

Aus der Klinik für Herz- Thorax- und Gefäßchirurgie und dem Deutschen Herzzentrum
Berlin
der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Assoziation eines funktionellen CTGF Promotorpolymorphismus
(CCN2c.-945) auf Herzerholung unter mechanischer
Kreislaufunterstützung bei Patienten mit idiopathischer dilatativer
Kardiomyopathie**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Allison Steinhoff

Geb. Thiemann

aus Logan, Utah, USA

Datum der Promotion 04.09.2015

Für meine Mutter.

Abkürzungen

A	-	Adenin
AD	-	Autosomal Dominant
BH	-	Berlin Heart
BMI	-	Body- Maß- Index
bp	-	Basenpaare
BSA	-	Body- Surface- Area
BTR	-	Bridge To Recovery
BTX	-	Bridge To Transplantation
BVAD	-	Bi- Ventricular Assist Device
C	-	Cytosin
CCN	-	Cyr61, CTGF und NOV
CT	-	Computertomographie
CTGF	-	Connective tissue growth factor
dATP	-	Desoxy- Adenin- Tri- Phosphat
DCM	-	Dilatative Kardiomyopathie
dCTP	-	Desoxy- Cytidin- Tri- Phosphat
DGGE	-	denaturierende Gradientenelektrophorese
dGTP	-	Desoxy- Guanin- Tri- Phosphat
DHZB	-	Deutsches Herzzentrum Berlin
dTTP	-	Desoxy- Thymidin- Tri- Phosphat
DNA	-	Desoxy- Ribonucleic- Acid
DSG2	-	Desmoglein- 2
DTT	-	Dithiothreit
ECM	-	extrazellular Matrix
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	-	Ejektionsfraktion
etc.	-	et cetera
F	-	Forward (Vorwärts- Leserichtung des Primers)
FS	-	Fractional Shortening
G	-	Guanin
HA	-	Heteroduplexanalyse

HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography
ICD	-	International Classification of Disease
iDCM	-	idiopathische dilatative Kardiomyopathie
IgG	-	Immunoglobulin G
INTERMACS	-	Interagency Registry of Mechanically Assisted Circulatory Support
JNKs	-	c-Jun N-terminal protein kinases
KHK		Koronare Herzkrankheit
LVAD	-	Left- Ventricular Assist Device
LVEDD	-	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD		Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
MCS	-	Mechanical Circulatory Support
MgCl ₂	-	Magnesiumchlorid
MMP	-	Matrix- Metalloproteinasen
MP	-	Skelettmuskel- Myopathie
NTP	-	Nucleoside- Tri- Phosphate
NYHA	-	New York Heart Association
PCR	-	Polymerase- Chain- Reaction
R	-	Reverse (Rückwärts- Leserichtung des Primers)
RFLP		Restriction- Fragment- Length- Polymorphism
RNA	-	Ribo- Nucleic- Acid
RVAD	-	Right- Ventricular Assist Device
SAP	-	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNP	-	Short Nucleotid Polymorphism
Sp1	-	Specific protein 1
SSCP	-	Single Strand Conformation Polymorphism
T	-	Thymin
TAH	-	Total Artificial Heart
TG	-	transgen
TGF-β	-	transforming growth factor beta
TIMP	-	Tissue Inhibitoren der Metalloproteinasen

TNF α	-	Tumor- Nekrose- Faktor α
TTGE	-	temporal temperature gradient elektrophoresis
TTN	-	Titin
VAD	-	Ventricular Assist Device
WHO	-	World- Health- Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Implantiertes LVAD. A: Lokalisation des implantierten LVAD mit dem benötigten Zubehör. B: Konnektionsstellen der LVAD mit dem Herzen.....	21
Abbildung 2: Circulus vitiosus bei chronischer Herzinsuffizienz (J. Weil, Schunkert H. (2006). Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. Clin Res Cardiol; Suppl 4. Vol 95:1-17.).....	26
Abbildung 3: Assoziation der funktionellen CTGF- Promotor- Variante (CCN2_c.945) mit einer erhöhten CTGF- Expression beim Menschen. Die Balance zwischen den komplexen Komponenten und der transkriptionellen Aktivität wird wahrscheinlich hervorgerufen durch den Verlust von Bindungsmöglichkeiten für Sp3 an Position -945.....	31
Abbildung 4: Lokalisation des Polymorphismus im Promotor des CTGF- Promotor.	35
Abbildung 5: Diagramm: Klinisch messbare Daten (EF und LVEDD) der Gruppe I im Vergleich zu den Gruppen II und III.....	52
Abbildung 6: Prozentuale MCS- Verteilung der Gruppe II, Tortendiagramm.....	54
Abbildung 7: Diagramm EF und LVEDD, Vergleich langfristige und kurzfristige Herzerholung.....	56
Abbildung 8: Prozentuale MCS- Verteilung der Gruppe III, Tortendiagramm.....	59
Abbildung 9: Diagramm über klinische Daten im Vergleich BTR zu BTX.....	62
Abbildung 10: Balkendiagramm über prozentuale Verteilung der eingesetzten MCS in der Gruppe II und III, sowie den Patienten mit kurzfristiger Herzerholung.....	64
Abbildung 11: Elektropherogramm nach PCR im Gradientencycler; ganz links ist die Basenleiter des Molekulargewichtmarkers VIII zu sehen, rechts davon das PCR- Produkt.....	65
Abbildung 12: Balkendiagramm über die Allelprävalenz von Gruppe I im Vergleich zu dem Referenzwert (aus Fonseca et al).....	66

Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Allelfrequenz bezogen auf die Zahl der jeweiligen Gruppe, Vergleich Gruppe II mit Patienten mit Wiederaufgetretener Herzinsuffizienz und Gruppe III.	70
Abbildung 14: Photodokumentation des Restriktionsverdau (1. CC- Wildtyp (213bp); 2. und 4. GG-Variante (120bp/93bp); 3. CG heterozygot (213bp und 120bp/93bp)).....	71
Abbildung 15: Diagramm über die prozentuale Verteilung der Allele.	72
Abbildung 16: Balkendiagramm: Prozentuales Vorkommen der jeweiligen Allelfrequenz, Vergleich Gruppe II mit BTR zu Gruppe III mit BTX.	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verschiedene Unterstützungssysteme unter Angabe des Herstellers sowie des Blutflusses (pulsatil versus axial):.....	23
Tabelle 2:	INTERMACS Profile bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz unter Angabe der Dringlichkeitsindikation. (aus Stevenson LW, Pagani FD, Young JB. (2009). INTERMACS Profiles of Advanced Heart Failure: The Current Picture. J of Heart and Lung Transplantation.	24
Tabelle 3:	Einzelne Komponenten des Reverse Remodeling. (aus: Birks EJ, George RS. (2010) Molecular changes occurring during reverse remodeling following left ventricular assist device support. J Cardiovasc Transl Res. 3(6);635-42.)	29
Tabelle 4:	Primerpaar mit Lage-, Sequenz-, Fragmentlängen-, GC- Gehalt- und Schmelztemperatur- Angabe.....	36
Tabelle 5:	Grundreaktionsgemisch für PCR.....	43
Tabelle 6:	Grundprogramm im Thermocycler zur Optimierung und Durchführung der PCR.....	44
Tabelle 7:	Reaktionsansatz für enzymatische Aufreinigung (Ansatz pro Probe).	46
Tabelle 8:	Ansatz für Cycle Sequencing (Ansatz pro Probe).	46
Tabelle 9:	Thermocycler- Programm für das Cycle- Sequencing.....	47
Tabelle 10:	Filterset für Taq- Dye- Markierung.....	48
Tabelle 11:	Ansatz für Restriktionsverdau	48
Tabelle 12:	Übersicht über gesamtes untersuchtes Patientenkollektiv mit iDCM (in Klammern wird jeweils die Standardabweichung angegeben).....	50
Tabelle 13:	Statistische Auswertung, p- Wert für Alter, BSA, EF, LVEDD und FS. Gruppe 1 versus 2 und Gruppe 1 versus 3.....	51

Tabelle 14:	Übersicht über klinische Daten der Gruppe II (in Klammern wird jeweils die Standardabweichung bzw. der prozentuale Anteil angegeben).....	53
Tabelle 15:	Mittelwert mit Standardabweichung der echokardiographische Daten von Patientin mit Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz: Vergleich vor Implantation und Explantation sowie vor Reimplantation.	55
Tabelle 16:	Statistische Auswertung der echokardiographischen Daten der sieben Patienten mit Wiederauftreten der Herzinsuffizienz. (EF 1= EF vor Implantation, EF 2= EF vor Explantation; EF 3= EF vor Reimplantation. LVEDD 1= LVEDD vor Implantation, LVEDD 2= vor Exp	55
Tabelle 17:	EF und LVEDD bei Patienten mit kurzfristiger bzw. langfristiger Erholung.....	56
Tabelle 18:	Übersicht über Patienten, bei denen eine Herzinsuffizienz nach Explantation wiederauftrat.....	57
Tabelle 19:	Übersicht über klinische Daten der Gruppe III, in Klammern wird die Standardabweichung wiedergegeben.	58
Tabelle 20:	Mittelwert und Standardabweichung (SA) von EF, LVEDD und FS zu Beginn der Studie.....	60
Tabelle 21:	p- Wert für EF, LVEDD und FS, Gruppe I und II.	60
Tabelle 22:	p- Wert für EF, LVEDD und FS, Gruppe I und III.	61
Tabelle 23:	Signifikanz der klinisch meßbaren Daten (LVEDD und EF) bei Implantation und Explantation.	61
Tabelle 24:	Klinische Eigenschaften der untersuchten Patienten; Vergleich BTR zu BTX Kollektiv.....	62
Tabelle 25:	Prozentuale Verteilung von LVAD versus BVAD.....	63
Tabelle 26:	Verteilung der unterschiedlichen Ventricular assist devices von Gruppe II und III.	64

Tabelle 27:	Prävalenz des CCN2_c.-945C>G Polymorphismus der Gruppe I im Vergleich zu einem Referenzwert (Fonseca et al.) der allgemeinen Bevölkerung.....	66
Tabelle 28:	Allelverteilung der Gruppe II.....	67
Tabelle 29:	Genotyp der sieben Patienten, bei denen eine Herzinsuffizienz wieder auftrat.	67
Tabelle 30:	Häufigkeit der Allelfrequenz der Patienten (n= 7), bei denen es nach einer Explantation des MCS wegen Herzerholung zu einer wiederaufgetretenen Herzinsuffizienz kam, im zu der gesamten Gruppe II (n= 20).....	68
Tabelle 31:	Häufigkeit der Allelfrequenz der Gruppe II und III.	69
Tabelle 32:	Gruppe I im Vergleich zu den Patienten, die eine MCS benötigten (Gruppe II+III). Statistische Auswertung der Allelprävalenz mittels Chi- Quadrat- Test.....	71
Tabelle 33:	Statistische Auswertung der Genotypisierung, Vergleich Gruppe II mit III.....	72

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT ENGLISH	13
ABSTRACT DEUTSCH	14
1. EINLEITUNG.....	15
1.1. Herzinsuffizienz.....	15
1.2. Kardiomyopathien	15
1.3. Dilatative Kardiomyopathie - eine primäre Erkrankung des Muskels	17
1.4. Mechanische Herzunterstützungssysteme	20
1.4.1. Historischer Hintergrund über die Entwicklung von Herzunterstützungssystemen (mechanical circulatory support, MCS)	20
1.4.2. Systeme der Herzunterstützung (Ventricular assist device, VAD, MCS)	20
1.4.3. Pulsatiler versus kontinuierlicher Flow	22
1.4.4. Therapeutische Ansätze von MCS	23
1.4.4.1. „Bridge to transplantation“ und „Bridge to destination“	25
1.4.4.2. „Bridge to recovery“	25
1.5. Molekulare Mechanismen von Remodeling und Reverse Remodeling Prozessen.....	26
1.5.1. Remodeling bei chronischer Herzinsuffizienz	26
1.5.2. Reverse Remodeling nach MCS.....	27
1.6. Connective Tissue Growth Factor und Remodeling.....	29
1.7. Fragestellung	31
2. MATERIALIEN.....	33
2.1. Geräte.....	33
2.2. Chemikalien	34
2.3. Enzyme und Nukleotide	34
2.4. DNA-Molekulargewichtsmarker.....	35
2.5. Wasser.....	35
2.6. Materialien der jeweiligen Arbeitsschritte	35
2.6.1. Primer Design	35
2.6.2. Materialien für die Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	36
2.6.3. Automatische Sequenzierung.....	38
2.6.4. Restriktions- Fragment- Längen- Polymorphismus- Analyse (RFLP- Analyse)	39

3. METHODEN	40
3.1. Übersicht über die Methodik	40
3.1.1. Patientenkollektiv	40
3.2. Fließschema zum Arbeitsablauf	42
3.3. Aufarbeitung der Blutproben	43
3.4. Polymerasekettenreaktion	43
3.4.1. PCR- Optimierung	43
3.4.2. Durchführung der PCR	44
3.4.3. Kontrolle der Amplifikation	45
3.5. Automatische Sequenzierung	45
3.5.1. Herstellung der zu sequenzierenden Proben	45
3.5.2. Enzymatische Aufreinigung	45
3.5.3. Cycle- Sequencing	46
3.5.4. Sephadex- Aufreinigung	47
3.5.5. Automatische Sequenzierung	47
3.6. Restriktions- Fragment- Längen- Polymorphismen- Analyse	48
3.6.1. Durchführung der RFLP- Analysen	48
3.6.2. Kontrolle der Restriktionsprodukte	49
3.7. Statistische Analyse	49
4. ERGEBNISSE	50
4.1. Übersicht über das gesamte Patientenkollektiv	50
4.1.1. Gruppe I	51
4.1.2. Gruppe II	52
4.1.2.1. Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz nach kardialer Erholung	54
4.1.3. Gruppe III	58
4.2. Statistische Auswertung der klinisch gesammelten Daten	59
4.2.1. Geschlecht	59
4.2.2. Alter	59
4.2.3. BSA	60
4.2.4. EF, LVEDD und FS	60
4.2.5. Gegenüberstellung von Gruppe II und Gruppe III	61
4.3. Genetische Analyse	65
4.3.1. PCR- Optimierung	65
4.3.2. Sequenzanalyse	65

4.3.3. Sequenzdaten der Gruppe I	66
4.3.3.1. Sequenzdaten der Gruppe II	67
4.3.3.2. Sequenzdaten der Gruppe III	68
4.3.4. Restriktionsverdau	70
4.4. Statistische Auswertung der genetischen Analyse	71
5. DISKUSSION	74
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	74
5.2. Ergebnisse im Kontext des gegenwärtigen Wissenstandes.....	79
5.3. Bewertung der Methodik	81
5.3.1. Bewertung des Studiendesign und der Patientenrekrutierung.....	81
5.3.2. Bewertung des Versuchsaufbau	82
5.3.2.1. Wahl des CCN2-c.945 C>G Polymorphismus.....	82
5.3.2.2. Genetische Analysen	83
5.4. Schlussfolgerung	83
6. ZUSAMMENFASSUNG	85
LITERATURVERZEICHNIS	87
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	95
CURRICULUM VITAE	96
PUBLIKATIONSLISTE	97
DANKSAGUNG	98

Abstract (englisch)

Mechanical circulatory support (MCS) leads to an improvement of cardiac function in a small portion of patients (*bridge to recovery*) with idiopathic dilated cardiomyopathy (iDCM). Among other factors cardiomyocyte hypertrophy seems to be an important prerequisite for MCS related cardiac recovery. Previously has been shown that cardiac specific overexpression of connective tissue growth factor (CTGF) leads to adaptive cardiomyocyte hypertrophy in transgenic mice. The objective of this study was to investigate if CCN2 promotor variant may be associated with myocardial recovery on MCS: Therefore, three groups were classified: Group I with moderate iDCM (314 individuals), who received medical treatment only. Moreover, 49 iDCM patients who either weaned from MCS (group II; n=20)- *bridge to recovery*- or bridged to cardiac transplantation- *bridge to destination*- (group III; n=29) were analysed. The CTGF- SNP was genotyped and the prevalence with the clinical outcome associated. It showed that the functional promoter polymorphism in the gene encoding CTGF to be significantly overrepresented in patients with cardiac recovery on MCS when compared to subjects who showed no improvement of cardiac function during mechanical unloading. If the c.-945C/G genotype represents a positive predictor for MCS related cardiac recovery remains to be studied in larger cohorts.

Abstract (deutsch)

Bei einer kleinen Gruppe von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (iDCM) führt mechanische Kreislaufunterstützung (mechanical circulatory support, MCS) zu einer Verbesserung der kardialen Funktion (*bridge to recovery, BTR*). Neben anderen Faktoren scheint die kardiomyozytäre Hypertrophie eine zentrale Rolle in der kardialen Erholung unter MCS einzunehmen. Es ist bekannt, dass eine herzspezifische Überexpression von connective tissue growth factor (CTGF) zu einer adaptiven, kardiomyozytären Hypertrophie bei transgenen Mäusen führt. Ziel dieser Arbeit war es nun die CTGF- Promotorvariante CCN2_c.-945 als prognostisches Mittel auf eine Assoziation mit der auftretenden Herzerholung unter MCS zu untersuchen. Hierfür wurden insgesamt 363 Patienten in drei Gruppen unterschieden. Die Gruppe I stellte sich aus 314 Patienten mit idiopathischer DCM zusammen, die konservativ-medikamentös therapiert wurden. Die übrigen 49 Patienten benötigten eine mechanische Herzunterstützung. 20 von jenen wiesen eine Herzerholung auf und konnten mit BTR der Gruppe II zugeteilt werden. Die Gruppe III bildete sich aus den restlichen 29 Patienten mit *bridge- to- transplantation* bzw. *destination (BTX)*. Der CTGF- SNP wurde genotypisiert und die Prävalenz mit dem klinischen outcome assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit fanden wir einen funktionellen Promotor-Polymorphismus, der für das CTGF- Gen kodiert, signifikant überrepräsentiert bei Patienten mit einer Herzerholung unter MCS verglichen zu Patienten, bei denen keine Besserung unter mechanischer Unterstützung dokumentiert werden konnte. Ob der c.-945G/G Genotyp als genetischer Prädiktor für die MCS vermittelte kardiale Regeneration angewendet werden könnte, muss in weiteren Studien repliziert werden.

1. Einleitung

1.1. Herzinsuffizienz

Als Herzinsuffizienz wird die Unfähigkeit des Herzens bezeichnet, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischem Ventrikeldruck von 0 mmHg zu fördern.

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen. Nach der *International Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD- 10) war sie 2009 in Deutschland mit einer Mortalität von durchschnittlich 30 % nach Diagnosestellung die dritthäufigste Todesursache.^{1, 2, 3} Die Sterblichkeit für Patienten mit den NYHA- Stadien III und IV nach der Klassifizierung der *New York Heart Association* (NYHA) beträgt innerhalb von 3 Jahren sogar annähernd 40 %⁴ und ist damit höher als für die meisten Krebserkrankungen.⁵

Es ist davon auszugehen, dass die Zahl der Patienten mit Herzinsuffizienz in den nächsten Jahren und Jahrzehnten zunehmen wird, da ihre Häufigkeit mit dem Lebensalter korreliert.⁶ Nach den Daten des statistischen Bundesamtes der Bundesrepublik Deutschland erreichte im Jahr 2002 die Herzinsuffizienz (I50), bezogen auf die absolute Fallzahl, erstmals Platz drei der Hauptdiagnosen in Krankenhäusern. Bereits 2006 war die Herzinsuffizienz mit 317.000 Hauptdiagnosen zum häufigsten Grund für eine Hospitalisation in Deutschland geworden. 2007 zeigte sich ein weiterer Anstieg um 5,6 % auf 335.000 Fälle.⁶

Nach der koronaren Herzkrankheit (KHK) sind Kardiomyopathien die zweithäufigste Ursache einer Herzinsuffizienz.⁷

1.2. Kardiomyopathien

Die Kardiomyopathie ist eine wichtige, äußerst heterogene Erkrankung des Myokards. Bereits der Begriff *Kardiomyopathie* weist auf die vielen, nach wie vor bestehenden Unklarheiten bezüglich deren Ätiologie und Pathogenese hin. Daraus folgt auch eine in der Literatur nahezu unübersehbare Vielzahl an Klassifizierungsbestrebungen. Eine mögliche und gebräuchliche Definition der American Heart Association sei hier wiedergegeben:

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit einer mechanischen und/ oder elektrischen Dysfunktion einhergehen und eine inadäquate ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation verursachen. Die Ätiologie ist vielfältig. Häufig liegt eine genetische Ursache zugrunde. Kardiomyopathien sind entweder auf das Herz begrenzt oder Teil einer generalisierten, systemischen Erkrankung. Langfristig führt eine Erkrankung zu einer progressiven Herzinsuffizienz oder einem plötzlichen Herztod.

Maron BJ et al. grenzten die Kardiomyopathie weiter als Herzmuskelerkrankung ein, die nicht als direkte Konsequenz einer Koronarsklerose, einer arteriellen/ pulmonalen Hypertonie, einem angeborenen/ erworbenen Herzfehler oder einer Perikarderkrankung entstanden ist (siehe auch 1.3 Diagnose der DCM). Die Einteilung in folgende zwei Gruppen ist allgemein anerkannt:

Primäre Kardiomyopathie

Bei den primären Kardiomyopathien ist vorwiegend oder fokussiert das Herz betroffen. Man unterscheidet genetisch bedingte von erworbenen Formen. Weiter ist ein Mischbild aus erworben und genetisch bedingten Pathologien beschrieben. Zu den genetisch bedingten primären Kardiomyopathien zählen die

1. Hypertrophe Kardiomyopathie
2. Arrhythmogen rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/ Dysplasie (ARVC/D)
3. Linksventrikuläre Noncompaction
4. Kardiomyopathien durch Anomalien des Reizleitungssystems (Lenegre- Krankheit)
5. Ionenkanalerkrankungen

Gemischt erworben- genetisch bedingte primäre Kardiomyopathien sind die

1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)
2. Restriktive Kardiomyopathie (RCM)

Zu den erworbenen primären Kardiomyopathien zählen u.a. die

1. Inflammatorische Kardiomyopathie
2. Tako- Tsubo- Kardiomyopathie
3. Peripartale Kardiomyopathie

Sekundäre Kardiomyopathie

Sekundäre Kardiomyopathien sind erworbene Kardiomyopathien, bei denen das Herz im Rahmen einer generalisierten, systemischen Erkrankung mit betroffen ist. Ursächlich kommt eine Vielzahl von Faktoren infrage. Neben toxischen seien hier noch beispielhaft

infiltrative, entzündliche und endokriologische Ursachen sowie Autoimmunerkrankungen (z.B. Sklerodermie) und Speichererkrankungen (z.B. Hämochromatose) als Ursachen genannt.^{9,10.}

1.3. Dilatative Kardiomyopathie - eine primäre Erkrankung des Muskels

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) führt über eine Ausdehnung des linken oder beider Ventrikel zu einer progredient verlaufenden Einschränkung der systolischen Pumpfunktion des Herzens.

Mit einer jährlichen Inzidenz von 8 pro 100.000 Einwohner^{11,12} und einer Prävalenz von ca. 36 pro 100.000 Einwohner^{11, 13, 14} tritt die DCM überwiegend bei Männern zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr auf¹⁵. Aufgrund der großen Zahl asymptomatischer Verlaufsformen dürfte die Häufigkeit der Erkrankung jedoch deutlich höher liegen. Mehr als ein Drittel aller Patienten mit der Diagnose Herzinsuffizienz leiden an einer DCM.¹⁶ Die Genese der Erkrankung ist äußerst heterogen.

Ätiologie

Vier pathophysiologische Mechanismen, die in der Krankheitsentstehung einer DCM eine Rolle spielen können, werden unterschieden (Braunwald's Heart Disease):

- Familiäre und genetische Faktoren
- Inflammatorische und infektiöse (insbesondere virale) Faktoren
- Zytotoxische Faktoren
- Verlust von Kardiomyozyten, Regelwidrigkeit in den endogenen Reparaturmechanismen

Gerade die Funktionsstörung der endogenen Zellen sich in Kardiomyozyten zu teilen bzw. zu differenzieren, könnte zentral in dem Entstehungsprozess einer Kardiomyopathie mitwirken.

