

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Gruppeneinteilung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Bedeutung der chronischen myokardialen Inflammation für den Umbau der extrazellulären Matrix und die Induktion der MMP/TIMP-Expression bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie zu untersuchen. Dazu wurde eine Gruppe von Patienten mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie einer Patientengruppe mit einer idiopathischen Kardiomyopathie und einer Kontrollgruppe gegenüber gestellt. Hierdurch konnte der Effekt einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion von dem Einfluss einer chronischen inflammatorischen Reaktion des Myokards separiert werden. Als abhängige Variablen wurden MMP-3 als Matrixmetalloproteinase und TIMP-4 als Tissue Inhibitor of Metalloproteinases verwendet. MMP-3 ist in der Lage eine Vielzahl von Matrixproteinen wie Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV und Proteoglykane zu degradieren und kann zusätzlich andere MMPs direkt aktivieren. TIMP-4 ist ein direkter Inhibitor von MMP-3 und dominiert in der myokardialen Verteilung der MMP-Inhibitoren. Somit können MMP-3 und TIMP-4 als Schlüsselenzyme des matrixdegradierenden Systems verstanden werden und bieten sich daher für eine exemplarische Untersuchung des MMP/TIMP-Systems an.

Für die vorliegende Studie wurden die eingeschlossenen Patienten (n=24) auf die drei genannten Kollektive aufgeteilt. Dabei ist zu betonen, dass die Zuteilung auf die einzelnen Kollektive erst nach der abgeschlossenen klinischen und invasiven Diagnostik erfolgte. Alle Patienten wurden wegen einer myokardialen Funktionsstörung der klinischen und invasiven Diagnostik unterzogen. In Abhängigkeit von der Ejektionsfraktion, welche planimetrisch im Rahmen der Linksherzkatheteruntersuchung bestimmt wurde, und der entzündlichen zellulären Infiltration an CD3 T-Lymphozyten, erfasst über die immunhistologische Aufarbeitung des Biopsiematerials, konnten die Patienten auf die Kollektive aufgeteilt werden.

2.1.1 Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

Bei 15 Patienten wurde eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) diagnostiziert. Eine dilatative Kardiomyopathie wird auf der Grundlage einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion mit schwerer Herzinsuffizienz und konsekutiv verschlechterter Kontraktilität festgestellt. Für die vorliegende Arbeit mussten die anamnestischen und diagnostischen Daten der Patienten den Kriterien der dilatativen Kardiomyopathie der WHO/ISFC von 1995 standhalten, um in das Kollektiv aufgenommen werden zu können. So musste die Ejektionsfraktion, planimetrisch in der Linksherzkatheteruntersuchung bestimmt, unter 50% liegen. Linksventrikuläre Funktionsstörungen bekannter Ursache, spezifische Kardiomyopathien und andere Kardiomyopathieformen nach den Kriterien der WHO/ISFC von 1995 konnten durch das beschriebene diagnostische Programm im Vorfeld ausgeschlossen werden. Hierunter fallen insbesondere die koronare Herzerkrankung, hämodynamisch bedeutsame Vitien und das Cor hypertensivum. Das Kollektiv der Patienten mit einer DCM konnte aufgrund der immunhistologischen Ergebnisse auf zwei Gruppen aufgeteilt werden, so dass im folgenden die Patienten mit einer idiopathischen DCM den Patienten mit einer inflammatorische DCM gegenübergestellt werden.

2.1.1.1 Patienten mit einer inflammatorischen DCM (infDCM)

Bei 7 Patienten konnte nach Bestimmung der zellulären Infiltration an CD3 T-Lymphozyten eine Inflammation des myokardialen Gewebes diagnostiziert werden. Hierfür musste die Infiltration an CD3 T-Lymphozyten mindestens 2 pro HPF betragen.

2.1.1.2 Patienten mit einer idiopathischen DCM (idDCM)

Insgesamt 8 Patienten mit einer DCM zeigten keine pathologisch erhöhte CD3 T-Lymphozyten Infiltration im Myokard mit weniger als 2 CD3 T-Lymphozyten pro HPF, so dass die Diagnose einer idiopathische DCM gestellt wurde.

2.1.2 Kontrollgruppe (KG)

Patienten mit einer Ejektionsfraktion größer als 50 % und einer zellulären Infiltration an CD3 T-Lymphozyten kleiner als 2 pro HPF wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. So wurde bei 9 Patienten nach abgeschlossener invasiver Diagnostik eine lokoregionale linksventrikuläre Dysfunktion festgestellt. Die folgende Tabelle fasst die Versuchsgruppen und die jeweils gültigen Einschlusskriterien zusammen.

Tab. 3: Versuchsgruppen und Einschlusskriterien.

Versuchsgruppen	EF, %	CD3 T-Lymphozyten/HPF
KG (n=9)	> 50	< 2
infDCM (n=7)	< 50	> 2
idDCM (n=8)	< 50	< 2

2.2 Das Patientenkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden rechtsventrikuläre endomyokardiale Biopsien von insgesamt 24 Patienten aufgearbeitet, die mit einer myokardialen Funktionsstörung in der kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin vorstellig wurden. Dabei wurde nur solches Biopsiematerial verwendet, welches für die weitere Diagnostik nicht mehr benötigt wurde. Die Sichtung der Krankenakten, welche erst nach vollständiger Auswertung der Biopsien erfolgte, diente dem anamnestischen und demographischen Informationsgewinn. Eine zusätzliche Befragung oder Untersuchung der Patienten war nicht notwendig.

