

Aus der Med. Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle genetischer Variationen des Gens der löslichen
Epoxidhydrolase bei Vorhofflimmern

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Kestler

aus Schwabach

Datum der Promotion: 22.09.2017

Zusammenfassung

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen und weist eine weiterhin steigende Prävalenz auf. Mit der Entwicklung der Katheterablation konnte eine Verbesserung in der Behandlung von Vorhofflimmern erreicht werden, jedoch kommt es bei einem nicht unerheblichen Teil der ablatierten Patienten zu VHF-Rezidiven. Genetische Aspekte rücken zunehmend in den Fokus kardiovaskulärer Forschung und spielen auch bei Vorhofflimmern eine wichtige Rolle. Genetische Variationen des Gens der lösliche Epoxidhydrolase (sEH) – des Enzyms, das die Arachidonsäurederivate Epoxyeicosatriensäuren (EETs) metabolisiert – sind mit verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die Single Nukleotid Polymorphismen (SNP) K55R und R287Q des sEH-Gens (EPHX2-Gen) mit einem gehäuften Auftreten von VHF oder einer veränderten Krankheitsausprägung assoziiert sind und ob die beiden SNPs mit einem veränderten Ansprechen auf die Katheterablation assoziiert sind. Es wurden die entsprechenden Genabschnitte des Gens der löslichen Epoxidhydrolase von 218 VHF-Patienten, bei denen eine Katheterablation durchgeführt wurde, und 268 Kontrollpatienten sequenziert und die Genotypverteilung in beiden Kollektiven verglichen. Zudem wurden innerhalb des VHF-Kollektivs Krankheitsausprägung und Ansprechen auf die Katheterablation zwischen SNP-Trägern und Nicht-Trägern verglichen.

Es ergab sich für beide SNPs keine signifikant unterschiedliche Häufigkeitsverteilung zwischen VHF- und Kontrollkollektiv. Darüber hinaus zeigten sich für beide SNPs hinsichtlich der untersuchten Krankheitscharakteristika keine signifikanten Unterschiede zwischen SNP-Trägern und Nicht-Trägern. Jedoch zeigte sich hinsichtlich des Ansprechens auf die Katheterablation unter den Trägern des SNPs R287Q ein signifikant häufigeres Auftreten von VHF-Rezidiven nach Ablation. Es erwies sich ferner, dass der SNP R287Q ein von anderen Variablen unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation ist. Unter den Trägern des SNPs K55R zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven nach Ablation.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die beiden SNPs K55R und R287Q weder mit dem Auftreten noch mit einer veränderten Krankheitsausprägung

von VHF assoziiert sind. Jedoch zeigen diese Ergebnisse erstmalig, dass der SNP R287Q mit einem erhöhten Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation assoziiert ist und unabhängig von anderen Einflussgrößen zu VHF-Rezidiven nach Katheterablation prädisponiert. Der SNP R287Q führt in vitro und in vivo zu einer verminderten Aktivität des EET-abbauenden Enzyms sEH und damit wahrscheinlich zu erhöhten EET-Spiegeln. Die Rekonnexion isolierter Pulmonalvenen ist der Hauptmechanismus für die Entstehung von VHF-Rezidiven nach Katheterablation. Antifibrotische, antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte erhöhter EET-Spiegel könnten die Rekonnexion der Pulmonalvenen begünstigen und somit der zugrundeliegende Pathomechanismus für die Prädisposition zu VHF-Rezidiven bei Trägern des SNPs R287Q sein.

Abstract

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia and its prevalence continues to rise. The development of catheter ablation has led to an improvement in the therapy of AF, but recurrence of AF after catheter ablation remains a challenging problem. Genetic aspects are of growing interest in cardiovascular research and play an important role in atrial fibrillation. Epoxyeicosatrienoic acid (EET), a derivative of arachidonic acid, is known to influence cardiovascular pathophysiology. Genetic variations in the soluble epoxide hydrolase (sEH) gene, the enzyme which metabolizes EETs, are associated with various cardiovascular diseases.

The goal of this work was to investigate whether the two single nucleotide polymorphisms (SNP) K55R and R287Q are associated with the occurrence or an altered manifestation of AF and whether the two SNPs are associated with an altered response to catheter ablation. The respective genetic regions of 218 AF patients, who underwent catheter ablation, and those of 268 controls were sequenced and genotypes were compared between both groups. In addition characteristics of AF manifestation and the success rates of catheter ablation were compared between the SNP carriers and wildtype carriers within the AF group.

No significant difference was found between the AF group and controls in respect to the presence of either of the two SNPs and wildtype. Also there was no significant

difference in the examined characteristics of AF manifestation between the SNP carriers and wildtype carriers within the AF group. However, among the carriers of the R287Q variant there was a significant increase in the rates of AF recurrence following catheter ablation after 12 and 24 months follow-up. Moreover, the SNP R287Q was an independent predictor of AF recurrence after catheter ablation.

It can thus be concluded that the SNPs K55R and R287Q are not associated with an increased occurrence of AF or an altered manifestation of AF. However it was shown for the first time that the SNP R287Q is associated with an increased rate of AF recurrence after catheter ablation and has independent predictive value for AF recurrence after catheter ablation. The SNP R287Q leads to a reduced activity of the enzyme sEH which metabolises EETs and is therefore likely to lead to higher EET levels. The reconnection of the pulmonary veins is the main mechanism of AF recurrence after catheter ablation. Antiinflammatory, antifibrotic, and anti-apoptotic effects of increased EET levels could promote the reconnection of the pulmonary veins and might therefore be the underlying pathomechanism that predisposes the carriers of the R287Q variant to AF recurrence following catheter ablation.

Inhalt

1	Einleitung	7
1.1	Vorhofflimmern	7
1.1.1	Überblick	7
1.1.2	Definition und Einteilung	7
1.1.3	Ätiopathogenese von Vorhofflimmern	8
1.1.4	Klinik, Diagnostik und Therapie von Vorhofflimmern.....	11
1.2	Pulmonalvenenisolation bei Vorhofflimmern.....	19
1.2.1	Überblick	19
1.2.2	Erfolge und Komplikationen der Katheterablation	20
1.2.3	Indikation der Katheterablation bei Vorhofflimmern	22
1.2.4	Rezidiv nach Pulmonalvenenisolation.....	24
1.3	Genetische Aspekte bei Vorhofflimmern	25
1.3.1	Überblick.....	25
1.3.2	Epoxyeicosatriensäuren und ihr Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System..	27
1.3.3	Die lösliche Epoxidhydrolase und SNPs des EPHX2-Gens.....	29
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	31
2	Patienten, Material und Methoden	33
2.1	Patienten	33
2.2	Material.....	33
2.2.1	Geräte.....	33
2.2.2	Computerprogramme	34
2.2.3	Verbrauchsmaterialien	35
2.2.4	Chemikalien	35
2.2.5	Enzyme	36
2.2.6	Nukleotide	36
2.2.7	Molekulargewichtsmarker	36
2.2.8	Kits.....	37
2.3	Methoden	37
2.3.1	Durchführung der Katheterablation	37
2.3.2	Follow-up	38
2.3.3	Genetische Analysen	39
2.3.4	Statistische Auswertung.....	48

3	Ergebnisse	50
3.1	Primer	50
3.2	PCR	50
3.3	Sequenzierung	51
3.4	Genotypverteilung und Zusammenhang mit Auftreten von Vorhofflimmern	54
3.5	Einfluss der genetischen Varianten auf Ausprägung von Vorhofflimmern	55
3.6	Einfluss der genetischen Varianten auf Erfolg der Katheterablation	56
4	Diskussion	58
4.1	Bewertung der Ergebnisse	58
4.1.1	Genotypverteilung	58
4.1.2	Rezidivaufreten nach Katheterablation	59
4.2	Der SNP R287Q und VHF-Rezidive nach Katheterablation	60
4.3	Einschränkungen	65
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	67
5	Literatur	71
6	Anhang	79
6.1	Abkürzungen	79
6.2	Abbildungen	80
6.3	Tabellen	80
6.4	Sequenzen	81
7	Eidesstattliche Versicherung	82
8	Publikationsliste	84
9	Lebenslauf	85
10	Danksagung	88

1 Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

1.1.1 Überblick

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung und liegt nach neuesten Schätzungen bei bis zu 3% der über 20-Jährigen vor. Sie ist mit einem fünffach höheren Schlaganfallrisiko, einem dreifach erhöhten Auftreten von Herzinsuffizienz und, je nach Geschlecht, mit einer eineinhalb bis zweifach erhöhten Mortalität assoziiert [1, 2]. Derzeit leiden in Europa etwa sechs Millionen Menschen an VHF und aufgrund der alternden Bevölkerung wird erwartet, dass dieser Wert bis 2030 auf vierzehn bis siebzehn Millionen ansteigen wird. Insofern stellt diese Erkrankung eine wachsende Herausforderung für die Gesundheitssysteme dar [2, 3]. Mit der Etablierung der Katheterablation als weltweit angebotene Standardtherapie ist eine Verbesserung in der Therapie von VHF erreicht worden. Dennoch ist, trotz der Erfolge dieses interventionellen Therapieverfahrens, ein langfristiger Erhalt des Sinusrhythmus bei vielen Patienten weiterhin schwierig zu erreichen [4]. Um die Langzeitergebnisse der Katheterablation weiter zu verbessern, ist ein noch weitreichenderes Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen, die der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF, sowie der Entstehung von VHF-Rezidiven nach Ablation zugrunde liegen, nötig.

1.1.2 Definition und Einteilung

Bei VHF handelt es sich um eine supraventrikuläre Tachyarrhythmie, bei der es zu chaotischen und hämodynamisch unwirksamen Vorhofkontraktionen kommt, denen pathophysiologisch kreisende Erregungen im Bereich der Vorhöfe zugrunde liegen [5]. Man unterscheidet idiopathisches Vorhofflimmern, bei dem keine strukturellen Herzerkrankungen vorliegen (Lone Atrial Fibrillation) und sekundäres VHF, das sich auf der Basis kardialer und nicht-kardialer Grunderkrankungen wie Koronare Herzkrankheit, Erkrankungen der Herzklappen, insbesondere Mitralklappen (valvuläres VHF), Kardiomyopathien, Arterieller Hypertonie, Hyperthyreose u.a. entwickelt. [5]

Einleitung

Weiterhin können bei Vorhofflimmern verschiedene Typen unterschieden werden (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: VHF-Typen laut ESC-Leitlinien 2016 [2]. 1) Meist selbstlimitierend <48 h.

VHF-Typ	Erklärung
Erstmalig diagnostiziertes VHF	Erstmalige Diagnose einer VHF-Episode
Paroxysmales VHF	Selbstlimitierende VHF-Episoden < 7 Tage ¹
Persistierendes VHF	VHF-Episoden dauern >7 Tage oder bedürfen Kardioversion
Langanhaltend persistierendes VHF	Länger als 12 Monate bestehendes VHF
Permanentes VHF	Nicht selbstlimitierendes VHF; keine therapeutische Intention Konversion in Sinusrhythmus herzustellen

Man sollte sich jedoch diese verschiedenen Typen von VHF nicht als unabhängige Krankheitssubtypen vorstellen, sondern sie vielmehr als Stadien einer fortlaufenden Erkrankung verstehen. In der Regel beginnt VHF mit einzelnen, im Verlauf zunehmenden Episoden paroxysmalen Vorhofflimmerns und geht im Laufe der Jahre, insbesondere unter dem Einfluss von kardialen Komorbiditäten, in anhaltende Formen über [3].

1.1.3 Ätiopathogenese von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern liegt pathophysiologisch ein Reentry-Mechanismus mit kreisenden Erregungen im Bereich des Vorhofmyokards zugrunde, deren Entstehung und Aufrechterhaltung noch nicht vollständig verstanden ist [4]. Damit es zu kreisenden Erregungen kommen kann, müssen diese getriggert werden und dann auf Gewebe treffen, das ihre Aufrechterhaltung begünstigt (Substrat) [3]. Für die Triggerung kreisender Vorhoferregung sind vor allem ektope erregungsbildende Zentren von großer Bedeutung, die hauptsächlich im Bereich der Pulmonalvenenmündungen und im linken Vorhof liegen [4]. Bei diesen ektope Zentren handelt es sich um elektrophysiologisch abgrenzbare Foci, die im Vergleich zu den physiologischen Schrittmacherzellen eine wesentlich höhere Frequenz schneller Depolarisationen zeigen und somit spontan Erregung generieren können [6]. Dabei geht die Erregung von den Foci mit der höchsten dominanten Frequenz (DF) aus, das heißt von den Zellen, die die höchste Rate an Depolarisationen pro Zeiteinheit aufweisen. Die so generierte Erregung ist in Bezug auf den normalen Erregungszyklus früh einfallend und kann daher auf nicht-refraktäre Kardiomyozyten treffen. Über diese breitet sich die

Einleitung

Erregung über den Vorhöfen aus und wird aufgrund struktureller (z.B. anatomische Begebenheiten, Fibrosierung, elektrische Dissoziation von Kardiomyozyten) und physiologischer Hindernisse (z.B. refraktäre Zellen, Leitungsblöcke) aufgespalten, so dass verschiedene kleine Erregungskreisläufe entstehen, die zum Flimmern führen [7, 8]. Bei Patienten mit paroxysmalem VHF liegen die ektopen Foci vor allem in den Pulmonalvenenostien, bei Patienten mit persistierendem VHF, also in der Regel in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, liegen die Foci diffuser verteilt, vor allem im linken, zum Teil aber auch im rechten Vorhof (vgl. Abbildung 1) [9].

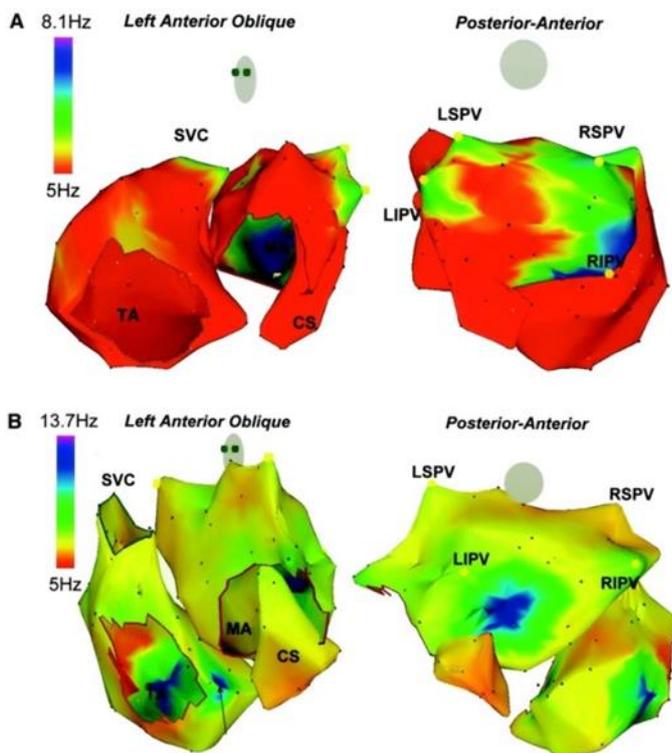


Abbildung 1: Modifizierte DF-Map der Vorhöfe [9]. Blick von schräg links oben und von hinten. **A)** Paroxysmales VHF seit 6 h: Die höchsten dominanten Frequenzen (DF), d.h. Orte mit hoher Depolarisationsfrequenz, liegen im Bereich der Pulmonalvenenmündungen. **B)** Permanentes VHF seit 2 Jahren: Insgesamt zeigen sich höhere maximale DFs und eine diffusere Verteilung. LIPV + LSPV = untere + obere linke Pulmonalvene, RIPV + RSPV = untere + obere rechte Pulmonalvene, CS = Sinus coronarius, MA + TA = Annulus der Mitral + Trikuspidalklappe, SVC = obere Hohlvene

Die Pulmonalvenen sind aus mehreren Gründen arrhythmogen prädisponiert: In ihrem Mündungsbereich weisen sie Herzmuskelgewebe auf, das etwa 3 cm in die Venen hinein reicht und Kardiomyozyten enthält, die durch eine kürzere Aktionspotentialdauer, kürzere Refraktärzeiten und ein erhöhtes autoexzitatorisches Potential charakterisiert sind [4, 10]. Die diesen veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht ausreichend verstanden, eine entscheidende Rolle spielt aber ein verminderter Kaliumstrom durch den

Einleitung

Kaliumeinwärtsgerichteter I_{K1} [11] sowie (möglicherweise dadurch mitbegründet) ein positiveres Ruhemembranpotential [10]. Weiterhin scheint eine dichte vegetative Innervation im Bereich der Pulmonalvenenmündungen und des linken Vorhofs für das arrhythmogene Potential dieser Areale mitverantwortlich zu sein. Es finden sich im Bereich des linken Vorhofs fünf wesentliche Plexus, die sympathische und parasympathische Innervation enthalten (siehe Abbildung 2A). Unter parasympathischem Einfluss kommt es im Bereich der Pulmonalvenen zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer und der Refraktärzeiten, unter sympathischer Stimulation zeigt sich eine verstärkte Autoexzitation. Gemeinsam tragen diese Phänomene zu der Prädisposition der Pulmonalvenen bei, ektope Erregung zu generieren [4].

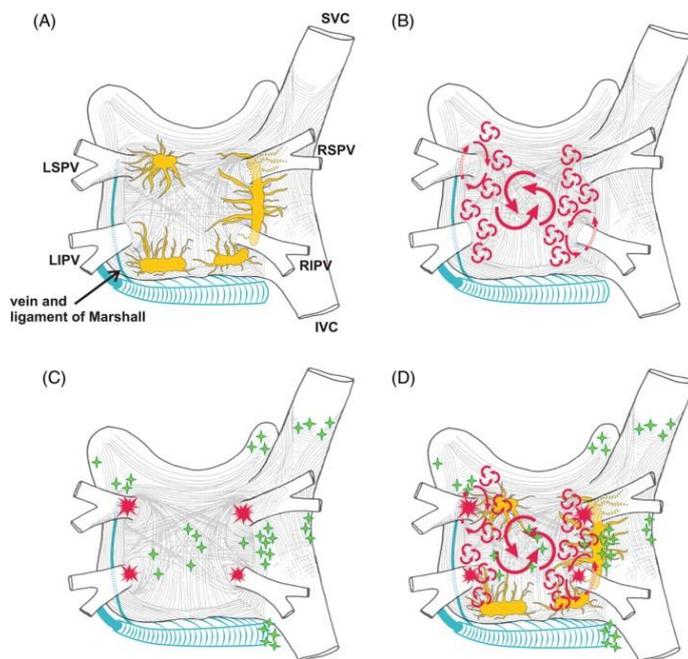


Abbildung 2: Darstellung verschiedener pathophysiologischer Aspekte bei VHF [4]: A) Autonome Plexus im Bereich der Vorhöfe inkl. Marshall-Band (siehe Pfeil); B) Mutterrotor als VHF-Trigger und resultierende kleine Erregungskreisläufe; C) Lokalisation von Foci, die VHF triggern innerhalb (rot) und außerhalb (grün) der Pulmonalvenen; D) Synopsis der dargestellten Mechanismen. LIPV + LSPV = untere + obere linke Pulmonalvene, RIPV + RSPV = untere + obere rechte Pulmonalvene, IVC + SVC = untere + obere Hohlvene.

Bei anhaltenden Formen von VHF sind die ektopen Foci, die VHF triggern können, diffuser sowohl über dem linken als auch rechten Vorhof verteilt (siehe Abbildung 2C) [9]. Es wird angenommen, dass atriales Remodeling, also Umbauprozesse im Vorhofgewebe, die im Verlauf von Vorhofflimmern auftreten, ursächlich für die Entwicklung dieser diffus verteilten ektopen Foci sind. Gleichzeitig wird angenommen, dass elektrophysiologische und strukturelle Veränderungen, die bei atrialem Remodeling auftreten, wesentlich zur Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns beitragen

[12]. Schon innerhalb der ersten Tage nach Beginn einer VHF-Episode kommt es in den Vorhöfen zu einem arrhythmiestabilisierenden elektrischen Remodeling [3]. Bei diesem Prozess spielt eine durch veränderte Ionenkanaleigenschaften verkürzte Aktionspotentialdauer eine wichtige Rolle. Es kommt dabei einerseits zu einer Hochregulierung repolarisierender Kaliumströme, insbesondere über den Kaliumeinwärtsgleichrichter I_{K1} und andererseits zu einer Herunterregulierung des depolarisierenden Calciumeinstroms über den L-Typ Calciumkanal [10]. Neben der Veränderung elektrophysiologischer Eigenschaften laufen auch strukturelle Veränderungen ab: Durch inflammatorische Prozesse und Fibrosierung kommt es zu einer elektrischen Dissoziation der Vorhofmyozyten, was eine unstete Erregungsausbreitung bedingt und so die Entstehung von kreisenden Erregungen fördert [10] [8]. Die Kombination aus strukturellen und elektrophysiologischen Veränderungen kann ebenfalls die Entstehung relativ großer, stabiler Reentryphänomene bedingen, sogenannter Mutterrotoren, die in ihrer Peripherie wiederum kleinere Erregungskreisläufe initiieren und so als Trigger von VHF fungieren können (siehe Abbildung 2B) [10]. Kardiales Remodeling tritt jedoch nicht nur bei VHF auf, sondern auch und vor allem bei kardialen Grunderkrankungen wie der Koronaren Herzkrankheit (KHK), Erkrankungen der Herzklappen, insbesondere Mitralvitien, oder Herzinsuffizienz [10]. Es ist daher konsistent, dass bei Patienten mit schwerwiegenden kardialen Grunderkrankungen eine schnellere Progredienz zu anhaltenden Formen von VHF besteht und öfter bereits bei Erstdiagnose persistierendes VHF vorliegt [13].

1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie von Vorhofflimmern

Die unter 1.1.3 beschriebenen Mechanismen verhindern eine koordinierte atriale Kontraktion und damit einen effizienten Blutauswurf. Zudem kann die hochfrequente Vorhoferregung bei tachykarder Überleitung zu einer Tachyarrhythmie auf Kammerebene führen. Der Wegfall der Vorhofpumpfunktion führt zu einer Verminderung des Schlagvolumens (SV) um 5-15%, bei Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion kommt es zu einer noch deutlicheren Reduktion des SV. Bei tachykarder Überleitung und daraus resultierender hoher Kammerfrequenz kommt es zu einer Behinderung der diastolischen Füllung der Ventrikel und damit zu einer weiteren Verminderung des SV. Zusätzlich kommt es durch unregelmäßige Kammerzyklen, die

Einleitung

der unregelmäßigen Erregungsausbreitung geschuldet sind, zum Auswurf unterschiedlich großer Schlagvolumina [3].

Die Verminderung des Schlagvolumens und die Unregelmäßigkeit der Herzaktionen können zu folgenden typischen Symptomen führen [5]:

- Verminderte Leistungsfähigkeit
- Palpitationen
- Dyspnoe
- Schwindel
- Synkopen
- Angstgefühl
- Polyurie
- Unregelmäßiger Puls mit Pulsdefizit

Meist treten typische Symptome während der VHF-Episoden bei paroxysmalem VHF auf, Vorhofflimmern kann aber auch still, d.h. symptomlos ablaufen [5]. Die Schwere der Symptome kann laut der European Heart Rhythm Association (EHRA) in fünf Stadien eingeteilt werden (siehe Tabelle 2). Eine solche Einteilung ist zur Dokumentation des Krankheitsverlaufs und zur Findung einer Therapieentscheidung sinnvoll [3]

Tabelle 2: Überarbeitete Stadieneinteilung der Schwere von VHF-Symptomen laut EHRA [2]

EHRA Stadium	Bedeutung
1	Keine Symptome
2a	Milde Symptome ohne Behinderung der Aktivitäten des täglichen Lebens
2b	Moderate Symptome ohne Behinderung der Aktivitäten des täglichen Lebens, jedoch belastend für Patienten
3	Schwere Symptome mit Behinderung der Aktivitäten täglichen Lebens
4	Sehr schwere Symptome, die Aktivitäten des täglichen Lebens verhindern

Eine VHF-Episode wird mittels EKG diagnostiziert. Laut den Kriterien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) müssen, um die Diagnose VHF stellen zu können, folgende elektrokardiographischen Charakteristika mindestens so lange vorliegen,

Einleitung

damit sie mittels Oberflächen-EKG oder einem implantierten Gerät dokumentiert werden können [3], (vgl. Beispiel-EKG. Abb. 3):

- Vorliegen von absolut unregelmäßigen RR-Intervallen
- Absenz eindeutig abgrenzbarer P-Wellen
- Dauer eines Vorhofzyklus (sofern erkennbar) < 200ms (d.h. Vorhoffrequenz > 300/min)

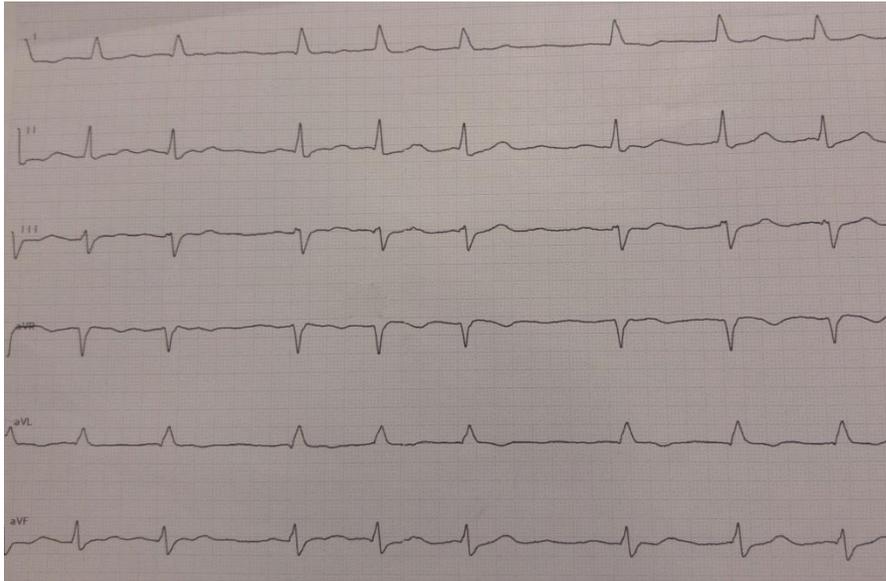


Abbildung 3: Beispiel-EKG (aus Übersichtsgründen sind die Brustwandableitungen nicht dargestellt): VHF, Linkslagetyp, HF um 100/min. Es sind keine P-Wellen zu erkennen, die RR-Intervalle sind unregelmäßig. Mit freundl. Genehmigung: Prof. Dr. B. Pieske, Klinik f. Kardiologie, Charité, CVK.

