beide Kohorten aber insgesamt im gleichen Wertebereich. Für alle anderen Parameter ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Kohorten.

Tabelle 63: Ergebnisse des Vergleichs klinischer Parameter der DIAST-Kohorte und der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*

Parameter	Messwert	DIAST-Kohorte	HFpEF-Subkohorte nach *Matching*	p-Wert	statistischer Test
	n	46	22		
Alter [Jahre]				0,37	Welch-Test
	M ± SD	73 ± 9	75 ± 9		
	Md (Min; Max)	72 (53; 87)	76 (55; 89)		
BMI [kg/m²]				0,06	Welch-Test
	M ± SD	32 ± 7	29 ± 5		
	Md (Min; Max)	31 (22; 51)	29 (21; 40)		
Geschlecht				0,57	Exakter Fisher-Test
männlich	a. H. (r. H.)	15 (32,6%)	5 (22,7%)		
weiblich	a. H. (r. H.)	31 (67,4%)	17 (77,3%)		
KHK				0,42	Exakter Fisher-Test
nein	a. H. (r. H.)	32 (69,6%)	13 (59,1%)		
ja	a. H. (r. H.)	14 (30,4%)	9 (40,9%)		
lnM *ATP2A2*				0,48	Welch-Test
	M ± SD	-5,5 ± 1,4	-5,7 ± 1,3		
	Md (Min; Max)	-5,4 (-9,5; -2,5)	-5,9 (-7,6; -2,9)		
lnM *B9D1*				0,05*	Welch-Test
	M ± SD	-3,7 ± 1,2	-4,2 ± 1,0		
	Md (Min; Max)	-3,7 (-6,4; -1,0)	-4,4 (-5,7; -2,5)		
lnM *RASAL1*				0,59	Welch-Test
	M ± SD	-4,9 ± 1,2	-5,0 ± 1,1		
	Md (Min; Max)	-4,9 (-7,6; -1,9)	-4,9 (-7,1; -3,3)		

Ergebnisse der Welch-Tests bzw. Exakten Fisher-Tests zum Vergleich jedes in die Modelle einfließenden klinischen Parameters zwischen der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* und der DIAST-Kohorte. Es ergab sich nur für den Parameter *B9D1*-Promotormethylierung ein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten. Angabe des im jeweils genannten statistischen Test ermittelten p-Werts mit zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. n, Anzahl; lnM, natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung; a. H., absolute Häufigkeit; r. H., relative Häufigkeit; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.4.4 Vergleich klinischer Parameter der Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten

In Kapitel 3.4.2.4.2 zeigte sich, im Vergleich zu den Nicht-Hochrisikopatienten, eine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten bei der Modellübertragung mit *B9D1*-Promotormethylierung und ein statistischer Trend zur niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten bei der Modellübertragung mit *RASAL1*-Promotormethylierung.

Dies gab Hinweise auf eine funktionierende Modellübertragung mit prognostischer Vorhersage für diese beiden Gene. Um Hinweise auf von der Risikozuteilung abhängige Gruppenunterschiede zu finden, die nützlich für die Identifikation von Hochrisikopatienten sein könnten, wurden die in die Modelle einfließenden klinischen Parameter zwischen den Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten für die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung verglichen.

Nach Anwendung des Modells mit der *B9D1*-Promotormethylierung ergab sich eine Aufteilung in 7 Hochrisiko- und 15 Nicht-Hochrisikopatienten (Tabelle 64). Bei Betrachtung der Parameter im direkten Vergleich der zwei Risikogruppen ergab sich nach Adjustierung des p-Werts für die Parameter BMI und KHK ein signifikanter Unterschied zwischen den Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten. Bei den Hochrisikopatienten war der BMI niedriger und mehr Patienten hatten eine KHK. Für alle anderen Parameter ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Nach Anwendung des Modells mit der *RASAL1*-Promotormethylierung ergab sich eine Aufteilung in 8 Hochrisiko- und 14 Nicht-Hochrisikopatienten (Tabelle 65). Auch für das Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung ergab sich bei Betrachtung der Parameter im direkten Vergleich der zwei Risikogruppen nach Adjustierung des p-Werts für die Parameter BMI und KHK ein signifikanter Unterschied. Die Hochrisikopatienten hatten einen niedrigeren BMI und es gab mehr Patienten mit einer KHK. Für alle anderen Parameter ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen.

Tabelle 64: Vergleich klinischer Parameter der zwei Risikogruppen für die Modellübertragung mit *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*

Parameter	Messwert	Hochrisiko	Nicht-Hochrisiko	p-Wert	adjust. p-Wert	statistischer Test
	n	7	15			
Alter [Jahre]				0,15	0,30	Welch-Test
	M ± SD	79 ± 10	73 ± 8			
	Md (Min; Max)	82 (58; 89)	72 (55; 86)			
BMI [kg/m²]				< 0,01**	0,02*	Welch-Test
	M ± SD	25 ± 3	31 ± 5			
	Md (Min; Max)	24 (21; 30)	31 (24; 40)			
Geschlecht				0,27	0,30	Exakter Fisher-Test
männlich	a. H. (r. H.)	3 (42,9%)	2 (13,3%)			
weiblich	a. H. (r. H.)	4 (57,1%)	13 (86,7%)			
KHK				0,01*	0,04*	Exakter Fisher-Test
nein	a. H. (r. H.)	1 (14,3%)	12 (80,0%)			
ja	a. H. (r. H.)	6 (85,7%)	3 (20,0%)			
lnM *ATP2A2*				0,09	0,27	Welch-Test
	M ± SD	-5,0 ± 1,3	-6,1 ± 1,2			
	Md (Min; Max)	-5,4 (-6,3; -2,9)	-6,5 (-7,6; -3,7)			

Parameter	Messwert	Hochrisiko	Nicht-Hochrisiko	p-Wert	adjust. p-Wert	statistischer Test
lnM *B9D1*				0,02*	0,10	Welch-Test
	M ± SD	-3,5 ± 0,8	-4,5 ± 0,9			
	Md (Min; Max)	-3,5 (-4,8; -2,5)	-4,7 (-5,7; -2,5)			
lnM *RASAL1*				0,05	0,20	Welch-Test
	M ± SD	-4,4 ± 1,0	-5,4 ± 1,0			
	Md (Min; Max)	-4,3 (-6,1; -3,4)	-5,2 (-7,1; -3,3)			

Ergebnisse der Welch-Tests bzw. Exakten Fisher-Tests zum Vergleich der in die Modelle einfließenden klinischen Parameter zwischen den Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* für das Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung. Es ergab sich für die Parameter BMI und KHK ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Hochrisikopatienten hatten einen niedrigeren BMI und es gab mehr Patienten mit einer KHK. Angabe des im jeweils genannten statistischen Test ermittelten p-Werts und des adjustierten p-Werts mit zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Die Adjustierung des p-Werts für multiples Testen erfolgte mit der Bonferroni-Holm Methode. n, Anzahl; lnM, natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung; adjust., adjustierter; a. H., absolute Häufigkeit; r. H., relative Häufigkeit; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

Tabelle 65: Vergleich klinischer Parameter der zwei Risikogruppen für die Modellübertragung mit *RASAL1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*

Parameter	Messwert	Hochrisiko	Nicht-Hochrisiko	p-Wert	adjust. p-Wert	statistischer Test
	n	8	14			
Alter [Jahre]				0,05	0,23	Welch-Test
	M ± SD	80 ± 9	72 ± 7			
	Md (Min; Max)	82 (58; 89)	72 (55; 82)			
BMI [kg/m²]				< 0,01**	0,01*	Welch-Test
	M ± SD	26 ± 3	32 ± 5			
	Md (Min; Max)	25 (21; 30)	31 (24; 40)			
Geschlecht				0,31	0,31	Exakter Fisher-Test
männlich	a. H. (r. H.)	3 (37,5%)	2 (14,3%)			
weiblich	a. H. (r. H.)	5 (62,5%)	12 (85,7%)			
KHK				< 0,01**	0,01*	Exakter Fisher-Test
nein	a. H. (r. H.)	1 (12,5%)	12 (85,7%)			
ja	a. H. (r. H.)	7 (87,5%)	2 (14,3%)			
lnM *ATP2A2*				0,15	0,30	Welch-Test
	M ± SD	-5,2 ± 1,3	-6,0 ± 1,3			
	Md (Min; Max)	-5,7 (-6,5; -2,9)	-6,2 (-7,6; -3,7)			
lnM *B9D1*				0,05*	0,23	Welch-Test
	M ± SD	-3,7 ± 0,9	-4,5 ± 0,9			
	Md (Min; Max)	-3,5 (-4,8; -2,5)	-4,7 (-5,7; -2,5)			
lnM *RASAL1*				0,05*	0,23	Welch-Test
	M ± SD	-4,5 ± 0,9	-5,4 ± 1,1			
	Md (Min; Max)	-4,5 (-6,1; -3,4)	-5,4 (-7,1; -3,3)			

Ergebnisse der Welch-Tests bzw. Exakten Fisher-Tests zum Vergleich der in die Modelle einfließenden klinischen Parameter zwischen den Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* für das Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung. Es ergab sich für die Parameter BMI und KHK ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Hochrisikopatienten hatten einen niedrigeren BMI und es gab mehr Patienten mit einer KHK. Angabe des im jeweils genannten statistischen Test ermittelten p-Werts und des adjustierten p-Werts mit zugehöriger deskriptiver Statistik der betrachteten Gruppen. Die Adjustierung des p-Werts für multiples Testen erfolgte mit der Bonferroni-Holm Methode. n, Anzahl; lnM, natürlicher Logarithmus der Promotormethylierung; adjust., adjustierter; a. H., absolute Häufigkeit; r. H., relative Häufigkeit; M, Mittelwert; SD, Standardabweichung; Md, Median; Min, Minimum; Max, Maximum (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

3.4.2.4.5 Hochrisikopatientenvorhersage

Für alle vier Modelle wurden die vorhergesagten Hochrisikopatienten in der Zusammenschau betrachtet. Ziel war es herauszufinden, ob die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung, die in Kapitel 3.4.2.4.2 sinnvolle prognostische Vorhersagen bei der Übertragung auf die HFpEF-Subkohorte nach *Matching* erbracht hatten, einen Zusatznutzen bei der Identifikation von Hochrisikopatienten bringen können.

Die Identifikation von Hochrisikopatienten in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* mit insgesamt 22 Patienten überlappte sich für die vier Modelle stark (Abbildung 27). Von allen vier Modellen gleichermaßen wurden sieben Hochrisikopatienten (31,8% der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*) identifiziert. Das Modell ohne Promotormethylierung konnte vier zusätzliche Hochrisikopatienten identifizieren (18,2% der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*). Das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung führte zur Identifikation von einem zusätzlichen Hochrisikopatienten (4,5% der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*). Die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung konnten keine zusätzlichen Hochrisikopatienten identifizieren. Insgesamt wurden durch alle vier Modelle gemeinsam 13 verschiedene Hochrisikopatienten identifiziert.

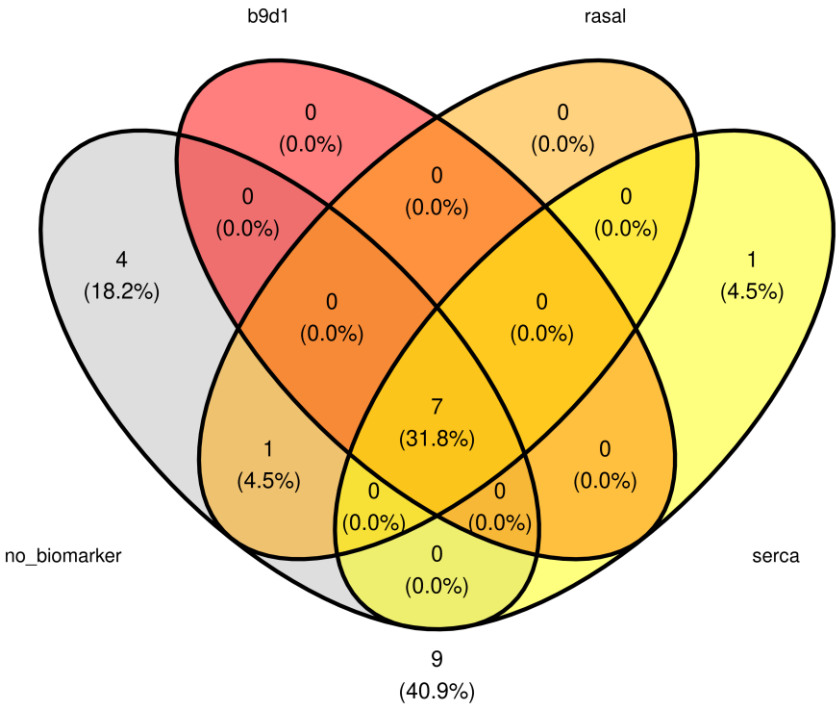

Abbildung 27: Unterschiede der Hochrisikopatientenvorhersage durch die vier Modelle in der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*. Darstellung der durch die vier Modelle vorhergesagten Hochrisikopatienten für jedes Modell innerhalb einer Ellipse. Darstellung der Überlappungen der Vorhersagen zwischen den einzelnen Modellen in Form von Überlappungen der Ellipsen. Angabe von absoluter Häufigkeit und prozentualem Anteil an der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* mit insgesamt 22 Patienten. Unten in der Abbildung außerhalb der Ellipsen Angabe zur absoluten Häufigkeit und zum prozentualen Anteil der Differenz zwischen Gesamtanzahl der vorhergesagten Hochrisikopatienten in den vier Modellen (n = 13) und der Gesamtanzahl der Patienten in der Kohorte (n = 22). no_biomarker, Modell ohne Promotormethylierung; b9d1, Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung; rasal, Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung; serca, Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2024).

4 Diskussion

Patienten der beiden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Erkrankungen HFpEF (Lee et al. 2009; Tribouilloy et al. 2008) und Aortenklappenstenose (Frank et al. 1973; Leon et al. 2010) weisen im Allgemeinen eine hohe Mortalität und schlechte Prognose auf. Für einige bereits klinisch etablierte im Blut messbare Biomarker, wie die natriuretischen Peptide, wird die Eignung als prognostischer Biomarker für HFpEF (Anjan et al. 2012; Myhre et al. 2018) und die Aortenklappenstenose (Clavel et al. 2014; Hadziselimovic et al. 2022) diskutiert. Die bereits klinisch etablierten Biomarker ermöglichen allerdings bisher keine ausreichende Identifikation von Hochrisikopatienten und keine ausreichende individuelle prognostische Vorhersage, sodass für beide Erkrankungen weiterhin die beschriebene allgemein schlechte Prognose besteht. Die Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose teilen sich die in Kapitel 1.2 ausführlich erläuterte pathomechanistische Bedeutung der Herzfibrose, die eng mit der Mortalität und dem Progress der beiden Erkrankungen assoziiert ist. Wie in Kapitel 1.5 dargestellt, kann anhand von Vorarbeiten ein Zusammenhang zwischen der im Blut messbaren Promotormethylierung spezifischer Gene und der im Herzgewebe messbaren Promotormethylierung dieser Gene sowie mit dem Ausmaß der pathologischen Fibrogenese am Herzen hergestellt werden. In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg ergab sich eine signifikante Korrelation der aberranten DNA-Methylierung der Gene *ATP2A2* und *RASAL1* im Blut mit dem Grad der Herzfibrose (Gosch 2020). Meder et al. (2017) fanden Hinweise darauf, dass die Messung der DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut die DNA-Methylierung dieser Gene im Herzgewebe widerspiegelt. Entsprechend dem Prinzip der *Liquid Biopsy* (Schwarzenbach et al. 2011) ergibt sich anhand der dargestellten Zusammenhänge eine potentielle Eignung der DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut als Biomarker, um Rückschlüsse auf entsprechende DNA-Veränderungen im Ursprungsorgan Herz ziehen zu können (Meder et al. 2017). Eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg ergab Hinweise darauf, dass sich die im peripheren Blut messbare Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als prognostischer Biomarker für Patienten mit HFpEF eignet (Awe 2020). Eine weitere Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg an einer Kohorte aus Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose, die eine TAVI erhielten, ergab Hinweise darauf, dass sich die im peripheren Blut gemessene Promotormethylierung des Gens *IRX3* als potentieller prognostischer Biomarker für das Krankheitsbild Aortenklappenstenose eignet (Kanwischer et al. 2023). Resümierend verdichten sich anhand dieser beschriebenen Zusammenhänge die Hinweise darauf, dass sich die im Blut messbare Promotormethylierung spezifischer Gene als prognostischer Biomarker für kardiale Erkrankungen eignen könnte, die sich die pathomechanistische Gemeinsamkeit der Herzfibrose teilen. Bisher gelang keine klinische Etablierung solcher Biomarker. Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Hauptziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob sich die im Blut messbare Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als prognostischer Biomarker für die Erkrankungen HFpEF bzw. Aortenklappenstenose eignet. Zudem sollte geprüft werden, ob sich Vorteile bei der Erhebung der Promotormethylierung im Blut gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter ergeben.

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, wurde zur Messung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut zunächst die DNA aus Blutproben isoliert und aufgereinigt. Im Anschluss wurde die methylierte DNA antikörpervermittelt per MeDIP separiert. Der Anteil der Promotormethylierung der drei Gene konnte daraufhin per qRT-PCR ermittelt werden.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit lagen Daten zu drei Patientenkohorten vor. Die DIAST-Kohorte setzte sich aus Patienten mit dem Krankheitsbild HFpEF zusammen. Alle Patienten erfüllten die Einschlusskriterien LVEF ≥ 45% und E/e' mittel ≥ 12. Darüber hinaus hatten diese Patienten entweder eine Belastungsdyspnoe und Ödeme oder die Diagnose einer Herzinsuffizienz war bereits ärztlich gestellt. Die DIAST-Kohorte wurde initial im Rahmen einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) zur Untersuchung des Krankheitsbildes HFpEF zusammengestellt und zugehörige Daten wurden bereits teilweise analysiert (siehe auch Kapitel 2.2.3). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere Kohorten untersucht. In der HFpEF-Kohorte wurden Patienten mit dem Krankheitsbild HFpEF betrachtet. Alle Patienten erfüllten die echokardiographischen Kriterien LVEF ≥ 45% und E/e' mittel ≥ 12 (aufgerundet ab E/e' mittel ≥ 11,5). Diese Kriterien wurden in Anlehnung an die Einschlusskriterien der DIAST-Kohorte der Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) festgelegt (siehe auch Kapitel 2.2.1). Die TAVI-Kohorte galt der Untersuchung von Patienten mit dem Krankheitsbild Aortenklappenstenose. Alle Patienten dieser Kohorte erhielten aufgrund einer schweren oder in Einzelfällen moderaten bis schweren Aortenklappenstenose eine TAVI (siehe auch Kapitel 2.2.2).

Die Promotormethylierung der drei Gene wurde in den drei Kohorten zunächst deskriptiv betrachtet und die Kohorten wurden anhand verschiedener klinischer Parameter charakterisiert (siehe auch Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2). Ziel war es, zunächst einen allgemeinen Überblick über die untersuchten Kohorten mit ihren Charakteristika zu gewinnen. Anschließend wurden in der HFpEF- und TAVI-Kohorte Zusammenhänge der Promotormethylierung der drei Gene mit verschiedenen klinischen Parametern untersucht (siehe auch Kapitel 3.3). Es sollte hierdurch die Überlegenheit der Messung der potentiellen neuen Biomarker gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter geprüft werden. Das Hauptziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob sich die im Blut detektierbare Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als prognostischer Biomarker für Patienten mit HFpEF bzw. Aortenklappenstenose eignet. Für die DIAST-Kohorte ergab sich in Überlebensmodellen ein signifikanter Einfluss der aberranten Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* auf das Gesamtüberleben dieser Patienten mit HFpEF. Diese an der DIAST-Kohorte modellierten Cox-Regressionen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Form von vier Modellen auf die HFpEF- und TAVI-Kohorte übertragen, um die Möglichkeit einer prognostischen Vorhersage durch die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* zu analysieren (siehe auch Kapitel 3.4).

