

Aus der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Campus Virchow Klinikum
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Bedeutung des löslichen (Pro)Reninrezeptors als
Biomarker
für Patienten mit Herzinsuffizienz**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Danilo Obradovic
geboren in Belgrad, Serbien

Datum der Promotion: 05.06.2016

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungen:	5
1. Einleitung:	7
1.a Definition der Herzinsuffizienz.....	7
1.b.Epidemiologie der Herzinsuffizienz	7
1.c. Die Ätiologie, das Krankheitsbild und die pathophysiologischen Aspekte der Herzinsuffizienz.....	8
2. Die Behandlungsstrategien der Herzinsuffizienz:	11
2.a. Medikamentöse Therapie:	11
2.b. Nicht-medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz	14
2.c. Prognose der chronischen Herzinsuffizienz	15
3.Biomarker als ein diagnostisches Mittel der Herzinsuffizienz.....	16
3.a. Die natriuretischen Peptide.....	16
3.b. Andere potenzielle Kandidaten	18
4.Das Renin-Angiotensin System	20
4.a.Lokales, gewebespezifisches Renin-Angiotensin System:	21
4.b. Der Proreninrezeptor	24
5. Zielstellung der Arbeit	34
6. Material und Methoden:	35
6.a. CIBIS-ELD Studie.....	35
6.b. Die Bestimmung von sPRR.....	39
6.c. Ethik.....	40
6.d. Statistische Auswertung.....	40
7.Ergebnisse	42
8.Diskussion:	58
9.Zusammenfassung.....	65
Literaturverzeichnis:.....	65
Abstrakt.....	72
Abstract.....	73
Eidesstattliche Versicherung.....	74
Lebenslauf.....	75
Publikationsliste.....	76
Danksagung.....	77

Abkürzungen:

HFREF- Die Herzinsuffizienz mit erniedrigter Ejektionsfraktion

HFPEF- Die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion

NYHA - New York Heart Association- Klassifikation

HZV – Das Herzzeitvolumen

AHA –American Heart Association

LVAD- Das linksventrikuläre Unterstützungssystem

ADH- Das antidiuretische Hormon

ACE – Das angiotensin konvertierendes Enzym

ARB – Der Angiotensin- Rezeptor Blocker

B-Blocker- Beta – Rezeptor Blocker

ANP- Das atriale natriuretische Peptid

BNP- Das B-Typ natriuretische Peptid (BNP)

ADM- Adrenomedullin

cAMP- Cyclisches Adenosinmonophosphat

PRR –Der Proreninrezeptor

sPRR- Der lösliche Proreninrezeptor

RAAS- Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

ANG I- Das Angiotensin I

ACE- Das Angiotensin-I-Converting-Enzym

ANG II- Das Angiotensin II

mRNA- Die Boten-RNA (englisch messenger RNA)

AT₁- Rezeptor- Der Angiotensin-Rezeptor I

AT₂- Rezeptor- Der Angiotensin-Rezeptor II

v-H⁺-ATPase- Die vakuoläre proton-transportierende ATPase

PLZF- promyelocytic zinc finger, transcription factor

TNF- α – Der Tumornekrosefaktor Alfa

TGF- β - Der transformierende Wachstumsfaktor- beta

LVDED- Der linksventrikuläre enddiastolische Diameter

LVSED- Der linksventrikuläre endsystolisch Diameter

IVS- Das intraventrikuläre Septum

PWD- Die posteriore Wand des linken Ventrikels

ROS- Die reaktive Sauerstoffspezies

EGFR- Der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor

CTGF- Der Bindegewebe-Wachstumsfaktor

GDF-15- Der Differenzierungswachstumsfaktor 15

1. Einleitung: Die aktuellen Aspekte der Herzinsuffizienz

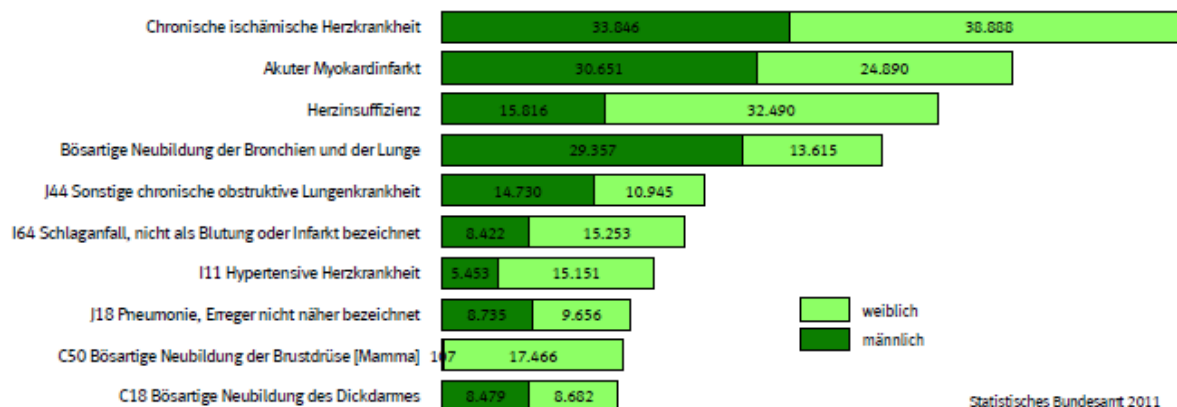
1.a Definition der Herzinsuffizienz

In den vergangenen fünfzig Jahre wurden zahlreiche Definitionen der Herzinsuffizienz postuliert. Allen Definitionen gemeinsam ist das Vorhandensein der typischen Symptome einer Herzinsuffizienz wie Luftnot, verminderte körperliche Belastbarkeit sowie Ödembildung¹. Die asymptomatischen morphologischen und funktionellen Veränderungen des Herzens werden als prädisponierende Faktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz angesehen und sind mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert. Ihre frühzeitige Entdeckung verbessert die Lebenserwartung und ermöglicht die frühzeitige adäquate therapeutische Intervention in diesem Patientenkollektiv².

Aus physiologischer Perspektive ist eine Herzinsuffizienz als ein Zustand definiert, bei dem das Herz nicht mehr in der Lage ist, den Organismus ausreichend mit Blut und damit nicht mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um einen ausgewogenen Stoffwechsel unter Belastungs- sowie unter Ruhebedingungen zu gewährleisten³.

1.b. Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in industrialisierten Ländern. Während im Alter von 45–55 Jahren weniger als 1% der Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind, leidet in der Altersgruppe der über 80-Jährigen fast jeder Zehnte an einer Herzinsuffizienz. Die Herzkrankheiten machten im Jahr 2011 in Deutschland 8,2% (1 554 381 Fälle) der im Rahmen der Krankenhausdiagnose-Statistik erfassten Krankenhausaufnahmen aus. Von diesen Diagnosen entfielen 57,5% auf Männer und 42,5% auf Frauen. Insgesamt gab es 464,7 Einweisungen pro 100 000 Einwohner auf Grund einer Herzinsuffizienz. Der Wert bei Männern lag um 4% unter dem der Frauen. In den vergangenen 10 Jahren ist die Hospitalisierungsrate in allen Krankenhäusern in Deutschland aufgrund einer Herzinsuffizienz um 159% gestiegen. Die Mortalität ist hierbei höher als bei den meisten Krebserkrankungen und liegt bei ca. 50% in den ersten 5 Jahren⁴. Abbildung 1. zeigt die häufigsten Todesursachen laut dem statistischen Bundesamt Deutschlands. In der Auswertung dieses Bundesamtes aus dem Jahr 2010 wird die Herzinsuffizienz an dritter Stelle der häufigsten Todesursachen genannt, nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt.



Die Abbildung 1. Die Todesursachen im Jahr 2010. Das Statistische Bundesamt Deutschlands.

1.c. Die Ätiologie, das Krankheitsbild und die pathophysiologischen Aspekte der Herzinsuffizienz:

Grundsätzlich werden zwei klinische Formen der Herzinsuffizienz definiert. Wir unterscheiden eine systolische Herzinsuffizienz mit reduzierter systolischer linksventrikulärer Funktion („heart failure with reduced ejection fraction“, HFrEF) sowie eine diastolische Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Funktion („heart failure with preserved ejection fraction“, HFpEF).

Ist die Kontraktionskraft des Myokards erniedrigt, so entwickelt sich eine Störung der systolischen Funktion. Bei der diastolischen Dysfunktion ist die Dehnbarkeit des Herzens erniedrigt bzw. die Entspannungsphase gestört. In der Folge ist die Fähigkeit des Herzens, sich bei einer normalen Frequenz zu füllen, beeinträchtigt.

Als Vorwärtsversagen bezeichnet man eine Verminderung des Herzzeitvolumens (HZV) mit folgendem inadäquatem Blutdruck und peripherer Minderperfusion (Low-output-failure). Die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ist vergrößert. Im Gegensatz dazu bedeutet ein High-output-failure eine mangelhafte Blut-Sauerstoff-Versorgung der Peripherie bei erhöhtem HZV. Ursachen können Anämie, Hyperthyreose oder arteriovenöse-Fisteln sein. Die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ist normal oder vermindert.

In der Abhängigkeit von der betroffenen Herzkammer unterscheiden wir zwischen Links-, Rechts- und Globalherzinsuffizienz.

Obwohl die ätiologischen Faktoren der systolischen Herzinsuffizienz sehr gut erforscht und erklärt sind, fehlt es an Einblicken in die pathophysiologischen Grundlagen der diastolischen Herzinsuffizienz ⁵.

Als die häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz sind arterielle Hypertonie und koronare Herzkrankheit bekannt. In Tabelle 1. sind weitere wichtige Ursachen einer Herzinsuffizienz aufgelistet. Nichtischämische Kardiomyopathien, medikamentös sowie toxisch bedingte Herzschädigungen sind bei der Diagnosestellung einer Herzinsuffizienz ätiologisch zu berücksichtigen.

Ursachen einer Herzinsuffizienz	
Koronare Herzerkrankung	vielfältige Manifestation (z. B. Myokardinfarkt, ischämische Kardiomyopathie)
Arterielle Hypertonie	oft assoziiert mit LV-Hypertrophie und erhaltener systolischer Pumpfunktion
Kardiomyopathie	dilatativ, hypertroph, restriktiv, arrhythmogen, rechtsventrikulär, unklassifiziert
medikamentös	Überdosierung von Betablocker, Calciumantagonisten, Antiarrhythmika, Chemotherapeutika
Toxine	Alkohol, Kokain, Spurenelemente (Kobalt, Arsen)
endokrinologisch	Diabetes mellitus, Hypo-/Hyperthyreose, Cushing-Syndrom, Nebenniereninsuffizienz, Akromegalie, Phäochromozytom
alimentär/metabolisch	Thiaminmangel, Selenmangel, Carnitinmangel, Adipositas, Kachexie
infiltrativ	Sarkoidose, Amyloidose, Hämochromatose, Bindegewebserkrankungen
andere	HIV-Infektion, peripartale Kardiomyopathie, terminale Niereninsuffizienz, Chagas-Krankheit

Tabelle 1. Die häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz (www.dgk.or)

Als Leitsymptome der chronischen Herzinsuffizienz sind Dyspnoe, verminderte körperliche Belastbarkeit, Ödeme, Orthopnoe und Nykturie bekannt. Das Kennzeichen der Krankheit ist eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes bei den betroffenen Patienten. Die Symptome der Herzinsuffizienz können nur diskret ausgeprägt sein und sind für sich allein genommen unspezifisch. Der Schweregrad von Symptomen korreliert nicht unbedingt mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz. Die meist gebrauchte Klassifikation zur Stadienklassifizierung der Herzinsuffizienz ist die NYHA- Klassifikation:

NYHA I- Beschwerdefreiheit unter Belastung und in der Ruhe

NYHA II- Leichte Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeiten

NYHA III- Deutliche Leistungseinschränkung, jedoch Beschwerdefreiheit in der Ruhe

NYHA IV- Beschwerden bereits in Ruhe. Permanente Dyspnoe

Als Ergänzung zur NYHA- Klassifikation haben sich einige weitere Klassifikationen in alltäglichen Umgang mit den Patienten etabliert, wie zum Beispiel die Einteilung der Herzinsuffizienz nach der American Heart Association (AHA). Diese Klassifizierung der Herzinsuffizienz

suffizienz beschränkt sich nicht nur auf deren symptomatischen Einteilung, sondern berücksichtigt Risikofaktoren sowie das Vorhandensein einer strukturellen Herzerkrankung:

Stadium A: Die Patienten mit hohem Risiko, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, da Faktoren vorliegen, die stark mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz assoziiert sind, keine strukturelle Herzerkrankung, noch nie Herzinsuffizienzsymptome.

Stadium B: Die Patienten struktureller Herzkrankheit, die eng mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz assoziiert ist, welche bisher keine Symptome einer Herzinsuffizienz aufweisen.

Stadium C: Die Patienten mit aktuellen oder anamnestisch angegebenen Herzinsuffizienz-Symptomen, welche einer strukturellen Herzkrankheit zuzuordnen sind.

Stadium D: Die Patienten mit einer fortgeschrittenen strukturellen Herzkrankheit und schweren Herzinsuffizienz-Symptomen trotz maximaler medikamentöser Therapie (spezielle Therapie erforderlich)

Das insuffiziente Herz verfügt über Kompensationsmechanismen, mit denen es versucht, ein ausreichendes Herzzeitvolumen aufrechtzuerhalten. Zu diesen Mechanismen gehören:

- Erhöhung der kardialen Frequenz sowie der Myokardkontraktilität, was durch Aktivierung des sympathoadrenergen Systems erreicht wird.
- Die ventrikuläre Hypertrophie, die durch chronische Belastung des Herzens entsteht. Eine Volumenbelastung führt zu einer exzentrischen Hypertrophie (mit Dilatation). Druckbelastung führt zu einer konzentrischen Hypertrophie (ohne Dilatation)
- Die Erhöhung der Vorlast, die über die Aktivierung der neuro-humoralen Regulationssysteme zustande kommt. Dabei wird das antidiuretische Hormon (ADH) ausgeschüttet und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert, was zur Wasser- und Natriumretention sowie Vasokonstriktion führt.

Diese Mechanismen sind jedoch begrenzt und führen letztendlich langfristig selbst zu einer Senkung des Herzzeitvolumens, zu einer Minderung der Kontraktionskraft oder zu einer Beeinträchtigung der diastolischen Funktion. Im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz führen die Kompensationsmechanismen zur Verschlechterung der hämodynamischen Situation und tragen auf diese Weise zur Entstehung eines Circulus vitiosus bei.

2. Die Behandlungsstrategien der Herzinsuffizienz

2.a. Medikamentöse Therapie:

Die grundlegende Strategie besteht in der Verlangsamung der Progression der Erkrankung durch Entlastung des Herzens in Form einer Senkung der Vor- und Nachlast. Weiterhin sind die Vorbeugung von Rhythmusstörungen, eine Verbesserung der Inotropie, eine Kontrolle der übermäßigen neuro-humoralen Stimulation sowie eine Vermeidung der pathologischen Umbauprozesse des Myokards vorrangig. Durch eine konsequente Therapie sollen die Progression der Erkrankung gestoppt und die Hospitalisierungsrate sowie die Letalität gesenkt werden. Gleichzeitig sollen die Symptome gemildert und die Lebensqualität verbessert werden.

Weil die Patienten mit Herzinsuffizienz erhöhte Serum- und/oder Gewebekonzentration von Noradrenalin, Angiotensin II, Aldosteron, Endothelin und Zytokinen aufweisen, setzen die aktuellen Leitlinien den Schwerpunkt der Behandlung dieser Patienten auf die Blockierung neuro-humoraler Kompensationsmechanismen. Abbildung 2 zeigt aktuelle Empfehlungen zur medikamentösen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz.

ACE-Hemmer blockieren durch Hemmung des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) die Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II, und den Abbau von Kininen. Durch diese Wirkungen kommt es einerseits zur Senkung von Vor- und Nachlast und andererseits zu einer Ausscheidung von Natrium durch eine Verbesserung der renalen Perfusion. Die gleichzeitige Hemmung des intrakardialen Renin-Angiotensin-Systems (RAAS) vermindert die ventrikuläre Hypertrophie und Fibrose. Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass durch die Gabe von ACE-Hemmern bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz eine Verlängerung der Überlebensrate, eine Verbesserung der Symptome und eine Verzögerung der Progression registriert werden konnte. Falls keine Kontraindikation oder Intoleranz gegenüber ACE-Hemmern besteht, ist diese Medikamentenklasse bei allen Patienten mit der symptomatischen Herzinsuffizienz die Therapie der ersten Wahl.

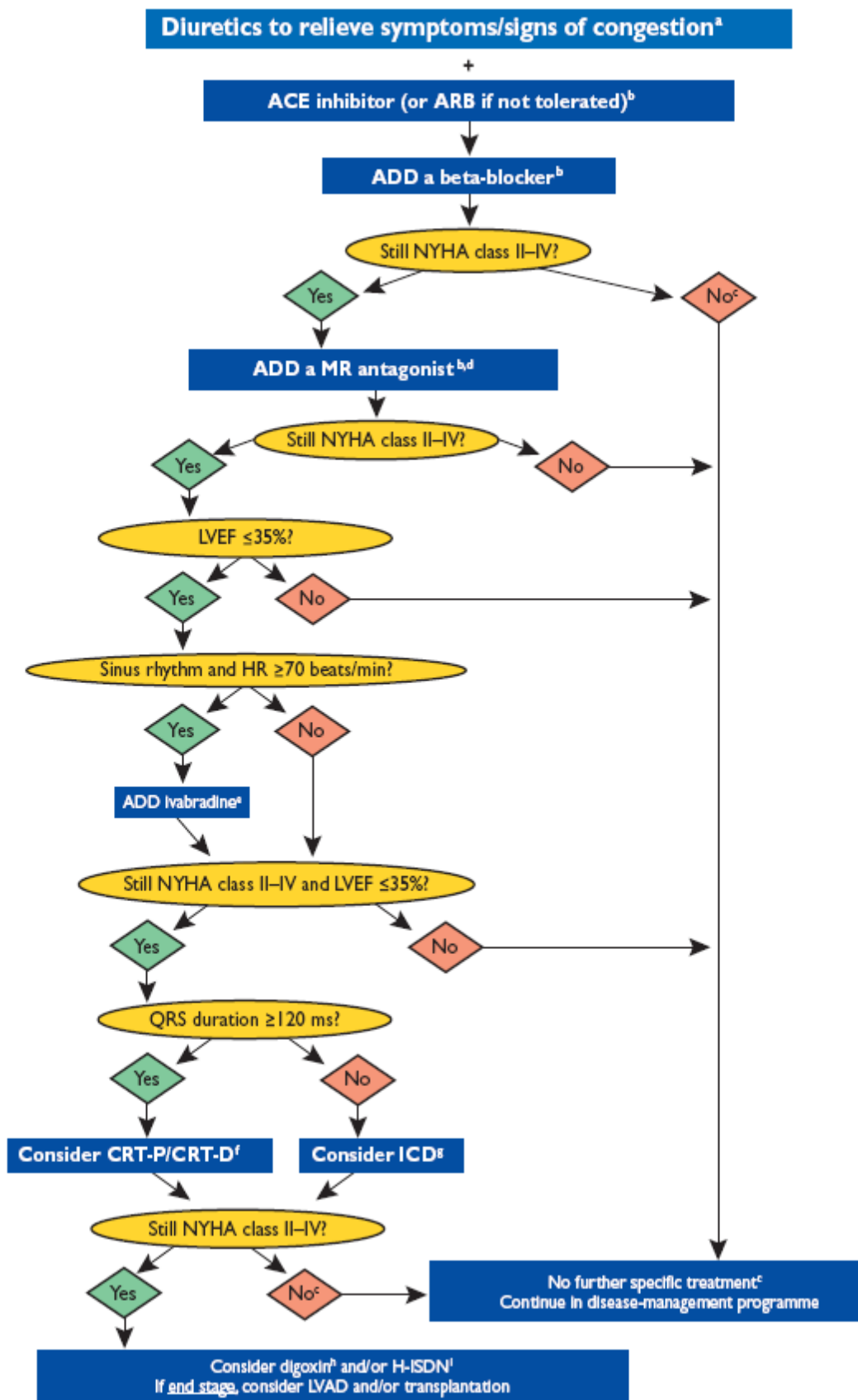


Abbildung 2. Eine Übersicht über die aktuellen Empfehlungen zur Therapie der Herzinsuffizienz ⁶

Mehrere große prospektive, randomisierte klinische Studie an Patienten mit verschiedenen Stadien der chronischen Herzinsuffizienz konnten eine prognostische Relevanz für ACE-Hemmer und AT1-Blocker zeigen⁷⁻¹¹.

So konnte in der SOLVD-Studie eine Verlängerung der Lebenserwartung in der mit Enalapril behandelten Gruppe (n=1284) im Vergleich zur Placebo-Kontrollkohorte (n=1285) bewiesen werden. Es handelte sich überwiegend um Patienten der NYHA Klasse II-III (etwa 90%) mit einem durchschnittlichem Alter von 61 Jahren⁸. Valsartan konnte in der Val-HeFT-Studie eine Reduktion des kombinierten Endpunktes aus Mortalität und Morbidität sowie eine Besserung der klinischen Zeichen und Symptomen der chronischen Herzinsuffizienz erzielen⁷. Beim Beginn einer Therapie mit ACE-Hemmern sollten Kalium und Nierenfunktion kontrolliert werden. Eine Dosissteigerung kann jeweils nach 2-4 Wochen erfolgen. Bei einer Verschlechterung der Nierenfunktion, Hyperkaliämie, ausgeprägten Nebenwirkungen (z.B. Reizhusten) oder Verdacht auf ein Angioödem, muss dringend das Absetzen der ACE-Hemmer-Therapie erwogen werden.