Die Diagnose von paroxysmalem VHF kann schwierig sein, da die Arrhythmie nur anfallsweise auftritt. Es sollte versucht werden, ein EKG abzuleiten, während Symptome auftreten. Dazu kann die Durchführung eines Langzeit-EKGs nötig sein. Neben der EKG-Dokumentation ist auch eine ausführliche Anamnese sowie körperliche Untersuchung nötig, um Symptome von VHF und Vorerkrankungen, die VHF auslösen oder im seinem Verlauf beeinflussen können, zu erkennen. Bei Verdacht auf eine kardiale Grunderkrankung sollte eine Echokardiographie durchgeführt werden [3]

Vorhofflimmern kann auch dann, wenn es symptomfrei abläuft, schwerwiegende Komplikationen hervorrufen: Zum einen können sich aufgrund der stark verminderten Flussgeschwindigkeit des Blutes in den Vorhöfen Thromben bilden, die Schlaganfälle und andere Embolien auslösen können. Die Prädilektionsstelle ist hierbei das linke Vorhofohr. Zum anderen kann es bei entsprechend hochfrequenter Überleitung der Vorhoferregung auf die Kammern zu einer Tachyarrhythmie und in der Folge zu einer

Einleitung

akuten Linksherzinsuffizienz kommen [5]. Alle nachfolgend beschriebenen therapeutischen Ansätze haben das Ziel solche Komplikationen zu verhindern und VHF-assoziierte Symptome zu lindern [3].

Neben einer leitliniengerechten Therapie von Grunderkrankungen, die VHF beeinflussen, können grundsätzlich zwei therapeutische Optionen unterschieden werden, die als prognostisch gleichwertig anzusehen sind [14]: Frequenzkontrolle und Rhythmuskontrolle. Unter Frequenzkontrolle versteht man Bemühungen, die Kammerfrequenz trotz Vorhofflimmerns zu normalisieren [5]. Die Intention, eine Konversion in den Sinusrhythmus herzustellen, sieht das Konzept der Frequenzkontrolle nicht vor. Gelingt es, Symptome von VHF mittels Frequenzkontrolle suffizient einzudämmen, dann stellt diese ein geeignetes Therapiekonzept dar und es sollte, insbesondere bei älteren Patienten, keine Rhythmuskontrolle angestrebt werden [3]. Zur Frequenzkontrolle werden Betablocker, Calciumantagonisten vom Diltiazem- und Verapamil-Typ und Digitalis eingesetzt, wobei die Auswahl des anzuwendenden Medikaments immer individuell, unter Berücksichtigung bestehender Begleiterkrankungen und der aktuellen Lebenssituation, getroffen werden sollte (siehe Abbildung 4 und Tabelle 3) [3].

Einleitung

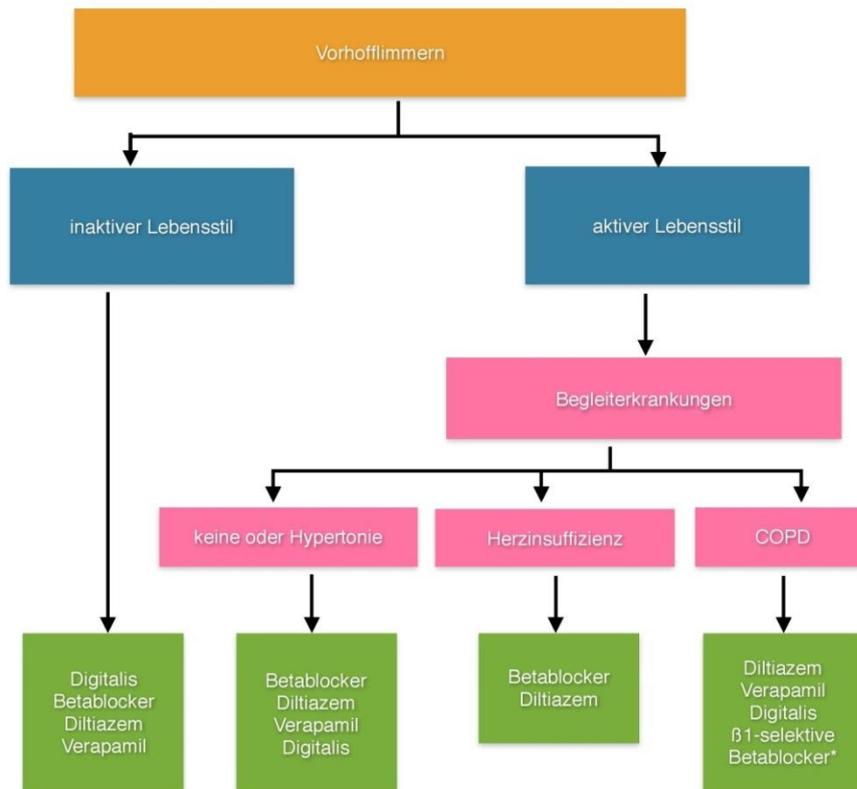


Abbildung 4: Fließschema zur Frequenzkontrolle: Auswahl eines geeigneten Wirkstoffs unter Berücksichtigung von Begleiterkrankungen und Lebensstil laut ESC-Leitlinien 2010 [3]. COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung.

Unter Rhythmuskontrolle wird ein therapeutisches Konzept verstanden, dass darauf zielt, eine Konversion in den Sinusrhythmus herzustellen und diesen (gegebenenfalls mit antiarrhythmischer Pharmakotherapie) zu erhalten [5]. In der Praxis kann zwar meist eine Reduktion der VHF-Rezidive erreicht werden, eine vollkommene Rezidivfreiheit ist jedoch schwer zu erreichen (siehe 1.2.3). Die Hauptindikation der Rhythmuskontrolle ist die Minimierung von VHF-Symptomen, die durch Frequenzkontrolle nicht ausreichend gelindert werden können [3]. Problematisch sind sowohl proarrhythmogene Eigenschaften als auch schwerwiegende Nebenwirkungen der eingesetzten Pharmaka (vgl. Tabelle 3). Abbildung 5 verdeutlicht, welche Überlegungen bei der Auswahl des geeigneten Pharmakons eine Rolle spielen.

Einleitung

Tabelle 3: Zur Rhythmuskontrolle empfohlene Medikamente laut ESC Leitlinien 2016 [2]; HF = Herzinsuffizienz, Krea-CI = Kreatinin-Clearance.

Medikament	Indikation	Einschränkungen (Auswahl)	
Amiodaron	Patienten mit Herzinsuffizienz	Effektivstes Antiarrhythmikum, wegen schwerwiegender UAW nur 1. Wahl bei Herzinsuffizienz; QT-Zeit verlängernd.	
Dronedaron	Geeignet bei KHK und Arterieller Hypertonie	Erste Wahl bei Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung	
Flecainid	Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung		Kontraindiziert bei HF, KHK, Krea-CI. < 50 mg/ml, Lebererkrankung
Propafenon	Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung		Kontraindiziert bei Herzinsuffizienz und KHK
Sotalol	Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung		Kontraindiziert bei Herzinsuffizienz, linksventrikulärer Hypertrophie, vorbestehende QT-Zeit-Verlängerung, Hypokaliämie, Kreatinin-Clearance < 50 mg/ml

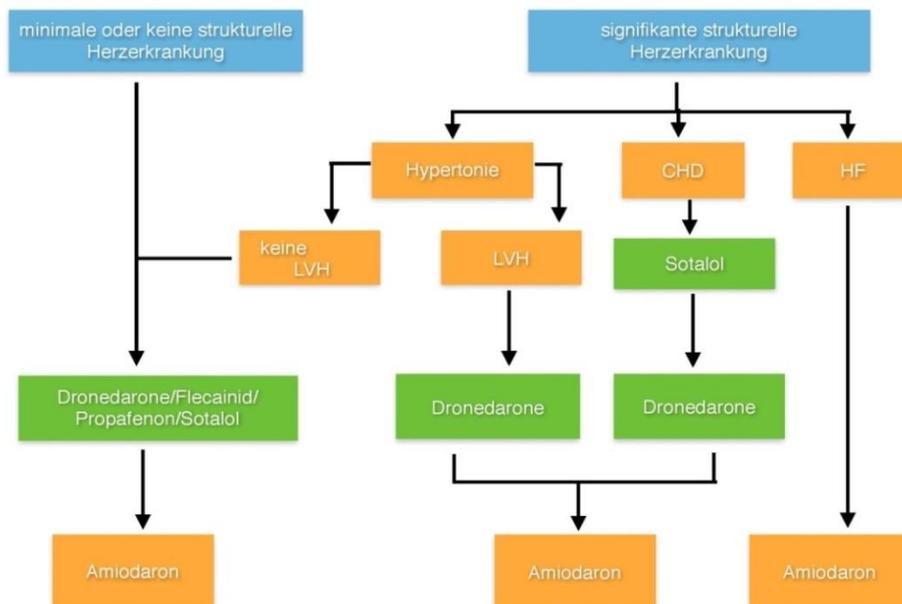


Abbildung 5: Fließschema zur Rhythmuskontrolle: Auswahl des geeigneten Antiarrhythmikums unter Berücksichtigung der Vorerkrankungen nach ESC Leitlinienupdate 2012 [1]. CHD=Koronare Herzkrankheit, LVH= Linksventrikuläre Hypertrophie, HF=Herzinsuffizienz.

Einleitung

Bei persistierendem VHF erfolgt zur Konversion in den Sinusrhythmus eine Kardioversion. Diese kann auf medikamentösem (medikamentöse Kardioversion) und elektrischem Wege (Elektrokardioversion) nach echokardiographischem Ausschluss von Vorhofthromben oder dreiwöchiger Antikoagulation erfolgen [1] (siehe Abbildung 6). Eine elektrische Kardioversion ist auch bei hämodynamischer Instabilität bzw. Präferenz des Patienten indiziert [15]. Zur medikamentösen Kardioversion sind in Deutschland die Wirkstoffe Amiodaron, Flecainid, Propafenon und Vernakalant zugelassen, wobei eine antiarrhythmische Prämedikation mit einem der in Tabelle 3 dargestellten Pharmaka die Wahrscheinlichkeit einer Konversion in den Sinusrhythmus erhöht [3].

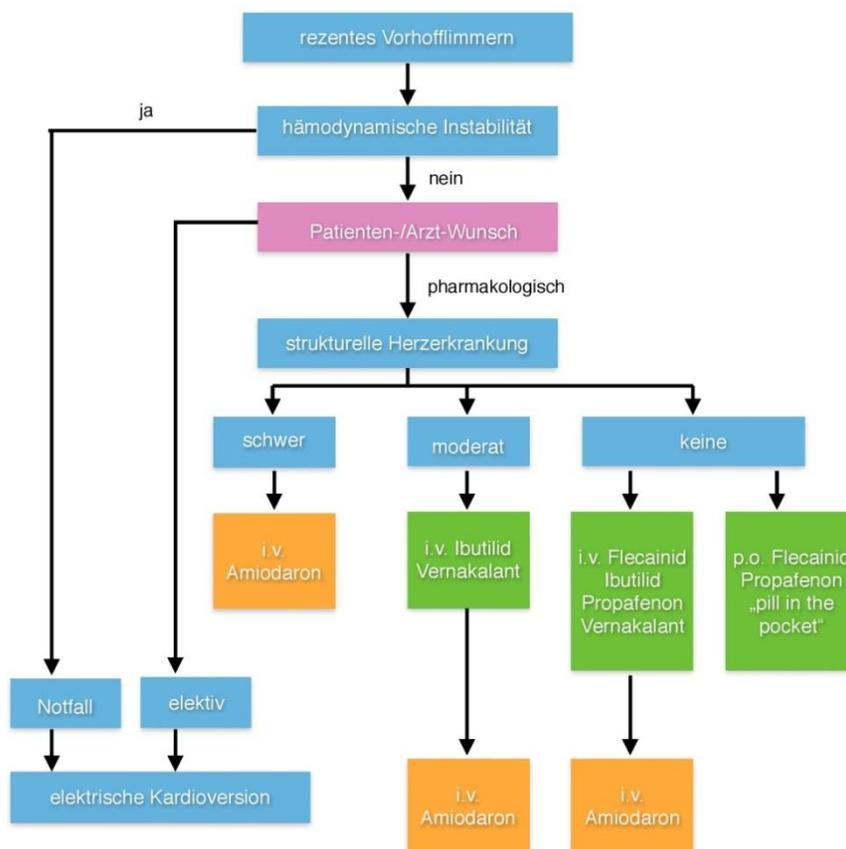


Abbildung 6: Fließschema zur Kardioversion laut ESC-Leitlinien 2010 [3]. Anmerkung: Ibutilid ist in Deutschland nicht zugelassen.

Unabhängig von den beiden therapeutischen Konzepten Frequenz- und Rhythmuskontrolle, muss nach Diagnose von VHF aufgrund des erhöhten Schlaganfall-Risikos immer eine orale Antikoagulation erwogen werden. Dies gilt für paroxysmales VHF gleichermaßen wie für die anhaltenden Formen von VHF, da das Schlaganfallrisiko in etwa gleich hoch ist [16]. Die Erwägung, ob eine orale

Einleitung

Antikoagulation angezeigt ist, sollte auf der Grundlage des individuellen Schlaganfall- und Blutungsrisikos erfolgen, welche mit dem CHA₂DS₂-VASc-Score (siehe Tabelle 4) und dem HAS-BLED-Score eingeschätzt werden können [3]. Der CHA₂DS₂VASc-Score berücksichtigt die Hauptrisikofaktoren für das Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls bei Patienten mit VHF. Die Punktzahl wird addiert, ab zwei Punkten (Männer) bzw. drei Punkten (Frauen) besteht die Indikation zur oralen Antikoagulation, bei einem Punkt (Männer) bzw. zwei Punkten (Frauen) sollte sie erwogen werden [2]. Die Bedeutung des HAS-BLED-Scores wurde von den neuen VHF Leitlinien 2016 abgeschwächt, es wird eher die Reduktion (möglicherweise) reversibler Blutungsrisikofaktoren in den Mittelpunkt gestellt [2].

Tabelle 4: CHA₂DS₂-VASc-Score [17]. 1) Vaskuläre Erkrankungen wie KHK, pAVK etc.

Buchstabe	Bedeutung	Punktzahl
C (congestive heart failure)	Herzinsuffizienz	1
H (hypertension)	Arterielle Hypertonie	1
A₂ (age)	Alter > 75	2
D (diabetes)	Diabetes mellitus	1
S₂ (stroke)	Durchgemachter Schlaganfall/TIA	2
V (vascular disease)	Vaskuläre Erkrankungen ¹	1
A (age)	Alter 65 - 74	1
Sc (sex category)	Weibliches Geschlecht	1

Zur oralen Antikoagulation bei Vorhofflimmern werden von den ESC-Leitlinien 2016 Antagonisten mittlerweile primär sogenannte neue orale Antikoagulantien (NOAKs), wie die Faktor-Xa-Inhibitoren Apixaban, Rivaroxaban und Edoxaban, sowie der direkte Thrombininhibitor Dabigatran, empfohlen. Daneben spielen aber auch die seit langem eingesetzten Vitamin-K-Antagonisten weiterhin eine wichtige Rolle, insbesondere sind sie als einziges Medikament zugelassen bei zudem bestehendem mechanischen Klappenersatz oder mindestens mittelgradiger Mitralkappenstenose. Bei Vorliegen von Kontraindikationen gegen eine orale Antikoagulation kann ein interventioneller (oder operativer) Verschluss des linken Vorhofohres erwogen werden [2].

Neben den genannten therapeutischen Strategien gibt es zudem zwei kurative Ansätze: Die chirurgische Ablation, bei der eine Substratmodifikation mit chirurgischen Mitteln durchgeführt wird, sowie die Katheterablation, bei der in erster Linie ektopie Foci aus den Pulmonalvenen, die VHF initiieren, vom Vorhofgewebe isoliert werden [4]. Letztere

wurde in den letzten zehn Jahren weltweit zu einer Standardtherapie bei VHF etabliert und wird im folgenden Kapitel ausführlich betrachtet.

1.2 Pulmonalvenenisolation bei Vorhofflimmern

1.2.1 Überblick

Die Katheterablation ist heute ein Standardeingriff in der Therapie von Vorhofflimmern und wird in den meisten größeren kardiologischen Kliniken angeboten. Sie ist ein kurativer Ansatz mit dem Ziel, Rezidive von VHF zu verhindern oder zumindest deutlich zu reduzieren und somit VHF-assoziierte Komplikationen zu minimieren und die Lebensqualität der Patienten zu verbessern [4]. Die ersten Versuche VHF durch Kathetereingriffe zu behandeln, bei denen im Grunde versucht wurde, die Techniken der chirurgischen Maze-III-Operation auf interventionellem Wege anzuwenden, waren komplikationsreich und wenig erfolgreich [4]. Neue und erfolgversprechendere Versuche erfolgten durch die französische Arbeitsgruppe um Haissaguerre et al., die darauf zielte, fokale Arrhythmietrigger innerhalb der Pulmonalvenen, die bei der Mehrheit der Patienten VHF auslösen, mit Hilfe von mit Kathetern applizierter Radiofrequenzenergie elektrisch vom Vorhofmyokard zu isolieren. Nachdem zuvor bereits im Tierexperiment fokale Arrhythmieherde induziert und ablatiert worden waren [18], beschrieb diese Arbeitsgruppe erstmals die erfolgreiche Beendigung von VHF am Menschen durch Ablation von fokalen Triggern in den Pulmonalvenen [6]. Dies kann rückblickend als die Geburtsstunde der Pulmonalvenenisolation (PVI) angesehen werden, die in der Folge zahlreichen Evolutionen hinsichtlich Ablationstechnik, angestrebter Endpunkte sowie verwendeter Katheter und Mappingsysteme unterlag. Der heutige Standard ist die großflächige zirkumferentielle Pulmonalvenenisolation, bei der die Ablationslinie im Vorhofantrum mit Sicherheitsabstand zu den Pulmonalvenenostien gesetzt wird (vgl. Abbildung 7) [19]. Angestrebter Endpunkt ist die vollständige elektrische Isolation der Pulmonalvenen mit Verifikation des Leitungsblocks (genauere Beschreibung der Durchführung der PVI siehe 2.3.1) [20].

Einleitung

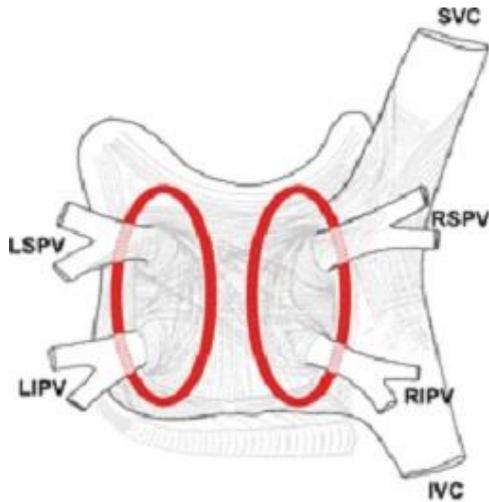


Abbildung 7: Technik der zirkumferentiellen Pulmonalvenenisolation [4]. Die Ablationslinie ist rot dargestellt. LIPV + LSPV = untere + obere linke Pulmonalvene, RIPV + RSPV = untere + obere rechte Pulmonalvene, IVC + SVC = untere + obere Hohlvene.

Es kommen heute meist zirkuläre multipolare Mappingkatheter und kontinuierlich gekühlte Ablationskatheter zum Einsatz, was Überhitzung und Koagulation vorbeugt. Zusätzlich zu Röntgendurchleuchtung und Kontrastmittelangiographie werden heute in den meisten Zentren dreidimensionale elektroanatomische Mappingsysteme eingesetzt [4]. Durch die steten technischen Verbesserungen und die zunehmende Erfahrung der Untersucher haben sich die Ergebnisse der Katheterablation in den Jahren seit ihrer Einführung deutlich verbessert [21]. Trotz der beachtlichen Erfolge erleidet eine beträchtliche Zahl der ablatierten Patienten VHF-Rezidive und es bestehen eine Reihe offener Fragen, die der Klärung bedürfen. Hierzu gehören die richtige Patientenauswahl für die Ablation, die anzuwendende Ablationstechnik bei persistierendem VHF und die Mechanismen, die der Entstehung von VHF-Rezidiven zugrunde liegen [20].

1.2.2 Erfolg und Komplikationen der Katheterablation

Grundsätzlich bereitet es Schwierigkeiten, die Erfolgsraten der Katheterablation bei VHF anzugeben. Zwar gibt es eine Vielzahl an Studien, in denen dies untersucht wurde, allerdings wird Erfolg dabei teils sehr unterschiedlich definiert und es kommen unterschiedliche Standards hinsichtlich Ablationsstrategie und Follow-up zur Anwendung. In einer von Cappato et al. durchgeführten weltweiten Befragung von Zentren, an denen in den Jahren 2003 bis 2006 Katheterablationen bei insgesamt 16309 Patienten durchgeführt wurden, zeigte sich hinsichtlich Freiheit von symptomatischen VHF-Episoden nach PVI eine mittlere Erfolgsrate von 70% ohne weitere Einnahme von Antiarrhythmika bzw. eine Erfolgsquote von 80% bei weiterer Einnahme der zuvor ineffektiven antiarrhythmischen Medikation. Eine zweite Ablation

Einleitung

war bei 27% der Patienten notwendig [21]. Kritisch muss in Bezug auf diese Daten angemerkt werden, dass in den unterschiedlichen befragten Zentren uneinheitliche Follow-up-Regime zum Einsatz kamen und dass das Follow-up mit 10 Monaten im Mittel insgesamt eher kurz war. Eine große Metaanalyse, in der die Langzeitergebnisse nach Katheterablation untersucht wurden, berichtete allerdings ähnliche Daten: Dieser Publikation zufolge waren nach einem Jahr 85.7%, nach drei Jahren 79.3% und nach fünf Jahren 77.8% der ablatierten Patienten frei von VHF-Rezidiven [22]. Beachtet werden sollte, dass die Ablationserfolgsraten bei paroxysmalem VHF und persistierendem VHF unterschiedlich sind. In der beschriebenen Umfrage von Cappato et al zeigte sich bei Patienten mit paroxysmalem VHF eine Erfolgsquote von 74,9% ohne weitere Einnahme von Antiarrhythmika (AA) und 84,0% bei fortgesetzter Einnahme. Demgegenüber zeigte sich bei den Patienten mit persistierendem VHF ein Ablationserfolg von 64,8% respektive 74,8% (mit AA). Bei den Patienten mit langanhaltend-persistierendem VHF waren 63,1% respektive 71,0% (mit AA) der Patienten frei von symptomatischen VHF-Rezidiven.