4.1 Charakterisierung der untersuchten Kohorten

Die drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kohorten wurden zunächst anhand der vorliegenden klinischen Parameter und der im Blut gemessenen Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* rein deskriptiv charakterisiert, um einen allgemeinen Überblick über die Kohorten mit ihren individuellen Charakteristika zu gewinnen. Die Promotormethylierung der drei Gene im Blut zeigte sich in den drei Kohorten lognormal verteilt (Abbildung 1 bis Abbildung 5). Eine derartige Werteverteilung zeigte sich auch schon in einer Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020). In der vorliegenden Arbeit lag der Median der *RASAL1*-Promotormethylierung in den drei Kohorten in einem ähnlichen Wertebereich (Tabelle 19 bis Tabelle 21). Der Median der *ATP2A2*- und *B9D1*-Promotormethylierung lag für die HFpEF- und TAVI-Kohorte in einem ähnlichen Wertebereich, in der DIAST-Kohorte lag der Median der Promotormethylierung für beide Gene höher. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht die Aussagekraft der einzelnen absoluten Werte der Promotormethylierung der drei Gene untersucht. Diese Arbeit beschäftigte sich vielmehr mit der Untersuchung von Zusammenhängen der Promotormethylierung mit klinischen Parametern. Bei der näheren Betrachtung der klinischen Parameter in den drei Kohorten mit ähnlicher Gruppengröße (HFpEF-Kohorte: 48 Patienten, TAVI-Kohorte: 57 Patienten, DIAST-Kohorte: 46 Patienten), fiel als Gemeinsamkeit der Kohorten ein mittleres Alter der Patienten über 70 Jahre und ein erhöhter BMI der Patienten auf (Tabelle 22 bis Tabelle 27). In der HFpEF- und TAVI-Kohorte lag im Mittel eine Präadipositas vor, in der DIAST-Kohorte lag im Mittel eine Adipositas vor. Als weitere Gemeinsamkeit hatten alle Patienten der DIAST- und HFpEF-Kohorte eine LVEF ≥ 45%. Die mittlere LVEF lag in der TAVI-Kohorte bei 52,8%. Zudem gab es in allen drei Kohorten einen hohen Anteil an Komorbiditäten, darunter u. a. ein Diabetes mellitus mit einem Anteil von 43,8% in der HFpEF-Kohorte und 38,6% in der TAVI-Kohorte und eine arterielle Hypertonie mit einem Anteil von 95,8% in der HFpEF-Kohorte und 93% in der TAVI-Kohorte. Darüber hinaus gab es in den drei Kohorten einen hohen Anteil an Patienten mit KHK. In der HFpEF-Kohorte lag der Anteil bei 56,3%, in der TAVI-Kohorte bei 73,7% und in der DIAST-Kohorte bei 30,4%.

4.2 Bedeutung des Gens *B9D1* am Herzen

Die im Blut gemessene Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* wurde auf Korrelationen mit verschiedenen klinischen Parametern der HFpEF- und TAVI-Kohorte untersucht. Ziel war es zunächst Zusammenhänge der potentiellen Biomarker mit klinischen Parametern zu finden. Im Rahmen dieser Analysen erfolgte bei multiplem Testen eine Adjustierung des p-Werts, sodass hier nur Zusammenhänge näher betrachtet werden, die nach Adjustierung weiterhin Signifikanz zeigten. Für die TAVI-Kohorte ergab sich nach Adjustierung des p-Werts für keines der drei Gene ein signifikanter Zusammenhang der klinischen Parameter mit der Promotormethylierung (siehe auch Kapitel 3.3.2). Für die HFpEF-Kohorte ergab sich nach Adjustierung des p-Werts für die drei Gene ebenfalls für fast alle klinischen Parameter kein signifikanter Zusammenhang mit der Promotormethylierung (siehe auch

Kapitel 3.3.1). Einzig der Parameter BNP zeigte nach Adjustierung des p-Werts einen signifikanten positiven linearen Zusammenhang mit der *B9D1*-Promotormethylierung (Tabelle 29). Eine höhere Promotormethylierung von *B9D1* im Blut ging mit höheren Werten von BNP im Blut einher (Abbildung 6). BNP gehört zur Familie der natriuretischen Peptide (McDonagh et al. 2021; Vanderheyden et al. 2004). Als kardiales Hormon stammt es vorwiegend aus den Ventrikeln und das Herz stellt beim Menschen insgesamt die Hauptquelle des im Blut zirkulierenden BNPs dar (Mukoyama et al. 1991; Vanderheyden et al. 2004). Als wichtigster Stimulus für die Sekretion von BNP gilt eine myokardiale Wanddehnung, wie sie im Rahmen einer Volumenüberladung oder Drucküberlastung am Herzen auftritt (Mueller et al. 2019; Vanderheyden et al. 2004). Es wird im Allgemeinen angenommen, dass die Höhe von BNP im Blut mit dem Ausmaß der hämodynamischen Dysfunktion einer kardialen Pathologie korreliert, sodass ein höherer Schweregrad einer Herzinsuffizienz mit höheren Werten von BNP im Blut einhergeht (Bettencourt 2004; Mukoyama et al. 1991; Richards et al. 1993). Es wird angenommen, dass auch die Schwere einer Aortenklappenstenose mit der Höhe von BNP im Blut korreliert und bei zunehmendem Grad der Stenose höhere Werte von BNP im Blut vorliegen (Bergler-Klein et al. 2004). BNP ist ein bereits etablierter im Blut messbarer Biomarker für Herzerkrankungen, der beispielsweise für das Krankheitsbild Herzinsuffizienz zur Diagnosestellung der Erkrankung herangezogen werden kann (McDonagh et al. 2021). Beim Krankheitsbild Aortenklappenstenose kann BNP u. a. bei der Therapieentscheidung genutzt werden (Vahanian et al. 2022).

In der vorliegenden Arbeit ergab sich eine positive lineare Korrelation der Promotormethylierung des Gens *B9D1* mit BNP im Blut, in Form einer höheren Promotormethylierung von *B9D1* bei höheren Werten von BNP (Abbildung 6). Dies kann als ein Hinweis darauf verstanden werden, dass das Gen *B9D1* eine Rolle am Herzen spielt und die aberrante Promotormethylierung von *B9D1* wie BNP eine kardiale Pathologie widerspiegelt. Die Arbeit von Meder et al. (2017) untermauert die Hypothese, dass das Gen *B9D1* eine Rolle am Herzen spielt. Die Autoren fanden Hinweise auf die Eignung des Methylierungsstatus des Gens *B9D1* im peripheren Blut als diagnostischen Biomarker für die Herzerkrankung DCM (Meder et al. 2017). Eine Funktion des Gens *B9D1* am Herzen vermutete auch Awe (2020) anhand der Ergebnisse ihrer Arbeit, da dort eine Assoziation der im Blut gemessenen *B9D1*-Promotormethylierung zum Progress von Patienten mit der kardialen Erkrankung HFpEF, im Sinne eines kürzeren Überlebens, gefunden wurde. Zudem ergab sich in der Korrelationsanalyse zwischen der *B9D1*-Promotormethylierung im Blut und BNP im Blut ein positiver Pearson-Korrelationskoeffizient als Hinweis auf einen gleichgerichteten Zusammenhang der zwei Variablen, was aber ohne statistische Signifikanz blieb und in der genannten Arbeit nicht näher analysiert wurde (Awe 2020). Dieser Unterschied hinsichtlich des Signifikanzniveaus der Korrelation der *B9D1*-Promotormethylierung und BNP im Blut lässt sich mit dem derzeitigen Wissen zum Gen *B9D1* nicht erklären.

Anhand der gefundenen positiven linearen Korrelation der Promotormethylierung von *B9D1* und BNP lässt sich wie dargestellt eine Funktion des Gens *B9D1* am Herzen und eine Rolle des Gens bei kardialen

Pathologien vermuten. Es wird allgemein angenommen, dass eine Methylierung der CpG-Inseln in der Promotorregion eines Gens in der Regel zu einer Unterdrückung der transkriptionellen Genaktivität führt (Bird und Wolffe 1999; Herman und Baylin 2003; Neary et al. 2015; Tampe et al. 2015). So konnte auch spezifisch für die in dieser Arbeit untersuchten Gene *ATP2A2* (Kao et al. 2010; Kao et al. 2011) und *RASAL1* (Bechtel et al. 2010; Gosch 2020; Xu et al. 2015; Xu et al. 2016) gezeigt werden, dass eine verstärkte Promotormethylierung mit einer verminderten Genexpression einhergeht. Übertragt man diese Überlegungen auf das Gen *B9D1* und geht nun bei einer höheren Promotormethylierung des Gens von einer verminderten Genexpression aus und vergegenwärtigt sich zugleich, dass höhere Werte von BNP wie beschrieben im Allgemeinen mit einer verstärkten kardialen Pathologie einhergehen, kann anhand der gefundenen positiven Korrelation zwischen der Promotormethylierung von *B9D1* und BNP eine protektive Funktion des Gens *B9D1* am Herzen vermutet werden. Im Rahmen einer kardialen Pathologie könnte dabei die aberrante Promotormethylierung des Gens *B9D1* zum Verlust der protektiven Genfunktion führen. Eine protektive Funktion des Gens *B9D1* am Herzen vermutete auch bereits Awe (2020) in ihrer Arbeit, da dort eine höhere *B9D1*-Promotormethylierung im Blut univariant signifikant mit einem kürzeren Überleben von Patienten mit HFpEF assoziiert war. Für eine protektive Funktion des Gens *B9D1* am Herzen sprechen auch die Ergebnisse von Dowdle et al. (2011), die im Mausmodell bei einer Mutation des Gens *B9D1* gehäuft eine gestörte Herzentwicklung und das vermehrte Auftreten von Herzfehlern beobachten konnten. Hierfür machen die Autoren die durch die Fehlfunktion des Gens *B9D1* gestörte Ziliogenese und gestörte Lokalisierung von Zilienproteinen verantwortlich (Dowdle et al. 2011). Die Mutation von *B9D1* kann mit der Entwicklung von Ziliopathien assoziiert werden (Garcia-Gonzalo et al. 2011; Hopp et al. 2011; Romani et al. 2014). Ziliopathien können im Allgemeinen mit der Entstehung kongenitaler Herzerkrankungen und kardiovaskulärer Anomalien in einen Zusammenhang gebracht werden (Kennedy et al. 2007; Klena et al. 2017; Li et al. 2015). Zusammenfassend stützen die zuvor genannten Arbeiten die Hypothese einer protektiven Funktion des Gens *B9D1* am Herzen. In der Arbeit von Meder et al. (2017) zeigte sich das Gen *B9D1* bei Patienten mit DCM im Blut und Herzgewebe insgesamt hypomethyliert. Hierbei wurde der absolute Methylierungsstatus des Gens von Patienten mit einer durch eine DCM ausgelösten Herzinsuffizienz mit einer herzgesunden Kontrollkohorte verglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen nicht der absolute Wert der Promotormethylierung betrachtet oder mit gesunden Kontrollen verglichen, sondern es wurde die Korrelation der Promotormethylierung mit unterschiedlichen klinischen Parametern untersucht. Bei der detaillierten Betrachtung der Werteverteilung der im Blut und Gewebe gemessenen Promotormethylierung des Gens *B9D1* bei den von Meder et al. (2017) untersuchten Patienten mit DCM zeigen sich vereinzelt hypermethylierte Werte. Dies gleicht damit insgesamt der Werteverteilung der *B9D1*-Promotormethylierung im Blut in der vorliegenden Arbeit (Abbildung 1 bis Abbildung 5). Meder et al. (2017) beschreiben, dass es im Rahmen der Entwicklung einer Herzinsuffizienz als Antwort auf Stressoren zur Reaktivierung eines fetalen Genprogramms und einer Reihe dynamischer Veränderung der Methylierung verschiedener Gene kommt. So lässt sich hier die Hypothese aufstellen, dass das Gen *B9D1* im Rahmen der gefundenen Hypomethylierung mit konsekutiver Expression des Gens bei den

Patienten mit DCM im Verlauf der Erkrankung initial eine protektive Funktion übernimmt. Möglicherweise kommt es dann im Rahmen der beschrieben dynamischen Veränderungen der Methylierung verschiedener Gene im Verlauf der kardialen Erkrankung zu einer Hypermethylierung mit Verlust der protektiven Funktion des Gens *B9D1* und daraus resultierendem Progress der kardialen Erkrankung, wie es auch die beschriebene Assoziation der aberranten *B9D1*-Promotormethylierung im Blut zum Progress der Erkrankung HFpEF in der Arbeit von Awe (2020) vermuten lässt. Eine höhere *B9D1*-Promotormethylierung im Blut war mit eine Progress der Erkrankung HFpEF, im Sinne eines kürzeren Überlebens, assoziiert (Awe 2020). Aufgrund des eingeschränkten Wissens zum Gen *B9D1* lässt sich dieser Zusammenhang nicht abschließend klären.

Wie anhand des in Kapitel 1.4.3 präsentierten aktuellen Wissensstands zum Gen *B9D1* deutlich wird, ist zur Funktion des Gens *B9D1* am Herzen insgesamt noch wenig bekannt. Damit bleibt hier zusammenfassend die genaue Rolle von *B9D1* am Herzen und der potentielle pathomechanistische Einfluss auf die Entstehung und den Progress kardialer Erkrankungen unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der beschriebenen Vorarbeiten lassen resümierend eine Funktion des Gens *B9D1* am Herzen in Form einer protektiven Genfunktion vermuten. Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge sind hier Folgestudien nötig.

4.3 Prognostische Biomarker kardialer Erkrankungen

Für kardiale Erkrankungen, insbesondere die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Krankheitsbilder HFpEF (McDonagh et al. 2021) und Aortenklappenstenose (Vahanian et al. 2022), gibt es bereits verschiedene klinisch etablierte im Blut messbare Biomarker. Für einige dieser sich bereits in der klinischen Anwendung befindlichen Biomarker, zu denen insbesondere die natriuretischen Peptide zählen, wird eine Bedeutung als prognostischer Biomarker diskutiert, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz weisen NT-proBNP und BNP grundsätzlich neben der Eignung als diagnostischer Biomarker auch einen prognostischen Wert auf (Anand et al. 2003; Bettencourt 2004; Gardner et al. 2003; Madamanchi et al. 2014; Zile et al. 2016). Speziell für das Krankheitsbild HFpEF konnten verschiedene Studien zeigen, dass sich die natriuretischen Peptide BNP und NT-proBNP als prognostische Biomarker eignen (Anand et al. 2011; Anjan et al. 2012; Myhre et al. 2018). Höhere Werte dieser Biomarker im Blut werden mit einem schlechteren *Outcome*, im Sinne einer höheren Morbidität und Mortalität, assoziiert (Anand et al. 2011; Zile et al. 2016). Auch die ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz aus dem Jahr 2021 verweist auf die Eignung der natriuretischen Peptide als diagnostische und prognostische Biomarker für die Erkrankung (McDonagh et al. 2021). Für das Krankheitsbild Aortenklappenstenose stellen ebenfalls verschiedene Studien eine prognostische Relevanz der natriuretische Peptide, insbesondere von BNP und NT-proBNP, heraus (Bergler-Klein et al. 2004; Clavel et al. 2014; Hadziselimovic et al. 2022; White et al. 2021). Höhere Werte der natriuretischen Peptide im Blut werden auch bei der Aortenklappenstenose mit einem schlechteren *Outcome*, im Sinne einer höheren Gesamtmortalität, assoziiert (Bergler-Klein et

al. 2004; White et al. 2021). Auch die ESC-Leitlinie zu Herzklappenerkrankungen aus dem Jahr 2021 verweist auf die Eignung natriuretischer Peptide als prognostische Biomarker für das Krankheitsbild Aortenklappenstenose (Vahanian et al. 2022). Es wird im Allgemeinen angenommen, dass die Höhe von BNP und NT-proBNP im Blut mit der Schwere der Aortenklappenstenose korreliert und bei Zunahme des Schweregrades der Stenose die Werte im Blut entsprechend ansteigen (Bergler-Klein et al. 2004). Neben den natriuretischen Peptiden wird in der aktuellen Literatur auch Troponin T als prognostischer Biomarker für die beiden Krankheitsbilder HFpEF (Bayes-Genis et al. 2022) und Aortenklappenstenose (Sarkar et al. 2023; Vahanian et al. 2022; White et al. 2021) diskutiert. In der aktuellen Literatur werden für die Erkrankungen Aortenklappenstenose und HFpEF auch verschiedene neue potentielle im Blut messbare Biomarker für prognostische Vorhersagen diskutiert, die bisher keine breite klinische Anwendung finden. Beispielsweise diskutieren Tromp et al. (2017) die Biomarker Osteopontin und Neuropilin als HFpEF-spezifische prognostische Biomarker im Blut. White et al. (2021) beschreiben eine Assoziation erhöhter Ausgangswerte von Galectin-3 im Blut zur erhöhten Mortalität bei Patienten mit Aortenklappenstenose. Auch Lipoprotein A wird als prognostischer Biomarker für die Aortenklappenstenose diskutiert (Sarkar et al. 2023).

Die beschriebenen bereits klinisch etablierten prognostischen Biomarker weisen unterschiedliche Probleme und Einschränkungen in ihrer klinischen Anwendung auf. Beispielsweise können verschiedene kardiale und nicht-kardiale Ursachen zu einer Erhöhung der natriuretischen Peptide im Blut führen, sodass die diagnostische Genauigkeit der natriuretischen Peptide hinsichtlich spezifischer kardialer Erkrankungen entsprechend eingeschränkt wird (McDonagh et al. 2021). Als wichtigste Störfaktoren, die zu einer nicht-kardial bedingten Veränderung der natriuretischen Peptide im Blut führen können, gelten die Nierenfunktion und der BMI (Mueller et al. 2019). Adipöse Patienten weisen im Allgemeinen niedrigere Konzentrationen der natriuretischen Peptide im Blut auf als nicht-adipöse Vergleichspersonen (Madamanchi et al. 2014; Mueller et al. 2019). Aus diesem Grund werden für diese Patienten niedrigere *Cut-off*-Werte der Konzentration der natriuretischen Peptide im Blut diskutiert (Mueller et al. 2019). Patienten mit einer Einschränkung der Nierenfunktion weisen im Allgemeinen höhere Konzentrationen der natriuretischen Peptide im Blut auf als nierengesunde Vergleichspersonen, sodass für diese Patienten höhere *Cut-off*-Werte für die Konzentration der natriuretischen Peptide im Blut diskutiert werden (Mueller et al. 2019). Eine allgemeine Abhängigkeit von der Nierenfunktion zeigt auch der etablierte kardiale Biomarker Troponin T, denn bei einer Nierenfunktionseinschränkung sind erhöhte Werte von Troponin T im Blut nachweisbar (Freda et al. 2002; Pfortmueller et al. 2013). Darüber hinaus können Patienten mit HFpEF BNP-Werte unterhalb der diagnostischen Schwellenwerte aufweisen, insbesondere wenn die Patienten zugleich eine Adipositas aufweisen (Anjan et al. 2012; Dunlay et al. 2017; McDonagh et al. 2021; Pieske et al. 2019). Damit wird die diagnostische Nutzbarkeit des Biomarkers bei diesem Krankheitsbild entsprechend einschränkt (Pieske et al. 2019). Auch HFpEF-Patienten mit nicht erhöhten natriuretischen Peptiden weisen gegenüber Patienten ohne Herzinsuffizienz eine erhöhte Morbidität und Mortalität auf (Verbrugge et al. 2022). Eine Anpassung

der diagnostischen Schwellenwerte der natriuretischen Peptide für Patienten mit HFpEF wird diskutiert (Lam et al. 2011).

Resümierend wird anhand der dargestellten Probleme in der klinischen Anwendung bisheriger Biomarker und der aktuell weiterhin bestehenden schlechten Prognose von Patienten mit HFpEF und Aortenklappenstenose deutlich, dass die Suche nach neuen prognostischen Biomarkern für diese Erkrankungen einen wichtigen Forschungsschwerpunkt darstellt.

4.4 Überlegenheit der Messung der Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut

Anhand der Untersuchung von Korrelationen zwischen der im Blut gemessenen Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* mit verschiedenen klinischen Parametern der HFpEF- und TAVI-Kohorte, sollte die Überlegenheit der Messung der Promotormethylierung im Blut gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter geprüft werden.

Wie schon in Kapitel 4.2 erläutert, ergab sich nur für die Promotormethylierung von *B9D1* und den Parameter BNP im Blut in der HFpEF-Kohorte eine signifikante positive lineare Korrelation (Abbildung 6). Für alle anderen untersuchten klinischen Parameter ergaben sich in beiden Kohorten, der HFpEF- und TAVI-Kohorte, keine signifikanten Zusammenhänge mit der Promotormethylierung der drei Gene. Insbesondere für bereits etablierte Biomarker kardialer Erkrankungen, wie NT-proBNP und BNP, oder für die Herzfunktion charakterisierende Parameter, wie die LVEF oder E/e', konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation mit der im Blut gemessenen Promotormethylierung der drei Gene nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 3.3). Vergleichbare Ergebnisse einer insgesamt fehlenden Korrelation zwischen verschiedenen allgemeinen klinischen Parametern und der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut erbrachte auch die Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020).