2.2.1 Demographische und anamnestische Daten

An demographischen Daten wurden das Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme sowie das Geschlecht der eingeschlossenen Patienten festgehalten. Anamnestisch interessierten die Dauer der Symptome sowie das Auftreten von Dyspnoe oder Palpitationen. Hinsichtlich der

Pharmakotherapie wurde eine Medikation mit ACE-Hemmern, Diuretika, Digitalis, β -Blockern, Spironolactonen und AT₁-Blockern dokumentiert.

2.2.2 Technische Untersuchungen

Patienten mit einer myokardialen Funktionsstörung werden routinemäßig folgender technischen Diagnostik unterzogen: Elektrokardiographie, Echokardiographie, Linksherzkatheteruntersuchung mit Koronarangiographie, Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Biopsieentnahme. Bei einigen Patienten wird darüber hinaus auch eine Radionuklidventrikulographie veranlasst. Die gesammelten Untersuchungsergebnisse werden zur Erstellung des Gesamtbildes der Schwere der linksventrikulären Funktionsstörung herangezogen. Erkrankungen wie eine koronare Herzerkrankung, ein Cor hypertensivum und hämodynamisch bedeutsame Vitien können so als Auslöser einer eingeschränkten Herzfunktion ausgeschlossen werden.

2.2.2.1 EKG

Es wurde ein 12 Kanal-Standard-EKG mit den Extremitätenableitungen nach Einthoven und Goldberge sowie mit den Brustwandableitungen nach Wilson abgeleitet. Hiermit konnten Aussagen über den Herzrhythmus, über Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen sowie über Repolarisationsstörungen gemacht werden. Festgehalten wurde das Auftreten von Vorhofflimmern, ventrikulären Extrasystolen, Schenkelblöcken und ST-Veränderungen.

2.2.2.2 Echokardiographie in Ruhe:

Die Echokardiographie ist eine nichtinvasive Methode zur Beurteilung der anatomischen Verhältnisse des Herzens und dessen Funktion. Für die vorliegende Untersuchung interessierten die Größenverhältnisse der Herzhöhlen. Hierzu wurde der linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Durchmesser vermessen, welche als linksventrikulärer enddiastolische Diameter (LVEDD) und linksventrikulärer endsystolischer Diameter (LVESD) in Millimetern (mm) angegeben wurde. Anhand dieser Parameter konnte das Fractional Shortening (FS) in Prozent (%) als Maß für die globale linksventrikuläre Funktion

ermittelt werden (Formel, siehe Anhang). Des Weiteren wurden Beweglichkeit und Struktur der Herzklappen zur Erfassung möglicher hämodynamisch relevanter Vitien dargestellt.

2.2.2.3 Radionuklidventrikulographie

Bei der Radionuklidventrikulographie (RNV) wurden nach Gabe von mit Technetium (^{99m}Tc) markierte Erythrozyten die Herzhöhlen aus der Left-Anterior-Oblique-Position mit einer Gammakamera aufgenommen. So können alle Volumenphasen einer Herzaktion dargestellt werden. Für die vorliegende Studie wurde das enddiastolischen Volumen (LVEDV) in Milliliter (ml) als das Volumen, welches sich am Ende der Diastole im linken Ventrikel befindet und die Ejektionsfraktion (EF) in Prozent (%) als die Blutmenge, die der linke Ventrikel während der Kontraktion in Relation zum enddiastolischen Volumen auswirft, in Ruhe festgehalten.

2.2.2.4 Linksherzkatheter

Im Rahmen der Linksherzkatheteruntersuchung wurden mittels Kontrastmittel und unter Röntgendurchleuchtung sowohl der linke Ventrikel (Lävographie) als auch die Koronargefäße (Koronarangiographie) dargestellt. Hierdurch konnte eine koronare Herzerkrankung als Ursache der myokardialen Funktionsstörung ebenso ausgeschlossen werden wie hämodynamisch bedeutsame Ventildefekte. Planimetrisch wurde die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) in Prozent (%) bestimmt. Über eine Druckmessung im linken Ventrikel konnte der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) in mmHg angegeben werden.

2.2.2.5 Rechtsherzkatheter

Bei der Rechtsherzkatheteruntersuchung mittels Einschwemmkatheter ist eine Druckmessung im Niederdrucksystem möglich. Für die vorliegende Studie wurde der pulmonal-kapilläre Verschlussdruck (PCWP) in mmHg dokumentiert, welcher nach Okklusion der pulmonalarteriellen Strombahn über das distale Lumen des pulmonalarteriellen Katheters gemessen wird. Über die Thermodilutionsmethode konnte das Herzzeitvolumen (HZV) in

Liter pro Minute (l/min) erfasst werden. Bezogen auf die Körperoberfläche wurde der Cardiac Index (CI) in Liter pro Minute pro Quadratmeter ($l/min/m^2$) berechnet. Der Schlagvolumenindex (SVI) konnte durch Relation des Cardiac Index auf die Herzfrequenz ermittelt und in Liter pro Quadratmeter Körperoberfläche (l/m^2) angegeben werden.

Die Biopsien wurden transvenös der Septumwand des rechten Ventrikels entnommen. Diese wurden anschließend routinemäßig molekularbiologisch, histologisch und immunhistologisch untersucht.