Tabelle 5: Erfolgsraten der Katheterablation von VHF nach im Mittel 10 Monaten Follow-up [21]. AA = Antiarrhythmika

	ohne AA-Einnahme	mit AA-Einnahme
Paroxysmales VHF	74,9%	84,0%
Persistierendes VHF	64,8%	74,8%
Langanhaltend-pers. VHF	63,1%	71,0%
Insgesamt	70,0%	80,0%

An diesen, aber auch vielen anderen veröffentlichten Daten zeigt sich, dass eine Katheterablation bei persistierendem VHF schwieriger und auch weniger erfolgsversprechend ist als bei paroxysmalem VHF. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass Patienten mit persistierendem VHF häufiger von kardialen und extrakardialen Begleiterkrankungen betroffen sind, welche Remodeling-Vorgänge am Herzen auslösen. In deren Folge kommt es dazu, dass Arrhythmietrigger diffus über die Vorhöfe verteilt sind und dass die Vorhöfe insofern strukturell verändert werden, dass sie die Aufrechterhaltung von VHF begünstigen [3]. Zum anderen befinden sich viele Patienten mit persistierendem VHF in einem fortgeschrittenen Stadium der voranschreitenden Erkrankung VHF, die ihrerseits auch substratverändernde Remodeling-Vorgänge auslöst (siehe 1.1) [3]. Eine wichtige Rolle spielt dabei sicherlich neben der geschilderten komplexeren Pathophysiologie mit diffus verteilten

Einleitung

arrhythmogenen Foci, dass bislang keine universell anerkannte Ablationsstrategie entwickelt wurde, die dieser komplexen Pathophysiologie gerecht wird [20]. Den beschriebenen Erfolgsraten der Katheterablation müssen ihre Komplikationen gegenübergestellt werden. Laut der bereits zuvor zitierten weltweiten Umfrage von Cappato et al., in der 85 Zentren zu 20850 Interventionen bei über 16000 Patienten befragt wurden, treten nach etwa 4,5% aller Katheterablationen schwerwiegende Komplikationen auf. Die wichtigsten Komplikationen und ihre Häufigkeiten laut Cappato et al. sind in Tabelle 6 dargestellt. Es muss kritisch angemerkt werden, dass aufgrund der freiwilligen Teilnahme an der Umfrage die Komplikationsrate eher unterschätzt als überschätzt wird.

Tabelle 6: Wichtigste Komplikationen nach Katheterablation [21]; TIA = Transitorische Ischämische Attacke.

Art der Komplikation	Häufigkeit in %
Tod	0,15
Perikardtamponade	1,31
Arteriovenöse Fistel	0,93
Femorales Pseudoaneurysma	0,54
TIA	0,71
Schlaganfall	0,23
Interventionsbedürftige Pulmonalvenenstenose	0,29
Atrioösophageale Fistel	0,07
Läsion des N. phrenicus	0,17
Pneumothorax	0,09
Hämatothorax	0,02
Herzklappenverletzung	0,04
Endokarditis/Sepsis	0,01
Gesamt	4,54

1.2.3 Indikation der Katheterablation bei Vorhofflimmern

Die Katheterablation steht als therapeutisches Verfahren in Konkurrenz zur (alleinigen) medikamentösen Rhythmuskontrolle. Für Patienten ohne schwerwiegende Grunderkrankungen, die paroxysmales VHF haben und trotz antiarrhythmischer Medikation an VHF-Symptomen leiden, konnte die Überlegenheit der Katheterablation in einer Vielzahl an Studien gezeigt werden [3] (Auswahl siehe Tabelle 7):

Einleitung

Tabelle 7: Vergleich der Erfolgsraten von Katheterablation und medikamentöser Rhythmuskontrolle bei paroxysmalem VHF [3]. 1: Follow-up-Spanne: 12 Monate; 2: Abl-Gr. = Ablationsgruppe, AA-Gr. = Antiarrhythmika-Gruppe, AA = Antiarrhythmika.

Studie	Patienten (n)	ØAlter (Jahre)	Re-Ablation notwendig	VHF-frei nach Ablation¹	VHF-frei mit AA-Therapie¹
Wazni et al 2005	70	53±8 Abl-Gr. ² 54±8 AA-Gr. ²	12%	87%	37%
Pappone et al 2006	198	55±10 Abl-Gr. 57±10 AA-Gr.	9%	86%	22%
Jais et al 2008	112	51±11	1,8±0,8 Ablationen/Pat.	89%	23%
Wilber et al 2010	167	56	12,6%	66%	16%

Darüber hinaus hat sich in zwei multizentrischen randomisierten prospektiven Studien, die die Katheterablation als initiale rhythmuserhaltende Therapie bei Patienten mit paroxysmalem VHF mit der medikamentösen Rhythmuskontrolle verglichen haben, eine Überlegenheit der Katheterablation hinsichtlich Freiheit von VHF-Rezidiven und Lebensqualität gezeigt [23] [24]. Auch bei persistierendem Vorhofflimmern ist die Effektivität der Katheterablation als rhythmuserhaltende Therapie – trotz komplexerer Ablationsbedingungen – belegt [25, 26]. Auch wenn die Erfolgsraten nicht so gut sind wie bei der Ablation von paroxysmalem VHF und meist Re-ablationen notwendig sind, konnte eine Überlegenheit gegenüber der (alleinigen) medikamentösen Rhythmuskontrolle gezeigt werden. [27].

In Einklang mit der geschilderten wissenschaftlichen Evidenz ist laut dem Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie von 2016 eine Katheterablation empfohlen bei Patienten mit paroxysmalem VHF, bei denen trotz antiarrhythmischer Medikation symptomatische VHF-Episoden auftreten (Ia-Indikation). Weiterhin wird empfohlen, eine Katheterablation bei Patienten mit paroxysmalem symptomatischem VHF auch als erste rhythmuserhaltenden Intervention zu erwägen (IIa-Indikation), sofern es sich um junge Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung handelt, bei denen Komplikationen eher unwahrscheinlich sind. Für Patienten mit persistierendem VHF empfehlen die aktuellen Leitlinien von 2016 eine Katheterablation dann zu erwägen (IIa Indikation), wenn mit medikamentöser antiarrhythmischer Therapie keine ausreichende Symptomkontrolle gelingt und ein entsprechender Patientenwunsch sowie eine Empfehlung eines „VHF Herz-Teams“ vorliegt. Die Involvierung von VHF-Herzteams ist eine Neuerung der

aktuellen Leitlinien. Bei komplexen Fällen soll ein solches Team, bestehend aus konservativen Kardiologen, interventionellen Elektrophysiologen sowie ggf. Herzchirurgen und Neurologen, hinzugezogen werden. Bei Patienten mit relevanten strukturellen Herzerkrankungen bzw. Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion sollte eine Ablation ebenfalls dann erwogen werden, wenn trotz Therapie mit Antiarrhythmika schwerwiegende Symptome bestehen, sowie wenn eine Tachymyopathie vermutet wird (IIa Indikation) [2]. Bei solchen Patienten sind Katheterablationen komplexer und komplikationsreicher, allerdings ist eine dauerhafte Therapie mit dem Amiodaron ebenfalls mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden [3]. All diese Empfehlungen werden insofern eingeschränkt, dass sie voraussetzen, dass die Ablation von einem erfahrenen Team in einem Zentrum mit ausreichender Erfahrung durchgeführt wird und dass eine vorsichtige und informierte Patientenauswahl erfolgt [1] [3].

1.2.4 Rezidiv nach Pulmonalvenenisolation

Die oben geschilderten Ergebnisse der Pulmonalvenenisolation zeigen, dass ein beträchtlicher Teil der ablatierten Patienten Rezidive erleiden: Abhängig davon, auf welche Daten man sich stützt, liegen die Rezidivraten nach einmaliger Katheterablation zwischen 20 und 40% bei paroxysmalen VHF und zwischen 30 und 50% bei persistierendem VHF [20]. Am höchsten scheint das Rezidivrisiko zwischen sechs und zwölf Monaten nach der Ablation zu sein [4]. Grundsätzlich, das zeigen die genannten Erfolgsraten, haben Patienten mit persistierendem VHF ein höheres Risiko ein VHF-Rezidiv zu erleiden. Dafür gibt es eine Reihe von Gründen: Zum einen haben Patienten mit persistierendem VHF meist mehr und schwerere Grunderkrankungen, von denen einige Prädiktoren für die Entstehung von Rezidiven nach Ablation sind. So haben Grunderkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes, Schlafapnoesyndrom, Hypercholesterinämie, und Adipositas prädiktiven Wert für ein erhöhtes Rezidivaufreten. Auch linksventrikuläre Dysfunktion und große Vorhöfe (LAD >45mm), häufig eine Folge kardialer Grunderkrankungen, machen Rezidive wahrscheinlicher [4, 22, 28]. Zum anderen haben Patienten mit persistierendem VHF häufig eine längere VHF-Anamnese. Dies bedeutet, dass Remodelingprozesse, die im Rahmen der Erkrankung auftreten und strukturelle und elektrophysiologische Veränderungen hervorrufen, weiter vorangeschritten sind (siehe 1.1.2). In der Folge sind ektope erregungsbildende Foci diffuser über die Vorhöfe verteilt. Sie werden möglicherweise im

Einleitung

Rahmen der Katheterintervention bewusst oder unbewusst nicht ablatiert und können später Rezidive auslösen [4]. Neben der nicht erfolgten Ablation von ektopten Triggern, ist es vor allem aber die Regeneration von ablatiertem Gewebe, die, unabhängig von der Art des Vorhofflimmerns, vordergründig für die Entstehung von VHF-Rezidiven verantwortlich ist. Zum einen wird angenommen, dass die Regeneration von autonomen Nervenplexus im Vorhofantrum, die bei der PVI aufgrund ihrer anatomischen Lage teilweise mitablatiert werden, eine Rolle spielt. Diesen vegetativen Nerven wird Einfluss auf die Entstehung von VHF zugeschrieben, sie könnten also auch Rezidive auslösen [4]. Der dominante Mechanismus der Rezidiventstehung ist allerdings die Regeneration der elektrischen Leitfähigkeit im Bereich der zirkulären Ablationslinie um die Pulmonalvenen: Bei einer überwältigenden Mehrheit von Patienten mit VHF-Rezidiven nach PVI wird eine Rekonnexion der Pulmonalvenen beobachtet: Neben anderen Arbeitsgruppen konnten Ouyang et al zeigen, dass bei 62 von 64 Patienten (94%), die aufgrund eines Rezidivs nach verifizierter kompletter Pulmonalvenenisolation einer Reablation unterzogen wurden, intrainerventionell Lücken in der vormals intakten Narbenlinie nachgewiesen werden konnten, durch die elektrische Impulse aus den Pulmonalvenen in den Vorhof fortgeleitet wurden [29]. Man kann unterscheiden zwischen akuter Pulmonalvenenrekonnexion, die innerhalb von 90 Tagen auftritt und später Pulmonalvenenrekonnexion. Zu einer akuten Pulmonalvenenrekonnexion kommt es, wenn es während der PVI nicht gelang eine transmurale Läsion zu setzen [30]. Die Mechanismen, die einer späten Rekonnexion zugrunde liegen sind bislang ungeklärt. Es gibt allerdings Hinweise, dass inflammatorische Prozesse, von denen angenommen wird, dass sie an der Pathophysiologie von VHF beteiligt sind [31], dabei eine Rolle spielen. Letsas et al identifizierten die Erhöhung der weißen Blutkörperchen über 6280 mm^3 als unabhängigen Prädiktor für ein erhöhtes Rezidivaufreten [32]. Daneben gibt es auch Hinweise, dass genetische Aspekte für die Rezidiventstehung von Bedeutung sind. Zwei Single Nukleotid Polymorphismen auf Chromosom 4q25 haben ebenfalls prädiktiven Wert für das Auftreten von Rezidiven nach Ablation [33].

1.3 Genetische Aspekte bei Vorhofflimmern

1.3.1 Überblick

Genetische Aspekte von Erkrankungen sind in den letzten Jahren überall in der Medizin verstärkt untersucht worden, so auch in der Rhythmologie. Etwa 15-36% der Patienten mit VHF haben idiopathisches VHF (loneAF). Bei ihnen lässt sich keine fassbare

Einleitung

Ursache für die Erkrankung feststellen und bei ca. 15% dieser Patienten besteht anamnestisch eine familiäre Häufung [34]. Darüber hinaus haben Kinder, die mindestens ein Elternteil mit VHF haben, unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren ein erhöhtes Risiko, an VHF zu erkranken [35]. Daraus kann gefolgert werden, dass genetische Faktoren an der Entstehung von Vorhofflimmern eine Rolle spielen. Diese Folgerung wurde durch eine Reihe von Studien mit Familien mit familiärem VHF belegt. Es wurden in solchen Familien mehrere nach den Mendel'schen Regeln vererbte Gene identifiziert, deren Mutationen VHF auslösen. Beispielgene hierfür sind das KCNQ1-Gen oder das KCNE2-Gen, die beide für kardiale Kaliumkanäle kodieren [34]. Daneben wurde eine Vielzahl an Genen identifiziert, deren Variationen mit VHF assoziiert sind. Es wird davon ausgegangen, dass bis zu ein Drittel der VHF-Patienten Träger einer genetischen Variation sind, die zu VHF prädisponiert [2]. Zu den bisher identifizierten Genen gehören solche, die für Ionenkanäle, Strukturproteine, Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems, sowie Komponenten inflammatorischer und antiinflammatorischer Signalwege, kodieren [36]. In Tabelle 6 werden exemplarische einige Gene, deren Mutationen mit VHF zusammenhängen, dargestellt.

Tabelle 8: Beispiele für Gene, deren Mutationen mit VHF assoziiert sind

Gen	Funktion
ABCC9 [37]	Regulatorische Untereinheit SUR2A des ATP-sensitiven Kaliumkanals K_{ATP}
KCNA5 [38]	α -Untereinheit des spannungs-abhängigen Kaliumkanal Kv1.5
KCNE5 [39]	MiRP4 β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}
SCN5A [40]	Spannungsabhängiger kardialer Natriumkanal
GJA5 [41]	Atriales Gap-Junction-Protein Connexin 40
NUP155 [42]	Nukleoporin 155
NPPA [43]	Atriales Natriuretisches Peptid
ACE [44]	Angiotensin-Converting-Enzym
IL6R [45]	Interleukin-6-Rezeptor (nur in weißer Population)

Die exakten Pathomechanismen, die durch die einzelnen Mutationen ausgelöst werden, müssen genauer erforscht werden. Grundsätzlich können sie über Zunahme der Funktion (Gain-of-Function-Mutation) oder Verminderung bzw. Verlust der Funktion (Loss-of-function-Mutation) des Genprodukts vermittelt werden [3]. Pathophysiologische Korrelate sind, abhängig davon, ob es sich bei den veränderten Zielstrukturen um

Ionenkanäle, Strukturproteine oder Enzyme handelt, zelluläre Hyperexzitabilität, Verlängerung oder Verkürzung von Aktionspotentialen und Refraktärzeiten, heterogene atriale Erregungsleitungs-geschwindigkeiten und hormonelle Modulation von Ionenkanälen und atrialer Erregungszyklen [46]. Auch wenn die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse nicht im Detail verstanden sind, ist klar, dass genetische Aspekte eine wichtige Rolle bei VHF spielen und dass die Identifikation von mit VHF assoziierten genetischen Mutationen bei der Klärung pathophysiologischer Zusammenhänge und der Suche nach neuen pharmakologischen Angriffspunkten hilfreich sein könnte. Ferner ist die Detektion solcher Mutationen hilfreich bei der Identifikation von Patientengruppen, die erhöhtes Risiko haben an VHF zu erkranken oder Komplikationen von VHF zu entwickeln [34]. Nicht nur das Auftreten von VHF hängt mit genetischen Faktoren zusammen, sondern auch das Ansprechen auf verschiedene Therapiestrategien. Es konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen des ACE-Gens mit unterschiedlichem Ansprechen auf antiarrhythmische Pharmakotherapie verbunden sind [44]. Auch für die interventionelle Therapie sind genetische Aspekte von Bedeutung: Zwei Polymorphismen auf Chromosom 4q25 haben prädiktiven Wert für das Auftreten von Rezidiven nach Katheterablation [33]. Allerdings ist insgesamt, trotz der Vielzahl an Arbeiten, die sich mit genetischen Aspekten bei VHF beschäftigen, relativ wenig über den Zusammenhang genetischer Variationen mit dem Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation bekannt. Diesbezüglich ist weitere Forschung nötig und weitere Gene, die eine Rolle beim Rezidivauftreten nach Ablation spielen, sollten identifiziert werden.

1.3.2 Epoxyeicosatriensäuren und ihr Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System

Epoxyeicosatriensäuren (EETs) sind Epoxide, die durch Cytochrom-P450-Epoxygenasen aus Arachidonsäuren gebildet, und durch das Enzym lösliche Epoxidhydrolase (sEH) in ihre korrespondierenden Diole abgebaut werden. Sie stellen die Hauptmetabolite neben dem Cyclooxygenase- (COX) und Lipoxygenasesignalwegs (LOX) dritten großen Stoffwechselwegs des Arachidonsäuremetabolismus dar (vgl. Abbildung 8) [47]. Es sind vier Regioisomere bekannt: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET und 14,15-EET, die in unterschiedlicher Ausprägung kardioprotektiv wirksam sind und eine Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen positiv beeinflussen [48].

Einleitung

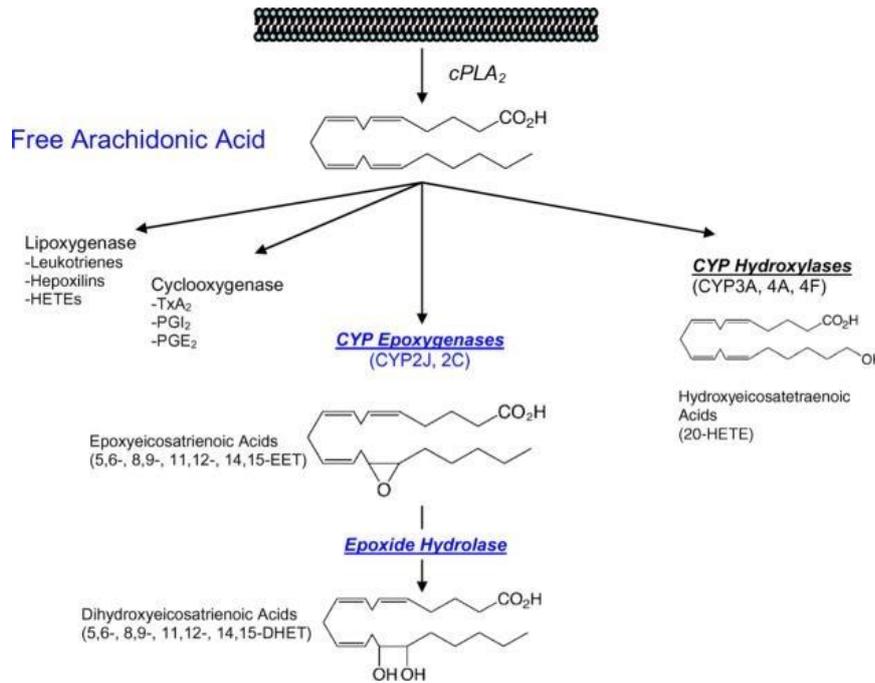


Abbildung 8: Signalwege des Arachidonsäure-Metabolismus nach Seubert et al. [49].

In den Gefäßen wirken EETs als endothelabhängige Hyperpolarisationsfaktoren (endothelium-derived hyperpolarisation factors, EDHFs): Durch Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle BK_{Ca} rufen sie eine Hyperpolarisation und damit Relaxation glatter Muskelzellen hervor, was letztlich zu einer Vasodilatation führt [50]. Die Gabe von sEHI (soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors), die eine medikamentöse Hemmung des enzymatischen Abbaus von EETs bewirken, führt daher zu Vasodilatation und hat somit antihypertensive Wirkung [51]. Dieser vasodilatatorische Effekt von EETs findet sich auch in humanen Koronararterien, in denen die beschriebenen CYP-Enzyme, die EETs herstellen, und 8,9-, 11,12- und 14,15-EETs in hoher Konzentration nachgewiesen werden konnten [52]. Weiterhin haben EETs eine potente antiinflammatorische Wirkung. Sie verhindern über Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), mit dessen Hilfe Leukozyten an die Gefäßwand andocken und behindern so das Eindringen von Leukozyten in entzündetes Gewebe [53]. Unter pharmakologischer Inhibition des enzymatischen Abbaus von EETs zeigte sich im Tiermodell zudem eine Verringerung der Plasmaspiegel der inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-12 sowie des Chemokins MCP-1 [54]. Ihre antiinflammatorische Kapazität spielt vermutlich auch bei einem weiteren positiven Effekt von EETs eine Rolle: Der günstigen Wirkung auf Arteriosklerose. An Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Abbaus von EETs zu einer

signifikant verringerten Bildung atherosklerotischer Läsionen führt [55]. Der durch EETs gehemmte Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt nicht nur eine Rolle bei Inflammation, sondern auch bei Apoptose und Zellproliferation – drei Mechanismen, die bei kardialen Remodeling von Bedeutung sind [56]. Ein weiterer wesentlicher Vorgang des kardialen Remodelings, das infolge verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen auftritt und auch in der Pathophysiologie von VHF eine wichtige Rolle spielt, ist Fibrosierung. Dabei kommt es zur Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und in der Folge zu Einlagerung von kollagenem Bindegewebe [3]. Gegen diesen Prozess üben EETs protektive Effekte aus. So zeigte sich unter sEH-Inhibition sowohl in einem Hypertrophie-Modell als auch in einem Ischämie-Modell eine signifikant verminderte Fibrosierung [54]. Darüber hinaus verbessern erhöhte EET-Spiegel die Ischämietoleranz: An isolierten Mäuseherzen konnte gezeigt werden, dass Inhibition des EET-Abbaus zu verminderter Infarzierung während Ischämie und einer besseren postischämischen linksventrikulären Funktion führt [57]. Auch auf die Erregungsausbreitung im Herzen üben EETs weitreichende Effekte aus. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass EETs von Kardiomyozyten aufgenommen und durch Beeinflussung von Ionenkanälen die kardiale Elektrophysiologie modulieren [58]: Sie hemmen die spannungsabhängigen Natriumkanäle, aktivieren die ATP-abhängigen Kaliumkanäle K_{ATP} und steigern den Calciumstrom durch die L-Typ-Calciumkanäle [58-60]. Weiterhin konnte an transgenen Mäusen gezeigt werden, dass EETs cAMP-abhängig die Aktionspotentiale von Kardiomyozyten verkürzen [61].

Aufgrund der weitreichenden kardialen Wirkungen von EETS, insbesondere der Beeinflussung des kardialen Remodelings, der Modulation kardialer Ionenkanäle und der Verkürzung der Aktionspotentialdauer von Kardiomyozyten, erscheint es wahrscheinlich, dass EETs in der Pathophysiologie von VHF eine Rolle spielen.

1.3.3 Die lösliche Epoxidhydrolase und SNPs des EPHX2-Gens

Das EPHX2-Gen, welches die lösliche Epoxidhydrolase, das Enzym, das EETs metabolisiert, kodiert, liegt in der chromosomalen Region 8 p21-12. Es weist eine Länge von etwa 45 Kilobasen (kb) auf, verfügt über neunzehn Exons mit einer Länge von 27 bis 265 Basenpaaren (bp) und kodiert für 555 Aminosäuren [50]. Ein großer Teil der

Einleitung

unter 1.3.2 beschriebene Effekte von EETs auf die Physiologie des Herzkreislaufsystems wurde in Studien gezeigt, in denen der enzymatische Abbau von EETs inhibiert wurde. Dies erfolgte durch gezieltes Ausschalten des EPHX2-Gens. Daraus folgt, dass die beschriebenen Effekte von EETs eng mit einem Funktionsverlust oder einer Funktionsminderung des Genprodukts des EPHX2-Gens zusammenhängen. Da auch Mutationen in einem Gen zur Beeinflussung der Funktion des Genprodukts führen können, ist es naheliegend, dass Mutationen des EPHX2-Gens mit Herzkreislauferkrankungen zusammenhängen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass genetische Variationen des EPHX2-Gens eine Rolle bei Herzkreislauferkrankungen spielen. Sie sind assoziiert mit verändertem Schlaganfall-outcome, koronarer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz [62] [63] [64]. Aufgrund dieses Einflusses auf kardiovaskuläre Erkrankungen und der wichtigen Rolle, die EETs in der Pathophysiologie des Herzkreislaufsystems spielen, erscheint es möglich, dass genetische Variationen des EPHX2-Gens auch eine Rolle bei Vorhofflimmern spielen. Insbesondere Variationen, die mit einer veränderten Aktivität des Enzyms lösliche Epoxidhydrolase (sEH) in vivo und veränderten EET-Spiegeln einhergehen, könnten Einfluss auf VHF ausüben. Przybyla-Zawislak et al. identifizierten sechs Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) des EPHX2-Gens, die die Aminosäuresequenz des Enzyms so verändern, dass sie in vivo eine veränderte Enzymaktivität bedingen [65]. Die beiden häufigsten SNPs, die zu einer veränderten Enzymaktivität führen, sind die Polymorphismen K55R und R287Q, die im Folgenden genauer dargestellt werden.