Die Beta-Rezeptor-Blocker (β -Blockern) hemmen ungünstige Effekte der Sympathikusstimulation, wie zum Beispiel periphere Vasokonstriktion, Tachykardie, Natriumretention, Rhythmusstörungen, linksventrikuläre Hypertrophie, Myokardischämie oder Apoptose von Kardiomyozyten. Die prognostischen Vorteile einer β -Blocker-Therapie wurden in zahlreichen Studien bestätigt¹²⁻¹⁶. Die CIBIS II-Studie dürfte vorzeitig abgebrochen werden, weil eine deutliche Mortalitätssenkung unter Bisoprolol-Behandlung vs Placebo nach zweiter Zwischenanalyse verzeichnet werden konnte (HR 0.66, 95% CI 0.54-0.81, $p < 0.0001$)¹⁷. Im Rahmen der MERIT-HF-Studie konnte neben der Sterblichkeitsreduktion eine Senkung der Hospitalisierungsrate, eine Verbesserung der NYHA-Klasse sowie des subjektiven Wohlbefindens dokumentiert werden¹⁸. Die Voraussetzung für den Einsatz von diesen Medikamenten ist ein klinisch stabiler Zustand. Die ambulante Kontrolle alle 2-4 Wochen zur Dosisanpassung nach dem klinischen Status des Patienten (langsamere Dosissteigerung kann bei einigen Patienten erforderlich sein) ist wünschenswert. Keine Dosiserhöhung ist bei Verschlechterung der Herzinsuffizienz, symptomatischer Hypotension, ausgeprägter Bradykardie ($< 50/\text{min}$) erlaubt.

Diuretika sollten unter Berücksichtigung der Retentionsparameter und der Serumelektrolyten erfolgen. Von dieser Therapie können insbesondere symptomatische herzinsuffiziente Patienten mit Stauungszeichen profitieren. Von erheblicher Bedeutung ist eine konsequente Therapie mit einem Schleifendiuretikum als symptomatische Maßnahme, insbesondere im

klinischen Setting einer akuten oder dekompensierten Herzinsuffizienz¹⁹. Eine prognostische Bedeutung konnte für die Diuretika bisher nicht eindeutig belegt werden.

Die Therapie mit einem Mineralocorticoidrezeptorantagonisten (MRA) ist bei Patienten mit ausgeprägten Symptomen einer Herzinsuffizienz in den Leitlinien seit einigen Jahren fest verankert. In der randomisierten und placebokontrollierten RALES-Studie („Randomized Aldactone Evaluation Study“) konnte bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz in den NYHA-Klassen III und IV die Mortalität sowie die Hospitalisierungsrate aufgrund von kardiovaskulären Gründen durch die Gabe des MRA Spironolacton zusätzlich zur damaligen Standardtherapie signifikant gesenkt werden²⁰. Die EPHEUS-Studie („Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study“) stellte fest, dass die zusätzliche Gabe von Eplerenon als „add-on“ zur empfohlenen Standardtherapie die Mortalität jeder Ursache sowie die kardiovaskuläre Hospitalisierungsrate bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt und mit eingeschränkter systolischer linksventrikulärer Funktion (EF \leq 40%) signifikant reduzierte

2.b. Nicht-medikamentöse Therapie in der Herzinsuffizienz

Ein implantierbarer Defibrillator (ICD) hat bei herzinsuffizienten Patienten als Hauptaufgabe die Prävention lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmien, sowie des plötzlichen Herztodes. Aktuelle Leitlinien der verschiedenen kardiologischen Gesellschaften (National Institute for Health and Clinical Excellence; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association) suggerieren, dass Patienten mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion \leq 35% und einer NYHA- Klasse II-IV, durch eine Senkung der Hospitalisierung und der kardiovaskulären Komplikationsrate erheblich von einer ICD- Implantation profitieren können. Die kardiale Resynchronisation (CRT) ist eine etablierte Therapie der schweren Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) bei Patienten mit hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion und Linksschenkelblock. Durch eine linksventrikuläre Stimulation kommt es zu einer Synchronisierung der Kammerkontraktion, zu einer Zunahme der linksventrikulären systolischen Funktion, einer Verminderung der funktionellen Mitralklappeninsuffizienz sowie einer Verbesserung der klinischen Situation des Patienten (Abnahme des NYHA- Stadiums)

Die Herztransplantation ist seit der ersten Herztransplantation am 3. Dezember 1967 durch Christian Barnard als ultima ratio in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz anzusehen²¹. Die Internationale Gesellschaft für Herztransplantation gibt ein einjähriges Überleben von 79% an, die Zehnjahresüberlebensraten werden von verschiedenen Autoren auf 40-45% geschätzt²². Bei Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz kann die Implan-

tation eines LVAD (left ventricular assist device) als Übergangslösung bis zum Zeitpunkt der Herztransplantation in Erwägung gezogen werden.

2.c. Prognose der chronischen Herzinsuffizienz

Die Vorhersage der klinischen Entwicklung des individuellen Patienten ist ein entscheidendes Element in der medizinischen Versorgung einer chronischen Herzinsuffizienz. Wünschenswert wäre daher die Anwendung von klinischen Scores zur Risikoabschätzung der Hospitalisierungsraten und der Sterblichkeit der Patienten mit verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz, die auf Basis der prognostischen Ergebnisse aus den neuesten epidemiologischen Studien entwickelt worden sind. Die Herzinsuffizienz ist mit einer generell ungünstigen Prognose verbunden (Abbildung 3.). Die Zahl an Todesfälle durch eine Herzinsuffizienz hat sich laut den erhobenen wissenschaftlichen Daten seit sechziger Jahren mehr als vervierfacht. Die Letalität nimmt mit dem Schweregrad der kardialen Dysfunktion zu und wird durch verschiedenen therapeutische Maßnahmen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst ²³.

Somit ist die Prognose hauptsächlich vom Grad der Einschränkung der systolischen linksventrikulären Ejektionsfraktion, von der vorhandenen Symptomatik, von der Belastbarkeit und von den weiteren Begleiterkrankungen abhängig²⁴. Sowohl die Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz als auch die Patienten mit einer diastolischen linksventrikulären Dysfunktion haben eine schlechte Prognose mit einer jährlichen Sterblichkeit von 15- 19 Prozent, beziehungsweise 8- 9 Prozent ^{25,26}. Die häufigsten Todesursachen sind das akute Herzversagen (Herztod mit einer vorausgehenden symptomatischen oder hämodynamischen Verschlechterung der Pumpfunktion des Herzens) und plötzlicher Herztod (Herztod innerhalb einer Stunde nach kardiovaskulärem Kollaps bei vorher stabilem Patienten) ²⁷.

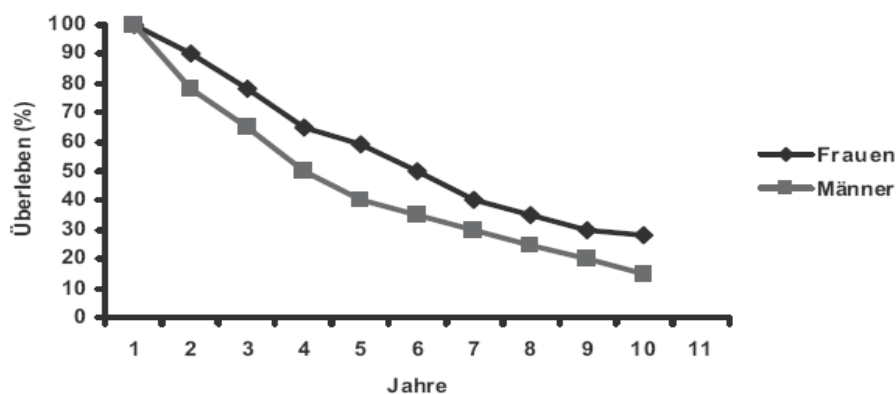


Abbildung 3. Prognose von Patienten mit der Herzinsuffizienz. AHA heart disease and stroke statistics 2004.

3. Biomarker als ein diagnostisches Mittel der Herzinsuffizienz

In der Diagnostik und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen erreicht auch der Einsatz von Biomarkern einen zunehmenden Stellenwert. Biomarker stellen messbare Produkte von Organismen dar, die als Indikatoren für eine Abweichung von physiologischem Zustand angewendet werden können²⁸. Der ideale Biomarker sollte einige strenge Kriterien erfüllen. Neben der biologischen Plausibilität sollte er ein günstiges Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Unabhängigkeit des Testverfahrens zur Bestimmung des Biomarkers im Hinblick auf das Alter, das Geschlecht und den ethnischen Hintergrund ist von der höchsten Bedeutung. Weiterhin sollte die klinische Nachweisbarkeit adäquater Biomarker im zeitlichen Zusammenhang mit dem beobachteten pathophysiologischen Phänomen stehen. Die potenziellen Biomarker könnten grob in folgenden Gruppen klassifiziert werden: (a) Biomarker der neuro-humoralen Aktivierung, (b) Biomarker der Myozytenbeschädigung, (c) Biomarker des extrazellulären Matrixumbaus, (d) Biomarker der Inflammation, (e) Biomarker der renalen Dysfunktion, (f) Biomarker hämatologischer Abnormalitäten, (g) Biomarker des oxidativen Stress und (h) Biomarker, deren pathophysiologischen Zusammenhänge nicht genau festgestellt wurden²⁸.

Zahlreichen Laborparameter (u.a. Serum-Kreatinin und Hämoglobin), neurohumorale Faktoren (u.a. Noradrenalin, Vasopresin, und proADM) sowie Marker der Inflammation (TNF- α , IL-6, GDF-15) korrelieren bei bereits bekannter Herzinsuffizienz mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Prognose. Überwiegend aufgrund mangelnder Spezifität, teilweise aber auch aufgrund mangelnder Sensitivität eignen sich diese allerdings nicht als Herzinsuffizienzmarker.

3.a. Die natriuretischen Peptide

Während der letzten Jahrzehnten wurde die biologische Rolle und die potenzielle klinische Anwendung der natriuretischen Peptide intensiv erforscht.

Im Jahr 1981 haben De Bold et al. die natriuretische und vasodilatatorische Fähigkeiten des natriuretischen Peptides beschrieben²⁹. Bis heute sind vier Moleküle bekannt, die die Gruppe der kardialen natriuretischen Peptide bilden. Das atriale natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ natriuretische Peptid (BNP), das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) und das D-Typ natriuretische Peptid (DNP) gehören zu dieser Gruppe. Jedes Peptid ist durch ein eigenes Gen kodiert, und stereochemisch bilden alle vier Proteinformen einen durch Disulfidbrücke zusammengehaltenen intramolekularen Ring. Im klinischen und wissenschaftlichen Umgang

sind ANP und BNP von entscheidender Bedeutung. Ergänzend wird gemäß der aktuellen Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (2012) die Bestimmung der natriuretischen Peptide zur Differenzialdiagnose und Prognoseeinschätzung der Herzinsuffizienz empfohlen (Empfehlungsgrad IIa). Es besteht ein umfangreicher wissenschaftlicher Datensatz für die Anwendung von natriuretischen Peptiden zur klinischen Bestätigung einer vorliegenden Herzinsuffizienz³⁰

ANP wird hauptsächlich in den Vorhöfen des Herzens gebildet. In hypertrophem wie auch in fetalem Myokard liegt es in höheren Konzentrationen vor. Die Peptide ANP und BNP werden nach Sekretion enzymatisch gespalten, wodurch ein peptides Hormon und ein biologisch inaktives N-terminal-Segment entstehen (NT-pro ANP und NT-pro BNP). Die beiden Partikel können in der Zirkulation determiniert und gemessen werden³¹. Eine Volumenüberladung des Herzens führt durch die erhöhte Wandspannung und den mechanischen Druck auf die Kardiomyozyten zur Freisetzung von ANP. Die Hormone und Neurotransmitter wie zum Beispiel Endothelin, Arginin-Vasopressin oder Katecholamine können den ANP-Spiegel im Blut beeinflussen. Auch supraventrikuläre Tachykardien oder Vorhofflimmern werden als potenzielle Trigger für die Freisetzung von natriuretischen Biomarkern angesehen.³²

BNP- die basale Produktion von BNP ist äußerst niedrig und das BNP ist gleichmäßig von den Vorhöfen und den Kammern produziert. Durch die Ausdehnung des Herzmuskels kommt es jedoch zu einer Verschiebung des atrio-ventrikulären Verhältnisses, wodurch die Kammer als dominante Produktionsstelle in den Vordergrund gerät³³. Die beiden Gruppen der natriuretischen Hormone (ANP und BNP) aktivieren die gleichen ubiquitären Rezeptoren (der natriuretische peptide Rezeptor A) in entsprechenden Geweben (das vaskuläre Endothel und die Nieren). Sie leisten auch eine ähnliche physiologische Wirkung: Natriurese, Diurese und Vasorelaxation. Darüber hinaus üben sie eine parakrine Wirkung aus, wodurch Fibrose- und Hypertrophie gehemmt werden. ANP und BNP werden durch zwei verschiedenen Mechanismen aus dem Kreislauf entfernt: (a) durch die rezeptor-vermittelte Internalisierung (durch den natriuretisch-Peptid-Clearance-Rezeptor), was überwiegend in den Nieren abläuft und (b) den proteolytischen Abbau von den neutralen Endopeptidasen.

In kontrollierten Studien zur Untersuchung neuer Therapiestrategien bei Herzinsuffizienz haben BNP und NT-pro BNP heute einen festen Stellenwert als Marker der Effizienz einer medikamentösen Therapie. BNP und NT-pro BNP dürfen jedoch eine kardiologische Untersuchung und insbesondere eine Echokardiografie nicht ersetzen, zumal sie keine Rückschlüsse auf Form und Ätiologie der kardialen Grunderkrankung erlauben.

Zusammenfassend lässt sich betonen, dass die natriuretischen Peptide BNP und NT-pro BNP schon heute eine wertvolle Hilfe für den Praxisalltag und die Diagnostik sowie Therapie aller Formen der Herzinsuffizienz darstellen.

3.b. Andere potenzielle Kandidaten

Andere Biomarker sind bisher erst in kleineren Studien untersucht worden, so dass diese Parameter im Augenblick eher eine experimentelle Bedeutung haben und eine abschließende Beurteilung sowie klinische Anwendung noch nicht möglich ist. Zu diesen Parametern gehören Endothelin, Adrenomedulin, Urocortin, Apelin, Copeptin und GDF-15.

Endothelin (ET) ist ein potentes, 21 Aminosäuren langes Protein. Die Endothelinkonzentration korreliert mit der NYHA-Klasse und der linksventrikulären Ejektionsfraktion³⁴. Ein erhöhter Endothelinspiegel ist mit einer schlechten Prognose bei leichter bis mittelgradiger Herzinsuffizienz (bei 120 Patienten) verbunden.³⁵

Adrenomedullin (ADM) besitzt starke natriuretische und vasodilatatorische Fähigkeiten und seine Konzentration ist bei Hypertonie, chronischer Niereninsuffizienz sowie Herzinsuffizienz erhöht. In einer Beobachtungsstudie von Pousset et al wurde ADM bei 117 Patienten mit stabiler systolischer Herzinsuffizienz bestimmt. ADM zeigte sich als ein unabhängiger prognostischer Parameter in der einjährigen Prognose der mittelgradigen Herzinsuffizienz³⁶.

Urocortin soll herzprotektive, inotrope, natriuretische und vasodilatatorische Wirkungen ausüben³⁷. In der Studie von Goetze et al wurden jedoch höheren Plasmakonzentrationen vom Urocortin bei Patienten mit einer systolischen Herzinsuffizienz (HFREF-Gruppe) im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden, was besonders bei den Männern ausgeprägt war

Apelin senkt durch einen NO vermittelten Mechanismus den Blutdruck ab³⁸. In einer Kohorte mit 202 herzinsuffizienten Patienten und 22 nach dem Alter gematchten Probanden war die Plasmakonzentration von Apelin statistisch signifikant niedriger in der Gruppe der Herzinsuffizienten, unabhängig von NYHA-Klasse, LVEF und der zugrunde liegenden Ätiologie³⁹.

Copeptin ist ein Peptidhormon, welches sich als C-terminales Fragment des Vasopressinprohormons (antidiuretisches Hormon, ADH) proportional zur dessen Sekretion verhält. Die prognostische Bedeutung von Copeptin konnte bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz, Herzinsuffizienz nach akutem Myokardinfarkt und in der Postinfarktperiode nachgewiesen werden⁴⁰.

GDF („growth differentiation factor“-)-15, als Mitglied der übergeordneten Familie der TGF („transforming growth-factor“-)- β -Zytokine, wurde ursprünglich in aktivierten Makrophagen identifiziert und wird unter normalen physiologischen Bedingungen lediglich von der Plazen-

ta in signifikanten Mengen produziert ⁴¹. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigte sich GDF-15 im Vergleich zu Kontrollprobanden signifikant erhöht und korrelierte positiv mit dem NYHA-Schweregrad und mit NT-proBNP ⁴²; ebenso war es ein Prädiktor einer schlechten Prognose bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ⁴³.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der gezielte Einsatz eines Biomarkers für Herzinsuffizienz im klinischen Alltag in der Diagnostik und Therapiesteuerung eine entscheidende Rolle in der kardiologischen Behandlung spielen könnte. In der Betreuung von Patienten mit akuter oder chronischer Herzinsuffizienz eignet sich zum jetzigen Zeitpunkt das BNP bzw. NT-proBNP zum Ausschluss einer Herzmuskelschwäche sowie zur Prognoseabschätzung. Zur kardiovaskulären Risikostratifizierung im Rahmen der Primärprävention bieten diese kardialen Biomarker ergänzend zu den klassischen Risikofaktoren lediglich einen moderaten Vorteil. Zudem ist die klinische Zuverlässigkeit der natriuretischen Peptide bei einer fortgeschrittenen chronischen Niereninsuffizienz sowie bei älteren Patienten nicht ausreichend⁴⁴. Deswegen ist die weitere Suche nach neuen Biomarkern, die auf Basis bestehender pathophysiologischer Erkenntnisse im Bereich der Herzinsuffizienz identifiziert und weiter erforscht werden sollten, von primärer Bedeutung.

4. Das Renin-Angiotensin System

In seiner „Lehrbuchdefinition“ stellt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ein peptidergisches System mit endokrinen Charakteristika dar ⁴⁵. Das RAAS spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle des arteriellen Blutdrucks, und umfasst eine Reihe von Proenzymen, Enzymen und Hormonen. Die Aktivierungskaskade des RAAS ist auf Abbildung 4. dargestellt. Das erste Substrat des Systems, Angiotensinogen (ein glykosyliertes α 2-Plasmaglobulin), wird aus der Leber freigesetzt und im Kreislauf durch Renin zu Angiotensin I gespalten. Renin wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere produziert ⁴⁵. Das Angiotensin I (ANG I) wird durch das Angiotensin-I-Converting-Enzym (ACE, ebenfalls eine Dipeptidylcarboxypeptidase) sehr schnell durch Abspaltung von zwei Aminosäuren zum Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) umgewandelt ⁴⁶. ANG II wird als Haupteffektor des RAAS betrachtet. Durch die Bindung mit membranständigen Rezeptoren leistet ANG II seine Wirkungen in den Zielorganen (Abbildung 5): Vasokonstriktion, Durst/Salzappetit, Natriumresorption, die Freisetzung des antidiuretischen Hormons und so weiter. Die kardiovaskulären Effekte von Angiotensin II werden durch AT₁ und AT₂-Rezeptoren vermittelt. Beide Rezeptoren stellen Transmembranglycoproteine dar, mit 30% Strukturähnlichkeit ⁴⁷. Die AT₁-Rezeptoren sind in erster Linie mit den Phospholipasen A, C, D, dem Inositoltriphosphat, Kalzium-Kanälen sowie der Mehrzahl von Serin/ Treonin-Proteasen katalytisch verbunden ⁴⁸. Bis jetzt wurden zwei Subtypen der AT₁-Rezeptoren entdeckt: AT_{1A} und AT_{1B}. Die AT₁ und AT₂-Subtypen der AT-Rezeptoren zeigen ähnliche Eigenschaften bei der Bindung zu ANG II, aber unterschiedliche genetische Struktur und Lokalisation sowie eine unterschiedliche gewebespezifische Expression und Regulation ⁴⁹. Während die bekanntesten Wirkungen des ANG-II (wie zum Beispiel Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung) durch die Aktivierung der AT₁-Rezeptoren vermittelt werden, ist die Funktion der AT₂-Rezeptoren weiterhin nicht im vollen Ausmaß klar. Als sicher steht fest, dass die AT₂-Rezeptoren in der embryonalen Entwicklung des Organismus wichtig sind sowie dass diese Rezeptoren in vivo hinsichtlich ihres Einflusses auf die metabolischen Prozesse den AT₁-Rezeptoren entgegenwirken ⁵⁰. Zahlreiche Ergebnisse weisen auf die Rolle von AT₂-Rezeptoren in der Differenzierung und Regeneration des Nervengewebes hin. Zuletzt wurde die Existenz eines neuen Rezeptors der AT-Rezeptorfamilie postuliert. Hier handelt sich um AT₄-Rezeptor, der ein physiologischer Ligand für bestimmte Degradationsprodukten des Angiotensins sein soll. Seine Anwesenheit wurde im Herzmuskel, in den Nieren, im Kolon, den Nebennieren, in der Prostata sowie verschiedenen motorischen und sensorischen Hirnregionen bewiesen.

Außerdem wurden zusätzliche gekürzte Peptide wie ANG-(1-7) als alternative Spaltungsprodukte von ANG I entdeckt. ANG-(1-7) entsteht durch Aktivität von ACE2, indem dieses Enzym von C-terminaler Seite des ANG II die Aminosäure Phenylalanin abschneidet. Dieses Peptid ist ein Ligand für den G-Protein gekoppelten Mas- Rezeptor, der überwiegend im Gehirn, den Testes, in den Nieren, im Herzen und in vaskulären Gefäßen exprimiert wird. Die Bindung ANG-(1-7)- Mas- Rezeptor führt zu einer Interaktion zwischen Mas und AT₁-Rezeptor und zur Inhibierung von ANG-II- Wirkungen, die durch den AT₁-Rezeptor vermittelt werden. ACE ist aktiv im Metabolismus und Abbau von ANG-(1-7), was auf eine komplexe Interaktion zwischen verschiedenen kardiovaskulären peptidergischen Systemen hindeutet. ANG-(1-7) hat multiple physiologischen Wirkungen, die in der Mehrzahl den ANG II zugeschriebenen Wirkungen entgegengesetzt sind.