Diagnose

Bei Diagnosestellung der DCM besteht oft schon ein fortgeschrittenes Stadium. Anamnestiche Angaben, die klinische Symptomatik der Patienten und eine Vielzahl an Befunden sind für die Diagnosestellung zwar hilfreich, jedoch nicht pathognomisch. Viele kardiale und systemische Erkrankungen können zu einer systolischen Dysfunktion und linksventrikulären Dilatation führen. Letztlich unterscheidet sich die Klinik der

dilatativen Kardiomyopathie nicht von jeder anderen sekundären Herzinsuffizienz. So ist z.B. die Abgrenzung der DCM von einer chronischen Myokarditis, der eine virale bzw. sekundär immunologische Genese zugrunde liegt, nach wie vor schwierig. Trotz methodischer Fortschritte in der Diagnostik (wie z.B. Myokardbiopsie, Nachweis von genomisch- viralem Material und Erfassung immunologischer Reaktionen) weisen die Resultate erhebliche Variabilität vor, die eine Zuweisung schwierig machen. Häufig ist eine Ursachenklärung nicht möglich. Folglich wird daher bei den meisten Patienten noch heute ohne Berücksichtigung einer möglichen Ursache eine idiopathische DCM (iDCM) diagnostiziert. Hierfür müssen folgenden Ausschlusskriterien beachtet werden:¹⁸

- Arterielle Hypertension (> 160/100 mmHg)
- Koronare Herzerkrankung (> 50 prozentige Stenose eines Hauptastes)
- Chronischer Alkoholabusus (> 40 g/d für Frauen bzw. > 80 g/d für Männer über einen Zeitraum von mehr als fünf Jahren gemäß der WHO Richtlinien).
- Supraventrikuläre Arrhythmien
- Vorliegen einer schweren systemischen Erkrankung
- Vorliegen einer Erkrankung des Perikards
- Vorliegen eines angeborenen Herzfehlers
- Vorliegen eines cor pulmonale

Genetisch bedingte DCM

Bei mindestens 25 % aller Fälle ist ein familiärer oder genetischer Ursprung bekannt; bei etwa 70 % dieser Fälle ließ sich ein autosomal- dominanter Erbgang nachvollziehen.^{8, 17} Die autosomal- dominanten Formen basieren auf Mutationen in den Genen des Zytoskeletts, des Sarkomers bzw. der Z- Bande, der nuklearen Membranen und der zwischengeschalteten Disc- Proteinen. Zu den x- chromosomal vererbten Erkrankungen, die mit einer DCM assoziiert sind, zählen Muskeldystrophien wie Becker oder Duchenne. Auch kann die DCM bei Patienten mit mitochondrialen Zytopathien und erblichen metabolischen Erkrankungen wie z.B. einer Hämochromatose auftreten.

Erworbene DCM

Beispiele für erworbene Auslöser einer DCM sind Ernährungsdefizite, endokrine Dysfunktionen sowie die Einnahme von kardiotoxischen Medikamenten. Auch kann sie infolge einer kardialen Infektion und Inflammation auftreten. Im Gegensatz zu einer aktiven oder fulminanten Myokarditis, welche nach Definition zu den akuten inflammatorischen Erkrankungen des Herzens zählt, wird die inflammatorische DCM

über eine histologisch und/ oder immunhistochemisch belegte Anwesenheit von chronisch inflammatorischen Zellen in Assoziation mit einer linksventrikulären Dilatation und reduzierten Ejektionsfraktion definiert. Bei manchen Fällen konnte jedoch keine Inflammation, trotz Vorhandensein von viralen Proteinen, registriert werden. In diesem Zusammenhang werden autoimmunologische Prozesse diskutiert. Auch ist eine Peripartum- Kardiomyopathie (PPCM) als untergeordnete DCM beschrieben. Sie tritt in den letzten Monaten der Schwangerschaft auf. In diesem Zusammenhang scheint Prolaktin eine besondere Rolle zu spielen.¹⁰

Prognose

Die Prognose der DCM ist ungünstig, neben einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität, beträgt die 1- Jahres- Mortalitätsrate nach Auftreten der ersten Symptome, trotz therapeutischer Bemühungen, ca. 20- 30 %, die 5- Jahres- Überlebensrate ca. 50 %.¹⁹

Konsequenzen der DCM sind neben der Herzinsuffizienz häufig Herzrhythmusstörungen und/ oder Störungen des kardialen Reizleitungssystems sowie thrombembolische Komplikationen.

Therapie

Die medikamentöse Therapie ist symptomatisch und beschränkt sich auf die Behandlung der Herzinsuffizienz. Es kommen also insbesondere Betablocker, ACE-Hemmer, bzw AT2- Antagonisten und Aldosteronantagonisten zum Einsatz. Eine spezifische Behandlung der DCM ist bisher nicht möglich. Eine Verzögerung der Progression der Erkrankung und die Reduktion des Eintretens des plötzlichen Herztodes sind wichtige therapeutische Ziele. Bei letzterem spielt die Implantation einer automatischen Defibrillators (AICD) eine wesentliche Rolle. Die DCM stellt die häufigste Indikation für eine Herztransplantation dar.⁸ Überbrückend kann eine mechanische Herzunterstützung eingesetzt werden. Der meist schwere klinische Verlauf mit deutlich reduzierter Lebenserwartung beweist die Dringlichkeit einer zuverlässigen Diagnostik zur Entwicklung gezielter präventiver und therapeutischer Verfahren.

1.4. Mechanische Herzunterstützungssysteme

1.4.1. Historischer Hintergrund über die Entwicklung von Herzunterstützungssystemen (*mechanical circulatory support, MCS*)

Die grundsätzliche Idee der extrakorporalen Zirkulation wurde erstmals von dem französischen Physiologen Julien César Legallois 1812 schriftlich niedergelegt. Einer der ersten Durchblutungsapparate zur extrakorporalen Blutoxygenierung wurde schließlich im Jahre 1885 von V. Frey und M. Gruber konstruiert. Diese Maschine verfügte bereits über alle Hauptkomponenten einer Herz- Lungen- Maschine, nämlich einer Pumpe, einem Oxygenator, einem Reservoir und einer Sauerstoffquelle.²⁰ Zwei weitere wichtige Schritte, um eine Operation am Herzen und somit die Implantation eines Kunstherzes zu ermöglichen, waren die Entdeckung der unterschiedlichen Blutgruppen durch Karl Landsteiner 1901²¹ sowie die der antikoagulativen Wirkung des Heparins durch Jay McLean 1916²².

Die ersten erfolgsversprechenden Experimente einer extrakorporalen Zirkulation und damit der Grundstein für Herzoperationen wurden in den 20er Jahren in Moskau von Bruchonenko und Terebinski durchgeführt.²³ 1968 setzte schließlich der Pionier der Herzchirurgie Michael DeBakey eine externe Herzpumpe erfolgreich bei einem Menschen ein. Es handelte sich um ein linksventrikuläres Unterstützungssystem.^{24,25}

1.4.2. Systeme der Herzunterstützung (*Ventricular assist device, VAD, MCS*)

Nach den jeweils zu unterstützenden Kammern können *Left Ventricular Assist Devices* (LVADs) von *Right Ventricular Assist Devices* (RVADs) und *Biventricular Assist Devices* (BVADs) unterschieden werden. Meist werden LVADs eingebaut. Jedoch sind temporäre oder permanent implantierte RVADs bei eingeschränkter Rechtsherzfunktion und erhöhtem pulmonalarteriellen Widerstand indiziert.

Weiter werden MCS- Systeme nach dem Prinzip der Blutbeförderung in folgende Gruppen eingeteilt:

- Pulsatiler Blutfluss: mittels Klappen an jedem artifiziellen Ventrikel wird die Richtung des Blutflusses um 180° geändert.
- Nicht- pulsatiler also kontinuierlicher Blutfluss, welcher wiederum wie folgt unterteilt wird:

- Axiale Pumpen: der kontinuierliche Blutfluss erfährt keine Änderung der Fließrichtung, es sind keine Kunstklappen vorhanden.
- Zentrifugale Pumpen: über einen kontinuierlichen Fluss ohne künstliche Klappen wird der Blutfluss um 90° beeinflusst.

Auch nach der Lokalisation des Unterstützungssystems ist eine Differenzierung zwischen intravaskulär, parakorporal und intrakorporal möglich.

Der aktuelle Entwicklungsstand künstlicher Herzunterstützungssysteme wird repräsentiert durch die breite Verfügbarkeit elektrisch betriebener LVADs, die ein perkutan ausgeleitetes Steuerungs- und Energieversorgungskabel zur Konnektion an die Steuereinheit und die Stromversorgung benötigen, während die Pumpe selbst intrakorporal implantiert ist (Abbildung 1).

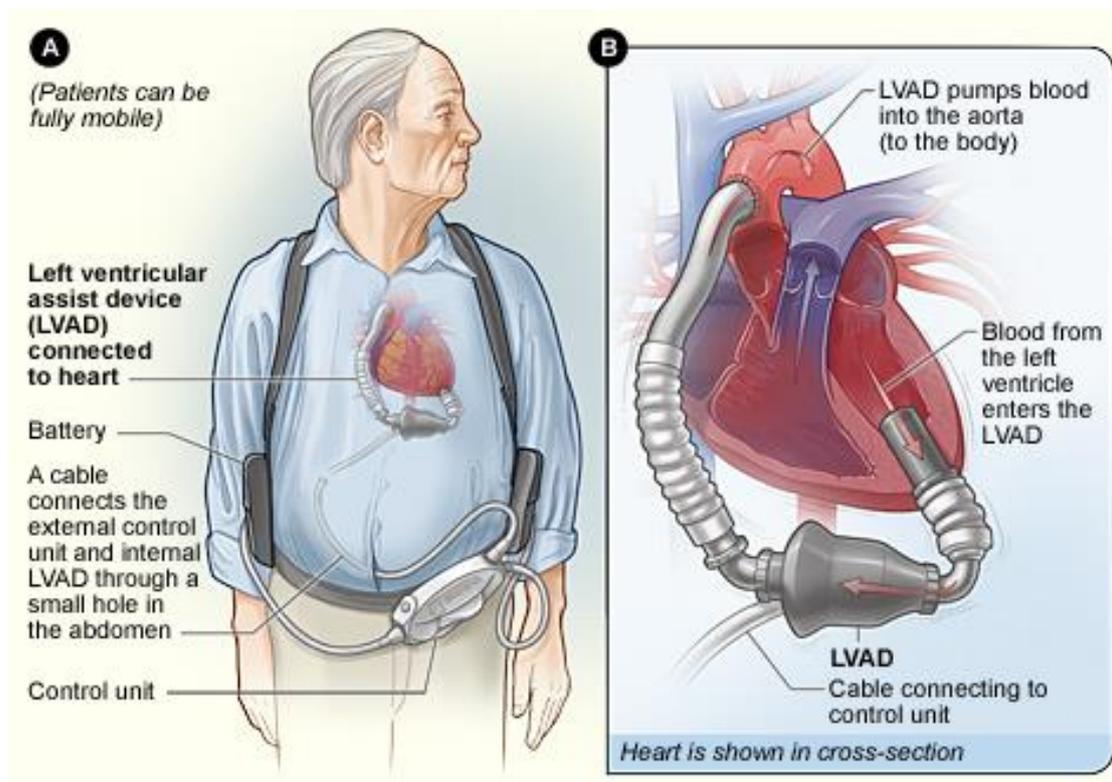


Abbildung 1: Implantiertes LVAD. A: Lokalisation des implantierten LVAD mit dem benötigten Zubehör. B: Konnektionsstellen der LVAD mit dem Herzen. (aus: National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, Maryland, USA. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/vad/>)

Von der Lunge nimmt der Blutfluss den physiologischen Weg in das linke Herz. Von dem linken Herzen wird es in die prothetische Ventrikelpumpkammer umgeleitet und von dort dann aktiv durch die Ausflussklappe in die ascendierende Aorta gepumpt (Abbildung 1). Die intrakorporale Position der implantierten Pumpe hängt von dem

jeweiligen System ab. Beispielsweise wird das Novacor N100 LVAD hinter den linken Musculus rectus abdominis positioniert.

1.4.3. Pulsatiler versus kontinuierlicher Flow

Die ersten Pumpen zur Kreislaufunterstützung dienten der funktionellen Förderung des Blutes aus der linken, der rechten oder beider Herzkammern. Daraus wurden Verdrängungs- und Kreiselpumpen entwickelt. Verdrängungspumpen sind pulsatil arbeitende Pumpen, welche die Funktion des Herzens nachahmen. Kreiselpumpen, die weiter in Axialfluss-, Zentrifugal- und Diagonalpumpen eingeteilt werden, stellen einen kontinuierlichen Blutfluss her. Die unlängst in die klinische Therapie eingeführten Axialflusssysteme (DeBakey- VAD, Jarvik- 2000- VAD, Heart- Mate- II- LVAD, HeartWare HVAD, ua.) bieten bei kontinuierlichem Blutfluss durch ihre geringe Größe und Gewicht, ihren niedrigen Energieverbrauch sowie ihre vereinfachte Implantationstechnik und Steuerung offenbar deutliche Vorteile gegenüber den bereits längere Zeit verwendeten pulsatilen Systemen (Novacor- N100- LVAD , TCI- HeartMate- LVAD) (siehe auch Tabelle 1).

Neuesten Erkenntnissen zu Folge sind kontinuierliche Systeme (z.B. das INCOR®, eine magnetisch gelagerte axiale Pumpe) für die Langzeittherapie zu bevorzugen, obwohl mit pulsatilen Systemen im Durchschnitt eine bessere linksventrikuläre Entlastung, gemessen an einem kleineren enddiastolischen Durchmesser, erreicht wird.²⁶ Besonders die höhere Lebensqualität ist hierfür verantwortlich zu machen²⁷, die unter anderem aus der dauerhaften Inbetriebnahme ohne Abnutzung der magnetisch gelagerten Pumpen resultiert.

Typ	Typ des Blutflusses	Hersteller
DeBakey- LVAD	Axial	Micromed Technology Inc., Houston, Texas, USA ²⁸
Jarvik-2000- VAD	Axial	Jarvik Heart Inc., New York, USA ²⁹
Heart-Mate-II-LVAD	Axial	Thoratec Corp., Woburn, Massachusetts, USA ³⁰
HeartWare HVAD	Axial	HeartWare Ltd. Sydney, Australia
INCOR	Axial	Berlin Heart AG, Berlin, Deutschland
Novacor-N100- LVAD	Pulsatil	World Heart Inc., Oakland, California, USA ³¹
TCI-HeartMate-LVAD	Pulsatil	Thoratec Corp., Wobum, Massachusetts, USA ³²

Tabelle 1: Verschiedene Unterstützungssysteme unter Angabe des Herstellers sowie des Blutflusses (pulsatil versus axial).

1.4.4. Therapeutische Ansätze von MCS

Wenn die entsprechenden medikamentösen und interventionellen Möglichkeiten bei der Behandlung einer terminalen Herzinsuffizienz ausgeschöpft sind und es zu immer wieder auftretenden Dekompensationen kommt, kann eine mechanische Unterstützung des kranken Herzens notwendig sein. Mittels MCS konnte im Vergleich zu der konservativen, medikamentösen Therapiealternative bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine Verbesserung Lebensqualität erzielt werden.³³ Darüberhinaus konnte durch die technologischen Verbesserungen der Systeme die Lebenserwartung und die funktionelle Kapazität der Patienten mit MCS noch mal erheblich verbessert werden.³⁴ Die Implantation eines MCS stellt heute eine etablierte und akzeptierte Option in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz bei Patienten in unmittelbar lebensbedrohlichem Zustand und einer geschätzten Lebenserwartung von wenigen Tagen, Wochen oder Monaten dar.^{35,36} Prinzipiell bestehen nach INTERMACS vier unterschiedliche Dringlichkeitsindikationen für eine MCS- Implantation, Profil 5 bis 7 besitzen eine variable Dringlichkeit bzw. zum Zeitpunkt der Beurteilung keine Indikation (Tabelle 2).³⁷

INTERMACS Profile der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz	Dringlichkeitsindikation
Profil 1: kritischer kardiogener Schock	Endgültige mechanische Intervention innerhalb weniger Stunden
Profil 2: Progressive Verminderung der Herzfunktion trotz inotroper Unterstützung	Endgültige Intervention innerhalb weniger Tage
Profil 3: Stabil unter kontinuierlicher, intravenöser und inotroper Unterstützung oder temporären MCS	Endgültige Intervention elektiv in einem Zeitraum von Wochen bis Monaten
Profil 4: Anhaltende Symptomatik (Manche Patienten pendeln zwischen 4 und 5.)	Intervention elektiv innerhalb Wochen bis Monaten
Profil 5: Intolerant bei körperlicher Betätigung Symptomarm in Ruhe, eventuell mit erhöhtem, refraktärem Volumen einhergehend mit unterschiedlich ausgeprägter renaler Dysfunktion. (Bei grenzwertiger renaler Funktion kann bei Patienten diesen Profiles die Indikation einer Intervention gegeben sein.)	Variable Dringlichkeit einer Intervention, abhängig von dem Ernährungsstatus, der Organfunktion und der individuellen Aktivität des jeweiligen Patienten.
Profil 6: Eingeschränkte körperliche Betätigung möglich (symptomarm in Ruhe und bei der häuslichen Arbeit, jedoch schnelle Ermüdung nach Aktivität)	Variable Dringlichkeit, abhängig von Organfunktion und individuellem Aktivitätslevel.
Profil 7: Fortgeschrittene NYHA III	Eine Transplantation oder ein MCS sind in dieser Phase nicht indiziert.

Tabelle 2: INTERMACS Profile bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz unter Angabe der Dringlichkeitsindikation. (aus Stevenson LW, Pagani FD, Young JB. (2009). INTERMACS Profiles of Advanced Heart Failure: The Current Picture. J of Heart and Lung Transplantation.

1.4.4.1. „Bridge to transplantation“ und „Bridge to destination“

Die Herztransplantation stellt nach wie vor den Goldstandard für die Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz dar. Die Hämodynamik wird ohne erhöhtes Thrombembolie- und Blutungsrisiko wiederhergestellt. Limitierend ist jedoch die viel zu geringe Zahl an Spenderorganen, verbunden mit ungewissen, oft langen Wartezeiten. Ein weiterer Nachteil ist die notwendige Immunsuppression mit ihren Nebenwirkungen. Bisher wurden ungefähr 63.000 Herztransplantationen durchgeführt, wobei die Zahl der jüngst durchgeführten Transplantationen rückläufig ist.³⁸ Die Überbrückung zur Transplantation (*bridge to transplantation*) stellt eine weltweit etablierte Indikation zur Anwendung von mechanischen Unterstützungssystemen dar.

Angesichts der hohen Inzidenz von Herzversagen bei älteren Patienten, die keine Kandidaten für eine Herztransplantation sind, erscheint außerdem ein langfristiger Einsatz von MCS gerechtfertigt, was zu einer Verbesserung der Lebenserwartung und der Lebensqualität führt. Neben dem Alter sind maligne Tumoren und pulmonale Hypertonie wichtige Kontraindikationen für eine Herztransplantation (*bridge to destination*).

1.4.4.2. „Bridge to recovery“

Erstmals konnte am Deutschen Herzzentrum Berlin bei Patienten mit DCM nach Implantation eines LVADs eine funktionelle Herzerholung beobachtet werden, die eine Explantation des Systems möglich machte.³⁹ Im Laufe der Jahre konnten mehr als 50 Patienten von der MCS entwöhnt werden.⁴⁰ Durch die Druck- und Volumenentlastung des Herzens erholte sich der linke Ventrikel insbesondere bei Patienten mit kurzer Krankheitsgeschichte, wodurch eine Explantation des MCS möglich wurde. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Bridge to recovery*.⁴¹ Der Anteil der Patienten mit DCM und Herzerholung wird auf 5 % geschätzt.⁴²

1.5. Molekulare Mechanismen von Remodeling und Reverse Remodeling Prozessen

1.5.1. Remodeling bei chronischer Herzinsuffizienz

Beim insuffizienten Herzen kommt es zu einer dauerhaft erhöhten ventrikulären Wandspannung, die über eine Dilatation zu einem verringerten koronaren Blutfluss und einer Myozytenschädigung führt. Es resultiert eine Einschränkung der kardialen Pumpleistung mit Verringerung des arteriellen Mitteldruckes und Steigerung des Füllungsdruckes, wodurch wiederum eine erhöhte Wandspannung entsteht (Abbildung 2). Kompensatorisch folgt histopathologisch ein sogenanntes *Remodeling*, welches eine zentrale Rolle in der Progredienz der Herzinsuffizienz einnimmt.^{38, 43.} Man unterscheidet folgende zwei zellulären Konsequenzen:

- (1) Zum einen werden kardiomyozytäre Hypertrophie, Dysfunktion, und Zelltod beobachtet und zum anderen
- (2) wird eine gesteigerte myokardiale Fibrose beschrieben.^{44.}

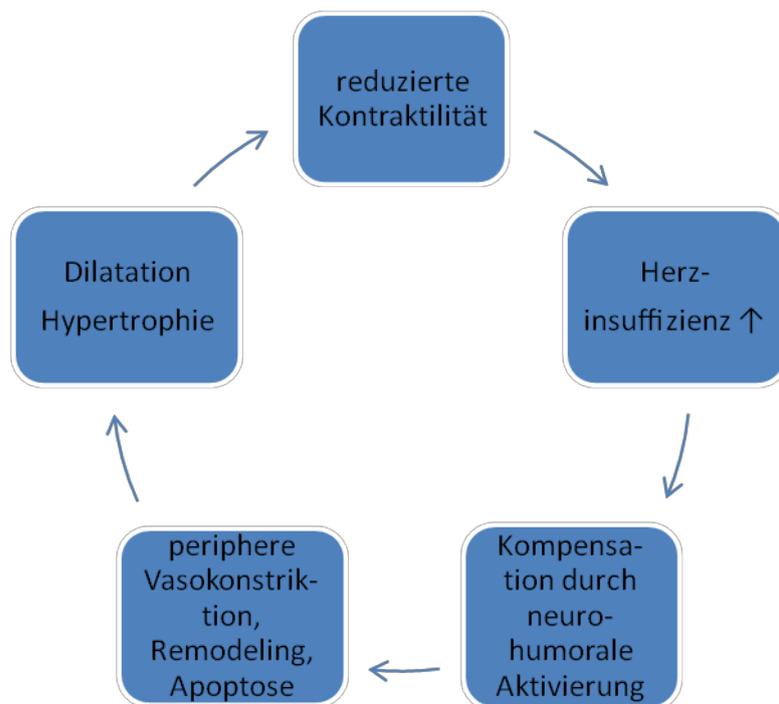


Abbildung 2: Circulus vitiosus bei chronischer Herzinsuffizienz (J. Weil, Schunkert H. (2006). Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. Clin Res Cardiol; Suppl 4. Vol 95:1-17.).

Strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) des Herzens ändert sich bei Herzerkrankungen grundlegend. Die ECM ist ein dynamisches und metabolisch aktives Netzwerk, welches eine wichtige und unabhängige Rolle bei der Progredienz der Herzinsuffizienz spielt. Kardiomyopathien sind durch Veränderungen und Akkumulation der ECM gekennzeichnet. Bei einer Herzinsuffizienz wirkt die Anlagerung von Kollagen in der ECM anfangs adaptiv und somit förderlich für den Erhalt der adäquaten Herzleistung. Mit dem Fortschritt der Kardiomyopathie kommt es jedoch zu maladaptiven Veränderungen in der ECM, welche zur systolischen und diastolischen Dysfunktion sowie Erregungsleitungsstörungen führt.⁴⁵

Das myokardiale **Remodeling** ist gekennzeichnet durch eine veränderte Zusammensetzung und Verteilung der ECM sowie eine abweichende räumliche Orientierung von Zellen und intrazellulären Komponenten. Ferner wird eine veränderte Ultrastruktur der Kardiomyozyten mit abnormer Verteilung der Mikrotubuli, der Desminfilamente und des Isomyosins beobachtet.⁴⁶

Eine zentrale Rolle im Metabolismus der extrazellulären Matrix nehmen die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Inhibitoren der MMP (TIMP) ein, die für den Auf-, Um- und Abbau der ECM verantwortlich sind. Dies geschieht durch Aufspaltung nahezu aller Bestandteile der extrazellulären Matrix, zu denen Faserproteine wie Elastin und Kollagen, Proteoglykane und Adhäsionsproteine wie Fibronectin und Laminin zählen.

1.5.2. Reverse Remodeling nach MCS

Es ist bekannt, dass es nach mechanischer ventrikulärer Herzunterstützung bei einigen Patienten zu einer suffizienten Herzerholung kommen kann, dem sogenannten *Bridge to recovery*. Hierbei sind viele morphologische und molekulare Alterationen beteiligt, deren Summe als *Reverse Remodeling* bezeichnet wird. Jedoch ist das Vorhandensein von molekularen Veränderungen nicht mit einer funktionellen und klinischen Herzerholung gleichzusetzen.⁴⁴ Morphologisch konnte bei Patienten mit Herzerholung echokardiographisch ein erniedrigter linksventrikulärer Durchmesser bei erhöhter Wanddicke nachgewiesen werden. Auch radiologisch sind reduzierte Organgrößen dokumentiert worden.³⁸ Auf molekularer Ebene wurde besondere Aufmerksamkeit dem zytoskelettalen Aufbau zuteil. Unterschiedliche Regulation von Genen, die für die Proteine Sarcoglycan, Dystrophin, Titin, α -Actin, Troponin T, β -Myosin, Desmin, Lamin

A/C oder Tafazzin kodieren, sind mit der Herzerholung assoziiert worden. Neben Proteinen des Zytoskeletts sind auch die des sarkomeren Apparats sowie mitochondriale und nukleäre Proteine involviert.^{47, 48.}

Jedoch gibt es bisher keine gesicherten Parameter, die das *Reverse Remodeling* charakterisieren oder sogar vorhersagen können.^{38.} Die molekularen Veränderungen, die während der mechanischen Unterstützung auftreten, können keine Herzerholung garantieren, da sie auch bei Patienten mit *Bridge to transplantation* dokumentiert worden sind. Daher ist eine erfolgreiche Entwöhnung von dem System mit molekularen Markern bisher nicht vorhersagbar.