Der SNP K55R lag in dem von Przybyla-Zawislak et al. untersuchten Kollektiv bei 17% der Patienten vor. Er betrifft die Base Adenin, die sich auf Exon 2 an Position 10610 der Basensequenz befindet (Sequenz siehe Anhang). Liegt der Polymorphismus vor, so befindet sich an dieser Position statt der Base Adenin die Base Guanin. In der Folge kommt es zu einem Austausch der kodierten Aminosäure von Lysin zu Arginin (siehe Tabelle 13). Dadurch kommt es in vivo zu einer erhöhten Aktivität des Enzyms sEH [65]. Lee et al. zeigten, dass der SNP K55R mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist, an koronarer Herzkrankheit zu erkranken [63], was angesichts der positiven Effekte von EETs bei koronarer Herzkrankheit (vgl. 1.3.2) konsistent erscheint. Allerdings muss angefügt werden, dass eine andere Studie dieses Resultat nicht bestätigen konnte [66]. Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass der Polymorphismus mit arterieller

Hypertonie und erhöhtem Schlaganfallrisiko assoziiert ist [67], was insbesondere angesichts der antihypertensiven Effekte von EETs plausibel wäre.

Der SNP Q287R wurde von Przybyla-Zawislak mit einer Häufigkeit von 14% angegeben. Er liegt auf Exon 8 und betrifft die Base Guanin an Position 26170. Diese wird, wenn der Polymorphismus vorliegt, durch Adenin ersetzt, was wiederum einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin zur Folge hat (siehe Tabelle 14). In der Folge kommt es, am ehesten durch den Wegfall nicht-kovalenter Bindungen, zu einer verminderten Aktivität des Enzyms sEH in vitro und damit wohl zu erhöhten EET-Spiegeln [65]. Aufgrund der dargestellten größtenteils positiven Effekte von EETs auf kardiovaskuläre Erkrankungen ist es eher überraschend, dass der SNP R287Q mit einem erhöhten KHK-Risiko, einer verstärkten Kalzifizierung der Koronararterien und einem erhöhten Schlaganfallrisiko assoziiert zu sein scheint [68]. Jedoch wurde hinsichtlich Schlaganfallrisiko auch eine Assoziation mit vermindertem Risiko beschrieben [69]. Ebenfalls wurde eine Assoziation des Polymorphismus R287Q mit einer verbesserten kardialen Ischämietoleranz beschrieben [70].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen und es muss davon ausgegangen werden, dass die Prävalenz in den nächsten Jahren und Jahrzehnten weiter zunehmen wird [1]. Insbesondere mit der Entwicklung der Katheterablation zu einer weltweit angewandten Standardtherapie, konnte eine Verbesserung in der Behandlung von Vorhofflimmern erreicht werden. Trotz der überwiegend positiven Resultate dieser interventionellen Therapie ist ein langfristiger Erhalt des Sinusrhythmus nach Ablation hochkomplex und es besteht weiterhin eine Reihe offener Fragen, insbesondere hinsichtlich Patientenauswahl und Ablationsstrategie [4]. Um diese Fragen klären zu können, ist ein noch weitreichenderes Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, die der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF sowie der Entstehung von VHF-Rezidiven nach interventioneller Therapie zugrunde liegen, notwendig. Bei der Klärung dieser Fragen wurden in den letzten Jahren auch genetische Aspekte verstärkt berücksichtigt. Genetische Erkenntnisse ermöglichen zum einen Schlüsse auf pathophysiologische Vorgänge und liefern neue Ansatzpunkte für weitergehende Forschung. Zum anderen

Einleitung

bieten sie die Möglichkeit zukünftig im Zuge einer zunehmend individualisierten Medizin, Therapieentscheidungen auf der Basis individueller genetischer Voraussetzungen zu treffen. Epoxyeicosatriensäuren spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen und genetische Variationen des Gens der lösliche Epoxidhydrolase, des Enzyms, das EETs metabolisiert, sind ebenfalls mit verschiedenen Herzkreislauferkrankungen assoziiert [47] [68]. Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob die Single Nukleotid Polymorphismen K55R und R287Q mit dem Auftreten von VHF bzw. mit einem veränderten Krankheitsverlauf von VHF assoziiert sind und ob die beiden SNPs mit einem veränderten Ansprechen auf die Katheterablation assoziiert sind.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

In dieser Arbeit wurden 218 kaukasische Patienten mit Vorhofflimmern untersucht. Bei allen Patienten wurde Vorhofflimmern nach geltenden klinischen Kriterien (siehe 1.1.3) diagnostiziert und eine ausführliche Anamnese hinsichtlich der Krankheitsgeschichte durchgeführt. Weiterhin wurden klinische und echokardiographische Parameter (siehe Tabelle 23) erhoben. Zusätzlich wurde ein Kollektiv aus 268 ethnisch gematchten Kontrollen ohne Vorhofflimmern oder andere Herzrhythmusstörungen untersucht. Alle eingeschlossenen Patienten gaben nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde im Einklang mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission der Charité genehmigt.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

	Hersteller
ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems
CARTO Mapping System	Biosense Webster
CoolPath Ablationskatheter 4mm	St. Jude Medical
Digital Graphic PrinterUP-D895	Sony
Dri-Block DB2A	Techne, Thermo-Dux
EnSite Mapping System	St. Jude Medical
Flachbettgelkammer	ABgene
Gelkammer Horizon 58	Gibco BRL
Generator 70 RF	Stockert/Biosense Webster
Inquiry Mapping Katheter	St. Jude Medical

Patienten, Material und Methoden

LASSO Mapping Katheter	Biosense Webster
MultiScreen Column Loader & Scraper	Millipore
Netzteil Power Pack P25	Biometra
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Mikrowelle	Severin
Peltier Thermal Cycler PTC-100	MJ-Research, Biozym
Peltier Thermal Cycler PTC-200 Gradient	MJ-Research, Biozym
Peltier Thermal Cycler PTC-225 Gradient	MJ-Research, Biozym
Pipetten (µl) – 10; 20; 100; 200; 1000	Eppendorf
Picofuge	Stratagene
ThermoCool Ablationskatheter 3,5mm	Biosense Webster
Thermocycler Professional 1000	Biometra
Thermocycler Professional Gradient1000	Biometra
UV-Lampe Bio Doc Analyze	Biometra
Waage 510-37	Kern
Vortex Reax 2000	Heidolph
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich

2.2.2 Computerprogramme

	Hersteller
OLIGO 4.0	Molecular Biology Insights

Patienten, Material und Methoden

Sequencher 4.10.1

Gene Codes
Corporation

2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Hersteller

AB gene® PCR Plates

Thermo Scientific

96-Well Reaction Plate MicroAmp™

Applied Biosystems

96-Well Assay System MultiScreen®

Millipore

Cellophanfolie

Folia/Festa

Einführhilfe für Sephadex

GE Healthcare

Erlenmeyerkolben

Carl Zeiss

Handschuhe Prima Profi; Verde

Sänger

Handschuhe Rotiprotect Nitril

Roth

Iso Freeze Rack 90

Roth

Messzylinder (50ml, 250ml)

Carl Zeiss

Paket-Klebeband

Tesa

Parafilm

Roth

Multiply µStrip 0,2ml Kette

Sarstedt

Multiply 8er Deckelkette flach

Sarstedt

Pipettenspitzen

Biosphere

Reaktionsgefäße (ml) 2; 1,5; 0,6

Biozym

2.2.4 Chemikalien

Hersteller

Agarose Standard

Roth

Borsäure

Roth

Patienten, Material und Methoden

Bromphenolblau	Pierce
EDTA	Pierce
Ethidiumbromid	Roth
GelGreen	Biotium
Glycerin	Serva
HI-DI Formamid	Merck
HPLC-Wasser Rotisolv	Roth
Salzsäure	Merck
Sephadex™ G-50 Superfine	GE Healthcare
Tris (base)	Roth
Xylencyanol	Pierce

2.2.5 Enzyme

Hersteller

Exonuklease I	BioLabs
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas
Taq DNA Polymerase	Roche

2.2.6 Nukleotide

Hersteller

DNA-Primerpaare ¹	BioTez
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Epicentre

2.2.7 Molekulargewichtsmarker

Hersteller

DNA Molekulargewichtsmarker Typ VIII	Fermentas
--------------------------------------	-----------

2.2.8 Kits

	Hersteller
PCR-Kit	Strattec
10x PCR-Probenpuffer (100mM Tris-HCL, pH 8,3; 500mM KCL)	
MgCl ₂ 25mM	
Tag-DNA-Polymerase (5U/μl)	
BigDye Terminator-Kit v 1.1	ABI-Prism
BigDye Ready Reaction Mix	
5x Sequenzierungspuffer	

2.3 Methoden

2.3.1 Durchführung der Katheterablation

Bei allen 218 Patienten des VHF-Kollektivs wurde durch einen ärztlichen Mitarbeiter der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie, Charité Campus Virchow Klinikum, eine Pulmonalvenenisolation durchgeführt. Es kam dabei das für diese Intervention übliche Standardprocedere der Klinik zur Anwendung [71]. Der Eingriff wurde unter tiefer Sedierung mit Midazolam und Propofol nach mindestens achtstündiger Nahrungskarenz und nach Ausschluss von Vorhofthromben durch transösophageale Echokardiographie durchgeführt. Periinterventionell wurde die gegebenenfalls bestehende orale Antikoagulation unter Bridging mit dem niedermolekularen Heparin Nadroparin pausiert. Intrainterventionell erfolgte eine Antikoagulation mit unfraktioniertem Heparin, wobei für die aktivierte Koagulationszeit (Activated-Clotting-Time, ACT) ein Zielwert zwischen 300 und 350 Sekunden angestrebt wurde. Die ACT wurde in 30-minütigen Abständen gemessen. Über bilaterale femoralvenöse Zugänge und unter Durchleuchtung ausgeführter transseptaler Punktion wurden ein Ablationskatheter (ThermoCool, Biosense Webster oder CoolPath, St. Jude Medical) und ein Mapping Katheter (LASSO, Biosense Webster oder Inquiry,

St. Jude Medical) in den linken Vorhof eingeführt. Der linke Vorhof wurde in Adenosin- oder high rate pacing- induzierter Asystolie angiographisch und mit Hilfe eines elektroanatomischen 3D-Mapping-Systems (CARTO, Biosense Webster oder EnSite, St. Jude Medical) dargestellt. Dann erfolgte die zirkumferentielle Ablation der Pulmonalvenen (siehe Abb. 8) mittels Radiofrequenzenergie wobei die Ablationslinie mit einem Sicherheitsabstand von bis zu einem Zentimeter Entfernung von der Mündung der Pulmonalvenen in den linken Vorhof gesetzt wurde. Endpunkt war die vollständige elektrische Isolation der Pulmonalvenen, was durch Nachweis des bidirektionalen Blocks mit Mapping- und Ablationskatheter verifiziert wurde. Der verwendete Generator 70 RF (Stockert/Biosense Webster), erzeugte eine Leistung von 35 Watt, die maximale Temperatur betrug 43°C. Es wurde stets eine Temperatursonde im Ösophagus platziert.

2.3.2 Follow-up

Die ablatierten Patienten wurden im Abstand von drei, zwölf und 24 Monaten nach der Katheterablation zu Kontrollterminen einbestellt, bei denen sie mittels Anamnese, 12-Kanal-EKG und 7-Tage-Langzeit-EKG hinsichtlich des Auftretens eines VHF Rezidiv untersucht wurden. Zudem wurden die Patienten angehalten, sich bei jedem Auftreten von Symptomen, die in Zusammenhang mit einem VHF Rezidiv stehen könnten, außerplanmäßig vorzustellen. Als Rezidiv gewertet wurden im EKG aufgezeichnete Episoden von VHF über 30 Sekunden, wobei VHF-Episoden innerhalb der sogenannten „Blanking Period“ von drei Monaten nach dem Eingriff nicht als Rezidiv gewertet wurden. Innerhalb dieses Zeitraums kommt es im Rahmen von Heilungsprozessen nach der Ablation häufig zu VHF-Frührezidiven, die in der Folge nicht weiter auftreten [4]. Die vorbestehende antiarrhythmische Medikation wurde innerhalb der ersten drei Monate weiter verordnet und dann abgesetzt. Kam es zu einem symptomatischen VHF-Rezidiv, oder einem Rezidiv, dass länger als 48 Stunden anhielt, wurde eine elektrische Kardioversion durchgeführt und die Entscheidung über die weitere medikamentöse Therapie dem behandelnden Arzt überlassen.

2.3.3 Genetische Analysen

Anmerkung

Die für die genetischen Analysen notwendigen Versuche wurden in den Räumlichkeiten des Kardiogenetischen Labors im Experimental and Clinical Research Center am Charité Campus Buch durchgeführt. Für die Herstellung der Reaktionsansätze wurden, falls nicht anders angegeben, die Herstellerempfehlungen angewendet. Alle Reagenzien wurden bei – 20°C aufbewahrt und vor Gebrauch im Wärmebad aufgetaut und gevortext. Eine Ausnahme bildeten die Enzyme Taq Polymerase, Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase, die im gekühlten Zustand in die Ansätze pipettiert und nicht gevortext wurden. Es wurde bei allen Schritten HPLC-Wasser verwendet. Als Reaktionsbehältnisse dienten, sofern nicht anders angegeben, 8er-MultiPLY µStrips mit einem Volumen von 0,2ml. Diese standen während des Pipettierens der Ansätze stets in Eisblöcken und wurden danach gut verschlossen, gevortext und zentrifugiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden 95 Proben gleichzeitig untersucht. Eine Negativkontrolle, die keine DNA enthielt, wurde bei allen Schritten stets mitgeführt.

2.3.3.1 DNA-Isolation

Die DNA-Extraktion wurde durch einen Mitarbeiter des Kardiogenetischen Labors mit Hilfe des Extraktionsroboters Autopure LS von Quiagen durchgeführt und lag gebrauchsfertig in einer Konzentration von 25 (ng/µl) im Gefrierschrank bei - 20 °C vor. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese bestimmt, wofür 3%ige Agarosegele verwendet wurden.

2.3.3.2 Primerdesign

Primer sind Oligonukleotide, die von der DNA-Polymerase benötigt werden, damit diese sich an den zu vervielfältigenden DNA Einzelstrang anlagern kann. Ihre Basensequenz ist komplementär zum DNA-Einzelstrang und sie bilden das Anfangsstück der Kopie, das durch die Polymerase verlängert wird. Die Verlängerung kommt dabei zustande durch Anlagerung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP), die untereinander durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft werden. Um einen Genabschnitt zu vervielfältigen werden ein Forward-Primer, der in 5'-3' Richtung verlängert wird, und ein Reverse-Primer, der in 3'-5' Richtung verlängert wird, benötigt [72]. Die Primer für Exon 2 und Exon 8, die beiden Genabschnitte, auf denen sich die zu untersuchenden Polymorphismen K55R und R287Q befinden, wurden mit Hilfe des

Computerprogramms OLIGO 4.0 designt. Die hierfür benötigten DNA-Sequenzen (siehe Anhang) des jeweiligen Genabschnitts wurden der Ensembl Datenbank (<http://www.ensembl.org>) [73] entnommen. Die Sequenzen und wichtige Eigenschaften der designten Primer können Tabelle 18 im Ergebnisteil entnommen werden. Bei ihrem Design wurde darauf geachtet, dass die Primer etwa eine Länge von 18 bis 24 Basenpaaren aufweisen, dass die Schmelztemperaturen von Forward- und Reverse-Primer möglichst nahe beieinander liegen und dass die Primer, sofern möglich, einen CG-Gehalt im Bereich von 50 Prozent aufweisen. Die Fragmentlänge des zu replizierenden DNA-Abschnitts, der durch die Bindungsstellen der beiden Primer begrenzt wird, sollte 300 Basenpaare nicht überschreiten [74]. Die Synthese der designten Primer wurde durch die Firma BioTeZ, Berlin durchgeführt.

2.3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion werden DNA-Fragmente exponentiell vervielfältigt. Diese Vervielfältigung kommt durch etwa vierzigfache Wiederholung der Schritte Denaturierung, Primeranlagerung und Primerelongation zustande (siehe Abbildung 9). Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei 94 °C denaturiert, so dass Einzelstränge vorliegen, welche im folgenden Vervielfältigungsprozess als Vorlage (Matrize) dienen. Die Primer lagern sich bei ihrer spezifischen Annealingtemperatur an ihre spezifische Bindungsstelle am Einzelstrang an und werden dann bei 72 °C durch Anlagerung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) komplementär zum Matrizenstrang verlängert. Auf diese Weise kann ein zu analysierendes DNA-Fragment quantitativ vermehrt werden, so dass es in ausreichend großer Menge für weitere Analysen vorliegt [75].

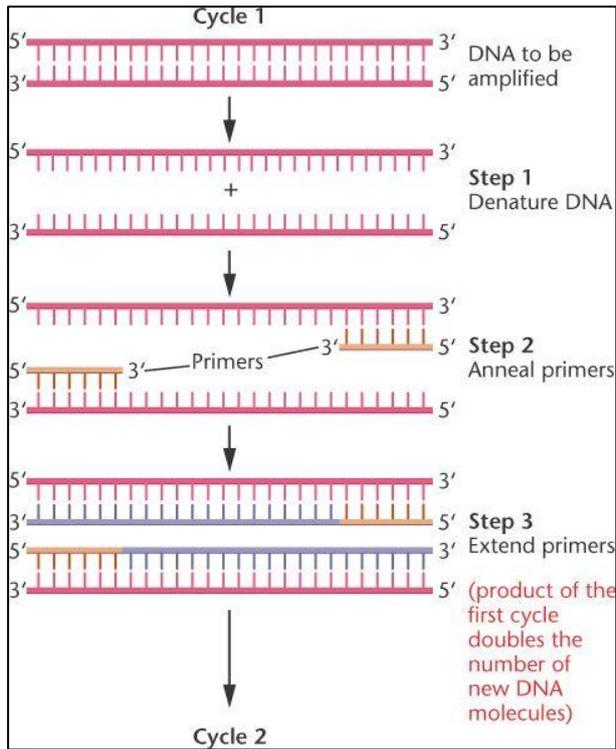


Abbildung 9: Ablauf der Polymerasekettenreaktion[76]; Erklärung siehe Text.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein PCR-Kit der Firma Stratec verwendet. Der Mastermix-Ansatz (siehe Tabelle 9) wurde nach dem vorgegebenen Protokoll der Herstellerfirma pipettiert und enthielt neben 10 x NH₄-Pufferlösung und MgCl₂-Lösung das spezifische Primerpaar in Verdünnung 1:10, sowie eine thermostabile Taq DNA-Polymerase. Weiterhin wurde dem Mastermix-Ansatz als Substrat ein dNTP-Mix der Firma Epicenter Biotechnologies zugegeben, welcher zu gleichen Teilen 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP), 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP), 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP) und 2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat (dCTP) enthielt.

Tabelle 9: Ansatz für PCR - Mastermix

Komponente	Konzentration	Volumen pro Probe (µl)
H ₂ O	-	17,4
NH ₄ Reaktionspuffer	10x	2,5
MgCl ₂	50 mmol/l	1,5
Forward-Primer	5pmol/µl	1
Reverse-Primer	5pmol/µl	1
dNTP-Mix	20/µl	0,3
Taq DNA-Polymerase	5U/µl	0,3
Genomische DNA	25 ng/µl	1

Patienten, Material und Methoden

Es wurden stets 24µl Mastermix und 1µl genomische DNA in ein Reaktionsbehältnis pipettiert. Eine Negativkontrolle wurde immer mitgeführt. Die PCR-Reaktion lief in einem der unter Geräte angegebenen Thermocycler ab. Dieser wurde so programmiert, dass er für den Annealingschritt genau auf die spezifische Annealing-temperatur der jeweiligen Primer heizte. Der genaue Ablauf der PCR inklusive der jeweiligen Temperaturen, Dauer und Anzahl der Wiederholungen kann Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Ablauf der PCR. T_A =Spezifische Annealing-Temperatur des Primers (siehe unter PCR-Optimierung im Ergebnisteil)

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1. Initiale Denaturierung	94	10:00
2. Denaturierung	94	0:30
3. Primer-Annealing	T_A	0:30
4. Primerextension	72	1:30
39 x Wiederholung der Schritte 2 – 4		
5. Abschließende Primerextension	72	5:00
6. Kühlung	4	∞

Zur Bestimmung der idealen Annealingtemperatur (T_A) der jeweiligen Primer wurde ein Gradingprogramm des Thermocyclers genutzt. Dabei wurde eine PCR mit zwölf Proben durchgeführt, bei der im dritten Schritt, während dem die Primeranlagerung stattfindet, zwölf verschiedene Annealingtemperaturen hergestellt wurden (siehe Tabelle 11). Anschließend wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, bei welcher Annealingtemperatur die PCR am besten ablief (siehe unter PCR-Optimierung im Ergebnisteil). Weiterhin wurde mit Hilfe des Gradingprogramms die ideale Zyklenzahl bestimmt.

Tabelle 11: Gradingprogramm zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. An den Positionen 1-12 wird in Schritt 3 (Primeranlagerung, vgl. Tabelle 10) jeweils die angegebene Temperatur hergestellt.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur (°C)	50,0	50,5	51,7	53,2	55,5	58,4	61,8	64,6	66,8	68,4	69,6	70,0

2.3.3.4 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurde nach Beendigung der PCR überprüft, ob das richtige DNA-Fragment exklusiv und in ausreichender Menge amplifiziert wurde. Die dafür benötigten Gele wurden nach Laborstandart mit 3%iger Agarose, 1 x TBE-Puffer (Im Verhältnis 1:5 verdünnter 5 x TBE-Puffer, siehe Tab. 12) und dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid hergestellt und enthielten einzelne Taschen für jede Probe.

Tabelle 12: Inhaltsstoffe eines 3% Agarosegels. Agarose und 1xTBE-Puffer wurden vermischt und aufgekocht, dann wurde Ethidiumbromid zugegeben. Die Polymerisationszeit betrug 60 min.

Bestandteile	Menge
Agarose	3 g
1 x TBE-Puffer	100 ml
Ethidiumbromid	5 µl

Tabelle 13: Inhaltsstoffe des 5xTBE-Puffers

Bestandteile	Menge
H ₂ O	1000 ml
TRIS	54 g
Borsäure 0,5 mol/l	27,5 g
EDTA-Lösung	20 ml

Tabelle 14: Inhaltsstoffe des Auftragspuffers

Inhaltsstoffe	Menge
Glycerin	3 ml
H ₂ O	7 ml
Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025g

In diese Taschen wurden jeweils 2 µl PCR-Produkt und 2 µl Auftragspuffer (siehe Tabelle 14) pipettiert. In je eine Tasche wurden Negativkontrolle und ein Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas (Abb. 10) gegeben. Dieser enthält ein durch die Herstellerangaben bekanntes Gemisch aus DNA-Fragmenten

unterschiedlicher Größe. Die Gele wurden in eine Gelkammer gelegt, die außerdem mit 1 x TBE Laufpuffer befüllt wurde und dann für 45 min an ein Netzgerät angeschlossen wurde, das eine Spannung von 80V erzeugte. Im elektrischen Feld wandern DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode, wobei die Distanz, die sie dabei zurücklegen von Ihrer Größe abhängig ist. Größere Fragmente wandern weiter als Kleinere. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA-Moleküle werden diese unter UV-Licht in Form von hellen Banden sichtbar [77]. Durch Vergleich der Banden der PCR-Produkte mit den normierten, durch die Herstellerangaben bekannten Banden des Molekulargewichtsmarkers, konnte überprüft werden, ob in der PCR das richtige DNA-Fragment amplifiziert wurde.

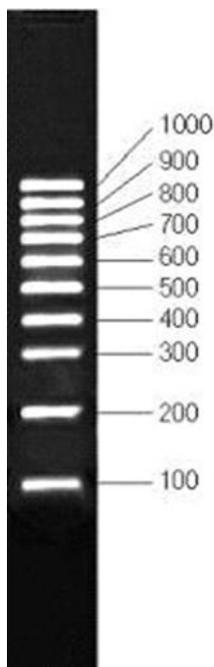


Abbildung 10: Beispiel eines Molekulargewichtsmarkers. Jede Bande steht für ein DNA-Fragment. Die Zahlen 100 - 1000 bezeichnen deren Größe in Basen-paaren (bp) [78].

Weiterhin wurde darauf geachtet, dass pro PCR-Produkt nur eine Bande entstand. Bei einer weiteren Bande muss davon ausgegangen werden, dass – bedingt durch mangelnde Spezifität der Primer oder falsch gewählte PCR-Bedingungen – ein zusätzlicher DNA-Abschnitt amplifiziert wurde. In diesem Fall sind die PCR-Produkte für die weiteren Analysen nicht zu gebrauchen. Toleriert wurden lediglich sehr schwache Banden im Bereich von unter 50 Basenpaaren, die durch Primerdimere entstehen können. Bei der Negativkontrolle, die keine DNA enthielt, durfte keine Bande entstehen, sonst musste von einer Verunreinigung ausgegangen werden.