2.2.2.6 Molekularbiologie

Die Endomyokardbiopsien werden mittels Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) aufgearbeitet und auf das Vorhandensein viraler RNA untersucht. Routinemäßig wird hierbei die Persistenz von Parvovirus B19, Adenovirus, Enteroviren, Humanes Herpes Virus 6, Ebstein Barr Virus, Coxsackivirus A, Coxsackivirus B und Echoviren im Endomyokardgewebe überprüft.

2.2.2.7 Histologie

Die Endomyokardbiopsate wurden nach Anfertigung von Paraffinschnitten mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. In der histologischen Bewertung der Proben wurde die Präsenz von mononukleären Infiltraten beurteilt. Überdies wurden die Biopsien auf Texturstörungen (Fibrose, Hypertrophie und zelluläre Nekrose) untersucht. Die Fibrose wurde als geringgradig, mittelgradig und hochgradig eingestuft und über die Werte 1 für eine geringgradige, 2 für eine mittelgradige und 3 für eine hochgradige Fibrose quantifiziert. Entsprechend den Dallaskriterien (Aretz et al., 1987) wurde bei Anwesenheit eines entzündlichen Infiltrats mit angrenzender Myozytolyse und fakultativem Vorhandensein von Fibrose eine aktive Myokarditis diagnostiziert. Die Konstellation entzündlicher Infiltrate mit fakultativer Fibrose und Fehlen von Nekrosen wurde als grenzwertige Myokarditis (Borderline-MC) befundet. Bei Fehlen von Infiltraten und Myozytolyse wurde eine MC ausgeschlossen. Des Weiteren wurde die Biopsie auf das Vorhandensein von myokardialen Speicherkrankheiten wie Amyloidose oder Hämochromatose untersucht.

2.2.2.8 Immunhistologie

Von den Endomyokardbiopsien wurden Gefrierschnitte angefertigt. Mittels sensitiver monoklonalen Antikörpern gegen die Lymphozyten-Antigene CD3, CD4 und CD8, Makrophagen und die Moleküle der MHC-Klasse I und II wurden die Biopsien auf das Vorhandensein entzündlich zellulärer Infiltrate untersucht. Die zellulären Infiltrate wurden als statistisches Mittel pro Gesichtsfeld bei einer 400-fachen Vergrößerung gezählt (High Power Field = HPF; Auswahl der Gesichtsfelder im Mäander-Muster). Als pathologisch im Sinne einer intramyokardialen Entzündung wurden Biopsien mit mehr als zwei CD3, CD4, CD8-positiven Lymphozyten oder aktivierte Makrophagen pro HPF bewertet, dies entsprach bei einer 400-fachen Vergrößerung mehr als 7 Zellen/ mm². Die Expression der MHC-Moleküle auf den interstitiellen Zellen wurde semiquantitativ mit der Abstufung Grad eins als normale und Grad zwei als verstärkte Immunreaktivität evaluiert (Kühl, et al., 1995; Kühl, et al., 1996).

2.3 Gewebepräparation und molekularbiologische Methoden

Die Endomyokardbiopsien wurden nach Entnahme aus der rechtsventrikulären Septumwand bis zur Aufarbeitung bei -195 bis -210 Grad Celsius in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bei der Durchführung der molekularbiologischen Aufarbeitung der Biopsien wurden ausschließlich sterile, RNase-freie Substanzen und Materialien verwendet. Glaswaren wurden bei 250°C für 5h gebacken und Arbeitsflächen und Einmalhandschuhe mit RNase-Zap behandelt.

2.3.1 RNA-Präparation mittels TRIZOL[®]

Die RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des TRIZOL[®] Reagenz und den dazugehörigen Protokollen der Firma GibcoBRL. Pro Patienten wurden 2 Biopsien je Ansatz aufgearbeitet. Die Herzbiopsien wurden in einer Lösung aus 380 µl Trizol und 20 µl Glykogen mit einer Konzentration von 10 µg/µl mittels des Polytron und eines Homogenisierstäbchens vollständig homogenisiert und anschließend bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Den Ansätzen wurde nun eine Menge von 300 µl Chloroform hinzugefügt. Dieses Gemisch musste für 15 Sekunden stark geschüttelt und nochmals bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert

werden. Durch die Zentrifugation der Proben für 25 Minuten bei 4 °C und 12.000 g konnten drei Phasen separiert werden. Die DNA- und proteinhaltige Inter- und Unterphase wurden verworfen. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde mittels einer Pipette abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß in 400 µl Isopropanol gelöst, zehnmal über Kopf geschwenkt und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA konnte nun mittels erneuter zehninütiger Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g pelletiert werden. Der sich über den Pellets gebildete Überstand wurde abpipettiert und verworfen, die Pellets mit 800 µl einer -20 °C-kalten, 75%igem Ethanollösung (v/v) und nochmaliger 5minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 7.500 g gewaschen. Wieder wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Pellets konnten anschließend an der Luft trocknen. Wurde das Pellet nach etwa 15 Minuten klar, konnte es in 9 µl nucleasefreiem Wasser (Firma) gelöst werden. Zur vollständigen Lösung der RNA wurden die Pellets 2 Sekunden gevortext, 5 Sekunden zentrifugiert und für 10 Minuten bei 55°C mit 500 rpm geschüttelt.