Wie in 1.3.1. beschrieben, entsteht bei einer progredienten Herzinsuffizienz eine Hypertrophie als kompensatorische Antwort über Kinase vermittelte Signaltransduktionswege bei Herzinsuffizienz. Dies scheint eine wichtige Voraussetzung für die kardiale Erholung unter MCS zu sein.

Nach MCS Implantation konnte im Organismus ein Abfall der phosphorylierten aktiven Form der Kinasen Erks und Akt/ GSK3 β gemessen werden. Daraus wurde ersichtlich, dass Erks und Akt/ GSK3 β in höchstem Maße verantwortlich für die myozytäre Ausdehnung sind und als sensitive molekulare Parameter für das *Reverse Remodeling* nach LVAD herangezogen werden können. Das bedeutet eine Regression der Hypertrophie nach MCS- Einsatz bei manchen Patienten, wobei die eintretende Atrophie der Kardiomyozyten signifikant mit der Inaktivierung der myokardialen Kinasen AKT und JNK assoziiert ist.^{49.}

Histologisch zeigte sich nach MCS eine Reduktion in Durchmesser, Länge sowie Volumen der Kardiomyozyten⁴⁴, wobei allein bei den Myozyten des Endomyokards eine Signifikanz messbar war.³⁸ Bruckner et al. stellten sogar einen Zusammenhang zwischen der Zeit an der mechanischen Unterstützung und der prozentualen Veränderung der Myozytengröße dar.^{50.}

Auch wurden nach LVAD wesentlich niedrigere Expression für MMP- 1 und MMP- 9 gemessen, während MMP-2 und MMP-3 unverändert waren. Die MMP- Inhibitoren TIMP- 1- und TIMP- 3- Proteine (*Tissue Inhibitoren* der Metalloproteinasen) waren signifikant hochreguliert worden, während TIMP- 2 und TIMP- 4 unverändert waren. Die Minderung von MMPs und der Anstieg von TIMPs führen zu einer Reduktion des interstitiellen Bindegewebes (*connective tissue*).

Bezüglich des Fibrosegrades gibt es verschiedene Meinungen.³⁸ Gesichert ist, dass Patienten, die bei Implantation des MCS eine geringere Fibrose sowie eine gesteigerte Myozytenhypertrophie aufweisen, den größten Benefit bezüglich der Ejektionsfraktion besitzen. Der Fibrosegrad sowie die Myozytengröße vor mechanischer Unterstützung werden daher als Prädiktoren gesehen.⁵¹

Zusammenfassend ist bekannt, dass durch den erhöhten mechanischen Stress, kombiniert mit einer lokalen Ischämie, kompensatorisch molekulare und zelluläre Mechanismen ausgelöst werden (dem sogenannten *Remodeling*), bis das kranke Herz keine Anpassungsmöglichkeiten mehr hat. Nach mechanischer Herzunterstützung kam es bei einigen Patienten zu einer Verbesserung der kardialen Funktion, so dass die Hypothese der Reversibilität mancher Mechanismen, die mit der Pathogenese der Herzinsuffizienz assoziiert sind, bestätigt werden konnte (*Reverse Remodeling*). Neben anderen Faktoren (Tabelle 3) ist die Hypertrophie eine wichtige Voraussetzung für die nach MCS auftretende Herzerholung.⁴⁴

Reverse Remodeling	
1.	Normalisierung des gestörten Ca ²⁺ -Transport
2.	Reduzierte Zytokine und neurohumorale Aktivität
3	Verbesserte Glucoseutilisation
4	Optimierung der Genexpression bezüglich der Herzinsuffizienz
5	Hochregulierung der β -adrenergen Rezeptoren, Besserung der myozytären Kontraktilität
6	Reduktion der Autoantikörper von β 1-adrenergen Rezeptoren.

Tabelle 3: Einzelne Komponenten des Reverse Remodeling. (aus: Birks EJ, George RS. (2010) Molecular changes occurring during reverse remodeling following left ventricular assist device support. J Cardiovasc Transl Res. 3(6);635-42.)

1.6. Connective Tissue Growth Factor und Remodeling

Connective Tissue Growth Faktor (CTGF) wird durch das Gen CCN2 kodiert und ist ein Wachstumsfaktor, welcher in biologischen Schlüsselfunktionen wie Fibroblastenproliferation, Bildung von Adhäsions- und Granulationsgewebe sowie der Regulation der extrazellulären Matrix involviert ist. CTGF ist ein extrazellulär sezerniertes Protein, welches von TGF- β (*transforming growth factor*) induziert wird.

Das Protein zählt zu der CCN Familie (Cyr61, CTGF und NOV). Charakteristisch für CTGF ist dessen Überexpression bei fibrotischen Umbauprozessen vieler Organe wie der Lunge, der Nieren, der Haut und des Herzens.

CTGF kann eine Hochregulierung von MMPs und TIMPs bewirken, wodurch das Potential sowohl zur Synthese als auch zum Abbau der extrazellulären Matrix gegeben ist.

Bei Herzinsuffizienz wird CTGF nachhaltig exprimiert. In vitro zeigten Panek et al., dass Angiotensin II, Epinephrine und mechanischer Stress zu einer Überexpression von CTGF bei kultivierten Kardiomyozyten führt. Bisher ging man davon aus, dass CTGF erst nach Ausbruch einer kardialen Fibrose den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst. Neuere Studien ergaben Erkenntnisse, dass CTGF zunächst als Schutzfaktor und dann als Verstärker einer Herzinsuffizienz wirkt. Weiter beobachteten Panek et al. anhand eines Tiermodells bei transgenen CTGF- Mäusen mit einer CTGF- Überexpression einen hypertrophen Umbau. Die Tiere wiesen eine Aktivierung der Kinasen AKT und JNK unabhängig von der Expression der Hypertrophie marker BNP (*brain natriuretic peptid*) und ANP (*atrial natriuretic peptid*) auf. Es wurde deutlich, dass die CTGF- Überexpression einen günstigen Einfluss auf die kardiale Funktion bei akuter Druckbelastung hatte. Die Anpassungsfähigkeit des Herzmuskels wurde verbessert. Bei Streßinduktion mittels Angiotensin II- Infusion war eine Aufrechterhaltung der Herzfunktion der Tiere zu messen, während diese beim Wildtyp reduziert war. Bei anhaltender CTGF- Stimulation entwickelten die Tiere jedoch eine Herzschwäche, welche zu einer erhöhten Morbidität führte. Somit entsteht die Hypothese, dass erhöhte CTGF- Werte beim Menschen auf eine drohende Herzschwäche hinweisen könnten.⁵² Ahmed MS et al verweisen auf einen kardioprotectiven Effekt einer CTGF- Überexpression, während Touvron M et al. wiederum die zentrale Schlüsselrolle von CTGF als profibrotischen Faktor interpretieren.^{53, 54}

Beim Menschen wird die Expression gesteuert über das Sp1 regulierende Element im Promotor. In dieser Region befindet sich ein Polymorphismus an der Position c.-945 (SNP ID: rs6918698). Es hat sich gezeigt, dass das G- Allel die CTGF- Transkription über eine erhöhte Affinität zu dem Transkriptionsfaktor Sp1 fördert, während das C- Allel über Sp3 eine mindere CTGF- Transkription hervorruft (Abbildung 3).

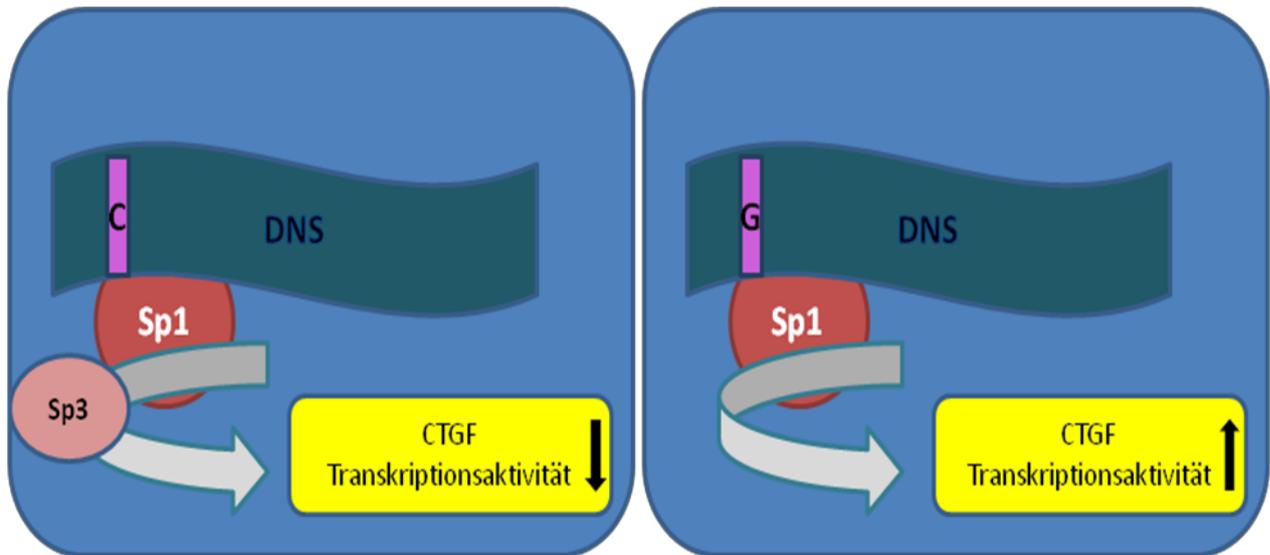


Abbildung 3: Assoziation der funktionellen CTGF- Promotor- Variante (CCN2_c.945) mit einer erhöhten CTGF- Expression beim Menschen. Die Balance zwischen den komplexen Komponenten und der transkriptionellen Aktivität wird wahrscheinlich hervorgerufen durch den Verlust von Bindungsmöglichkeiten für Sp3 an Position -945. (aus: Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M et al. (2007). A polymorphism in CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N England J Med.* 357:1210-20.)

Das c.-945G- Allel wurde signifikant bei Patienten mit fibrotischen Hauterkrankungen gefunden.⁵⁵

1.7. Fragestellung

Bei einigen Patienten mit terminaler DCM kam es unter mechanischer Kreislaufunterstützung zu einem myokardialen *Reverse Remodeling*, welches eine Herzerholung und damit eine Explantation des MCS möglich machte (*Bridge to recovery*). Die molekulargenetischen Mechanismen der Herzerholung sind allerdings weitestgehend unklar.

Die Überexpression von CTGF stellt entgegen früherer Annahmen einen Schutzfaktor vor Herzinsuffizienz im transgenen Mausmodell dar. Die Anpassungsfähigkeit des Herzmuskels gegenüber Druckbelastung wird verbessert.⁵²

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Genvariante im CTGF Promotor mit einer erhöhten Transkription von CTGF assoziiert ist und dass dies bei der Krankheitsentstehung der Sklerodermie eine Rolle spielt.⁵⁵

Um die Rolle dieses Promotorpolymorphismus bei der Entstehung der DCM und auf das myokardiale *Remodelling* beim Menschen zu untersuchen, analysierten wir die CTGF_c.-945 Variante bei insgesamt 479 Patienten mit idiopathischer DCM.

Die primäre Fragestellung war, ob der Polymorphismus gegenüber der Entstehung der Erkrankung prädisponiert und/ oder er mit einer myokardialen Erholung unter MCS assoziiert ist.

2. Materialien

2.1. Geräte

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
- ABI Prism 3100- Avant Genetic Analyser	Applied Biosystems
- Dokumentationssystem	Herolab Enhanced Analysis System
- Dell Precision	Dell Inc. Deutschland
- Deskjet 1600 CM	Hewlett Packard
- Easy Imager- Gel	Biometra
- Eismaschine AF- 100	Scotsman
- Elektrophorese- Netzgerät PS 9009	Gibco B
- Flachbettgelkammer	ABgene
- Fotoanlage Herolab E.A.S.Y.	Herolab Enhanced Analysis System
- Gelkammer Horizon® 58	Gibco B
- Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
- Mikrowelle	Bosch
- Millipore MultiScreen® Column Loader Millipore Platte MAHV N45	Millipore Corporation
- MultiScreen Sephadex Einfüllhilfe und Kratzer	Millipore Corporation
- Netzteil Biometra Power Pack P25	Biometra
- Parafilm	Roth
- PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym
- Peltier Thermal Cycler MJA PTC- 200 MJ Research	MJ- Research, Biozym
- Peltier Thermal Cycler MJD PTC- 200 MJ Research Gradient	MJ- Research, Biozym
- pH- Meter Calmatic 765	Knick
- Picofuge	Stratagene
- Pipettenspitzen	Biozym
- Pipetten 20; 100; 1000µl	Gilson
0,5- 10µl	Eppendorf und Biozym
- Thermocycler Professional 1000	Biometra
- Thermocycler Professional Gradient 1000	Biometra

- Thermomixer comfort	Eppendorf
- Thermostat Multi Temp III	Pharmacia Biotech
- Untersuchungshandschuhe	Braun
- UV- Lampe Biometra TI 1	Biometra
- Waage	Kern
- Zentrifuge Sigma 3K30	Sigma

2.2. Chemikalien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
- Agarose	BioRad/ Biozym/ Pierce
- Ammoniumperoxysulfat (APS)	Pulsone/ Pharmacia Biotech
- Alkonox	Aldrich
- Borsäure	Merck
- Bromphenolblau	Pierce
- Dextranblau	Fluka
- EDTA	Pierce
- Ethanol abs.	Merck
- Ethidiumbromid	Roth
- Salzsäure	Merck
- Sephadex G- 50 Superfine	GE Healthcare
- Tris(base)	Boehringer Mannheim
- Xylencyanol	Pierce

2.3. Enzyme und Nukleotide

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
- AmpliTaq DNA- Polymerase, 5 U/μl	Roche
- BigDye® Terminator 1.1 Kit	Applied Biosystems
- dNTP- Mix (dATP, aTTP, dGTP, dCTP), 2 mM	Roth
- DNA- Primerpaare NCAD	BioTeZ
- Exonuclease I	New England Biolabs
- Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega

2.4. DNA-Molekulargewichtsmarker

Als Molekulargewichtsmarker wurde der Marker VIII (37- 1114 bp) von Roche verwendet.

2.5. Wasser

Das für die Pufferherstellung benötigte Seralpurwasser wurde in einer Pro90CN-Wasseraufbereitungsanlage aufbereitet. Deionisiertes Wasser wurde hierbei durch Ionenaustauscherharze erneut gereinigt. Nach einer Membranfiltration resultierte so schwebstoffreies Seralpur (0,2 µm Ausschlussgrenze).

Für den Sequenzierungspuffer wurde LiChrosolv- HPLC- Wasser (Roth) verwendet.

Für die Agarosegelelektrophorese war destilliertes Wasser ausreichend.

Der pH- Wert wurde jeweils mit 15 %er HCL- Lösung eingestellt.

2.6. Materialien der jeweiligen Arbeitsschritte

Der CCN2 c.-945 liegt in der Promotorregion des CTGF- Gens (Abbildung 4). Wie im Vorfeld untersucht⁵⁵, ist die funktionelle CTGF- Promotor Variante assoziiert mit einer gesteigerten CTGF- Expression bei Menschen.

AGTTTTATATAGGCAAGGACAAGGGA[C/G]GAGTGGCCATCAATGTTTCCAGAAA

Abbildung 4: Lokalisation des Polymorphismus im Promotor des CTGF-Promotor.

2.6.1. Primer Design

Der entsprechende Genabschnitt wurde mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurde ein Vorwärts- (F) und ein Rückwärts- (R) Primer designt. Mit dem Online- Programm Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) konnte das Primerdesign unter Verwendung einer Referenzsequenz und Einhaltung bestimmter Kriterien bestimmt werden. Zu diesen zählen unter anderem der GC- Gehalt, der bei etwa 50% liegen sollte, sowie eine ähnliche Schmelztemperatur der Primerpaare und eine Länge von 20 bp (Tabelle 4).

Primer	Start [Position]	Sequenz (5'=> 3')	Länge [bp]	GC- Gehalt [%]	Schmelz- temperatur [°C]
F	188	GAGAACAAAGACGCGTGTGA	20	50	60,3
R	431	CTCCTAGGTGAACCCCTTT	20	55	59,43

Tabelle 4: Primerpaar mit Lage-, Sequenz-, Fragmentlängen-, GC- Gehalt- und Schmelztemperatur- Angabe.

Die Schmelztemperatur T_M wurde nach folgender Formel durch die Firma BioTeZ berechnet:

$$T_M = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (G + C).$$

A, T, G und C symbolisieren die Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cystein.

Die Stammlösung der Primer wurde entsprechend den Herstellerangaben mit Seralpurwasser verdünnt.

2.6.2. Materialien für die Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden folgende Komponenten benötigt:

- Betaine 0,5 M (Serva)
- dNTP 20 mM (Biozym)
- Magnesiumchlorid 25 mM (Applied Biosystem)
- 10x PCR- Puffer (Applied Biosystems)
- Primer F 5 pmol/ μl
- Primer R 5 pmol/ μl
- Taq-Polymerase 5 U/ μl (Applied Biosystems)
- destilliertes Wasser
- DNS (50 ng/ μl)

Der 10x konzentrierte PCR- Puffer enthält 100 mM Tris- HCL, pH 8,3 und 500 mM KCl.

Verwendete Lösungen

5x TBE- Puffer , pH 8,0

Tris (Base)	54,0 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml
H ₂ O Seralpur	ad 1000 ml

0,5 M EDTA- Lösung, pH 8,0

0,5 M EDTA- NA2 93,0 g
H₂O Seralpur ad 500 ml

Nach Bedarf wurde die Lösung mit HPLC- Wasser verdünnt, um z.B. 1x TBE- Puffer für die Elektrophorese zu erhalten. Der pH- Wert wurde immer mit 15 %iger Salzsäurelösung eingestellt.

Elektrophoresegele

3% Agarosegellösung

Agarose 0,9 g
1x TBE- Lösung 30 ml
Ethidiumbromid 1,0 µl

Zunächst wurde die Agarose mit der TBE- Lösung gemischt. Hinzu wurden 5 ml destilliertes Wasser gefügt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Kontrolliert wurde dies über die Waage. Danach wurde Ethidiumbromid untergemischt und das Gel in die Form gegossen.

Verwendete Puffer

Auftragspuffer

Glycerin 3,0 ml
Destilliertes H₂O 7,0 ml
Bromphenolblau 0,025 g
Xylencyanol 0,025 g

10 mM Tris- Puffer, pH 8,0

Tris (Base) 1,21 g
dH₂O (Seralpur) ad 1000 ml

DNA- Molekulargewichtsmarker

Marker VIII (37- 1114bp),
1:10 mit Tris- Puffer verdünnt

2.6.3. Automatische Sequenzierung

Enzymatische Aufreinigung

Die Exonuklease I mit 1,8 U/ μ l und die Shrimp- Alkaline- Phosphatase (SAP) mit 3,2 U/ μ l wurden für die enzymatische Aufreinigung der amplifizierten Proben benutzt.

Cycle- Sequenzierung

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das BigDye® Terminator- Kit 1.1 (ABI- Chemie) verwendet. Folgende Bestandteile wurden dafür benötigt:

- BigDye- Ready- Reaction- Mix (Applied Biosystems)
- 5x Sequenzierungspuffer (Applied Biosystems)
- PCR- Primer F bzw. R (0,5 pmol/ μ l)
- Enzymatisch aufgereinigtes PCR- Produkt
- HPLC- Wasser

Das BigDye- Ready- Reaction- Mix setzte sich laut Produktionsinformation aus folgenden Komponenten zusammen:

- A-, C-, G- und T- Dye Terminator
- dATP, dCTP, dTTP und dGTP
- Tris HCl (pH 9,0)
- Magnesiumchlorid
- Hitzeresistente Pyrophosphatase
- AmpliTaq- DNA- Polymerase

Automatische DNS- Sequenzierung mittels ABI Prism 3100 Avant- Genetic- Analyser

Das System besteht aus einer Kapillarelektrophoreseeinheit (vier Kapillaren) mit einem variablen Detektionsmodul. Die zur Anregung der Fluoreszenz nötige Energie wird mittels eines Laserstrahls auf die zu detektierende Probe gerichtet. Die Signale der so angeregten Fluoreszenzfarbstoffe werden im Gerät durch die Optik des Detektionsmoduls auf ein Filtersystem fokussiert, welches auf die Emissionsmaxima der vier basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe abgestimmt ist. Eine Signalverstärkerröhre (Photo Multiplier- Tube) wandelte die Photoenergie in elektrische Impulse um und verstärkte diese gleichzeitig. Die Sequenzierreaktion wurde mit Dye- markierten Terminatoren (Big Dye Terminatoren) und den zu dem Fragment gehörigen Primer durchgeführt. Je nach gewünschter Leserichtung konnte der Sense- oder

Antisenseprimer verwendet werden. Die Daten wurden von einem angeschlossenen Computer (Dell Precision) mit der ABI™ Sequencing Data Collection Software Version 1.2.1 als spezifische Datei aufgezeichnet. Für die Auswertung der Elektropherogramme wurde die Software Sequencher™ Version 4.1.2, Gene Codes Corporation© 1991-2000 auf einem anderen Computer verwendet.

2.6.4. Restriktions- Fragment- Längen- Polymorphismus- Analyse (RFLP-Analyse)

Mit RFLP lassen sich genetische Varianten schnell und sicher bestätigen. Restriktionsenzyme oder genauer Restriktionsendonukleasen sind Bakterienenzyme, welche die DNS an bestimmten Positionen schneiden. Jede Restriktionsendonuklease erkennt eine spezifische DNS- Basensequenz. Durch den Austausch eines Nukleotids ändert sich die Erkennungssequenz. Auf diese Weise können genetische Varianten dazu führen, dass bestimmte Restriktionsenzyme nicht mehr in der Lage sind, an die DNS zu binden, um diese zu schneiden. Werden DNS- Proben mit dem entsprechenden Restriktionsenzym inkubiert, so wird also nur die Variante bzw. nur der Wildtyp geschnitten. Schneidet das Enzym, so ergeben sich zwei kürzere Fragmente, die durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese von nicht geschnittenen DNS- Proben unterschieden werden können.

Das geeignete Restriktionsenzym Mnl1 wurde mit der Sequencher Software identifiziert.

3. Methoden

3.1. Übersicht über die Methodik

3.1.1. Patientenkollektiv

Das untersuchte Kollektiv setzte sich aus insgesamt 363 Patienten zusammen, bei welchen eine idiopathische DCM nach vorgegebenen Richtlinien festgestellt worden ist.

Die Patientenrekrutierung erfolgte nach den folgenden Ein- und Ausschlusskriterien:

<u>Einschlusskriterien:</u>	<u>Ausschlusskriterien:</u>
- Alter > 18 Lj. (gilt für Patienten der Gruppe II und III)	- KHK
- Idiopathische DCM-	- Angeborener Herzfehler
	- Myokarditis und virale, kardiale Infektionen

Einschlusskriterien für die Patienten der Gruppe II und III war ein Anschluss an eine mechanische Unterstützung für mindestens 30 Tage. Eine schriftliche Einwilligung zur genetischen Untersuchung war von den Patienten eingeholt worden. Zur Bestimmung von Geometrie und Funktion des Herzens wurden standardisierte echokardiographische Methoden und andere bildgebende Verfahren wie das multislice CT eingesetzt. Auch kamen Herzkatheteruntersuchungen zur Bildgebung und Druckmessung zum Einsatz. Drei Gruppen wurden unterschieden.

Gruppe I

314 Patienten mit milder iDCM, die zwischen 1998 und 2006 ambulant in Behandlung an der Charité Campus Buch waren, wurden konservativ- medikamentös therapiert. Sie erhielten keine mechanische Unterstützung oder Herztransplantation.