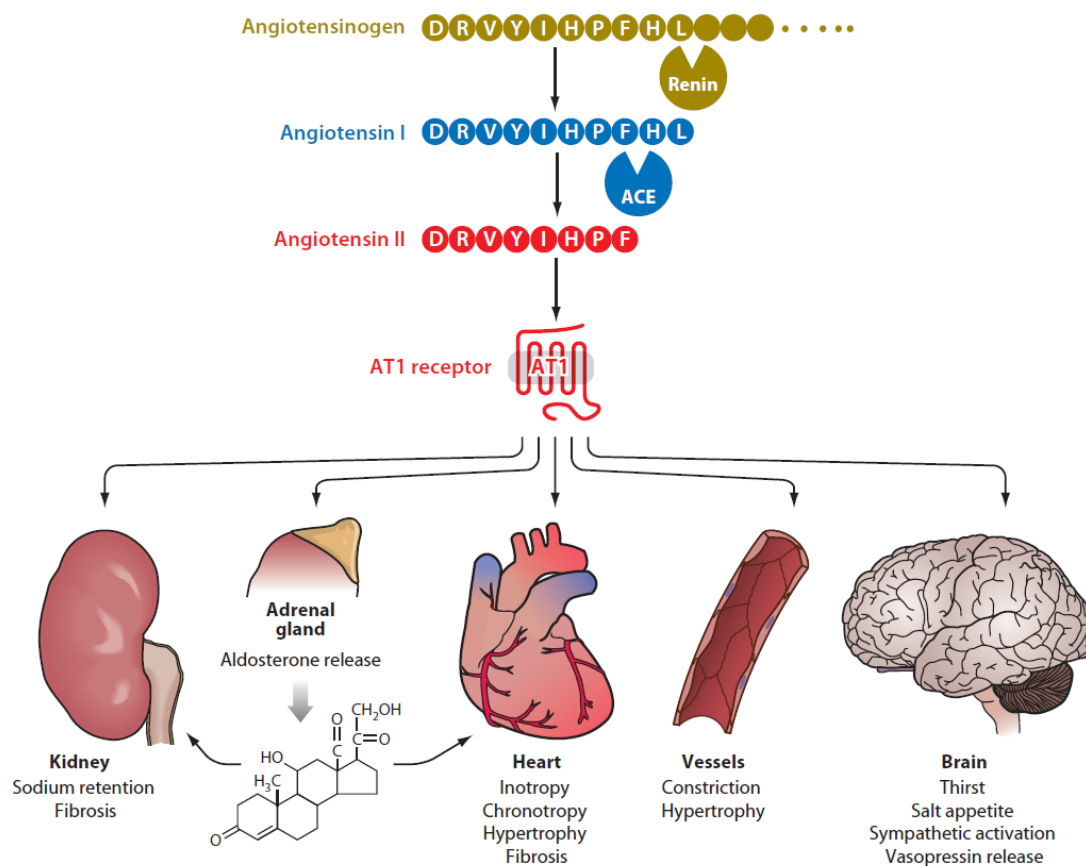


Abbildung 4. Die Aktivierungskaskade und die systemische Wirkung vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ⁵¹

4.a. Lokales, gewebespezifisches Renin-Angiotensin System:

In einigen Geweben sind die parakrinen/autokrinen Wirkungen dieses RAAS von entscheidender physiologischer Bedeutung und wurden dementsprechend intensiv erforscht. Es wurde

postuliert, dass Angiotensin in glatten Gefäßmuskelzellen eine Stimulation von Protoonkogenen sowie Adhäsionsmolekülen induziert⁵². Laut anderen Ergebnissen ist Angiotensin an der Migration neutrophiler Granulozyten und Monozyten in der Gefäßwand beteiligt⁵³ sowie an der Beschleunigung der Aufnahme von Lipiden und deren Oxidation, die als eine Folge von oxidativem Stress entstehen⁵⁴. Nachgewiesen wurde eine Interaktion des Angiotensins mit endogenen Wachstumsfaktoren⁵⁵. Dieser proinflammatorische Effekt des Angiotensins erscheint prädisponierend für die Plaquerupturen zu sein⁵⁶. Es kommt zur Proliferation, Migration und Hypertrophie glatter Muskelzellen. Dabei wird vor allem die charakteristische Hypertrophie der Media und die Zunahme der Wanddicke induziert. Das gewebeständige RAS scheint dabei unabhängig vom Einfluss der systemische Hämodynamik zu arbeiten⁵⁶. Alle diese Veränderungen führen zu einer Matrixexpansion und zur Entwicklung einer interstitiellen Fibrose und begünstigen somit das Entstehen von Atherosklerose in der Gefäßwand.

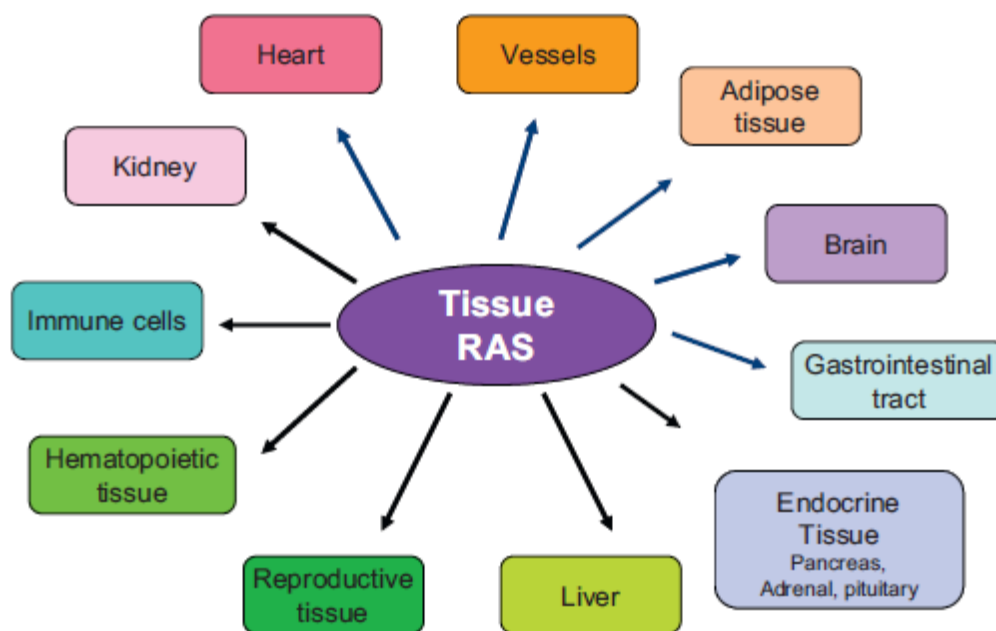


Abbildung 5. „tissue“ Renin-Angiotensin-System. Die Komponente des Renin-Angiotensin-Systems sind in verschiedenen Organen exprimiert³²

Das kardiovaskuläre System

Die bisherigen Studien erweckt die Vermutung, dass die Komponenten des RAAS durch parakrine und autokrine Effekte zur Proliferation, Apoptose, Inflammation, oxidativem Stress sowie Myokardbeschädigung und letztendlich zur Herzinsuffizienz führen können^{57,58}. Das Vorhandensein von allen Komponenten des RAAS ist durch zahlreiche Studien im Herzmuskel bewiesen und es ist auch bekannt, dass in einigen pathologischen Zuständen (wie z.B.

Hypertrophie oder Ischämie, Abbildung 6.) die Konzentrationen bestimmter Effektoren der RAAS- Familie unterreguliert sind ⁵⁹.

Das Herz ist in der Lage, ANG-II selbst zu produzieren ^{60,61}. Angiotensinogen ist überall in der Zellkultur von Kardiomyozyten und Fibroblasten exprimiert ⁶².

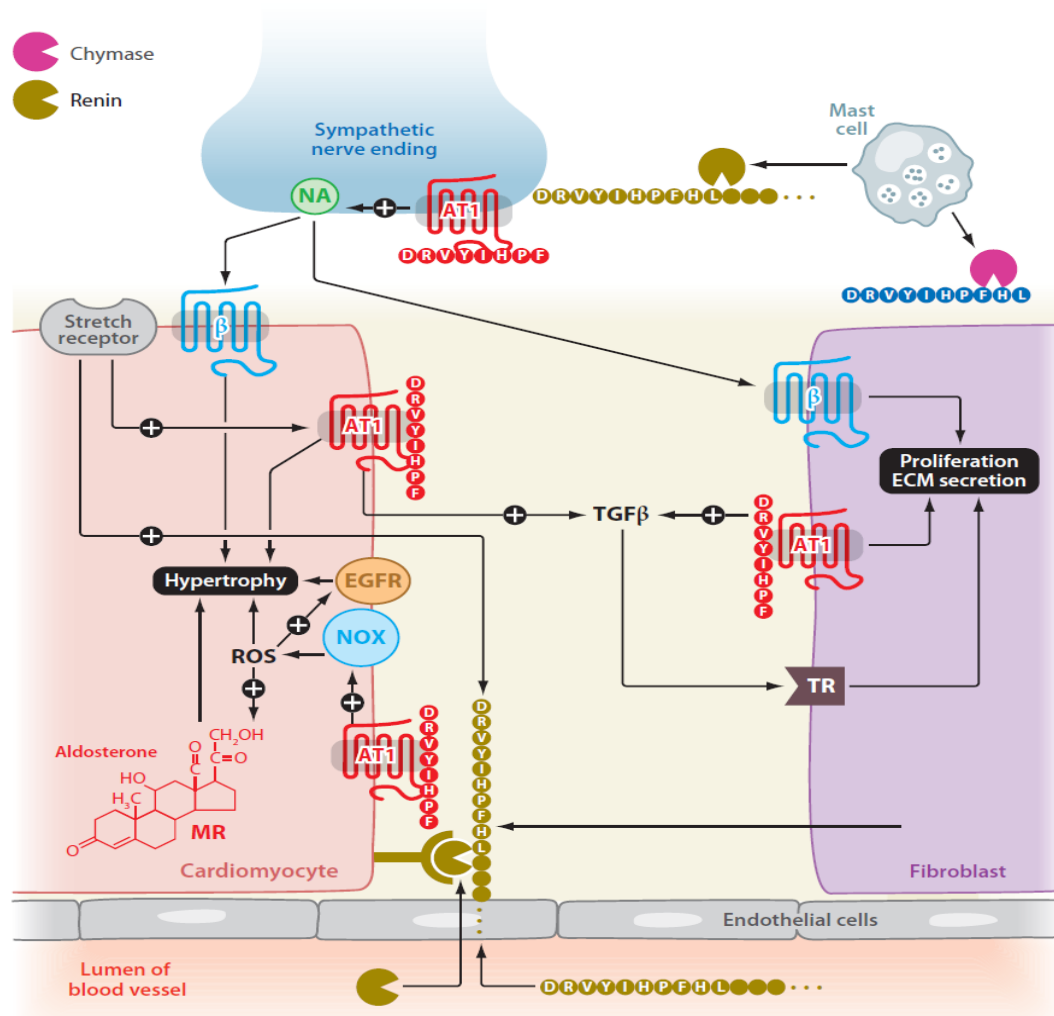


Abbildung 6. Lokales RAAS im Herzmuskel ⁵¹ Die Angiotensin II-Wirkung wird hauptsächlich über die Aktivierung von AT₁-Rezeptoren an vegetativen Nervenfasern, Kardiomyozyten und Fibroblasten vermittelt. Als Endresultat kommt es zur positive Inotropie, Hypertrophie und Fibrose

ACE wird in den Myokardfibroblasten und in den koronaren Endothelzellen produziert ⁶³.

Die Kardiomyozyten, Fibroblasten sowie auch sympathische Nervenfasern im Herzen besitzen AT₁-Rezeptoren ^{64,65}. Durch die Bindung an den AT₁-Rezeptor zeigt ANG II eine positive inotrope Wirkung ⁶⁶. Die direkte Regulation der Kalziumhomöostase und der transmembranen Konduktanz in den Kardiomyozyten sowie die Erleichterung der Norepinephrin-Freisetzung aus den sympathischen Nervenenden vermitteln diesen Effekt ⁶⁷.

Des Weiterem wird durch AT₁-Stimulation eine Hypertrophie und Fibrose induziert⁶⁸. Einige Mediatoren, wie z.B. Endothelin⁶⁹ oder Adrenalin⁷⁰ könnten bei der Wirkung von ANG II auf die Vermehrung von Kardiomyozyten mitbeteiligt sein. Zusätzlich induziert ANG II die Produktion von ROS, die wahrscheinlich durch die Transaktivierung von EGFR eine Hypertrophie bewirken⁷¹.

Die Rolle von lokalem RAAS in der Entstehung einer Herzhypertrophie aufgrund von mechanischer Dehnung ist unklar. Die mechanische Dehnung induziert die Freisetzung von ANG II im Myokard^{72,73}. In Tiermodellen zeigen die Mäuse, bei denen eine lokale Produktion von Angiotensinogen gehemmt wurde, eine verminderte hypertonie-induzierte Hypertrophie- und Fibroseneigung. Jedoch entwickeln Mäuse ohne ANG II und AT₁-Rezeptor im Herzmuskel nach Volumen- oder Druck-, „over-load“ (Überlast) weiterhin eine Hypertrophie⁷⁴. Die aus den angiotensinogen-defizienten Mäusen isolierten Kardiomyozyten zeigen keine hypertrophische Antwort auf Überdehnung. Im Gegensatz zur Kontrollzelle, blockieren AT₁-Antagonisten diesen Effekt jedoch nicht. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die adaptiven Reaktionen auf Überdehnung der Kardiomyozyten im Sinne einer Zellproliferation nur zum Teil durch ANG II/AT₁-Rezeptoren vermittelt werden.

Neben der Hypertrophie induziert ANG II eine Fibrose des Herzens, was mit einer Proliferation von kardialen Fibroblasten und einer übermäßigen Ablagerung extrazellulärer Matrix in das kardiale Interstitium einhergeht⁷⁵. Die Fibrose nimmt einen wichtigen Stellenwert in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ein, weil die durch eine Fibrose verursachte Herzwandsteifigkeit zu einer diastolischen Dysfunktion und in der Folge zur Herzinsuffizienz führt. Die Fibroblastenaktivierung durch ANG II ist abhängig von den umliegenden Kardiomyozyten⁷⁶. Wahrscheinlich müssen die Myozyten parakrine Faktoren wie zum Beispiel TGF- β freisetzen, die anschließend die mitogene Wirkung des ANG II potenzieren.

Letztendlich steht fest, dass das lokale RAAS im Herzen in der physiologischen Kommunikation zwischen den Fibroblasten und Kardiomyozyten und somit in der Pathogenese der Herzhypertrophie und Fibrose involviert ist. ACE-Hemmer und AT₁-Antagonisten hemmen die kardiale Fibrose bereits in Medikamentenkonzentrationen, die keinen Einfluss auf den systemischen Kreislauf haben.

4.b. Der Proreninrezeptor

Bis vor kurzem war die einzige dem Renin und seinem Präkursor Prorenin zugeschriebene Rolle die Spaltung von Angiotensinogen, was als erster Schritt in der RAAS- Aktivierung angesehen wird. Folglich sollte als Resultat dieser Aktivierung unter anderem auch ANG-II entstehen, was anschließend durch Aktivierung von AT₁- und AT₂-Rezeptoren zu den oben

beschriebenen Haupteffekten der RAAS- Kaskade führen sollte. Nach der Entschlüsselung der Rolle von „tissue“-RAAS wurde auf der Basis der zahlreichen Studien die Existenz eines gewebespezifischen Rezeptors postuliert, der für die lokale Proreninaktivierung und nachfolgende Angiotensin I und II –Produktion verantwortlich sein könnte. Der Rezeptor, der Renin und Prorenin bindet, wurde im Jahr 2002 geklont und PRR (Proreninrezeptor) genannt. Der Proreninrezeptor wurde von der Arbeitsgruppe um Professor Nguyen an der Institut de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, Frankreich entdeckt (Abbildung 7). Während andere in der Homöostase des Prorenins involvierte Rezeptoren wie MP6 (Mannose-6-phosphate-Rezeptor) und RnBP (renin binding protein) basierend auf aktuellen Ergebnissen für die gewebespezifische Elimination des Pro/Renins verantwortlich sind, erschien schon bei den ersten Resultaten die physiologische Rolle des Proreninrezeptors weitreichend zu sein. Der Proreninrezeptor war in zahlreichen Organen nachweisbar, unter anderem im Herzen, den Nebennieren, der Leber, den Nieren, dem Pankreas, den Ovarien, im Plazenta oder den Augen.

Bei Menschen befindet sich das Gen, das PRR verschlüsselt (als ATP6AP2 bezeichnet) auf dem Locus p 11.4 des X Chromosoms.

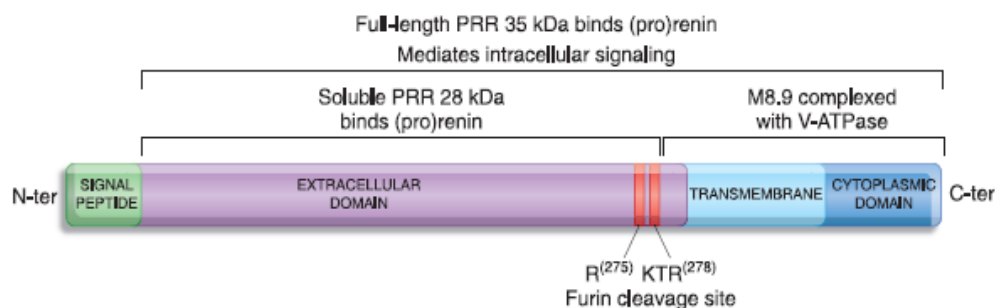


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Proreninrezeptors (PRR) ⁷⁷.

Der PRR bindet Renin und Prorenin mit einer Affinität im nanomolaren Bereich (5-20 nM). Die Konzentration des Prorenins unter physiologischen Umständen im Plasma ist im Vergleich zu Renin 7-9-fach höher. Trotzdem herrscht im Plasma das physiologische Gleichgewicht zwischen der aktiven „offenen“-Form des Prorenins (2%) und der konformationell inaktiven Form (98%). Eine pharmakologische Inhibition des RAAS mittels Renininhibitoren, ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptorblocker induziert den Anstieg des zirkulierenden Reninspiegels durch Hemmung der negativen Rückkopplung von ANG II auf die Reninproduktion. Bei renaler Schädigung und Myokardhypertrophie können zirkulierende Konzentration des

Prorenins um das 100-fache erhöht sein⁷⁸. Darüber hinaus ist die Bindungsaffinität des Prorenins zum Proreninrezeptor 2-3 fach höher im Vergleich zu Renin.

Prorenin besitzt ein 43-Aminosäuren langes Segment, das das aktive Zentrum des Enzyms verdeckt. Die Aktivierung des Prorenins kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen: 1. proteolytisch und 2. nicht-proteolytisch. Die proteolytische Aktivierung des Prorenins erfolgt in vivo durch die Entfernung des Prosegmentes mittels Kalikrein und Serin-Proteasen in den renin-produzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere, was unter physiologischen Bedingungen ein irreversibler Prozess ist. Eine nichtproteolytische Aktivierung erfolgt in vitro durch eine pH-Senkung ($\text{pH} \approx 3.00$) oder einen Temperaturabfall bis auf 4°C . Aktuelle Studien postulieren im Hinblick auf die Neuentdeckung des Proreninrezeptors einen zusätzlichen Mechanismus der nichtproteolytischen Aktivierung. So wurden von Suzuki et al. zwei entscheidenden Segmente im Bereich des Prosegmentes des Prorenins identifiziert und als „gate-region“ und „handle-region“ bezeichnet⁷⁹. Die „handle-region“ führt durch eine Bindung mit den spezifischen Proteinen mit folgender Konformationsänderung des Prosegmentes zu einer nichtproteolytischen Aktivierung des Enzyms.

Es wird vermutet, dass genau diese physiologische Kaskade durch Prorenin- PRR- Bindung getriggert wird.

Die Bindung von Prorenin und Renin mit PRR führt zu zahlreichen intrazellulären physiologischen Ereignissen, die abhängig von der jeweiligen Zellart sind. Überwiegend verursacht die PRR- Aktivierung die Phosphorylierung von MAPKs (mitogen activated protein kinases) und ERK 1/2 (extracellular-signal-regulated kinase). In der Folge kommt es zur Hochregulierung von profibrotischen Genen für TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) sowie Kollagen und Fibronectin. Außerdem steigt durch die Prorenin-PRR-Bindung die Produktion von COX₂ (cyclo-oxygenase 2), p38 MAPK/Hsp27 (heat-shock protein 27)-Weg, PI3K (phosphoinositide 3-kinase) sowie p85 und PLZF (promyelocytic zinc finger transcription factor), welcher wiederum durch negative Rückkopplung die Expression von PRR unterdrückt⁷⁷. Als Endresultat sämtlicher Signaltransduktionswege kommt es zur Intensivierung der zellulären Proliferation, zu profibrotischen sowie inflammatorischen Effekten als auch zum Umbau des Zytoskelettes. Die pathophysiologischen Zusammenhänge, die durch PRR vermittelt werden, sind in Abbildung 8. dargestellt.