Abschließend wurden Konzentration und Qualität der RNA photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen. Dazu wurde 0,5 µl der gelösten RNA mit 74,5 µl nucleasefreiem Wasser auf 1:150 verdünnt. Eine $A_{260/280}$ - Ratio von 1,6-1,8 wurde als qualitativ gut beurteilt.

2.3.2 DNase Verdau

Um möglicherweise vorhandene chromosomale DNA zu eliminieren, wurde ein DNase-Verdau der RNA-Proben durchgeführt. Der Verdau wurde mit der DNase I[®] nach den Protokollen der Firma Roche ausgeführt.

3 µg RNA wurden in 8 µl nucleasefreiem Wasser gelöst und in einem 12 µl Reaktionsgemisch aus 4 µl 0,5 mM EDTA, 5 µl 100 mM Tris-HCl und 2µl 50 mM MgCl₂ bei einem pH von 7,2 mit 1 µl entsprechend 10 U RNase-freier DNase I für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden die Ansätze anschließend für 5 Minuten bei 90°C inkubiert und dann 3 Minuten auf Eis gestellt.

Zur Kontrolle der vollständigen DNA-Eliminierung wurde anschließend eine Kontroll-PCR mit βActin-Primern durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Wasser, als Positivkontrolle eine nested Probe bzw. bereits vorhandene cDNA eingesetzt.

2.3.3 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Reverse Transcription System der Firma Promega und den dazugehörigen Protokollen durchgeführt.

3 µg der DNase-verdaute RNA-Proben in der 12 µl Lösung aus dem DNase-Verdau wurden in einem 20 µl Reaktionsgemisch aus 8 µl 25mM MgCl₂, 4 µl 10×Reverse Transcription Buffer, 4 µl 10mM dNTPs, 1 µl RNasin[®], 1 µl AMV Reverse Transcriptase und 2 µl Oligo (dt)₁₅ Primer bei 42°C für 30 Minuten transkribiert. Durch Inkubation bei 90°C für 5 Minuten und auf Eis für 5 Minuten wurde das Enzym inaktiviert. Die so gewonnene cDNA konnte direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Proben kann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese geleistet werden. Ihr Prinzip beruht auf der Wanderung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld, die aufgrund ihrer Phosphat-Gruppen negativ geladen sind. Im verwendeten 0,5xTBE-Puffer (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH = 8,0) wandern die Nukleinsäuren als Polyanionen im elektrischen Feld zur Anode. Die Agarose bildet im ausgehärteten Zustand eine dreidimensionale Gelmatrix, welche die Wanderung größerer DNA-Fragmente stärker behindert als die kleineren.

PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel (w/v) in 0,5xTBE in einer Horizontalelektrophorese für 20 min bei 120 V aufgetrennt. Je Spur wurde in allen verwendeten Gelen 10 µl der jeweiligen PCR-Produkte von TIMP-4 und βActin und 20 µl des PCR-Produktes von MMP-3 in 1xGelbeladungspuffer (40% Sucrose (w/v), 0,25% Bromphenolblau (w/v)) aufgetragen. Zur optischen Darstellung der DNA unter UV-Licht wurden 0,4 µg/ml Ethidiumbromid den Agarosegelen zugefügt. Zur Kontrolle wurde bei allen Gelen ein DNA-Größenstandard (Marker) mitgeführt.

Direkt nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm digital aufgezeichnet (Belichtung = 1000 ms; Blende = 2,8 und 4,0; Vergrößerungsfaktor = 20) und zur Dokumentation elektronisch gespeichert.

2.3.5 Optimierung der PCR-Bedingungen

Damit die Ergebnisse der PCR semiquantitativ ausgewertet werden können, müssen vorab die PCR-Bedingungen, und zwar die Primeranlagerungstemperatur und die Zyklenzahl, optimiert werden.

2.3.5.1 Primeranlagerungstemperatur

Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde zunächst die Primeranlagerungstemperatur mit Hilfe des Gradient-Thermozyklers der Firma Eppendorf in mehreren Probeläufen zwischen 50°C und 70°C ausgetestet. Bei der optimalen Primeranlagerungstemperatur zeigt sich ein maximales Signal bei minimalen Nebenbanden. Als optimale Primeranlagerungstemperatur konnte für alle verwendete Primer eine Temperatur von 56°C ermittelt werden.