Die übrigen 49 eingeschlossenen Patienten hatten eine mechanische Herzunterstützung. Der Krankheitsverlauf wurde für mindestens 12 Monate, im Durchschnitt 8,5 Jahre, verfolgt. In den ersten drei Monaten nach VAD- Implantation wurden alle vier, später alle acht Wochen ambulante Verlaufsuntersuchungen durchgeführt. Diese beinhalteten die Erfassung der Herzinsuffizienzsymptomatik nach NYHA- Klassifikation, Echokardiographien, einen sechsminütiger Gehstest sowie einen Herzinsuffizienzfragebogen. Diese 49 Patienten wurden in folgende Gruppen aufgeteilt:

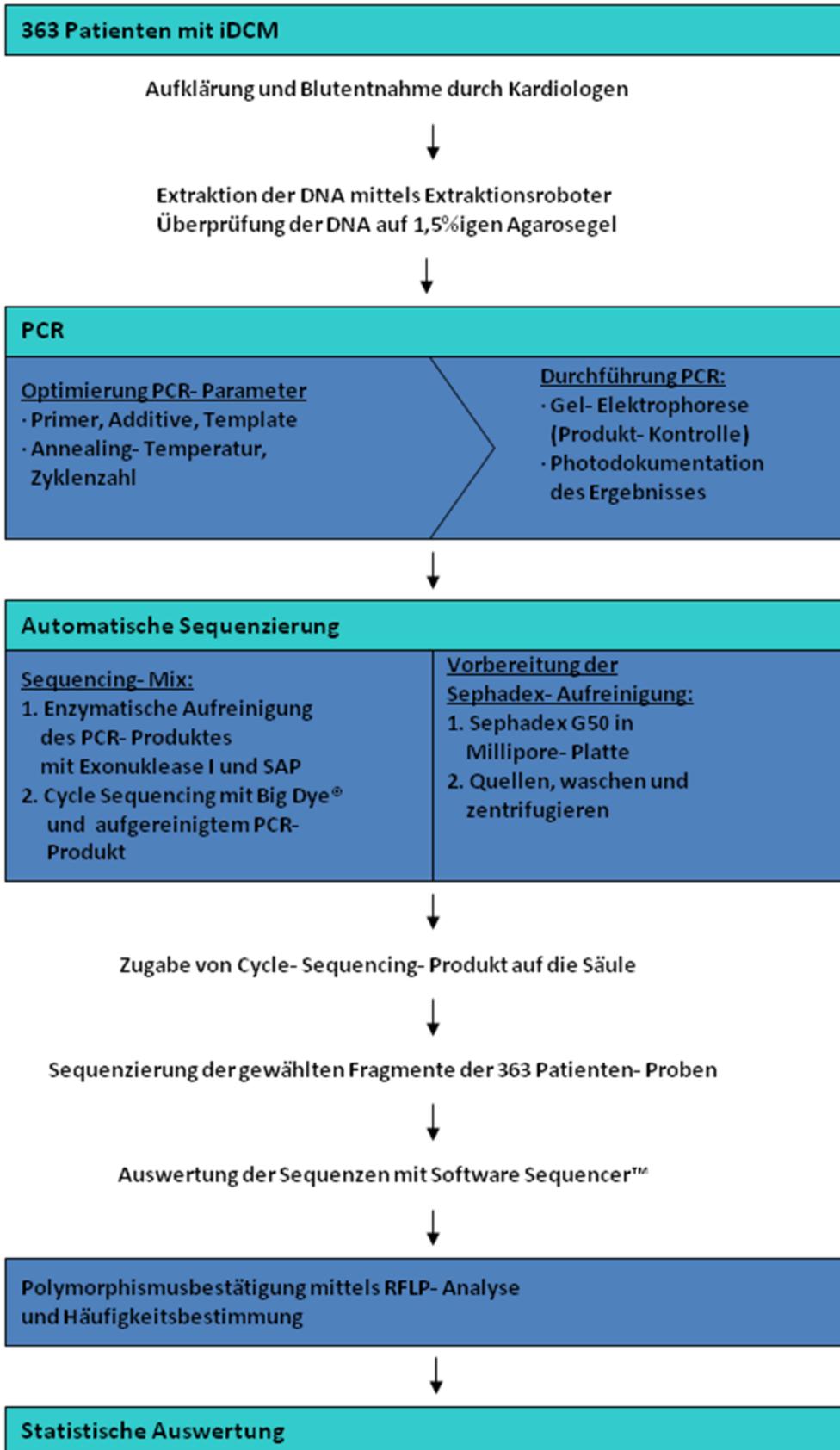
Gruppe II

20 Patienten mit iDCM, welche zwischen 1995 und 2009 erfolgreich vom MCS entwöhnt werden konnten, konnten in die Gruppe II aufgenommen werden. Diese wurden in dem DHZB in der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie behandelt und unter vorgegebenen Kriterien ausgewählt. Alle Teilnehmer wiesen nach Explantation eine Herzerholung vor, die für mindestens drei Monate anhielt.

Gruppe III

Gruppe III bestand aus den restlichen 29 Patienten mit *Bridge to transplantation*, welche im Zeitraum 1998 und 2006 behandelt wurden. Sie wiesen keine Herzerholung unter mechanischer Unterstützung auf. Auch hier erfolgte die Rekrutierung im DHZB unter Einhaltung der festgelegten Kriterien.

3.2. Fließschema zum Arbeitsablauf



3.3. Aufarbeitung der Blutproben

Zur Durchführung der Analysen wurde nach schriftlicher Einverständniserklärung 9 ml EDTA- Blut abgenommen und bei -20°C gelagert. Darauf folgte die Isolierung der genomischen DNA mittels eines Autopure LS Extraktionsroboter aus den Lymphozyten. Im Anschluss fand eine Konzentrationsbestimmung der DNA statt. Hierbei wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese mit einer Agarosekonzentration von 1,5 % durchgeführt. Durch Mitführen eines DNA- Standards mit einer Konzentration von 25 ng/µl konnte die DNA- Konzentration überprüft und gegebenenfalls eingestellt werden.

3.4. Polymerasekettenreaktion

3.4.1. PCR- Optimierung

Unter Beachtung der spezifischen Schmelztemperatur der Primer wurde eine Temperaturoptimierung durchgeführt. Auch wurden optimale Bedingungen für die Primermenge sowie die Menge an einzusetzender genomischer DNA und die Zyklenzahl der PCR ermittelt. Dabei galt es, unspezifische Produkte zu vermeiden und eine ausreichende Menge an PCR- Produkt zu erhalten. Das PCR- Reaktionsgrundgemisch wurde, wie in Tabelle 5 dargestellt, angesetzt.

Komponente	Volumen [µl]
Betain 0,5 M (Serva)	1,0
dNTP 20 mM (Biozym)	0,3
MgCl 25 mM (Applied Biosys.)	2,0
10X PCR-Puffer (Applied Biosys.)	2,5
Primer F 5 pmol/µl	1,0
Primer R 5 pmol/µl	1,0
Taq-Polymerase 5 U/µl (Applied Biosys.)	0,2
H ₂ O dest.	16,0
DNS (50 ng/µl)	1,0
	25 µl

Tabelle 5: Grundreaktionsgemisch für PCR

Bei der Durchführung zeigte sich unter Zugabe von PCR- Additiven wie Betaine eine Verbesserung des Ergebnisses. Die Optimierung wurde in den

Gradiententhermocyclern von Biometra und MJ Research durchgeführt, welche zwölf verschiedene Temperaturen in einem Lauf ermöglichten.

Die Annealingtemperatur ergab sich beim Gradientenlauf von der Temperatur, die das deutlichste PCR- Produkt lieferte. Während der Ermittlung der Annealingtemperatur wurde DNA von anonymen Blutspendern als Template eingesetzt. Für die Amplifikation der Fragmente wurde von folgendem Grundprogramm ausgegangen (Tabelle 6). Die einzusetzenden Mengen, Zyklenzahlen und Additive sind experimentell in diversen Versuchen ermittelt worden.

Schritt	Temperatur	Zeit in Minuten	Funktion
I	90°C	02:00	Start der Denaturierung
II	94°C	01:00	Initiale Denaturierung
III	58°C (Annealingtemperatur)	00:30	Primer Annealing
IV	73°C	01:00	Elongation
V	94°C	00:15	Denaturierung
VI	Wiederholung des Schrittes III-V (29x)	34 mal	Wiederholung
VII	58°C Annealingtemperatur	00:15	Primer Annealing
VIII	73°C	05:00	Finale Elongation
IX	4°C	Unbegrenzt	Ende

Tabelle 6: Grundprogramm im Thermocycler zur Optimierung und Durchführung der PCR

3.4.2. Durchführung der PCR

Die in Tabelle 4 aufgeführten einzelnen Komponenten waren tiefgefroren und wurden in einem Heizblock aufgetaut, gemischt und zentrifugiert. Ausnahme war die Taq-Polymerase, sie blieb bis zur Verwendung in einer Tiefkühlbox. Die Reaktionsansätze wurden je nach Anzahl der zu amplifizierenden Proben in entsprechender Menge aus den verschiedenen Komponenten hergestellt. Das Ansatzvolumen betrug 24 µl. Dazu kamen 1,0 µl der genomischen DNS- Lösung.

Der PCR- Ansatz wurde als Mastermix hergestellt und in Reaktionsgefäße (Tube- Strips) auf Eis pipettiert. Jeweils 24 µl Ansatz wurde in einen Tube- Strip pipettiert und mit einer automatischen Pipette 1,0 µl DNS hinzugefügt. Anschließend wurde diese Lösung in den Reaktionsgefäßen gemischt und zentrifugiert. Danach wurde der auf 95°C vorgeheizte und programmierte Thermocycler bestückt. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle (kn), die nur aus Reaktionsansatz ohne genomische DNA bestand, mitgeführt. Das optimierte Cycler- Programm aller Fragmente ist in Tabelle 6 dargestellt.

3.4.3. Kontrolle der Amplifikation

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese wurden die amplifizierten Fragmente überprüft. 3,0µl PCR- Produkt sind mit 3,0 µl Auftragspuffer vermischt und auf ein 2,0 %iges Agarosegel, bedeckt mit 1x TBE- Puffer, aufgetragen worden. Der Molekulargewichtsmarker VIII, der in der Gelelektrophoresekammer bei 80V angelegter Spannung mitlief, machte eine Aussage über die Länge der Fragmente möglich. Die Laufzeit betrug je nach Größe 25- 40 Minuten. Ethidiumbromid im Gel ließ bei Bestrahlung mit UV- Licht die Banden erscheinen. Die Agarosegele wurden unter UV- Licht am Transluminator UV- Tisch kontrolliert, per Photo das PCR- Produkt dann dokumentiert und danach ausgewertet. Bei ausreichender Intensität der Banden wurden die Proben für die Sequenzierung bzw. den Restriktionsverdau weiterverarbeitet.

3.5. Automatische Sequenzierung

3.5.1. Herstellung der zu sequenzierenden Proben

Wie in dem Abschnitt 2.7.2 beschrieben, wurden die zu sequenzierenden DNS- Proben amplifiziert. Nur Fragmente, die nach der Überprüfung im Agarosegel gut sichtbar und ohne Nebenbanden waren, konnten für die Sequenzierung verwendet werden.

3.5.2. Enzymatische Aufreinigung

Zur Aufreinigung der amplifizierten Fragmente wurde die Exonuklease I und die Shrimp alkaline Phosphatase (SAP) verwendet.

Komponente	Volumen [μ l]
Exonuklease	0,09
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	0,32
Destilliertes H ₂ O	2,59
PCR- Produkt	7,00
10,00 μ l	

Tabelle 7: Reaktionsansatz für enzymatische Aufreinigung (Ansatz pro Probe).

Der in Tabelle 7 aufgeführte Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei 72°C, dann bei 4°C unbegrenzt im Thermocycler inkubiert.

3.5.3. Cycle- Sequencing

Die nötigen Reagenzien wurden bei 20°C aufgetaut, gemischt und zentrifugiert. Je ein Mastermix für *Forward*- und *Reverse*- Ansatz wurde aus den einzelnen Komponenten zunächst ohne das aufgereinigte Fragment hergestellt. Die Anzahl der zu sequenzierenden DNS- Proben bestimmte das Gesamtvolumen des Mastermixes.

Komponente	Volumen [μ l]
Big Dye Terminator	0,50
5x Seq.- Buffer	1,75
Primer F oder R (05 pmol/ μ l)	1,00
Seralpurwasser	4,75
Enzymatisch aufgereinigtes PCR- Produkt	2,00
10,00 μ l	

Tabelle 8: Ansatz für Cycle Sequencing (Ansatz pro Probe).

Der fertige Reaktionsansatz (Tabelle 8) wurde danach in beschriftete Reaktionsgefäße (Tube- Stripes) pipettiert und die aufgereinigte DNS hinzugegeben.

Die verschlossenen, gemischten und zentrifugierten Tube- Strips wurden, wie in Tabelle 9 dargestellt, weiterverarbeitet.

Schritt	Temperatur	Zeit
I	96°C	00:01:00h
II	96°C	00:00:10h
III	50°C	00:00:30 h
IV	60°C	00:04:00 h
V	Wiederholung des Schrittes 2 bis 4	25 mal
VI	4°C	Unbegrenzt

Tabelle 9: Thermocycler- Programm für das Cycle- Sequencing

3.5.4. Sephadex- Aufreinigung

Zur Aufreinigung wurde eine Millipore 96- Loch Filterplatte über eine G- 50 Säule platziert. Die Filtermembran bestand aus einer Duraporemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die Millipore- Platte setzte sich aus einem Deckel und einem Unterteil zusammen, welches genau auf die 96- Loch Sequenzierplatte passte. Anschließend wurde Sephadexpulver (Healthcare Bioscience) in die Platte gefüllt und jedes einzelne Loch mit 300µl Wasser (Aqua Serapur) versetzt. Der Ansatz wurde für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur und maximal zwei Tage bei +4°C quellen gelassen. Nach dem ersten Zentrifugieren (970 g) wurde das abzentrifugierte Wasser verworfen, 150 µl Aqua Serapur pro Loch nachgefüllt und die Platte erneut zentrifugiert. Darauf wurden je 10 µl Sequenzierprodukt in das jeweilige Plattenloch pipettiert. Vor dem nächsten Zentrifugationsschritt wurde nun die mit 13µl HiDi- Formamid (Applied Biosystems) pro Loch gefüllte Ladeplatte (Optical 96- Well Reaction Plate, Applied Biosystems) unter die Sephadexplatte gesetzt, sodass das Sequenzierprodukt in die Ladeplatte einzentrifugiert werden konnte. Die Ladeplatte wurde anschließend mit dem Plate Septa (Applied Biosystems) verschlossen und bei -20°C bis zur Sequenzierung gelagert.

3.5.5. Automatische Sequenzierung

Mit Hilfe der automatischen Sequenzierung wurden die DNS- Proben des Kollektivs auf den gewählten Polymorphismus im CTGF- Gen untersucht. Die Sequenzierung (Kettenabbruch nach Sanger) beruht auf der unidirektionalen in- vitro- Synthese eines DNS- Komplementärstranges (Cycle sequencing, PCR- Methode). Die für die Reaktion notwendigen Desoxinukleotide (dNTPs) und Didesoxinukleotidbasen (ddNTPs), die mit

den vier basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, waren in dem verwendeten Kit von ABI Prism v1.1 enthalten.

Die ddNTPs hatten ihre Absorptionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen (siehe Tabelle 10).

Filter- Durchlassband(nm)	Fluoreszenzfarbstoff	Base
531	Blau	C
560	Grün	A
580	Gelb	G
610	Rot	T

Tabelle 10: Filterset für Taq- Dye- Markierung.

Die Sequenzierplatte wurde frei von Luftblasen in das zuvor programmierte Applied Biosystems Modell 3100 Avant gestellt. Nach der Sequenzierung erfolgte die Auswertung mit der Software Sequencher™. Anschließend wurden die in Elektropherogrammen dargestellten Sequenzdaten mit den Referenzsequenzen des CTGF- Fragments aus www.ensemble.org verglichen.

3.6. Restriktions- Fragment- Längen- Polymorphismen- Analyse

3.6.1. Durchführung der RFLP- Analysen

Für den Ansatz (Tabelle 11) wurde das Enzym aufgetaut, gemischt und zentrifugiert. In einem 2,0 ml Reaktionsgefäß wurde die dem Hersteller entsprechenden Reagenzien dazugegeben. Das mit dem Restriktionsenzym Mnl1 versetzte PCR-Produkt wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz von 10 µl mit 3 µl PCR- Auftragspuffer vermischt und auf 2 %igem Agarosegel aufgetragen, um danach elektrophoretisch getrennt zu werden. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte auf einem Photo.

Komponente	Volumen [µl]
Restriktionsenzym (Mnl1)	0,10
NEB Puffer	1,00
H2O	6,90
PCR-Produkt	2,00
	10,00µl

Tabelle 11: Ansatz für Restriktionsverdau

3.6.2. Kontrolle der Restriktionsprodukte

Mittels Gelelektrophorese konnte der Polymorphismus überprüft und das Bandenmuster der Restriktion dokumentiert werden. Hierfür wurden 10,0 µl Probenvolumen vom Restriktionsverdau mit 3,0 µl Auftragspuffer vermischt und auf 2,0 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese und die anschließende Dokumentation der Ergebnisse erfolgten auf die in 2.8.3.3. beschriebene Verfahrensweise.

3.7. Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS (erhältlich unter <http://www.spss.com/de/downl.cfm#sta>) herangezogen. Die Häufigkeit der ermittelten Variante ist in absoluten Zahlen und Prozenten angegeben. Stetige Variablen wurden auf Normal- Verteilung (Gauß) überprüft und sind als Durchschnittswerte mit Standardabweichung (SA) wiedergegeben. Für metrische Größen wurde der Student t- Test angewandt, während bei nominalen Werten der Chi- Quadrattest hinzugezogen wurde. Bei Fallzahlen kleiner als fünf wurde der Fishers- Exakt- Test verwendet. Eine Signifikanz wurde mit einem p- Wert <0,05 belegt.

4. Ergebnisse

4.1. Übersicht über das gesamte Patientenkollektiv

Insgesamt konnten 363 Patienten mit DCM in die Studie eingeschlossen werden. Alle Patienten wurden nach den oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien zwischen 1996 und 2005 rekrutiert (siehe Patientenkollektiv). Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Studienteilnehmer der Gruppe I, die rein medikamentös behandelt werden konnten, im Vergleich zu den Gruppen II und III mit schwerer iDCM, die eine mechanische Unterstützung benötigten.

	Gruppe I	Gruppe II und III
Geschlecht [m:w]	256:58	44:5
Alter (<i>Zeitpunkt der Analysen</i>) [y]	63 ±11,9	45 (±10,9)
BSA [m²]	1,95 (±0,23)	1,87 (±0,4)
EF%	33,6 (±10,6)	15,7 (±3,9)
LVEDD [mm]	67,4 (±9,2)	75,2 (±9)
FS [%]	18,9 (±7,6)	8,5 (±4,5)

Tabelle 12: Übersicht über gesamtes untersuchtes Patientenkollektiv mit iDCM (in Klammern wird jeweils die Standardabweichung angegeben)

Die FS wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$FS = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD}$$

LVESD steht für den linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser.

Statistisch konnte weder bezüglich des Geschlechts (p- Wert 0,517), noch des Alters, der BSA, des LVEDD und des FS ein signifikanter Unterschied errechnet werden. Lediglich anhand der EF mit einem p- Wert <0,005 wurde wie zu Erwarten die differente Ausprägung der DCM statistisch belegt (Tabelle 13). Die signifikant verminderte EF entspricht den Stratifizierungskriterien, die aus der Patientenrekrutierung und Gruppierung resultieren.

	Gruppe I vs Gruppe II p- Wert	Gruppe I vs Gruppe III p- Wert
Alter	0,663	0,340
BSA	0,226	0,829
EF	0,001	0,002
LVEDD	0,154	0,871
FS	0,075	0,160

Tabelle 13: Statistische Auswertung, p- Wert für Alter, BSA, EF, LVEDD und FS. Gruppe 1 versus 2 und Gruppe 1 versus 3.

4.1.1. Gruppe I

Die in der Gruppe I eingeschlossenen Patienten mit milder iDCM wurden aus der Biomaterial- und Datenbank der Charité, Campus Buch rekrutiert (Tabelle 12). 81,5 % der Patienten dieser Gruppe waren männlich. 69 % hatten einen Sinusrhythmus. 26 % litten an Vorhofflimmern. 5 % waren Schrittmacherträger. Der älteste Studienteilnehmer war zum Zeitpunkt der Studie 88 Jahre alt, der Jüngste 18 Jahre. Die Patienten dieser Gruppe I hatten im Durchschnitt eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion 33,6 %, die sich signifikant von dem Mittelwert der anderen Gruppen unterschied (siehe auch Tabelle 13). Der LVEDD lag im Mittel bei 67,4 mm (p- Wert >0,005 im Vergleich zu Gruppe II und III). Daraus wird die mildere Ausprägung ersichtlich im Vergleich zu jenen Patienten, die eine mechanische Unterstützung benötigten (Gruppe II und III). Therapeutisch erhielten sie eine rein konservativ- medikamentöse Behandlung. Eine mechanische Kreislaufunterstützung war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht nötig. Abbildung 5 stellt diese Differenz zwischen den Gruppen graphisch dar.

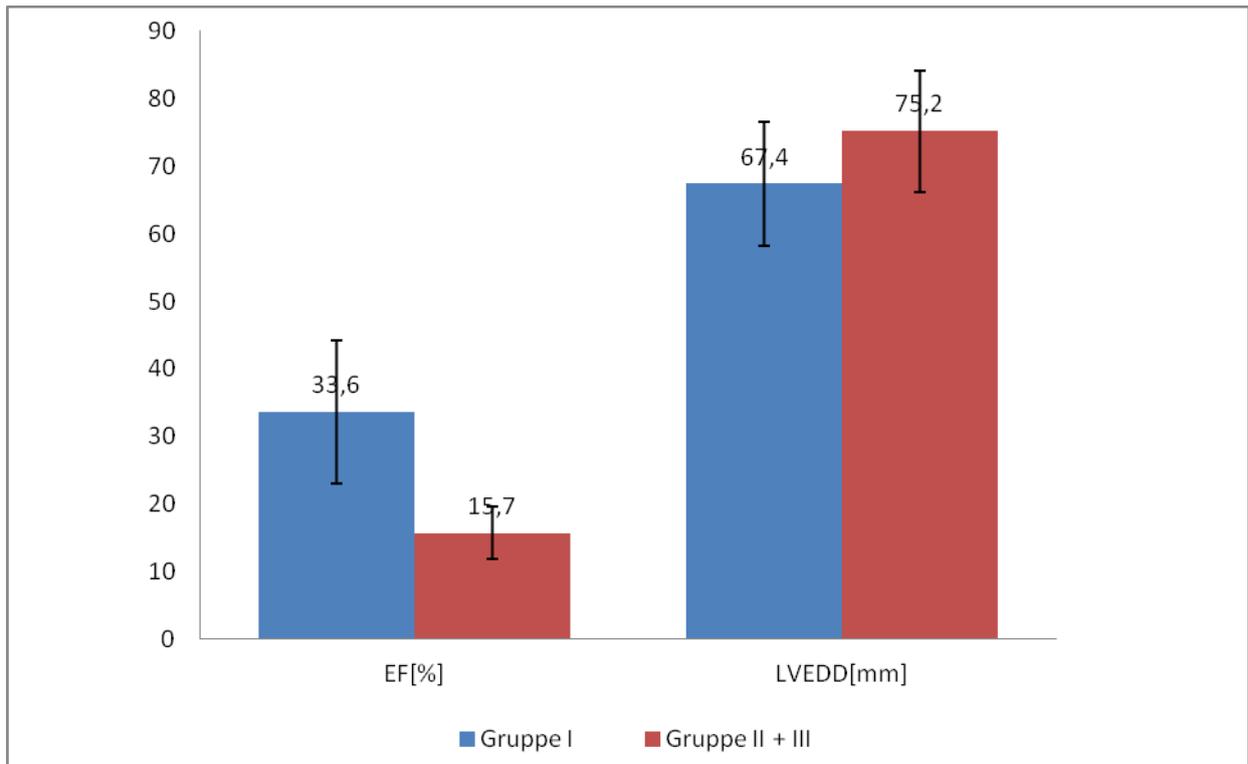


Abbildung 5: Diagramm: Klinisch messbare Daten (EF und LVEDD mit Standardabweichung) der Gruppe I im Vergleich zu den Gruppen II und III.

4.1.2. Gruppe II

Die 20 Patienten dieser Gruppe hatten unter der mechanischen Kreislaufunterstützung eine Herzerholung erfahren, die zumindest für drei Monate nach Explantation anhielt. Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die klinischen Daten der Gruppe II.

	Gruppe II
Geschlecht [m:w]	19:1
Alter [y] bei Implantation des MCS	43,1 ($\pm 11,1$)
BSA[m²]	1,93 ($\pm 0,2$)
LVEDD [mm] bei Implantation	72,4 ($\pm 7,2$)
EF [%] bei Implantation	15,5 ($\pm 4,0$)
FS [%] bei Implantation	6,2 ($\pm 3,9$)
LVEDD [mm] bei Explantation	52,2 ($\pm 6,5$)
EF [%] bei Explantation	51,3 ($\pm 7,9$)
FS [%] bei Explantation	33,5 ($\pm 19,5$)
Linksventrikulär MCS	18 (90%)
Pulsatile MCS	16 (80%)
Biventrikuläre MCS	2 (10%)
Tage am MCS	130,15 ($\pm 84,5$)

Tabelle 14: Übersicht über klinische Daten der Gruppe II (in Klammern wird jeweils die Standardabweichung bzw. der prozentuale Anteil angegeben).