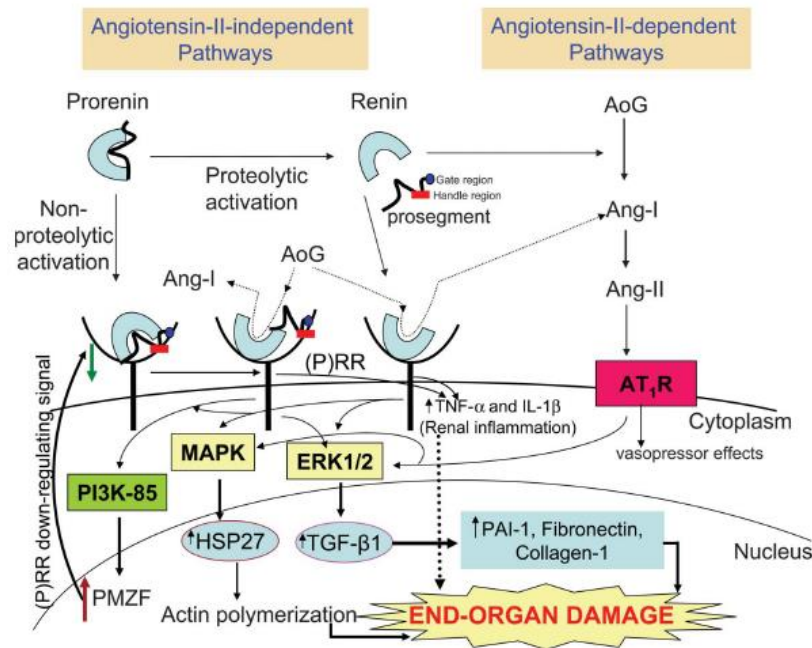


Abbildung 8. Der Proreninrezeptor ist sowohl durch den angiotensin-abhängigen als auch durch angiotensin-unabhängigen Signalweg in der Entwicklung der Organbeschädigung involviert⁷⁸

Die Bemühungen in der Entwicklung des Proreninrezeptorblockers, um tiefere Einblicke in die Physiologie des PRR zu erlangen, ergaben widersprüchliche Resultate. Die Studien mit Aliskiren, einem auf dem Markt verfügbaren Renin-Blocker, zeigte, dass die durch Aliskiren vermittelte Hemmung des Renins die Bindung von Prorenin und Renin an den PRR nicht beeinflusst⁸⁰. Suzuki et al. konnten ein 10-Aminosäuren langes Protein mit den Eigenschaften eines kompetitiven Inhibitors der „handle-region“ des Prosegmentes des Prorenins herstellen („handle-region“ Protein- HRP), wodurch letztendlich eine Komplexbildung zwischen Prorenin und Proreninrezeptor verhindert werden sollte. Weiterhin konnte HRP die Entwicklung der Glomerulosklerose in diabetischen Tiermodellen sowie diabetischen AT₁ defizienten Mäusen inhibieren und sogar teilweise umkehren. Matavelli et al beobachteten eine Senkung der Konzentration von TNF- α , IL-1 im Interstitium der Niere sowie eine Abnahme der Albuminurie nach der Behandlung von Streptozocin-diabetischen Ratten mit HRP und Valsartan⁸¹. Leider ließen sich die positiven Auswirkungen der PRR- Blockade mittels HRP in verschiedenen in vivo und in vitro Studien nicht bestätigen. Die dauerhafte Behandlung mit HRP im Tiermodell (Goldblatt-Raten mit einseitiger Klemmung der Nierenarterie- 2K1C) der hypertensiven Nephrosklerose nahm keinen Einfluss auf die arterielle Hypertonie, die Ergebnisse von Myokardbiopsien oder die renale Schädigung. Weitere Untersuchungen wurden an spontanhypertensiven Ratten unter kochsalzreicher (8% NaCl) und kochsalzärmerer Diät mit oder ohne HRP durchgeführt. Bei Versuchsratten unter kochsalzreicher Diät und ernied-

rigtem Plasma-Renin-Spiegel führte die HRP- Behandlung zu einer Senkung des Serum-Kreatinin-Spiegels, einer Abnahme der linksventrikulären Masse, einer Besserung der linksventrikulären Ejektionsfunktion sowie der Myokardfibrose. In beiden Behandlungsgruppen, den spontanhypertensiven Ratten mit erhöhtem und niedrigem Plasma-Renin-Spiegel, hat das HRP die Blutdruckwerte nicht beeinflusst⁸². Das Besondere an beiden Modellen ist, dass die genetische PRR- Expression unterreguliert war (sowohl bei spontanhypertensiven Ratten, als auch bei Goldblatt-Ratten).

Damit lässt sich postulieren, dass eine Hemmung der nichtproteolytischen Aktivierung des Prorenins im pathophysiologischen Setting der arteriellen Hypertonie mit niedrigem Plasma-Renin-Spiegel positive oder sogar kurative Auswirkungen auf das kardioresnale System haben könnte. Durch diese Studie erhärtet sich der Verdacht, dass die physiologischen Auswirkungen des Prorenins, die durch PRR- Aktivierung vermittelt werden, für die Entstehung kardialer und renaler Erkrankungen verantwortlich sein könnten. Zusammenfassend lässt sich für die beobachteten Effekte des HRP in zahlreichen präklinischen Studien sagen: 1. HRP induziert unspezifische Effekte mittels unbekanntem Mechanismen, unabhängig von der PRR-Hemmung; 2. HRP wirkt bei niedrigen Prorenin-Plasma-Spiegeln als Agonist und bei hohen Prorenin-Plasma-Spiegeln als Antagonist von PRR.

Der PRR wurde in erster Linie im Rahmen kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen erforscht⁸³. Die Untersuchung der pathophysiologischen Rolle des Proteins war erschwert, da keine vollständige Ablation des PRRs in den Versuchstiermodellen möglich war. Das deutet auf eine wichtige Funktion des PRRs in der embryonalen Entwicklung des Menschen hin⁷⁷.

Eine Mutation im Gen für den Proreninrezeptor (ATP6AP2) wird in Verbindung mit der familiären-X-Mentalen-Retardierung sowie epileptischem Syndrom gebracht. Entsprechend lässt sich postulieren, dass Renin und sein Zellrezeptor in der Hirnentwicklung und dem Aufbau der kognitiven Funktionen mit involviert ist. Eine PRR- Deletion in *C.elegans* und in Zebrafisch führt in frühen Stadien der Embryogenese zum Tod des Embryos⁷⁷.

Bei den männlichen transgenen Ratten mit einer Überexpression des Prorenin-Gens in der Leber und einer 400-fachen Plasmakonzentrationserhöhung von Prorenin wurden schwergradige kardiale und renale Schädigungen mit erhöhter interstitieller Konzentration von Angiotensin I im zwanzigsten Lebensmonat nachgewiesen. Die Tatsache, dass bei transgenen Ratten mit einem mehr als 1000-fach erhöhten Plasma-Prorenin in drittem Lebensmonat eine Hypertonie im Vordergrund steht, mit nur dezenter kardialer und renaler Schädigung, spricht eher dafür, dass eine Unterregulation der Proreninrezeptoren mittels PLZF ein Schutzmechanismus in pathologischen Zuständen mit erhöhtem Proreninplasmaspiegel sein könnte. Mer-

cure et al berichteten von einer moderaten Hypertonie und myokardialen Hypertrophie mit Albuminurie bei transgenen Ratten mit der Überexpression des nativen Prorenins⁸⁴. Erhöhte Prorenin-Plasma-Konzentrationen bei Diabetes mellitus mit Nephropathie und Retinopathie zeigten eine starke Korrelation mit der Inzidenz von Mikroalbuminurie, Glomerulosklerose und Augeninflammation.

Es ist aber wichtig zu betonen, dass ein erhöhter Proreninplasmaspiegel per se nicht unbedingt mit einer kardialen Sklerose sowie einer Glomerulosklerose einhergeht. Erhöhte Prorenin-Plasmakonzentrationen während der Schwangerschaft gehen nicht mit kardio-renalen Konsequenzen einher, was sich durch die entscheidende Rolle von RAAS in der Embryogenese der Niere, der Kontrolle des fetalen systolischen Blutdruckes, der fetalen renalen Durchblutung sowie der Regulation der fetalen glomerulären Filtrationsrate erklären lässt⁷⁸.

Die molekulare Struktur von PRR

Der Proreninrezeptor ist ein kleines Protein (35-39 kDa) mit einer langen nicht-glykosylierten hydrophoben extrazellulären N-terminal-Domäne, einer transmembranen Domäne und einer kleinen intrazellulären Domäne ohne intrinsische Kinaseaktivität. Die immunhistochemischen Studien konnten die Struktur von PRR in den vaskulären glatten Muskelzellen, dem Myokard sowie der Niere charakterisieren. Im Jahr 2009 identifizierten Christelle Cousin et al Furin als Enzym, das für die intrazelluläre Spaltung des integralen Proreninrezeptors verantwortlich ist⁷⁷. Durch diese enzymatische furinspezifische Spaltung entstehen zwei weitere Erscheinungsformen des Rezeptors: 1. ein 8.9 kDa langes transmembranes/zytoplasmatisches Fragment (M8.9 genannt), das mit dem membrannahen Bereich der vakuolären H⁺-ATP-ase koprezipitiert und 2. ein 28 kDa-langes Fragment, das als löslicher Proreninrezeptor gekennzeichnet ist und im Kulturzellenmedium sowie in biologischem Material (wie Plasma und Urin) nachweisbar ist. Das M8.9-Segment und der ungespaltene Proreninrezeptor stehen intrazellulär mit der vakuolären proton-transportierenden ATPase (v-H⁺-ATPase) in einer engen physiologischen Verbindung. Die schematische Darstellung der Struktur von der v- H⁺-ATPase ist auf der Abbildung 9. ersichtlich.

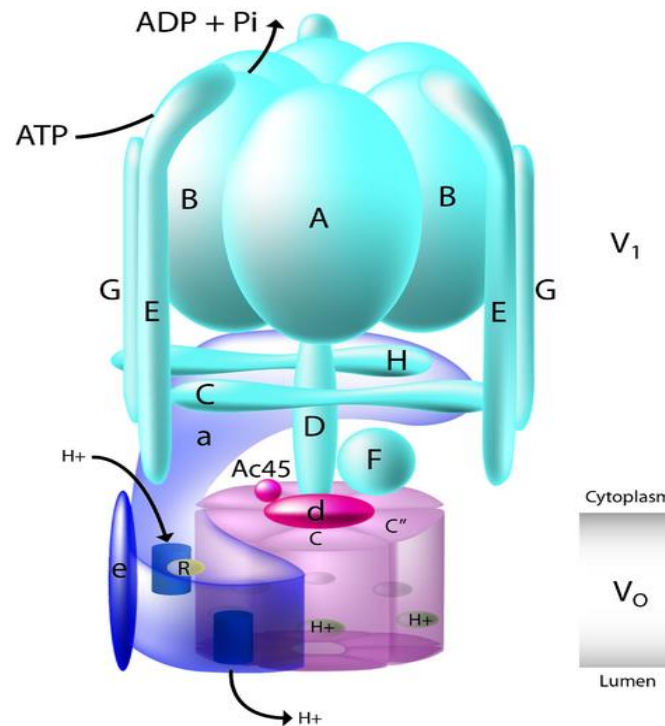


Abbildung 9. Es können zwei funktionellen Domänen V_1 und V_0 mit eigenen Untereinheiten identifiziert werden. Während die V_1 -Einheit das ATP hydrolysiert, ist die V_0 -Einheit für den H^+ -Transport durch die zelluläre Membran verantwortlich. www.wikipedia.org

Die $v\text{-H}^+$ -ATPase befindet sich auf der Zellmembran sowie in den intrazellulären Organellen verschiedener Gewebe und sorgt für die Regulation der intrazellulären pH-Homöostase, für die Aufrechterhaltung eines sauren pH-Wertes in den lysosomalen Vesikeln sowie für die Azidifizierung des Urins⁷⁷. Die DNA-Sequenz des Prorenins ist identisch mit dem Gen des ATP-ase assoziierten Proteins 2 (ATP6ap2), das eine Untereinheit der $v\text{-H}^+$ -ATPase ist. Aus diesem Grund ist das Gen, das Prorenin kodiert, als ATP6AP2 gekennzeichnet. Für die biologische Funktion sind zwei strukturelle Einheiten der $v\text{-H}^+$ -ATPase entscheidend. Die V_1 -Einheit stellt einen 650 kDa langen zytoplasmatischen Teil der $v\text{-H}^+$ -ATPase dar. V_1 spaltet ATP ab und dabei besteht keine Möglichkeit einer eigenen ATP-Synthese. Die V_0 -Einheit ist tatsächlich für den Transport der H^+ -Protonen durch die Phospholipidmembran zuständig. Für die regelrechte Funktion der $v\text{-H}^+$ -ATPase ist die Zusammenarbeit von 14 Untereinheiten erforderlich. PRR ist nicht an der Bildung des $v\text{-H}^+$ -ATPase-Komplexes involviert, aber seine enge räumliche Verbindung mit der V_0 -Einheit deutet auf eine regulatorische Rolle des PRR im Hinblick auf die V_0 -Formation hin.

Kinouchi et al haben nach mühsamer Arbeit die Mäuse mit einer PRR-Gen- Deletion ausschließlich in Kardiomyozyten erzeugt⁸⁵. Diese Mäusen entwickelten drei Wochen nach der Geburt eine schwergradige Herzinsuffizienz. Histologische Analysen ergaben zahlreiche intrazelluläre Alterationen wie desorganisierte intrazelluläre fibrilläre Strukturen mit exzessiven

autophagischen Vakuolen, was auf eine gestörte Funktion der $v\text{-H}^+$ -ATPase zurückzuführen war. Durch eine mangelnde Expression von PRR erfolgte eine Unterregulation vor allem V_0 -Komponenten der $v\text{-H}^+$ -ATPase. Damit ist der Proreninrezeptor durch seine regulatorische Rolle in der Funktion von $v\text{-H}^+$ -ATPase der entscheidende Faktor in der Homöostase zahlreicher Zellarten (wie zum Beispiel Podozyten, Neutrophilen, Osteoklasten etc.).

Cruciat et al überraschten mit der Entdeckung, dass die extrazelluläre und transmembranöse Domäne des PRR gemeinsam mit LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) in der Regulation des Wnt/ β -catenin- Signalweges involviert sind ⁸³ .

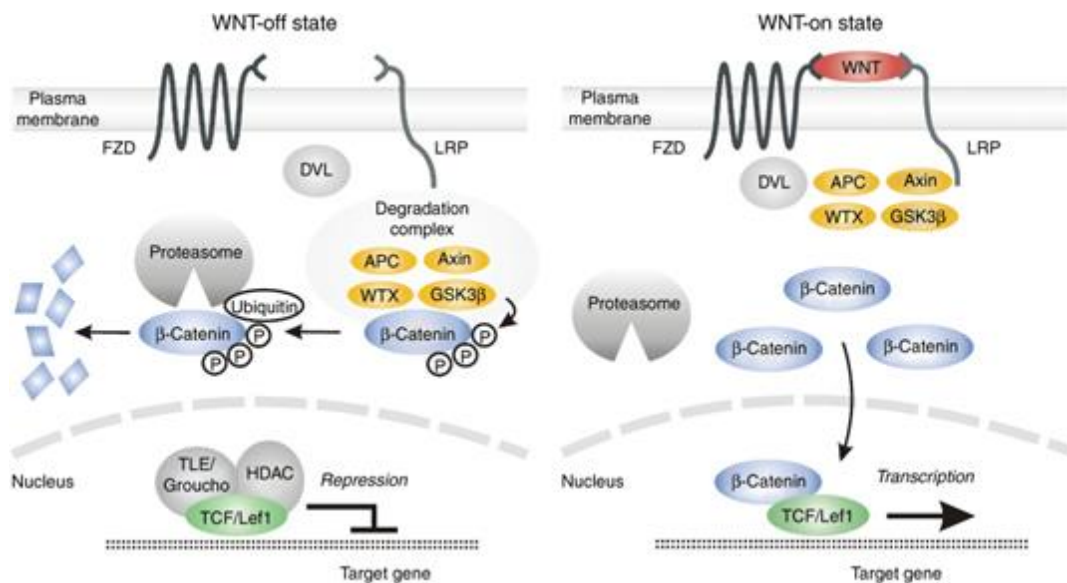


Abbildung 10. Die Aktivierung des Wnt/ β -catenin –Signalweges. Nach der Bindung von Wnt-Protein zu Frizzled-Rezeptor (FZD) kommt es zur Interaktion mit LRP6. Dieses Komplex aktiviert Dishevelled- Cofactor (DVL), der den Destruktionskomplex (APC, Axin, glycogen synthase kinase 3 (GSK3), casein kinase 1 (CK1)) für β -catenin inaktiviert. Dadurch im Überfluss entstandenes β -catenin bindet sich zu Transkriptionsfaktoren TCF und Lef 1, was zu Beeinflussung der Genexpression führt.

Der Wnt- Signalweg ist einer von vielen Signaltransduktionswegen, durch die die Zellen auf äußere Signale reagieren können. Eine schematische Darstellung der biochemischen Abläufe nach der Aktivierung des Wnt- Signalweges sind auf der Abbildung 10. präsentiert. Der Wnt-Signalweg ist unter anderem für die normale Embryonalentwicklung, für die Zellproliferation sowie für die Homöostase der Stammzellen essenziell. Der Wnt/ β -catenin kanonische Weg, der nicht kanonische Wnt- Signalweg der planaren Polarität und der nicht kanonische Wnt/Kalzium-Signalweg sind bisher am besten erforscht. Es wurde postuliert, dass PRR gemeinsam mit der $v\text{-H}^+$ -ATPase für die regelrechte Funktion von allen Wnt- Signalwegen notwendig ist. Ein knock-down Xenopus für PRR zeigt eine gestörte körperliche Morphogenese sowie Pigmentierungsdefizite ⁸⁶ .

Es ist wichtig zu betonen, dass PRR im Falle der v-H⁺-ATPase und des Wnt/β-catenin- Signalweges eine Funktion leistet, die völlig unabhängig sowohl von Prorenin/renin-Konzentration als auch von der PRR- vermittelten intrazellulären ERK1/2-Aktivierung ist. Da es sich um entscheidende molekularbiologische Kaskaden der Embryogenese handelt, ist der Misserfolg in der Entwicklung von PRR-„knock-out“- Mäusen im Hinblick auf die ubiquitäre Expression leichter zu erklären.

Der lösliche Proreninrezeptor (sPRR)

Der löslichen Fraktion des Proreninrezeptors (sPRR) ist bisher keine besondere Rolle zugeschrieben. Es ist bekannt, dass sPRR das Renin und Prorenin im Plasma binden kann, wobei es zu keiner enzymatischen Aktivierung des Prorenins kommt. sPRR- Renin kann unverändert Angiotensin spalten. Watanabe B et al fanden, dass die Patientinnen mit einem erhöhten sPRR-Plasmaspiegel im ersten Trimester der Schwangerschaft eine Risikoerhöhung um 2.90 (95% confidence interval 1.11-7.49) hinsichtlich der Entwicklung des Gestationsdiabetes mellitus im weiteren Verlauf der Schwangerschaft haben⁸⁷. In Anbetracht des Metabolismus des PRR ist es gerechtfertigt zu vermuten, dass mit einer auf der Zellebene verlaufenden PRR- Aktivierung durch Prorenin und Renin und somit einer gewebespezifischen ANG II-Produktion eine erhöhte Plasmakonzentration von löslichem Proreninrezeptor einhergeht.

Es ist wichtig zu betonen, dass durch eine Überaktivierung von PRR- Rezeptoren bei erhöhtem Renin/Prorenin-Plasma-Spiegel unter ACE-Hemmer-Therapie potenzielle Schaden verursacht werden könnten, die bisher nicht erkannt wurden. Die ACE-Hemmer-Therapie könnte dadurch neben bereits bekannten positiven Effekten auf die Herzhypertrophie, Vaso- und Nephroprotektivität gleichzeitig mittels Aktivierung der PRR- Rezeptoren auf der Gewebeebe umgekehrte Auswirkungen haben. Dafür spricht auch die Tatsache, dass es mittels einer AT₁-Rezeptor- und ANG II- Überexpression ausschließlich im Herzmuskel nur unter weiteren pathologischen Rahmenbedingungen (wie z.B Volumenbelastung oder arterieller Hypertonie) zu einer Myokardhypertrophie und Fibrose kommt⁵¹.

Bisher fehlten wissenschaftlichen Ergebnisse aus randomisierten klinischen Studien, die näheren Einblicke in die Eigenschaften des löslichen Proreninrezeptors ermöglichen konnten. Abgesehen von einer Assoziation zwischen bestimmtem Gen-Polymorphismus des PRR-Gens (ATP6ap2-Polymorphismus) in einem ambulanten Patientenkollektiv japanischer Männer mit einer arteriellen Hypertonie, verfügen wir bis zu diesem Zeitpunkt über keinen Überblick über das PRR- Verhaltensmuster im klinischen Setting der chronischen Herzinsuffizienz oder des chronischen kardierenalen Syndroms. Weiterhin war uns wichtig festzustellen, ob eine Ver-

bindung zwischen Konzentration von löslichem PRR und klinischen Merkmalen einer Herzinsuffizienz (Eingeschränkte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, kardiale Hypertrophie) zu diagnostischen und prognostischen Zwecken benutzen werden darf.

Zudem konnte eventuell eine Hemmung der Bildung des Prorenin-PRR- Komplexes neue therapeutische Optionen bei Patienten mit renalen Komplikationen darstellen, insbesondere bei den Patienten, bei denen eine Erhöhung der Prorenin-Plasma-Konzentration im Rahmen der verschiedenen Grunderkrankungen entsteht (wie z.B Diabetes Mellitus mit mikrovaskulären Komplikationen).

Unter Berücksichtigung der bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Fakten, lässt sich die Frage über die Bedeutung sowie die eventuelle diagnostische Anwendung des löslichen Proreninrezeptors in der chronischen Herzinsuffizienz stellen.

5. Zielstellung der Arbeit

In vorliegender Arbeit wollten wir folgende Fragen beantworten:

1. Ist der lösliche Proreninrezeptor bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz dysreguliert?
2. Können weitere relevante Untergruppen im Patientenkollektiv der chronischen Herzinsuffizienz durch den sPRR- Spiegel unterschieden werden. Dabei interessieren uns folgende Patientengruppen besonders:
 - a) Patienten mit systolischer versus diastolischer Herzinsuffizienz
 - b) Patienten mit fortgeschrittenen strukturellen Veränderungen des Herzens (Hypertrophie und/oder Dilatation)
 - c) Patienten mit begleitenden Erkrankungen, die Verlauf der Herzinsuffizienz beeinflussen (Diabetes mellitus oder chronische Niereninsuffizienz)
3. Ändern sich die sPRR- Spiegel in Abhängigkeit von der angewendeten medikamentösen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (ACE-Hemmer, Beta-Blocker, Diuretika usw.)
4. Könnte die Art und das Ausmaß dieser Dysregulation den Einsatz vom sPRR als potenziellen Biomarker der Herzinsuffizienz gerechtfertigen

6. Material und Methoden:

6.a. CIBIS-ELD Studie

Der lösliche Proreninrezeptor (sPRR) wurde in dem Patientenkollektiv der CIBI-ELD- Studie bestimmt. CIBIS-ELD war eine randomisierte, parallele, doppelblinde, investigator-initiierte Phase III, multizentrische klinische Studie. Es wurden ältere Patienten (≥ 65 Jahre) mit einer systolischen oder diastolischen Herzinsuffizienz eingeschlossen. Die Studie wurde durch die Charité initiiert und international geführt. 41 Forschungszentren haben an der Durchführung der Studie teilgenommen (Deutschland, Serbien, Montenegro und Slowenien). Alle Patienten wurden von April 2005 bis April 2008 in die Studie eingeschlossen. Der große Teil der Patienten wurde von niedergelassenen Internisten und Kardiologen zugewiesen.

Nur rekompensierte Patienten mit einer stabilen Symptomatik konnten entsprechend der strengen Ein- und Ausschlusskriterien an der Studie teilnehmen (Tabelle 2.). Nach Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung über die Studienteilnahme und einer ausführlichen Aufklärung über den Studienablauf sowie möglichen Nebenwirkungen der Studienmedikation, konnte einer Teilnahme stattgegeben werden.