2.3.3.5 Sequenzierung

Das Cycle Sequencing erfolgte nach der Dye-Terminator-Methode, der die Kettenabbruchsreaktion nach Sanger zugrunde liegt [79]. Dabei werden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente durch eine DNA-Polymerase repliziert wie bei der PCR. Im Unterschied zu dieser wird aber nur in eine Richtung repliziert, weshalb nur ein Primer benötigt wird (Forward oder Reverse). Außerdem werden durch die Polymerase bei der Primerelongation nicht nur dNTPs angebaut, sondern auch ddNTPs. Dabei handelt es sich um fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotidtriphosphate, die am 3'-Ende keine OH-Gruppe aufweisen, welche für die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung mit dem nächsten Nukleotid nötig ist. Aus diesem Grund kann an ein ddNTP kein weiteres Nukleotid angelagert werden und es kommt nach ihrem Einbau zum Kettenabbruch. Da der Einbau der ddNTPs zufällig erfolgt, ergibt sich auch die Position des Kettenabbruchs zufällig. Am Ende der Cycle-Sequencing-Reaktion liegt eine ausreichend große Anzahl an DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge vor, so dass jede einzelne Base der zu ermittelnden DNA-Sequenz mindestens einmal in fluoreszenzmarkierter Form vorliegt. Durch die Markierung der Base mit Fluoreszenzfarbstoff („dye“) kann im automatisierten Sequenzierungsprozess anhand der Wellenlänge des reflektierten Lichts detektiert werden, um welche Base es sich handelt (siehe Abbildung 11). Dazu werden die DNA-Fragmente durch den Sequenzierautomaten, der Fragmentlänge nach geordnet, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Argon-Laser angeregt. Dann misst der Automat die Wellenlänge der emittierten Fluoreszenz der zuvor angeregten ddNTPs und wandelt sie in elektrische Signale um. Diese können dann mit Hilfe der Software Sequencher™ in Form von Chromatogrammen am Bildschirm dargestellt werden (siehe Abb. 13 und 14 im Ergebnisteil).

Herstellerangaben, siehe Tabelle 11) für die Sequenzierung enthielt neben den DNA-Fragmenten eine Sequenzierungs-pufferlösung, den Forward Primer, eine AmpliTaq Polymerase, und als Substrate für die Polymerase dNTPs sowie fluoreszenzmarkierte ddNTPs. Es wurden jeweils 2 µl enzymatisch aufgereinigtes PCR-Produkt und 8 µl Mastermix in ein Reaktionsbehältnis pipettiert.

Tabelle 16: Ablauf des Sequenzierungsprogramms

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1. Initiale Denaturierung	96	1:00
2. Denaturierung	96	0:10
3. Primer-Annealing	50	0:30
4. Primerextension	60	4:00
25 x Wiederholung der Schritte 2 - 4		
5. Kühlung	4	∞

Tabelle 17: Mastermix-Ansatz für die Sequenzierung

Komponente	Volumen pro Probe (µl)
Big Dye Ready Reaction Mix	0,5
5 x Sequenzierungspufferlösung	1,75
Forward-Primer	1
H ₂ O	4,75

2.3.3.6 Sephadex- Aufreinigung

Die Proben wurden nach dem Cycle Sequencing mit dem Sephadex-Verfahren gereinigt [81]. Durch Passage durch eine Sephadexsäule können verschieden große Moleküle einer Lösung getrennt werden. Kleinere Moleküle werden dabei durch Ausbildung von Wechselwirkungen mit dem Dextran Sephadex zurückgehalten, größere Moleküle passieren durch die Poren und werden bei der Zentrifugation aus der Sephadex-Säule herausgelöst. Auf diese Weise werden Primer und andere Moleküle herausgefiltert, die zu analysierenden DNA-Fragmente liegen aufgereinigt zur automatischen Analyse vor.

Die Herstellung der Sephadexsäulen erfolgte in einer Millipore MultiScreen Filterplatte, deren 96 Löcher mit Sephadex G-50 Superfine und jeweils 300 µl Wasser befüllt wurden. Nach Lagerung über Nacht bei 4 °C zum Quellen, wurde sie 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert, wiederum mit 150 µl HPLCWasser pro Well befüllt und anschließend wieder für 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Durch diese Schritte wurde in jedem der 96 Wells der Platte eine Sephadexsäule hergestellt. In diese wurden nun je 95 zu analysierende Sequenzierungsprodukte und eine Negativkontrolle gegeben. Dann erfolgte eine erneute Zentrifugation der Platten, während derer die Proben durch die Sephadexsäule in eine zuvor mit je 13 µl HiDi-Formamid pro Well befüllte, darunter liegende 96-Loch Platte bewegt wurden. Die in HiDi-Formamid gelösten Proben konnten dann im Sequenzierautomaten analysiert werden.

2.3.3.7 Auswertung der Sequenzierung

Die Sequenzdaten wurden mit dem Sequenzierautomaten ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer von Applied Biosystems analysiert und mit Hilfe der Software Sequencher™ Version 4.1.2 (Gene Codes Corporation) am Computer ausgewertet. Mit Hilfe dieses Programms können die ermittelten Sequenzen der DNA-Fragmente in Form von Chromatogrammen dargestellt und mit den der Ensembl Datenbank [73] entnommenen Referenzsequenzen (siehe 6.4.) verglichen werden. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, ob an den fraglichen Positionen die Wildtypvariante oder die Mutation K55R bzw. R287Q vorlag. Im Falle einer Mutation konnte unterschieden werden, ob es sich um eine heterozygote oder homozygote Mutation handelte.

2.3.4 Statistische Auswertung

Die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen genetischen Varianten Wildtyp, Heterozygote Mutation und homozygote Mutation im VHF-Kollektiv und der Kontrollkohorte wurde mittels Chi Square Test verglichen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Krankheitsmerkmalen und dem jeweiligen Genotyp zu ermitteln, wurden zur Untersuchung des VHF-Kollektivs zunächst drei Betrachtungsmodelle konzipiert: In einem dominanten Modell wurde davon ausgegangen, dass die Mutation eines Allels genügt, um Krankheitsmerkmale zu beeinflussen und homozygote Mutation und heterozygote Mutation somit einen identischen Effekt ausüben und zusammengefasst betrachtet werden können. In einem rezessiven Modell wurde davon ausgegangen, dass nur die homozygote Mutation Krankheitsmerkmale verändern kann. Im additiven Modell wurde von einer abgestuften Beeinflussung von Krankheitsmerkmalen bei

heterozygoter Mutation im Vergleich zu homozygoter Mutation ausgegangen. Aufgrund der letztlich zu geringen Zahl an Trägern der homozygoten Variante wurden die beiden letzten Betrachtungsmodelle verworfen. Das VHF-Kollektiv wurde zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Genotyp und Krankheitsmerkmalen von Vorhofflimmern mithilfe des dominanten Modells untersucht, bei dem vom einem identischen Effekt der homozygoten und heterozygoten Variante ausgegangen wurde. Für alle Daten wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Genotyp und Rezidivaufreten nach Katheterablation wurde eine logistische Regressionsanalyse zur Ermittlung der Odds Ratio und des 95 % Konfidenzintervalls durchgeführt. In einer multivariablen Analyse wurden unabhängige Prädiktoren für ein VHF Rezidivaufreten ermittelt. Kontinuierliche Variablen wurden hierfür mittels T-Test und diskontinuierliche Variablen mittels Chi-Square-Test untersucht. Für alle statistischen Analysen wurde die Software SPSS 20.0 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Primer

Die zur Sequenzierung der Exons 2 und 8 notwendigen Primer wurden nach unter 2.3.3.2 geschilderten Gesichtspunkten mit Hilfe des Programms OLIGO 4.0 designt. Ihre Sequenzen und wichtige Eigenschaften können Tabelle 18 entnommen werden. Die Primer wurden durch die Firma BioTez, Berlin, hergestellt und in einer Konzentration von 50 pmol/ μ l geliefert.

Tabelle 18: Primer für die Exons 2 und 8 des EPHX2-Gens; F = Forward, R = Reverse, T_m = Schmelztemperatur, bp = Basenpaare

Exon	Sequenz (5' - 3')	T_m (°C)	CG-Gehalt (%)	Fragmentlänge (bp)
2F	TG TTCCTGATGTTCTTTGTG	57,2	40,0	213
2R	GGTGGGTGTTTTCTATTATG	56,5	40,0	
8F	TGGAGGGAAGGCAAAGAGG	61,7	61,1	296
8R	GTAGGAGAGGGAAAGAGGTGAAG	61,4	54,5	

3.2 PCR

Bei dem zur Optimierung der PCR-Bedingungen durchgeführten Gradingprogramm (vgl. Tabelle 11) wurden folgende Annealingtemperaturen ermittelt:

Primer für Exon 2: $T_A = 55,5$ °C

Primer für Exon 8: $T_A = 62,0$ °C

Eine Zyklenzahl von 40 erwies sich als optimal.

Unter diesen Bedingungen und mit den unter 2.2.4 angegebenen Ansätzen konnten die Exons 2 und 8 aller 218 Patienten des VHF-Kollektivs und aller 268 Kontrollpatienten erfolgreich amplifiziert werden. Es wurde stets mittels Gelelektrophorese überprüft, ob das richtige DNA-Fragment exklusiv und in ausreichender Menge vorlag (vgl. 2.3.3.3). Exemplarisch ist in Abbildung 12 eine Gelelektrophorese mit 47 Proben des Exons 2 zu sehen.

Ergebnisse

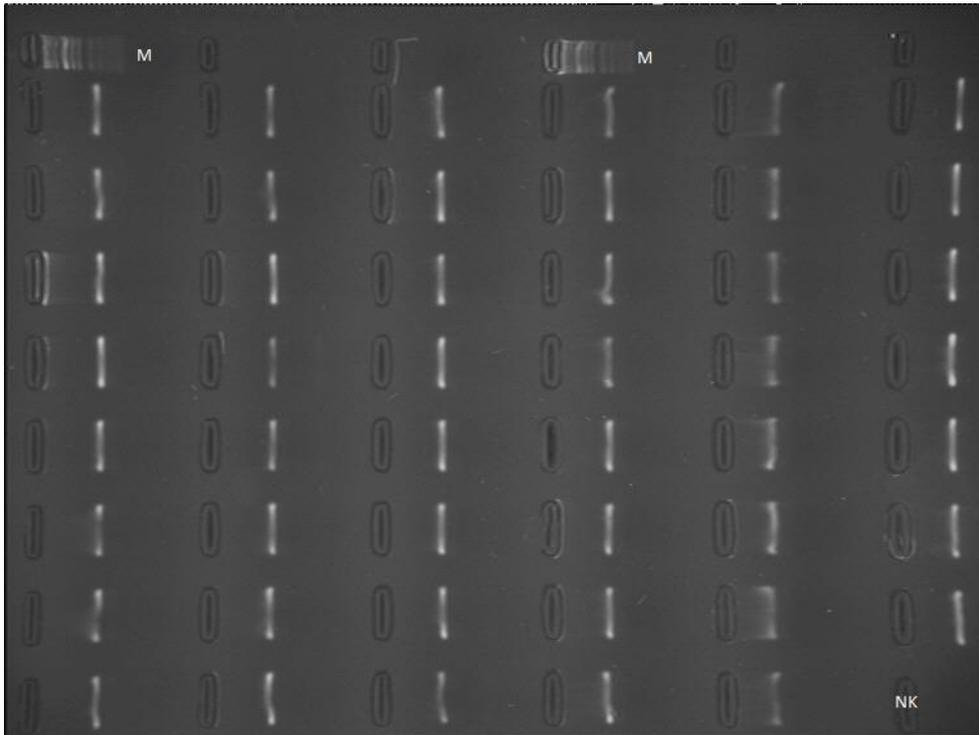


Abbildung 12: Exon 2: Gelelektrophorese nach PCR. Laufzeit 45 min. Es zeigen sich 47 sauber amplifizierte Proben. Im Bereich der Negativkontrolle (NK) ist keine Bande zu sehen. M = Molekulargewichtsmarker Typ VIII.

3.3 Sequenzierung

Die Genabschnitte Exon 2 und Exon 8 des EPHX2-Gens aller 218 VHF-Patienten sowie aller 268 Kontrollpatienten konnten erfolgreich sequenziert werden. Es wurden für die Sequenzierungen grundsätzlich Forward-Primer verwendet. In einigen Fällen war eine erneute Sequenzierung nötig, weil die Sequenzdaten nach der ersten Sequenzierung aufgrund von Verunreinigungen nicht lesbar waren. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Software Sequencher 4.10.1. Mit dieser wurde die Basensequenz der sequenzierten Genabschnitte in Form von Chromatogrammen dargestellt und mit der bekannten, aus der Ensembl Datenbank [73] entnommenen Referenzsequenz (siehe 6.4) verglichen. Es konnte auf diese Weise überprüft werden, ob die fraglichen SNPs K55R bzw. R287Q vorlagen oder der jeweilige Wildtyp, und, falls einer der beiden SNPs vorlag, ob es sich um die heterozygote oder homozygote Variante handelte. Der SNP K55R betrifft die Base Adenin, die sich auf Exon 2 an Position 10610 der Basensequenz befindet. Liegt der Polymorphismus vor, so befindet sich an dieser Position statt der Base Adenin die Base Guanin. In der Folge kommt es zu einem

Ergebnisse

Austausch der kodierten Aminosäure von Lysin zu Arginin. Der SNP Q287R auf Exon 8 betrifft die Base Guanin an Position 26170. Diese wird, wenn der Polymorphismus vorliegt, durch Adenin ersetzt, was wiederum einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin zur Folge hat. Die Polymorphismen können in einer heterozygoten und homozygoten Variante vorliegen. Im Falle der heterozygoten Variante kommt es nur auf einem Allel zum Basenaustausch, bei der homozygoten Variante sind beide Allele betroffen (siehe Tabelle 19 und 20).

Tabelle 19: Exon 2: SNP K55R

	Wildtyp	Heterozygote Mutation	Homozygote Mutation
Basen	A/A	A/G	G/G
Codon	AAA/AAA	AAA/AGA	AGA/AGA
Aminosäure	Lysin/Lysin	Lysin/Arginin	Arginin/Arginin

Tabelle 20: Exon 8: SNP R287Q

	Wildtyp	Heterozygote Mutation	Homozygote Mutation
Basen	G/G	G/A	A/A
Codon	CGG/CGG	CGG/CAG	CAG/CAG
Aminosäure	Arginin/Arginin	Arginin/Glutamin	Glutamin/Glutamin

In Abbildung 13 und 14 sind die drei beschriebenen Fälle Wildtyp, heterozygote Mutation und homozygote Mutation für die beiden SNPs K55R und Q287R in Form von Chromatogrammen dargestellt. Es handelt sich um Screenshots des Programms Sequencher 4.10.1, mit dessen Hilfe die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte.

Ergebnisse

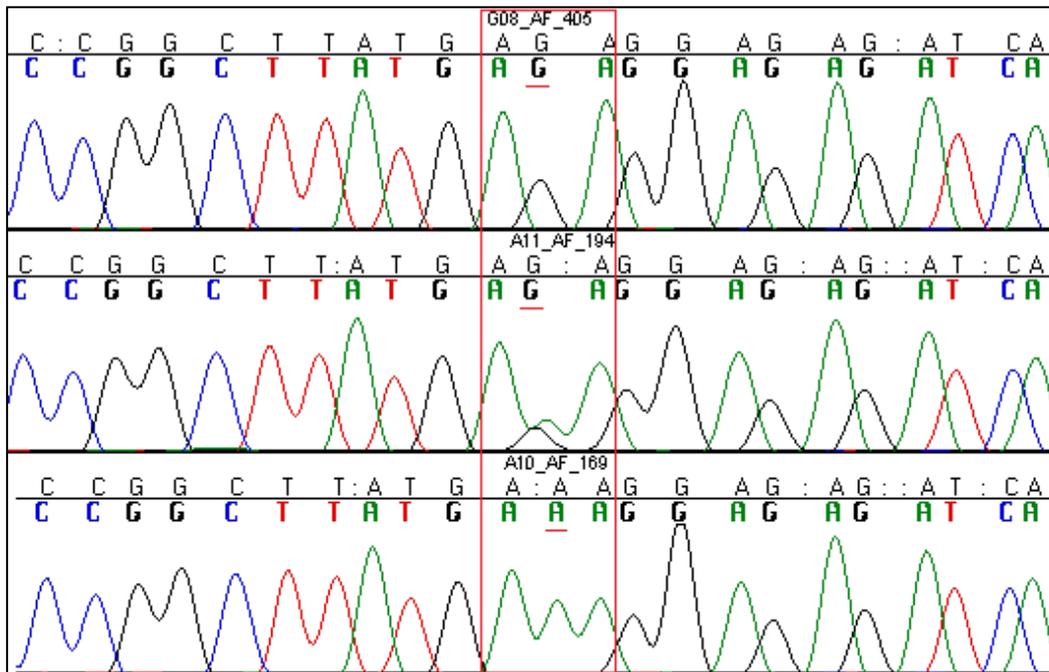


Abbildung 13: SNP K55R: Bearbeitete Screenshots des Programms Sequencher 4.10.1: Es sind die Basensequenzen von drei Proben in Form von Chromatogrammen dargestellt. Die Base, die beim SNP K55R ausgetauscht wird ist rot unterstrichen. Das betreffende Kodon ist rot eingerahmt. Obere Probe: homozygote Variante; mittleren Probe: heterozygote Variante; untere Probe: Wildtyp. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

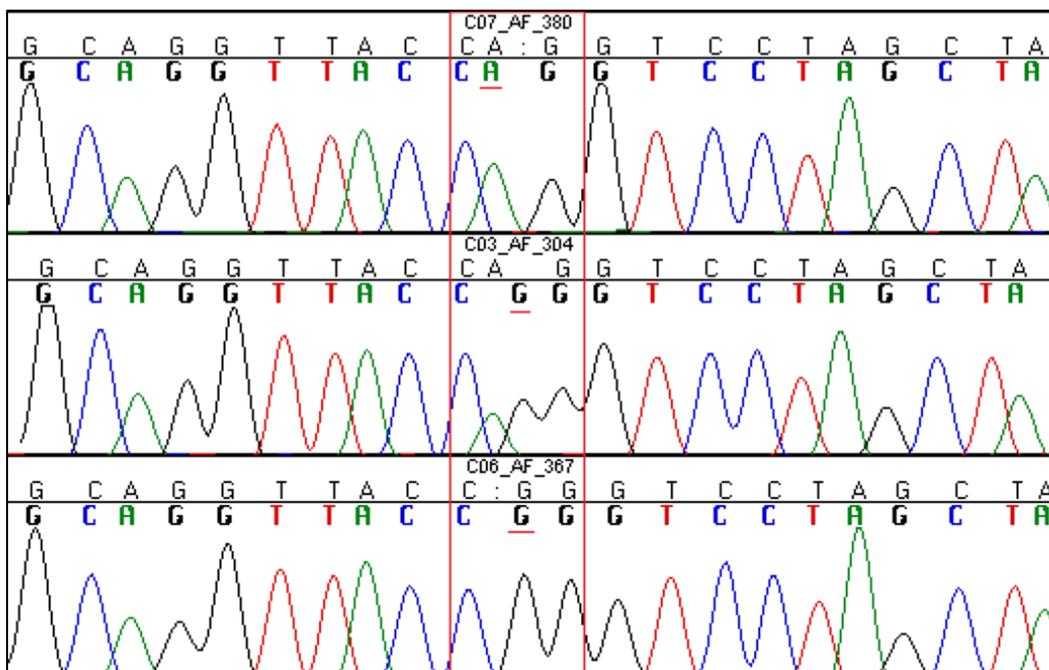


Abbildung 14: SNP Q287R: Bearbeitete Screenshots des Programms Sequencher 4.10.1: Es sind die Basensequenzen von drei Proben in Form von Chromatogrammen dargestellt. Die Base, die beim SNP Q287R ausgetauscht wird ist rot unterstrichen. Das betreffende Kodon ist rot eingerahmt. Obere Probe: homozygote Variante; mittleren Probe: heterozygote Variante; untere Probe: Wildtyp. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

3.4 Genotypverteilung und Zusammenhang mit Auftreten von Vorhofflimmern

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den SNPs K55R und R287Q und dem Auftreten von Vorhofflimmern besteht, wurde zunächst die Häufigkeitsverteilung der einzelnen genetischen Varianten in VHF-Kollektiv und Kontrollkollektiv verglichen (siehe Tabelle 21): Unter den 218 Patienten des VHF-Kollektiv lag der Polymorphismus K55R bei 40 Patienten vor, dies entspricht einem Anteil von 18,3%. Bei vier dieser 40 Patienten lag die homozygote Variante (1,8%), bei 36 die heterozygote Variante (16,5%) vor. Der Wildtyp lag bei 178 Patienten vor (81,7%). Unter den 268 Probanden des Kontrollkollektivs lag der Polymorphismus K55R in 46 Fällen (17,2%) vor, einer war homozygot (0,4%), 45 heterozygot (17,2%). Den Wildtyp hatten 222 Probanden (82,8%). Es bestand keine signifikant unterschiedliche Häufigkeitsverteilung des SNP K55R zwischen beiden Vergleichsgruppen ($p = 0,73$). Der Polymorphismus Q287R lag im VHF-Kollektiv bei 32 Patienten vor (14,7%). Davon hatten drei Patienten die homozygote Variante (1,4%) und 29 die Heterozygote (13,3%). Der Wildtyp lag bei 186 Patienten vor (85,3%). Im Kontrollkollektiv lag der Polymorphismus R287Q bei 43 Probanden vor (16%). Davon hatten 40 (14,9%) die heterozygote und drei (1,1%) die homozygote Variante. Der Wildtyp lag bei 225 Probanden vor (84%). Damit ergab sich auch in Bezug auf diesen SNP keine signifikant unterschiedliche Häufigkeitsverteilung zwischen beiden Vergleichsgruppen ($p = 0,67$).

Tabelle 21: SNP K55R: Genotypverteilung in VHF- und Kontrollkollektiv [vgl. Wutzler, Kestler et al.,36].

K55R	VHF-Patienten (=218)	Kontrollkollektiv (n=268)
A/A	178 (81,7%)	222 (82,8%)
A/G	36 (16,5%)	45 (16,8%)
G/G	4 (1,8%)	1 (0,4%)
A/G+G/G	40 (18,3%)	46 (17,2%)

Tabelle 22: SNP R287Q: Genotypverteilung in VHF- und Kontrollkollektiv [vgl. Wutzler, Kestler et al.,36]

R287Q	VHF-Patienten (=218)	Kontrollkollektiv (n=268)
G/G	186 (85,3%)	225 (84%)
G/A	29 (13,3%)	40 (14,9%)
A/A	3 (1,4%)	3 (1,1%)
G/A+A/A	32 (14,7%)	43 (16%)

3.5 Einfluss der genetischen Varianten auf Ausprägung von Vorhofflimmern

Um der Fragestellung nachzugehen, ob das Auftreten der beiden SNPs K55R und Q287Q Auswirkungen auf bestimmte Krankheitscharakteristika hat bzw. den Krankheitsverlauf von VHF moduliert, wurden innerhalb des VHF-Kollektivs klinische Parameter zwischen den SNP-Trägern und den Patienten mit Wildtyp verglichen. Die beiden SNPs K55R und R287Q wurden dabei einzeln betrachtet. Wie in 2.3.3 beschrieben, beruhen die hier geschilderten Ergebnisse auf den Berechnungen mit einem dominanten Betrachtungsmodell. Hierbei wurde angenommen, dass ein Allel genügt um eine Funktionseinschränkung des Enzyms sEH hervorzurufen. Es wurde daher ein identischer Effekt von homozygoter und heterozygoter Mutation angenommen. Neben Alter und Geschlecht wurde betrachtet, wie lange die Erkrankung bereits vorlag, welche Art von Vorhofflimmern die Patienten hatten und ob strukturelle Herzerkrankungen zugrunde lagen. Weiterhin wurden echokardiographische Kriterien wie der linksatriale Durchmesser (LAD) und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) sowie die aktuelle oder frühere antiarrhythmische Medikation betrachtet (siehe Tabelle 23). Für alle genannten Charakteristika bestand kein signifikanter Unterschied zwischen SNP-Trägern und Nicht-Trägern.

Ergebnisse

Tabelle 23: Vergleich von klinischen und echokardiografischen Eigenschaften sowie verabreichter Medikation zwischen den SNP-Trägern (homozygote + heterozygote Mutation) und Wildtyp-Trägern; Lone AF = VHF ohne strukturelle kardiale Grunderkrankung; LAD = Linksatrialer Durchmesser; LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion [vgl. Wutzler, Kestler et al.,36].