Vorarbeiten lieferten bereits Hinweise auf die potentielle Überlegenheit der im Blut messbaren Promotormethylierung spezifischer Gene gegenüber bereits etablierten Biomarkern für kardiale Erkrankungen. In einer Untersuchung von Patienten mit einer durch eine DCM ausgelösten Herzinsuffizienz zeigte sich die im peripheren Blut gemessene DNA-Methylierung des Gens *B9D1* als diagnostischer Biomarker gegenüber dem bereits klinisch etablierten Biomarker NT-proBNP überlegen (Meder et al. 2017). In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) zur Untersuchung des Krankheitsbildes HFpEF zeigte die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut eine bessere Assoziation zum Überleben als bereits etablierte Biomarker wie BNP und NT-proBNP. Während sich eine signifikante Korrelation der Promotormethylierung der drei Gene im Blut mit dem Überleben ergab, konnte keine signifikante Korrelation der Promotormethylierung der drei Gene im Blut mit bereits etablierten kardialen Biomarkern, wie BNP und NT-proBNP, der NYHA-Klasse oder anderen die Herzfunktion charakterisierenden Parametern, wie der LVEF oder

E/e', nachgewiesen werden (Awe 2020). Nur für das Gen *ATP2A2* und BNP sowie für das Gen *B9D1* und E/e' ergab sich eine signifikante Korrelation des klinischen Parameters mit der Promotormethylierung des jeweiligen Gens im Blut (Awe 2020).

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, ist die Anwendung der aktuell klinisch etablierten Biomarker für prognostische Vorhersagen der Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose problembehaftet. Patienten mit HFpEF (Lee et al. 2009; Tribouilloy et al. 2008) bzw. mit einer Aortenklappenstenose (Frank et al. 1973; Leon et al. 2010) weisen im Allgemeinen eine hohe Mortalität und schlechte Prognose auf. In Zusammenschau der dargestellten Zusammenhänge und den Ergebnissen dieser Arbeit führt dies zu der Hypothese, dass Risikopatienten der zwei untersuchten Erkrankungen anhand der bisher etablierten klinischen Parameter und Biomarker nicht ausreichend detektiert werden können. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob die Messung der Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut einen Mehrwert gegenüber der Erfassung anderer klinischer Parameter bringen kann. Wie berichtet ergab sich zwischen der Promotormethylierung der drei Gene im Blut und den untersuchten klinischen Parametern in der vorliegenden Arbeit bis auf eine Ausnahme keine statistisch signifikante Korrelation. Ausgehend von der Messung der untersuchten klinischen Parameter war damit aufgrund der fehlenden Korrelation im Allgemeinen kein Rückschluss auf die Höhe der Promotormethylierung im Blut möglich, was die Messung der Promotormethylierung anderenfalls obsolet machen würde. Dieses Ergebnis weist auf die Unabhängigkeit und Überlegenheit der neuen potentiellen Biomarker gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter hin.

Resümierend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit damit darauf hin, dass die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als potentieller Biomarker der kardialen Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose der Erfassung anderer klinischer Parameter und bereits etablierter Biomarker überlegen ist. Ergebnisse einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg deuten darauf hin, dass sich die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostischer Biomarker für die Erkrankung HFpEF eignen könnte (Awe 2020). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nachfolgend die Möglichkeit zur Nutzung der im Blut messbaren aberranten Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als prognostischer Biomarker für die zwei Krankheitsbilder HFpEF und Aortenklappenstenose evaluiert.

4.5 DNA-Methylierung im Blut als prognostischer Biomarker

Die DNA-Methylierung gilt als eine der zwei Hauptmechanismen der epigenetischen Modifikation menschlicher DNA (Bernstein et al. 2007; Zeisberg und Zeisberg 2013). Sie findet gehäuft an CpG-Inseln in der proximalen Promotorregion von Genen statt und beeinflusst die Transkription betroffener Gene (Herman und Baylin 2003; Neary et al. 2015; Tampe et al. 2015). Als epigenetischer Mechanismus spielt die DNA-Methylierung dabei sowohl in der normalen Physiologie als auch bei unterschiedlichen Erkrankungen eine Rolle (Bernstein et al. 2007; Bird und Wolffe 1999; Egger et al. 2004). In Vorarbeiten gelang es verschiedene Herzerkrankungen (Haas et al. 2013; Meder et al. 2017;

Movassagh et al. 2011) und insbesondere die beiden in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Erkrankungen HFpEF (Awe 2020; Rabkin und Wong 2023) und Aortenklappenstenose (Kanwischer et al. 2023; Nasu et al. 2020; Radhakrishna et al. 2016) mit epigenetischen Veränderungen in Form der aberranten DNA-Methylierung spezifischer Gene in einen Zusammenhang zu bringen. Wie in Kapitel 1.3 ausführlich dargestellt, gelingt anhand verschiedener Studien eine kausale Assoziation der aberranten DNA-Methylierung spezifischer Gene zur pathologischen Fibrogenese in unterschiedlichen Organen (Bechtel et al. 2010; Neary et al. 2015; Tampe et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2013) einschließlich des Herzes (Grimaldi et al. 2017; Xu et al. 2015). Die Herzfibrose ist bei den in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Krankheitsbildern HFpEF und Aortenklappenstenose, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, pathophysiologisch und prognostisch relevant, woraus sich eine allgemeine Assoziation der beiden Krankheitsbilder zur aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene ergibt. Wie schon von Zeisberg und Zeisberg (2013) und Xu et al. (2015) festgestellt, ergeben sich aus dem Verständnis den der pathologischen Fibrogenese zugrundeliegenden epigenetischen Mechanismen diagnostische Ansätze für Erkrankungen, bei denen die pathologische Fibrogenese bedeutsam ist. Anhand von Vorarbeiten kann ein Zusammenhang zwischen der im Blut messbaren Promotormethylierung spezifischer Gene und der im Herzgewebe messbaren Promotormethylierung dieser Gene (Meder et al. 2017) sowie dem Ausmaß der pathologischen Fibrogenese am Herzen hergestellt werden (Gosch 2020).

Resümierend ergibt sich anhand der dargestellten Zusammenhänge die Möglichkeit, anhand des Prinzips der *Liquid Biopsy* die DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut als potentiellen Biomarker zu nutzen. In der aktuellen Literatur wird die im Blut gemessene DNA-Methylierung spezifischer Gene bereits als potentieller diagnostischer Biomarker für verschiedene Erkrankungen beschrieben. In der onkologischen Forschung wird die Nutzung der DNA-Methylierung im Blut als potentieller diagnostischer Biomarker unterschiedlicher Krebserkrankungen diskutiert (Schwarzenbach et al. 2011). Auch für kardiale Erkrankungen existieren in der aktuellen Literatur entsprechende Studien. Beispielsweise beschreiben Meder et al. (2017) die DNA-Methylierung des Gens *B9D1* im Blut als potentiellen diagnostischen Biomarker für die Erkrankung DCM und die DNA-Methylierung der Genloci *NPPA* und *NPPB* im Blut als potentielle Biomarker für die Herzinsuffizienz. Radhakrishna et al. (2016) diskutieren in ihrer Arbeit die im Blut gemessene DNA-Methylierung verschiedener Gene als potentiellen Biomarker für die Aortenklappenstenose. Nasu et al. (2020) beschreiben die Methylierung des Gens *TRIB1* im Blut als potentiellen postoperativen Biomarker für Patienten mit Aortenklappenstenose. Schiano et al. (2020) erörtern in ihrer Arbeit die DNA-Methylierung des Gens *HLA-G* im Blut als potentiellen Biomarker für die Vorhersage des Schweregrades einer KHK, definiert als Schweregrad der Koronarstenose.

Neben der Nutzung als diagnostischer Biomarker wird die DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut in der aktuellen Literatur auch als prognostischer Biomarker diskutiert. In einer Kohorte zur Untersuchung der Allgemeinbevölkerung konnte die im Blut gemessene DNA-Methylierung

spezifischer krankheitsassoziierter Gene von Zhang et al. (2017) mit der Gesamtmortalität assoziiert werden. Die Autoren verweisen auf die potentielle Eignung dieser DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut zur Risikostratifizierung von Patienten (Zhang et al. 2017). In einer weiteren Arbeit benennen Zhang et al. (2016) die DNA-Methylierung spezifischer Genloci im Blut als potentielle Biomarker für die mit dem Rauchen assoziierte Mortalität, da sie in ihrer Arbeit eine Assoziation der DNA-Methylierung spezifischer mit dem Rauchen verknüpfter Genloci im Blut mit der Mortalität fanden. In der onkologischen Forschung wird die DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut bereits für verschiedene Krebsarten als prognostischer Biomarker diskutiert (Schwarzenbach et al. 2011). Pimson et al. (2016) beschreiben die Methylierung der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PCDH10* im Blut als potentielle prognostische Biomarker für Patienten mit Magenkrebs. Eine aberrante Promotormethylierung der zwei Gene im Blut war mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten mit Magenkrebs assoziiert (Pimson et al. 2016). Wallner et al. (2006) beschreiben den Methylierungsstatus der Gene *HPP1* und *HLTF* im Blut als prognostische Biomarker für Patienten mit kolorektalem Krebs. Eine aberrante Promotormethylierung der zwei Gene im Blut war mit einer höheren Mortalität und damit einer schlechteren Prognose der Patienten mit kolorektalem Krebs assoziiert (Wallner et al. 2006). Für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs wird die DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut ebenfalls als potentieller prognostischer Biomarker diskutiert (Liouta et al. 2023).

Auch für kardiovaskuläre Erkrankungen wird die aberrante DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut bereits als potentieller prognostischer Biomarker diskutiert. Benincasa et al. (2023) identifizierten in ihrer Arbeit die im Blut gemessene Promotormethylierung des Gens *SOCS3* als potentiellen prognostischen Biomarker für Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie (PAH). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigte das Gen bei Patienten mit PAH ein verändertes Muster der Promotormethylierung im Blut und die Promotormethylierung von *SOCS3* im Blut korrelierte mit spezifischen hämodynamischen Parametern der PAH, die als robuste prognostische Parameter für die Erkrankung gelten (Benincasa et al. 2023). Abdulrahim et al. (2019) untersuchten in einer kardiovaskulären Kohorte aus Patienten, die eine Herzkatheteruntersuchung erhielten, den Zusammenhang der DNA-Methylierung im Blut und der Gesamtmortalität. Die Autoren fanden eine Assoziation einer aberranten DNA-Methylierung spezifischer Genloci im Blut zu einer erhöhten Gesamtmortalität und stellten anhand ihrer Ergebnisse fest, dass Unterschiede in der Methylierung spezifischer Genloci im Blut als potentielle Biomarker zur Risikoeinschätzung von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen dienen könnten (Abdulrahim et al. 2019). In der Arbeit von Breitling et al. (2012) war bei Patienten mit stabiler KHK eine niedrigere Methylierung des Gens *F2RL3* im Blut mit einer höheren Mortalität assoziiert.

Die aberrante DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut wird auch als potentieller prognostischer Biomarker speziell für das Krankheitsbild HFpEF diskutiert. Die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* zeigte an einer Kohorte aus Patienten mit HFpEF in der Arbeit von Awe

(2020) eine Assoziation zum Überleben, da eine höhere Promotormethylierung der drei Gene im Blut mit einem kürzeren Überleben assoziiert war. Auch speziell für das Krankheitsbild Aortenklappenstenose wird die aberrante DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut als potentieller prognostischer Biomarker diskutiert. Kanwischer et al. (2023) konnten die aberrante Promotormethylierung des Gens *IRX3* im Blut als potentiellen prognostischen Biomarker für Patienten mit Aortenklappenstenose identifizieren, da bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose eine niedrige Promotormethylierung des Gens *IRX3* im Blut mit einem schlechteren Gesamtüberleben nach TAVI assoziiert war.

Da bisher etablierte Biomarker keine ausreichende Identifizierung von Risikopatienten und keine ausreichende prognostische Vorhersage ermöglichen, besteht für die Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose weiterhin die beschriebene hohe Mortalität und schlechte Prognose. Die Anwendung bisher etablierter Biomarker hinsichtlich prognostischer Vorhersagen ist, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, problembehaftet. Die in Kapitel 4.4 diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen für die untersuchten kardialen Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose darauf hin, dass die Messung der Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut einen Mehrwert gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter, einschließlich bisher etablierter Biomarker, bringen könnte. Wie in diesem Kapitel dargestellt, weisen verschiedene Arbeiten auf die Eignung der DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut als prognostischen Biomarker hin. Für die Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* konnte eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) bereits Hinweise darauf liefern, dass sich die Promotormethylierung dieser drei Gene im Blut als prognostischer Biomarker für Patienten mit HFpEF eignen könnte. Aufgrund dieser Ergebnisse und der bisher dargestellten Zusammenhänge wurde im Folgenden untersucht, ob sich die im Blut detektierbare Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als prognostischer Biomarker eignet. Hierzu wurde eine Kohorte aus Patienten mit der Erkrankung HFpEF untersucht. Zudem wurde eine Kohorte aus Patienten mit Aortenklappenstenose untersucht. Das Krankheitsbild Aortenklappenstenose ist eine kardiale Erkrankung mit enger Verknüpfung zur Herzinsuffizienz, da es im Krankheitsverlauf zu einer Herzinsuffizienz kommen kann, was mit einer schlechten Prognose dieser Patienten assoziiert ist (Czarny und Resar 2014). Zudem teilen sich die beiden Krankheitsbilder HFpEF und Aortenklappenstenose die in Kapitel 1.2 beschriebene pathomechanistische Bedeutung der Herzfibrose, die zudem bei beiden Erkrankungen eine prognostische Relevanz zeigt.

4.6 Übertragung von Überlebensmodellen auf neue Kohorten

Im Rahmen einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg ergaben Untersuchungen an einem Datensatz der DIAST-Kohorte Hinweise darauf, dass sich die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2, B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostischer Biomarker für Patienten mit HFpEF eignen könnte (Awe 2020). Anhand des Datensatzes der DIAST-Kohorte wurden für die vorliegende Arbeit vier Cox-Regressionen modelliert (siehe auch Kapitel 3.4.1). Diese vier Modelle beinhalteten eine Auswahl

klinischer Parameter, die Einfluss auf das Überleben in der DIAST-Kohorte zeigten. Hierzu zählte auch die im Blut gemessene Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1*, sodass in drei der vier Modelle jeweils die Promotormethylierung eines der drei Gene integriert wurde (Abbildung 8). Die vier Modelle wurden anschließend auf die HFpEF- und TAVI-Kohorte übertragen. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Vorarbeit von Awe (2020), sollte durch diese Modellübertragung auf neue Kohorten untersucht werden, ob die Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als prognostischer Biomarker angewendet werden kann. Das übergeordnete Ziel der Untersuchung war es zu evaluieren, ob mithilfe der im Blut gemessenen potentiellen neuen Biomarker Hochrisikopatienten identifiziert und prognostische Aussagen getroffen werden können. Zum Vergleich wurde auch ein Modell nur mit klinischen Parametern und ohne die Promotormethylierung betrachtet.

In den vier Modellen zeigten neben der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* auch die klinischen Parameter BMI, Geschlecht und KHK einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der HFpEF-Patienten in der DIAST-Kohorte (Abbildung 8). Ein niedrigerer BMI, ein männliches Geschlecht, das Vorliegen einer KHK und eine höhere Promotormethylierung im Blut waren mit einem höheren Risiko zu versterben assoziiert. Diese Assoziation der klinischen Parameter zur Mortalität bei HFpEF steht im Einklang mit der aktuellen Literatur. Die Parameter Alter, Geschlecht, BMI und KHK werden als Schlüsselfaktoren der Mortalität bei Patienten mit HFpEF diskutiert (Chan und Lam 2013). Ein höheres Alter, ein männliches Geschlecht (Chan und Lam 2013; Pocock et al. 2013) und das Vorliegen einer KHK (Chan und Lam 2013; Hwang et al. 2014) werden hierbei im Allgemeinen mit einer höheren Mortalität von Patienten mit dem Krankheitsbild HFpEF assoziiert. Im Allgemeinen wird das Vorliegen einer Präadipositas und Adipositas mit einer höheren Gesamtmortalität assoziiert (Global BMI Mortality Collaboration et al. 2016; Pischon et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit war in den beschriebenen Überlebensmodellen dahingegen ein niedrigerer BMI mit einer höheren Mortalität assoziiert. Ein solcher Zusammenhang ergab sich auch bereits in der Vorarbeit von Awe (2020). Dieses sogenannte Adipositas-Paradoxon wird für Patienten verschiedener Erkrankungsgruppen in der aktuellen Literatur diskutiert und für Patienten mit Herzinsuffizienz ergaben verschiedenen Studien eine Assoziation von einem erhöhten BMI zu einer niedrigeren Mortalität (Doehner et al. 2010). So fanden Oreopoulos et al. (2008) in ihrer Metaanalyse eine Assoziation von Übergewicht und Adipositas zu einer niedrigeren Gesamtmortalität und niedrigeren kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz. In aktuelleren Studien wird speziell für die Erkrankung HFpEF von verschiedenen Autoren ein U-förmiger Zusammenhang von BMI und Gesamtmortalität beschrieben (Chan und Lam 2013; Haass et al. 2011; Li et al. 2022). Da der genaue Zusammenhang zwischen der Mortalität und dem BMI bei HFpEF weiterhin kontrovers diskutiert wird und die zugrundeliegenden Mechanismen bisher ungeklärt bleiben, bedarf es hier weiterer Forschung (Oreopoulos et al. 2008; Tadic und Cuspidi 2019).

4.7 Ausbleiben einer sinnvollen prognostischen Vorhersage durch den Biomarker Promotormethylierung an der TAVI-Kohorte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Cox-Regressionen an der DIAST-Kohorte modelliert (Abbildung 8). Bei den Patienten der DIAST-Kohorte lag als Grunderkrankung eine HFpEF vor (siehe auch Kapitel 2.2.3). Die vier Modelle wurden auf die TAVI-Kohorte übertragen (siehe auch Kapitel 3.4.2.1 und Kapitel 3.4.2.2). Alle Patienten der TAVI-Kohorte erhielten aufgrund einer schweren oder in Einzelfällen moderaten bis schweren Aortenklappenstenose eine TAVI (siehe auch Kapitel 2.2.2). Für das Krankheitsbild HFpEF ergab eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) Hinweise auf die potentielle Eignung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostische Biomarker der Erkrankung. Mit der Aortenklappenstenose wurde hier eine andere Grunderkrankung als HFpEF untersucht, die aber pathomechanistische Gemeinsamkeiten zur HFpEF aufweist. So spielt bei beiden kardialen Erkrankungen, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, die Herzfibrose pathomechanistisch eine Rolle und zeigt zudem eine prognostische Relevanz. Hauptziel der im Folgenden dargestellten Untersuchungen war es zu prüfen, ob die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als neuer potentieller Biomarker bei Patienten mit Aortenklappenstenose, also einer anderen Grunderkrankung als HFpEF, sinnvolle prognostische Vorhersagen ermöglicht.

Die Übertragung der vier betrachteten Cox-Regressionen auf die vollständige TAVI-Kohorte führte, in Zusammenschau mit den vorliegenden Daten zum Gesamtüberleben und zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben, zu keiner sinnvollen prognostischen Vorhersage (siehe auch Kapitel 3.4.2.1). Zunächst wurde die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung zu den Zeitpunkten ein Jahr (Abbildung 9 und Abbildung 12) und vier Jahre (Abbildung 10 und Abbildung 13) nach Studieneintritt untersucht. Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens (Tabelle 48 und Tabelle 49) und des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens (Tabelle 50 und Tabelle 51) ordneten die Modelle den Patienten mit Event keinen signifikant höheren Risikowert zu als den Patienten ohne Event. Das Event war hier definiert als Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens bzw. des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens. Im nächsten Schritt wurde die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung über den gesamten Beobachtungszeitraum untersucht. Die vom Modell als Hochrisikopatient klassifizierten Patienten hatten bei Betrachtung des Gesamtüberlebens keine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als die vom Modell als Nicht-Hochrisikopatient klassifizierten Patienten (Abbildung 11). Auch bei näherer Betrachtung des kardiovaskulär-spezifischen Überlebens hatte die Gruppe der Hochrisikopatienten keine signifikant höhere kumulative Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre bzw. nicht-kardiovaskuläre Events als die Gruppe der Nicht-Hochrisikopatienten (Abbildung 14). Für die vier Modelle waren zu verschiedenen Zeitpunkten die Ergebnisse der Modellübertragung zudem zum Teil widersprüchlich zu vorliegenden Überlebensdaten, was aber ohne statistische Signifikanz blieb. Beispielsweise wurde den Patienten ohne Event durch die Modelle teils ein höherer Risikowert zugeteilt als den Patienten mit Event (Tabelle 48

bis Tabelle 51). Beim Vergleich der klinischen Parameter zwischen der TAVI- und DIAST-Kohorte ergaben sich signifikante Unterschiede (Tabelle 52). Eine daraus mutmaßlich resultierende eingeschränkte Vergleichbarkeit der zwei Kohorten könnte hier zur fehlenden Übertragbarkeit der vier Modelle auf die vollständige TAVI-Kohorte geführt haben.