Einschlusskriterien

- Schriftliche Patienteneinwilligung für die Teilnahme an der Studie
- Lebensalter ≥ 65 Jahre
- Chronische Herzinsuffizienz (NYHA II-IV)
- Keine akute kardiale Dekompensation in den letzten 2 Wochen
- Systolische Herzinsuffizienz mit $LVEF \leq 45\%$ (dokumentiert mittels Echokardiografie, Levokardiografie oder Magnetresonanztomografie) und/oder echokardiografischen Parametern der diastolischen Dysfunktion (Stadium > 1)

Tabelle 2. Haupteinschlusskriterien der CIBIS-ELD-Studie ⁸⁸

Der primäre Endpunkt der CIBIS-ELD- Studie war die Verträglichkeit der nach Leitlinien empfohlenen Auftitrierung von zwei Beta-Blockern (Bisoprolol und Carvedilol) innerhalb von 12 Wochen bei älteren Patienten mit einer klinisch stabilen chronischen Herzinsuffizienz. Als sekundäre Endpunkte wurden unerwünschte Ereignisse sowie verschiedene klinische Parameter der kardialen Dekompensation ausgewertet.

Klinische Charakteristika des Patientenkollektives der CIBIS-ELD Studie sind in Tabelle 3. zusammengefasst.

	Alle	Bisoprolol (n=431)	Carvedilol (n=445)
Frauen (%)	329(38)	167(39)	162(36)
Alter (Mittelwert±SD)	72.8±5.5	72.9±5.6	72.7±5.5
Blutdruck-systolisch (Mittelwert±SD in mmHG)	137±21	137±21	137±22
Blutdruck-diastolisch (Mittelwert±SD in mmHG)	80±12	80±12	80±12
Herzfrequenz (Mittelwert±SD)	73±14	74±15	73±14
BMI (Mittelwert±SD)	27.7±4.9	28.0±5.0	27.6±4.7
Komorbiditäten – Anzahl (%)			
Vorhofflimmern	164(19)	83(19)	81(18)
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	121(14)	58(14)	62(14)
Hypertonie	724(83)	353(82)	371(84)
Diabetes mellitus	223(26)	107(25)	116(26)
COPD	65(7)	28(7)	37(8)
Anämie	181(21)	86(20)	95(21)
Niereninsuffizienz	338(39)	165(38)	173(39)
Depression	73(8)	34(8)	39(9)
Hyperlipidämie	548(63)	261(61)	287(65)
Med. Geschichte- Anzahl (%)			
Herzinfarkt	347(40)	163(38)	184(41)
PCI und/oder CABG	196(22)	90(21)	106(24)
Herzschrittmacher und/oder ICD	56(6)	23(5)	33(7)
LVEF (Mittelwert in %±SD)	42±14	42±14	42±13
NYHA-Klasse- Anzahl (%)			
I	34(4)	15(4)	19(4)
II	575(66)	272(63)	303(68)
III	258(30)	139(32)	119(27)
IV	9(1)	5(1)	4(1)
Medikation –Anzahl (%)			
ACE-Hemmer und/oder ARB	741(85)	374(87)	367(83)
Beta-Blocker	527(60)	256(69)	271(61)
Aldosteron Antagonisten	275(31)	145(34)	130(29)
Diuretika	649(74)	323(75)	326(73)
Herzglykoside	129(15)	64(15)	65(15)
Calciumkanalblocker	143(16)	80(19)	63(14)
Statine	342(39)	159(37)	183(41)
Antiarrhythmika	95(11)	48(11)	47(11)
Antikoagulazien	701(80)	343(80)	358(80)
Körperliches Wohlbefinden-Qo SF-36 (Mittelwert±SD)	51±25	51±24	51±26

Tabelle 3. Klinische Charakteristika des Patientenkollektives der CIBIS-ELD Studie

Die prädefinierten sekundären klinischen Endpunkte waren : NYHA- Klasse, Blutdruck, Herzfrequenz, LVEF, 6-Minuten-Gehtest, Beurteilung der diastolischen Herzinsuffizienz so-

wie der Score des körperlichen und psychischen Wohlbefindens in „short-form QoL health survey“ (SF36).

Der zeitliche Ablauf der CIBIS-ELD- Studie ist auf Abbildung 11. dargestellt. Bei der Baseline-Visite wurden neben einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung (Beurteilung des Allgemeinzustands, Herzfrequenzmessung, Blutdruckmessung, Auskultation von Herz und Lunge, Untersuchung auf Ödeme und obere Einflusstauung) auch ein Elektrokardiogramm (EKG) in Ruhe, eine 24-h-EKG Aufzeichnung, eine Echokardiographie, ein 6-Minuten-Gehtest, eine Lungenfunktionsprüfung und Blutentnahmen durchgeführt. Ein Teil der Blutproben wurde für genetische Untersuchungen auf einen CYP- Polymorphismus verwendet. Ein weiterer Teil diente der Erhebung von Laborparametern der klinischen Routine (Elektrolyte, Retentionsparameter, TSH, HbA1C, Lipidstatus, NT- proBNP) sowie der Evaluation der potenziellen neuen Biomarkern der Herzinsuffizienz. Anhand der klinisch-anamnestischen Befunde und der Ergebnisse der Echokardiografie wurde jeweils entschieden, ob ein Patient für die Studienteilnahme geeignet war oder nicht.

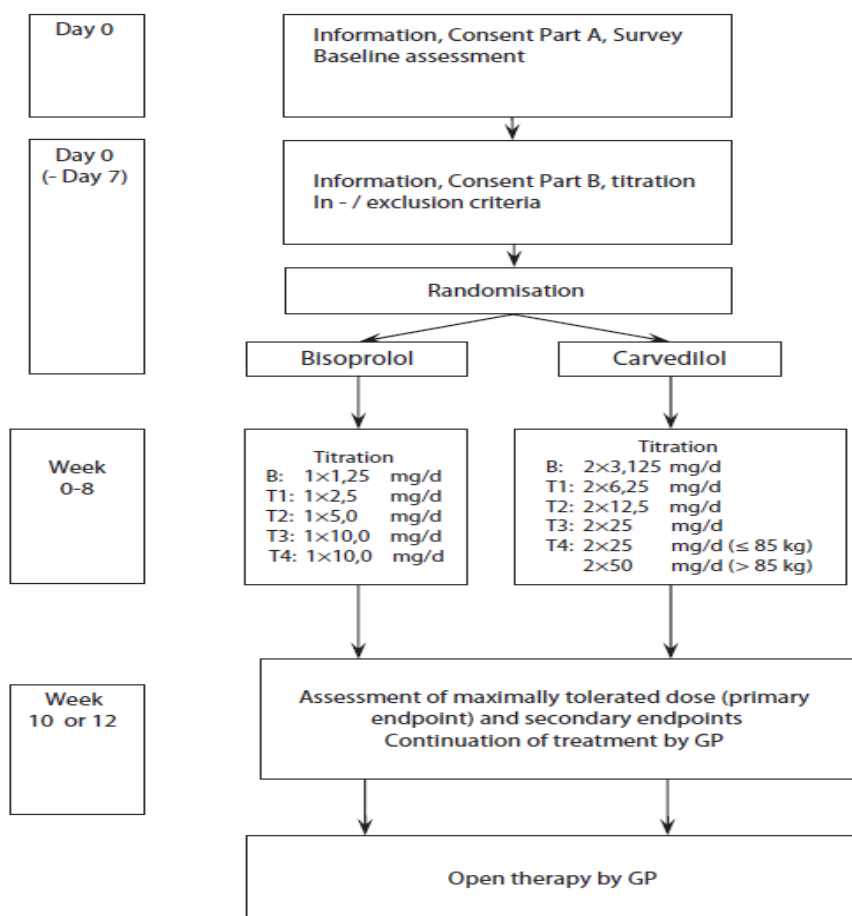


Abbildung 11. Zeitlicher Ablauf der CIBIS-ELD- Studie ⁸⁹

Nach der Erstvisite erfolgten innerhalb der folgenden 12 Wochen die Titrationsphase und die Follow-up-Untersuchung. Alle 14 Tage wurden Titrationsvisiten (T1-T4) durchgeführt, an denen die Dosissteigerung der Betarezeptorblocker stattfand. Bei eventuellen Nebenwirkungen konnten zusätzliche Visiten außerhalb des vorgesehenen Studienverlaufs vereinbart werden.

Die Dosisstufe bei der Auftitration des Beta-Blockers betrug 1/8 oder 1/4 der Tageshöchstdosis. Vor der Verabreichung der Studienmedikation war eine körperliche Untersuchung obligat. Bei jeder Studienvsiten war ein zweistündiger Aufenthalt zur Kontrolle von Herzfrequenz und Blutdruck sowie eventuellen Nebenwirkungen nach der Medikamenteneinnahme vorgesehen. Entsprechend den Leitlinien der Herzinsuffizienztherapie wurden die Patienten alle 14 Tage einbestellt und bei stabiler Symptomatik eine Verdopplung der aktuellen Dosis angestrebt. Bei jeder Titrationsvisite erfolgten wieder Anamnese, körperliche Untersuchung, Blutentnahme, Dokumentation negativer Ereignisse innerhalb der letzten 14 Tage und eine Ruhe-EKG-Aufzeichnung. Anhand der aktuellen Symptomatik wurde individuell festgelegt, ob eine weitere Dosiserhöhung möglich war, die Dosis unverändert bleiben oder sogar reduziert werden musste.

In der CIBIS-ELD- Studie wurde kein Unterschied in der erreichten Dosierung oder der Verträglichkeit bei der Auftitrierung von Bisoprolol oder Carvedilol bei älteren Patienten mit stabiler chronischer Herzinsuffizienz gefunden. Insgesamt 31% von allen beteiligten Patienten erhielten die nach Leitlinien empfohlene maximale Tagesdosis und 55% der Patienten zeigten eine gute klinische Verträglichkeit der halbierten Tageshöchstdosis. Die durchschnittliche Tagesdosis von Bisoprolol beziehungsweise Carvedilol war 5mg bzw. 23.9 mg (bei den Patienten mit einem Körpergewicht <85 kg). Der Hauptgrund für den Abbruch der Auftitration war eine symptomatische Bradykardie. Diese trat häufiger in der Bisoprolol- Gruppe auf (70 vs 47, $p=0.02$). Respiratorische unerwünschte Ereignisse (wie Verschlechterung der dynamischen Lungenvolumina, Dyspnoe, Bronchospasmen) waren häufiger in der Carvedilol-Gruppe beobachtet (44 vs 16, $p=0,01$). Ein Abfall des Hb- Mittelwertes war in der Carvedilol-Gruppe ausgeprägter, besonders bei den Patienten, die am Anfang der Studie Beta-Blocker naiv waren ($p<0.01$). Weitere unerwünschten Ereignisse (Verschlechterung der Herzinsuffizienz, Hypotension, Krankenhausaufnahme und Tod) zeigten im Gruppenvergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die CIBIS-ELD- Studie war eine der ersten großen klinischen Studien, in der die klinischen Aspekte einer Beta-Blocker-Therapie im älteren Patientenkollektiv (>65 Jahre) wissenschaftlich evaluiert wurden.

Für die Analyse der vorliegenden Arbeit wurden alle Daten sowie Blutproben der Baseline-Untersuchung (Erstvisite vor dem Beginn der Titrationphase) aus dem Patientenkollektiv der CIBIS-ELD-Studie unter Berücksichtigung der Datenschutzbestimmungen ausgewählt.

Aus einer peripheren Vene wurden zirka 9 ml Blut in eine Serum-Monovette (S-Monovette ®, 9 ml, Sarstedt) abgezogen und 30 Minuten zur Blutgerinnung stehen gelassen. Anschließend wurde die verschlossene Serum-Monovette 10 Minuten bei 2800 g zentrifugiert (Universal 32 R, Hettich-Zentrifuge). Der Versand der Proben erfolgte bei einer maximalen Transportzeit von drei Tagen mit der Deutschen Post AG an ein Labor in Berlin-Buch. Hier wurden jeweils 1,5 ml der Serumproben in ein Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml, Sarstedt) abpipettiert und bei - 80 °C gelagert.

Als Kontrollgruppe dienten die Proben von gesunden Probanden, bei denen mittels Anamnese, körperlicher Untersuchung sowie kardiologischer Diagnostik (EKG, Echo) kardiologische Pathologien weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Eine medikamentöse Therapie lag bei keinem vor.

6.b. Die Bestimmung von sPRR

Die quantitative Bestimmung von sPRR im Serum der chronisch herzinsuffizienten Patienten erfolgte mittels eines ELISA-Testverfahrens der Firma CellTrend (Berlin, Deutschland). Es handelte sich um „sandwich-ELISA“, der für die quantitative Analyse der sPRR in komplexen Proben (Serum, Plasma und andere physiologischen Flüssigkeiten) hergestellt wurde.

Im ersten Schritt wurden Standard-Kontrollen bzw. -Proben in Mikrotiterwells pipettiert. Nach dem Waschvorgang wurden die mit Biotin markierten anti-sPRR-(Kaninchen)- Antikörper hinzugefügt. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Gabe von mit dem Enzym verbundenem Streptavidin. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Substratlösung in Mikrotiterwells inkubiert. Es entwickelte sich die entsprechende Solutionsverfärbung, in Abhängigkeit von der Konzentration des sPRR- Antikörper- Komplexes.

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe einer Stop-Lösung beendet. Die Farbintensität ist dabei direkt proportional zu der Konzentration von intaktem sPRR in der Probe. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

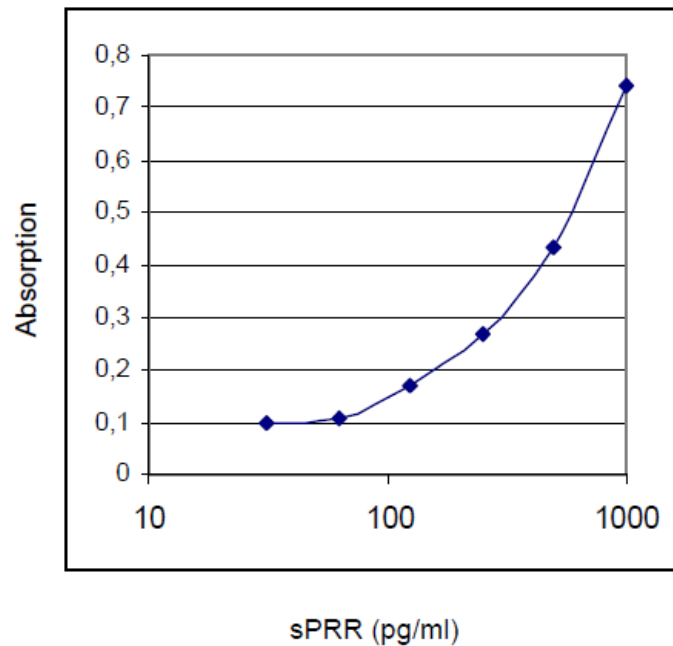


Abbildung 12. Die Standard-Kurve, die für die sPRR- Bestimmung benutzt wurde.

Da sich synthetischer sPRR bei der Determinierung der Standardkurve als instabil zeigte, für die Kalibrierung und Standardkurve des ELISA-Testverfahrens wurde ein sPRR- Positivserum verwendet. Dementsprechend wurden die sPRR- Einheiten in Units/ml angegeben. Ungefähr entsprechen 250 pg/ml etwa 25 Units/ml.

6.c. Ethik

Die Teilnahme an der Titrationsphase der vorliegenden klinischen Studie erfolgte gemäß der strengen Ein- und Ausschlusskriterien, sowie nach ausführlicher Aufklärung über den Studienablauf und das Auftreten möglicher Nebenwirkungen. Eine schriftliche Einverständniserklärung musste vorliegen, welche zu jedem Zeitpunkt ohne Nennen von Gründen zurückgezogen werden konnte. Die Befragungen zum körperlichen Wohlbefinden erfolgten nach dem zuvor durch die Ethikkommission der Charité genehmigten zusätzlichen Protokoll und entsprechender Patienteninformation und Einwilligung. Die Studie wurde unter Berücksichtigung der ICH- GCP- Kriterien durchgeführt. Alle Personen, die an der Durchführung dieser Studie beteiligt waren, haben sich verpflichtet, die Deklaration von Helsinki und ihre Amendments zu beachten.

6.d. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 13.0.1 für Windows. Die Gruppenunterschiede wurden mittels Fisher's exact test und t-Test analysiert. Im Fall der feh-

lender Normalverteilung der quantitativen Variablen wurde U-Test angewendet. Korrelation wurde mit Hilfe von Kendall's tau bzw Spearman's rho-Analyse berechnet.

7. Ergebnisse

sPRR- Plasmakonzentration bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden

In unserer Arbeit haben wir die Blutproben von insgesamt 556 Patienten, welche die Kriterien für die Diagnose einer chronischen Herzinsuffizienz erfüllten, evaluiert. Als Vergleichsgruppe diente eine Kontrollgruppe von insgesamt 198 gesunden Probanden. Die wichtigsten klinischen Parameter der beiden Gruppen sind in Tabelle 4. zusammengefasst.

	CIBIS- Kohorte	Probanden
Anzahl	556	198
Alter (Mittelwert in Jahren)	72.1±5.4	58.5±7.4
Weibliches Geschlecht (in %)	34	67
Körpergröße (Mittelwert in cm)	167.7±9.4	168.4±9.1
Gewicht (Mittelwert in kg)	78.3±13.9	73.4±13.8
Blutdruck (Mittelwert diastolisch in mmHg)	81±11	78±10
Blutdruck (Mittelwert systolisch in mmHg)	138±21	129±15
Hypertonie (%)	83	-
Diabetes Mellitus (%)	26	-
Hyperlipidämie (%)	64	-
Raucher(%)	Ex-34 ja-8.3	Ex-36 ja-36
KHK (%)	58	-
Herzfrequenz (Schläge/Min)	73±13	72±10
6-G-test (Mittelwert in m)	331	583
Echo-parameters		
EF (Mittelwert in % ± SD)	42±13	61±7
LVEDD (Mittelwert in mm ± SD)	56±10	47±5
LVESD (Mittelwert in mm ± SD)	42±11	29±5
IVS (Mittelwert in mm ± SD)	11±2	10±1
PWD (Mittelwert in mm ± SD)	10±2	10±1

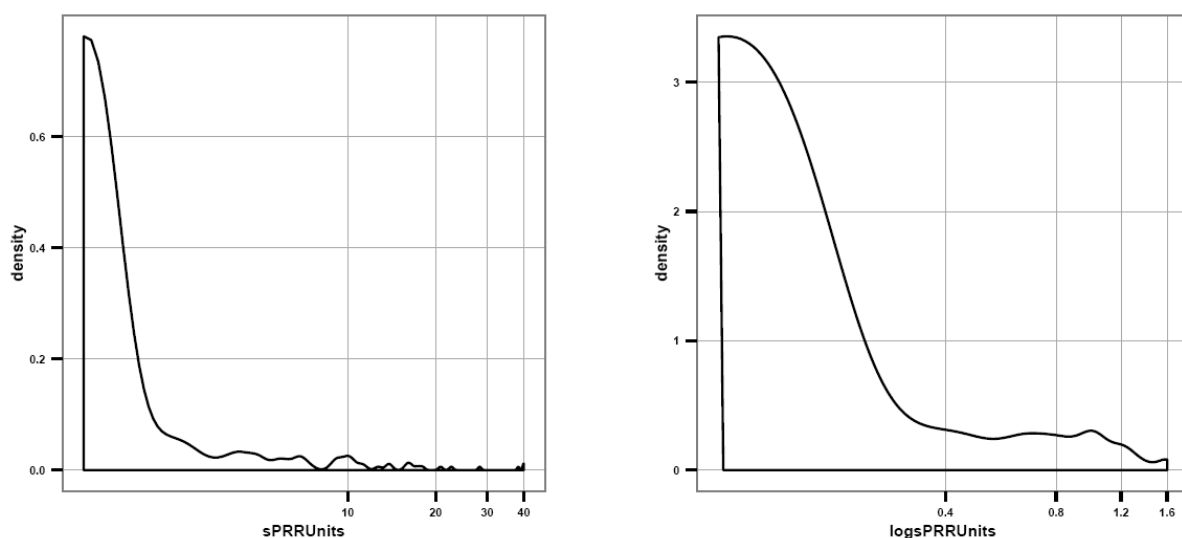
Tabelle 4. Die Charakterisierung der CIBIS- Kohorte und des gesunden Probandenkollektivs, EF- Ejektionsfraktion, LVEDD- linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, LVESD- linksventrikulärer systolischer Diameter, IVS- interventrikuläres Septum, PWD- posteriore Wand

Die gesunden Probanden waren im Durchschnitt jünger als die Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Mittelwerte in Jahren : 58.5±7.4vs. 72.1±5.4). 67.3 % der gesunden Teilnehmer waren Frauen, wobei in der Herzinsuffizienz-Gruppe deutlich weniger weibliche Patienten untersucht wurden (34%). Die verzeichnete Körpergröße war in beiden Studienkollektiven annähernd gleich (167.7±9.4cm in CIBIS- Kohorte vs. 168.4± 9.1cm bei den gesunden Probanden). Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz waren im Durchschnitt 5 kg schwerer (78.3±13.9 vs. 73.4±13.8). Der systolische Blutdruck in der CIBIS- Gruppe war im

Vergleich zu dem mittlerem systolischem Blutdruck der gesunden Probanden erhöht (138 ± 21 mmHg vs. 129 ± 15 mmHg). Eine ähnliche Konstellation fanden wir im Hinblick auf den diastolischen Blutdruck (81 ± 11 mmHg vs 78 ± 10 mmHg).

Eine Hypertonie sowie eine Hyperlipidämie waren die häufigsten Begleitdiagnosen in der Gruppe der chronisch herzinsuffizienten Patienten (83% beziehungsweise 64%). Eine koronare Herzkrankheit war bei 58% und ein Diabetes mellitus bei 26% der Patienten für die Entwicklung der Herzinsuffizienz mitverantwortlich. Neben einer deutlich besseren Gehstrecke der gesunden Probanden im Rahmen des 6-Minuten-Gehetestes (Mittelwert in m: 583m vs 331m in CIBIS- Kohorte) waren verglichen mit der CIBIS- Kohorte weiterhin die echokardiografischen Parameter im Referenzbereich. Der echokardiografische Status der CIBIS- Kohorte ist in Tabelle 4. zusammengefasst.