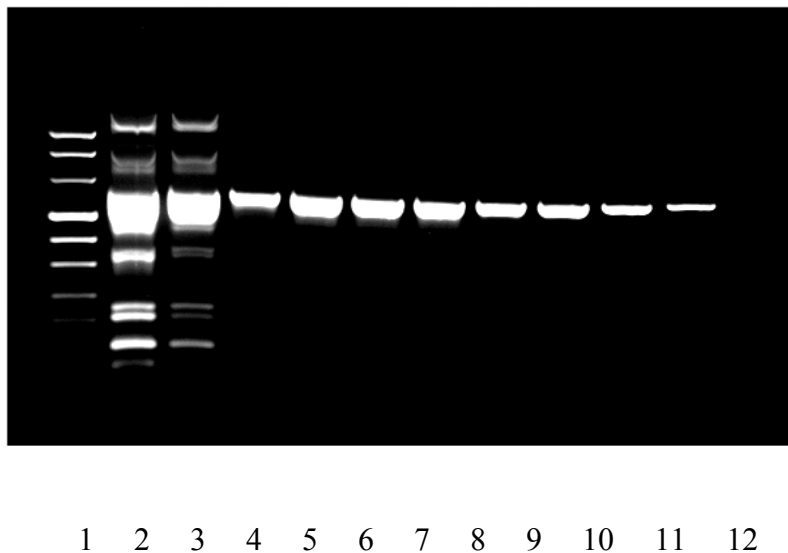


Abb. 3: PCR zur Optimierung der Primeranlagerungstemperatur. Spur 1: DNA-Längenstandard, Spur 2: 48,2 °C; Spur 3: 49,1 °C; Spur 4: 50,5 °C; Spur 5: 52,4 °C; Spur 6: 54,4 °C; Spur 7: 56,6 °C; Spur 8: 58,8 °C; Spur 9: 60,8 °C; Spur 10: 62,5 °C; Spur 11: 63,8 °C; Spur 12: H₂O.

2.3.5.2 Zyklusoptimierung

Bei einem semiquantitativen Vergleich zweier PCRs ist es von essentieller Bedeutung, dass sich die PCR im linear ansteigenden Teil der DNA-Amplifikationskurve befindet, um größtmögliche Unterschiede in der Genexpression zu zeigen.

Es wurden deshalb PCRs mit identischen Reaktionsansätzen, gleichen Versuchsbedingungen, aber unterschiedlichen Zyklenzahlen für die einzelnen Primerpaare durchgeführt. Die Proben wurden nebeneinander in einem 2%igem Agarosegel aufgetragen

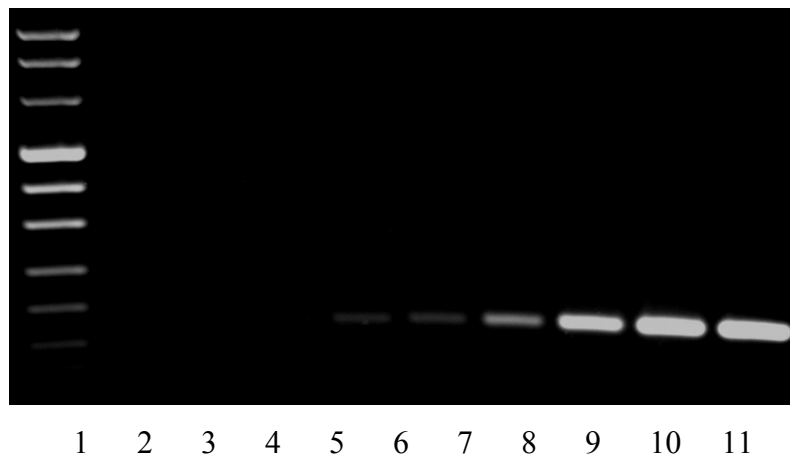


Abb. 4: Amplifikation von β Actin (171 bp) bei verschiedenen Zyklenzahlen. Spur 1: DNA-Längenstandard, Spur 2: Negativkontrolle, Spur 3-11: ansteigende Zyklenzahlen: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32.

Die Signalstärken wurden mit dem Scan-Image-Programm ausgewertet. In einem Koordinatensystem wurden die Pixel-Werte (OD-Werte) als Maß für die Stärke der Signale gegenüber den Zyklenzahlen aufgetragen. Für die semiquantitative RT-PCR wurde eine Zykluszahl im unteren, linear ansteigenden Teil der Amplifikationskurve gewählt

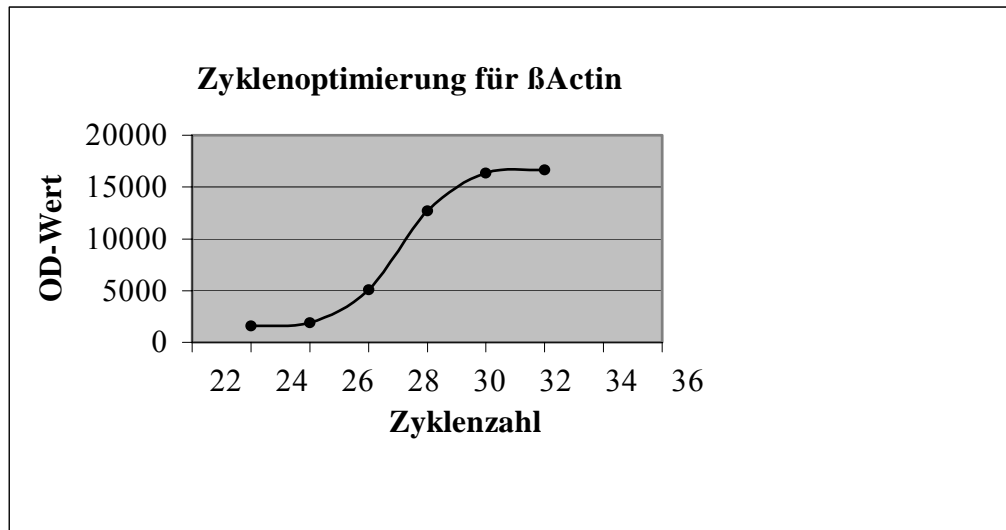


Abb. 5: Zusammenhang zwischen Zykluszahl und Grad der Amplifikation bei gleichem Einsatz an cDNA von β Actin.