Um die Vergleichbarkeit der Kohorten zu verbessern, erfolgte ein *Propensity Score Matching* zwischen der TAVI- und DIAST-Kohorte. Die Modelle wurden anschließend auf diese TAVI-Subkohorte nach *Matching* übertragen (siehe auch Kapitel 3.4.2.2). Beim Vergleich der klinischen Parameter dieser Subkohorte mit der DIAST-Kohorte ergaben sich nach dem *Matching* keine signifikanten Unterschiede mehr (Tabelle 53), woraus sich eine gute allgemeine Vergleichbarkeit der Kohorten annehmen ließ. In Zusammenschau mit den vorliegenden Daten zum Gesamtüberleben und zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben, ergab allerdings auch die Modellübertragung auf die TAVI-Subkohorte nach *Matching* in Kapitel 3.4.2.2 keine sinnvollen prognostischen Vorhersagen.

Aufgrund dieser allgemein fehlenden Übertragbarkeit der Modelle auf die Patienten der TAVI-Kohorte wurde nach möglichen Erklärungen gesucht. Auf allgemein gültige Gründe für die Einschränkung der Modellübertragung wird in Kapitel 4.10 näher eingegangen. Darüber hinaus kommen grundlegende Unterschiede des Krankheitsbildes Aortenklappenstenose zum Krankheitsbild HFpEF in Frage. Möglicherweise ist der Progress der Erkrankung bei Patienten mit HFpEF ohne Intervention im Vergleich zu Patienten mit Aortenklappenstenose, die eine Intervention in Form einer TAVI erhalten haben, grundlegend unterschiedlich. Daraus würde eine generell schlechte Vergleichbarkeit des Überlebens und der Mortalität der zwei Patientengruppen resultieren. Für dieses Argument spricht die Arbeit von Martin et al. (2017), in der die Autoren das beobachtete Überleben von Patienten nach TAVI mit dem erwarteten Überleben gematchter Patienten der Allgemeinbevölkerung verglichen haben. Direkt nach der Intervention in Form der TAVI zeigte sich im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein deutlich höheres Mortalitätsrisiko der Patienten mit Aortenklappenstenose, anschließend näherte sich das Mortalitätsrisiko der zwei Kohorten im Verlauf mehrerer Jahre einander an (Martin et al. 2017). Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit lagen von der TAVI-Kohorte Überlebensdaten nur für einen Zeitraum von ca. fünf Jahren nach TAVI vor. Eine längere Beobachtungszeit könnte hier zu einer besseren Übertragbarkeit der Modelle führen, da dann die interventionsbedingte Erhöhung der Mortalität direkt nach TAVI weniger ins Gewicht fallen würde. Auch ein Beobachtungsbeginn mit definiertem Abstand zur Intervention könnte eine mögliche Option darstellen, um die interventionsbedingte Erhöhung der Mortalität weniger ins Gewicht fallen zu lassen. Als Einschränkung der Studie von Martin et al. (2017) muss beachtet werden, dass das beobachtete Überleben von Patienten nach TAVI mit dem erwarteten Überleben einer gematchten Kohorte der Allgemeinbevölkerung statt mit dem Überleben von HFpEF-Patienten verglichen wurde. Für eine Übertragung der Ideen in Folgestudien sollte hier zunächst ein direkter Vergleich des Mortalitätsverlaufes von HFpEF- und TAVI-Patienten erfolgen. Ein weiterer möglicher Grund für die fehlende Übertragbarkeit der Modelle auf die TAVI-Kohorte könnte eine grundlegend unterschiedliche Bedeutung der Gene *ATP2A2*, *B9D1*

und *RASAL1* beim Krankheitsbild Aortenklappenstenose im Vergleich zu HFpEF sein. Die in dieser Arbeit beschriebene Assoziation der drei untersuchten Gene zu kardialen Erkrankungen und zur Herzfibrose lässt eine allgemeine Assoziation der drei Gene zum Krankheitsbild Aortenklappenstenose vermuten. Zur spezifischen Funktion der drei Gene beim Krankheitsbild Aortenklappenstenose liefert die aktuelle Literatur allerdings keine ausreichenden Hinweise. Hier bedarf es weiterer Forschung.

Resümierend ergab die Modellübertragung auf die TAVI-Kohorte keine validen Ergebnisse. Eine abschließende Beurteilung, ob sich die Promotormethylierung der Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostischer Biomarker für Patienten mit Aortenklappenstenose eignet, ist anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit daher nicht möglich. Hier müssen sich Folgestudien anschließen.

4.8 Eignung der *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung als prognostischer Biomarker an der HFpEF-Kohorte

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an der DIAST-Kohorte vier Cox-Regressionen modelliert (Abbildung 8). Bei den Patienten der DIAST-Kohorte lag als Grunderkrankung eine HFpEF vor (siehe auch Kapitel 2.2.3). Die vier Modelle wurden auf die HFpEF-Kohorte übertragen (siehe auch Kapitel 3.4.2.3 und Kapitel 3.4.2.4). Die Auswahl der HFpEF-Kohorte diente der Untersuchung der Grunderkrankung HFpEF (siehe auch Kapitel 2.2.1). Als Hauptziel dieser Untersuchung sollte geprüft werden, ob die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als neuer potentieller Biomarker für Patienten mit HFpEF sinnvolle prognostische Vorhersagen ermöglicht.

Die Übertragung der vier Modelle auf die vollständige HFpEF-Kohorte führte, in Zusammenschau mit vorliegenden Daten zum Gesamtüberleben, zu keiner sinnvollen prognostischen Vorhersage (siehe auch Kapitel 3.4.2.3). Zuerst wurde die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung zu den Zeitpunkten ein Jahr (Abbildung 21) und vier Jahre (Abbildung 22) nach Studieneintritt untersucht. Bei der Betrachtung des Gesamtüberlebens ordneten die Modelle den Patienten mit Event keinen signifikant höheren Risikowert zu als den Patienten ohne Event (Tabelle 58 und Tabelle 59). Das Event war hier definiert als Versterben im Rahmen der Betrachtung des Gesamtüberlebens. Anschließend wurde die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung über den gesamten Beobachtungszeitraum untersucht. Die vom Modell als Hochrisiko klassifizierten Patienten hatten bei Betrachtung des Gesamtüberlebens keine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als die vom Modell als Nicht-Hochrisiko klassifizierten Patienten (Abbildung 23). Es fiel darüber hinaus auf, dass die Ergebnisse der Übertragung der vier Modelle zu verschiedenen Zeitpunkten zum Teil widersprüchlich zu vorliegenden Überlebensdaten waren, was aber ohne statistische Signifikanz blieb. Beispielsweise wurden Patienten ohne Event durch das Modell höhere Risikowerte zugeteilt als Patienten mit Event (Tabelle 58 und Tabelle 59). Die klinischen Parameter zwischen der HFpEF- und DIAST-Kohorte wurden verglichen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede verschiedener Parameter zwischen den Kohorten (Tabelle 60). Dies könnte zur eingeschränkten Vergleichbarkeit der zwei Kohorten und damit zur fehlenden Übertragbarkeit der vier Modelle auf die vollständige HFpEF-Kohorte geführt haben.

Um die Kohorten vergleichbarer zu machen, fand daher ein *Propensity Score Matching* zwischen HFpEF- und DIAST-Kohorte statt. Die vier Modelle wurden anschließend auf die HFpEF-Subkohorte nach *Matching* übertragen. Die Übertragung der vier Modelle auf die HFpEF-Subkohorte nach *Matching* (siehe auch Kapitel 3.4.2.4) erbrachte zusammenfassend eine bessere prognostische Vorhersage als die Modellübertragung auf die vollständige HFpEF-Kohorte (siehe auch Kapitel 3.4.2.3). Dies traf insbesondere für die Modelle mit der Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* zu. Zunächst wurde auch hier die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung zu den Zeitpunkten ein Jahr (Abbildung 24) und vier Jahre (Abbildung 25) nach Studieneintritt untersucht. Bei Betrachtung der vom Modell zugeteilten Risikowerte für den Zeitpunkt ein Jahr und vier Jahre nach Studieneintritt wurde den Patienten mit Event von allen vier Modellen ein höherer Risikowert zugeordnet als den Patienten ohne Event (Tabelle 61 und Tabelle 62). Diese Beobachtung blieb rein deskriptiv und ohne statistische Signifikanz. Passend zu den vorliegenden Überlebensdaten, teilten die vier Modelle folglich richtig den Patienten mit Event einen höheren Risikowert zu. Damit ergaben sich anhand dieser Ergebnisse resümierend erste Hinweise auf eine funktionierende prognostische Vorhersage durch die Modelle an der HFpEF-Subkohorte nach *Matching*. Anschließend wurde die prognostische Vorhersagekraft der Modellübertragung über den gesamten Beobachtungszeitraum untersucht (Abbildung 26). Bei der Betrachtung von Überlebenskurven ergab sich für das Modell ohne Promotormethylierung und das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den vom Modell als Hochrisiko und Nicht-Hochrisiko klassifizierten Patienten. Durch die Modellübertragung konnte hier keine sinnvolle Aufteilung der Kohorte in zwei Risikogruppen erreicht werden. Demgegenüber ergab sich im Modell mit *B9D1*-Promotormethylierung ein signifikanter Unterschied im Überleben der durch die Modellübertragung als Hochrisiko und Nicht-Hochrisiko klassifizierten Patienten mit niedrigerer Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten. Für das Modell mit *RASAL1*-Promotormethylierung zeigte sich ein statistischer Trend zur niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochrisikopatienten. Es ergab sich hier durch die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung eine gute Aufteilung der Überlebenskurven in zwei Risikogruppen. Unter Zuhilfenahme der *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung in den Modellen konnte damit gut zwischen Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten unterschieden werden. Der im Rahmen dieser Modellberechnungen ermittelte Risikowert stellte sich damit als prognostisch relevante Gruppierungsvariable dar. Zusammenfassend gelang hier durch die Modellübertragung mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung eine sinnvolle prognostische Vorhersage. Ein sich anschließender Vergleich der klinischen Parameter zwischen der HFpEF-Subkohorte nach *Matching* und der DIAST-Kohorte ergab nur für die *B9D1*-Promotormethylierung einen signifikanten Unterschied. Die *B9D1*-Promotormethylierung war in der HFpEF-Kohorte signifikant niedriger, es überschnitt sich aber der Wertebereich der Promotormethylierung beider Kohorten (Tabelle 63). Alle anderen klinischen Parameter zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kohorten. Nach dem *Propensity Score Matching* konnte damit für die beiden Kohorten insgesamt eine bessere Vergleichbarkeit angenommen

werden. Das Modell mit der *B9D1*-Promotormethylierung konnte, trotz des Unterschiedes des Parameters *B9D1*-Promotormethylierung zwischen der HFpEF- und DIAST-Kohorte, dessen Einfluss an der HFpEF-Kohorte gut modellieren und prognostische Vorhersagen ermöglichen. Der Unterschied in der Höhe der *B9D1*-Promotormethylierung zwischen den Kohorten führte damit zu keiner Einschränkung der Modellübertragung.

Im nächsten Schritt wurde nach spezifischen Hinweisen für die Identifikation von Hochrisikopatienten gesucht. Hierzu wurden, für die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung, die in die Modelle einfließenden klinischer Parameter zwischen Hochrisiko- und Nicht-Hochrisikopatienten verglichen (Tabelle 64 und Tabelle 65). In beiden Modellen war bei den Hochrisikopatienten die Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* höher als bei den Nicht-Hochrisikopatienten, allerdings blieb dies ohne statistische Signifikanz. In beiden Modellen war der BMI in der Gruppe der Hochrisikopatienten signifikant niedriger. Zudem hatten die Hochrisikopatienten in beiden Modellen signifikant häufiger eine KHK. Diese Hinweise zur Identifikation von Hochrisikopatienten gehen mit den Erkenntnissen der aktuellen Literatur einher. Wie bereits in Kapitel 4.6 diskutiert, wird das Vorliegen einer KHK bei Patienten mit HFpEF im Allgemeinen mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Chan und Lam 2013; Hwang et al. 2014). Ein niedriger BMI konnte bei Patienten mit Herzinsuffizienz (Oreopoulos et al. 2008) mit einer erhöhten Mortalität assoziiert werden. Für Patienten mit HFpEF ergab sich eine Assoziation eines niedrigeren BMIs zu einem kürzeren Überleben (Awe 2020). Aktuellere Studien diskutieren einen U-förmigen Zusammenhang von BMI und Mortalität bei HFpEF-Patienten (Chan und Lam 2013; Haass et al. 2011; Li et al. 2022).

Als nächstes galt es herauszufinden, ob die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung einen Zusatznutzen bei der Identifikation von Hochrisikopatienten bringen können. Dafür wurden die durch die vier Modelle vorhergesagten Hochrisikopatienten in der Zusammenschau betrachtet (Abbildung 27). Die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung identifizierten keine zusätzlichen Hochrisikopatienten. Das Modell mit *ATP2A2*-Promotormethylierung identifizierte einen, das Modell ohne Promotormethylierung mehrere zusätzliche Hochrisikopatienten. Hinsichtlich der Identifikation von Hochrisikopatienten, ließ sich hier auf den ersten Blick kein Mehrwert durch die Hinzunahme der *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung in die Modelle feststellen. Die Modelle ohne Promotormethylierung und mit *ATP2A2*-Promotormethylierung identifizierten zwar eine höhere Anzahl von Hochrisikopatienten, erbrachten aber, wie oben beschrieben, keine gute Differenzierung der Risikogruppen bei der Betrachtung der Überlebenskurven (Abbildung 26). Demgegenüber war bei der Modellübertragung mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung anhand der Risikowertzuteilung eine Differenzierung von Hochrisikopatienten in den Überlebenskurven möglich. Es lässt sich daher vermuten, dass die Modelle mit *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung fokussierter und spezifischer bei der Identifikation von Hochrisikopatienten vorgehen, sodass aus diesem Grund insgesamt eine niedrigere Anzahl an Hochrisikopatienten identifiziert wurde, als durch die beiden anderen Modelle. Es lässt sich zudem die Vermutung aufstellen, dass die erhöhte Anzahl an

vorhergesagten Hochrisikopatienten durch das Modelle ohne Promotormethylierung möglicherweise auf Falschvorhersagen beruhte. Eine differenziertere Interpretation lässt das aktuell noch eingeschränkte Wissen zu den einzelnen Genen nicht zu.

Eine abschließende Bewertung, ob die Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut einen eindeutigen Mehrwert bei der Identifikation von Hochrisikopatienten bei der Erkrankung HFpEF bringt, lassen die Ergebnisse an dieser Stelle nicht zu. Da die HFpEF-Subkohorte nach *Matching* klein war und es nur eine geringe Anzahl an Events gab, war die statistischen Aussagekraft entsprechend eingeschränkt. Zudem sollten allgemeine Einschränkungen der Modellübertragung bedacht werden, auf die in Kapitel 4.10 näher eingegangen wird. Darüber hinaus wird eine Interpretation durch den eingeschränkten Wissensstand zur Bedeutung der einzelnen Gene bei der Erkrankung HFpEF eingeschränkt. Resümierend ergeben sich aber anhand der dargestellten Ergebnisse starke Hinweise auf die Eignung der *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als prognostischen Biomarker bei HFpEF. Für allgemein gültige Aussagen, sollten die Modelle in Folgestudien an weiteren Kohorten getestet werden.

4.9 Die *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als neue prognostische Biomarker

Wie im vorherigen Kapitel dargestellt, weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass sich die Promotormethylierung der zwei Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostischer Biomarker für Patienten mit der Erkrankung HFpEF eignet. Für das Gen *ATP2A2* bei Patienten mit der Grunderkrankung HFpEF und für alle drei untersuchten Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* bei Patienten mit der Grunderkrankung Aortenklappenstenose ergab sich dagegen kein solcher Zusammenhang (siehe auch Kapitel 3.4).

In der vorliegenden Arbeit gelang es nicht, die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als potentielle prognostische Biomarker für die Grunderkrankung Aortenklappenstenose zu validieren. Wie im Verlauf der vorliegenden Arbeit ausführlich dargestellt wurde, ergibt sich für die Aortenklappenstenose anhand von Vorarbeiten eine allgemeine Assoziation des Krankheitsbildes zur aberranten DNA-Methylierung spezifischer Gene (siehe auch Kapitel 1.3 und Kapitel 1.5) und zur prognostisch relevanten Herzfibrose (siehe auch Kapitel 1.2). Ergebnisse einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Kanwischer et al. (2023) deuten auf die potentielle Eignung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als prognostischer Biomarker für Patienten mit Aortenklappenstenose hin. Die Autoren diskutieren in ihrer Arbeit die *IRX3*-Promotormethylierung im Blut als neuen prognostischen Biomarker für Patienten mit Aortenklappenstenose (Kanwischer et al. 2023). Aufgrund der genannten Zusammenhänge wurden in der vorliegenden Arbeit neben Patienten mit der Grunderkrankung HFpEF auch Patienten mit der Grunderkrankung Aortenklappenstenose untersucht. Es gelang dabei allerdings nicht die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostische

Biomarker an der untersuchten TAVI-Kohorte aus Patienten mit Aortenklappenstenose zu etablieren. Mögliche Gründe dafür wurden ausführlich in Kapitel 4.7 diskutiert. Die genannten Zusammenhänge geben Anreiz für Folgestudien zur Untersuchung der Bedeutung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut und ihrer Eignung als Biomarker beim Krankheitsbild Aortenklappenstenose.

Die *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit weder für die Grunderkrankung HFpEF, noch für die Grunderkrankung Aortenklappenstenose als potentieller prognostischer Biomarker validiert werden. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, kodiert das Gen *ATP2A2* für die SERCA2, ein Ca^{2+}-transportierendes Protein (Vangheluwe et al. 2005). Die SERCA2a gilt als die prädominante Isoform der SERCA2 in der Herzmuskulatur (Moorman et al. 1995) und spielt eine wichtige Rolle in der Calciumhomöostase und dem Kontraktionszyklus des Herzens (Zhihao et al. 2020). Für das Gen *ATP2A2* wird eine epigenetische Regulierbarkeit so beschrieben, dass eine aberrante Promotormethylierung zu einer verminderten Expression des Gens führt (Kao et al. 2010; Kao et al. 2011). Eine verminderte Expression des Gens *ATP2A2* und seiner Genprodukte kann mit dem Krankheitsbild Herzinsuffizienz assoziiert werden (Hasenfuss et al. 1994; Mercadier et al. 1990; Meyer et al. 1995; Studer et al. 1994; Takahashi et al. 1992). Eine verminderte Expression des Gens *ATP2A2* lässt sich zudem in einen Zusammenhang mit der Herzfibrose bringen (Xiong et al. 2022). Darüber hinaus konnte eine im Rahmen der Herzinsuffizienz auftretende Dysregulation der SERCA2a mit der pathologischen Fibrogenese im Herzen assoziiert werden (Katz et al. 2016). Wie in Kapitel 1.2 ausführlich besprochen, spielt die Herzfibrose bei den beiden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten kardialen Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose pathomechanistisch eine wichtige Rolle und zeigt zudem eine prognostische Relevanz. Eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Gosch (2020) ergab eine signifikante Korrelation der *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut mit dem anhand von MRT-Daten errechneten Grad der Herzfibrose bei Patienten mit HOCM und einer LVEF ≥ 55%. Eine höhere *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut ging mit einem höheren Grad der Herzfibrose einher (Gosch 2020). Im Rahmen einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) ergaben sich Hinweise auf die Eignung der Promotormethylierung des Gens *ATP2A2* im Blut als prognostischen Biomarker für die Erkrankung HFpEF. Eine höhere Promotormethylierung des Gens im Blut war uni- und multivariant signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert (Awe 2020). Wie in Kapitel 4.4 ausführlich diskutiert, lässt sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass die Messung der *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut der Erhebung anderer klinischer Parameter grundsätzlich überlegen sein könnte. Im Rahmen der Modellübertragung auf die Datensätze der TAVI- und HFpEF-Kohorte dieser Arbeit konnte die Eignung der *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut als prognostischer Biomarker allerdings nicht validiert werden (siehe auch Kapitel 3.4). Als mögliche Gründe für diese abweichenden Ergebnisse hinsichtlich der Eignung der *ATP2A2*-Promotormethylierung als prognostischer Biomarker kommen verschiedene allgemeine Limitationen dieser Arbeit in Frage, auf die in Kapitel 4.10 näher eingegangen wird. Resümierend weisen die beschriebenen Zusammenhänge darauf hin, dass das Gens *ATP2A2* und seine epigenetische Modulierbarkeit in Form der aberranten Promotormethylierung am Herzen eine

Rolle spielt und es lässt sich eine Bedeutung des Gens bei kardialen Erkrankungen vermuten. Eine Eignung der *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut als prognostischer Biomarker für kardiale Erkrankungen erscheint daher grundsätzlich möglich. Insgesamt existiert zu dieser Thematik bisher wenig Literatur, was die Interpretation entsprechend einschränkt. Es bedarf daher weiterer Forschung in Folgestudien.