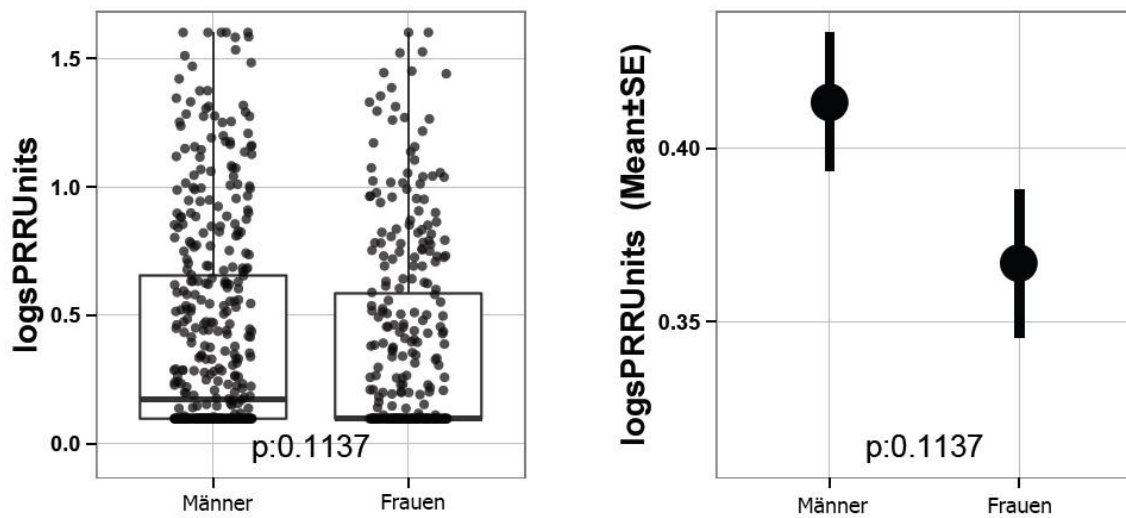
Die sPRR- Konzentrationen zeigte eine logarithmische Verteilung. Auf der Grafik 1. ist das Verteilungsmuster der sPRR- Plasmakonzentrationen vor und nach logarithmischer Transformation dargestellt. Das arithmetische Mittel betrug 0.42 ng/ml, die Standard Deviation 0.4 ng/ml und der Standardfehler 0.0172. Die sPRR- Werte wurden als Units/ml \pm Standardabweichung angegeben.



Grafik 1. Verteilung der sPRR- Plasmakonzentrationen bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz vor und nach der logarithmischen Transformation

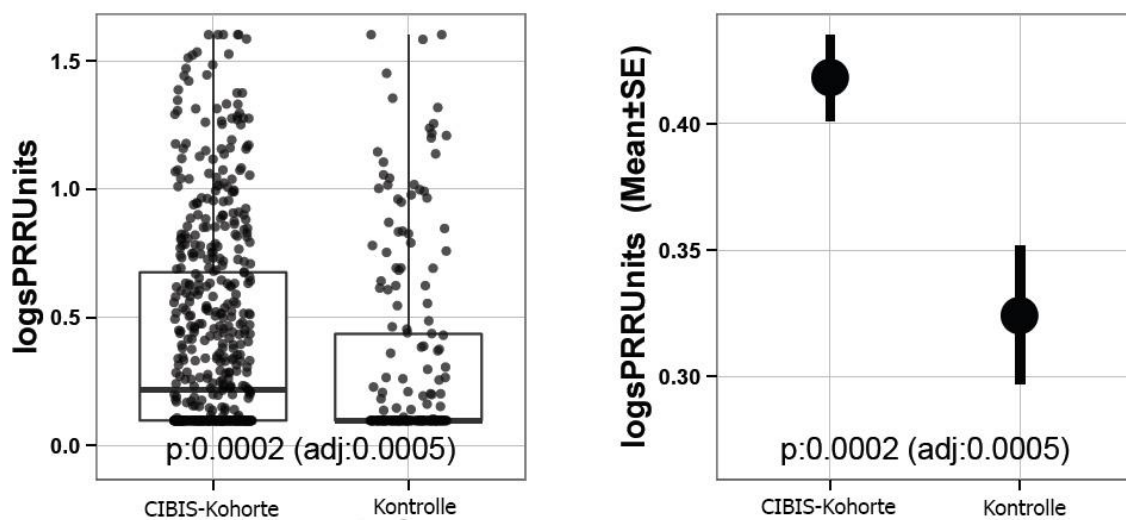
Zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CIBIS-ELD- Kohorte) gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Plasmakonzentration von löslichen Proreninrezeptoren (0.41 ± 0.41 Units/ml vs. 0.37 ± 0.38 Units/ml, $p=0.11$). Männer wiesen höhere sPRR- Plasmakonzentrationen auf (Grafik 2). Hinsichtlich der NYHA- Klasse bestanden innerhalb der CIBIS- Kohorte keine statis-

tisch signifikanten Unterschiede in der sPRR- Konzentration (0.42 ± 0.41 Units /ml vs. 0.42 ± 0.39 Units /ml, $p=0.84$).



Grafik 2. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Hinblick auf die sPRR- Konzentration in der CIBIS- Kohorte.

Bei Patienten mit einer stabilen chronischen Herzinsuffizienz wurden hoch statistisch signifikant höhere PRR- Plasmakonzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt (0.42 ± 0.4 Units / ml vs 0.32 ± 0.38 Units /ml, $p=0.0002$, Grafik 3.)



Grafik 3. Unterschiede in der sPRR- Konzentration zwischen CIBIS- Kohorte und gesunden Probanden

sPRR- Plasmakonzentration bei systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz

Aus klinischen und pathophysiologischen Gründen haben wir unser Patientenkollektiv der chronischen Herzinsuffizienz in zwei Gruppen unterteilt (Tabelle 5.).

CIBIS-Kohorte	HFREF	HFPEF
Patienten	437	119
Alter (Mittelwert in Jahren)	72,7	72,8
Weibliches Geschlecht	24,8%	68,8%
NYHA I/II/III	I-11 II-292 III-134	I-1 II-97 III-21
Größe(Mittelwert in cm)	169,3±9	162,9±9
Gewicht (Mittelwert in kg)	78±13	79±17
Blutdruck (Mittelwert in diastolisch)	76,7±10	75,5±5
Blutdruck (Mittelwert in systolisch)	126,9±18	133,2±19
Hypertonie (%)	81,5	92,0
Diabetes Mellitus (%)	27,8	22,4
Hyperlipidemia	64,0	65,6
Raucher	Ex-37,6 current-9,2	Ex-24,0 current-5,6
KHK	67,3	25,6
Herzfrequenz	67	62
6-G-test (Mittelwert in m)	343,6	361,2
	Echokardiografie	
EF (Mittelwert in %)	39,5	62,8
LVEDD (Mittelwert in mm)	58,5	46,7
LVESD (Mittelwert in mm)	45,1	29,7
IVS (Mittelwert in mm)	10,7	12,9
PWD (Mittelwert in mm)	10,2	11,8
LAVI (Mittelwert)	40,36	43,27
E/E` (Mittelwert)	13,64	10,10
LEDP (Mittelwert in mmHg)	20,55	13,00

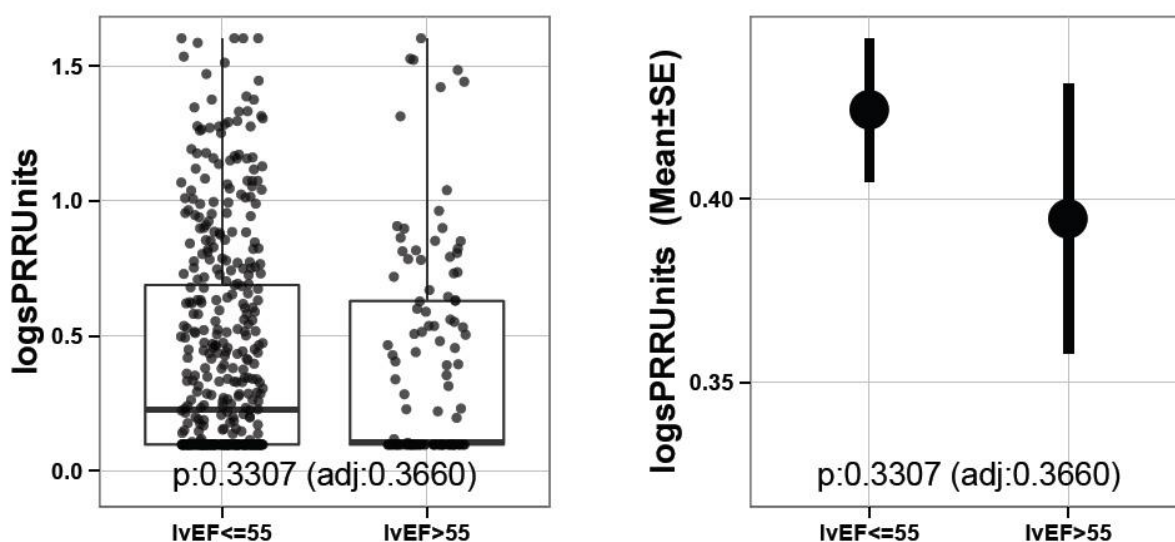
Tabelle 5. Die Baseline-Charakteristika der CIBIS- Kohorte.

In erster Gruppe befanden sich insgesamt 437 Patienten mit Symptomen und klinischen und echokardiografischen Zeichen einer chronischen Herzinsuffizienz mit einer erniedrigten linksventrikulären Ejektionsfraktion (HFREF). Die Patienten aus dieser Untergruppe beklagten vor allem eine der NYHA- Klasse II entsprechende Dyspnoe (insgesamt 292 Patienten). 134 Patienten beklagten eine Dyspnoe entsprechend NYHA Klasse-III und 11 Patienten entsprechend NYHA- Klasse I.

In der Gruppe von 119 herzinsuffizienten Patienten mit erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion (HFPEF) beklagten insgesamt 97 Patienten Dyspnoe NYHA- Klasse II. Der

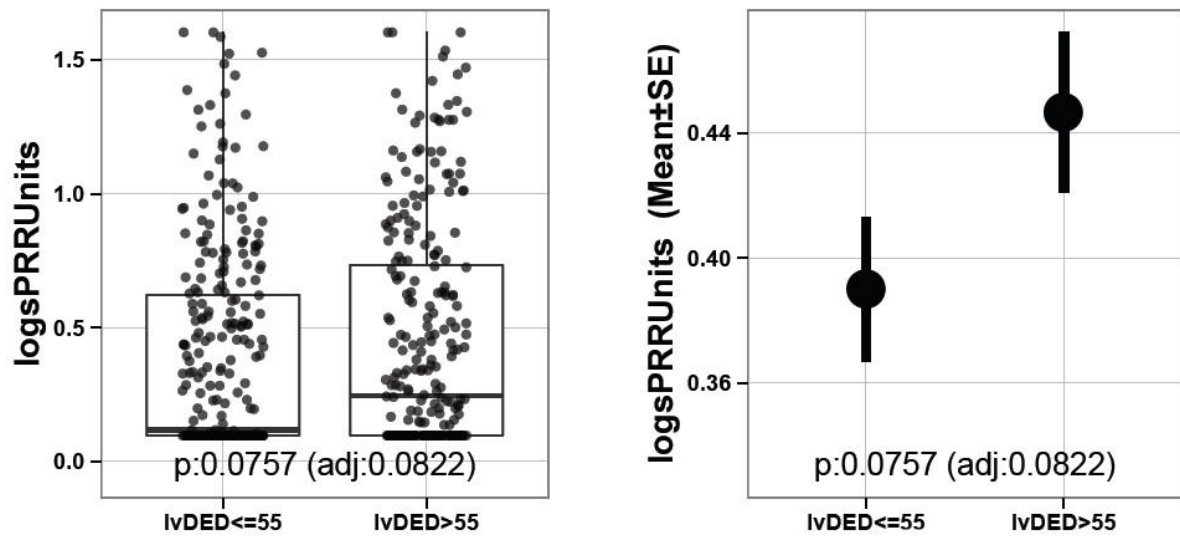
systolische Blutdruck war in der HFREF- Gruppe durchschnittlich um 6.3 mmHg niedriger im Vergleich zu HFPEF- Gruppe ($126,9 \pm 18$ vs. $133,2 \pm 19$). Dementsprechend war eine arterielle Hypertonie prozentual seltener vorkommend in HFREF- Gruppe (81.5% vs 92%). Die koronare Herzkrankheit war am häufigsten für die Genese der HFREF verantwortlich (67.3% vs 25.6). Körperliche Leistungsfähigkeit, gemessen mit 6-Minute-Gehtest, war erwartungsgemäß in der HFREF im Vergleich zu HFPEF erniedrigt (343,6 m vs. 361,2 m).

Auf der Grafik 4. sind die Unterschiede in der sPRR- Konzentration zwischen HFREF und HFPEF- Patienten ersichtlich. Die herzinsuffizienten Patienten mit einer eingeschränkten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF < 55%) haben verglichen mit Patienten mit einer erhaltenen linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF > 55%) einen erhöhten sPRR Plasmaspiegel (0.42 ± 0.41 Units / ml vs 0.39 ± 0.39 Units / ml, $p=0,330$)



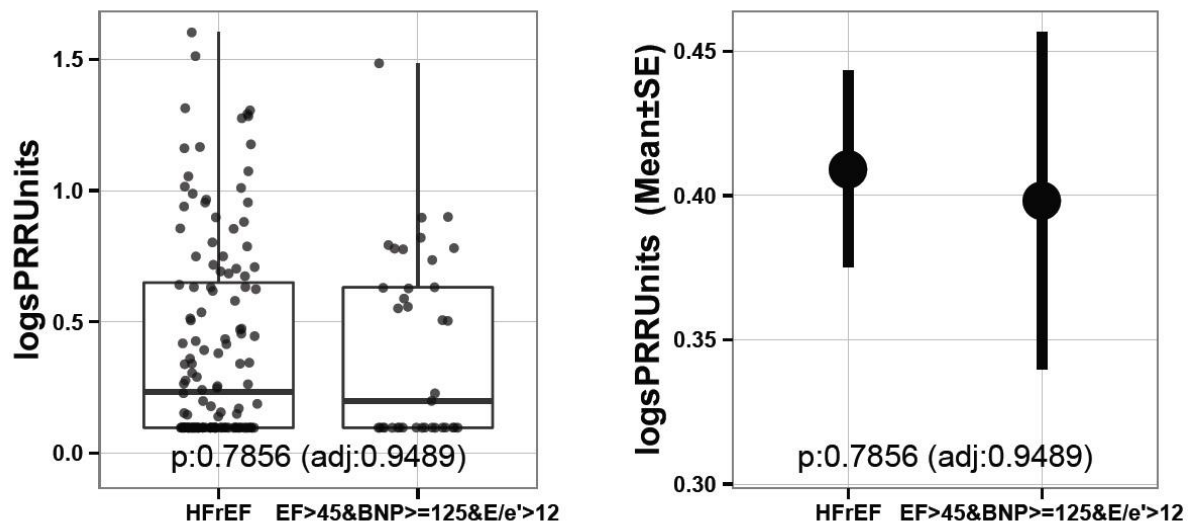
Grafik 4. Die Unterschiede in der sPRR- Konzentration zwischen HFREF (LVEF ≤ 55%) und HFPEF (LVEF > 55%)

Weiterhin wollten wir feststellen, ob strukturelle Veränderungen des linken Ventrikels, die bei der Progression einer Herzinsuffizienz entstehen, einen Einfluss auf die sPRR-Plasmakonzentration ausüben (Grafik 5.) LVDED steht für einen linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser. Unter einer linksventrikulären Dilatation versteht man einen LVDED von mehr als 55 mm. Wir fanden, dass bei einer linksventrikulären Dilatation und somit Zeichen einer dilatativen Kardiomyopathie die Konzentration des löslichen Prorenins ansteigt (0.45 ± 0.42 Units/ml bei LVDED > 55mm vs 0.39 ± 0.39 Units /ml bei LVDED < 55mm, $p=0,075$).



Grafik 5. Die Unterschiede der arithmetischen Mittel im Hinblick auf morphologische Zeichen einer linksventrikulären Dilatation (LVDED < 55mm) innerhalb der CIBIS- Kohorte

Zwischen den Patienten mit einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion und Patienten mit echokardiografischen und laborchemischen Kriterien einer fortgeschrittenen linksventrikulären diastolischen Relaxationsstörung (LVEF > 45%, BNP-Konzentration im Plasma mehr als 125 pg/ml, E/e' > 12) bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der sPRR-Plasmakonzentration (0.41 ± 0.39 Units /ml vs 0.4 ± 0.35 Units/ml, $p=0,785$, Grafik 6).

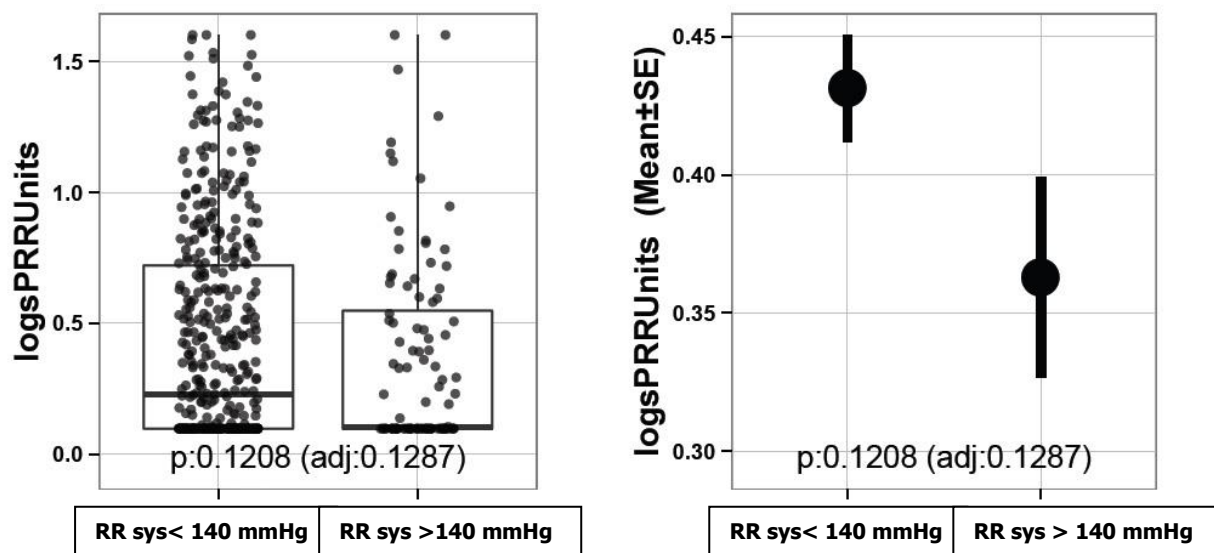


Grafik 6. Die Unterschiede in der sPRR- Konzentration im Hinblick auf das Vorhandensein einer diastolischen Herzinsuffizienz

sPRR- Plasmakonzentration und arterielle Hypertonie

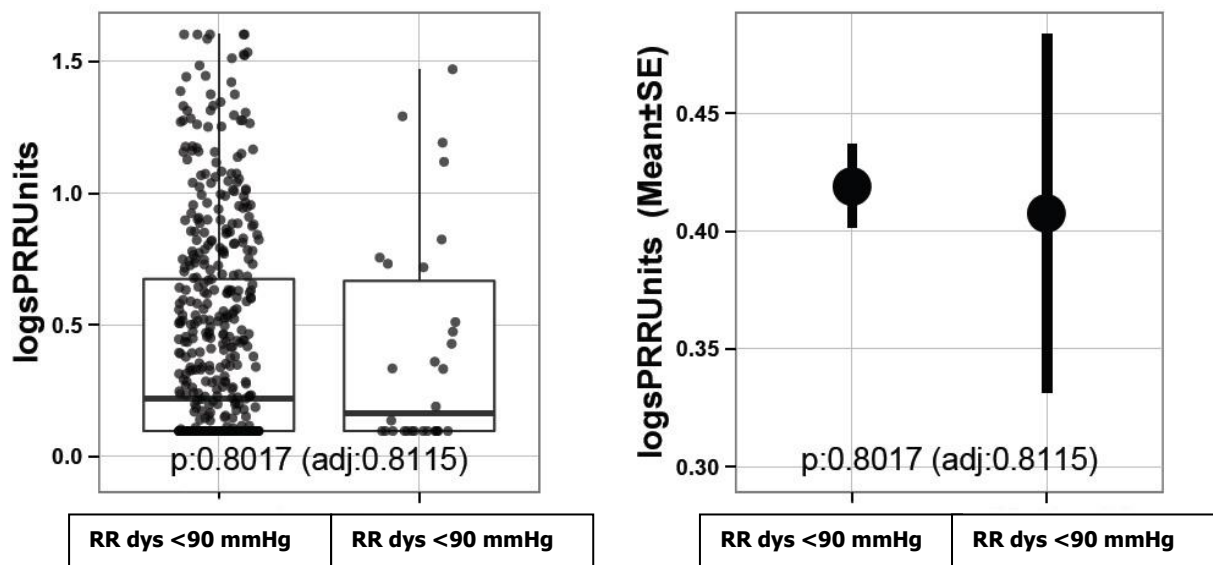
In der Cibis-Kohorte konnte anamnestisch bei insgesamt 83% der Patienten eine arterielle Hypertonie nachgewiesen werden. Der durchschnittliche Wert für den systolischen Blutdruck betrug 138 ± 21 mmHg, für den diastolischen Blutdruck lag der Wert bei 81 ± 11 mmHg.

Unter den Herzinsuffizienzpatienten bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Konzentration des sPRR im Hinblick auf das Vorhandensein einer systolischen Hypertonie (0.43 ± 0.41 Units /ml 0.36 ± 0.37 Units /ml, $p=0.1208$). Ein höherer Plasmaspiegel wurde bei chronisch herzinsuffizienten Patienten mit einem systolischen Blutdruck unter 140 mmHg verzeichnet (Grafik 7.).