Insgesamt 19 Studienteilnehmer, also 95 % waren männlich. Durchschnittlich hatte das Kollektiv ein Alter von 43,1 Jahren zum Zeitpunkt der Implantation; der Jüngste war bei der Operation 22 Jahre alt (Geburtsjahr 1982), der älteste Teilnehmer 64 Jahre (Geburtsjahr 1942). Durchschnittlich wurde eine BSA von 1,93m² dokumentiert. Bei Implantation des MCS lag der LVEDD zwischen 66 bis 93 mm (Durchschnittswert von 72,4mm) und FS von durchschnittlich 6,2 %, während die Ejektionsfraktion zwischen 10% bis 20% (Durchschnittswert von 15,5 %) rangierte. Diese Werte verdeutlichen den terminalen Zustand der iDCM in diesem Kollektiv. Von den 20 Patienten wurden 18 linksventrikulär und zwei biventrikulär mechanisch unterstützt. Die Mehrheit dieser Gruppe erhielt ein Novacor LVAD (n=12 ~60 %). Drei hatten ein Berlin Heart Excor (1 LVAD ~5 %, 2 BVAD ~10 %), während bei weiteren drei (~15 %) ein Incor LVAD mit kontinuierlichem Fluss implantiert wurde. Zwei Patienten (~10%) bekamen ein Heartmate LVAD (Abbildung 6, siehe auch Tabelle 26).

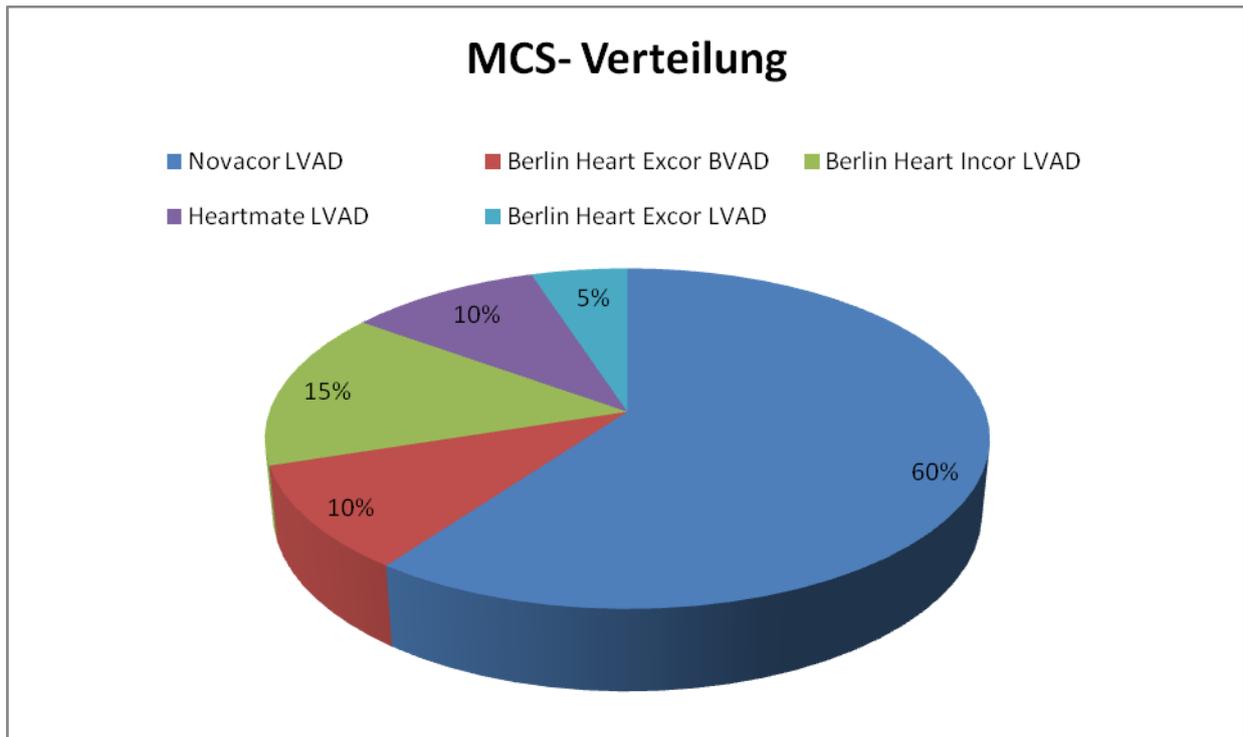


Abbildung 6: Prozentuale MCS- Verteilung der Gruppe II, Tortendiagramm.

Während der 30 bis 341 Tage, die sie an das MCS angeschlossen waren, verbesserte sich die kardiale Funktion signifikant. LVEDD und EF bewegten sich bei der finalen Pumpenstoppechokardiographie zwischen 52,2 mm \pm 6,0 und 51,3 % \pm 7,9, FS bei Explantation betrug 33,5 % \pm 19,5. Die Herzfunktion hatte sich unter MCS soweit erholt, dass annähernd normwertige Messbereiche erreicht worden sind und damit eine Explantation erwogen wurde. Die Mehrheit der Gruppe (70 %) wies eine Langzeitverbesserung der kardialen Funktion von mehr als 24 Monaten auf.

4.1.2.1. Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz nach kardialer Erholung

Bei sieben der 20 Patienten kam es nach einer vorübergehenden Herzerholung zu einem Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz. Zwischen 215 bis 3408 Tagen benötigten diese Patienten keine mechanische Unterstützung (siehe auch Tabelle 18). Alle Sieben waren männlich. Ihre echokardiographischen Daten werden in Tabelle 15 aufgeführt.

	EF vor Implanta- tion [%]	EF vor Explanta- tion [%]	EF vor Reim- planta- tion [%]	LVEDD vor Implanta- tion [mm]	LVEDD vor Explanta- tion [mm]	LVEDD vor Reim- planta- tion [mm]
Mittel- wert (SA)	16,4 (±4,2)	48,3 (±8,2)	35,7 (±14,0)	71,4 (±3,4)	52,2 (±8,2)	62,3 (±9,3)

Tabelle 15: Mittelwert mit Standardabweichung der echokardiographische Daten von Patientin mit Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz: Vergleich vor Implantation und Explantation sowie vor Reimplantation.

Bei der statistischen Auswertung dieser Daten konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 16). Sowohl im Vergleich der EF vor Implantation bzw. Explantation ergibt sich mit einem p- Wert von <0,001 eine Signifikanz als auch vor Implantation bzw. Reimplantation mit einem p- Wert von 0,01. Die EF vor Explantation des MCS unterschied sich mit einem p-Wert von 0,059 nicht signifikant von der EF vor Reimplantation. Auch bei dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser vor Implantation und Explantation des MCS zeigt sich eine Signifikanz mit einem p- Wert von 0,001. Weiter unterschied sich der LVEDD vor Explantation bzw. Reimplantation unterscheidet wesentlich (p-Wert <0,05). Vor Implantation bzw. Reimplantation ist den LVEDD betreffend kein signifikanter Unterschied feststellbar (p-Wert >0,05).

	EF 1 vs. EF 2	EF 1 vs. EF 3	EF 2 vs. EF 3	LVEDD 1 vs. LVEDD 2	LVEDD 1 vs. LVEDD 3	LVEDD 2 vs. LVEDD 3
p- Wert	<0,001	0,01	0,059	0,001	0,109	0,062

Tabelle 16: Statistische Auswertung der echokardiographischen Daten der sieben Patienten mit Wiederauftreten der Herzinsuffizienz. (EF 1= EF vor Implantation, EF 2= EF vor Explantation; EF 3= EF vor Reimplantation. LVEDD 1= LVEDD vor Implantation, LVEDD 2= LVEDD vor Explantation, LVEDD3= LVEDD vor Reimplantation)

Vor Explantation wurde bei den sieben Patienten eine EF ≥ 40 % und ein LVEDD ≤ 65 mm gemessen. In dem LVEDD konnte keine Differenz festgestellt werden. Der Durchschnittswert der 13 Personen sowie der sieben mit kurzfristiger Erholung lag bei 52,2 mm. Währenddessen lag die EF bei den Patienten mit kurzfristiger Erholung mit

48,3 % unter dem Wert jener mit langfristiger Erholung (53,8 %) (siehe auch Tabelle 17 und Abbildung 7).

	EF [%] (SA)	LVEDD [mm] (SA)
Kurzfristige Erholung	48,3 (±8,2)	52,2 (±8,2)
Langfristige Erholung	53,8 (±5,9)	52,2 (±4,8)

Tabelle 17: EF und LVEDD bei Patienten mit kurzfristiger bzw. langfristiger Erholung.

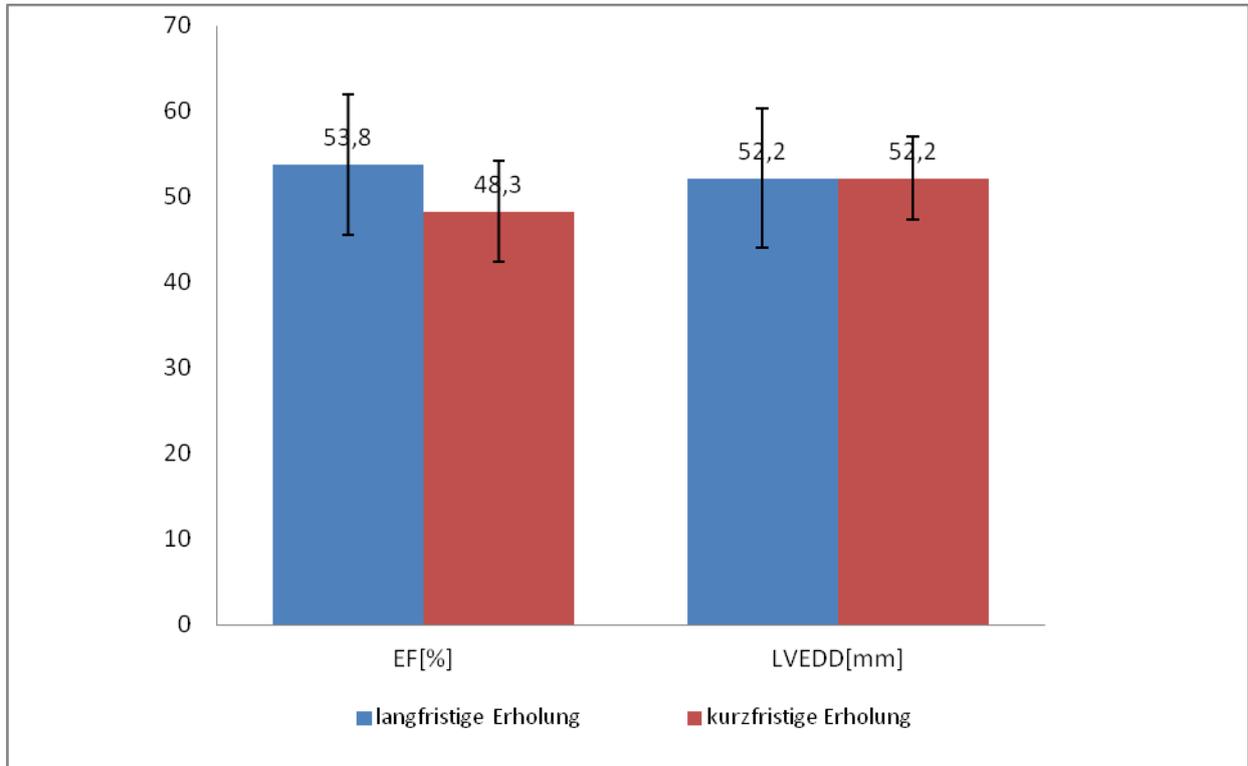


Abbildung 7: Diagramm EF und LVEDD, Vergleich langfristige und kurzfristige Herzerholung.

Bei Sechs der Sieben mit kurzfristiger Herzerholung folgte auf die MCS- Explantation eine Herztransplantation (Tabelle 18).

	MCS	Pulsatile versus continuous flow	Tage am MCS	Tage ohne MCS	Herztransplantation (im untersuchten Zeitraum)
Individuum A	Novacor LVAD	P	202	215	Ja
Individuum B	Novacor LVAD	P	176	269	Ja
Individuum C	Novacor LVAD	P	30	2317	Ja
Individuum D	Novacor LVAD	P	62	1413	Ja
Individuum E	Novacor LVAD	P	102	2563	Ja
Individuum F	Novacor LVAD	P	69	3408	Ja
Individuum G	Berlin Heart Incor LVAD	C	206	1597	Nein
		Mittelwert ±SA	121 ±72,6	1697 ±1294	

Tabelle 18: Übersicht über Patienten, bei denen eine Herzinsuffizienz nach Explantation wiederauftrat.

Der Beobachtungszeitraum von Individuum A und B war vor 2002, von C bis G nach 2002. Die kürzeste Zeitspanne der Herzerholung bis zum Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz betrug 215 Tage, das größte Erholungsintervall 3408 Tage (Tabelle 18). Individuum G benötigte nach 1597 Tagen eine Reimplantation eines MCS. Durchschnittlich verbrachten diese sieben Patienten mit kurzfristiger Herzerholung 121 Tage $\pm 72,6$ an der ventrikulären Unterstützung. Für die restlichen 13 stabilen Patienten der Gruppe II ergab sich im Mittel ein Wert von 128,7 Tagen $\pm 98,4$ am MCS. Somit zeigt sich, dass die Studienteilnehmer mit Langzeiterholung tendenziell auch eine längere Zeit an einem MCS angeschlossen waren als jene mit kurzfristiger Erholung. In der Verteilung der implantierten Systeme zeigte sich ein deutlicher Unterschied im

Vergleich zu der Gruppe II insgesamt, so wurde bei jenen Patienten mit kurzfristiger Erholung ausschließlich Novacor LVAD und BH Incor LVAD eingesetzt.

4.1.3. Gruppe III

Unter MCS konnte bei den Studienteilnehmern der Gruppe III keine Besserung der kardialen Funktion beobachtet werden. Letztlich wurden sämtliche Patienten herztransplantiert. Tabelle 19 gibt eine Übersicht über die klinischen Daten dieser Gruppe.

	Gruppe III	
Geschlecht [m:w]	25:4	86,2%: 13,8%
Alter [y] bei Implantation des MCS	45,9 (\pm 11,9)	
BSA[m²]	1,81 (\pm 0,6)	
LVEDD [mm] bei Implantation	78,6 (\pm 10,8)	
EF [%] bei Implantation	15,9 (\pm 3,8)	
FS [%] bei Implantation	33,5 (\pm 19,5)	
Pulsatile MCS	16 (55%)	
Biventrikuläre MCS	9 (31%)	
Tage am MCS	345,86 (\pm 214,97)	

Tabelle 19: Übersicht über klinische Daten der Gruppe III, in Klammern wird die Standardabweichung wiedergegeben.

Das Durchschnittsalter bei Implantation lag hier bei 46 Jahren (zwischen 18 und 64 Lebensjahren). LVEDD wurde zwischen 62 bis 108 mm (Mittelwert von 78,6 mm) gemessen, die EF zwischen 10- 20 % (im Mittel 15,9 %). Ein FS von durchschnittlich 33,5 % konnte berechnet werden. Zur mechanischen Unterstützung wurde bei 13 Patienten das Berlin Heart Excor (8 BVAD und 4 LVAD), bei 12 ein Berlin Heart Incor und bei vier ein Novacor implantiert. Zwei wurden mit einem Heartmate LVAD behandelt (Abbildung 8 und Tabelle 26). Das Intervall zwischen MCS Implantation und Transplantation lag zwischen 7 bis 823 Tagen (Mittelwert 345,86 Tage \pm 214,97).

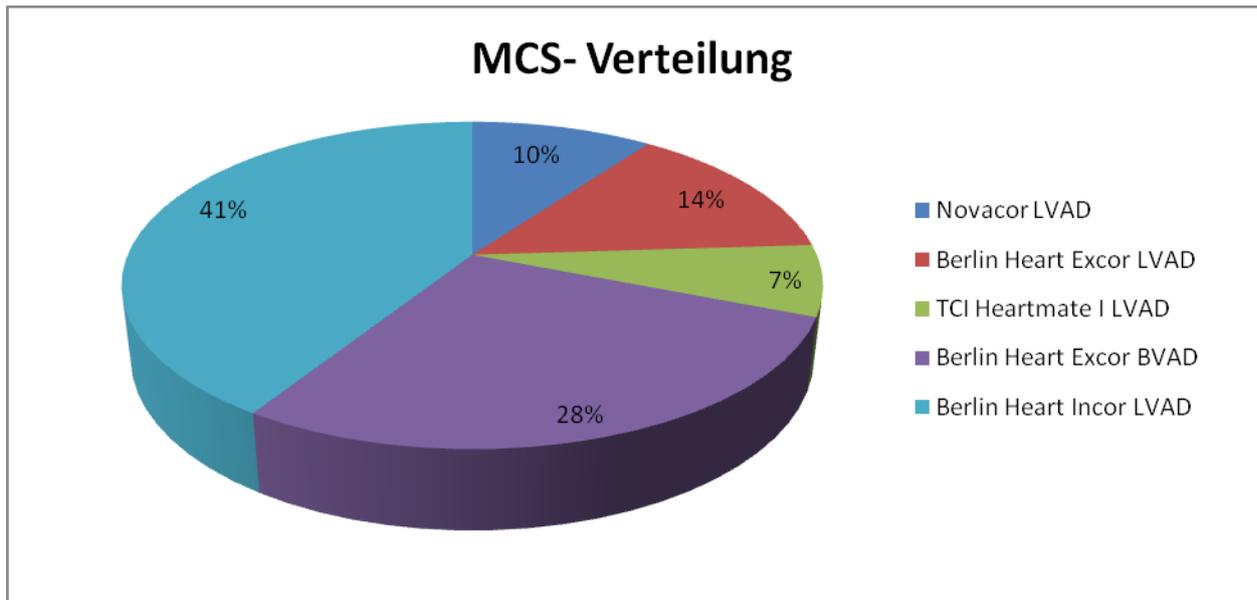


Abbildung 8: Prozentuale MCS- Verteilung der Gruppe III, Tortendiagramm

4.2. Statistische Auswertung der klinisch gesammelten Daten

Alle Variablen wurden zunächst auf die Gauß- Normalverteilung überprüft.

4.2.1. Geschlecht

Untersucht man, ob das Geschlecht der Gruppe I sich in ihrer Verteilung signifikant von den Gruppen II und III unterscheidet, dann ergibt sich mittels Chi- Quadrat- Test ein p- Wert von 0,517. Somit ist keine wesentlich Differenz in der Geschlechtsverteilung zwischen der unterschiedlichen Ausprägung der Kardiomyopathien erkennbar.

Auch bei der Gegenüberstellung von Gruppe II und Gruppe III errechnet sich keine Signifikanz, p- Wert von 0,32.

4.2.2. Alter

In der Altersverteilung zeigte sich, dass die Studienteilnehmer der Gruppe I durchschnittlich älter als die der Gruppen II und III waren ($p=0,41$).

4.2.3. BSA

Mittels T- Test wurde die Körperoberfläche (*Body Surface Area*, BSA) statistisch ausgewertet. Annähernd ähnliche Werte ließen sich nach der Formel

$$BSA (m^2) = ([Grösse(cm) \times Gewicht(kg)] / 3600)^{1/2}$$

kalkulieren.

Der durchschnittliche BSA der Gruppe I betrug 1,95 m², von der Gruppe II 1,93 m² und war damit größer als die der Gruppe III mit 1,81 m².

4.2.4. EF, LVEDD und FS

Wie bereits beschrieben, wurden die Gruppen zu Beginn der Studie echokardiographisch untersucht und die Messgrößen dokumentiert. Bei Gruppe II und III fanden weitere Untersuchungen nach MCS Implantation sowie nach Explantation bzw. vor Herztransplantation statt (Tabelle 20).

Gruppe	EF [%] (SA)	LVEDD [mm] (SA)	FS [%] (SA)
I	33,58 (±10,62)	67,23 (±8,99)	18,85 (±7,62)
II	15,50 (±4,02)	72,4 (±7,2)	6,17 (±3,92)
III	15,9 (±3,08)	78,60 (±10,8)	10,82 (±4,98)

Tabelle 20: Mittelwert und Standardabweichung (SA) von EF, LVEDD und FS zu Beginn der Studie.

Gruppe I und II

Meßwert	p- Wert
EF	0,001
LVEDD	0,154
FS	0,075

Tabelle 21: p- Wert für EF, LVEDD und FS, Gruppe I und II.

In der Ejektionsfraktion unterscheiden sich Gruppe I von Gruppe II mit einem p- Wert <0,05 (p- Wert von 0,001) signifikant, was die schwerer ausgeprägte, kardiale Dysfunktion verdeutlicht (Tabelle 21).

Gruppe I und III

Meßwert	p- Wert
EF	0,002
LVEDD	0,871
FS	0,160

Tabelle 22: p- Wert für EF, LVEDD und FS, Gruppe I und III.

Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied die EF betreffend mit einem p- Wert von $p = 0,002$ berechnet werden (Tabelle 22).

Gruppe II

Bei Explantation konnte im Vergleich zu den Messwerten vor Implantation echokardiographisch eine Verbesserung dokumentiert werden. Auch statistisch konnte die Herzerholung unter mechanischer Unterstützung mit p- Werten $<0,05$ belegt werden, so dass eine Explantation des MCS möglich war (siehe Tabelle 23).

	Gruppe II	p- Wert
EF [%] bei Implantation	15,50 ($\pm 4,0$)	$<0,001$
EF [%] bei Explantation	51,25 ($\pm 7,9$)	
LVEDD [mm] bei Implantation	72,40 ($\pm 7,20$)	$<0,001$
LVEDD [mm] bei Explantation	51,89 ($\pm 6,1$)	
FS[%] bei Implantation	6,17 ($\pm 3,9$)	0,018
FS [%] bei Explantation	33,50 ($\pm 19,5$)	

Tabelle 23: Signifikanz der klinisch messbaren Daten (LVEDD und EF) bei Implantation und Explantation.

4.2.5. Gegenüberstellung von Gruppe II und Gruppe III

Im Vergleich von BTR mit BTX Patienten zeigte sich die in Tabelle 24 aufgeführte Verteilung.

	Gruppe II	Gruppe III	p- Wert
Geschlecht [m:w]	19:1	25:4	0,32
Alter [y] bei Implantation	43,1 (±11,1)	45,9 (±11,9)	0,41
BSA[m²]	1,93 (±0,2)	1,81 (±0,6)	0,38
LVEDD [mm] bei Implantation	72,4 (±7,2)	78,6 (±10,8)	0,07
EF [%] bei Implantation	15,5 (±4,0)	15,9 (±3,8)	0,82
FS [%] bei Implantation	6,2 (±3,9)	10,8 (±5)	0,32
Pulsatile MCS	16 (80%)	16 (55%)	0,07
Biventrikuläre MCS	2 (10%)	9 (31%)	0,08
Tage am MCS	130,2 (±84,5)	345,9 (±214,9)	0,0004

Tabelle 24: Klinische Eigenschaften der untersuchten Patienten; Vergleich BTR zu BTX Kollektiv.

Bezüglich der Angaben zu Alter, Geschlecht und echokardiographischen Daten bei Implantation des MCS konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Für alle wurde ein p- Wert >0,05 berechnet. Insgesamt waren die Patienten der Gruppe III wesentlich länger am MCS (p- Wert= 0,0004), was durch die limitierte Zahl der vorhandenen Spenderherzen erklärbar ist (Abbildung 9).