2.3.6 Semiquantitative RT-PCR

Die gewonnene cDNA wurde auf die Transkripte von TIMP-4, MMP-3 und β Actin untersucht. Für jede PCR wurden 3 μ l cDNA eingesetzt, die in 39,0 μ l Wasser gelöst wurden. Zu jeder Probe wurden 8,25 μ l Reaktionsansatz bestehend aus 5 μ l 10 \times PCR-Puffer, 1,0 μ l 100mM dNTPs, 1,0 μ l 3'Primer, 1,0 μ l 5'Primer (Primerkonzentration: 100 μ M, gelöst in Aqua bidest.) und 0,25 μ l Amersham-Taq-DNA-Polymerase (1,25 U) gegeben. Für alle Primerpaare wurde das gleiche PCR-Programm verwendet:

Tab. 4: Programm für die Polymerasekettenreaktion.

Schritt	Dauer	Temperatur in °C	Reaktion
Schritt 1	2 min	95 °C	Denaturierung
Schritt 2	30 sec	95 °C	Denaturierung
Schritt 3	30 sec	56 °C	Primeranlagerung
Schritt 4	1 min	72 °C	DNA-Synthese
Schritt 5	10 min	72 °C	DNA- Synthese
Schritt 6	Mind. 5 min	4 °C	Reaktionsstop

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden entsprechend der optimalen Zyklenanzahl zyklisch wiederholt. Zur Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit Wasser amplifiziert.

Das Ergebnis der PCR wurde in einem 2%igen Agarosegel kontrolliert, im UV-Transluminator digitalisiert und die Stärke der Signale mit dem Scion-Image-Programm (©2000 Scion Corporation) in OD-Werte transformiert.

Jede PCR wurde durch eine oder mehrere weitere PCRs bestätigt. Weiterhin wurden die Ergebnisse von TIMP-4 und MMP-3 an den Ergebnissen von β Actin relativiert, da β Actin in allen Eukaryotenzellen in hohem Maße exprimiert, jedoch nicht bei chronisch inflammatorischer Myokardreaktion reguliert wird.

Tab. 5: Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR.

Amplifikat	Länge	Primersequenzen 5' → 3'	Annealing-Temperatur	Zykluszahl
TIMP-4	614 bp	5'-Primer: tgccaaatcaccacctgctac 3'-Primer: atgctgtcaaaccaccttctg	56,0°C	30
MMP-3	146 bp	5'-Primer: agagatatgtagaaggcacaatatgggcac 3'-Primer: gatacagattcacgctcaagttcccttgag	56,0°C	37
β Actin	171 bp	5'-Primer: gccttccttctctgggcatggagtctgtgg 3'-Primer: agggcagrgatctccttctgcatcctgtcg	56,0°C	27

2.4 Eingesetzte Arbeitsmittel

Folgende Übersicht weist tabellarisch alle verwendeten Arbeitsmittel auf.

Tab. 6: Verwendete Arbeitsgeräte.

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Bezug
250°C Ofen		Heraeus
Autoklaviergerät		Hartmann
Betriebssystem	Windows 2000 Professional	Microsoft
Computer	Pentium III	Asus
Digitaler Grafikdrucker	Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Elektronische Waage	DMS 580	Kern
Elektrophoresekammer	Mini-Protean [®] 3 Cell	Bio-Rad
Gellaufkammer		Biometra
Gelschlitten		UKBF
Homogenisiergerät	Pellet Pestle Motor	Sigma
Kühlschrank –20°C	economic super	Bosch
Kühlschrank –20°C/4°C	Electronic (ISH)	Bosch
Kühlschrank 4°C	cooler	Bosch
Kühlschrank –80°C	-85°C Ultralow Freezer	Nuaire
Kühlschrank –80°C	(ISH)	GFL
Magnetrühr- und Erwärmungsplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik
Mikrowelle	Microwave 800	Severin
Netzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra
PCR-Maschine	Mastercycler gradient	Eppendorf
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick

Photometer	Spectrophotometer DU 640i	Beckman
Pipetten	Reference	Eppendorf
Präzisionswaage		Sartorius
Schüttler	Swip	Edmund Bühler
Schüttler	3015 (ISH)	GFL
SPSS 11.0	Statistical Package for the Social Sciences	ZEDTA, Hochschulrechenzentrum der Freien Universität Berlin
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Superspeed RC-2B	Sorval
UV-Transilluminator	Bio Doc Analyse System	Biometra
Vortexgerät	VF 2	IKA-Labortechnik
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge 13R (ISH)	Heraeus

Tab. 7: Verwendete Verbrauchsartikel.

Verbrauchsartikel	Bezeichnung/Besonderheiten	Bezug
0,2 ml Reaktionsgefäße		Biozym
0,5 ml Reaktionsgefäße	RNAse-frei	Eppendorf
0,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	Eppendorf
1,5 ml Reaktionsgefäße	RNAse-frei	Eppendorf
1,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	Eppendorf
15 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
50 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
Einmalhandschuhe		Ansell Medical
Homogenisierstäbe	Pellet Pestles	Sigma
Photopapier	K 65 HM-CE	Mitsubishi

Pipettenspitzen 10,100,1000µl	Unsteril	Eppendorf
Pipettenspitzen 10,100,1000µl	mit Filtertip, RNase-frei	Biozym Diagnostik
Zentrifugationsgefäße	Polypropylen Oak Ridge Bottle	Sorval

Tab. 8: Verwendete Reagenzien.