Die Bedeutung der Gene *B9D1* und *RASAL1* wird in der aktuellen Literatur diskutiert. Zur Funktion des Gens *B9D1* und seiner Bedeutung insbesondere am Herzen und bei kardialen Erkrankungen ist bisher wenig bekannt, wie anhand des in Kapitel 1.4.3 präsentierten aktuellen Wissenstands deutlich wird. Das vom Gen *B9D1* kodierten Protein konnte in der Transitionszone von Zilien nachgewiesen werden (Garcia-Gonzalo et al. 2011). Das Gen *B9D1* zeigt eine Assoziation zu verschiedenen Ziliopathien (Garcia-Gonzalo et al. 2011; Hopp et al. 2011), die im Allgemeinen mit der Entstehung kongenitaler Herzerkrankungen und kardiovaskulärer Anomalien in einen Zusammenhang gebracht werden können (Kennedy et al. 2007; Klena et al. 2017; Li et al. 2015). Im Tiermodell zeigten sich bei einer Mutation des Gens *B9D1* gehäuft Herzfehler (Dowdle et al. 2011). Zudem ergab sich bereits eine Assoziation des Gens *B9D1* zu den kardialen Erkrankungen DCM (Meder et al. 2017) und HFpEF (Awe 2020). Sowohl HFpEF (Kasner et al. 2011) als auch die DCM (Cojan-Minzat et al. 2021) sind grundsätzlich mit der Herzfibrose assoziierte Erkrankungen, sodass sich hier in der Zusammenschau der Literatur eine mögliche Assoziation des Gens *B9D1* zur pathologischen Fibrogenese im Herzen ergibt. Die in Kapitel 1.2 erläuterte pathomechanistische und prognostische Relevanz der Herzfibrose bei den in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose stellt eine Assoziation des Gens *B9D1* zu beiden Grunderkrankungen her. Verschiedene Studien konnten zudem die epigenetische Modifikation des Gens *B9D1* in Form der DNA-Methylierung in einen Zusammenhang mit kardialen Erkrankungen bringen. So fanden Meder et al. (2017) ein verändertes Muster der DNA-Methylierung des Gens *B9D1* bei Patienten mit DCM in Blut und Herzgewebe. Bei Patienten mit HFpEF zeigte die aberrante Promotormethylierung des Gens *B9D1* im Blut eine Assoziation zum Progress der Erkrankung, im Sinne eines kürzeren Überlebens der Patienten (Awe 2020). Eine höhere Promotormethylierung des Gens *B9D1* im Blut korrelierte mit einem kürzeren Überleben der HFpEF-Patienten (Awe 2020). Resümierend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine Funktion des Gens *B9D1* am Herzen in Form einer protektiven Genfunktion hin (siehe auch Kapitel 4.2). Die Funktion des Gens *RASAL1* am Herzen und die Bedeutung des Gens bei kardialen Erkrankungen werden, wie in Kapitel 1.4.1 dargestellt, in der aktuellen Literatur diskutiert. Das vom Gen *RASAL1* kodierte gleichnamige Protein RASAL1 fungiert in Form einer RAS-GTPase als Inhibitor des RAS-Signalweges (Takata et al. 2017; Xu et al. 2015), der verschiedene Zellsignalwege reguliert (Mitin et al. 2005). Für das Gen wird eine epigenetische Regulation so beschrieben, dass eine aberrante Promotormethylierung zu einer verminderten Expression des Gens und in der Folge zur Enthemmung des RAS-Signalweges führt (Bechtel et al. 2010; Xu et al. 2015; Xu et al. 2016). Die aberrante Promotormethylierung von *RASAL1* kann mit der pathologischen Fibrogenese in verschiedenen Organen assoziiert werden (Bechtel et al. 2010; Feng et al. 2024; Tao et al. 2011). Tampe

et al. (2015) gelang es die *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als Biomarker für die Nierenfibrose zu etablieren. Entsprechend dem Prinzip der *Liquid Biopsy* (Schwarzenbach et al. 2011) korrelierte die im peripheren Blut gemessene *RASAL1*-Promotormethylierung mit dem Ausmaß der intrarenalen *RASAL1*-Promotormethylierung sowie dem bioptisch ermittelten Grad der Nierenfibrose (Tampe et al. 2015). Die aberrante Promotormethylierung des Gens *RASAL1* im Herzgewebe konnte in einen kausalen Zusammenhang mit der Herzfibrose und ihrem Progress gebracht werden (Xu et al. 2015; Xu et al. 2016). Aufgrund dieser Assoziation zum Progress der Herzfibrose wird die aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung bereits als prognostischer Biomarker diskutiert (Xu et al. 2015). Eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Gosch (2020) ergab bei Patienten mit HOCM und einer LVEF ≥ 55% eine signifikante Korrelation der *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut mit dem anhand von MRT-Daten errechneten Grad der Herzfibrose. Eine höhere *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut ging mit einem höheren Grad der Herzfibrose einher (Gosch 2020). Da die Herzfibrose bei den zwei in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten kardialen Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose, wie in Kapitel 1.2 dargestellt, pathomechanistisch eine wichtige Rolle spielt und zudem eine prognostische Relevanz zeigt, ergibt sich anhand der dargestellten Literatur eine Assoziation des Gens *RASAL1* zu den beiden Grunderkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose. Bei Patienten mit HFpEF konnte für die aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut eine Assoziation zum Progress der Erkrankung, im Sinne eines kürzeren Überlebens der Patienten, gezeigt werden (Awe 2020). Eine höhere Promotormethylierung des Gens *RASAL1* im Blut korrelierte mit einem kürzeren Überleben der HFpEF-Patienten (Awe 2020). Resümierend verdichten sich anhand der dargestellten Zusammenhänge die Hinweise auf eine Bedeutung der Gene *B9D1* und *RASAL1* am Herzen und bei kardialen Erkrankungen sowie eine potentielle prognostische Relevanz der Gene. Eine genaue Definition dieser potentiellen prognostischen Relevanz, insbesondere der Rolle der aberranten Promotormethylierung dabei, ist anhand der bisherigen Forschungsergebnisse noch nicht möglich. Hier setzten die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an.

Wie in Kapitel 4.8 diskutiert, liefert die vorliegende Arbeit am Datensatz der HFpEF-Kohorte Hinweise auf die Eignung der Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostische Biomarker für die Erkrankung HFpEF. Darüber hinaus weisen die in Kapitel 4.4 diskutierten Ergebnisse auf eine potentielle Überlegenheit der Messung der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als Biomarker gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter hin. Die insgesamt ausbleibende Korrelation zwischen der Promotormethylierung der drei Gene im Blut und anderen klinischen Parametern kann hier als Zeichen der Spezifität und Unabhängigkeit und damit des Mehrwertes des Biomarkers Promotormethylierung hinsichtlich prognostischer Vorhersagen interpretiert werden. Einzig der Parameter BNP zeigte eine signifikante positive lineare Korrelation mit der *B9D1*-Promotormethylierung in der HFpEF-Kohorte (Abbildung 6). Dies kann einerseits als Hinweis darauf verstanden werden, dass die *B9D1*-Promotormethylierung dem bereits etablierten Biomarker BNP möglicherweise nicht überlegen ist. Andererseits weist BNP als Biomarker und insbesondere bei Patienten mit HFpEF Schwächen in der klinischen Anwendung auf, die in Kapitel 4.3

bereits näher erläutert wurden. Beispielsweise können Patienten mit HFpEF BNP-Werte unterhalb der diagnostischen Schwellenwerte aufweisen, was die diagnostische Anwendbarkeit von BNP bei diesen Patienten entsprechend einschränkt (Anjan et al. 2012; McDonagh et al. 2021; Pieske et al. 2019). Es lässt sich daher vermuten, dass die gefundene Korrelation der *B9D1*-Promotormethylierung und BNP im Blut, hinsichtlich eines potentiellen allgemeinen Mehrwertes der Messung der *B9D1*-Promotormethylierung gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter, keine Einschränkung darstellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darüber hinaus eine Überlegenheit des Gens *B9D1* hinsichtlich prognostischer Vorhersagen gegenüber dem Gen *RASAL1* vermuten. Im Rahmen der Modellübertragung auf die HFpEF-Subkohorte nach *Propensity Score Matching* in Kapitel 3.4.2.4 führte die Risikogruppenzuteilung durch die Modellübertragung mit *B9D1*-Promotormethylierung zu einem signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben der durch das Modell als Hochrisiko und Nicht-Hochrisiko klassifizierten Patienten (Abbildung 26). Die Hochrisikopatienten zeigten eine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Nicht-Hochrisikopatienten. Die Modellübertragung mit *RASAL1*-Promotormethylierung ergab anhand der Risikogruppenzuteilung einen statistischen Trend zur niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe der als Hochrisiko klassifizierten Patienten, wobei dies ohne statistische Signifikanz blieb (Abbildung 26). In der Arbeit von Awe (2020) zeigte sich dagegen die *RASAL1*-Promotormethylierung der *B9D1*-Promotormethylierung hinsichtlich prognostischer Vorhersagen in einem multivarianten Modell überlegen, wohingegen die beiden Gene in der univarianten Betrachtung gleichermaßen signifikante Ergebnisse hinsichtlich einer Korrelation mit dem Überleben erbrachten. Dieser potentielle Unterschied in der Relevanz der zwei Gene hinsichtlich prognostischer Vorhersagen lässt sich mithilfe des aktuellen Wissens zu den zwei Genen nicht erklären und gibt Anlass zu weiterer Forschung in Folgestudien.

Resümierend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Hinweise auf die Eignung der Erhebung der Promotormethylierung der zwei Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut als potentieller prognostischer Biomarker für HFpEF gefunden werden (siehe auch Kapitel 4.8). Hinweise auf die Eignung der Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostische Biomarker für die Erkrankung HFpEF ergab bereits eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020). Eine höhere *B9D1*-Promotormethylierung im Blut war univariant und eine höhere *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut war uni- und multivariant signifikant mit einer schlechteren Prognose, im Sinne eines kürzeren Überlebens, der HFpEF-Patienten assoziiert (Awe 2020). Zudem zeigte sich die *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut gegenüber bereits etablierten Biomarkern der Herzinsuffizienz, wie BNP und NT-proBNP, überlegen (Awe 2020). Die präsentierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen damit die potentielle Eignung der Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als neue prognostische Biomarker für kardiale Erkrankungen mit pathomechanistischer Gemeinsamkeit der Herzfibrose.

4.10 Limitationen

Für die Ergebnisse dieser Arbeit bestehen verschiedene allgemeine Limitationen.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten lag ein hoher Anteil an Komorbiditäten vor (siehe auch Kapitel 3.2). Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass dies zur Beeinflussung der Ergebnisse geführt haben könnte. Sowohl Patienten mit HFpEF (Anjan et al. 2012; Dunlay et al. 2017; Shah und Gheorghiade 2008) als auch Patienten mit Aortenklappenstenose (Faggiano et al. 2012; Playford et al. 2023) weisen jedoch typischerweise eine hohe Anzahl an Komorbiditäten auf. Dies entkräftigt die Hypothese der allgemeinen Einschränkung der Ergebnisse, da ein hoher Anteil an Komorbiditäten zum typischen Erscheinungsbild der zwei untersuchten Krankheitsbilder gehört. Die Rolle einzelner Komorbiditäten gilt es in Folgestudien zu analysieren, da dies nicht Teil der vorliegenden Arbeit war.

Eine weitere zu diskutierende potentielle Limitation der vorliegenden Arbeit betrifft die Zusammensetzung der untersuchten Kohorten. Die Kohorten waren mit jeweils weniger als 60 Patienten klein und Überlebensdaten lagen nur für einen kurzen Betrachtungszeitraum nach Studieneintritt, von ca. fünf Jahren für die HFpEF- und TAVI-Kohorte und elf Jahren für die DIAST-Kohorte, vor (siehe auch Kapitel 2.2.1 bis Kapitel 2.2.3). Dies schränkte die statistische Aussagekraft der durchgeführten Untersuchungen insgesamt ein. Diese Struktur der Kohorten war der Notwendigkeit zur Datenerhebung in einem angemessenen Zeitraum geschuldet.

Da in dieser Arbeit Kohorten mit einer spezifischen Grunderkrankung untersucht wurden, wird die Übertragung der Ergebnisse auf die Gesamtpopulation entsprechend eingeschränkt. Die Ergebnisse der HFpEF-Kohorte sollten primär nur auf Patienten mit der Grunderkrankung HFpEF übertragen werden, Ergebnisse aus der TAVI-Kohorte primär nur auf Patienten mit Aortenklappenstenose. Eine Prüfung der Anwendbarkeit der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostischer Biomarker für die Allgemeinbevölkerung war nicht Gegenstand dieser Arbeit und könnte in Folgestudien untersucht werden.

Die Datenerhebung im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschränkte sich auf bereits vorhandene Daten, was eine weitere potentielle Limitation darstellt. Es wurden keine klinischen Daten nachträglich erhoben oder erfragt, sodass vorhandene Fehlwerte den Datensatz entsprechend schmälerten. Darüber hinaus unterliegen u. a. die per Echokardiographie erhobenen Parameter potentiellen Schwankungen, da die Untersuchung von unterschiedlichen Ärzten durchgeführt wurde und die Technik als sehr untersucherabhängig gilt (Hoffmann 2004).

Eine weitere potentielle Limitation dieser Arbeit, hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu der Erkrankung HFpEF, betrifft die Einschlusskriterien der Patienten der HFpEF-Kohorte. Für die Auswahl wurde nicht die bereits bestehende Diagnose HFpEF vorausgesetzt, sondern es wurden die echokardiographischen Einschlusskriterien LVEF ≥ 45% und E/e' mittel ≥ 12 gewählt. Dies erfolgte in Anlehnung an eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020), für die diese

echokardiographischen Kriterien anhand der ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz von Ponikowski et al. (2016) gewählt und für eine ausreichende Patientenanzahl bei vorbestehendem Datensatz entsprechend angepasst wurden. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und in einem angemessenen Zeitraum eine ausreichende Patientenanzahl zu rekrutieren, wurden daher für die vorliegende Arbeit die gleichen echokardiographischen Einschlusskriterien gewählt (siehe auch Kapitel 2.2.1). In der ESC-Leitlinie zur Herzinsuffizienz aus dem Jahr 2021 wird als Grenzwert für die Diagnosestellung einer HFpEF eine LVEF ≥ 50% empfohlen, wobei die Festlegung dieses Grenzwertes inmitten einer Diskussion steht (McDonagh et al. 2021). So werden in klinischen Studien unterschiedliche Grenzwerte für die LVEF beim Krankheitsbild HFpEF gewählt (Kelly et al. 2015; Lam et al. 2011; McDonagh et al. 2021). Resümierend bedarf es weitere Forschung, um einen optimalen Grenzwert der LVEF für die Diagnose einer HFpEF zu finden und damit zugleich eine optimale Vergleichbarkeit verschiedener Studien zu gewährleisten.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit stellt die unzureichende Datenlage zur Organspezifität der untersuchten potentiellen Biomarker *ATP2A2*-, *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut dar. Wie dargestellt, ergeben sich anhand der aktuellen Studienlage starke Hinweise auf eine Assoziation dieser Biomarker zum Herzen und zu kardialen Erkrankungen mit pathomechanistischer Gemeinsamkeit der Herzfibrose. Hinsichtlich der Spezifität der potentiellen Biomarker für das Herz und die untersuchten Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose im Vergleich zu anderen Organerkrankungen ist bisher aber wenig bekannt. Beispielsweise wird für die aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung neben einer Assoziation zur Herzfibrose (Xu et al. 2015; Xu et al. 2016) auch eine Assoziation zur pathologischen Fibrogenese in der Niere (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2015) oder in der Leber (Tao et al. 2011) beschrieben. So konnte für die aberrante *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut eine Korrelation mit der Nierenfibrose nachgewiesen werden (Tampe et al. 2015). Eine weitere Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg konnte eine signifikante Erhöhung der *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion nachweisen (Eller 2023). In der vorliegenden Arbeit ergab sich dagegen, wie schon in der Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020), keine signifikante Korrelation der Promotormethylierung der drei Gene im Blut mit Parametern der Nierenfunktion (siehe auch Kapitel 3.3). Das Ziel von Folgestudien sollte es sein, den Einfluss spezifischer Organerkrankungen auf die Höhe der Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut zu evaluieren. Nur wenn Zusammenhänge der Biomarker mit anderen Organerkrankungen klar interpretierbar werden, kann eine sinnvolle Etablierung der neuen potentiellen Biomarker im klinischen Alltag gelingen.

Auch die Auswahl des Ausgangsmaterials für die Messung der Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut muss als potentielle Limitation dieser Arbeit diskutiert werden. In der HFpEF-Kohorte wurde als Ausgangsmaterial aus Vollblut separiertes Lymphozytenisolat genutzt. In der TAVI-Kohorte wurde aus Vollblut separierter *Buffy Coat* verwendet. In der DIAST-Kohorte stellte Vollblut das Ausgangsmaterial dar (siehe auch Kapitel 2.3.1). Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Messung

in verschiedenen Ausgangsmaterialien zu unterschiedlichen Messwerten der Promotormethylierung führen könnte. Die Nutzung unterschiedlicher Ausgangsmaterialien könnte damit im Allgemeinen zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen. In der vorliegenden Arbeit könnte dies u. a. auch zur eingeschränkten Übertragbarkeit der vier Cox-Regressionen auf die neuen Kohorten in Kapitel 3.4 beigetragen haben. Neben dieser potentiellen Einschränkung der internen Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit sollte auch die potentielle Einschränkung der Vergleichbarkeit mit anderen Studien bedacht werden. So erfolgte die Messung der DNA-Methylierung in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) und Gosch (2020) in Vollblut, in der Arbeit von Kanwischer et al. (2023) in aus Vollblut separiertem *Buffy Coat* und in der Arbeit von Eller (2023) in aus Vollblut separiertem Lymphozytenisolat. Auch in einigen externen Arbeiten wurde als Ausgangsmaterial Vollblut gewählt (Breitling et al. 2012; Meder et al. 2017), andere Arbeiten wählten dagegen periphere mononukleäre Blutzellen als Ausgangsmaterial für die Messung der DNA-Methylierung (Nasu et al. 2020; Schiano et al. 2020). Die Untersuchung der potentiellen Auswirkungen unterschiedlicher Ausgangsmaterialien auf die Messung der DNA-Methylierung spezifischer Gene im Blut war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und sollte in Folgestudien näher untersucht werden.