Grafik 7. Die Unterschiede in der sPRR- Konzentration innerhalb der CIBIS- Kohorte in Bezug auf eine systolische Hypertonie (RR sys auf der Grafik)

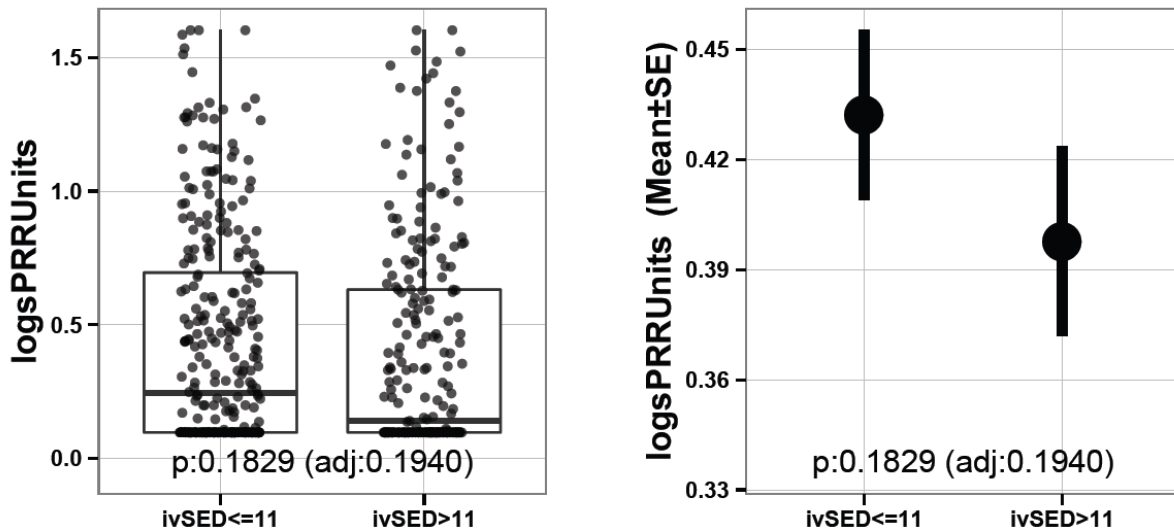
Bezüglich der diastolischen Hypertonie gab es keine statistisch signifikante Differenz hinsichtlich des sPRR- Plasmaspiegels innerhalb der CIBIS- Kohorte (0.42 ± 0.4 Units /ml vs 0.41 ± 0.42 Units /ml, $p=0,801$). Analog zu den systolischen Blutdruckwerten bestand bei Patienten mit einem normalen diastolischen arteriellen Blutdruck eine Erhöhung der sPRR- Plasmakonzentration (Grafik 8).



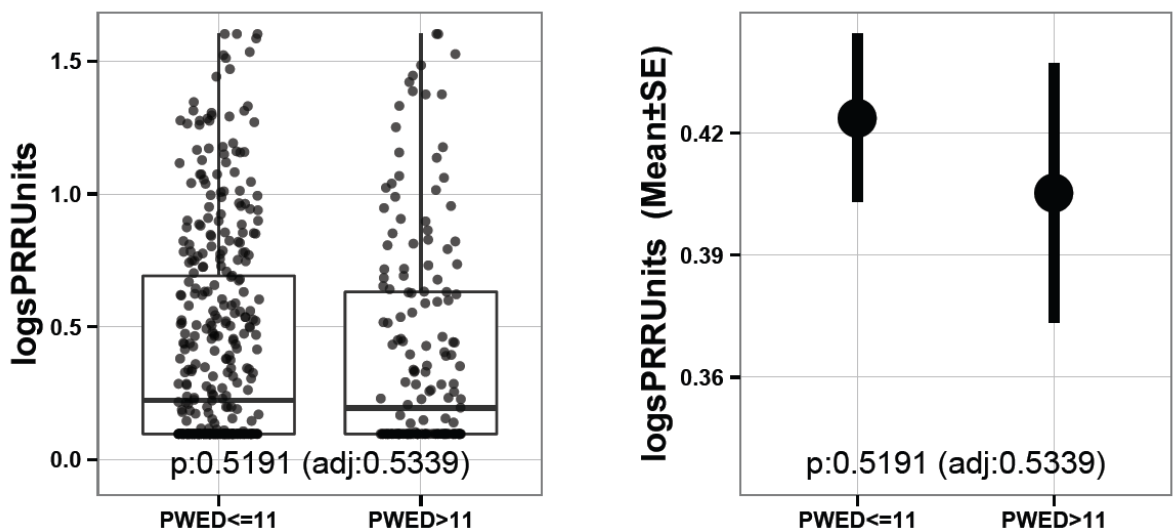
Grafik 8. Die Unterschiede in der sPRR- Konzentration innerhalb der CIBIS- Kohorte in Bezug auf eine diastolische Hypertonie (RR dys auf der Grafik).

sPRR- Plasmakonzentration und Hypertrophie

In der CIBIS- Kohorte zeigten Patienten mit einem Diameter des interventrikulären Septums (IVSED) oder der linksventrikulären Hinterwand (PWED) von weniger als 11 mm den höheren Plasmaspiegel vom sPRR im Vergleich zu Patienten mit IVSED- und PWED- Werten von mehr als 11 mm (0.43 ± 0.41 Units /ml vs 0.40 ± 0.40 Units /ml bei IVSED für $p=0.182$; 0.42 ± 0.40 Units /ml vs 0.41 ± 0.41 Units /ml bei PWED für $p=0,519$, Grafik 9. und 10.)



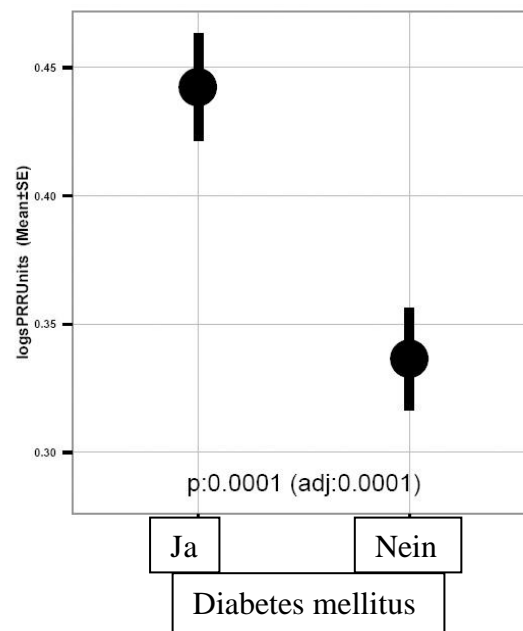
Grafik 9. Die Unterschiede in der Konzentration des löslichen Proreninrezeptors innerhalb der CIBIS-Kohorte hinsichtlich des Diameters des interventrikulären Septums



Grafik 10. Die Unterschiede in der Konzentration des löslichen Proreninrezeptors innerhalb der CIBIS-Kohorte hinsichtlich des Diameters der linksventrikulären Hinterwand

sPRR bei Herzinsuffizienz und Diabetes

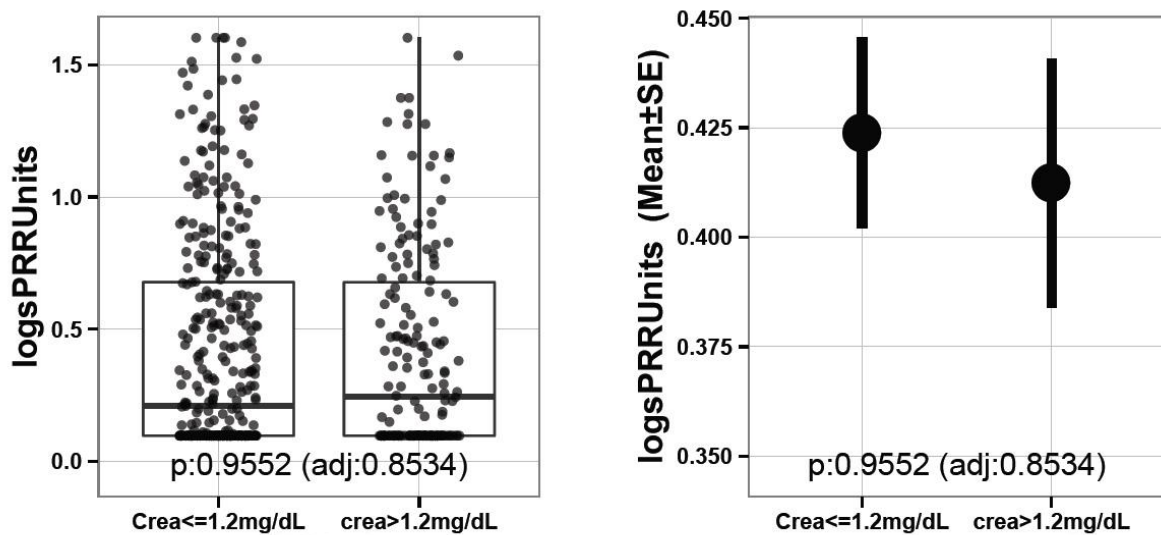
Bei der chronisch insuffizienten Patienten mit einem symptomatischen Diabetes mellitus (Typ I und Typ II, insgesamt 142 Patienten) fanden wir hoch statistisch signifikante Unterschiede in der sPRR- Konzentration im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes mellitus in der Anamnese (0.44 ± 0.42 Units/ml vs 0.34 ± 0.37 Units/ml , $p=0.0001$, Grafik 11.)



Grafik 11. Die Unterschiede in der sPRR- Konzentration im Hinblick auf das Vorhandensein eines Diabetes mellitus (Typ I und Typ II)

sPRR bei Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz

In der Gruppe der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bestand kein Unterschied in der Konzentration des löslichen Proreninrezeptors angesichts des Kreatinin-Wertes als Marker einer eingeschränkten Nierenfunktion (0.42 ± 0.42 Units /ml bei einem Kreatinin-Spiegel von mehr als 1,2 mg/dl vs 0.41 ± 0.38 Units /ml bei einem Kreatinin-Spiegel von weniger als 1,2 mg/dl für $p=0,955$, Grafik 12.)



Grafik 12. Die Unterschiede in der Konzentration von löslichen Proreninrezeptor im Hinblick auf die Kreatininkonzentration bei den Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz

Nach entsprechender Adjustierung (matched pairs und propensity score, Tabelle 6.) der statistischen Ergebnisse zeigten sich die Niveaus der statistischen Signifikanz für die evaluierte Variablen unverändert.

Parameter	n	p	p (matched pairs und propensity score)
CIBIS-Kohorte	556	0,0002*	0,0005*
Probanden	198		
HFrEF	437	0,33	0,37
HFpEF	119		
LVDED > 55 mm	268	0,07	0,08
LVDED < 55 mm	280		
Blutdruck systolisch >140 mmHg	105	0,12	0,13
Blutdruck systolisch <140 mmHg	451		
Blutdruck diastolisch >90 mmHg	31	0,80	0,81
Blutdruck diastolisch <90 mmHg	525		
IVSED > 11 mm	241	0,18	0,19
IVSED < 11 mm	308		
PWED > 11 mm	165	0,52	0,53
PWED < 11 mm	382		
Diabetes mellitus (ja)	142	0,0001*	0,0001*
Diabetes mellitus (nein)	414		
Kreatinin > 1.2 mg/dl	182	0,95	0,85
Kreatinin < 1.2 mg/dl	39		

Tabelle 6, HFrEF- systolische Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion, HFpEF- systolischer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion , LVDED- enddiastolischer linksventrikulärer Diameter, IVSED- interventrikuläres Septum enddiastolisch, PWED- linksventrikuläre posteriore Wand enddiastolisch, n-Anzahl der Patienten,p- statistische Signifikanz

Der Einfluss der Herzinsuffizienztherapie auf die sPRR-Plasmakonzentration

In Tabelle 7. sind die Medikamente aufgelistet, die die RAAS- Achse beeinflussen. Bei chronisch herzinsuffizienten Patienten unter einer Therapie mit einem ACE-Hemmer, einem Angiotensin-Rezeptorblocker oder einem Aldosteron-Antagonisten fanden wir höhere Plasmakonzentrationen von sPRR im Vergleich zu Patienten, die kein Medikament der genannten Klassen eingenommen haben. Statistisch signifikant höhere Konzentrationen von sPRR zeigten Patienten unter einer diuretischen Therapie oder einer Therapie mit einem Beta-Blocker ($p=0.0218$ bzw. $p=0.0058$). Da der sPRR- Spiegel vor der Auftitrierung des Beta-Blockers im Lauf der CIBIS-ELD-Studie bestimmt wurde, nahm die Studienintervention der CIBIS-ELD-Studie keinen Einfluss auf die Plasmakonzentration des sPRR.

Medikation	sPRR - Plasmakonzentration		
	ja	nein	p
ACE-Hemmer	0.41±0.41 Units /ml	0.37±0.39 Units /ml	p=0.10
Angiotensin- Rezeptorblocker	0.42±0.36 Units /ml	0.39±0.4 Units /ml	p=0.43
Beta-Blocker	0.42±0.40 Units /ml	0.37±0.41 Units /ml	p=0.005*
Aldosteron- Antagonisten	0.44±0.43 Units /ml	0.38±0.39 Units /ml	p=0.13
Diuretika	0.43±0.42 Units /ml	0.37±0.39 Units /ml	p=0.02*

Tabelle 7. Die Unterschiede in der sPRR- Konzentration unter Herzinsuffizienzmedikation

Korrelation von sPRR mit wichtigen morphologischen und laborchemischen Merkmalen der Herzinsuffizienz

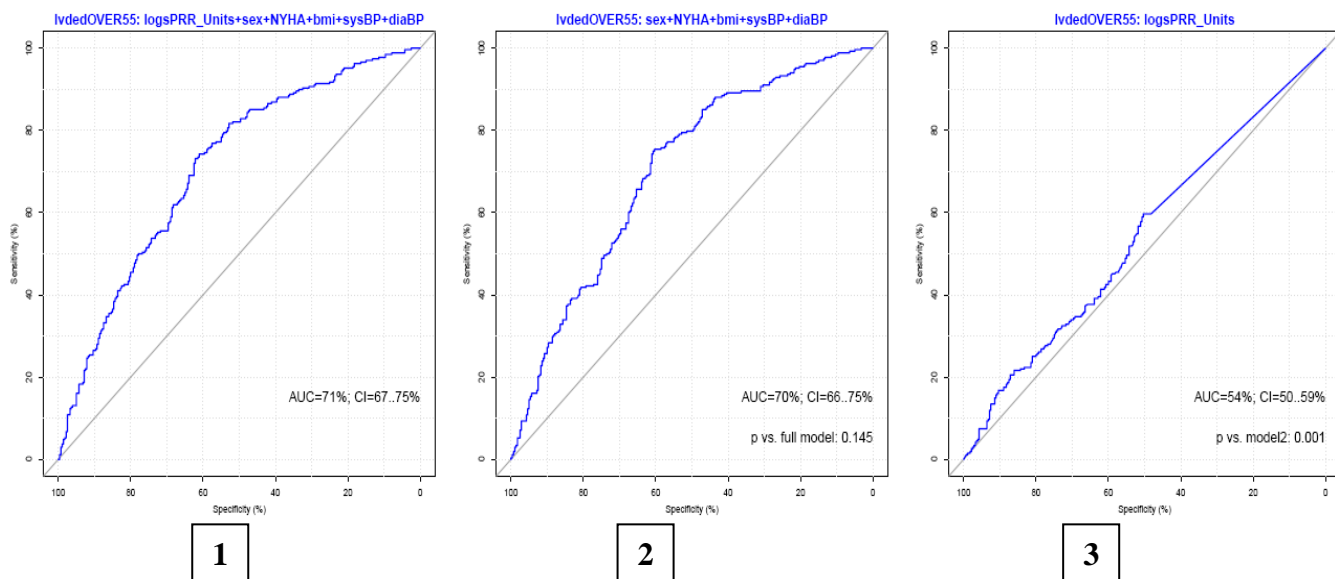
Mittels einer Korrelation wollten wir die Natur der Beziehung zwischen den wichtigsten klinischen und echokardiografischen Parametern der chronischen Herzinsuffizienz und Plasmakonzentration von sPRR erfahren (Ergebnisse in der Tabelle 8. dargestellt). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigte eine negative Korrelation mit dem Plasmaspiegel des löslichen Proreninrezeptors ($r=-0,1$, $p=0.003$). Weiterhin fanden wir eine negative Korrelation zwischen der linksventrikulären Verkürzungsfraktion und dem 6 Minuten- Gehtest mit dem sPRR Plasmaspiegel bei CIBIS- Patienten ($r=-0.012$, $p=0.087$ bzw $r=-0.13$, $p=0.769$). Der linksventrikuläre enddiastolische Diameter zeigt dagegen eine positive Korrelation ($r=0.116$, $p=0.001$). Eine ähnliche Konstellation fanden wir bei der Korrelation zwischen dem LVSED und der Plasma-sPRR- Konzentration ($r=0.105$, $p=0.004$). Eine zunehmende linksatriale Größe ging mit einem höheren sPRR- Spiegel einher ($r= 0.073$, $p=0.046$). Im Hinblick auf den HbA1c und die Kreatinin-Konzentration konnte eine negative Korrelation mit der sPRR-Plasmakonzentration verzeichnet werden ($r=-0.018$, $p=0.769$ bzw. $r=-0.13$, $p=0.769$).

Korrelation	r	p
LVEF (%)	-0.1	$p=0.003$
Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (%)	-0.012	$p=0.087$
6 Minuten- Gehtest	-0.13	$p=0.769$
LVEDD (mm)	0.116	$p=0.001$
LVESD (mm)	0.105	$p=0.004$
Linker Vorhof (mm)	0.073	$p=0.046$
HbA1c	-0.018	$p=0.769$
Kreatinin	-0.13	$p=0.769$

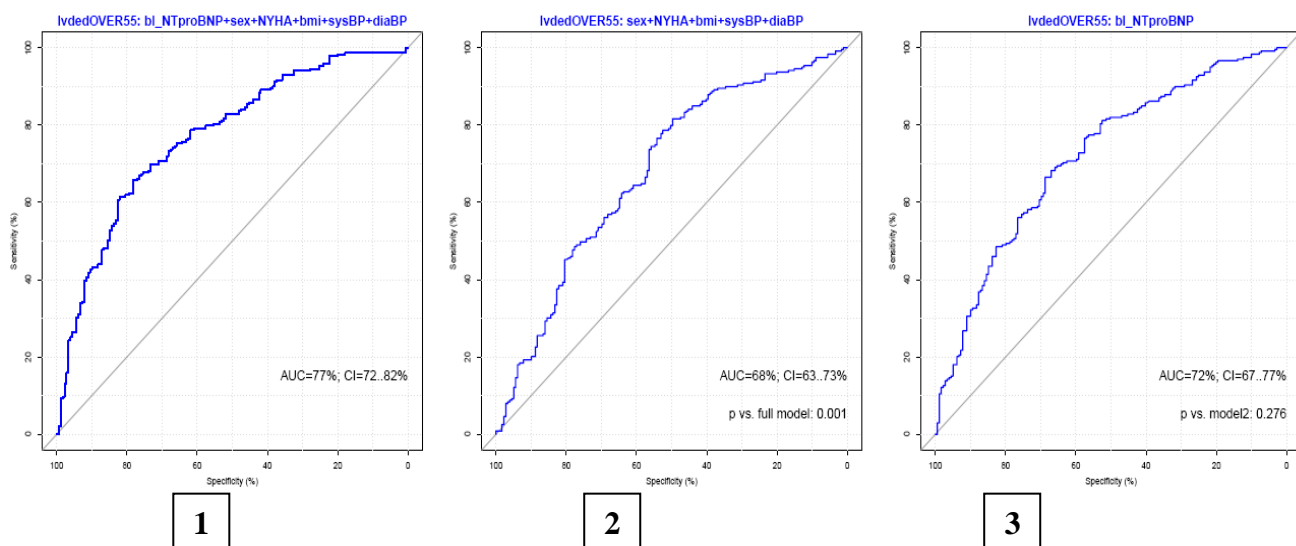
Tabelle 8. Die Korrelationsergebnisse und statistische Signifikanzniveaus für die wichtigste echokardiografische und klinische Parameter der Herzinsuffizienz

sPRR als Biomarker der chronischen Herzinsuffizienz

Auf der Grafik 13. ist der lösliche Proreninrezeptor als Prädiktor einer linksventrikulären Dilatation (LVDED>55mm) dargestellt. In dieser Eigenschaft war sRPP im multivariaten Modell der ROC- Analyse der prognostischen Fähigkeit des NT- proBNP (Grafik 14.), das als Goldstandard in der Diagnostik der Herzinsuffizienz gilt, unterlegen (AUC=0,54, 95%, CI=0.50- 0.59 für sPRR vs AUC=0.72, 95%, CI=67-77 für NT- proBNP).

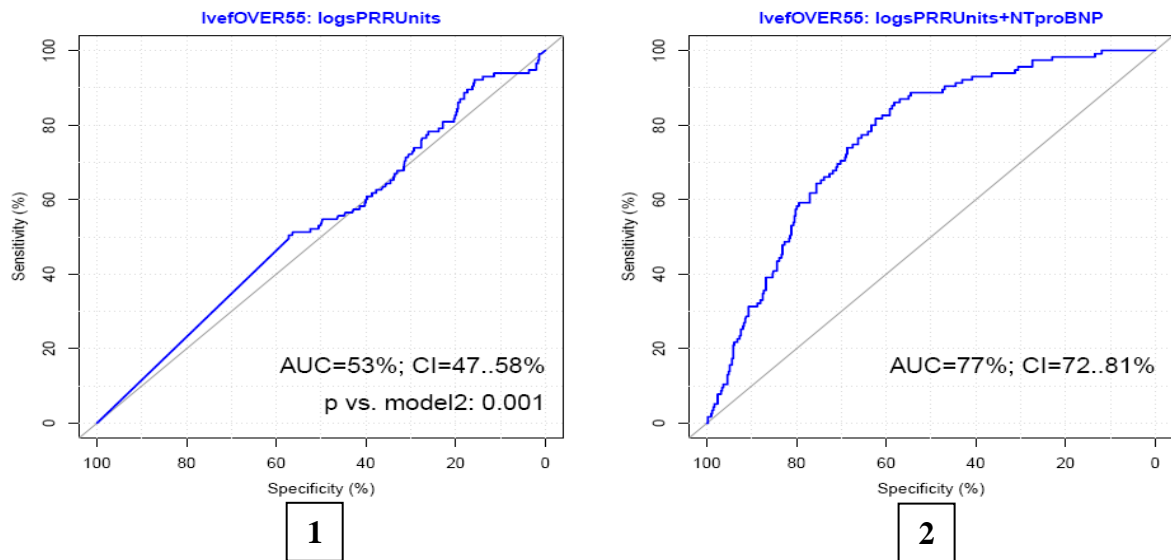


Grafik 13. ROC- Analyse des löslichen Proreninrezeptors für einen Cut-Off des LVDED>55mm, Model 1 sPRR gemeinsam mit Geschlecht, NYHA- Klasse, BMI, systolischem und diastolischem Blutdruck. Model 2 Vorhersage mittels Geschlecht, NYHA- Klasse, BMI, systolischem und diastolischem Blutdruck. Model 3 sPRR allein.