	VHF-Gesamt (n=218)	R287Q GG (n=186)	R287Q GA/AA (n=40)	K55R AA (n=178)	K55R GA/GG (n=40)
Alter (Jahre)	57 ± 10	57 ± 10	59 ± 8	56 ± 10	58 ± 10
Weiblich (%)	29	29	28	30	25
VHF seit (Monate)	15 ± 38	15 ± 41	10 ± 16	14 ± 38	17 ± 39
Lone AF (%)	33	38	33	36	45
Paroxysmales VHF (%)	76	77	71	77	72
LAD (mm)	41 ± 6	41 ± 5	42 ± 6	42 ± 6	40 ± 5
LVEF (%)	54 ± 3	54 ± 3	53 ± 5	54 ± 3	54 ± 4
Medikation:					
Flecainid od. Propafenon (%)	44	40	39	39	38
Amiodaron (%)	15	14	15	15	18
Sotalol (%)	6	7	--	6	8
Dronedaron (%)	1	1	3	1	3
Ca²⁺- Antagonist (%)	3	4	--	3	5
Digitoxin (%)	0,4	0,5	--	0,5	--
Betablocker (%)	45	46	44	47	43
ACE-Hemmer (%)	17	18	18	19	13
AT₁- Antagonisten (%)	13	12	19	14	5

3.6 Einfluss der genetischen Varianten auf Erfolg der Katheterablation

Bei allen 218 Patienten aus dem VHF-Kollektiv wurde eine Katheterablation durchgeführt (siehe 2.3.1). Um zu untersuchen, ob einer der beiden SNPs K55R oder R287Q das Ansprechen auf diese interventionelle Standardtherapie beeinflusst, wurde das Rezidivaufreten bei den SNP-Trägern und den Patienten mit Wildtyp verglichen. Wie unter 3.5 beschrieben lagen zum Ablationszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich klinischer und echokardiographischer Kriterien zwischen beiden Gruppen vor. Es wurde für diese Betrachtung das dominante Modell angewandt (vgl. 2.3.4). Die Patienten wurden dazu planmäßig nach 3, 12 und 24 Monaten nach Ablation, sowie außerplanmäßig bei Auftreten von Symptomen untersucht (siehe 2.3.2), wobei nach zwölf Monaten noch 211 und nach 24 Monaten noch 192 Patienten nachuntersucht werden konnten. Insgesamt trat bei 20% aller Patienten ein VHF-Rezidiv zwischen drei und zwölf Monaten nach Pulmonalvenenisolation (PVI) auf. Bei 35% aller Patienten trat ein Rezidiv zwischen drei und 24 Monaten nach PVI auf. Unter den Trägern der K55R-Variante fand sich zu den Zeitpunkten zwölf und 24 Monate

Ergebnisse

nach PVI kein signifikant häufigeres Rezidivaufreten. Allerdings zeigte sich bei den Trägern der R287Q Variante sowohl nach 12 Monaten ($p=0,035$) als auch nach 24 Monaten ($p<0,0001$) ein signifikant erhöhtes Auftreten eines VHF-Rezidivs nach Katheterablation (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Rezidivaufreten nach Katheterablation: Vergleich zwischen Trägern der SNPs K55R bzw. R287Q und Nicht-Trägern; p = Signifikanzwert, OR = Odds Ratio, KI = Konfidenzintervall [vgl. Wutzler, Kestler et al.,36].

	VHF Rezidiv	p	OR	95%KI
Nach 12 Monaten (n=211)				
K55R		0,982	1,01	0,427 - 2,39
AA (n=172)	35 (20%)			
GA/GG (n=39)	8 (20%)			
R287Q		0,035	2,525	1,069 - 5,968
GG (n=183)	33 (18%)			
GA/AA (n=28)	10 ((35%)			
Nach 24 Monaten (n=192)				
K55R		0,134	1,767	0,84 - 3,718
AA (n=157)	50 (31%)			
GA/GG (n=35)	16 (45%)			
R287Q		<0,0001	5,418	2,210 – 13,287
GG (n=167)	49 (29%)			
GA/AA (n=25)	17 (68%)			

Weiterhin wurde mit Hilfe einer multivariablen Analyse untersucht, ob sich aus der Präsenz der jeweiligen Polymorphismen K55R und R287Q ein Vorhersagewert für ein erhöhtes Rezidivrisiko nach Katheterablation ableiten lässt. Es zeigte sich hier, dass der SNP R287Q ein unabhängiger Prädiktor für ein erhöhtes Rezidivrisiko sowohl nach zwölf ($p=0,016$), als auch nach 24 Monaten ($p<0,001$) nach Ablation ist. Für den SNP K55R konnte nach zwölf und 24 Monaten nach Ablation kein unabhängiger Vorhersagewert belegt werden (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Unabhängiger Vorhersagewert für Rezidivaufreten nach Katheterablation der SNPs K55R und R287Q [vgl. Wutzler, Kestler et al.,36].

	p	OR	95%KI
Nach 12 Monaten (n=211)			
K55R	0,707	1,198	0,468 – 3,068
R287Q	0,016	3,2	1,237 – 8,276
Nach 24 Monaten (n=192)			
K55R	0,113	1,962	0,853 – 4,511
R287Q	<0,0001	6,076	2,244 – 16,451

4 Diskussion

4.1 Bewertung der Ergebnisse

4.1.1 Genotypverteilung

Epoxyeicosatriensäuren spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen. Sie wirken antihypertensiv und antiinflammatorisch, beeinflussen Zellproliferation und Apoptose und haben insbesondere über Modulation kardialer Ionenkanäle und Verkürzung kardialer Aktionspotentiale weitreichenden Einfluss auf die Erregungsausbreitung am Herzen [51, 53, 56, 58, 61]. Genetische Variationen des Gens der lösliche Epoxidhydrolase, des Enzyms, welches EETs metabolisiert, sind mit verändertem Schlaganfalloutcome, koronarer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz assoziiert [62, 64]. Die beiden SNPs des sEH-Gens K55R und R287Q gehen mit einer veränderten sEH-Aktivität in vivo einher [65].

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit diese beiden SNPs mit dem Auftreten von VHF assoziiert sind. Dazu wurden die entsprechenden Genabschnitte bei 218 Patienten mit VHF und bei 268 Kontrollen sequenziert. Der SNP K55R lag im VHF-Kollektiv bei 18,3% der Patienten und Kontrollkollektiv bei 17,2% der untersuchten Probanden vor. Es bestand hinsichtlich des Vorkommens des Polymorphismus zwischen VHF-Kollektiv und Kontrollkollektiv kein signifikanter Unterschied ($p = 0,73$). Daraus muss geschlossen werden, dass das Vorliegen des SNPs K55R nicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist, an VHF zu erkranken. Der SNP R287Q lag im VHF-Kollektiv bei 14,7% der Patienten und im Kontrollkollektiv bei 16% der Patienten vor. Auch hier bestand bezüglich Vorliegen des Polymorphismus kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven ($p = 0,67$). Daraus folgt, dass der SNP R287Q ebenfalls nicht mit einem erhöhten Auftreten von VHF assoziiert ist. Die ermittelten Häufigkeiten der beiden SNPs in beiden Kollektiven stimmen weitgehend mit den von Przybyla et al [65] ermittelten Häufigkeiten (17% bzw. 14%) überein, was nahelegt, dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten valide sind.

Neben der Fragestellung, ob einer der beiden SNPs mit einem erhöhten Auftreten von VHF assoziiert ist, wurde auch untersucht, ob die Präsenz der beiden Polymorphismen

mit veränderten Krankheitscharakteristika bzw. einem veränderten Krankheitsverlauf von VHF einhergeht. Es wurden innerhalb des VHF-Kollektivs Patienteneigenschaften sowie anamnestische, klinische und echokardiographische Charakteristika der SNP-Träger mit denen von Nicht-SNP-Trägern verglichen. Dabei wurden die beiden SNPs K55R und R287Q einzeln betrachtet. Es konnten für beiden SNPs hinsichtlich der betrachteten Variablen Patientenalter, Geschlecht, Erkrankungsdauer, Art des Vorhofflimmerns, Vorliegen struktureller Herzerkrankungen, linksatrialer Durchmesser (LAD), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), sowie der verordneten Medikation keine signifikanten Unterschiede zwischen SNP-Trägern und Nicht-Trägern festgestellt werden. Folglich sind die beiden SNPs K55R und R287Q nicht mit einer veränderten Ausprägung dieser Charakteristika assoziiert.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass in Bezug auf beide SNPs die homozygoten Varianten in beiden untersuchten Kollektiven bei sehr wenigen Patienten vorlagen (K55R 1,8% vs. 0,4%; R287Q 1,4% vs. 1,1%). Daher kann keine Aussage über den Effekt der homozygoten Varianten der beiden SNPs getroffen werden. Es ist grundsätzlich denkbar, dass diese mit einem gehäuften Auftreten von VHF, bzw. mit einer veränderten Krankheitsausprägung assoziiert sind.

4.1.2 Rezidivaufreten nach Katheterablation

Neben der Frage, ob die beiden SNPs K55R und R287Q mit dem Auftreten von VHF oder mit veränderter Krankheitsausprägung von VHF assoziiert sind, wurde ebenfalls der Zusammenhang mit dem Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation untersucht. Alle 218 Patienten aus dem VHF-Kollektiv wurden einer Pulmonalvenenisolation unterzogen und während einer Follow-up-Spanne von 24 Monaten regelmäßig nachuntersucht. Es wurden nach 12 Monaten bei 20% und nach 24 Monaten bei 35% der ablatierten Patienten Rezidive festgestellt. Diese Erfolgsraten stimmen weitgehend mit denen anderer Zentren überein [20, 21].

Obwohl bereits gezeigt wurde, dass genetische Variationen mit verändertem Ansprechen auf medikamentöse und interventionelle Therapie von VHF assoziiert sind [33, 44], ist bislang wenig über die Assoziation genetischer Variationen mit dem Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation bekannt. In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob SNPs des EPHX2-Gens mit einem erhöhten Rezidivaufreten vergesellschaftet sind. Dazu wurden innerhalb des VHF-Kollektivs das Rezidivaufreten

während einer Follow-up Spanne von 24 Monaten zwischen SNP-Trägern und Wildtyp-Patienten verglichen. Träger des K55R-Polymorphismus wiesen sowohl nach 12 als auch nach 24 Monaten kein gehäuftes Rezidivaufreten auf. Es besteht daher keine Assoziation zwischen dem SNP K55R und einem gehäuften Rezidivaufreten nach Katheterablation.

Unter den Trägern des R287Q-Polymorphismus zeigte sich jedoch sowohl zum Follow-up Zeitpunkt 12 Monate, als auch zum Follow-up Zeitpunkt 24 Monate eine signifikant höhere Anzahl an VHF-Rezidiven. Es besteht also eine klare Assoziation zwischen dem Vorliegen dieser Variante und einem gehäuften Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation. Außerdem zeigte sich in der multivariablen statistischen Analyse, dass das Vorliegen des SNPs R287Q ein von anderen Variablen unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von VHF-Rezidiven nach Pulmonalvenenisolation ist. Diese Arbeit konnte damit erstmals zeigen, dass das Vorliegen des SNPs R287Q zu VHF-Rezidiven nach Katheterablation prädisponiert.

4.2 Der SNP R287Q und VHF-Rezidive nach Katheterablation

Das hier erstmals gezeigte Ergebnis, dass das Vorliegen des SNPs R287Q mit signifikant erhöhtem Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation assoziiert ist, überrascht zunächst, denn diese genetische Variation führt zu einer niedrigeren Aktivität der löslichen Epoxidhydrolase in vivo und damit sehr wahrscheinlich zu höheren EET-Spiegeln [82]. Aufgrund der überwiegend positiven Effekte hoher EET-Spiegel auf arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz, war zu erwarten, dass hohe EET-Spiegel auch die Erkrankung Vorhofflimmern und ihr Ansprechen auf interventionelle Therapieverfahren positiv beeinflussen könnten. Zudem ist überraschend, dass der SNP R287Q zwar mit erhöhtem Auftreten von VHF-Rezidiven nach Ablation assoziiert ist, jedoch nicht mit erhöhtem primärem Auftreten von Vorhofflimmern. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass der Begünstigung von VHF-Rezidiven nach Ablation ein Mechanismus zugrunde liegt, der von den Pathomechanismen, die primär zur Entstehung von VHF führen, unabhängig ist.

Warum das Vorliegen des SNPs R287Q die Entstehung von VHF-Rezidiven nach Ablation begünstigt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und deshalb kann über die Ursachen dieses Zusammenhangs nur spekuliert werden. Auch wurde kein kausaler Zusammenhang bewiesen, sondern lediglich der statistische Zusammenhang, dass es

Diskussion

unter den Trägern dieses Polymorphismus gehäuft zu Rezidiven kommt, und dass das Vorliegen des SNPs unabhängig von anderen Einflussgrößen Vorhersagewert für das Auftreten von Rezidiven hat. Nichtsdestotrotz ist dieses Ergebnis hochinteressant und es gibt eine Reihe von möglichen Erklärungen, warum das Vorliegen des SNPs R287Q die Entstehung von VHF-Rezidiven begünstigen könnte. Diese sollen im Folgenden diskutiert werden.

Der Hauptmechanismus für die Entstehung von VHF-Rezidiven nach Pulmonalvenenisolation ist die Rekonnexion der Pulmonalvenen [83]. Dabei kommt es zur Regeneration der elektrischen Leitfähigkeit im Bereich der während der Ablation gesetzten Isolationslinie. Bei der Pulmonalvenenisolation werden im Bereich dieser zu setzenden Ablationslinie durch Radiofrequenzenergie oder andere Energieformen Kardiomyozyten bewusst geschädigt. Dabei kommt es durch die Energieeinwirkung einerseits direkt zu irreversiblen nekrotischen Veränderungen von Kardiomyozyten und andererseits zu einem inflammatorischen Prozess mit teils reversibler Zellschädigung [84]. Ziel der bewussten Zellschädigung ist es, einen Narbenbildungsprozess zu induzieren, in dessen Folge es im Bereich der Ablationslinie zum Ersatz der Kardiomyozyten durch nicht leitfähiges Bindegewebe kommt. Von großer Bedeutung dafür, dass die anhaltende vollständige elektrische Isolation der PVs erreicht wird, ist die Ausbildung einer transmuralen bindegewebigen Narbe [85]. Histopathologische Analysen ergaben jedoch, dass bei rekonnectierten Pulmonalvenen der fibrotische Umbau gehäuft nicht transmural erfolgte, sondern sich im Bereich der Ablationslinie weiterhin vitales Herzmuskelgewebe fand, obwohl eine vollständige Isolation aller PVs am Ende der Ablation dokumentiert werden konnte [86].

Der SNP R287Q führt zu einer niedrigeren Aktivität des Enzyms sEH in vitro und in vivo und damit wahrscheinlich zu erhöhten Plasma- und Gewebespiegeln von EETs [65, 82]. Erhöhte Spiegel von EETs wiederum könnten aufgrund ihrer antifibrotischen Effekte die Ausbildung einer transmuralen bindegewebigen Narbe behindern. An verschiedenen experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass es unter Inhibition des EET-abbauenden Enzyms sEH bzw. Überexpression des EET-bildenden Enzyms CYP2J2, zu verminderter Fibrosierung kommt. Mit Hilfe dieser Methoden, die beide erhöhte EET-Spiegel in vivo hervorrufen, zeigte sich eine signifikant verminderte Anzahl kardialer Fibroblasten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen [54, 87]. Darüber hinaus

Diskussion

zeigte sich unter sEH-Inhibition ebenfalls eine signifikant verringerte proliferative Kapazität der Fibroblasten [54].

Angesichts dieser Ergebnisse erscheint es plausibel, dass erhöhte Spiegel von EETs den Fibrosierungsprozess behindern, der im Rahmen der Ablation durch Setzen einer thermischen Läsion bewusst initiiert wird. Erhöhte EET-Spiegel können daher mitverantwortlich dafür sein, dass die Ausbildung der bindegewebigen Narbe nach Ablation nicht transmural erfolgt.

Damit es zur Ausbildung einer elektrisch isolierenden Narbe kommen kann, muss der dafür notwendige Fibrosierungsprozess induziert werden. Dies geschieht durch eine inflammatorische Reaktion auf die bei der Ablation erfolgte Gewebeverletzung: Durch die Applikation von Radiofrequenzenergie (oder anderer Energieformen) kommt es im Bereich der Ablationslinie zu irreversiblen und reversiblen Zellschädigungen [84], wodurch Zytokine wie TNF α und verschiedene Interleukine freigesetzt werden. Diese aktivieren kardiale Fibroblasten, regen diese zur Proliferation an und rekrutieren Fibroblasten aus anderen Geweben. Weiterhin induzieren sie die Expression von TGF β , unter dessen Einfluss Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren. Diese sezernieren verstärkt Bestandteile der extrazellulären Matrix und stellen somit die Effektoren von Fibrosierungsprozessen dar [88-90]. Im Rahmen der Zytokin-induzierten inflammatorischen Reaktion kommt es – vor allem unter dem Einfluss von TNF α – verstärkt zu Apoptosen von Kardiomyozyten. Apoptotische Zellen wiederum setzen ebenfalls den profibrotischen Mediator TGF β frei [91], sodass inflammatorische Mediatoren sowohl über Aktivierung bzw. Rekrutierung von Fibroblasten, über Stimulation der TGF β -Expression und über die Induktion von Apoptose zur Fibrosierung beitragen.

EETs haben eine potente antiinflammatorische Wirkung: Sie hemmen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, welcher die Expression verschiedener an inflammatorischen und apoptotischen Prozessen beteiligter Gene fördert. Insbesondere hemmt er die Zytokin-induzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen (v.a. VCAM-1) und damit die Adhäsion und das Eindringen von Leukozyten in entzündete bzw. geschädigte Gewebe [53, 54]. Darüber hinaus zeigten sich unter sEH-Inhibition signifikant verminderte Plasmakonzentrationen der inflammatorischen Zytokine TNF α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 sowie des Chemokins MCP-1 [54, 92]. Durch diese

Diskussion

antiinflammatorischen Effekte könnten erhöhte EET- Spiegel die Induktion des fibrotischen Umbaus sowie die Initiierung von Apoptosevorgängen hemmen.

EETs üben zudem auch unmittelbar antiapoptotische Effekte aus. An Endothelzellen wurde gezeigt, dass erhöhte Spiegel endogen produzierter EETs TNF α -induzierte apoptotische Prozesse abschwächen und zu erhöhtem Zellüberleben beitragen. Die Hemmung von Apoptose geschieht dabei zum einen über die Abschwächung der TNF α -vermittelten Hemmung der Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 sowie die über Hemmung der Aktivierung des proapoptotischen Enzyms Caspase-3 [93]. Zum anderen beeinflussen EETs die Hemmung von Apoptose über Aktivierung der MAPK-, ERK- und PI3K-Signalwege, deren zentrale Bedeutung für das Überleben von Zellen in mehreren Arbeiten gezeigt wurde [57, 92-94].

Die Aktivierung dieser das Zellüberleben begünstigender Signalwege und die Hemmung von Apoptose sind auch von großer Bedeutung für die weitreichenden kardioprotektiven Effekte von EETs, die insbesondere an Ischämie-Modellen gezeigt wurden: Sowohl in vitro als auch in vivo zeigten sich unter sEH-Inaktivierung bzw. – Inhibition eine signifikant reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen, eine signifikant verbesserte Ischämietoleranz bei verbessertem Überleben von Kardiomyozyten sowie signifikant kleinere Infarktareale [70, 92, 95]. Interessanterweise zeigte sich auch bei Vorliegen des SNPs R287Q ein verbessertes Zellüberleben bei Ischämie [70].

Diese antiapoptotischen und kardioprotektiven Effekte, könnten auch für die Entstehung von VHF-Rezidiven nach PVI eine Rolle spielen. Kowalsky et al. zeigten, dass bei histologischen Präparaten rekonnectierter Pulmonalvenen im Vergleich zu Präparaten nicht-rekonnectierter PV signifikant häufiger keine transmurale bindegewebige Narbe ausgebildet wurde und sich stattdessen funktionales Herzmuskelgewebe im Bereich der Ablationslinie fand. Ihre histologischen Untersuchungen zeigten zudem, dass im Bereich des ablatierten Gewebes neben Zeichen irreversibler Zellschädigung wie Pyknosen, auch Myozytolysen vorlagen, die die Autoren als Zeichen reversibler zellulärer Reaktionen auf Gewebeverletzung werteten [86]. Ähnliche Ergebnisse fanden sich in einer weiteren Studie, in der die Befunde von Kardio-MRT-Untersuchungen unmittelbar nach erfolgreicher PVI sowie drei Monate nach Ablation mit dem Auftreten von VHF-Rezidiven innerhalb von im Mittel elf Monaten verglichen wurden. Bei allen untersuchten Patienten fanden sich akut und drei Monate nach

Diskussion

Ablation Zeichen irreversibler (delayed enhancement = verspätete Kontrastmittelanreicherung, Anzeichen von Nekrose) und reversibler Gewebeschädigung (hochintensives T2-Signal = inflammatorischer Prozess mit Ödem). Je größer der Anteil der reversiblen Veränderungen, desto größer war die Wahrscheinlichkeit, dass im Verlauf VHF-Rezidive auftraten [84]. In Kombination mit den Ergebnissen von Kowalski et al. belegt diese Arbeit, dass infolge der Ablationsläsionen entstehende reversible Läsionen entscheidende Bedeutung für die Entwicklung von Rezidiven haben [84, 86]. Ob eine langfristige elektrische Isolation der Pulmonalvenen erreicht werden kann, hängt also davon ab, ob es zu einer Regeneration des reversibel geschädigten Gewebes kommt. Es ist hochwahrscheinlich, dass antiinflammatorische und antiapoptotische Prozesse zur Regeneration dieses Gewebes beitragen. Erhöhte Spiegel von EETs vermitteln, wie beschrieben, antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte, insofern könnten sie zur Regeneration von reversibel geschädigtem Gewebe und damit zur Rekonnexion der Pulmonalvenen beitragen.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass erhöhte EET-Spiegel antiapoptotische, antiinflammatorische und antifibrotische Effekte ausüben und auf diesem Wege die Ausbildung einer dauerhaft isolierenden transmuralen bindegewebigen Narbe behindern könnten. Angesichts dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass der SNP R287Q zu erhöhter sEH-Aktivität führt, erscheint das Ergebnis dieser Arbeit, dass das Vorliegen dieses Polymorphismus zu gehäuftem Auftreten von VHF-Rezidiven nach Pulmonalvenenisolation prädisponiert, plausibel. Unter der Annahme, dass erhöhte Spiegel von EETs tatsächlich mittels Hemmung der Narbenbildung für das gehäufte Auftreten von VHF-Rezidiven bei den SNP R287Q-Trägern ursächlich sind, ist es ebenfalls plausibel, warum unter den Trägern dieses Polymorphismus die Erkrankung Vorhofflimmern nicht per se gehäuft vorliegt. Die Mechanismen, die zu erhöhtem Rezidivaufreten bei den R287Q-Trägern führen, wurden allerdings in dieser Arbeit nicht untersucht. Weitere Studien sind nötig, um diese Mechanismen aufzuklären.

4.3 Einschränkungen

Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit und der unter 4.2 dargelegten Hypothesen, sollten einige Einschränkungen zur Kenntnis genommen werden. Zunächst handelt es sich bei der durchgeführten Studie um eine Assoziationsstudie, die den signifikanten statistischen Zusammenhang zeigen konnte, dass in der Gruppe der Träger des SNP R287Q gehäuft zu VHF-Rezidiven nach Katheterablation kommt und dass das Vorliegen dieses SNPs zu Rezidiven nach Ablation prädisponiert. Es wurde durch diese Studie jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des SNPs und dem Auftreten von VHF-Rezidiven belegt. Weiterhin wurden bei den in dieser Studie untersuchten Patienten keine EET-Spiegel im Plasma bestimmt. Die Vermutung, dass erhöhte EET-Spiegel über antifibrotische, antiinflammatorische und antiapoptische Effekte das Auftreten von VHF-Rezidiven begünstigen, kann daher nicht experimentell untermauert werden und bleibt vorerst spekulativ.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit bei den untersuchten VHF-Patienten keine EET-Spiegel im Plasma bestimmt. Dies wäre sinnvoll gewesen, um zu untersuchen, ob bei den R287Q-Trägern tatsächlich in vivo erhöhte EET-Spiegel vorliegen. Bislang wurde gezeigt, dass dieser Polymorphismus in vitro und in vivo zu einer verminderten Aktivität des Enzyms sEH, welches EETs abbaut, führt [65, 82]. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass der SNP in vivo beim Menschen zu höheren EET-Spiegeln führt, allerdings wurde dies bislang nicht belegt. Weiterhin muss angeführt werden, dass den Ergebnissen dieser Arbeit statistische Berechnungen zugrunde liegen, in denen ein dominantes Betrachtungsmodell angewandt wurde. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die heterozygote und homozygote Variante den gleichen Effekt ausüben. Dieses Modell wurde deshalb angewendet, weil die Anzahl an vorliegenden homozygoten Mutationen zu gering war, um damit aussagekräftige statistische Betrachtungen durchführen und so den Einfluss von homozygoter und heterozygoter Mutation getrennt betrachten zu können. Es erscheint jedoch denkbar, dass homozygote und heterozygote Variante die Aktivität der löslichen Epoxidhydrolase unterschiedlich beeinflussen. Es wäre daher wünschenswert ein insgesamt größeres Kollektiv untersuchen zu können, insbesondere um den Effekt der homozygoten Variante einzeln betrachten zu können. Möglicherweise könnte dann auch ein Effekt auf das Auftreten von VHF selbst gefunden werden.