Abkürzung/ Formel/ Name	Erläuterung/ vollständiger Name	Bezug
Aceton	pro analysi	Merck
Agarose	SeaKem LE Agarose	BioWhittaker Molecular Applications
Aqua bidest.	Aqua Spüllösung	Delta Pharma
Borsäure	für die Molekularbiologie	Merck
Bromphenolblau		Sigma
Chloroform		Merck
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Sigma
DEPC-treated water	RNase- freies Wasser	Ambion
DNase I	RNase-frei	Roche
dNTP Set	dATP,dGTP,dCTP,dTTP	Amersham
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid	Ambion
EDTA als Dihydrat	Ethylenediaminetetracetic acid	Merck
Ethanol absolut	pro analysi	Merck
Ethidiumbromid		Merck

Glycogen	In RNase freiem Wasser	Invitrogen
Isopropanol	= 2-Propanol	Merck
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	Ambion
Marker VIII	DNA-Längenstandard	Roche
Methanol		J.T.Baker
Nuclease free Water	Not DEPC treated	Ambion
Primer	siehe Kapitel 3.3.6	Tib Molbiol
Reverse Transcription System	inkl.: AMV Reverse Transkriptase, RNAsin, Oligo(dT) ₁₅ Primer, 10mM dNTP's, Reaktionspuffer, 25mM MgCl ₂ , Random Primer	Promega
RNase Zap	zur RNase Neutralisierung	Ambion
RNAsin	RNase-Inhibitor	Promega
Saccharose		Sigma
Taq	DNA Polymerase	Amersham
Trichloressigsäure		Merck
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Ambion
TRISMA Hydrochlorid TRISMA Base	beide zur Herstellung von Tris pH 7,5 (ISH)	Sigma
Trizol LS Reagent	zur Gewebeextraktion	Gibco BRL

2.5 Vorstudie zur Bestimmung des Stichprobenfehlers

Für die Aufarbeitung des endomyokardialen Gewebes standen zwei Biopsien pro Patient zur Verfügung. Bei einer kleinen Anzahl von Gewebeproben pro Patient stellt sich stets die Frage, ob durch diese geringe Anzahl von Biopsien die myokardiale Funktionsstörung hinreichend erfasst werden kann. Daher wurde zunächst in einer Vorstudie die Repräsentativität einer Biopsie für das rechtsventrikuläre Gewebe untersucht. Dazu wurde auf das Konzept des Stichprobenfehlers (Sampling Errors) zurückgegriffen. Der Sampling Error ist ein Maß für die Generalisierbarkeit einer Stichprobe und beschreibt die zu erwartende Repräsentativität einer Stichprobe für die Grundgesamtheit in Hinblick auf das zu untersuchende Merkmal. Der Sampling Error erfasst also den Unterschied zwischen den Charakteristika von der Stichprobe und der Grundgesamtheit.

Im Rahmen der Vorstudie konnten sechs Patienten eingeschlossen werden, die wegen einer myokardialen Funktionsstörung einer invasiven Diagnostik unterzogen wurden. Entsprechend erfolgte bei diesen Patienten die gleiche technische Diagnostik mit Elektrokardiographie, Echokardiographie, Linksherzkatheteruntersuchung mit Koronarangiographie und Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Biopsieentnahme wie bei den Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden. Daher war ein Vergleich des Patientenkollektivs der Vorstudie mit dem Kollektiv der Studie möglich. Bei jedem der Patienten der Vorstudie stand nach der Routinediagnostik noch Probenmaterial von insgesamt sechs Biopsien aus dem Bereich der Septumwand für die Bestimmung des Sampling Errors zur Verfügung. Diese Biopsien wurden nach dem gleichen Protokoll aufgearbeitet, wie die Gewebeproben für die Studie (siehe Abschnitt 2.3). Allerdings wurde nur die mRNA Menge von TIMP-4 gemessen und auf die mRNA Menge von β Actin bezogen.

2.6 Statistische Methoden

Für eine zufallskritische Absicherung der beobachteten Werte ist die Anwendung statistischer Testverfahren unerlässlich. Für die hier verwendeten Tests wurde hinsichtlich der Signifikanz eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ als ein signifikantes Ergebnis gewertet, wobei jeweils das genaue Signifikanzniveau als p-Wert angegeben wurde. p-Werte größer 0.05 wurden folglich als nicht signifikantes Ergebnis (n.s.) gewertet. Die Auswertung wurde mit SPSS 11.0, Statistical Package for the Social Sciences, durchgeführt.

2.6.1 Auswertung der Daten zu den Patientenkollektiven

Die Daten, die für die Charakterisierung des Patientenkollektivs verwendet wurden, waren sowohl nominalskalierte als auch intervall- bzw. verhältnisskalierte Daten.

Die intervallskalierten Daten wurden als numerische Häufigkeiten im Vergleich zu der möglichen Gesamthäufigkeit angegeben. So bezeichnet zum Beispiel in eine Tabelle zur Medikation mit ACE-Hemmern für die Kontrollgruppe der Wert 7/9, dass sieben der neun Patienten der Kontrollgruppe mit einem ACE-Hemmer behandelt wurden. Die statistische Auswertung dieser nominalskalierten Daten erfolgte mittels des χ^2 -Tests nach Pearson. Als relevante Voraussetzungen des χ^2 -Tests nach Pearson ist die Unabhängigkeit der einzelnen beobachteten Werte zu nennen. Außerdem muss jede Beobachtungseinheit eindeutig einer Merkmalskategorie zugeordnet werden können. Die Anzahl der erwarteten Häufigkeiten sollte größer als 5 sein. Allerdings erweisen sich die χ^2 -Techniken bezüglich der letzt genannten Voraussetzung als relativ stabil (Bortz, 1993).