Die bis hierhin diskutierten allgemeinen Limitationen der vorliegenden Arbeit gelten auch für die Modellberechnungen in Kapitel 3.4. Darüber hinaus unterliegen die Modellberechnungen weiteren spezifischen Limitationen, die potentielle Erklärungen für die beobachtete eingeschränkte Übertragbarkeit der Modelle liefern. Die HFpEF- und TAVI-Kohorte waren kleine Kohorten, die aus jeweils weniger als 60 Patienten bestanden, und Überlebensdaten lagen nur für einen kurzen Zeitraum, von der HFpEF- und TAVI-Kohorte für ca. fünf Jahre und von der DIAST-Kohorte für elf Jahre nach Studieneintritt, vor (Abbildung 7). Größere Kohorten und ein längerer Beobachtungszeitraum mit einer höheren Anzahl an Events, Events im Sinne von Versterben im Rahmen der Betrachtung der Mortalität, könnten in Folgestudien zu einer besseren Überprüfbarkeit der an der DIAST-Kohorte modellierten Überlebensmodelle führen. Darüber hinaus waren die Überlebensmodelle nur auf Daten zum Gesamtüberleben trainiert, da für die DIAST-Kohorte keine Daten zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben vorlagen. Dies schränkt die Aussagen zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben bei den Modellübertragungen auf die TAVI-Kohorte entsprechend ein. Eine neue Modellierung von Überlebensmodellen anhand vorliegender Daten zum kardiovaskulär-spezifischen Überleben sollte in Folgestudien an neuen Kohorten evaluiert werden. Im Rahmen der Modellberechnungen wurden der *Cut-off* für die Risikogruppenzuteilung und das *Baseline*-Hazard aus der DIAST-Kohorte auf die zwei neuen Kohorten übertragen, was die Aussagefähigkeit der Modelle insgesamt einschränkte. Darüber hinaus ist auch eine allgemein fehlende Übertragbarkeit der Modelle auf andere Kohorten denkbar. Die DIAST-Kohorte war klein und es lagen Überlebensdaten nur für einen kurzen Zeitraum vor (siehe auch Kapitel 3.4). Daher könnten die Modelle an die Daten der DIAST-Kohorte überangepasst sein, sodass sie außerhalb des Trainingsdatenbereiches nicht sinnvoll prädizieren können. Hierfür spricht, dass es nur nach Anpassung der Vergleichbarkeit der Kohorten durch ein *Propensity Score Matching* im Rahmen der Modellübertragung auf die HFpEF-Subkohorte nach *Matching* zu sinnvollen Ergebnissen kam.

Außerdem erfolgte die Auswahl der Modellparameter datengetrieben an der DIAST-Kohorte, wodurch es zur Überschätzung der Effekte in der ursprünglichen Modellierung gekommen sein könnte. In drei der vier Modelle ging die im Blut gemessene Promotormethylierung jeweils eines der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* bzw. *RASAL1* ein. Als Limitation der vorliegenden Arbeit muss genannt werden, dass die Promotormethylierung der drei Gene im Blut in Anlehnung an die Ergebnisse einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) nur im multivarianten Modell betrachtet wurde. Eine Betrachtung der univarianten Korrelation der Promotormethylierung der drei Gene im Blut mit dem Überleben war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Dies sollte in Folgestudien näher untersucht werden.

4.11 Klinische Implikationen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Biomarker für prognostische Vorhersagen der beiden Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose zu finden. Sowohl Patienten mit HFpEF (Lee et al. 2009; Tribouilloy et al. 2008) als auch Patienten mit Aortenklappenstenose (Frank et al. 1973; Leon et al. 2010) zeichnen sich im Allgemeinen durch eine hohe Mortalität und eine schlechte Prognose aus. Herz-Kreislauf-Erkrankungen gelten als die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2023a) und weisen zudem eine volkswirtschaftliche Relevanz auf, da krankheitsassoziierte Kosten in Milliardenhöhe entstehen (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017). Die Prävalenz der Erkrankungen HFpEF (Tribouilloy et al. 2008; Upadhya et al. 2017) und Aortenklappenstenose (Nkomo et al. 2006) zeigt eine Abhängigkeit vom Alter in Form einer steigenden Prävalenz mit zunehmendem Alter, sodass insbesondere ältere Menschen betroffen sind. Vor dem Hintergrund einer weltweit alternden Gesellschaft (WHO 2024) wird die globale Relevanz von HFpEF (Cook et al. 2014; Heidenreich et al. 2013; Kapelios et al. 2023; Liao et al. 2006) und der Aortenklappenstenose (Stewart et al. 2022; van Bakel et al. 2022; Yadgir et al. 2020) in Zukunft voraussichtlich zunehmen.

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mithilfe neuer Biomarker eine Identifizierung von Hochrisikopatienten und eine Prognostizierung des individuellen Krankheitsprogresses zu ermöglichen, um damit in Zukunft die bisher allgemein schlechte Prognose dieser Patienten verbessern zu können. Hierfür wurde die Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als potentieller prognostischer Biomarker ausführlich in Zusammenschau mit verschiedenen klinischen Parametern analysiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten zum einen auf die Überlegenheit der Messung der aberranten Promotormethylierung der drei Gene im Blut gegenüber der Erhebung anderer klinischer Parameter hin (siehe auch Kapitel 4.4). Zum anderen ergaben sich für das Krankheitsbild HFpEF Hinweise auf die Eignung der *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als prognostischer Biomarker (siehe auch Kapitel 4.8). Für das Gen *ATP2A2* und das Krankheitsbild Aortenklappenstenose gelang dagegen kein solcher Nachweis (siehe auch Kapitel 4.9). Wie in Kapitel 1.2 erläutert, hat die Herzfibrose bei den untersuchten Krankheitsbildern HFpEF und Aortenklappenstenose neben einer pathomechanistischen Bedeutung auch eine prognostische Relevanz.

Entsprechend dem Prinzip der *Liquid Biopsy* (Schwarzenbach et al. 2011) lassen Vorarbeiten eine Assoziation der im Blut messbaren aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene mit der im Herzgewebe messbaren Promotormethylierung dieser Gene (Meder et al. 2017) bzw. mit dem Ausmaß der Herzfibrose (Gosch 2020) zu (siehe auch Kapitel 1.5). Zudem gelang der Nachweis eines kausalen Einflusses der aberranten Promotormethylierung des Gens *RASAL1* auf den Progress der Herzfibrose (Xu et al. 2015; Xu et al. 2016). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg erbrachten Hinweise auf die potentielle Eignung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als prognostischen Biomarker für die Erkrankungen HFpEF (Awe 2020) und Aortenklappenstenose (Kanwischer et al. 2023). Aufgrund eines Mangels an Myokardbiopsien diente in der vorliegenden Arbeit die Mortalität als Korrelat für Herzfibrose und den Erkrankungsprogress. Dieses Vorgehen wurde auch bereits in der Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg von Awe (2020) gewählt.

Aufgrund der beschriebenen kausalen Assoziation der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene zum Progress der pathologischen Fibrogenese im Herzen, können sich aus dem Verständnis der zugrundeliegenden epigenetischen Mechanismen nicht nur die bisher erläuterten diagnostischen Aspekte, sondern auch therapeutische Optionen ergeben (Grimaldi et al. 2017; Neary et al. 2015; Xu et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2013). Ein solches Therapieziel wird durch die potentielle Reversibilität epigenetischer Veränderungen möglich (Gošev et al. 2017). In der aktuellen Literatur werden verschiedene potentielle epigenetische Therapeutika diskutiert, die in Zukunft für die Therapie der Herzfibrose etabliert werden könnten.

Der Wachstumsfaktor *bone morphogenetic protein 7* (BMP7) gehört zur TGF-β Superfamilie (Aluganti Narasimhulu und Singla 2020) und wird als ein potentielles antifibrotisches Therapeutikum diskutiert. Xu et al. (2015) konnten in ihrer Arbeit eine kausale Verbindung einer aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung zum Fortschreiten der Herzfibrose herstellen. Im Mausmodell führte die Applikation von BMP7 zu einer Abnahme der *RASAL1*-Promotormethylierung, zu einer Zunahme der *RASAL1*-Genexpression sowie zu einer Abnahme der kardialen Fibrose (Xu et al. 2015). Auch in vitro gelang den Autoren an humanen Koronararterienendothelzellen die Assoziation der Applikation von BMP7 zu einer verringerten *RASAL1*-Promotormethylierung und einer verstärkten *RASAL1*-Genexpression (Xu et al. 2015). Als zugrundeliegenden Mechanismus dieser transkriptionellen Reaktivierung von *RASAL1* beschreiben die Autoren die durch BMP7 induzierte Demethylierung des *RASAL1*-Promotors durch die Aktivität von Enzymen der t*en eleven translocation*(TET)-Familie, insbesondere von TET3 (Xu et al. 2015). Hierbei kommt es zu einer TET3-vermittelten Hydroxymethylierung der methylierten Cytosinmoleküle in der Promotorregion des Gens (Xu et al. 2015). DNA-Reparaturmechanismen können anschließend diese hydroxymethylierten Cytosinmoleküle durch unveränderte Cytosin-Moleküle ersetzten (Zeisberg und Zeisberg 2013).

Als weiteres potentielles epigenetisches Therapeutikum der Herzfibrose wird das Medikament Hydralazin diskutiert (Kao et al. 2011; Zeisberg und Zeisberg 2016). Kao et al. (2011) konnten an murinen Kardiomyozyten eine demethylierende Wirkung von Hydralazin auf die Promotoren des

SERCA2a kodierenden Gens nachweisen, was mit einer erhöhten mRNA- und Proteinexpression der SERCA2a einherging. An einem Herzinsuffizienzmodell an Ratten führte die Behandlung mit Hydralazin zu einer Reduzierung der Promotormethylierung des SERCA2a kodierenden Gens und zu einer Erhöhung der Expression der SERCA2a-mRNA im Herzen (Kao et al. 2011). Das Gen *ATP2A2* kodiert u. a. für die SERCA2a (Vangheluwe et al. 2005). Eine Minderexpression bzw. Fehlfunktion der Genprodukte von *ATP2A2* und eine daraus resultierende Störung der Calciumhomöostase konnte bereits von verschiedenen Autoren mit der Herzfibrose assoziiert werden (Huang et al. 2022; Katz et al. 2016; Xiong et al. 2022). Die Hydralazin-induzierte Promotordemethylierung könnte zu einer Verbesserung der Herzfunktion führen, da die steigende SERCA2a-Expression eine Modulierung der Calciumhomöstase in Kardiomyozyten bewirkt (Kao et al. 2011).

Verschiedene Studien diskutieren zudem eine antifibrotische Wirkung des Medikamentes 5-Azacytidin am Herzen als epigenetische Therapieoption für die Herzfibrose (Kim et al. 2014; Watson et al. 2014; Watson et al. 2016; Xu et al. 2015). Xu et al. (2015) beschreiben in vitro an einer immortalisierten Zelllinie humaner Koronararterienepithelzellen eine Demethylierung des *RASAL1*-Promotors mit Normalisierung der *RASAL1*-Expression und verminderter EndMT durch Applikation von 5-Azacytidin. Die EndMT trägt im Herzen zur pathologischen Fibrogenese bei (Zeisberg et al. 2007). Watson et al. (2016) gelang es, in ihren Versuchen an menschlichen Fibroblasten in vitro sowie im Tiermodell positive Effekte einer Therapie mit 5-Azacytidin auf die pathologische Fibrose im Herzen nachzuweisen. Auch in der Arbeit von Watson et al. (2014) zeigte sich ein antifibrotisches therapeutisches Potential von 5-Azacytidin auf die Herzfibrose. Kim et al. (2014) demonstrierten im Tiermodell einen antifibrotischen Effekt von 5-Azacytidin am Herzen.

Eine Etablierung derartiger epigenetischer Therapeutika der Herzfibrose im klinischen Alltag gelang bisher nicht und es bedarf daher weiterer Forschung zu diesem Thema.

Anhand der dargestellten Erkenntnisse der aktuellen Literatur und den Ergebnissen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergeben sich Hinweise auf eine prognostische Relevanz der aberranten Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* bei kardialen Erkrankungen, die sich die pathomechanistische Gemeinsamkeit der Herzfibrose teilen. Damit ergibt sich zugleich, anhand des beschriebenen Prinzips der *Liquid Biopsy,* eine potentielle Eignung der aberranten Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostische Biomarker für diese Art von Erkrankungen. Zur spezifischen Eignung der *B9D1*-und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut als prognostische Biomarker kardialer Erkrankungen gibt es neben den Ergebnissen der Arbeit von Awe (2020) und der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt der Literaturrecherche keine weitere wegweisende Literatur. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterliegen verschiedenen Limitationen, die in Kapitel 4.10 erläutert wurden. Zudem finden sich in der aktuellen Literatur auch Studien, in denen die Messung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Genloci im Blut als prädiktiver Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen in Frage gestellt wird (Fernández-Sanlés et al. 2021). Dies gibt Anlass für weitere Forschung zu diesem Thema.

Resümierend weist die vorliegende Arbeit darauf hin, dass sich die Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als prognostischer Biomarker eignen könnte. Im Speziellen zeigte sich dies für das Krankheitsbild HFpEF und die im Blut gemessene Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1*. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eröffnet sich damit ein potentieller Weg zur Senkung der hohen Mortalität dieser Patienten durch die klinische Anwendung dieser Biomarker in der Zukunft. Ob sich die Messung der Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut im Allgemeinen als prognostischer Biomarker für Patienten mit Herzerkrankungen eignet, die sich die pathomechanistische Gemeinsamkeit der Herzfibrose teilen, konnte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Insbesondere die genaue Bedeutung der unterschiedlichen Gene als Progressionsmarker und die Anwendung der Biomarker bei Patienten mit anderer Grunderkrankung als HFpEF bedürfen einer weiteren Klärung. Hierzu kann die Untersuchung größerer Kohorten und die Betrachtung verschiedener Grunderkrankungen in Folgestudien in Zukunft hilfreich sein.

5 Zusammenfassung

Sowohl Patienten mit HFpEF als auch Patienten mit Aortenklappenstenose weisen im Allgemeinen eine hohe Mortalität und schlechte Prognose auf. Mit den aktuell zur Verfügung stehenden klinisch etablierten Biomarkern gelingt keine ausreichende Identifikation von Hochrisikopatienten und keine ausreichende Prognostizierung des individuellen Krankheitsprogresses, sodass für beide Erkrankungen weiterhin eine schlechte Prognose besteht. Die Prävalenz der Erkrankungen HFpEF und Aortenklappenstenose zeigt eine altersabhängige Verschiebung, im Sinne einer hohen Prävalenz insbesondere bei älteren Patienten, sodass die Relevanz der Erkrankungen in der weltweit alternden Gesellschaft voraussichtlich zunehmen wird. Beide Erkrankungen teilen sich die pathomechanistische Bedeutung der Herzfibrose, die zudem eine prognostische Relevanz zeigt. Die DNA-Methylierung gilt als einer der Hauptmechanismen der epigenetischen Modifikation menschlicher DNA. Die aberrante Promotormethylierung spezifischer Gene zeigt einen kausalen Einfluss auf die pathologische Fibrogenese im Herzen. In Vorarbeiten ergab sich, entsprechend des Prinzips der *Liquid Biopsy,* eine Korrelation der im Blut gemessenen aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene mit der im Herzgewebe gemessenen Promotormethylierung dieser Gene. Anhand des Prinzips der *Liquid Biopsy* ergeben sich damit Hinweise auf die Eignung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als Biomarker für kardiale Erkrankung mit pathomechanistischer Gemeinsamkeit der Herzfibrose. Aufgrund eines Mangels an Myokardbiopsien diente in der vorliegenden Arbeit die Mortalität als Korrelat für Herzfibrose und den Erkrankungsprogress. Eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg ergab bereits Hinweise auf die Eignung der im Blut gemessenen aberranten Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* als prognostische Biomarker für Patienten mit der Erkrankung HFpEF. Auch für das Krankheitsbild Aortenklappenstenose konnte eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe Zeisberg Hinweise auf die Eignung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut als prognostischen Biomarker finden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand des Prinzips der *Liquid Biopsy* zu untersuchen, ob sich die aberrante Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als Biomarker für die klinische Progression und zur Risikostratifizierung von Patienten mit HFpEF bzw. Aortenklappenstenose eignet, die sich die pathomechanistische Gemeinsamkeit der Herzfibrose teilen. Zudem sollte überprüft werden, ob die Messung der aberranten Promotormethylierung der drei Gene im Blut Vorteile gegenüber der Erfassung anderer klinischer Parameter bietet.

Es wurden Blutproben und verschiedene klinische Parameter von Patienten aus drei Kohorten analysiert. Die DIAST- und HFpEF-Kohorte dienten der Betrachtung der Grunderkrankung HFpEF. Die TAVI-Kohorte diente der Betrachtung der Grunderkrankung Aortenklappenstenose. Zur Messung der aberranten Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* wurde die DNA zunächst aus Blutproben isoliert und aufgereinigt. Die methylierte DNA konnte anschließend antikörpervermittelt per MeDIP separiert werden. Der Anteil der Promotormethylierung der drei Gene wurde daraufhin per qRT-PCR ermittelt.

Nach einer allgemeinen Charakterisierung der untersuchten Kohorten folgte zunächst die Untersuchung von Zusammenhängen der Promotormethylierung der drei Gene im Blut mit klinischen Parametern. Einzig die Promotormethylierung des Gens *B9D1* korrelierte hierbei signifikant mit dem bereits etablierten kardialen Biomarker BNP. Eine höhere *B9D1*-Promotormethylierung im Blut ging mit höheren Werten von BNP im Blut einher. Dieses Ergebnis kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass das Gen *B9D1* eine Rolle am Herzen spielt und die aberrante *B9D1*-Promotormethylierung wie BNP eine kardiale Pathologie widerspiegelt. Höhere Werte von BNP im Blut gehen im Allgemeinen mit einer verstärkten kardialen Pathologie einher. Eine aberrante Promotormethylierung führt in der Regel zu einer verminderten Genexpression. In Zusammenschau lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit daher eine protektive Genfunktion des Gens *B9D1* am Herzen vermuten, die im Rahmen kardialer Pathologien durch eine aberrante Promotormethylierung des Gens *B9D1* verloren geht. Für alle weiteren klinischen Parameter ergab sich keine signifikante Korrelation mit der Promotormethylierung der drei untersuchten Gene im Blut. Diese insgesamt fehlende Korrelation kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass die Messung der Promotormethylierung im Blut der Erfassung anderer klinischer Parameter, einschließlich bereits etablierter Biomarker, überlegen ist und einen Mehrwert bieten kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Möglichkeit zur Nutzung der aberranten Promotormethylierung der drei Gene *ATP2A2*, *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostischer Biomarker für die Krankheitsbilder HFpEF und Aortenklappenstenose evaluiert. In Überlebensmodellen an der DIAST-Kohorte zeigte die aberrante Promotormethylierung der drei Gene im Blut einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten mit der Grunderkrankung HFpEF. Diese Überlebensmodelle wurden in Form von Cox-Regressionen auf die HFpEF- und TAVI-Kohorte übertragen. Die *ATP2A2*-Promotormethylierung im Blut konnte für beide Krankheitsbilder nicht als prognostischer Biomarker validiert werden. Am Datensatz der TAVI-Kohorte zur Untersuchung des Krankheitsbildes Aortenklappenstenose gelang ebenfalls keine Validierung der Promotormethylierung der drei Gene im Blut als prognostischer Biomarker. Am Datensatz der HFpEF-Kohorte ergaben sich dagegen Hinweise auf die Eignung der Promotormethylierung der Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut als prognostische Biomarker für Patienten mit der Grunderkrankung HFpEF. Die im ersten Teil der Arbeit herausgestellte fehlende Korrelation der aberranten Promotormethylierung der drei Gene im Blut mit klinischen Parametern kann in Zusammenschau mit den Ergebnissen des zweiten Teils dieser Arbeit als Zeichen der Spezifität und Unabhängigkeit und damit des Mehrwertes der neuen potentiellen prognostischen Biomarker *B9D1*- und *RASAL1*-Promotormethylierung im Blut interpretiert werden.

Resümierend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Promotormethylierung der zwei Gene *B9D1* und *RASAL1* im Blut als potentieller prognostischer Biomarker für die Erkrankung HFpEF bestätigt und der Mehrwert hinsichtlich der Erhebung anderer klinischer Parameter herausgestellt werden. Es ergeben sich damit anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise auf die Eignung der aberranten Promotormethylierung spezifischer Gene im Blut für kardiale Erkrankungen, die sich die pathomechanistische Gemeinsamkeit der Herzfibrose teilen. Hier müssen sich Folgestudien anschließen.