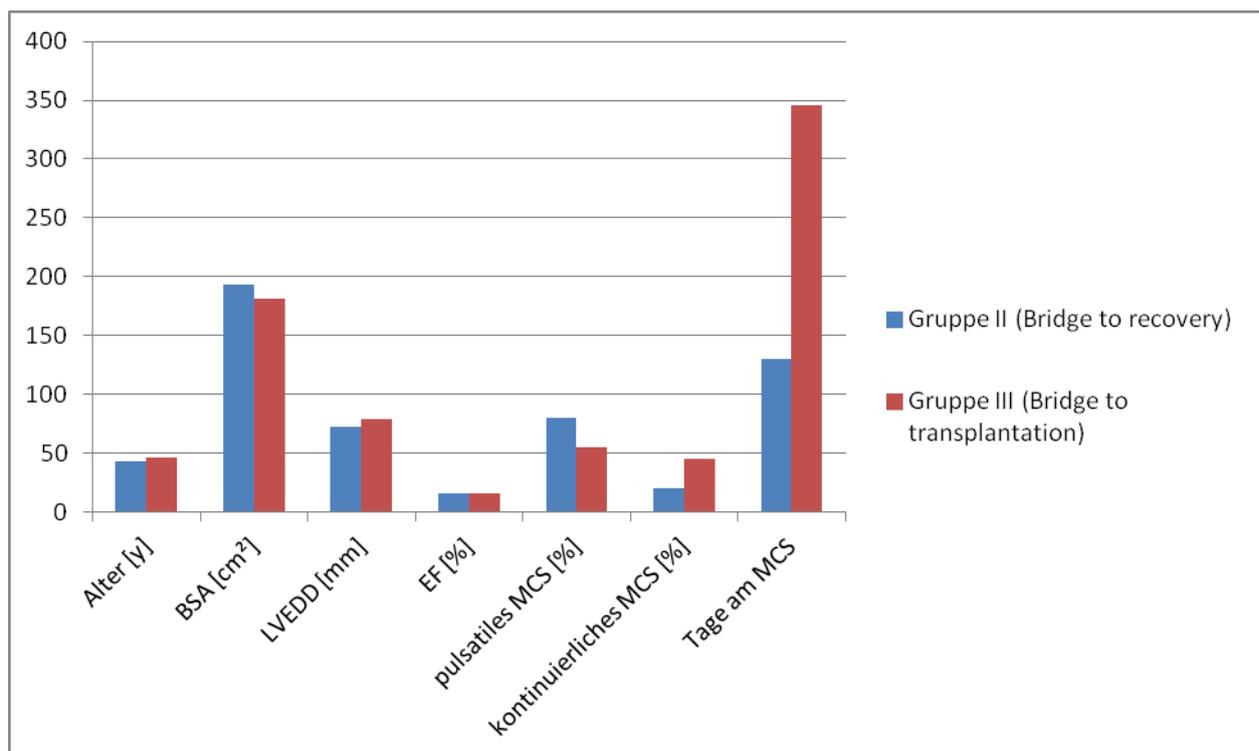


Abbildung 9: Diagramm über klinische Daten im Vergleich BTR zu BTX.

Versucht man die Verteilung von pulsatiler und kontinuierlicher Unterstützung zu vergleichen, so zeigt sich in Gruppe II eine Tendenz zur pulsatilen Unterstützung (80 %). In der Gruppe III gab es eine annähernd gleiche Verteilung von pulsatiler (55 %) und kontinuierlicher MCS (45 %) (siehe auch Abbildung 9). Weiter zeigte sich, dass prozentual die Mehrheit der Gruppe II ein LVAD (90 %) und nur 10 % ein BVAD implantiert bekommen hatte (Tabelle 25). Bei Gruppe III hatten währenddessen 72,4 % ein LVAD, die restlichen 27,6 % ein BVAD.

		Assisttyp		Gesamt
		LVAD	BVAD	
Gruppe II	Anzahl	18	2	20
	% innerhalb von Gruppe	90,0%	10,0%	100,0%
	% innerhalb der insgesamt eingesetzten Assisttyp	46,2%	20,0%	40,8%
Gruppe III	Anzahl	21	8	29
	% innerhalb von Gruppe	72,4%	27,6%	100,0%
	% innerhalb der insgesamt eingesetzten Assisttyp	53,8%	80,0%	59,2%
Gesamt	Anzahl	39	10	49
	% innerhalb von Gruppe	79,6%	20,4%	100,0%

Tabelle 25: Prozentuale Verteilung von LVAD versus BVAD.

Tabelle 26 gibt die Verteilung der eingesetzten MCS im Vergleich der Gruppen II und III wieder, siehe auch Abbildung 10.

MCS		Gruppe II, n=20 (prozentualer Anteil)	Gruppe III, n=29 (prozentualer Anteil)
LVAD	Novacor	12 (60%)	3 (10%)
	Berlin Heart Excor	1 (5%)	4 (14%)
	Heartmate II	1 (5%)	0
	Berlin Heart Incor	3 (15%)	12 (41%)
	TCI Heartmate I	1 (5%)	2 (7%)
BVAD	Berlin Heart Excor	2 (10%)	8 (28%)

Tabelle 26: Verteilung der unterschiedlichen Ventricular assist devices von Gruppe II und III.

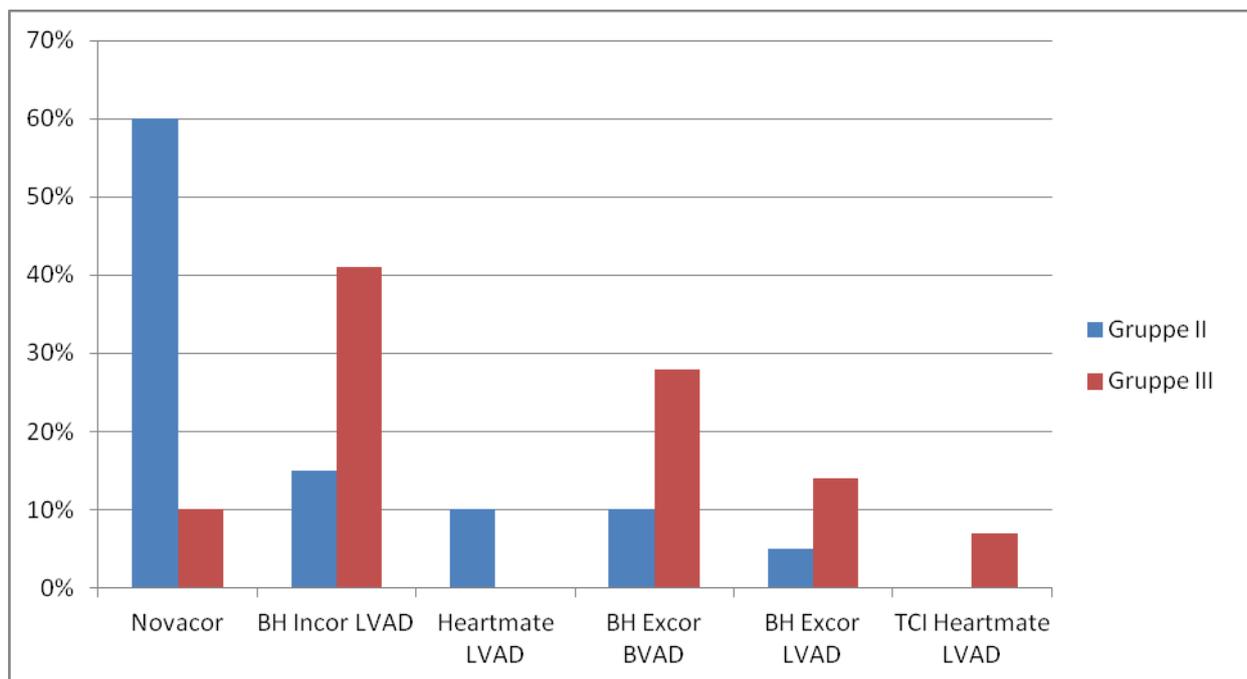


Abbildung 10: Balkendiagramm über prozentuale Verteilung der eingesetzten MCS in der Gruppe II und III, sowie den Patienten mit kurzfristiger Herzerholung.

Auch hier wird die Differenz zwischen den mit BTR und BTX deutlich. Wie in *Pulsatiler versus kontinuierlicher Flow* beschrieben, konnte unter pulsatiler Unterstützung in der Vergangenheit im Vergleich zu kontinuierlichen Geräten ein kleinerer enddiastolischer

Durchmesser gemessen werden, was eventuell einen positiven Effekt auf die Herzerholung haben und als erster Hinweis auf eine Herzerholung gewertet werden könnte. Anhand der Indikationsstellungen lässt sich ein Wegweiser für eine bzw. keine Herzerholung vermuten. Jedoch muss dies in weiteren Untersuchungen repliziert werden.

4.3. Genetische Analyse

4.3.1. PCR- Optimierung

Zunächst erfolgte die Optimierung der Annealingtemperatur für die PCR mit Hilfe des Gradientencyclers. Der Temperaturgradient wurde auf 54 - 67°C eingestellt. Eine optimale Annealingtemperatur von 58°C wurde ermittelt.

Im folgenden Arbeitsschritt wurde die DNA des Kollektivs eingesetzt und amplifiziert (Abbildung 11).

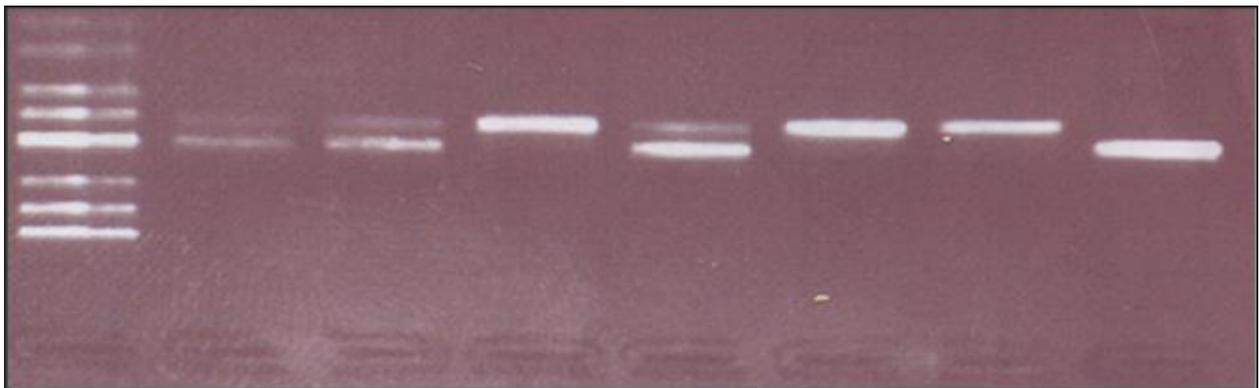


Abbildung 11: Elektropherogramm nach PCR im Gradientencycler; ganz links ist die Basenleiter des Molekulargewichtsmarkers VIII zu sehen, rechts davon das PCR- Produkt.

4.3.2. Sequenzanalyse

Das Sequenzierprodukt wurde mit Software Sequencher TM ausgewertet und danach in Elektropherogrammen dokumentiert.

Anschließend wurden die in Elektropherogrammen dargestellten Sequenzdaten mit den Referenzsequenzen des CTGF- Fragments aus www.ensembl.org verglichen.

4.3.3. Sequenzdaten der Gruppe I

Um die Prävalenz des CCN2_c.-945 C>G Polymorphismus bei Patienten mit Herzinsuffizienz, bei denen kein ischämischer Ursprung vorliegt, zu untersuchen, wurden 314 Patienten mit iDCM auf c._945 C>G genotypisiert. Diese wurden bei der folgenden Auswertung als Kontrollgruppe herangezogen. Nach der Sequenzanalyse zeigte sich eine ähnliche Verteilung, wie sie bereits in der Studie von Fonseca et al. bei 500 Kontrollpersonen auftrat⁵⁵ (Tabelle 27). Graphisch wird dies in dem Balkendiagramm der Abbildung 12 dargestellt.

CCN2_c.-945	Referenzwert (n=500)	Gruppe I (n=314)
C/C	138 (27,6%)	71 (22,6 %)
C/G	266 (53,2 %)	146 (46,5 %)
G/G	96 (19,2%)	97 (30,9 %)

Tabelle 27: Prävalenz des CCN2_c.-945C>G Polymorphismus der Gruppe I im Vergleich zu einem Referenzwert (Fonseca et al.) der allgemeinen Bevölkerung.

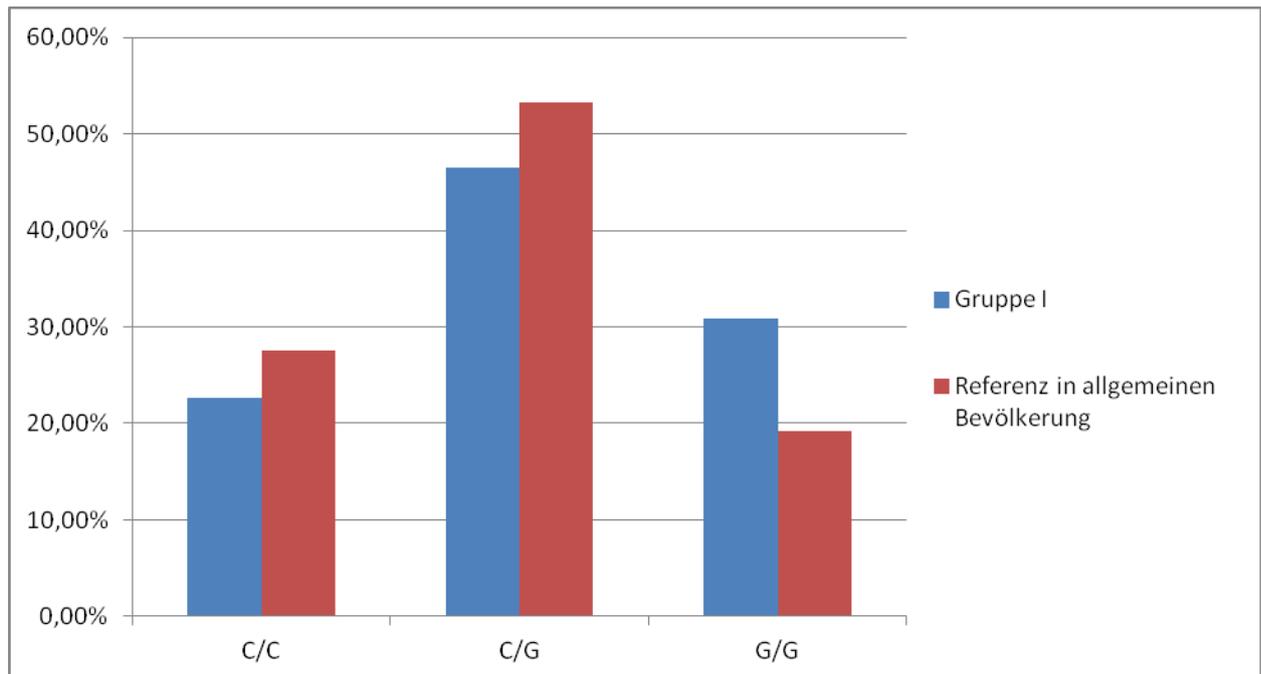


Abbildung 12: Balkendiagramm über die Allelprävalenz von Gruppe I im Vergleich zu dem Referenzwert (aus Fonseca et al.).

4.3.3.1. Sequenzdaten der Gruppe II

Die Genotypisierung der Gruppe II zeigte eine differierende Verteilung im Vergleich zu der Gruppe I (siehe auch Tabelle 27). Fünf Personen der Gruppe, die ein *Reverse Remodeling* aufwiesen, waren homozygot für das C- Allel (25 %). Ebensoviele waren heterozygot mit dem Genotyp C/G (25 %). Für die restlichen zehn (50 %) wurde ein homozygotes G-Allel dokumentiert (Tabelle 28).

CCN2_c.-945	C/C	C/G	G/G
Gruppe II (n=20)	5 (25%)	5 (25%)	10 (50%)

Tabelle 28: Allelverteilung der Gruppe II.

Bei den insgesamt sieben Patienten (35 %) der Gruppe II mit einem Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz (siehe auch Gruppe II) wurden folgende in Tabelle 29 aufgelisteten Genotypen dokumentiert.

	Genotyp
Individuum A	C/C
Individuum B	G/G
Individuum C	G/G
Individuum D	C/G
Individuum E	G/G
Individuum F	C/C
Individuum G	G/G

Tabelle 29: Genotyp der sieben Patienten, bei denen eine Herzinsuffizienz wieder auftrat.

Prozentual ergab sich folgende in Tabelle 30 aufgeführte Verteilung im Vergleich zur Gruppe II gesamt:

CCN2_c.-945	C/C	C/G	G/G
Gruppe II (n=20)	5 (25 %)	5 (25 %)	10 (50 %)
Patienten mit wiederaufgetretener Herzinsuffizienz der Gruppe II (n=7)	2 (28,57 %)	1 (14,29 %)	4 (57,14 %)

Tabelle 30: Häufigkeit der Allelfrequenz der Patienten (n= 7), bei denen es nach einer Explantation des MCS wegen Herzerholung zu einer wiederaufgetretenen Herzinsuffizienz kam, im zu der gesamten Gruppe II (n= 20).

Im Vergleich zeigt sich, dass der GG- Genotyp am häufigsten bei beiden vertreten war.

4.3.3.2. Sequenzdaten der Gruppe III

Die Mehrheit der Patienten mit BTX (Gruppe III) hatte ein C/G-Allel (51,7 %). Insgesamt 82,8 % machten die Patienten mit C/G- und C/C- Genotyp aus, nur die restlichen 17,2 % hatten zwei G-Allele im Vergleich zu 50 % bei der Gruppe II mit BTR (siehe Tabelle 31).

		Genotyp			Gesamt
CCN2_c.-945		CC	CG	GG	
Gruppe II	Anzahl	5	5	10	20
	% innerhalb der Gruppe II	25,0 %	25,0 %	50,0 %	100 %
Gruppe III	Anzahl	7	17	5	29
	% innerhalb der Gruppe III	24,1 %	58,6 %	17,2 %	100 %
Gesamt	Anzahl	12	22	15	49
	% innerhalb der Gruppen II und III	24,5 %	44,9 %	30,6 %	100 %

Tabelle 31: Häufigkeit der Allelfrequenz der Gruppe II und III.

Abbildung 13 verdeutlicht diesen Unterschied. Die G/G- Allelfrequenz scheint auf eine Assoziation mit einer Herzerholung hinzuweisen. Jedoch dominiert dieser Genotyp auch in der Gruppe mit Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz, somit ist eine hinreichende Aussage über eine Langzeiterholung nicht möglich.

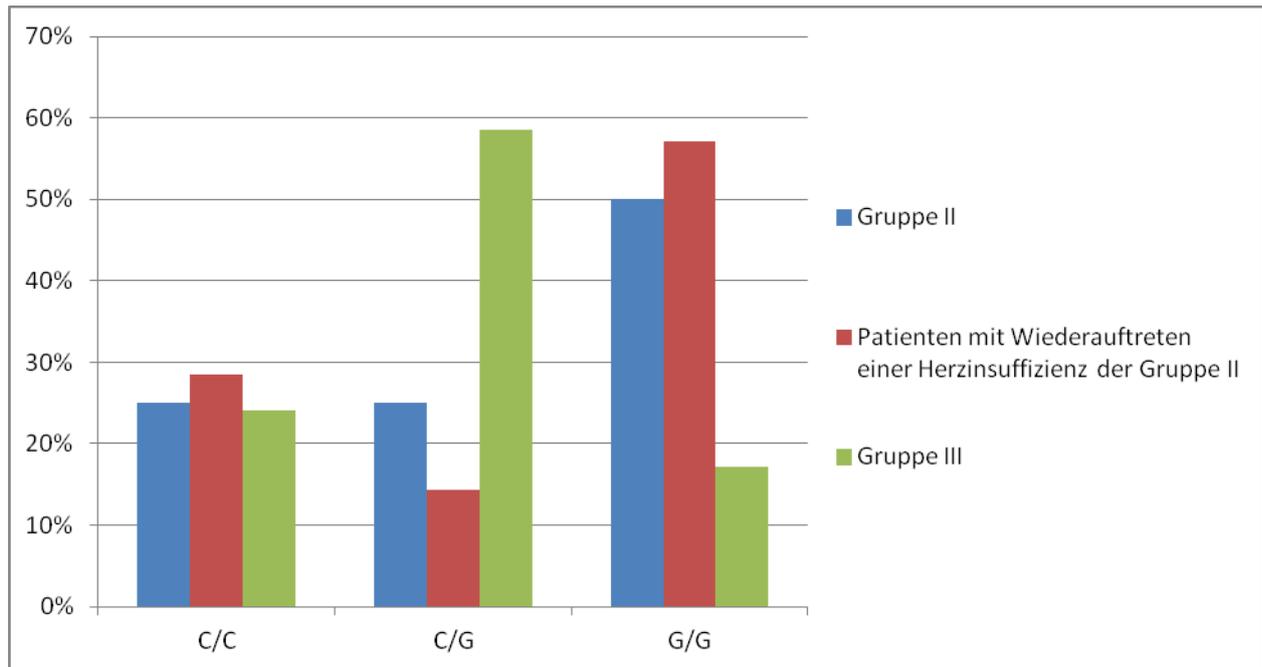


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Allelfrequenz bezogen auf die Zahl der jeweiligen Gruppe, Vergleich Gruppe II mit Patienten mit Wiederaufgetretener Herzinsuffizienz und Gruppe III.

4.3.4. Restriktionsverdau

Zur schnellen und sicheren Bestätigung der Varianten wurde ein Restriktionsverdau mit dem geeigneten Restriktionsenzym Mnl1 durchgeführt, welches mittels Sequencher Software identifiziert werden konnte. Restriktionsenzyme agieren wie ‚molekulare Scheren‘. So hat Mnl1 in der CTGF-945 C>G-Variante eine genau definierte Schnittstelle: Die G- Variante wurde geschnitten, wodurch im Agarosegel zwei Fragmente entstehen (120 bp und 93 bp). Da diese sich nur durch 27 Basenpaare unterscheiden und somit fast gleich groß sind, erschien in der Kontrollphotodokumentation nur eine Bande. Das Wildtypallel wird nicht geschnitten und hat damit ebenfalls nur eine Bande mit 213 bp. Das bedeutet, dass man bei dem homozygoten Wildtyp (CC) nur eine Bande mit 213 bp sieht (Abbildung 14; Bande 1). Beim heterozygoten (CG) Typ erscheinen zwei Banden mit 213 bp und 120 bzw. 93 bp (siehe Abbildung 14 Bande 3), während bei homozygoten Variante (GG) eine kleine Bande von 120 bzw. 93 bp (siehe Abbildung 14 Bande 2 und 4) vorliegt.

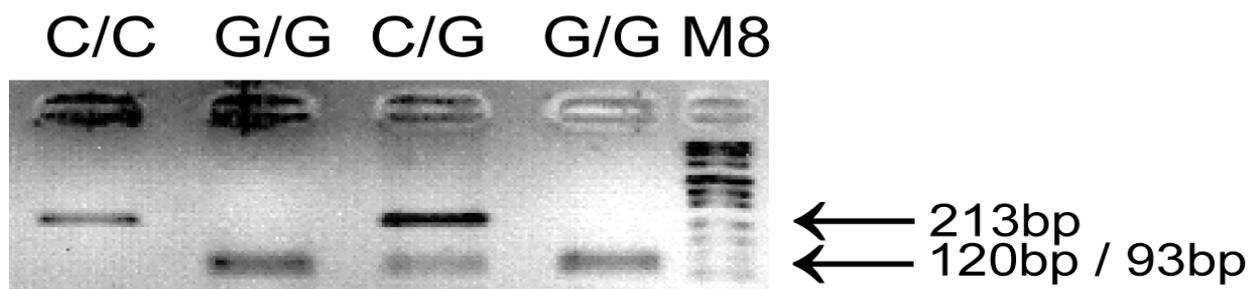


Abbildung 14: Photodokumentation des Restriktionsverdau (1. CC- Wildtyp (213bp); 2. und 4. GG-Variante (120bp/93bp); 3. CG heterozygot (213bp und 120bp/93bp)).

Somit konnten die genetischen Varianten durch ihre unterschiedlichen Schnittstellen für das Restriktionsenzym Mnl1 unterschieden und dadurch schnell und sicher bestätigt werden.

4.4. Statistische Auswertung der genetischen Analyse

Stellt man die Ergebnisse der Genotypisierung von der Gruppe I mit milder iDCM jenen gegenüber, die eine mechanische Unterstützung benötigten (Gruppe II und III), dann wird deutlich, dass sich die zwei Parteien bezüglich der Allelprävalenz nicht unterscheiden. Statistisch wird dies belegt durch den Chi- Quadrat- Test. Es ergab sich ein p- Wert von $p > 0,05$ und damit keine Signifikanz (Tabelle 32).

CCN2_c.-945	Gruppe I (n= 314)	Gruppe II + III (n= 49)	X ² - Test
C/C	71 (22,6 %)	12 (24,5 %)	X ² = 0,04 p= 0,83
C/G	146 (46,5 %)	22 (44,9 %)	
G/G	97 (30,9 %)	15 (30,6 %)	

Tabelle 32: Chi- Quadrat- Test, Gruppe I im Vergleich zu den Patienten, die eine MCS benötigten (Gruppe II+III). Statistische Auswertung der Allelprävalenz mittels X² -Test.

Abbildung 15 stellt die ähnliche Verteilung der Allelprävalenz der Gruppe I im Vergleich mit Gruppe II und III graphisch dar.