Diskussion

Ein weiterer Parameter, der in dieser Arbeit nicht gemessen wurde, ist der durchschnittliche Anpressdruck der Ablationskatheterspitze an die Vorhofwand. Es wäre interessant, zu überprüfen, ob das Vorliegen des SNPs R287Q ein auch von dieser Variable unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von VHF-Rezidiven ist. In Hinblick auf die unter 4.2 dargelegten Forschungsergebnisse, die zeigen, dass der Anteil der reversiblen Gewebeschädigung im Bereich der Ablationslinie von großer Bedeutung für die Rekonnexion der Pulmonalvenen ist [84], erscheint es wahrscheinlich, dass dieser Parameter Einfluss auf die Häufigkeit von Rezidiven hat. Es ist zu vermuten, dass umso mehr direkte irreversible Zellschädigung auftritt, je höher der durchschnittliche Katheteranpressdruck ist. Allerdings kann dieser nicht beliebig erhöht werden, da mit höherem Druck auch die Gefahr einer Vorhofperforation steigt. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass bei den meisten Ablationen, wie von Arujuna et al. und Kowalski et al. beschrieben, reversible Zellschädigung zur kurzfristigen Isolation der Pulmonalvenen beiträgt. Antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften von EETs könnten dazu beitragen, dass diese reversibel geschädigten Zellen sich regenerieren und ihre Leitfähigkeit im Verlauf wiedererlangen.

Es muss festgestellt werden, dass die Rekonnexion der Pulmonalvenen nicht der einzige Mechanismus ist, über den es zu VHF-Rezidiven nach Ablation kommen kann. Zwar zeigten Ouyang et al. und andere Autoren übereinstimmend, dass es bei einer großen Mehrheit der Patienten, die Rezidive erleiden, zu einer Rekonnexion der Pulmonalvenen gekommen war. In den histopathologischen Untersuchungen von Kowalski et al. zeigte sich aber auch, dass es bei manchen Patienten zu Rezidiven kam, obwohl alle PV weiterhin isoliert waren. Insbesondere elektrophysiologische Veränderungen, die zur Verkürzung der Aktionspotentialdauer oder Verlängerung der Refraktärzeiten im Bereich der Vorhöfe führen, könnten eine wichtige Rolle bei der Entstehung von VHF-Rezidiven spielen. Zwar könnten erhöhte EET-Spiegel über die Modulation von Ionenkanälen solche Vorgänge ebenfalls beeinflussen, dies wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde ein relativ homogenes, junges und gesundes Patientenkollektiv untersucht. Die Patienten der VHF-Gruppe waren mit im Mittel 57 Jahren jünger und gesünder als durchschnittliche VHF-Patienten. 76% der Patienten hatten paroxysmales VHF, bei 33% lag lone AF vor. Schwerwiegende kardiale Grunderkrankungen stellten

ein Ausschlusskriterium dar. Dieses Kollektiv wurde so gewählt, um den Einfluss der beiden untersuchten SNPs unabhängig von vorliegenden Grunderkrankungen untersuchen zu können. Das Hauptergebnis dieser Arbeit, dass der SNP R287Q das Auftreten von VHF-Rezidiven nach PVI begünstigt, ist nicht zwangsläufig auf ältere Patienten mit schwerwiegenderen kardialen Vorerkrankungen übertragbar. Dies sollte im Rahmen einer Ausweitung der Studie an einem größeren Kollektiv überprüft werden. Auf der anderen Seite erscheint es möglich, dass der SNP R287Q gerade bei Patienten mit einer längeren VHF-Anamnese und schwerwiegenden strukturellen Herzerkrankungen Einfluss auf das Auftreten und den Krankheitsverlauf von Vorhofflimmern hat. Bei sekundärem VHF wie auch beim Fortschreiten von primärem VHF spielen Fibrosierung, Inflammation und Apoptose eine wichtige Rolle [3]. Über eine verminderte sEH-Aktivität und erhöhte EET-Spiegel, könnte es daher bei solchen Patienten bei Vorliegen des Polymorphismus durch Hemmung dieser Prozesse zu einer günstigen Beeinflussung des Krankheitsverlaufs kommen.

Ein weiterer Aspekt, der bedacht werden muss, ist die Tatsache, dass in die statistischen Betrachtungen nur VHF-Rezidive miteinbezogen wurden, die im Rahmen der Follow-up-Untersuchungen detektiert werden konnten. Die ablatierten Patienten wurden drei, zwölf und 24 Monate nach Ablation und außerplanmäßig bei Auftreten von VHF-typischen Symptomen einbestellt und einem 7-Tage-LZ-EKG unterzogen. Es ist trotz dieser intensiven Bemühungen nicht auszuschließen, dass es zu asymptomatischen VHF-Rezidiven kam, die von den Patienten nicht bemerkt wurden und daher nicht berücksichtigt werden konnten.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass das Vorliegen des SNPs R287Q zu Vorhofflimmerrezidiven nach Pulmonalvenenisolation prädisponiert. Antifibrotische, antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte von wahrscheinlich in Folge der Mutation erhöhten Epoxyeicosatriensäurespiegeln könnten der pathophysiologische Hintergrund dieser Prädisposition sein. Die beschriebenen Effekte erhöhter EET-Spiegel könnten die Ausbildung einer transmuralen bindegewebigen Narbe behindern und so die Rekonnexion isolierter Pulmonalvenen begünstigen. Weitere Studien sind nötig, um zu klären, ob der SNP R287Q tatsächlich zu erhöhten EET-Spiegeln in vivo beim Menschen führt und ob erhöhte EET-Spiegel tatsächlich über die geschilderten

Diskussion

Effekte die Rekonnexion der isolierten Pulmonalvenen fördern. Sollte sich dies belegen lassen, so könnten sich daraus mehrere Konsequenzen ergeben.

Zum einen läge dann die Hypothese nahe, dass sich unter erniedrigten EET-Spiegeln das Auftreten von VHF-Rezidiven nach PVI reduzieren ließe. Gelingte es, dies in experimentellen Modellen zu zeigen, könnte damit die Grundlage gegeben sein für die Entwicklung eines periinterventionell zu verabreichenden Pharmakons, das darauf zielt, während und für einen näher zu definierenden Zeitraum nach dem Kathetereingriff, die EET-Spiegel im Plasma bzw. im Vorhofgewebe zu senken. Ein möglicher pharmakologischer Angriffspunkt könnte die Hemmung des CYP2J2-Enzyms sein, welches beim Menschen EETs bildet. Daneben ist auch denkbar, nicht die Synthese von EETs zu hemmen, sondern deren Wirkung blockieren. Um hierfür pharmakologische Zielstrukturen zu finden, muss jedoch besser verstanden werden, wie EETs ihre beschriebenen Wirkungen auslösen. Dazu müssen Rezeptoren, über die EETs wirken, charakterisiert werden und nachgeschaltete Signalkaskaden entschlüsselt werden. Bei all dem muss bedacht werden, dass EETs über eben jene antiinflammatorischen, antifibrotischen und antiapoptotischen Effekte, die nach PVI möglicherweise die Narbenbildung behindern, kardioprotektiv wirksam sind und eine Reihe günstiger Wirkungen auf das Herzkreislaufsystem ausüben [48]. Daher könnte die pharmakologische Senkung von EET-Spiegeln mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sein.

Während die Entwicklung von CYP2J2-Inhibitoren oder EET-Antagonisten derzeit allenfalls langfristig realistisch erscheint, sind Pharmaka, die die lösliche Epoxidhydrolase hemmen und damit zu erhöhten EET-Spiegeln führen, in ihrer Entwicklung bereits sehr weit fortgeschritten. Sogenannte sEH-Inhibitoren (sEHI) könnten unter anderem als Antihypertensiva, Antiinflammativa und als Inhibitoren kardialer Remodelingprozesse zum Einsatz kommen [47]. Die Einnahme dieser Pharmaka könnte VHF-Rezidive nach Ablation begünstigen. Es müsste untersucht werden, ob es unter sEHI-Einnahme verstärkt zu einer Rekonnexion der Pulmonalvenen nach Ablation kommt und, wenn dem so ist, ob sich dies durch periinterventionelles Pausieren der sEHI verhindern ließe. Zudem wäre es interessant zu klären, ob die Anwendung von sEHI bei Trägern des SNP R287Q sicher ist. Da der Polymorphismus zu einer Minderung der sEH-Aktivität führt [82], könnte es zu einer Potenzierung der

Diskussion

sEH-Inhibition und zu übermäßig hohen Spiegeln von EETs kommen. Darüber hinaus wäre interessant zu untersuchen, ob weitere bereits zugelassene Pharmaka zu erhöhten EET-Spiegeln führen und so das Auftreten von VHF-Rezidiven begünstigen. Insbesondere Medikamente wie COX- oder LOX-Hemmer, die in die Stoffwechselwege der übrigen Arachidonsäurederivate eingreifen, könnten Einfluss auf in-vivo-EET-Spiegel haben. Es wurde gezeigt, dass die selektive Modulation der einzelnen Enzyme aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel COX, LOX und sEH auch die jeweils anderen Stoffwechselwege beeinflusst [96]. Zudem ist bekannt, dass unter COX-Inhibition verstärkt Leukotriene, also LOX-Produkte, anfallen, die sogenanntes Analgetika-Asthma auslösen können [97]. Es erscheint möglich, dass es unter Einnahme von COX-Inhibitoren auch verstärkt zur Bildung von EETs kommen könnte. Daher könnte die Einnahme von COX-Inhibitoren das Auftreten von VHF-Rezidiven nach Katheterablation begünstigen. Besondere Bedeutung gewinnt diese Frage durch die Tatsache, dass in der klinischen Routine mitunter antientzündliche Pharmaka wie der COX-Hemmstoff Ibuprofen bei Auftreten von Frührezidiven verabreicht werden. Die Rationale dabei ist, durch die Ablation ausgelöste Entzündungsprozesse, denen arhythmogenes Potential zugeschrieben wird, zu hemmen. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit und den daraus abgeleiteten Hypothesen erscheint es möglich, dass die Gabe entzündlicher Pharmaka im Gegenteil eher die Rezidiventstehung begünstigt. Ob dem so ist, sollte dringend im Rahmen von klinischen Studien untersucht werden.

Unabhängig davon, ob der hier vermutete mechanistische Zusammenhang zwischen dem SNP R287Q, erhöhten EET-Spiegeln und einer verstärkten Rekonnexion isolierter Pulmonalvenen belegt werden kann, wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt, dass der SNP R287Q ein von anderen Einflussgrößen unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von VHF-Rezidiven nach PVI ist. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Risikostratifikation: Bei Patienten, bei denen das Vorliegen dieses Polymorphismus bekannt ist, sollte die Indikation zur Ablation kritisch gestellt werden und insbesondere bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren für das Auftreten von Rezidiven, primär eine pharmakologische Strategie erwogen werden. Es muss geklärt werden, ob durch wiederholte Ablationen bzw. durch Kombination von interventionellem Vorgehen und pharmakologischer Rezidivprophylaxe das Auftreten von Rezidiven bei SNP-Trägern reduziert werden kann. Ob es Sinn macht, in der klinischen Praxis routinemäßig vor Durchführung einer PVI das Vorliegen des SNP R287Q auszuschließen, erscheint

Diskussion

fraglich. Bei Patienten, bei denen es bereits zu Rezidiven nach PVI kam, sollte angesichts der Häufigkeit dieses SNP von etwa 15 Prozent jedoch vor Durchführung weiterer Ablationen eine Testung erwogen werden. Insbesondere im Rahmen von Studien erscheint es sinnvoll, den Einfluss dieses SNPs auf den Ablationserfolg zu berücksichtigen. Zudem sollten Patienten darüber aufgeklärt werden, dass der SNP R287Q und ggf. auch andere, bislang nicht beschriebene genetische Variationen das Auftreten von VHF-Rezidiven nach PVI begünstigen können.

5 Literatur

1. Camm, A.J., Lip, G.Y., De Caterina, R., Savelieva, I., Atar, D., Hohnloser, S.H., Hindricks, G. and Kirchhof, P., *2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association.* Eur Heart J, 2012. **33**(21): p. 2719-47.
2. Kirchhof, P., Benussi, S., Kotecha, D., Ahlsson, A., Atar, D., Casadei, B., Castella, M., Diener, H.C., Heidbuchel, H., Hendriks, J., Hindricks, G., Manolis, A.S., Oldgren, J., Popescu, B.A., Schotten, U., Van Putte, B., Vardas, P., Agewall, S., Camm, J., Baron Esquivias, G., Budts, W., Carerj, S., Casselman, F., Coca, A., De Caterina, R., Deffereos, S., Dobrev, D., Ferro, J.M., Filippatos, G., Fitzsimons, D., Gorenek, B., Guenoun, M., Hohnloser, S.H., Kolh, P., Lip, G.Y., Manolis, A., McMurray, J., Ponikowski, P., Rosenhek, R., Ruschitzka, F., Savelieva, I., Sharma, S., Suwalski, P., Tamargo, J.L., Taylor, C.J., Van Gelder, I.C., Voors, A.A., Windecker, S., Zamorano, J.L. and Zeppenfeld, K., *2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS.* Europace, 2016. **18**(11): p. 1609-1678.
3. Camm, A.J., Kirchhof, P., Lip, G.Y., Schotten, U., Savelieva, I., Ernst, S., Van Gelder, I.C., Al-Attar, N., Hindricks, G., Prendergast, B., Heidbuchel, H., Alfieri, O., Angelini, A., Atar, D., Colonna, P., De Caterina, R., De Sutter, J., Goette, A., Gorenek, B., Haldal, M., Hohloser, S.H., Kolh, P., Le Heuzey, J.Y., Ponikowski, P. and Rutten, F.H., *Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC).* Eur Heart J, 2010. **31**(19): p. 2369-429.
4. Calkins, H., Kuck, K.H., Cappato, R., Brugada, J., Camm, A.J., Chen, S.A., Crijns, H.J., Damiano, R.J., Jr., Davies, D.W., DiMarco, J., Edgerton, J., Ellenbogen, K., Ezekowitz, M.D., Haines, D.E., Haissaguerre, M., Hindricks, G., Iesaka, Y., Jackman, W., Jalife, J., Jais, P., Kalman, J., Keane, D., Kim, Y.H., Kirchhof, P., Klein, G., Kottkamp, H., Kumagai, K., Lindsay, B.D., Mansour, M., Marchlinski, F.E., McCarthy, P.M., Mont, J.L., Morady, F., Nademanee, K., Nakagawa, H., Natale, A., Nattel, S., Packer, D.L., Pappone, C., Prystowsky, E., Raviele, A., Reddy, V., Ruskin, J.N., Shemin, R.J., Tsao, H.M. and Wilber, D., *2012 HRS/EHRA/ECAS expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design.* J Interv Card Electrophysiol, 2012. **33**(2): p. 171-257.
5. Herold, G., *Innere Medizin.* 2015, Köln: Gerd Herold Verlag.
6. Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D.C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., Garrigue, S., Le Mouroux, A., Le Métayer, P. and Clémenty, J., *Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins.* N Engl J Med, 1998. **339**(10): p. 659-666.
7. Latchamsetty, R. and Kocheril, A.G., *Review of Dominant Frequency Analysis in Atrial Fibrillation.* J Atr Fibrillation, 2009. **2**(3): p. 20-23.
8. Mansour, M., *Highest Dominant Frequencies in Atrial Fibrillation: A New Target for Ablation?* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(7): p. 1408-1409.
9. Sanders, P., Berenfeld, O., Hocini, M., Jaïs, P., Vaidyanathan, R., Hsu, L.-F., Garrigue, S., Takahashi, Y., Rotter, M., Sacher, F., Scavée, C., Ploutz-Snyder, R., Jalife, J. and Haïssaguerre, M., *Spectral Analysis Identifies Sites of High-*

- Frequency Activity Maintaining Atrial Fibrillation in Humans*. Circulation, 2005. **112**(6): p. 789-797.
10. Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P. and Goette, A., *Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 265-325.
 11. Chen, Y.C., Pan, N.H., Cheng, C.C., Higa, S., Chen, Y.J. and Chen, S.A., *Heterogeneous Expression of Potassium Currents and Pacemaker Currents Potentially Regulates Arrhythmogenesis of Pulmonary Vein Cardiomyocytes*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2009. **20**(9): p. 1039-1045.
 12. Shiroshita-Takeshita, A., Brundel, B.J. and Nattel, S., *Atrial fibrillation: basic mechanisms, remodeling and triggers*. J Interv Card Electrophysiol, 2005. **13**(3): p. 181-93.
 13. Nattel, S., Guasch, E., Savelieva, I., Cosio, F.G., Valverde, I., Halperin, J.L., Conroy, J.M., Al-Khatib, S.M., Hess, P.L., Kirchhof, P., De Bono, J., Lip, G.Y., Banerjee, A., Ruskin, J., Blendea, D. and Camm, A.J., *Early management of atrial fibrillation to prevent cardiovascular complications*. Eur Heart J, 2014. **35**(22): p. 1448-56.
 14. Kotecha, D. and Kirchhof, P., *Rate and rhythm control have comparable effects on mortality and stroke in atrial fibrillation but better data are needed*. Evid Based Med, 2014. **19**(6): p. 222-3.
 15. Lewalter, T., Lickfett, L., Schwab, J.O., Yang, A. and Lüderitz, B., *Notfall Herzrhythmusstörungen*. Dtsch Arztebl, 2007. **104**(April): p. 1172-1180.
 16. Friberg, L., Hammar, N. and Rosenqvist, M., *Stroke in paroxysmal atrial fibrillation: report from the Stockholm Cohort of Atrial Fibrillation*. Eur Heart J, 2010. **31**(8): p. 967-75.
 17. Lip, G.Y., Nieuwlaat, R., Pisters, R., Lane, D.A. and Crijns, H.J., *Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: The euro heart survey on atrial fibrillation*. Chest, 2010. **137**(2): p. 263-272.
 18. Scherf, D., *Studies on auricular tachycardia caused by aconitine administration*. Proc Soc Exp Biol Med, 1947. **64**(2): p. 233-9.
 19. Arentz, T., Weber, R., Burkle, G., Herrera, C., Blum, T., Stockinger, J., Minners, J., Neumann, F.J. and Kalusche, D., *Small or large isolation areas around the pulmonary veins for the treatment of atrial fibrillation? Results from a prospective randomized study*. Circulation, 2007. **115**(24): p. 3057-63.
 20. Haegeli, L.M. and Calkins, H., *Catheter ablation of atrial fibrillation: an update*. Eur Heart J, 2014. **35**(36): p. 2454-9.
 21. Cappato, R., Calkins, H., Chen, S.A., Davies, W., Iesaka, Y., Kalman, J., Kim, Y.H., Klein, G., Natale, A., Packer, D., Skanes, A., Ambrogi, F. and Biganzoli, E., *Updated worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2010. **3**(1): p. 32-8.
 22. Ganesan, A.N., Shipp, N.J., Brooks, A.G., Kuklik, P., Lau, D.H., Lim, H.S., Sullivan, T., Roberts-Thomson, K.C. and Sanders, P., *Long-term outcomes of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(2): p. e004549.
 23. Cosedis Nielsen, J., Johannessen, A., Raatikainen, P., Hindricks, G., Walfridsson, H., Kongstad, O., Pehrson, S., Englund, A., Hartikainen, J., Mortensen, L.S. and Hansen, P.S., *Radiofrequency ablation as initial therapy in paroxysmal atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2012. **367**(17): p. 1587-95.

24. Wazni, O.M., Marrouche, N.F., Martin, D.O., Verma, A., Bhargava, M., Saliba, W., Bash, D., Schweikert, R., Brachmann, J., Gunther, J., Gutleben, K., Pisano, E., Potenza, D., Fanelli, R., Raviele, A., Themistoclakis, S., Rossillo, A., Bonso, A. and Natale, A., *Radiofrequency ablation vs antiarrhythmic drugs as first-line treatment of symptomatic atrial fibrillation: a randomized trial*. JAMA, 2005. **293**(21): p. 2634-40.
25. Oral, H., Pappone, C., Chugh, A., Good, E., Bogun, F., Pelosi, F., Jr., Bates, E.R., Lehmann, M.H., Vicedomini, G., Augello, G., Agricola, E., Sala, S., Santinelli, V. and Morady, F., *Circumferential pulmonary-vein ablation for chronic atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 934-41.
26. Scherr, D., Khairy, P., Miyazaki, S., Aurillac-Lavignolle, V., Pascale, P., Wilton, S.B., Ramoul, K., Komatsu, Y., Roten, L., Jadidi, A., Linton, N., Pedersen, M., Daly, M., O'Neill, M., Knecht, S., Weerasooriya, R., Rostock, T., Manninger, M., Cochet, H., Shah, A.J., Yeim, S., Denis, A., Derval, N., Hocini, M., Sacher, F., Haissaguerre, M. and Jais, P., *Five-year outcome of catheter ablation of persistent atrial fibrillation using termination of atrial fibrillation as a procedural endpoint*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2015. **8**(1): p. 18-24.
27. Mont, L., Bisbal, F., Hernandez-Madrid, A., Perez-Castellano, N., Vinolas, X., Arenal, A., Arribas, F., Fernandez-Lozano, I., Bodegas, A., Cobos, A., Matia, R., Perez-Villacastin, J., Guerra, J.M., Avila, P., Lopez-Gil, M., Castro, V., Arana, J.I. and Brugada, J., *Catheter ablation vs. antiarrhythmic drug treatment of persistent atrial fibrillation: a multicentre, randomized, controlled trial (SARA study)*. Eur Heart J, 2014. **35**(8): p. 501-7.
28. Wokhlu, A., Hodge, D.O., Monahan, K.H., Asirvatham, S.J., Friedman, P.A., Munger, T.M., Cha, Y.M., Shen, W.K., Brady, P.A., Bluhm, C.M., Haroldson, J.M., Hammill, S.C. and Packer, D.L., *Long-term outcome of atrial fibrillation ablation: impact and predictors of very late recurrence*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2010. **21**(10): p. 1071-8.
29. Ouyang, F., Tilz, R., Chun, J., Schmidt, B., Wissner, E., Zerm, T., Neven, K., Köktürk, B., Konstantinidou, M., Metzner, A., Fuernkranz, A. and Kuck, K.-H., *Long-Term Results of Catheter Ablation in Paroxysmal Atrial Fibrillation: Lessons From a 5-Year Follow-Up*. Circulation, 2010. **122**(23): p. 2368-2377.
30. Han, S. and Hwang, C., *How to Achieve Complete and Permanent Pulmonary Vein Isolation without Complications*. Korean Circ J, 2014. **44**(5): p. 291-300.
31. Aviles, R.J., Martin, D.O., Apperson-Hansen, C., Houghtaling, P.L., Rautaharju, P., Kronmal, R.A., Tracy, R.P., Van Wagener, D.R., Psaty, B.M., Lauer, M.S. and Chung, M.K., *Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation*. Circulation, 2003. **108**(24): p. 3006-10.
32. Letsas, K.P., Weber, R., Burkle, G., Mihas, C.C., Minners, J., Kalusche, D. and Arentz, T., *Pre-ablative predictors of atrial fibrillation recurrence following pulmonary vein isolation: the potential role of inflammation*. Europace, 2009. **11**(2): p. 158-63.
33. Husser, D., Adams, V., Piorkowski, C., Hindricks, G. and Bollmann, A., *Chromosome 4q25 variants and atrial fibrillation recurrence after catheter ablation*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(8): p. 747-53.
34. Sinner, M.F., Pfeufer, A. and Kaab, S., *Genetics of atrial fibrillation: rare mutations, common variants and clinical relevance?* Herzschrhythmerther Elektrophysiol, 2006. **17**(2): p. 95-105.