6 Literaturverzeichnis

Abdulrahim JW, Kwee LC, Grass E, Siegler IC, Williams R, Karra R, Kraus WE, Gregory SG, Shah SH (2019): Epigenome-Wide Association Study for All-Cause Mortality in a Cardiovascular Cohort Identifies Differential Methylation in Castor Zinc Finger 1 (*CASZ1*). J Am Heart Assoc 8, e013228

Aluganti Narasimhulu C, Singla DK (2020): The Role of Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7) in Inflammation in Heart Diseases. Cells 9, 280

Anand IS, Fisher LD, Chiang Y-T, Latini R, Masson S, Maggioni AP, Glazer RD, Tognoni G, Cohn JN (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

Anand IS, Rector TS, Cleland JG, Kuskowski M, McKelvie RS, Persson H, McMurray JJ, Zile MR, Komajda M, Massie BM et al. (2011): Prognostic value of baseline plasma amino-terminal pro-brain natriuretic peptide and its interactions with irbesartan treatment effects in patients with heart failure and preserved ejection fraction: findings from the I-PRESERVE trial. Circ Heart Fail 4, 569–577

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

Anjan VY, Loftus TM, Burke MA, Akhter N, Fonarow GC, Gheorghiade M, Shah SJ (2012): Prevalence, clinical phenotype, and outcomes associated with normal B-type natriuretic peptide levels in heart failure with preserved ejection fraction. Am J Cardiol 110, 870–876

Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, Brunner-La Rocca H-P, Choi D-J, Chopra V, Chuquiure-Valenzuela E et al. (2021): Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. N Engl J Med 385, 1451–1461

Awe M: Etablierung von zirkulierenden DNA-Fragmenten als Biomarker für die klinische Progression einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Med. Diss. Göttingen 2020

Azevedo CF, Nigri M, Higuchi ML, Pomerantzeff PM, Spina GS, Sampaio RO, Tarasoutchi F, Grinberg M, Rochitte CE (2010): Prognostic significance of myocardial fibrosis quantification by histopathology and magnetic resonance imaging in patients with severe aortic valve disease. J Am Coll Cardiol 56, 278–287

Bach DS, Siao D, Girard SE, Duvernoy C, McCallister BD, Gualano SK (2009): Evaluation of patients with severe symptomatic aortic stenosis who do not undergo aortic valve replacement: the potential role of subjectively overestimated operative risk. Circ Cardiovasc Qual Outcomes 2, 533–539

Baumgartner H, Backer J de, Babu-Narayan SV, Budts W, Chessa M, Diller G-P, Lung B, Kluin J, Lang IM, Meijboom F et al. (2021): 2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease. Eur Heart J 42, 563–645

Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, Bonis M de, Hamm C, Holm PJ, Iung B, Lancellotti P, Lansac E, Rodriguez Muñoz D et al. (2017): 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. Eur Heart J 38, 2739–2791

Bayes-Genis A, Cediel G, Domingo M, Codina P, Santiago E, Lupón J (2022): Biomarkers in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. Card Fail Rev 8, e20

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

Benincasa G, Maron BA, Affinito O, D'Alto M, Franzese M, Argiento P, Schiano C, Romeo E, Bontempo P, Golino P et al. (2023): Association Between Circulating $CD4^+$ T Cell Methylation Signatures of Network-Oriented SOCS3 Gene and Hemodynamics in Patients Suffering Pulmonary Arterial Hypertension. J Cardiovasc Transl Res 16, 17–30

Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K (1993): Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. Am J Cardiol 71, 322–327

Bergler-Klein J, Klaar U, Heger M, Rosenhek R, Mundigler G, Gabriel H, Binder T, Pacher R, Maurer G, Baumgartner H (2004): Natriuretic peptides predict symptom-free survival and postoperative outcome in severe aortic stenosis. Circulation 109, 2302–2308

Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S (2007): ECM remodeling in hypertensive heart disease. J Clin Invest 117, 568–575

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007): The mammalian epigenome. Cell 128, 669–681

Bers DM, Bassani JW, Bassani RA (1996): Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. Ann N Y Acad Sci 779, 430–442

Bettencourt P (2004): NT-proBNP and BNP: biomarkers for heart failure management. Eur J Heart Fail 6, 359–363

Bird AP, Wolffe AP (1999): Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. Cell 99, 451–454

Boer RA de, Keulenaer G de, Bauersachs J, Brutsaert D, Cleland JG, Diez J, Du X-J, Ford P, Heinzel FR, Lipson KE et al. (2019): Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. A scientific roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology. Eur J Heart Fail 21, 272–285

Brancati F, Dallapiccola B, Valente EM (2010): Joubert Syndrome and related disorders. Orphanet J Rare Dis 5, 20

Braunwald E (2015): The war against heart failure: the Lancet lecture. Lancet 385, 812–824

Breitling LP, Salzmann K, Rothenbacher D, Burwinkel B, Brenner H (2012): Smoking, *F2RL3* methylation, and prognosis in stable coronary heart disease. Eur Heart J 33, 2841–2848

Burlew BS, Weber KT (2002): Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. Herz 27, 92–98

Bursi F, Weston SA, Redfield MM, Jacobsen SJ, Pakhomov S, Nkomo VT, Meverden RA, Roger VL (2006): Systolic and diastolic heart failure in the community. JAMA 296, 2209–2216

Carson PE, Anand 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). JACC Heart Fail 3, 429–441

Chan MMY, Lam CSP (2013): How do patients with heart failure with preserved ejection fraction die? Eur J Heart Fail 15, 604–613

Chen H, Pan Y, Cheng Z-Y, Wang Z, Liu Y, Zhao Z-J, Fan H (2013): Hypermethylation and clinicopathological significance of *RASAL1* gene in gastric cancer. Asian Pac J Cancer Prev 14, 6261–6265

Chin CWL, Everett RJ, Kwiecinski J, Vesey AT, Yeung E, Esson G, Jenkins W, Koo M, Mirsadraee S, White AC et al. (2017): Myocardial Fibrosis and Cardiac Decompensation in Aortic Stenosis. JACC Cardiovasc Imaging 10, 1320–1333

Cisneros J, Hagood J, Checa M, Ortiz-Quintero B, Negreros M, Herrera I, Ramos C, Pardo A, Selman M (2012): Hypermethylation-mediated silencing of $p14^{ARF}$ in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 303, L295-303

Clavel M-A, Malouf J, Michelena HI, Suri RM, Jaffe AS, Mahoney DW, Enriquez-Sarano M (2014): B-type natriuretic peptide clinical activation in aortic stenosis: impact on long-term survival. J Am Coll Cardiol 63, 2016–2025

Cojan-Minzat BO, Zlibut A, Agoston-Coldea L (2021): Non-ischemic dilated cardiomyopathy and cardiac fibrosis. Heart Fail Rev 26, 1081–1101

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

Czarny MJ, Resar JR (2014): Diagnosis and management of valvular aortic stenosis. Clin Med Insights Cardiol 8, 15–24

Dally S, Bredoux R, Corvazier E, Andersen JP, Clausen JD, Dode L, Fanchaouy M, Gelebart P, Monceau V, Del Monte F et al. (2006): Ca^{2+}-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2 isoform (SERCA2c). Biochem J 395, 249–258

Dally S, Corvazier E, Bredoux R, Bobe R, Enouf J (2010): Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. J Mol Cell Cardiol 48, 633–644

Davies SW, Gershlick AH, Balcon R (1991): Progression of valvar aortic stenosis: a long-term retrospective study. Eur Heart J 12, 10–14

Demografieportal des Bundes und der Länder (2024): Ältere Bevölkerung. https://www.demografie-portal.de/DE/Fakten/aeltere-bevoelkerung.html; abgerufen am 27.02.2024

Doehner W, Clark A, Anker SD (2010): The obesity paradox: weighing the benefit. Eur Heart J 31, 146–148

Dowdle WE, Robinson JF, Kneist A, Sirerol-Piquer MS, Frints SGM, Corbit KC, Zaghloul NA, van Lijnschoten G, Mulders L, Verver DE et al. (2011): Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. Am J Hum Genet 89, 94–110

Du Bois D, Du Bois EF (1916): A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. Arch Intern Med (Chic) 17, 863–871

Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM (2017): Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. Nat Rev Cardiol 14, 591–602

Dweck MR, Joshi S, Murigu T, Alpendurada F, Jabbour A, Melina G, Banya W, Gulati A, Roussin I, Raza S et al. (2011): Midwall fibrosis is an independent predictor of mortality in patients with aortic stenosis. J Am Coll Cardiol 58, 1271–1279

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 429, 457–463

Eller C: Hypermethylierte DNA als Biomarker für Herz- und Nierenerkrankungen. Med. Diss. Göttingen 2023

Estécio MRH, Issa J-PJ (2011): Dissecting DNA hypermethylation in cancer. FEBS Lett 585, 2078–2086

Faggiano P, Frattini S, Zilioli V, Rossi A, Nistri S, Dini FL, Lorusso R, Tomasi C, Dei Cas L (2012): Prevalence of comorbidities and associated cardiac diseases in patients with valve aortic stenosis. Potential implications for the decision-making process. Int J Cardiol 159, 94–99

Feng Y, Dong H, Tan B (2024): Endometriotic mesenchymal stem cells promote the fibrosis process of endometriosis through paracrine TGF-β1 mediated RASAL1 inhibition. J Obstet Gynaecol Res 50, 467–477

Fernández-Sanlés A, Sayols-Baixeras S, Subirana I, Sentí M, Pérez-Fernández S, Castro Moura M de, Esteller M, Marrugat J, Elosua R (2021): DNA methylation biomarkers of myocardial infarction and cardiovascular disease. Clin Epigenetics 13, 86

Frank KF, Bölck B, Brixius K, Kranias EG, Schwinger RHG (2002): Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. Basic Res Cardiol 97 Suppl 1, I72–I78

Frank S, Johnson A, Ross J (1973): Natural history of valvular aortic stenosis. Br Heart J 35, 41–46

Freda BJ, Tang WHW, van Lente F, Peacock WF, Francis GS (2002): Cardiac troponins in renal insufficiency: review and clinical implications. J Am Coll Cardiol 40, 2065–2071

Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H (2009): Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. Curr Protoc Immunol 85, 7.1.1-7.1.8

Gahl B, Çelik M, Head SJ, Vanoverschelde J-L, Pibarot P, Reardon MJ, van Mieghem NM, Kappetein AP, Jüni P, Da Costa BR (2020): Natural History of Asymptomatic Severe Aortic Stenosis and the Association of Early Intervention With Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Cardiol 5, 1102–1112

Galat A, Guellich A, Bodez D, Lipskaia L, Moutereau S, Bergoend E, Hüe S, Ternacle J, Mohty D, Monin J-L et al. (2019): Causes and consequences of cardiac fibrosis in patients referred for surgical aortic valve replacement. ESC Heart Fail 6, 649–657

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

Gardner RS, Ozalp F, Murday AJ, Robb SD, McDonagh TA (2003): N-terminal pro-brain natriuretic peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure. Eur Heart J 24, 1735–1743

Gazoti Debessa CR, Mesiano Maifrino LB, Rodrigues de Souza R (2001): Age related changes of the collagen network of the human heart. Mech Ageing Dev 122, 1049–1058

Gleason TG, Reardon MJ, Popma JJ, Deeb GM, Yakubov SJ, Lee JS, Kleiman NS, Chetcuti S, Hermiller JB, Heiser J et al. (2018): 5-Year Outcomes of Self-Expanding Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Replacement in High-Risk Patients. J Am Coll Cardiol 72, 2687–2696

Global BMI Mortality Collaboration, Di Angelantonio E, Bhupathiraju S, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, Berrington de Gonzalez A, Cairns B, Huxley R, Jackson C et al. (2016): Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. Lancet 388, 776–786

Gosch J: Epigenetische Suppression von *RASAL1* und *ATP2A2* als Biomarker und Therapieansatz bei kardialer Fibrogenese. Med. Diss. Göttingen 2020

Gošev I, Zeljko M, Đurić Ž, Nikolić I, Gošev M, Ivčević S, Bešić D, Legčević Z, Paić F (2017): Epigenome alterations in aortic valve stenosis and its related left ventricular hypertrophy. Clin Epigenetics 9, 106

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

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008): Wound repair and regeneration. Nature 453, 314–321

Haas J, Frese KS, Park YJ, Keller A, Vogel B, Lindroth AM, Weichenhan D, Franke J, Fischer S, Bauer A et al. (2013): Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. EMBO Mol Med 5, 413–429

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

Hadziselimovic E, Greve AM, Sajadieh A, Olsen MH, Kesäniemi YA, Nienaber CA, Ray SG, Rossebø AB, Willenheimer R, Wachtell K et al. (2022): Association of Annual N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Measurements With Clinical Events in Patients With Asymptomatic Nonsevere Aortic Stenosis: A Post Hoc Substudy of the SEAS Trial. JAMA Cardiol 7, 435–444

Hartley A, Hammond-Haley M, Marshall DC, Salciccioli JD, Malik IS, Khamis RY, Shalhoub J (2021): Trends in Mortality From Aortic Stenosis in Europe: 2000-2017. Front Cardiovasc Med 8, 748137

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, 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

Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, Bluemke DA, Butler J, Fonarow GC, Ikonomidis JS, Khavjou O, Konstam MA, Maddox TM et al. (2013): Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. Circ Heart Fail 6, 606–619

Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn W-P, Schaper J (2003): Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. Circulation 107, 984–991

Herman JG, Baylin SB (2003): Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med 349, 2042–2054

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y) 10, 413–417

Hoffmann R (2004): Positionspapier zu Qualitätsstandards in der Echokardiographie. Z Kardiol 93, 975–986

Hopp K, Heyer CM, Hommerding CJ, Henke SA, Sundsbak JL, Patel S, Patel P, Consugar MB, Czarnecki PG, Gliem TJ et al. (2011): *B9D1* is revealed as a novel Meckel syndrome (MKS) gene by targeted exon-enriched next-generation sequencing and deletion analysis. Hum Mol Genet 20, 2524–2534

Huang X, Lin X, Wang L, Xie Y, Que Y, Li S, Hu P, Tong X (2022): Substitution of SERCA2 Cys^{674} aggravates cardiac fibrosis by promoting the transformation of cardiac fibroblasts to cardiac myofibroblasts. Biochem Pharmacol 203, 115164

Hwang S-J, Melenovsky V, Borlaug BA (2014): Implications of coronary artery disease in heart failure with preserved ejection fraction. J Am Coll Cardiol 63, 2817–2827

Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde J-L, Vermeer F, Boersma E et al. (2003): A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. Eur Heart J 24, 1231–1243

Jin H, Wang X, Ying J, Wong AHY, Cui Y, Srivastava G, Shen Z-Y, Li E-M, Zhang Q, Jin J et al. (2007): Epigenetic silencing of a Ca^{2+}-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 12353–12358

Jones PA, Laird PW (1999): Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 21, 163–167

Kanagala P, Cheng ASH, Singh A, Khan JN, Gulsin GS, Patel P, Gupta P, Arnold JR, Squire IB, Ng LL et al. (2019): Relationship Between Focal and Diffuse Fibrosis Assessed by CMR and Clinical Outcomes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. JACC Cardiovasc Imaging 12, 2291–2301

Kanwischer L, Xu X, Saifuddin AB, Maamari S, Tan X, Alnour F, Tampe B, Meyer T, Zeisberg M, Hasenfuss G et al. (2023): Low levels of circulating methylated *IRX3* are related to worse outcome after transcatheter aortic valve implantation in patients with severe aortic stenosis. Clin Epigenetics 15, 149

Kao Y-H, Chen Y-C, Cheng C-C, Lee T-I, Chen Y-J, Chen S-A (2010): Tumor necrosis factor-α decreases sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. Crit Care Med 38, 217–222

Kao Y-H, Cheng C-C, Chen Y-C, Chung C-C, Lee T-I, Chen S-A, Chen Y-J (2011): Hydralazine-induced promoter demethylation enhances sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and calcium homeostasis in cardiac myocytes. Lab Invest 91, 1291–1297

Kapelios CJ, Shahim B, Lund LH, Savarese G (2023): Epidemiology, Clinical Characteristics and Cause-specific Outcomes in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. Card Fail Rev 9, e14

Kasner M, Westermann D, Lopez B, Gaub R, Escher F, Kühl U, Schultheiss H-P, Tschöpe C (2011): Diastolic tissue Doppler indexes correlate with the degree of collagen expression and cross-linking in heart failure and normal ejection fraction. J Am Coll Cardiol 57, 977–985

Katz MG, Brandon-Warner E, Fargnoli AS, Williams RD, Kendle AP, Hajjar RJ, Schrum LW, Bridges CR (2016): Mitigation of myocardial fibrosis by molecular cardiac surgery-mediated gene overexpression. J Thorac Cardiovasc Surg 151, 1191-1200.e3

Kelly JP, Mentz RJ, Mebazaa A, Voors AA, Butler J, Roessig L, Fiuzat M, Zannad F, Pitt B, O'Connor CM et al. (2015): Patient selection in heart failure with preserved ejection fraction clinical trials. J Am Coll Cardiol 65, 1668–1682

Kennedy MP, Omran H, Leigh MW, Dell S, Morgan L, Molina PL, Robinson BV, Minnix SL, Olbrich H, Severin T et al. (2007): Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. Circulation 115, 2814–2821

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2013): KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int Suppl (2011) 3, 1–150

Kim YS, Kang WS, Kwon JS, Hong MH, Jeong H-Y, Jeong HC, Jeong MH, Ahn Y (2014): Protective role of 5-azacytidine on myocardial infarction is associated with modulation of macrophage phenotype and inhibition of fibrosis. J Cell Mol Med 18, 1018–1027

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

Kleiveland CR: Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland CR, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H (Hrsg.): The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Springer, Cham 2015, 161–167

Klena NT, Gibbs BC, Lo CW (2017): Cilia and Ciliopathies in Congenital Heart Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 9, a028266

Kong P, Christia P, Frangogiannis NG (2014): The pathogenesis of cardiac fibrosis. Cell Mol Life Sci 71, 549–574

Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R (2010): The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. J Cell Physiol 225, 631–637

Lam CSP, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS (2011): Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. Eur J Heart Fail 13, 18–28

Lee DS, Gona P, Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Wang TJ, Tu JV, Levy D (2009): Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute. Circulation 119, 3070–3077

Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR et al. (2010): Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. N Engl J Med 363, 1597–1607

Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, van Lente F, Greene T et al. (2009): A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med 150, 604–612

Li S, Zheng Y, Huang Y, He W, Liu X, Zhu W (2022): Association of body mass index and prognosis in patients with HFpEF: A dose-response meta-analysis. Int J Cardiol 361, 40–46

Li Y, Klena NT, Gabriel GC, Liu X, Kim AJ, Lemke K, Chen Y, Chatterjee B, Devine W, Damerla RR et al. (2015): Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. Nature 521, 520–524

Liao L, Jollis JG, Anstrom KJ, Whellan DJ, Kitzman DW, Aurigemma GP, Mark DB, Schulman KA, Gottdiener JS (2006): Costs for heart failure with normal vs reduced ejection fraction. Arch Intern Med 166, 112–118

Liouta G, Adamaki M, Tsintarakis A, Zoumpourlis P, Liouta A, Agelaki S, Zoumpourlis V (2023): DNA Methylation as a Diagnostic, Prognostic, and Predictive Biomarker in Head and Neck Cancer. Int J Mol Sci 24, 2996

Mack MJ, Leon MB, Smith CR, Miller DC, Moses JW, Tuzcu EM, Webb JG, Douglas PS, Anderson WN, Blackstone EH et al. (2015): 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial. Lancet 385, 2477–2484

Madamanchi C, Alhosaini H, Sumida A, Runge MS (2014): Obesity and natriuretic peptides, BNP and NT-proBNP: mechanisms and diagnostic implications for heart failure. Int J Cardiol 176, 611–617

Mansueto G, Benincasa G, Della Mura N, Nicoletti GF, Napoli C (2020): Epigenetic-sensitive liquid biomarkers and personalised therapy in advanced heart failure: a focus on cell-free DNA and microRNAs. J Clin Pathol 73, 535–543

Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X (2012): Rheumatic heart disease. Lancet 379, 953–964

Marks AR (2013): Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. J Clin Invest 123, 46–52

Martin GP, Sperrin M, Hulme W, Ludman PF, Belder MA de, Toff WD, Alabas O, Moat NE, Doshi SN, Buchan I et al. (2017): Relative Survival After Transcatheter Aortic Valve Implantation: How Do Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Implantation Fare Relative to the General Population? J Am Heart Assoc 6, e007229

McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O et al. (2021): 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Eur Heart J 42, 3599–3726

McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O et al. (2023): 2023 Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Eur Heart J 44, 3627–3639

McLenachan JM, Dargie HJ (1990): Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis. Am J Hypertens 3, 735–740

Meder B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Frese K, Lai A, Nietsch R, Scheiner C, Mester S, Bordalo DM et al. (2017): Epigenome-Wide Association Study Identifies Cardiac Gene Patterning and a Novel Class of Biomarkers for Heart Failure. Circulation 136, 1528–1544

Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. J Clin Invest 85, 305–309

Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. Circulation 92, 778–784

Milano AD, Faggian G, Dodonov M, Golia G, Tomezzoli A, Bortolotti U, Mazzucco A (2012): Prognostic value of myocardial fibrosis in patients with severe aortic valve stenosis. J Thorac Cardiovasc Surg 144, 830–837

Mitin N, Rossman KL, Der CJ (2005): Signaling interplay in Ras superfamily function. Curr Biol 15, R563-R574

Moorman AF, Vermeulen JL, Koban MU, Schwartz K, Lamers WH, Boheler KR (1995): Patterns of expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and phospholamban mRNAs during rat heart development. Circ Res 76, 616–625