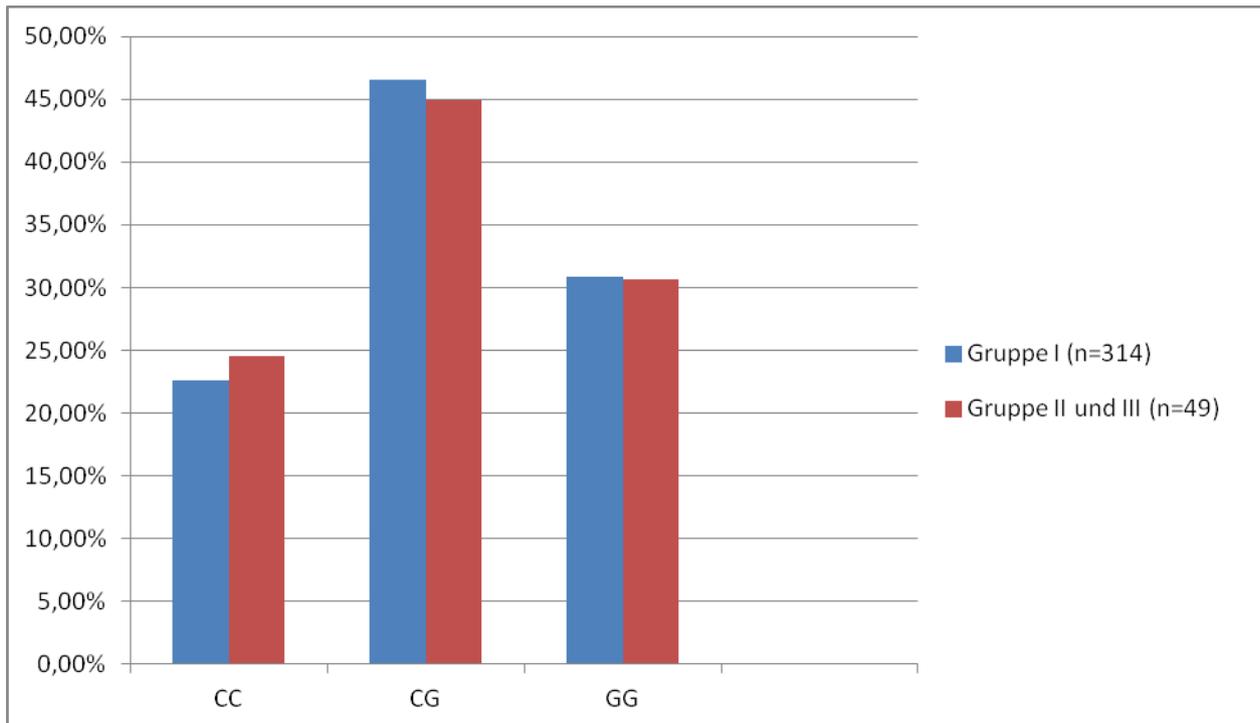


Abbildung 15: Diagramm über die prozentuale Verteilung der Allele.

Um zu beurteilen, ob die Variante mit der klinischen Herzerholung assoziiert ist, wurde die Genotypisierung der Gruppe II mit der Gruppe III verglichen. 50 % der Gruppe II, die am MCS ein Reverse Remodeling erfahren haben, war homozygot für das G- Allel, während es bei der Gruppe III nur 17,2 % waren (Tabelle 33). Im Chi- Quadrattest ergab sich mit $p= 0,03$ eine signifikanter Unterschied zwischen dem Genotyp der Gruppe II und dem der Gruppe III.

	Gruppe II (n= 20)	Gruppe III (n= 29)	p- Wert
Allelfrequenz			
CCN2_c.-945 C	15	31	0,12
CCN2_c.-945 G	25	27	
Dominant			
C/C	5	7	0,95
C/G+G/G	15	22	
Rezessiv			
C/C+C/G	10	24	0,03
G/G	10	5	

Tabelle 33: Statistische Auswertung der Genotypisierung, Vergleich Gruppe II mit III.

Dieser signifikante Unterschied stellt Abbildung 16 graphisch dar.

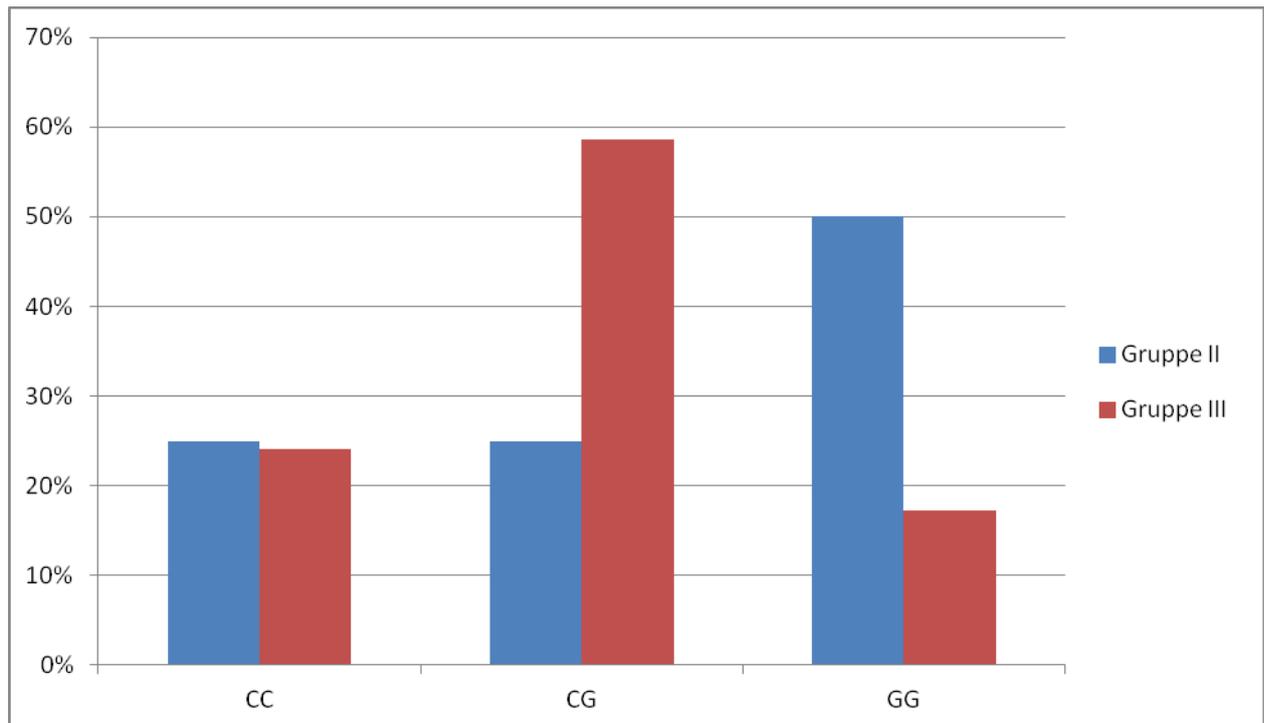


Abbildung 16: Balkendiagramm: Prozentuales Vorkommen der jeweiligen Allelfrequenz, Vergleich Gruppe II mit BTR zu Gruppe III mit BTX.

Mit dieser Signifikanz wurde eine Assoziation zwischen dem funktionellen Promotorpolymorphismus im CTGF- Gen und der Herzerholung am MCS bestätigt. Der homozygote Status der c.945 C>G Variante könnte folglich für eine Herzerholung unter MCS prädisponieren. Um diesen CCN2-SNP als Prädiktoren für ein *Reverse Remodeling* festzulegen, müssen weitere Studien das Ergebnis replizieren.

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Klinische Daten

Die Auswertung der klinisch gesammelten Daten zeigt in der Geschlechtsverteilung sowie dem durchschnittlichen BSA der drei Gruppen mit einem p -Wert $>0,05$ keinen signifikanten Unterschied (siehe auch *Geschlecht* und *Alter*). Wie in der aktuellen Literatur beschrieben, zeigte sich auch in dieser Studie, dass mehr Männer als Frauen an einer DCM leiden. Gruppe I war durchschnittlich bei Datenerhebung älter als Gruppe II und III.

Alter bei Implantation

Neben Krabatsch et al. wiesen auch Müller, Dandel, Birks und andere darauf hin, dass das Alter bei Implantation einen Einfluss auf eine myokardiale Erholung hat.^{56, 40, 44.} Für jüngere Patienten konnte ein Zusammenhang mit einer signifikant höheren Herzerholungsrate nachgewiesen werden. Weiter belegten Dandel et al. in einer Studie, dass das Alter eine prädiktive Aussage über eine Langzeitherholung nach Explantation ermöglicht.^{57.} Die vorliegende Studie unterstützt die Rolle des Alters bei Implantation auf eine Herzerholung. Gruppe II mit einem durchschnittlichen Alter von 43,1 Jahren (Standardabweichung $\pm 11,1$ Jahre) war jünger als die Gruppe III mit 45,9 Jahren (Standardabweichung $\pm 11,9$ Jahre). Jedoch ergab sich mit einem p -Wert von 0,41 keine Signifikanz für das Alter.

Echokardiographische Daten

Die durchschnittlich gemessene EF wies bei der statistischen Analyse eine Signifikanz auf; sowohl im Vergleich von Gruppe I und II, als auch Gruppe I und III wurde ein p -Wert kleiner als 0,05 ermittelt. LVEDD und FS unterschieden sich nicht wesentlich (p -Wert $>0,05$).

In der Gegenüberstellung von Gruppe II und III wurde eine wesentliche Differenz (p -Wert = 0,0004) zwischen den Studienteilnehmern bei der Zahl der Tage am MCS festgestellt. Erklärbar ist dies durch die längere Wartezeit auf ein Herztransplantat der Gruppe III, während die Explantation nach Verbesserung der Herzfunktion in der Gruppe II zeitlich unabhängig von äußeren Faktoren war.

Studienteilnehmer der Gruppe II hatten mit einer durchschnittlichen EF <20 % und einem LVEDD >70 mm vor Implantation einen Zustand erreicht, der die Intervention mit einem MCS notwendig machte. Während der finalen Pumpenstoppechokardiographie konnte durchschnittlich eine EF >50 % sowie LVEDD <55 mm gemessen werden. Mit p-Werten von <0,001 für EF und LVEDD vor Implantation bzw. Explantation konnte die signifikante Verbesserung der Herzfunktion dokumentiert werden. Auch das FS mit Mittelwerten von 6,17 % ($\pm 3,9$) vor Implantation und 33,50 % ($\pm 19,5$) vor Explantation des MCS wies eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,018 auf.

Seit März 2002 wird im Deutschen Herzzentrum Berlin nach standardisierten Kriterien eine Explantation nach Herzerholung durchgeführt. Diese beinhalten unter anderen eine LVEF ≥ 45 % sowie eine LVEDD ≤ 55 mm, da alleine bei diesen echokardiographischen Werten gute klinische Ergebnisse dokumentiert werden konnten.^{40, 58.}

Auch in dieser Studie zeigen sich die Resultate vorangegangener Studien bestätigt. Dandel et al. schlussfolgerte 2010, dass eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion ≥ 50 % bei Pumpenstopp mit einer Wahrscheinlichkeit von 91,7 % eine Stabilität der Herzfunktion innerhalb der nächsten fünf Jahre vorhersagbar macht.^{40.}

Pulsatile versus kontinuierliche Flusspumpen

Betrachtet man die Verteilung der gewählten mechanischen Unterstützungssysteme, so zeigt sich ein Unterschied zwischen Patienten mit BTR und BTX. In der Gruppe II hatte die Mehrheit eine pulsatile Unterstützung (80 %), während in der BTX Gruppe eine annähernd ähnliche Verteilung von pulsatilen (55 %) und kontinuierlich (45 %) fließenden Systemen vorlag. Andere Studien zeigten bereits Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen einer Herzerholung und einer pulsatilen Unterstützung⁵⁹, jedoch ist das Ausmaß des Einflusses bis heute ungeklärt. Ob der pulsatile Fluss des MCS nun eine prädiktive Aussage bezüglich einer Herzerholung möglich macht, wäre interessant zu eruieren. Da die kontinuierliche Unterstützung im Vergleich zu der pulsatilen deutliche Vorteile in punkto Lebensqualität und Handhabung besitzt, führt bereits dies zu einer Selektion der wahrscheinlichen Empfänger.

Neben anderen Faktoren hat das Alter bei Implantation einen Einfluss auf die ärztlich indizierte Geräteauswahl. Mit steigendem Alter scheint die Wahl zugunsten eines

kontinuierlich fließenden MCS auszufallen, wobei neben einer komplikationsloseren Implantation die vereinfachte Handhabung eine zentrale Rolle einnimmt.

Allerdings erfasste Dandel et al 2011 in ihren Ergebnissen keinen Einfluss des Systems auf die Langzeiterholung.⁴⁰

Genotyp

Die genetische Analyse dieser Studie zeigt eine signifikante Assoziation zwischen dem c.-945 C>G Polymorphismus im CTGF- Gen und der Herzerholung unter mechanischer Unterstützung (siehe auch Tabelle 33). Im Einzelnen wurde ein Zusammenhang zwischen dem homozygoten G- Allel an der Stelle -945 und der Herzerholung erkennbar. Der Einfluss von CTGF auf die Zellproliferation und seine zentrale Rolle im Metabolismus der extrazellulären Matrix könnte ein möglicher Beleg für die Assoziation sein.

Die Allelfrequenz an Position -945 der 314 DCM Patienten (Gruppe I) hat eine ähnliche Verteilung wie jene, die in der SNP Datenbank hinterlegt worden ist (Tabelle 27). Die in dieser Arbeit ermittelte Prävalenz konnte in die bereits vorhandenen Daten eingegliedert werden. Bedacht werden muss, dass die Angaben über genetische Varianten in den Online- Datenbanken (z.B. Ensembl, NCBI, GeneCards, etc.) vor allem auf Ergebnisse größerer genetischer Populationsstudien (Human Genome Project, HapMap, etc.) beruhen, in welchen bislang teilweise nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl an Individuen (HapMap z.B.: n= 60) eingeschlossen werden konnten.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede (p- Wert 0,83) der Allelprävalenz bei Patienten mit milder DCM (Gruppe I) verglichen mit jenen, die eine mechanische Unterstützung nötig hatten (Gruppe II und III). Hieraus lässt sich schließen, dass sich kein Unterschied in der Verteilung der Allelprävalenz der Studienteilnehmer mit terminaler iDCM (Gruppe II und III) im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung findet.

Betrachtet man nun die Studienteilnehmer, die eine Herzerholung erfahren haben (Gruppe II), so zeigte sich eine Signifikanz gegenüber der Gruppe III mit BTX. In der Gruppe II waren 50 % der Patienten homozygot für das G- Allel, in Gruppe III ohne Herzerholung nur 17,2 %. Der Chi-Quadratstest ergab einen p- Wert von $p= 0,03$ (Tabelle 33).

Die G/G- Träger mit BTR waren durchschnittlich 59,6 Jahre alt und damit lagen sie deutlich über dem Durchschnittsalter der gesamten Gruppe II (43,1 Jahre). Insgesamt

vier Patienten mit Herzerholung waren an ein kontinuierlich fließendes Gerät angeschlossen. Darunter die drei Ältesten (56, 59 und 64 Jahre alt zum Zeitpunkt der Implantation) waren homozygot für das G- Allel. Der GG- Genotyp könnte möglicherweise bei geringerer ventrikulärer Entlastung unter kontinuierlicher Unterstützung mit einer erhöhten myokardialen CTGF- Expression kompensieren und somit eine kardiale Erholung bei älteren Patienten erleichtern. Allerdings sind hierfür weitere Untersuchungen nötig.

Mit dieser Arbeit konnte neues Licht in die funktionelle Diversität, die CTGF innehat, gebracht werden. Vor dem Hintergrund der relativ kleinen Anzahl an Patienten, die eine Herzerholung erfahren haben, ist eine Prädiktion derselben durch diese Signifikanz zurzeit noch nicht möglich.

Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz

Bei insgesamt sieben der 20 Studienteilnehmer, die eine Herzerholung erfahren haben (Gruppe II), wurde ein Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz beobachtet. Ein vorübergehender, erneuter Anschluss an ein MCS war nötig, gefolgt von entweder einer erneuten BTR oder einer BTX.

Gruppe II war durchschnittlich 130,2 Tage mit einer SA von $\pm 84,5$ Tagen an der ventrikulären Unterstützung angeschlossen. Subtrahiert man jene sieben mit Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz, so ergibt sich für die restlich 13 stabilen Patienten ein Mittelwert von 132,92 Tagen mit einer SA von $\pm 91,76$ Tagen am MCS. Im Vergleich zu den sieben männlichen Individuen A bis G, die im Mittel 121 Tage (SA $\pm 72,61$ Tage) an der mechanischen Unterstützung angeschlossen waren, bevor mit BTR eine Explantation durchgeführt worden ist, zeigt sich, dass letztere im Schnitt etwas weniger Tage am MCS verbracht haben. Ob die Dauer am MCS innerhalb der Gruppe, die eine Herzerholung erfahren haben, mit einer dauerhaften Herzerholung assoziiert ist, bleibt fraglich.

Zwischen 215 bis 3408 Tage hielt die Herzerholung an, bis erneut ein MCS implantiert werden musste. Sechs der Sieben hatten mit Novacor eine pulsatile mechanische Unterstützung. Einer war am Berlin Heart Incor angeschlossen und hatte einen kontinuierlichen Fluss.

Die Mehrzahl hatte einen GG- Genotyp (4 von 7, entspricht 57,1 %), zwei hatten eine CC-(28,6 %) und nur einer eine CG-Ausprägung (14,9 %). Die Verteilung der Merkmale

entspricht den gesammelten und evaluierten Daten der Gruppe II. Eine Interpretation sowie mögliche Rückschlüsse auf ein Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz sind aufgrund der kleinen Anzahl an Patienten nicht möglich. Es könnte spekuliert werden, dass der GG- Genotyp, die pulsatile Unterstützung sowie das männliche Geschlecht für einen Rückfall prädisponieren. Im Hinblick auf die Verteilung der Allelfrequenz, des Geschlechts und der mechanischen Unterstützungssysteme der Gruppe II scheint es sich jedoch nur um Erwartungswerte zu handeln, da der GG-Genotyp und die pulsatile Unterstützung am häufigsten in der Gruppe II vertreten waren.

Echokardiographisch wurde durchschnittlich eine LVEF von 16,4 % ($\pm 4,2$) und eine LVEDD von 71,4 mm ($\pm 3,4$) bei Implantation gemessen. Vor Explantation des MCS waren die Ejektionfraktion 48,3 % $\pm 8,2$ und der linksventrikuläre Durchmesser 52,1mm $\pm 8,2$. Vor Reimplantation waren die LVEF 35,7% $\pm 14,0$, LVEDD 62,3 mm $\pm 9,3$ im Mittel. Es ergaben sich signifikante Unterschiede, die eine nötige Implantation bzw. eine mögliche Explantation oder erneut nötige Reimplantation belegen (Tabelle 16).

Dandel et al. beschäftigte sich in ihrer Studie 2010 bereits damit, eine Langzeiterholung bzw. das Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz vorhersagbar zu machen. Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von 91,7 % erfassten sie bei Pumpenstoppwerten von einer LVEF ≥ 50 % eine Herzerholung, die über ≥ 5 Jahre nach Explantation andauerte. War zusätzlich der linksventrikuläre Durchmesser ≤ 55 mm, konnte die Prädiktion sogar auf 100 % gesteigert werden. Weiter waren Patienten, die mehr als 5 Jahre nach Explantation eine kardiale Stabilität vorwiesen, jünger. Außerdem war der Zeitraum der Herzinsuffizienz vor Implantation kürzer. Wurde bei Pumpenstopp eine LVEF < 45 %, ein LVEDD > 55 mm gemessen, konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem Wiederauftreten einer Herzinsuffizienz gerechnet werden.⁴⁰ Die hier erfassten durchschnittlichen Werte befinden sich demnach gerade grenzwertig oberhalb des Bereichs, der von Dandel et al. mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eines Wiederauftretens einer Herzinsuffizienz assoziiert wurde. Jedoch zeigte sich eine deutliche Tendenz im Vergleich zu den allgemein in Gruppe II erfassten Daten, die eine LVEF > 50 % und LVEDD < 55 mm beinhalten. Somit erscheint die These von Dandel et al. durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

5.2. Ergebnisse im Kontext des gegenwärtigen Wissenstandes

Bei terminaler Herzinsuffizienz stellt eine Herzerholung unter MCS eine Alternative zu einer Herztransplantation dar. Vorangegangene Untersuchungen wiesen eine geringere Mortalität als nach Herztransplantation auf.⁶⁰ Bisher wurde jedoch immer nur über eine kleine Anzahl an Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz berichtet, die nach mechanischer Herzunterstützung eine Verbesserung der Herzfunktion erfahren haben.⁵⁷ Neben dem geringen Maß an Herzfunktionsverbesserung, welche unter mechanischer Unterstützung dokumentiert werden konnte, führt hauptsächlich das begrenzte Wissen über die Vorhersagbarkeit einer Herzerholung bzw. Langzeiterholung zu der kleinen Zahl an durchgeführten Explantationen von Flusspumpen. Die Erforschung der Prädiktion bzw. des komplexen Mechanismus der Herzerholung ist sinnvoll, um die Therapiemöglichkeiten voll auszunutzen. Eine Herzerholung wird häufiger bei nicht ischämischer Herzinsuffizienz dokumentiert. Ursächlich ist hierfür die koronare Herzerkrankung, die die häufigste Ursache für eine ischämische Herzinsuffizienz darstellt. Akut kann diese im Rahmen eines Myokardinfarktes oder einer sehr ausgedehnten Ischämie durch einen irreversiblen Gewebsuntergang zu einer Herzinsuffizienz führen. Nach ausgedehnten bzw. wiederholten Herzinfarkten und chronischen Anpassungsvorgängen kann dies in eine chronische Linksherzinsuffizienz münden oder aufgrund der diffusen Schädigungen des Herzmuskels als ischämische Kardiomyopathie imponieren.⁶¹ Diese Studie beschränkte sich auf an iDCM erkrankte Patienten.

Viele experimentelle Denkansätze beschäftigten sich in den letzten Jahren mit den molekularen Veränderungen, welche unter ventrikulärer Entlastung auftreten.³⁵ Bekannt ist, dass das *Reverse Remodeling* mit spezifischen Veränderungen wie der unterschiedlichen Expression von Serummarkern, der Kalziumhomöostase und echokardiographischen Parametern (siehe Zusammenfassung der Ergebnisse, echokardiographische Daten) einhergeht.^{26, 62, 48} Birks et al stellten bereits 2005 fest, dass die zytoskelettalen Gene im Myokard bei Patienten mit BTR im Vergleich zu BTX unterschiedlich reguliert werden.⁴⁸ Jedoch konnte die Frage, ob ein spezifisches genetisches Profil für eine kardiale Erholung prädisponiert, nicht geklärt werden.

In dieser Studie wurde der CCN2_c.-945 Polymorphismus gewählt, um die Hypothese einer Assoziation zwischen Genotyp und klinischem Verlauf zu untersuchen. Das CCN2_c.-945 G- Allel führt zu einer signifikant erhöhten transkriptionellen Aktivität des

CTGF-Promotors. Die Prävalenz bei Gesunden ist hoch genug, um eine Fall-Kontroll-Studie bei der relativ kleinen Anzahl von Patienten mit Herzerholung unter mechanischer Unterstützung bzw. Transplantation zu ermöglichen. In dieser Studie fand sich keine wesentliche Allelfrequenz in der Patientengruppe mit milder DCM (Gruppe I) im Vergleich zu den von Gourh et al. bereits veröffentlichten Genotypen von über tausend Gesunden.⁶³ So erscheint die Variante selbst nicht für eine idiopathische DCM zu prädisponieren. Weiter wird CTGF in der aktuellen Literatur als Biomarker für eine kardiale Dysfunktion bei herzinsuffizienten Patienten diskutiert.⁶⁴ Es ist ein Protein der extrazellulären Matrix, welches von TGF- β induziert wird. Ein besonderes Merkmal ist das Auftreten seiner Überexpression bei fibrotischen Erkrankungen vieler Organe wie z.B. der Lunge, der Nieren, der Haut und des Herzens. Obwohl das Protein als profibrotischer Faktor gehandelt wird⁶⁵, existieren keine in vivo Studien, die diese Aussage bestätigen. Die profibrotischen und prohypertrophen Veränderungen⁶⁶, die während des *Remodeling*-Prozesses einer Herzinsuffizienz auftreten, werden hauptsächlich von TGF- β gesteuert. Panek et al haben 2009 einen Zusammenhang zwischen einer CTGF-Überexpression und einem vorübergehenden kardialen Schutz unter akuter Druckbelastung bewiesen. Auch konnten sie in diesem Kontext eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität für den Promotorbereich feststellen. Jedoch widersprachen sie der Aussage, dass CTGF profibrotische Eigenschaften besitze.⁵² Beim *Reverse Remodeling* zählt unter anderem die Myozytengröße zu den morphologischen Veränderungen, die mit der klinischen myokardialen Erholung assoziiert sind. Es konnte beobachtet werden, dass sich unter MCS die Myozytenhypertrophie normalisiert. Ahmed et al. belegten eine antihypertrophe Wirkung bei Überexpression von myokardialem CTGF und damit die Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion bei chronischer Druckbelastung, wodurch der Beginn der Herzinsuffizienz hinausgezögert wird.^{67, 68} Der Fibrosegrad zum Zeitpunkt der Implantation des MCS hat auf eine Herzerholung keinen Einfluss. Die Annahme, dass CTGF eine zentrale Rolle im *Remodeling*- und *Reverse Remodeling*-Prozess innehat, ist somit gerechtfertigt.