35. Fox, C.S., Parise, H., D'Agostino, R.B., Sr., Lloyd-Jones, D.M., Vasan, R.S., Wang, T.J., Levy, D., Wolf, P.A. and Benjamin, E.J., *Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring*. JAMA, 2004. **291**(23): p. 2851-5.
36. Wutzler, A., Kestler, C., Perrot, A., Loehr, L., Huemer, M., Parwani, A.S., Attanasio, P., Özcelik, C., Schunck, W.H., Gollasch, M., Haverkamp, W. and Boldt, L.H., *Variations in the human soluble epoxide hydrolase gene and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation*. Int J Cardiol, 2013. **168**(4): p. 3647-3651.
37. Olson, T.M., Alekseev, A.E., Moreau, C., Liu, X.K., Zingman, L.V., Miki, T., Seino, S., Asirvatham, S.J., Jahangir, A. and Terzic, A., *K(ATP) channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007. **4**(2): p. 110-116.
38. Olson, T.M., Alekseev, A.E., Liu, X.K., Park, S., Zingman, L.V., Bienengraeber, M., Sattiraju, S., Ballew, J.D., Jahangir, A. and Terzic, A., *Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(14): p. 2185-91.
39. Ravn, L.S., Aizawa, Y., Pollevick, G.D., Hofman-Bang, J., Cordeiro, J.M., Dixen, U., Jensen, G., Wu, Y., Burashnikov, E., Haunso, S., Guerchicoff, A., Hu, D., Svendsen, J.H., Christiansen, M. and Antzelevitch, C., *Gain of function in I(Ks) secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2008. **5**(3): p. 427-435.
40. Olson, T.M., Michels, V.V., Ballew, J.D., Reyna, S.P., Karst, M.L., Herron, K.J., Horton, S.C., Rodeheffer, R.J. and Anderson, J.L., *Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation*. JAMA, 2005. **293**(4): p. 447-54.
41. Gollob, M.H., Jones, D.L., Krahn, A.D., Danis, L., Gong, X.-Q., Shao, Q., Liu, X., Veinot, J.P., Tang, A.S.L., Stewart, A.F.R., Tesson, F., Klein, G.J., Yee, R., Skanes, A.C., Guiraudon, G.M., Ebihara, L. and Bai, D., *Somatic Mutations in the Connexin 40 Gene (GJA5) in Atrial Fibrillation*. N Engl J Med, 2006. **354**(25): p. 2677-2688.
42. Zhang, X., Chen, S., Yoo, S., Chakrabarti, S., Zhang, T., Ke, T., Oberti, C., Yong, S.L., Fang, F., Li, L., de la Fuente, R., Wang, L., Chen, Q. and Wang, Q.K., *Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1017-27.
43. Hodgson-Zingman, D.M., Karst, M.L., Zingman, L.V., Heublein, D.M., Darbar, D., Herron, K.J., Ballew, J.D., de Andrade, M., Burnett, J.C., Jr. and Olson, T.M., *Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2008. **359**(2): p. 158-65.
44. Darbar, D., Motsinger, A.A., Ritchie, M.D., Gainer, J.V. and Roden, D.M., *Polymorphism modulates symptomatic response to antiarrhythmic drug therapy in patients with lone atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2007. **4**(6): p. 743-9.
45. Schnabel, R.B., Kerr, K.F., Lubitz, S.A., Alkylbekova, E.L., Marcus, G.M., Sinner, M.F., Magnani, J.W., Wolf, P.A., Deo, R., Lloyd-Jones, D.M., Lunetta, K.L., Mehra, R., Levy, D., Fox, E.R., Arking, D.E., Mosley, T.H., Muller-Nurasyid, M., Young, T.R., Wichmann, H.E., Seshadri, S., Farlow, D.N., Rotter, J.I., Soliman, E.Z., Glazer, N.L., Wilson, J.G., Breteler, M.M., Sotoodehnia, N., Newton-Cheh, C., Kaab, S., Ellinor, P.T., Alonso, A., Benjamin, E.J. and Heckbert, S.R., *Large-scale candidate gene analysis in whites and African Americans identifies IL6R polymorphism in relation to atrial fibrillation: the National Heart, Lung, and Blood*

- Institute's Candidate Gene Association Resource (CARE) project. Circ Cardiovasc Genet*, 2011. **4**(5): p. 557-64.
46. Roberts, J.D. and Gollob, M.H., *Impact of genetic discoveries on the classification of lone atrial fibrillation. J Am Coll Cardiol*, 2010. **55**(8): p. 705-12.
 47. Imig, J.D. and Hammock, B.D., *Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(10): p. 794-805.
 48. Nithipatikom, K. and Gross, G.J., *Review article: epoxyeicosatrienoic acids: novel mediators of cardioprotection. J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2010. **15**(2): p. 112-9.
 49. Seubert, J.M., Zeldin, D.C., Nithipatikom, K. and Gross, G.J., *Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury. Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007. **82**(1-4): p. 50-9.
 50. Spector, A.A., Fang, X., Snyder, G.D. and Weintraub, N.L., *Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. Prog Lipid Res*, 2004. **43**(1): p. 55-90.
 51. Yu, Z., Xu, F., Huse, L.M., Morisseau, C., Draper, A.J., Newman, J.W., Parker, C., Graham, L., Engler, M.M., Hammock, B.D., Zeldin, D.C. and Kroetz, D.L., *Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. Circ Res*, 2000. **87**(11): p. 992-8.
 52. Fang, X., Weintraub, N.L., Oltman, C.L., Stoll, L.L., Kaduce, T.L., Harmon, S., Dellsperger, K.C., Morisseau, C., Hammock, B.D. and Spector, A.A., *Human coronary endothelial cells convert 14,15-EET to a biologically active chain-shortened epoxide. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(6): p. 2306-14.
 53. Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D.C. and Liao, J.K., *Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. Science*, 1999. **285**(5431): p. 1276-9.
 54. Sirish, P., Li, N., Liu, J.Y., Lee, K.S., Hwang, S.H., Qiu, H., Zhao, C., Ma, S.M., Lopez, J.E., Hammock, B.D. and Chiamvimonvat, N., *Unique mechanistic insights into the beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in the prevention of cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(14): p. 5618-23.
 55. Ulu, A., Davis, B.B., Tsai, H.J., Kim, I.H., Morisseau, C., Inceoglu, B., Fiehn, O., Hammock, B.D. and Weiss, R.H., *Soluble epoxide hydrolase inhibitors reduce the development of atherosclerosis in apolipoprotein e-knockout mouse model. J Cardiovasc Pharmacol*, 2008. **52**(4): p. 314-23.
 56. Zhao, T.T., Wasti, B., Xu, D.Y., Shen, L., Du, J.Q. and Zhao, S.P., *Soluble epoxide hydrolase and ischemic cardiomyopathy. Int J Cardiol*, 2012. **155**(2): p. 181-7.
 57. Seubert, J.M., Sinal, C.J., Graves, J., DeGraff, L.M., Bradbury, J.A., Lee, C.R., Goralski, K., Carey, M.A., Luria, A., Newman, J.W., Hammock, B.D., Falck, J.R., Roberts, H., Rockman, H.A., Murphy, E. and Zeldin, D.C., *Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function. Circ Res*, 2006. **99**(4): p. 442-50.
 58. Lee, H.C., Lu, T., Weintraub, N.L., VanRollins, M., Spector, A.A. and Shibata, E.F., *Effects of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes. J Physiol*, 1999. **519 Pt 1**: p. 153-68.
 59. Lu, T., Ye, D., Wang, X., Seubert, J.M., Graves, J.P., Bradbury, J.A., Zeldin, D.C. and Lee, H.C., *Cardiac and vascular KATP channels in rats are activated by*

- endogenous epoxyeicosatrienoic acids through different mechanisms.* J Physiol, 2006. **575**(Pt 2): p. 627-44.
60. Xiao, Y.F., Ke, Q., Seubert, J.M., Bradbury, J.A., Graves, J., Degraff, L.M., Falck, J.R., Krausz, K., Gelboin, H.V., Morgan, J.P. and Zeldin, D.C., *Enhancement of cardiac L-type Ca²⁺ currents in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of CYP2J2.* Mol Pharmacol, 2004. **66**(6): p. 1607-16.
 61. Ke, Q., Xiao, Y.F., Bradbury, J.A., Graves, J.P., Degraff, L.M., Seubert, J.M. and Zeldin, D.C., *Electrophysiological properties of cardiomyocytes isolated from CYP2J2 transgenic mice.* Mol Pharmacol, 2007. **72**(4): p. 1063-73.
 62. Fornage, M., Boerwinkle, E., Doris, P.A., Jacobs, D., Liu, K. and Wong, N.D., *Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study.* Circulation, 2004. **109**(3): p. 335-9.
 63. Lee, C.R., North, K.E., Bray, M.S., Fornage, M., Seubert, J.M., Newman, J.W., Hammock, B.D., Couper, D.J., Heiss, G. and Zeldin, D.C., *Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.* Hum Mol Genet, 2006. **15**(10): p. 1640-9.
 64. Monti, J., Fischer, J., Paskas, S., Heinig, M., Schulz, H., Gosele, C., Heuser, A., Fischer, R., Schmidt, C., Schirdewan, A., Gross, V., Hummel, O., Maatz, H., Patone, G., Saar, K., Vingron, M., Weldon, S.M., Lindpaintner, K., Hammock, B.D., Rohde, K., Dietz, R., Cook, S.A., Schunck, W.H., Luft, F.C. and Hubner, N., *Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease.* Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 529-37.
 65. Przybyla-Zawislak, B.D., Srivastava, P.K., Vazquez-Matias, J., Mohrenweiser, H.W., Maxwell, J.E., Hammock, B.D., Bradbury, J.A., Enayetallah, A.E., Zeldin, D.C. and Grant, D.F., *Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase.* Mol Pharmacol, 2003. **64**(2): p. 482-90.
 66. Kullmann, S., Binner, P., Rackebrandt, K., Hüge, A., Haltern, G., Lankisch, M., Futh, R., von Hodenberg, E., Bestehorn, H.P. and Scheffold, T., *Variation in the human soluble epoxide hydrolase gene and risk of restenosis after percutaneous coronary intervention.* BMC Cardiovasc Disord, 2009. **9**: p. 48.
 67. Fava, C., Montagnana, M., Danese, E., Almgren, P., Hedblad, B., Engstrom, G., Berglund, G., Minuz, P. and Melander, O., *Homozygosity for the EPHX2 K55R polymorphism increases the long-term risk of ischemic stroke in men: a study in Swedes.* Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(2): p. 94-103.
 68. Zordoky, B.N. and El-Kadi, A.O., *Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases.* Pharmacol Ther, 2010. **125**(3): p. 446-63.
 69. Fornage, M., Lee, C.R., Doris, P.A., Bray, M.S., Heiss, G., Zeldin, D.C. and Boerwinkle, E., *The soluble epoxide hydrolase gene harbors sequence variation associated with susceptibility to and protection from incident ischemic stroke.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(19): p. 2829-37.
 70. Merkel, M.J., Liu, L., Cao, Z., Packwood, W., Young, J., Alkayed, N.J. and Van Winkle, D.M., *Inhibition of soluble epoxide hydrolase preserves cardiomyocytes: role of STAT3 signaling.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H679-87.
 71. Wutzler, A., Rolf, S., Huemer, M., Parwani, A.S., Boldt, L.H., Herberger, E., Hohenbichler, K., Dietz, R. and Haverkamp, W., *Safety aspects of deep sedation*

- during catheter ablation of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2012. **35**(1): p. 38-43.
72. Mullis, K.B. and Faloona, F.A., *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
 73. Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Chen, Y., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., Gordon, L., Hendrix, M., Hourlier, T., Johnson, N., Kahari, A., Keefe, D., Keenan, S., Kinsella, R., Kokocinski, F., Kulesha, E., Larsson, P., Longden, I., McLaren, W., Overduin, B., Pritchard, B., Riat, H.S., Rios, D., Ritchie, G.R., Ruffier, M., Schuster, M., Sobral, D., Spudich, G., Tang, Y.A., Trevanion, S., Vandrovcova, J., Vilella, A.J., White, S., Wilder, S.P., Zadissa, A., Zamora, J., Aken, B.L., Birney, E., Cunningham, F., Dunham, I., Durbin, R., Fernandez-Suarez, X.M., Herrero, J., Hubbard, T.J., Parker, A., Proctor, G., Vogel, J. and Searle, S.M., *Ensembl 2011*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D800-6.
 74. Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. and Dveksler, G.S., *General concepts for PCR primer design*. *PCR Methods Appl*, 1993. **3**(3): p. S30-7.
 75. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
 76. Chen, P., *Genetics. Biology 3400. Aurora University, Aurora, IL, USA*, 2008 (aufgerufen am 09.09.2014 unter <http://bio3400.nicerweb.com>).
 77. Clark, D.P. and Pazdernik, N.J., *Molekulare Biotechnologie*. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
 78. *Produktinformation 100 bp ladder*. Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, 2014 (aufgerufen am 12.09.2014 unter <http://www.genaxxon.com>).
 79. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
 80. Meyer, C. and Paulay, G. *DNA Sequencing*. Cowrie Genetic Database Project, Florida Museum of Natural History, University of Florida, Gainesville, FL, USA, 2005 (aufgerufen am 17.09.2014 unter <http://www.flmnh.ufl.edu>).
 81. Porath, J. and Flodin, P., *Gel filtration: a method for desalting and group separation*. *Nature*, 1959. **183**(4676): p. 1657-9.
 82. Lee, J.P., Yang, S.H., Kim, D.K., Lee, H., Kim, B., Cho, J.Y., Yu, K.S., Paik, J.H., Kim, M., Lim, C.S. and Kim, Y.S., *In vivo activity of epoxide hydrolase according to sequence variation affects the progression of human IgA nephropathy*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **300**(6): p. F1283-90.
 83. Ouyang, F., Antz, M., Ernst, S., Hachiya, H., Mavrakis, H., Deger, F.T., Schaumann, A., Chun, J., Falk, P., Hennig, D., Liu, X., Bansch, D. and Kuck, K.H., *Recovered pulmonary vein conduction as a dominant factor for recurrent atrial tachyarrhythmias after complete circular isolation of the pulmonary veins: lessons from double Lasso technique*. *Circulation*, 2005. **111**(2): p. 127-35.
 84. Arujuna, A., Karim, R., Caulfield, D., Knowles, B., Rhode, K., Schaeffter, T., Kato, B., Rinaldi, C.A., Cooklin, M., Razavi, R., O'Neill, M.D. and Gill, J., *Acute pulmonary vein isolation is achieved by a combination of reversible and irreversible atrial injury after catheter ablation: evidence from magnetic resonance imaging*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012. **5**(4): p. 691-700.
 85. McGarry, T.J. and Narayan, S.M., *The Anatomical Basis of Pulmonary Vein Reconnection After Ablation for Atrial Fibrillation: Wounds That Never Felt a Scar?* *J Am Coll Cardiol*, 2012. **59**(10): p. 939-941.

86. Kowalski, M., Grimes, M.M., Perez, F.J., Kenigsberg, D.N., Koneru, J., Kasirajan, V., Wood, M.A. and Ellenbogen, K.A., *Histopathologic characterization of chronic radiofrequency ablation lesions for pulmonary vein isolation*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(10): p. 930-8.
87. Westphal, C., Spallek, B., Konkell, A., Marko, L., Qadri, F., DeGraff, L.M., Schubert, C., Bradbury, J.A., Regitz-Zagrosek, V., Falck, J.R., Zeldin, D.C., Muller, D.N., Schunck, W.H. and Fischer, R., *CYP2J2 overexpression protects against arrhythmia susceptibility in cardiac hypertrophy*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73490.
88. Leask, A., *Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis: TGF β , Angiotensin, Endothelin, CCN2, and PDGF, Partners in Fibroblast Activation*. Circ Res, 2010. **106**(11): p. 1675-1680.
89. Hinz, B., *Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 526-537.
90. Nattel, S. and Harada, M., *Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation: Recent Advances and Translational Perspectives*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(22): p. 2335-2345.
91. Feng, W., Xu, X., Zhao, G., Li, G., Liu, T., Zhao, J., Dong, R., Wang, D.W. and Tu, L., *EETs and CYP2J2 inhibit TNF-alpha-induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells and TGF-beta1-induced migration in pulmonary artery smooth muscle cells*. Int J Mol Med, 2013. **32**(3): p. 685-93.
92. Li, N., Liu, J.Y., Timofeyev, V., Qiu, H., Hwang, S.H., Tuteja, D., Lu, L., Yang, J., Mochida, H., Low, R., Hammock, B.D. and Chiamvimonvat, N., *Beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in myocardial infarction model: Insight gained using metabolomic approaches*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(6): p. 835-45.
93. Yang, S., Lin, L., Chen, J.X., Lee, C.R., Seubert, J.M., Wang, Y., Wang, H., Chao, Z.R., Tao, D.D., Gong, J.P., Lu, Z.Y., Wang, D.W. and Zeldin, D.C., *Cytochrome P-450 epoxygenases protect endothelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha via MAPK and PI3K/Akt signaling pathways*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H142-51.
94. Seubert, J., Yang, B., Bradbury, J.A., Graves, J., Degraff, L.M., Gabel, S., Gooch, R., Foley, J., Newman, J., Mao, L., Rockman, H.A., Hammock, B.D., Murphy, E. and Zeldin, D.C., *Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway*. Circ Res, 2004. **95**(5): p. 506-14.
95. Motoki, A., Merkel, M.J., Packwood, W.H., Cao, Z., Liu, L., Iliff, J., Alkayed, N.J. and Van Winkle, D.M., *Soluble epoxide hydrolase inhibition and gene deletion are protective against myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(5): p. H2128-34.
96. Liu, J.-Y., Yang, J., Inceoglu, B., Qiu, H., Ulu, A., Hwang, S.-H., Chiamvimonvat, N. and Hammock, B.D., *Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model*. Biochemical Pharmacology, 2010. **79**(6): p. 880-887.
97. Randerath, W.J. and Galetke, W., *Differenzialdiagnose der rezidivierenden Polyposis nasi: Das Analgetika-Asthma-Syndrom*. Dtsch Arztebl Int, 2007. **104**(46): p. 3178-.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

AA	Antiarrhythmikum/-a
CHD	Koronare Herzkrankheit (coronary heart disease), auch KHK
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
EDHF	Endothelabhängiger Hyperpolarisationsfaktor (endothelium derived hyperpol. factor)
EET	Epoxyeicosatriensäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
HF	Herzinsuffizienz (heart failure)
IL -	Interleukin -
KHK	Koronare Herzkrankheit, auch CHD
LAD	Linksatrialer Diameter
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
LOX	Lipoxygenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monozytäres chemotaktisches Protein 1 (monocyte chemotactic protein 1)
MRT	Magnetresonanztomographie
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PV	Pulmonalvene
PVI	Pulmonalvenenisolation
OAK	Orale Antikoagulation
sEH	Lösliche Epoxidhydrolase (soluble epoxide hydrolase)
sEHI	Hemmstoff der löslichen Epoxidhydrosase (sEH-Inhibitor)
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TIA	Transitorische ischämische Attacke
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (vascular cell adhesion molecule 1)
VHF	Vorhofflimmern

6.2 Abbildungen

Abbildung 1: Modifizierte DF-Map der Vorhöfe [9]	9
Abbildung 2: Darstellung verschiedener pathophysiologischer Aspekte bei VHF [4]	10
Abbildung 3: Beispiel-EKG.	13
Abbildung 4: Fließschema zur Frequenzkontrolle	15
Abbildung 5: Fließschema zur Rhythmuskontrolle	16
Abbildung 6: Fließschema zur Kardioversion	17
Abbildung 7: Technik der zirkumferentiellen Pulmonalvenenisolation [4]	20
Abbildung 8: Signalwege des Arachidonsäure-Metabolismus [49]	28
Abbildung 9: Ablauf der Polymerasekettenreaktion[76]	41
Abbildung 10: Beispiel eines Molekulargewichtsmarkers [78]	44
Abbildung 11: Verdeutlichung des Prinzips der Kettenabbruchs-reaktion [80]	46
Abbildung 12: Exon 2: Gelelektrophorese nach PCR	51
Abbildung 13: SNP K55R: Bearbeitete Screenshots des Programms Sequencher 4.10.1	53
Abbildung 14: SNP Q287R: Bearbeitete Screenshots des Programms Sequencher 4.10.1	53

6.3 Tabellen

Tabelle 1: VHF-Typen laut ESC-Leitlinien 2016	8
Tabelle 2: Überarbeitete Stadieneinteilung der Schwere von VHF-Symptomen laut EHRA	12
Tabelle 3: Zur Rhythmuskontrolle empfohlene Medikamente laut ESC Leitlinien 2016	16
Tabelle 4: CHA ₂ DS ₂ -VASc-Score.....	18
Tabelle 5: Erfolgsraten der Katheterablation.....	21
Tabelle 6: Wichtigste Komplikationen nach Katheterablation	22
Tabelle 7: Vergleich der Erfolgsraten von Katheterablation und medikamentöser Rhythmuskontrolle bei paroxysmalem VHF	23
Tabelle 8: Beispiele für Gene, deren Mutationen mit VHF assoziiert sind	26
Tabelle 9: Ansatz für PCR - Mastermix	41
Tabelle 10: Ablauf der PCR.....	42
Tabelle 11: Gradingprogramm zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur.....	42
Tabelle 12: Inhaltsstoffe eines 3% Agarosegels	43
Tabelle 13: Inhaltsstoffe des 5xTBE-Puffers	43
Tabelle 14: Inhaltsstoffe des Auftragspuffers	43
Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die Enzymatische Aufreinigung	46
Tabelle 16: Ablauf des Sequenzierungsprogramms	47
Tabelle 17: Mastermix-Ansatz für die Sequenzierung	47
Tabelle 18: Primer für die Exons 2 und 8 des EPHX2-Gens	50
Tabelle 19: Exon 2: SNP K55R	52
Tabelle 20: Exon 8: SNP R287Q.....	52
Tabelle 21: SNP K55R: Genotypverteilung in VHF- und Kontrollkollektiv	54

Anhang

Tabelle 22: SNP R287Q: Genotypverteilung in VHF- und Kontrollkollektiv	54
Tabelle 23: Vergleich von klinischen und echokardiografischen Eigenschaften sowie verabreichter Medikation zwischen den SNP-Trägern und Wildtyp-Trägern	56
Tabelle 24: Rezidivauftreten nach Katheterablation	57
Tabelle 25: Unabhängiger Vorhersagewert für Rezidivauftreten nach Katheterablation	57

6.4 Sequenzen

EPHX2 Exon 2 (ENST00000521400; ENSE00003516483):

AGGACTTCTGAATGATGCTTTCCAGAAAGGGGGACCAGAGGGTGCCACTACCCGGCTTATGAAAGG
AGAGATCACACTTTCCAG

EPHX2 Exon 8 (ENST00000521400; ENSE00003571420):

ATCCCTGCTCTGGCCAGGCAGGTTACCGGGTCTAGCTATGGACATGAAAGGCTATGGAGAGTCA
TCTGCTCCTCCCG

Anmerkung: Die Sequenzen entstammen der Ensembl Datenbank (<http://www.ensembl.org>) [73]

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christoph Kestler versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle genetischer Variationen des Gens der löslichen Epoxidhydrolase bei Vorhofflimmern“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen:

Christoph Kestler hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Wutzler, A., Kestler, C., Perrot, A., Loehr, L., Huemer, M., Parwani, A.S., Attanasio, P., Özcelik, C., Schunck, W.H., Gollasch, M., Haverkamp, W. and Boldt, L.H., *Variations in the human soluble epoxide hydrolase gene and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation*. Int J Cardiol, 2013. 168(4): p. 3647-3651.

Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit bei Patientenrekrutierung sowie organisatorischen und administrativen Prozessen, Selbstständige Durchführung und Auswertung der genetischen Analysen, Durchführung der stat. Berechnungen gemeinsam mit dem Erstautor und Betreuer der Doktorarbeit, Alexander Wutzler, sowie Mitarbeit am Manuskript der Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Publikationsliste

Wutzler, A., Kestler, C., Perrot, A., Loehr, L., Huemer, M., Parwani, A.S., Attanasio, P., Özcelik, C., Schunck, W.H., Gollasch, M., Haverkamp, W. and Boldt, L.H., *Variations in the human soluble epoxide hydrolase gene and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation*. Int J Cardiol, 2013. **168**(4): p. 3647-3651.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

10 Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Wilhelm Haverkamp danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Med. Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Charité Campus Virchow Klinikum, anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus schulde ich ihm Dank für die finanzielle Förderung im Rahmen eines Promotionsstipendiums der Charité.

Meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Wutzler danke ich für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, für die Einweisung in das wissenschaftliche Arbeiten, für kritische Diskussion meiner Ergebnisse sowie für das Heranführen an die Interventionelle Rhythmologie. Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Leif-Hendrik Boldt, dem Leiter der Arbeitsgruppe, möchte ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie für die Unterstützung bei meinen ersten beruflichen Schritten in der Kardiologie danken, ihm und Herrn Wutzler ist meine Begeisterung für Rhythmologie geschuldet.

Herrn Dipl.-Ing. Andreas Perrot und den Mitarbeitern des Kardiogenetischen Labors in Berlin-Buch danke ich für die Unterstützung bei den genetischen Analysen und für die Einweisung in die Laborarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken. Ohne ihre jahrelange Unterstützung wären mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen. Meiner Freundin Lena danke ich für die liebevolle Unterstützung insbesondere auf den schweren letzten Metern dieses Projekts.