Die verhältnisskalierten Daten wurden pro Gruppe als Mittelwert plus minus einer Standardabweichung und dem Range dargestellt. Die im Text angegebenen Mittelwerte wurden als Quotient aus der Summe der Beobachtungen durch die Anzahl der Beobachtungen berechnet und zusammen mit der Standardabweichung als Maß für die Beurteilung der Streuung der Werte angegeben. Die Standardabweichung ließ sich aus der Wurzel des Quotienten der Summe der Fehlerquadrate dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen bestimmen. Zusätzlich wurde der Range der Werte angegeben, der den größten und den kleinsten Wert der Verteilung angibt. Zur statistischen Auswertung der verhältnisskalierten Daten wurde auf den t-Test zurückgegriffen. Der t-Test hat folgende Voraussetzungen: Die Verteilung der Grundgesamtheit, aus denen die Stichprobe entnommen wurde, muss normalverteilt sein. Diese Voraussetzung der Normalverteilung der beobachteten Werte lässt sich anhand eines Histogramms hinreichende genau abgeschätzt. Dazu wurde das Histogramm über die Residuen der beobachteten Werte erstellt. Die Residuen ergeben sich aus der Differenz des beobachteten Wertes mit seinem gruppenspezifischen Mittelwert. So konnte die Voraussetzung der Normalverteilung direkt für das gesamte Kollektiv überprüft werden. Weiterhin müssen die Varianzen in den zu vergleichenden Populationen homogen

sein. Dies wird durch den Levene Test der Varianzgleichheit überprüft. Als letztes müssen die Stichproben von einander unabhängig sein (Bortz, 1993).

Mittels der genannten statistischen Methoden wurde die Gruppen auf relevante Unterschiede bzw. ihre Vergleichbarkeit hin überprüft und nicht zu Überprüfung der aufgestellten Hypothesen benutzt. Daher ist eine mehrfache Verwendung der beschriebenen statistischen Tests ohne Korrektur des α -Niveaus zulässig.

2.6.2 Auswertung der Vorstudie

Für die Berechnung des Sampling Errors wurden der patientenspezifische Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung berechnet. Um die Streuung der Werte um den Mittelwert zu veranschaulichen wurde die prozentuale Abweichung der einzelnen Werte von ihrem Mittelwert berechnet und als mittlere prozentuale Abweichung quantifiziert. Anschließend wurde die über alle sechs Patienten gemittelte prozentuale Abweichung und die Standardabweichung berechnet, welche sich zum Vergleich von Streuungen der Einzelwerte in verschiedenen Gruppen eignet.

2.6.3 Auswertung der Studie

Die deskriptive Darstellung der beobachteten Ergebnisse erfolgte mit dem graphischen Mittel des Boxplots. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom 25. bis 75. Perzentil begrenzt wird und deren innere Linie den Median repräsentiert, wobei der Median den Wert kennzeichnet, über bzw. unter dem 50% der beobachteten Werte liegen. Ferner wird der kleinste und der größte Wert markiert, sofern sie keine Ausreißer sind. Werte die um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet (Bühl & Zöfel, 2000). Weiterhin wurde die Verteilung durch ihren Mittelwert und den zugehörigen Standardfehler des Mittelwertes als Maß für die Streuung der beobachteten Werte dargestellt. Der Standardfehler ist ein Maß für die durchschnittliche Größe des Stichprobenfehlers und eignet sich, um Mittelwerte miteinander zu vergleichen (Bortz, 1993).

Die statistische Auswertung der Gruppenunterschiede wurde mittels der MANOVA (Multivariate Analysis of Variance) Prozedur berechnet. Dieses statistische Verfahren ist dann anzuwenden, wenn die Gruppenunterschiede mehrerer Variablen zufallskritisch

abgesichert werden sollen, welche untereinander eine inhaltlich begründete Abhängigkeit aufweisen. Im Rahme der MANOVA Prozedur wird der Einfluss der unabhängigen Variable auf jede abhängige Variable getrennt mittels der ANOVA Prozedur (Analysis of Variance) berechnet. Die ANOVA ist an folgende Voraussetzungen geknüpft: Die Fehlerkomponenten müssen normalverteilt sein, die Fehlervarianzen müssen homogen sein und die Fehlerkomponenten müssen von einander unabhängig sein. Zur genaueren Charakterisierung der Gruppenunterschiede wurde mittels des LSD-Tests (Least significant difference) Einzelvergleich berechnet, um die relevanten Gruppenunterschiede heraus zu arbeiten.

Die Analyse einer korrelativen Beziehung wurde mittels der bivariate Korrelation nach Pearson unter Annahme eines einseitigen Signifikanzniveaus berechnet. Dieser Tests ist an die bivariate Normalverteilung der Grundgesamtheit und an die Homogenität der Varianzen geknüpft. Allerdings ist der Test gegen Verletzungen der Varianzhomogenität relativ robust (Bortz, 1993).