Die Auswertung dieser Untersuchung ergab für den GG- Genotyp bei dem Polymorphismus an der Stelle -945 eine signifikante Assoziation mit dem *Reverse Remodeling*.

5.3. Bewertung der Methodik

5.3.1. Bewertung des Studiendesign und der Patientenrekrutierung

Eine Assoziationsstudie liefert oft erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung bestimmter Begebenheiten und ist für die Erforschung von nicht-familiären Erkrankungen geeignet. Sie arbeitet nach folgendem Prinzip: Tritt ein Allel an einer bestimmten Stelle des Genoms öfter bei Individuen mit einer Erkrankung auf als bei einer gesunden, entsprechenden Kontrollgruppe, so wird angenommen, dass dieses Allel mit der Erkrankung assoziiert ist.

Das Ziel einer molekulargenetischen Assoziationsstudie ist demnach, solche Allele, die mit der Entstehung bzw. Entwicklung einer Erkrankung in Zusammenhang stehen, zu identifizieren. Dies erfolgt im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie beim Vergleich einer Patientengruppe mit einem gesunden Kollektiv.⁶⁹

In der Literatur wird der direkte kausale Wirkungszusammenhang jedoch kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde für eine deutsche Stichprobe ein Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Allele zwischen an iDCM erkrankten Patienten mit bzw. ohne Herzerholung unter MCS und Kontrollpersonen mit milder iDCM untersucht. Tritt das Markerallel signifikant häufiger bei Patienten mit Herzerholung auf, schließt man auf eine Assoziation zwischen Markerallel und der Krankheit.⁷⁰

Eine Limitierung bei der Durchführung von Assoziationsstudien ist, dass eine offensichtliche Assoziation nicht unbedingt kausal relevant sein muss. Eine dem Anschein nach vorhandene Assoziation kann möglicherweise auf einem statistischen Fehler beruhen, das heißt, dass bei einer genügend großen Menge an untersuchten Markern rein zufällig einer oder mehrere eine offensichtliche statistische Assoziation mit der Erkrankung zeigen.

Bei der vorliegenden Fragestellung konnte die Bedeutung von CTGF vorweg in der aktuellen Literatur bestätigt (siehe auch 5.2.) und somit die Wahrscheinlichkeit eines rein zufälligen Zusammenhanges minimiert werden. Weiter wurde hier das Kollektiv teilweise retrospektiv rekrutiert, da die Fallzahl der Patienten, die einer Herzerholung erfahren haben, weltweit gering ist. Dies ist möglich, da genetische Varianten stabile Parameter sind. In Berlin existiert mit dem Deutschen Herzzentrum Berlin eine bekannte und führende Herzklinik. Hier konnte auf eine der umfassendsten Blut- und Datenbanken zugegriffen werden, welche es ermöglichte, Patienten mit einzubeziehen, die schon vor Jahren eine Erholung bzw. Transplantation erfahren haben.

Die größte Einschränkung in dieser Arbeit ist trotzdem die geringe Zahl der eingeschlossenen Patienten; selbst weltweit konnten weniger als 100 an iDCM erkrankte Patienten dokumentiert werden, die eine Herzerholung unter MCS erfahren haben.

Sichere prospektive Merkmale, die auf eine Herzerholung nach MCS schließen lassen, konnten bislang nicht identifiziert werden. Klinische Prädiktoren könnten schwierige Entscheidungen über die Implantation bzw. Explantation eines MCS, sowie über den Klinikentlassungszeitpunkt erleichtern und zu einer Entlastung der Transplantationslisten führen. Neben klinischen Daten wie echokardiographischen Parametern³⁵ könnten genetische Varianten hierfür passende prospektive Indikatoren sein, die prädiktive Aussagen über eine Herzerholung möglich machen. Daher verdienen sie eingehendere Untersuchungen.

5.3.2. Bewertung des Versuchsaufbau

5.3.2.1. Wahl des CCN2-c.945 C>G Polymorphismus

Um einen geeigneten Prädiktor für die Herzerholung unter MCS zu ermitteln, wurden in der Vergangenheit bereits Untersuchungen durchgeführt. Neben echokardiographischen Daten²⁶ wurden auch signifikante Unterschiede die sarkomere Genexpression betreffend diskutiert. Ahmed et al. haben bereits einen Zusammenhang zwischen einer CTGF- Überexpression und einer antihypertrophen Wirkung hergestellt,^{67, 68} wobei bekannt ist, dass sich die Myozytengröße bei dem *Reverse Remodeling* normalisiert. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem CTGF- Polymorphismus an der Position -945, der zu einer Überexpression von myokardialem CTGF führt. Wahrscheinlich ist dies durch den Verlust von Bindungsmöglichkeiten für das Protein Sp3 erklärbar, welcher durch die C zu G-Substitution an Position -945 hervorgerufen wird.⁵⁵ Weiter ist die Prävalenz des Polymorphismus bei iDCM-Patienten hoch genug, um das klinische *Outcome* bei der relativ kleinen Zahl an Patienten am MCS zu untersuchen. Somit könnte eine Signifikanz aussagekräftig sein; daher erscheint die Wahl des CCN2_c.-945 gerechtfertigt.

5.3.2.2. Genetische Analysen

Die genetische Diagnostik einer DCM gestaltet sich schwierig. Neben dem heterogenen Ursprung dieser Erkrankung kommen erschwerend genetische, umweltbedingte und erworbene Faktoren hinzu, die sowohl positiv wie auch negativ untereinander agieren können.

Die Aufarbeitung der Blutproben und Genotypisierung erfolgte mittels PCR und sequenzspezifischen Primern nach Standard.⁷¹

Zur genetischen Mutationsanalyse stehen zahlreiche Methoden wie z.B. SSCP, RFLP, DGGE (denaturierende Gradientenelektrophorese), TTGE (Temporal temperature gradient electrophoresis), oder auch HA (Heteroduplexanalyse) zur Verfügung.⁷²

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem analytischen Restriktionsverdau (RFLP) das technisch einfachste Verfahren zum Nachweis eines veränderten Schnittmusters der DNA gewählt. Mittels Restriktionsenzym konnten hochspezifisch die bestimmten Basensequenzen erkannt und die DNA an dieser Stelle durchtrennt werden. Eine schnelle und sichere Bestätigung der genetischen Varianten konnte dadurch gewährleistet werden.⁷³

5.4. Schlussfolgerung

Eine Herzerholung während einer mechanischen Unterstützung ist eine potentiell erfolgreiche Option für Patienten mit iDCM. Die Arbeitshypothese dieser Studie konnte bestätigt werden, da ein funktioneller Promotorpolymorphismus in dem für CTGF kodierenden Gen gefunden wurde, der überrepräsentiert war bei Patienten mit kardialer Erholung unter MCS. Die c.-945 SNP Untersuchung ergab eine Signifikanz, welche eine prädiktive Aussage über die Herzerholung während mechanischer Unterstützung denkbar, jedoch derzeit noch nicht möglich macht. Eine Hauptlimitierung dieses Ergebnisses besteht in der geringen Anzahl an Patienten mit *Reverse Remodeling*. Auch muss berücksichtigt werden, dass die dem Anschein nach vorhandene Assoziation auf einem statistischen Fehler beruhen könnte. Jedoch konnte eine Grundlage für weiterführende genetische Untersuchungen und damit ein Fortschritt im Wissensstand über die Herzerholung während mechanischer Unterstützung geschaffen werden. Zukünftig bedarf es der Replikation der Ergebnisse sowie weiterführender Untersuchungen bezüglich anderer genetischer Varianten. Gemeinsam mit klinischen

Daten könnte eine prädiktive Aussage hinsichtlich der kardialen Erholung unter MCS in Zukunft möglich sein.

Mit dieser Arbeit konnte ein kleiner Baustein im komplexen Gebäude der genetisch assoziierten Herzerkrankungen detektiert werden.

6. Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist weltweit zunehmend ein gesundheitliches Problem. Betroffen ist vorwiegend das männliche Geschlecht. Die DCM stellt die häufigste zugrunde liegende Erkrankung bei Patienten mit Indikation zur Herztransplantation dar. Therapeutisch kann zunächst medikamentös interveniert werden, jedoch ist häufig der Organschaden so groß, dass eine mechanische Herzunterstützung (*Mechanical circulatory support*, MCS) nötig wird, bis ein Spenderherz vorhanden ist. Unter MCS zeigte sich bei manchen Patienten eine Herzerholung, welche eine Explantation des Systems ermöglichte (*bridge to recovery*). Die molekularen Mechanismen dieser Herzerholung- dem sogenannten *Reverse Remodeling*- sind bislang allerdings ungeklärt. Das bei einer Herzinsuffizienz auftretende *Remodeling* ist gekennzeichnet durch eine kardiomyozytäre Hypertrophie, welche eine zentrale Rolle in der Herzerholung unter MCS einzunehmen scheint. Vorangegangene Studien zeigten, dass eine herzspezifische Überexpression an *connective tissue factor* (CTGF) zu einer kompensatorischen Hypertrophie von Kardiomyozyten führt.

Ziel dieser Arbeit war es nun die CTGF- Promotorvariante CCN2_c.-945 als prognostisches Mittel auf eine Assoziation mit der auftretenden Herzerholung unter MCS zu prüfen. Hierfür wurden zwischen 1994 und 2009 insgesamt 363 Patienten mit idiopathischer DCM an der Charité Universitätsmedizin Berlin und am Deutschen Herzzentrum Berlin rekrutiert.

Das Patientenkollektiv wurde in drei Gruppen unterteilt. Die Gruppe I besteht aus 314 Patienten mit idiopathischer DCM, die konservativ- medikamentös therapiert wurden. Die übrigen 49 Patienten benötigten eine mechanische Herzunterstützung. 20 von jenen wiesen eine Herzerholung auf und konnten mit BTR der Gruppe II zugeteilt werden. Die Gruppe III bildete sich aus den restlichen 29 Patienten mit *bridge to transplantation* bzw. *destination*. Die Gruppen II und III am MCS wurden für mindestens 12 Monate begleitet (im Durchschnitt für 8,5 Jahre).

Der CTGF- SNP wurde genotypisiert und die Prävalenz mit dem klinischen Outcome assoziiert. Die Ergebnisse der c.-945 C>G Allelfrequenz bei den 314 Patienten der Gruppe I stimmten mit denen, die bei der SNP-Datenbank hinterlegt waren, überein. Die Allelprävalenz betreffend unterschieden sich die Patienten mit milder DCM (Gruppe I) nicht von denen mit schwerer DCM (Gruppe II und III). 50 % der Patienten, die

erfolgreich vom MCS entwöhnt werden konnten (Gruppe II), waren homozygot für das G- Allel, in der Gruppe III nur 17,2 % ($p= 0,03$). Im Rahmen dieser Arbeit fanden wir einen funktionellen Promotorpolymorphismus, der für das CTGF- Gen kodiert, signifikant überrepräsentiert bei Patienten mit einer Herzerholung unter MCS, verglichen mit jenen Individuen ohne Besserung.

Ob der c.-945 G/G Genotyp als genetischer Prädiktor für die MCS vermittelte kardiale Regeneration angewendet werden könnte, muss in weiteren Studien bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Kannel WB. (2000). Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev.*5:167.
- 2 Levy D, Kenchaiah S, Larson MG et al. (2002). Longterm trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med.*347:1397-1402.
- 3 Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen (2009). Statistisches Bundesamt. Available at <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php>
- 4 Ahmed A, Aronow WS, Fleg JL. (2006). Higher New York Heart Association classes and increased mortality and hospitalization in patients with heart failure and preserved left ventricular function. *Am Heart J.*151(2):444-450.
- 5 Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ et al. (2001). More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail.*3(3):315-322.
- 6 Neumann T, Biermann J, Neumann A et al. (2009). Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte – Medizinische und ökonomische Aspekte. *Dtsch Arztebl Int.*106(16):269-75.
- 7 Osterziel KJ, Perrot A. (2002). Molekularbiologische Grundlagen der Herzinsuffizienz und dilatativen Kardiomyopathie. *BNK- Persönliche Meinung.*
- 8 Maron BJ, Towbin JA et al. (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 113:1807-1816.
- 9 Maron BJ, Towbin JA, Thiemane G et al. (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 113(14):1807-16.

- 10 Elliott P, Andersson B, Arbustini E et al. (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of cardiologyworking group on myocardial and pericardial disease. *Europ Heart J.* 29:270-76.
- 11 Rakar S, Sinagra G, Linarda Di A et al. (1997). Epidemiology of dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal.*18:117-123.
- 12 Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ et al. (1989). Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 80:564-572.
- 13 Kortz TW, Spence MA. (1994).Genetics of essential hypertension.*American Journal of Medicine.* 8:77-84.
- 14 Michels VV, Moll PP, Fletcher A et al. (1992). The frequency of familial dilatative cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilatative cardiomyopathy. *N Eng J of Med.* 326:77-82.
- 15 Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ et al. (1989). Epidemiology of dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population- based study in Olmsted County, Minnesota. *Circulation.* 80:564-572.
- 16 Osterziel KJ, Hasselfeld S, Geier C et al. (2005). Familial dilated cardiomyopathy. *Herz.* 30:529-534.
- 17 Colombo MG, Botto N, Vittorini S et al. (2008). Clinical utility of genetic tests for inherited hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Cardiovasc Ultrasound.* 19;6:62.
- 18 Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ et al. (1999). Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 20:93-102.
- 19 Wynne J, Braunwald E. (1992).The cardiomyopathies and myocarditides. *Heart Disease, 4th Edition, Philadelphia, Saunders.*1394-1450.
- 20 Böttcher W, Alexi-Meskishvili VV und Hetzer R. (2000). Geschichtliche Entwicklung der extrakorporalen Zirkulation isolierte Organperfusion im 19. Jahrhundert. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefässchirurgie.*14(3):93-99.

- 21 Karl Landsteiner, 1930 ausgezeichnet mit dem Nobelpreis für die Entdeckung des ABO-Systems. Available at: http://www.uni-wuerzburg.de/ueber/universitaet_wuerzburg/wissenschaftsmeile_roentgenring/die_nobelpreistraeger/karl_landsteiner_1930/
- 22 Jay McLean 1916. Historische Entwicklung der Herzchirurgie. Available at: http://www.uniklinikum-regensburg.de/kliniken-institute/herz-thoraxchirurgie/Kardiotechnik/Herz_Lungen_Maschine/Historische_Entwicklung_/index.php
- 23 Alexi-Meskishvili VV, Potapov EV, Beyer EA et al. (1998). Nikolai Terebinski: a pioneer of the open valve operation. *Ann Thorac Surg*: 66(4):1440-3.
- 24 DeBakey ME. (1971). Left ventricular bypass pump for cardiac assistance. Clinical experience. *Am J Cardiol*: 27(1):3-11.
- 25 Michael DeBakey: Pioneer, innovator, miracle maker, samaritan. Available at: <http://www.wic.org/bio/debakey.htm>
- 26 Hetzer R, Weng Y, Potapov EV, et al. (2004). First experiences with a novel magnetically suspended axial flow left ventricular assist device. *Eur J Cardiothorac Surg*. 25(6):964-70.
- 27 Drews T, Jurmann M, Dandel M et al. (2008). Differences in pulsatile and non-pulsatile mechanical circulatory support in long-term use. *J Heart and Lung Transplant*. 27(10):1096-101.
- 28 Goldstein DJ. (2003) Worldwide experience with the MicroMed DeBakey Ventricular Assist Device as bridge to transplantation. *Circulation*. 108(Suppl 1):II272-7.
- 29 Frazier OH, Myers TJ, Westaby S, et al. (2003). Use of the Jarvik 2000 left ventricular assist system as a bridge to heart transplantation or as destination therapy for patients with chronic heart failure. *Ann Surg*. 237(5):631-7.
- 30 Griffith BP, Kormos RL, Borovetz HS et al. (2001). HeartMate II left ventricular assist system: from concept to first clinical use. *Ann Thorac Surg*;71(3 Suppl):S116-20.

- 31 Ramasamy N, Vargo R, Kormos R et al. (2000). Intracorporeal support: The Novacor left ventricular assist device. In Goldstein DJ, Oz MC, eds. Cardiac assist devices. Armonk, NY: Futura. 323-40.
- 32 Goldstein D. (2000). Intracorporeal support: Thermo cardiosystems ventricular assist devices. In: Goldstein DJ, Oz MC, eds. Cardiac assist devices. Armonk, NY: Futura. 307- 22.
- 33 Goldstein DJ, Oz MC, Rose EA. (1998) Implantable left ventricular assist devices. N England J Med. 339:1522-33.
- 34 Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA et al. (2009). Advanced heart failure treated with continuous- flow left ventricular assist device. N England J Med. 361(23):2241-51.
- 35 Hetzer R, Muller JH, Weng Y. (2001). Bridging to recovery. Ann Thorac Surg. 71(3 Suppl): S109-13;discussion S114-5.
- 36 Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ et al. (2001). Long- term use of left ventricular assist device for end- stage heart failure. N England J Med. 345:1435-43.
- 37 Kirklin JK, Naftel DC, Kormos RL et al. (2013) Fifth INTERMACS annual report: Risk factor analysis from more than 6,000 mechanical circulatory support patients. 23(2):141-156.
- 38 Wohlschlaeger J, Schmitz KJ, Schmid C et al. (2005). Reverse remodeling following insertion of left ventricular assist devices (LVAD): a review of the morphological and molecular changes. Cardiovasc Res. 68(3):376-386.
- 39 Potapov EV, Loforte A, Weng Y et al. (2008). Experience with over 1000 Implanted Ventricular Assist Devices. J Card Surg. 23(3):185-94.
- 40 Dandel M, Wenig Y, Siniawski H et al. (2011).Heart failure reversal by ventricular unloading in patients with chronic cardiomyopathy: criteria for weaning from ventricular assist devices. Eur heart J. 32:1148-1160.
- 41 Frazier OH, Benedict CR, Radovacevic B et al. (1996). Improved left ventricular function after chronic ventricular unloading. Ann Thorac Surg.62:675–682.

- 42 Mancini DM, Beniaminovitz A, Levin H et al. (1998). Low incidence of myocardial recovery after left ventricular assist device implantation in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 98:2328-9.
- 43 Mann DL. (1999). Mechanisms and models in heart failure: a combinatorial approach. *Circulation*. 100:999-1008.
- 44 Birks EJ, George RS. (2010) Molecular changes occurring during reverse remodeling following left ventricular assist device support. *J Cardiovasc Transl Res*. 3(6);635-42.
- 45 Miner EC, Miller WL. (2006). A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. *Mayo Clinic proceedings*.81(1):71-76.
- 46 Samuel JL, Bertier B, Bugaisky L et al. (1984). Different distributions of microtubules, desmin filaments and isomyosins during the onset of cardiac hypertrophy in the rat. *European journal of cell biology*.34(2):300-306.
- 47 Seidmann JG, Seidmann G. (2001). The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*.104: 557-67.
- 48 Birks EJ, Hall JL, Barton PJ et al. (2005). Gene profiling changes in cytoskeletal proteins during clinical recovery after left ventricular assist device support. *Circulation*. 112(9):157-64.
- 49 Baba HA, Stypmann J, Grabellus F et al. (2003). Dynamic regulation of MEK/Erks and Akt/GSK3 β in human end-stage heart failure after left ventricular mechanical support: myocardial mechanotransduction-sensitivity as a possible molecular mechanism. *Cardiovasc Res*.59:390-399.
- 50 Bruckner BA, Stetson SJ, Perez-Verida A et al. (2001). Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant*. 20(4):457-467.
- 51 Bruckner BA, Razeghi P, Setson S et al. (2004). Degree of cardiac fibrosis and hypertrophy at time of implantation predicts myocardial improvement during left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant*. 23:36-42.
- 52 Panek AN, Posch MG, Alenina N et al. (2009). Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection

against pressure overload. PloS One. 4:e6743. doi: 10.1371/journal.pone.0006743.

- 53 Ahmed MS, Gravning J, Martinov VN et al (2011). Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300(4):H1291-302.
- 54 Touvron M, Escoubet B, Mericskay M et al (2012). Locally expressed IGF1 propeptide improves mouse heart function in induced dilated cardiomyopathy by blocking myocardial fibrosis and SRF-dependent CTGF induction. *Dis Model Mech.* 5(4):481-91.
- 55 Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M et al. (2007). A polymorphism in CTGF promotor region asociated with systeic sclerosis. *N England J Med.* 357:1210-20.
- 56 Müller J, Wallukat G, Wenig YG et al. (1997). Temporary mechanical left heart support. Recovery of heart function in patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Herz.* 22(5):227-36.
- 57 Dandel M, Weng Y, Siniawski H et al. (2011). Heart failure reversal by ventricular unloading in patients with chronic cardiomyopathy: criteria for weaning from ventriculkar assist devices. *Eur heart J.* 32:1148-1160.
- 58 Dandel M, Wenig Y, Siniwaski H et al. (2008). Prediction of cardiac stability after weaning from left ventricular assist devices in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 118 (14 Suppl): S94-105.
- 59 Krabatsch T, Schweiger M, Dandel M et al (2011). Is bridge to recovery more likely with pulsatile left ventricular assist devices than with non- pulsatile flow-systems? *The Annals of thoracic surgery.* 91(5):1335-1340.
- 60 Taylor DO, Edwards LB; Boucek MM et al. (2007). The registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report. *Heart Lung Transplant.*26: 769-781.
- 61 Maybaum S, Mancini D, Xydas S et al. (2007). Cardiac improvement during mechanical circulatory support: a prospective multicenter study of the LVAD Working Group. *Circulation.*15:2497-2505.
- 62 Sodian R, Loebe M, Schmitt C et al. (2001). Decreased plasma concentration of brain natriuretic peptide as a potential indicator of cardiac recovery in patients

- supported by mechanical circulatory assist systems. *J Am Coll Cardiol.* 38:1942-1949.
- 63 Gourh P, Mayes MD, Arnett FC. (2007). CTGF polymorphism associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 358(3): 308.
- 64 Koitabashi N, Arai M, Niwano K et al. (2008). Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 10:373–379.
- 65 Lang C, Sauter M, Szalay G, Racchi G, Grassi G, et al. (2008) Connective tissue growth factor: a crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis. *J Mol Med.* 86: 49–60.
- 66 Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, et al. (2008). Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 370:274–278.
- 67 Ahmed MS, von Lueder TG, Graving JA et al. (2008). Connective tissue growth factor inhibits myocardial hypertrophy, elicits cardioprotective signaling, and preserves myocardial function in chronic heart failure. Available at: http://www.heartfailure.no/data/file/file_106.pdf.
- 68 Ahmed MS, Graving J, Martinov VN. (2010). Mechanisms of novel cardioprotective function of CCN2/CTGF in myocardial ischemia/ reperfusion injury. *AJP Heart.*10:1152.
- 69 Ehm MG, Nelson MR, Spurr NK. (2005). Guidelines for conducting and reporting whole genome/largescale association studies. *Hum Mol Genet.* 14(17):2485-2488.
- 70 Blanco R, Chakraborty R, Barton SA et al. (2001). Evidence of a sex- dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chilean Population. *Hum Biol.* 73(1):81-89.
- 71 Bunce M, Fanning GC, Welsh KI. ((1995). Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequenece- specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens.* 45:81-90.
- 72 Grompe M. (1993). The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet.* 5:111-117.

73 Pearson PL. (1985). Restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) and their use in mapping the human genome. *Prog Clin Biol Res.* 177:23-36.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Laura Allison Steinhoff geb. Thiemann, versichere eidesstattlich durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *Einfluss des CCN2-c_945 Polymorphismus auf die Herzerholung unter mechanischer Kreislaufunterstützung bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie* 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen den URM 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 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.

Ort, Datum, Unterschrift des Verfassers

Curriculum Vitae

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

Publikationsliste

Posch MG, Schmidt G, Steinhoff L et al. (2015). A promotor polymorphism -945C>G in the connective tissue growth factor in heart failure patients with mechanical circulatory support: a new marker for bridge to recovery? *Eur J Cardiothorac Surg.* 27;47(1):e29-33.

Posch MG, Thiemann L, Tomasov P et al. (2008). Sequence analysis of myozenin 2 in 438 European patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Med Sci Monit.* 14(7):CR372-374.

Danksagung

Danken möchte ich allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich

- Herrn PD. Dr. E. Potapov für die Übernahme der Betreuung sowie seine freundliche und tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.
- Herrn Dr. M. Posch für seine fachliche Betreuung und Vermittlung wichtiger Kontakte.
- Andrea Riese, die mir hilfsbereit zur Seite stand.
- meinem Mann und meinen Kindern.

Allen Patienten, die sich bereiterklärt haben, in dieser Studie teilzunehmen.