Moreo A, Ambrosio G, Chiara B de, Pu M, Tran T, Mauri F, Raman SV (2009): Influence of myocardial fibrosis on left ventricular diastolic function: noninvasive assessment by cardiac magnetic resonance and echo. Circ Cardiovasc Imaging 2, 437–443

Movassagh M, Choy M-K, Knowles DA, Cordeddu L, Haider S, Down T, Siggens L, Vujic A, Simeoni I, Penkett C et al. (2011): Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. Circulation 124, 2411–2422

Mueller C, McDonald K, Boer RA de, Maisel A, Cleland JGF, Kozhuharov N, Coats AJS, Metra M, Mebazaa A, Ruschitzka F et al. (2019): Heart Failure Association of the European Society of Cardiology practical guidance on the use of natriuretic peptide concentrations. Eur J Heart Fail 21, 715–731

Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H (1991): Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. J Clin Invest 87, 1402–1412

Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155, 335–350

Myhre PL, Vaduganathan M, Claggett BL, Anand IS, Sweitzer NK, Fang JC, O'Meara E, Shah SJ, Desai AS, Lewis EF et al. (2018): Association of Natriuretic Peptides With Cardiovascular Prognosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Secondary Analysis of the TOPCAT Randomized Clinical Trial. JAMA Cardiol 3, 1000–1005

Nakayama H, Otsu K, Yamaguchi O, Nishida K, Date M, Hongo K, Kusakari Y, Toyofuku T, Hikoso S, Kashiwase K et al. (2003): Cardiac-specific overexpression of a high Ca^{2+} affinity mutant of SERCA2a attenuates in vivo pressure overload cardiac hypertrophy. FASEB J 17, 61–63

Nanayakkara S, Patel HC, Kaye DM (2018): Hospitalisation in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Clin Med Insights Cardiol 12, 1179546817751609

Nasu T, Satoh M, Ohmomo H, Shiwa Y, Komaki S, Ono K, Shimizu A, Taguchi S, Takahashi Y, Osaki T et al. (2020): Epigenome-Wide Association Study Identifies a Novel DNA Methylation in Patients With Severe Aortic Valve Stenosis. Circ Genom Precis Med 13, e002649

Neary R, Watson CJ, Baugh JA (2015): Epigenetics and the overhealing wound: the role of DNA methylation in fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair 8, 18

Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R (2009): Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. Dtsch Arztebl Int 106, 269–275

Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M (2006): Burden of valvular heart diseases: a population-based study. Lancet 368, 1005–1011

Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, McAlister FA (2008): Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. Am Heart J 156, 13–22

Osnabrugge RLJ, Mylotte D, Head SJ, van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, Bogers AJJC, Piazza N, Kappetein AP (2013): Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. J Am Coll Cardiol 62, 1002–1012

Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD (1994): Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. Circulation 90, 844–853

Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Gentile F, Jneid H, Krieger EV, Mack M, McLeod C et al. (2021): 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 77, e25-e197

Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM (2006): Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. N Engl J Med 355, 251–259

Palta S, Pai AM, Gill KS, Pai RG (2000): New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. Circulation 101, 2497–2502

Periasamy M, Huke S (2001): SERCA pump level is a critical determinant of Ca^{2+} homeostasis and cardiac contractility. J Mol Cell Cardiol 33, 1053–1063

Pfortmueller CA, Funk G-C, Marti G, Leichtle AB, Fiedler GM, Schwarz C, Exadaktylos AK, Lindner G (2013): Diagnostic performance of high-sensitive troponin T in patients with renal insufficiency. Am J Cardiol 112, 1968–1972

Pieske B, Tschöpe C, Boer RA de, Fraser AG, Anker SD, Donal E, Edelmann F, Fu M, Guazzi M, Lam CSP et al. (2019): How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA-PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 40, 3297–3317

Pimson C, Ekalaksananan T, Pientong C, Promthet S, Putthanachote N, Suwanrungruang K, Wiangnon S (2016): Aberrant methylation of *PCDH10* and *RASSF1A* genes in blood samples for non-invasive diagnosis and prognostic assessment of gastric cancer. PeerJ 4, e2112

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

Playford D, Schwarz N, Chowdhury E, Williamson A, Duong M, Kearney L, Stewart S, Strange G (2023): Comorbidities and Symptom Status in Moderate and Severe Aortic Stenosis: A Multicenter Clinical Cohort Study. JACC Adv 2, 100356

Pocock SJ, Ariti CA, McMurray JJV, Maggioni A, Køber L, Squire IB, Swedberg K, Dobson J, Poppe KK, Whalley GA et al. (2013): Predicting survival in heart failure: a risk score based on 39 372 patients from 30 studies. Eur Heart J 34, 1404–1413

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, 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

Puls M, Beuthner BE, Topci R, Vogelgesang A, Bleckmann A, Sitte M, Lange T, Backhaus SJ, Schuster A, Seidler T et al. (2020): Impact of myocardial fibrosis on left ventricular remodelling, recovery, and outcome after transcatheter aortic valve implantation in different haemodynamic subtypes of severe aortic stenosis. Eur Heart J 41, 1903–1914

Rabkin SW, Wong CN (2023): Epigenetics in Heart Failure: Role of DNA Methylation in Potential Pathways Leading to Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. Biomedicines 11, 2815

Radhakrishna U, Albayrak S, Alpay-Savasan Z, Zeb A, Turkoglu O, Sobolewski P, Bahado-Singh RO (2016): Genome-Wide DNA Methylation Analysis and Epigenetic Variations Associated with Congenital Aortic Valve Stenosis (AVS). PLoS ONE 11, e0154010

Ravassa S, López B, Treibel TA, San José G, Losada-Fuentenebro B, Tapia L, Bayés-Genís A, Díez J, González A (2023): Cardiac Fibrosis in heart failure: Focus on non-invasive diagnosis and emerging therapeutic strategies. Mol Aspects Med 93, 101194

Rheude T, Pellegrini C, Xhepa E, Joner M (2024): Update zur Behandlung der Aortenklappenstenose bei symptomatischen und asymptomatischen Patienten. Herz 49, 156–164

Richards AM, Crozier IG, Yandle TG, Espiner EA, Ikram H, Nicholls MG (1993): Brain natriuretic factor: regional plasma concentrations and correlations with haemodynamic state in cardiac disease. Br Heart J 69, 414–417

Romani M, Micalizzi A, Kraoua I, Dotti MT, Cavallin M, Sztriha L, Ruta R, Mancini F, Mazza T, Castellana S et al. (2014): Mutations in *B9D1* and *MKS1* cause mild Joubert syndrome: expanding the genetic overlap with the lethal ciliopathy Meckel syndrome. Orphanet J Rare Dis 9, 72

Rommel K-P, Roeder M von, Latuscynski K, Oberueck C, Blazek S, Fengler K, Besler C, Sandri M, Lücke C, Gutberlet M et al. (2016): Extracellular Volume Fraction for Characterization of Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. J Am Coll Cardiol 67, 1815–1825

Rossi MA (1998): Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. J Hypertens 16, 1031–1041

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487–491

Samuel TJ, Rosenberry RP, Lee S, Pan Z (2018): Correcting Calcium Dysregulation in Chronic Heart Failure Using *SERCA2a* Gene Therapy. Int J Mol Sci 19, 1086

Sanders YY, Pardo A, Selman M, Nuovo GJ, Tollefsbol TO, Siegal GP, Hagood JS (2008): Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 39, 610–618

Sanders-van Wijk S, Barandiarán Aizpurua A, Brunner-La Rocca H-P, Henkens MTHM, Weerts J, Knackstedt C, Uszko-Lencer N, Heymans S, van Empel V (2021): The HFA-PEFF and H_2FPEF scores largely disagree in classifying patients with suspected heart failure with preserved ejection fraction. Eur J Heart Fail 23, 838–840

Sarkar A, Chowdhury S, Kumar A, Khan B, Chowdhury S, Gupta R, Hajra A, Aronow WS (2023): Biomarkers as Prognostic Markers for Aortic Stenosis: A Review. Am J Cardiol 206, 53–59

Schelbert EB, Fridman Y, Wong TC, Abu Daya H, Piehler KM, Kadakkal A, Miller CA, Ugander M, Maanja M, Kellman P 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

Schiano C, Benincasa G, Infante T, Franzese M, Castaldo R, Fiorito C, Mansueto G, Grimaldi V, Della Valle G, Fatone G et al. (2020): Integrated analysis of DNA methylation profile of *HLA-G* gene and imaging in coronary heart disease: Pilot study. PLoS ONE 15, e0236951

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer 11, 426–437

Seto M, Ohta M, Ikenoue T, Sugimoto T, Asaoka Y, Tada M, Mohri D, Kudo Y, Ijichi H, Tateishi K et al. (2011): Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer. Int J Cancer 128, 1293–1302

Shah SJ, Gheorghiade M (2008): Heart failure with preserved ejection fraction: treat now by treating comorbidities. JAMA 300, 431–433

Shareef MA, Anwer LA, Poizat C (2014): Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure. Eur J Pharmacol 724, 1–8

Solomon SD, McMurray JJV, Claggett B, Boer RA de, DeMets D, Hernandez AF, Inzucchi SE, Kosiborod MN, Lam CSP, Martinez F et al. (2022): Dapagliflozin in Heart Failure with Mildly Reduced or Preserved Ejection Fraction. N Engl J Med 387, 1089–1098

Søndergaard L, Steinbrüchel DA, Ihlemann N, Nissen H, Kjeldsen BJ, Petursson P, Ngo AT, Olsen NT, Chang Y, Franzen OW et al. (2016): Two-Year Outcomes in Patients With Severe Aortic Valve Stenosis Randomized to Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Replacement: The All-Comers Nordic Aortic Valve Intervention Randomized Clinical Trial. Circ Cardiovasc Interv 9, e003665

Spach MS, Boineau JP (1997): Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. Pacing Clin Electrophysiol 20, 397–413

Spitzer E, Hahn RT, Pibarot P, Vries T de, Bax JJ, Leon MB, van Mieghem NM (2019): Aortic Stenosis and Heart Failure: Disease Ascertainment and Statistical Considerations for Clinical Trials. Card Fail Rev 5, 99–105

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017): Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten: Pressemitteilung N. 347 vom 29. September 2017. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html; abgerufen am 27.02.2024

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2023a): Todesursachen 2022: Anteil der an COVID-19-Verstorbenen rückläufig: Pressemitteilung Nr. 441 vom 15. November 2023. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/11/PD23_441_23211.html; abgerufen am 27.02.2024

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2023b): Todesursachen: Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html; abgerufen am 27.02.2024

Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM (1997): Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. J Am Coll Cardiol 29, 630–634

Stewart S, Afoakwah C, Chan Y-K, Strom JB, Playford D, Strange GA (2022): Counting the cost of premature mortality with progressively worse aortic stenosis in Australia: a clinical cohort study. Lancet Healthy Longev 3, e599-e606

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na^+-Ca^{2+}exchanger in end-stage human heart failure. Circ Res 75, 443–453

Su M-YM, Lin L-Y, Tseng Y-HE, Chang C-C, Wu C-K, Lin J-L, Tseng W-YI (2014): CMR-verified diffuse myocardial fibrosis is associated with diastolic dysfunction in HFpEF. JACC Cardiovasc Imaging 7, 991–997

Tadic M, Cuspidi C (2019): Obesity and heart failure with preserved ejection fraction: a paradox or something else? Heart Fail Rev 24, 379–385

Takahashi T, Allen PD, Izumo S (1992): Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca^{2+}-ATPase gene. Circ Res 71, 9–17

Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Yamagami M, Ishibashi R, Sekiba K, Suzuki T, Ohno M, Yamashita Y, Abe T et al. (2017): RASAL1 is a potent regulator of hepatic stellate cell activity and liver fibrosis. Oncotarget 8, 64840–64852

Tampe B, Tampe D, Zeisberg EM, Müller GA, Bechtel-Walz W, Koziolek 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

Tan X, Xu X, Zeisberg M, Zeisberg EM (2016): DNMT1 and HDAC2 Cooperate to Facilitate Aberrant Promoter Methylation in Inorganic Phosphate-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition. PLoS ONE 11, e0147816

Taniguchi T, Morimoto T, Shiomi H, Ando K, Kanamori N, Murata K, Kitai T, Kawase Y, Izumi C, Kato T et al. (2018): Sudden Death in Patients With Severe Aortic Stenosis: Observations From the CURRENT AS Registry. J Am Heart Assoc 7, e008397

Tao H, Huang C, Yang J-J, Ma T-T, Bian E-B, Zhang L, Lv X-W, Jin Y, Li J (2011): MeCP2 controls the expression of RASAL1 in the hepatic fibrosis in rats. Toxicology 290, 327–333

Tao H, Yang J-J, Chen Z-W, Xu S-S, Zhou X, Zhan H-Y, Shi K-H (2014): DNMT3A silencing RASSF1A promotes cardiac fibrosis through upregulation of ERK1/2. Toxicology 323, 42–50

Thermo Fisher Scientific (2009): NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer: V1.0 User Manual. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf; abgerufen am 27.01.2020

Treibel TA, Badiani S, Lloyd G, Moon JC (2019): Multimodality Imaging Markers of Adverse Myocardial Remodeling in Aortic Stenosis. JACC Cardiovasc Imaging 12, 1532–1548

Tribouilloy C, Rusinaru D, Mahjoub H, Soulière V, Lévy F, Peltier M, Slama M, Massy Z (2008): Prognosis of heart failure with preserved ejection fraction: a 5 year prospective population-based study. Eur Heart J 29, 339–347

Tromp J, Khan MAF, Klip IT, Meyer S, Boer RA de, 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, e003989

Tsao CW, Lyass A, Enserro D, Larson MG, Ho JE, Kizer JR, Gottdiener JS, Psaty BM, Vasan RS (2018): Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. JACC Heart Fail 6, 678–685

Ueyama H, Kuno T, Harrington M, Takagi H, Krishnamoorthy P, Sharma SK, Kini A, Lerakis S (2021): Impact of Surgical and Transcatheter Aortic Valve Replacement in Low-Gradient Aortic Stenosis: A Meta-Analysis. JACC Cardiovasc Interv 14, 1481–1492

Upadhya 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

Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, Capodanno D, Conradi L, Bonis M de, Paulis R de et al. (2022): 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Eur Heart J 43, 561–632

van Bakel PAJ, Ahmed Y, Hou H, Sukul D, Likosky DS, van Herwaarden JA, Patel HJ, Thompson MP (2022): Trends in Medicare Payments for Beneficiaries With Aortic Stenosis. J Am Heart Assoc 11, e026102

Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M (2004): Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. Eur J Heart Fail 6, 261–268

Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F (2005): Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. Cell calcium 38, 291–302

Verboomen H, Wuytack F, Smedt H de, Himpens B, Casteels R (1992): Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca^{2+} pumps and their modulation by phospholamban. Biochem J 286, 591–595

Verbrugge FH, Omote K, Reddy YNV, Sorimachi H, Obokata M, Borlaug BA (2022): Heart failure with preserved ejection fraction in patients with normal natriuretic peptide levels is associated with increased morbidity and mortality. Eur Heart J 43, 1941–1951

Villari B, Campbell SE, Hess OM, Mall G, Vassalli G, Weber KT, Krayenbuehl HP (1993): Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease. J Am Coll Cardiol 22, 1477–1484

Virtanen MPO, Eskola M, Jalava MP, Husso A, Laakso T, Niemelä M, Ahvenvaara T, Tauriainen T, Maaranen P, Kinnunen E-M et al. (2019): Comparison of Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Replacement vs Surgical Aortic Valve Replacement Among Patients With Aortic Stenosis at Low Operative Risk. JAMA Netw Open 2, e195742

Vollenbroich R, Sakiri E, Roost E, Stortecky S, Rothenbühler M, Räber L, Englberger L, Wenaweser P, Carrel T, Windecker S et al. (2019): Clinical outcomes in high-risk patients with a severe aortic stenosis: a seven-year follow-up analysis. Swiss Med Wkly 149, w20013

Wallner M, Herbst A, Behrens A, Crispin A, Stieber P, Göke B, Lamerz R, Kolligs FT (2006): Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. Clin Cancer Res 12, 7347–7352

Wang Y, Fan P-S, Kahaleh B (2006): Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the *FLI1* gene in scleroderma fibroblasts. Arthritis Rheum 54, 2271–2279

Warren BA, Yong JL (1997): Calcification of the aortic valve: its progression and grading. Pathology 29, 360–368

Watkins DA, Johnson CO, Colquhoun SM, Karthikeyan G, Beaton A, Bukhman G, Forouzanfar MH, Longenecker CT, Mayosi BM, Mensah GA et al. (2017): Global, Regional, and National Burden of Rheumatic Heart Disease, 1990-2015. N Engl J Med 377, 713–722

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

Watson CJ, Horgan S, Neary R, Glezeva N, Tea I, Corrigan N, McDonald K, Ledwidge M, Baugh J (2016): Epigenetic Therapy for the Treatment of Hypertension-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. J Cardiovasc Pharmacol Ther 21, 127–137

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

Weidemann F, Herrmann S, Störk S, Niemann M, Frantz S, Lange V, Beer M, Gattenlöhner S, Voelker W, Ertl G et al. (2009): Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis. Circulation 120, 577–584

White M, Baral R, Ryding A, Tsampasian V, Ravindrarajah T, Garg P, Koskinas KC, Clark A, Vassiliou VS (2021): Biomarkers Associated with Mortality in Aortic Stenosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Med Sci (Basel) 9, 29

WHO (2024): Ageing and health. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health; abgerufen am 03.10.2024

WHO - Regional Office for Europe (2020): Body mass index - BMI. http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi; abgerufen am 07.03.2020

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. BioTechniques 22, 130-138

Wu C, Morris JR (2001): Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. Science 293, 1103–1105

Xiong X, Zhang X, Zhang Y, Xie J, Bian Y, Yin Q, Tong R, Yu D, Pan L (2022): Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA)-mediated ER stress crosstalk with autophagy is involved in tris(2-chloroethyl) phosphate stress-induced cardiac fibrosis. J Inorg Biochem 236, 111972

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

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 Rasal1 promoter methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis. Cardiovasc Res 105, 279–291

Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, Alahdab F, Alashi A, Alipour V, Arabloo J et al. (2020): Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. Circulation 141, 1670–1680

Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Shimizu T, Kaneshiro T, Takeishi Y (2020): Clinical Significance of Circulating Cardiomyocyte-Specific Cell-Free DNA in Patients With Heart Failure: A Proof-of-Concept Study. Can J Cardiol 36, 931–935

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

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 M, Kalluri R (2013): Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. Am J Physiol Cell Physiol 304, C216-C225

Zhang Y, Schöttker B, Florath I, Stock C, Butterbach K, Holleczek B, Mons U, Brenner H (2016): Smoking-Associated DNA Methylation Biomarkers and Their Predictive Value for All-Cause and Cardiovascular Mortality. Environ Health Perspect 124, 67–74

Zhang Y, Wilson R, Heiss J, Breitling LP, Saum K-U, Schöttker B, Holleczek B, Waldenberger M, Peters A, Brenner H (2017): DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. Nat Commun 8, 14617

Zhihao L, Jingyu N, Lan L, Michael S, Rui G, Xiyun B, Xiaozhi L, Guanwei F (2020): SERCA2a: a key protein in the Ca^{2+} cycle of the heart failure. Heart Fail Rev 25, 523–535

Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, Slater R, Palmer BM, van Buren P, Meyer M et al. (2015): Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. Circulation 131, 1247–1259

Zile MR, Claggett BL, Prescott MF, McMurray JJV, Packer M, Rouleau JL, Swedberg K, Desai AS, Gong J, Shi VC et al. (2016): Prognostic Implications of Changes in N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Patients With Heart Failure. J Am Coll Cardiol 68, 2425–2436

Danksagung

Mein Dank geht zuallererst an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Elisabeth Zeisberg für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Betreuung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Karl Toischer für die Möglichkeit in der Klinik für Kardiologie und Pneumologie zu promovieren. Ich danke der Abteilung zudem für die Bereitstellung der Daten zur TAVI- und DIAST-Kohorte.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Leha von der Wissenschaftlichen Serviceeinheit "Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik" der Universitätsmedizin Göttingen für die Durchführung eines Teils der statistischen Analysen und für die Beratung bei den selbst durchgeführten statistischen Analysen.

Schließlich möchte ich Herrn PD Dr. med. Björn Tampe, Frau Dr. med. Désirée Tampe, Frau Annika Erdmann, Frau Sarah Rinkleff und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zeisberg für die Unterstützung bei den Laborarbeiten dieser Dissertation meinen herzlichen Dank aussprechen.