Grafik 14. ROC- Analyse des NT-proBNP für einen Cut-Off des LVDED >55mm, Model 1. sPRR gemeinsam mit Geschlecht, NYHA- Klasse, BMI, systolischem und diastolischem Blutdruck. Model 2. Vorhersage mittels Geschlecht, NYHA- Klasse, BMI, systolischem und diastolischem Blutdruck. Model 3. sPRR allein.

Auf der Grafik 15. ist der lösliche Proreninrezeptor als Prediktor einer linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) für einen Cut-Off von 55 % dargestellt. Für den sPRR wurde eine AUC von 53% für ein CI=47-58% berechnet. In dem bivariaten Modell der ROC- Analyse zeigten sPRR und NT- pro BNP eine AUC von 77% für ein CI=72-81%.



Grafik 15. ROC- Analyse des sPRR für einen Cut-Off der LVEF>55mm, Model 1. sPRR allein. Model 2. sPRR mit NT- proBNP

8. Diskussion:

Wir fanden hoch statistisch signifikant höhere Plasmakonzentrationen des löslichen Proreninrezeptors bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz verglichen mit gesunden Probanden. Weiterhin zeigen die Patienten mit einer HFREF im Durchschnitt einen höheren sPRR-Plasmaspiegel im Vergleich zu Patienten mit einer erhaltenen linksventrikulären Ejektionsfraktion ($p=0.36$). Auch eine linksventrikuläre Dilatation (LVEDD > 55mm) ging mit einer höheren sPRR-Plasmakonzentration einher. Ein enddiastolischer Durchmesser des interventrikulären Septums (IVSED) sowie der linksventrikulären posterioren Wand (PWED) von weniger als 11 mm war im Vergleich zu Patienten mit Zeichen einer linksventrikulären Hypertrophie (IVSED > 11 mm sowie PWED > 11 mm) durch einen höheren sPRR-Plasmaspiegel geprägt. Dies ist ebenfalls mit bisherigen wissenschaftlichen Ergebnissen über die Verhaltensweise des sPRR in verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen konkordant und deutet darauf hin, dass PRR eigene, von ANG-II unabhängige Wirkung auf Kardiomyozyten und die kardi-ale extrazelluläre Matrix ausübt und zum Remodeling und zur Fibrose der Herzmuskels führen kann⁹⁰.

Weiterhin fanden wir eine positive Korrelation der Plasmakonzentration der löslichen Proreninrezeptoren mit dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser, dem linksventrikulären endsystolischen Durchmesser sowie dem Durchmesser des linken Vorhofs. Gleichzeitig wurde zwischen einer aufsteigenden Konzentration von sPRR und der linksventrikulären Ejektionsfraktion sowie der Endstrecke des 6-Minutengehtests eine negative Korrelation nachgewiesen. Obwohl die Korrelation verhältnismäßig schwach ausgeprägt ist (in allen Korrelationen $0.012 < r < 0.13$), was sich eventuell durch die logarithmische Verteilung der sPRR-Konzentrationen im evaluierten Patientenkollektiv teilweise erklären lässt, könnte eine daraus abzuleitende Tendenz wegweisend sein. Laut dieser Tendenz ist der sPRR im Rahmen einer kardialen Funktionseinschränkung, die sich in einer Verschlechterung der dynamischen und morphologischen echokardiografischen Parameter widerspiegelt, hochreguliert.

Wir haben uns sPRR als möglichen Biomarker für die Herzinsuffizienz ausgesucht, weil zahlreiche Publikationen zeigen, dass PRR sowie seine lösliche Fraktion (sPRR) an mehreren essenziellen molekularbiologischen Prozessen beteiligt ist. Sowohl PRR als auch sPRR besitzen die Fähigkeit, eine Bindung mit Prorenin und Renin herzustellen. Diese Bindung führt zu einer Aktivierung des lokalen RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems) sowie zur Aktivierung von Prorenin und Renin. Zudem zeigt PRR eine dreifach höhere Affinität zu Prorenin im Vergleich zu Renin. Daraus lässt sich postulieren dass das Prosegment des Prorenins eine Prorenin-Proreninrezeptor-Bindung fördert.

Der Proreninrezeptor (PRR) ist zudem ein wichtiger Cofaktor der v-H⁺-ATPase⁹¹ und ein Bestandteil der Wnt- Signaltransduktion⁹², die zahlreiche essenzielle biologische Abläufe regulieren. Diese sind aber von seiner Rollen in der Funktion des „tissue“-RAAS unabhängig und finden in früheren Stadien der Ontogenese statt^{78,85}.

Zahlreiche experimentelle und klinische Daten beweisen, dass das Fortschreiten der chronischen Herzinsuffizienz durch die Überexprimierung von biologisch aktiven Substanzen mit schädlicher Wirkung auf das Myokard bedingt ist. Im Mittelpunkt von diesen pathophysiologischen Mechanismen steht das RAAS. Obwohl es im Vergleich zum sympathischen Nervensystem verhältnismäßig spät im Rahmen der Herzinsuffizienz zu einer Überaktivierung des RAAS kommt, sind zweifellos hämodynamische und morphologische Auswirkungen von aktiven Substanzen der RAAS- Kaskade für die zunehmende kardiale Funktionseinschränkung mitverantwortlich.

Wichtige Hinweise über die Bedeutung der pathophysiologischen Relevanz von biologischen Systemen, die als potenzielle Kandidaten für Biomarker evaluiert werden können, liefern „knock-out“ Tiermodelle. Bis zum diesem Zeitpunkt ist ein Versuch einer Deletion des PRR in allen Zellen nicht geglückt. Die Keimzellen mit einer PRR- Deletion sterben zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der embryonalen Entwicklung, so dass von einem letalen Phänotyp auszugehen ist. Ein weiterer Hinweis für die klinische Bedeutung von PRR ist die hohe Konservierung in der Evolution. Die genetische Homologie des PRR verglichen unter Menschen, Ratten und Mäusen ist 95 %, wobei die Homologie in der Amino-Säuren-Sequenz der PRR-Proteinstruktur 80% betragt. Eine konditionelle Depletion des PRR ist aber erfolgreich und bereits in den Kardiomyozyten und in unserer Arbeitsgruppe in Podozyten durchgeführt worden. Die Mäuse mit einer konditionellen Deletion von PRR in Kardiomyozyten entwickelten innerhalb von drei Wochen eine schwere Herzinsuffizienz. Die histologischen Alterationen beinhalteten große fibrotische Areale mit degenerativen Veränderungen. In den PRR- deletierten Kardiomyozyten konnten desorganisierte fibrilläre Strukturen, exzessive Vakuolisierungen sowie das Vorhandensein von autophagischen Vakuolen nachgewiesen werden. Die Tatsache dass es in diesem Tiermodell nicht wie erwartet zu einem kardioprotektiven Effekt durch die RAAS- Blockade gekommen ist, unterstreicht nur die Rolle von PRR in anderen physiologischen Kaskaden, die essenziell für die zelluläre Homöostase sind. Eine Podozyten-spezifische Deletion von PRR beeinträchtigt die vesikuläre Azidifizierung, was sowohl zu einer irregulären Zytoskelett-Organisation als auch zu einer verschlechterten enzymatischen Funktion von Lysosomen führt. Eine konditionelle PRR- Deletion in Podozyten führt weiterhin zu einem kongenitalen nephritischen Syndrom mit akuter Niereninsuffizienz und sehr

hoher Sterblichkeit nach dem vierzehnten Lebensstag ⁹³. In der CIBIS- Kohorte fanden wir eine negative Korrelation zwischen dem Plasmaspiegel von sPRR und der Kreatininkonzentration ($r=-0.13$, $p=0,769$). Die Patienten mit einer Kreatininkonzentration von mehr als 1.2 mg/dl zeigten einen statistisch nicht signifikant niedrigeren Plasmagehalt von sPRR im Vergleich zu Patienten mit einer Kreatinin-Konzentration von weniger als 1.2 mg/dl ($p=0,85$). Aktuell arbeitet unsere Arbeitsgruppe an einem konditionalen „knock-out“ in B-Zellen des Pankreas und in T-Lymphozyten.

Unter Berücksichtigung der Struktur des Proreninrezeptors sowie seiner intrazellulären Physiologie gingen wir davon aus, dass die lösliche Fraktion des PRR (sPRR) dem Ausmaß der gewebespezifischen Aktivierung des integralen PRR entspricht. Hirose et al. fanden eine erhöhte Expression des PRR- Gens im Herzen und in den Nieren der Ratten, die unter einer Herzinsuffizienz gelitten haben ⁹⁴. In diesem Tiermodell der kongestiven Herzinsuffizienz, die durch eine Ligatur der Koronararterien induziert wurde, wurden statistisch signifikant höhere mRNA- Konzentrationen im Vorhof, in der rechten Herzkammer, in dem nicht infarzierten Teil des linken Ventrikels sowie in den durch Ischämie betroffenen linksventrikulären Arealen im Vergleich zu Kontrollgruppe gefunden. Es handelte sich um eine 1.4 bis 1.7 fache Erhöhung. Die anschließende immunhistochemische Analyse zeigte eine positive Markierung für PRR in der vaskulären glatten Muskulatur und dem Endothel der renalen und kardialen Gefäße ⁹⁴. Miriam et al. wollten die Rolle von PRR in den adaptiven Mechanismen einer akuten Herzinsuffizienz erforschen. In diesem experimentellen Model wurde die kongestive Herzinsuffizienz durch ein schnelles linksventrikuläres Pacing (225 Schläge/ Minute über 7 Tage hinaus) hervorgerufen. Eine PRR- Blockade mittels HRP bei diesen Tieren führte zu einem statistisch signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Druckes ($p<0.001$), einer Reduktion des links atrialen Druckes ($p<0.001$) sowie des peripheren vaskulären Widerstandes ($p<0.014$). Die Gabe von HRP hatte abgesehen von dem Herzfrequenzabfall und der Hämatokritsenkung keinen Einfluss auf das systolische und diastolische Blutdruckprofil in der Kontrollgruppe ⁹⁵. Burcklé et al fanden einen Zusammenhang zwischen der PRR- Überexpression in der vaskulären glatten Muskulatur und der systolischen Hypertonie im transgenen Tiermodell nach sechs monatiger Beobachtung ⁹⁶. Diesen Ergebnissen zufolge ist PRR involviert in der Blutdruckregulation, besonders in patophysiologischen Mechanismen, die in Rahmen einer Herzinsuffizienz oder Diabetes mellitus entstehen. Bei herzinsuffizienten Patienten mit einer systolischen und diastolischen Hypertonie fanden wir eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der sPRR- Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Patienten mit nor-

malen systolischen und diastolischen Blutdruckverhältnissen ($p=0.12$ beziehungsweise $p=0.80$).

Moilanen et al. haben durch eine lokale direkte intramyokardiale über Adenovirus vermittelte genetische Verabreichung des PRR- Genes bewiesen, dass PRR- Überexpression *in vivo* eine Verschlechterung der Herzfunktion verursacht ⁹⁰. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, linksventrikuläre systolische Verkürzungsfraction sowie die intraventrikuläre systolische und diastolische Septumdicke waren nach einer und zwei Wochen als Resultat des myokardialen PRR- Gentransfers im Vergleich zu Kontrollgruppe erniedrigt. Eine kontinuierliche Valsartan- Infusionstherapie und die dadurch erreichte Angiotensin-Rezeptorblockade konnten diese funktionellen und strukturellen Veränderungen des Herzens nicht verhindern, was auf ein von Angiotensin II unabhängiges Remodeling der kardialen extrazellulären Matrix hindeutet. Weiterhin fanden Autoren nach dem PRR- Gentransfer eine Hochregulation von TGF- β 1, CTGF, PAI-1, fibronectin 1, MMP 2 und MMP 9, was ein biochemischer Beweis für eine durch PRR- induzierte Fibrose ist ⁹⁰.

Da es sich in unserer Studie um Patientenkollektiv mit chronischer Herzinsuffizienz handelt, sollte die sPRR- Plasmakonzentration vor allem das Ausmaß der kardialen PRR- Aktivierung widerspiegeln. Unter der Voraussetzung, dass in der Entstehung der Herzinsuffizienz eine Überaktivierung des RAAS im Vordergrund steht, wollte wir erfahren, inwiefern der PRR als Bestandteil des „tissue“-RAAS für diese pathophysiologischen Abläufe wichtig ist. Der lösliche Proreninrezeptor wurde mittels eines neu entwickelten ELISA-Testverfahrens der Firma CellTrend bestimmt. Es handelt sich um ein innovativen Testverfahren zur quantitativen kolorimetrischen Detektion des sPRR in biologischem Material (zum Beispiel Plasma und Urin). Voraussetzung dafür stellte die Sequenzierung und Isolierung bestimmter Bestandteile des PRR-Proteins dar.

Zum besseren Verständnis der Rolle von PRR in den gewebespezifischen morphologischen Veränderungen trugen die Resultate der Arbeitsgruppe um Prof. Ichihara bei. Diese Arbeitsgruppe postulierte die Möglichkeit einer kompetitiven Inhibition des Prosegmentes von PRR mittels „handle region protein“ (HRP - ein Peptid, dass Prosegment des PRR nachahmt). Dabei konnte eine HRP- Infusion in einem diabetischen experimentellen Model das Fortschreiten der diabetischen Nephropathie, eine durch Ischämie bedingte retinale Neovaskularisierung sowie diabetische Retinopathie verhindern ⁸³. Weiterhin verringerte HRP kardiale und renale Fibrose sowie Insulinresistenz im experimentellen Model von spontan hypertensiven Ratten ^{82,97}. Obwohl darauffolgende Studien bezüglich der potenziell günstigen Wirkung vom HRP

in der durch PRR vermittelten Organbeschädigung widersprüchliche Ergebnisse lieferten, wobei auch die Hemmfähigkeit des HRP bei der Bindung des Prorenins an PRR *in vitro* in Frage gestellt wurde, unterstreichen bisherige Entdeckungen die Rolle von PRR in den durch RAAS vermittelten pathophysiologischen Veränderungen in verschiedenen Organsystemen. Durch die Bemühungen von Prof. Ichihara und seinen Kollegen wurde ein zusätzliches ELISA-Testverfahren zur Bestimmung von sPRR entwickelt. Durch dieses wurde die prognostische Bedeutung des sPRR für die Entwicklung einer Hypertonie und des Schwangerschaftsdiabetes festgestellt ⁸⁷. Weiterhin konnte die Plasmakonzentration von löslichem Proreninrezeptor im ersten Trimester die Wahrscheinlichkeit für Entstehung des Diabetes mellitus im weiteren Verlauf der Schwangerschaft vorhersagen ⁸⁷.

Ein Vergleich des in unserer Arbeit angewendeten ELISA-Testverfahrens und des ähnlichen Testverfahrens, das von den japanischen Kollegen etabliert wurde, wäre aus unserer Sicht sinnvoll. Die Tatsachen, dass zum Zeitpunkt der Sammlung des biologischen Materials im Rahmen der CIBIS- Studie kein ELISA-Test entwickelt wurde sowie dass wir nur über begrenztes Probenmaterial verfügten, haben uns daran gehindert einen Vergleich der zwei ELISA-Bestimmungsverfahren durchzuführen.

Das Patientenkollektiv der CIBIS-ELD- Studie stellt eine repräsentative Gruppe von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz dar. Die Tatsache, dass insgesamt 883 in dieser prospektiven Studie in verschiedenen europäischen Zentren eingeschlossen wurden sowie dass es sich im Hinblick auf den klinischen Status, echokardiografische und laborchemische Parameter um eine sehr gut determinierte Patientengruppe handelt, lässt gewünschte Rückschlüsse angesichts des möglichen Einsatzes des sPRR als einen Biomarker für Herzinsuffizienz mit ausreichende Aussagekräftigkeit zu. Insgesamt wurden 3.444 klinische Untersuchungen im Rahmen der Studie durchgeführt, wobei mehr als 300 Parametern erhoben werden konnten. Es erfolgten bei der Baseline-Visite 574 Ultraschalluntersuchungen mit einer Analyse von insgesamt 22 verschiedenen Echo-Parametern. Die Tatsache, dass im Verlauf der CIBIS- Studie eine ausführliche echokardiografische Beurteilung der Patienten (z.B. Tissue-Doppler, diastolische Funktion usw.) mit der Erhebung von spezifischen laborchemischen Parametern der Herzinsuffizienz stattfand, hat es uns ermöglicht, eine gut definierte Gruppe von Patienten mit systolischer versus Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz zu evaluieren.

Als Kontrollgruppe dienten 198 gesunde Probanden, bei denen durch körperliche und klinische kardiologische Untersuchung, Anamnese, laborchemische Untersuchung, EKG und Echokardiografie relevante kardiologische Erkrankung ausgeschlossen werden konnte. Eine besonders detaillierte echokardiografische Beurteilung der gesunden Probanden sowie eine

ausführliche Anamnese in Bezug auf das eventuelle Vorhandensein der relevanten kardiologischen Pathologien machte diese Probandengruppe für den statistischen Vergleich besonders geeignet.

Das übergeordnete Ziel der CIBIS- Studie war die Untersuchung der klinischen Toleranz einer den Leitlinien entsprechenden Auftitration von zwei Beta-Blockern (Carvedilol - Bisoprolol). Nach Leitlinien-gerechter Beta-Blocker-Therapie über 12 Wochen zeigte sich bezüglich der Verträglichkeit kein Beta-Blocker überlegen. Unter Bisoprolol- Behandlung wurde eine stärkere Herzfrequenzsenkung mit häufigeren bradykarden unerwünschten Ereignissen erzielt (16% vs. 11%, $p=0.02$). Auf der anderen Seite führte Carvedilol zu einer Reduktion der FEV1 mit einer Zunahme von dosis-unabhängigen pulmonalen unerwünschten Ereignissen (10% vs. 4%, $p<0.001$)⁸⁹. In der anschließenden Subanalyse zeigte sich, dass die Herzfrequenz nach zwölfwöchiger Beta-Blocker-Auftitrung unabhängig von der verwendeten Dosis des Beta-Blockers das gesamte Mortalitätsrisiko bei der Follow-Up-Visite nach 4 Jahren vorhersagen kann⁹⁸. Zur Durchführung unserer Studie wurde Blutproben von der Baseline-Visite verwendet, so dass die Auftitration von Beta-Blocker im weiteren Verlauf der CIBIS- Studie keinen Einfluss auf unsere Resultaten hatte. Da in den wichtigsten randomisierten Beta-Blocker-Studien^(12,13,99) eher ein jüngeres Patientenkollektiv untersucht wurde (durchschnittliches Alter 61-64 Jahre), sind die Ergebnisse der CIBIS-ELD- Studie in der medizinischen Versorgung immer älterer Patienten in der alltäglichen Behandlung einer Herzinsuffizienz von zunehmender wissenschaftlicher Relevanz. Weiterhin sehen wir als Vorteile der CIBIS-ELD-Kohorte die ausreichende Anzahl der Patienten für eine sichere statistische Power und eine engmaschige klinische Beobachtung der Patienten im Rahmen des Studienprotokolls.

Im unseren Versuch, sPRR als geeigneten kardialen Biomarker zu evaluieren, fanden wir hoch statistisch signifikant höhere Plasmakonzentrationen des löslichen Proreninrezeptors bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz verglichen mit gesunden Probanden. In der Geschlechtsanalyse bewiesen Männer statistisch nicht signifikant erhöhte sPRR-Plasmaspiegel. Des Weiteren fanden wir im Hinblick auf die NYHA-Klasse keine relevanten Unterschiede in der sPRR-Plasmakonzentration innerhalb der CIBIS-Kohorte.

Trotz umfangreicher Fortschritte haben sich nur wenige natriuretischen Peptide (NP) insbesondere BNP und NT proBNP, in der klinischen Routine etabliert und Einzug in die meisten Guideline-Empfehlungen zur Herzschwäche gehalten. Die natriuretischen Peptide sind quantitative Marker für das Ausmaß einer linksventrikulären Dysfunktion und des Schweregrads einer Herzinsuffizienz¹⁰⁰. Der führende Stimulus für die Synthese in den Kardiomyozyten und die nachfolgende Freisetzung ist eine erhöhte Wandspannung durch Volumen- oder

Druckbelastung¹⁰¹. Abgesehen von natriuretischen Peptiden wurden in den vergangenen Jahren ein paar weitere Biomarker wie z. B. Copeptin und GDF-15 diskutiert. Bei chronischer Herzschwäche konnten Neuhold et al.¹⁰² eine Korrelation des Copeptins zum NYHA-Schweregrad und eine Überlegenheit in der Risikostratifizierung im Vergleich zu NP nachweisen. Es bestehen leider noch Unklarheiten beim Einsatz des Copeptins in der klinischen Routine (u. a. Interaktionen mit bestimmten Medikamenten sowie die Definition von Geschlechts- und nierenabhängigen Grenzwerten)¹⁰⁰. Obwohl GDF-15 bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu Kontrollprobanden signifikant erhöht war und eine positive Korrelation mit dem NYHA-Schweregrad und mit NT-proBNP mit prognostischer Relevanz festgestellt werden konnte, fand GDF-15 bisher keine routinemäßige klinische Anwendung.

Anhand von Erkenntnissen aus unserer Arbeit haben wir in der ROC-Analyse die Vorhersagekraft von sPRR für einen Cut off des LVEDD von 55mm in einem multivariaten Modell mit Geschlecht, NYHA-Klasse, BMI, systolischem und diastolischem Blutdruck evaluiert. Hier zeigte sich die Sensitivität und Spezifität einer Vorhersage mittels NT-pro BNP dem PRR deutlich überlegen (AUC 0.72 vs 0.54 für CI 95%). Bei der Prognose einer linksventrikulären Ejektionsfraktion für einen Cut-Off von 55 % wurde für sPRR eine AUC von 54% bei einem CI von 50 bis 59% verzeichnet. Damit ist klar, dass sPRR die strengen Kriterien eines Biomarkers zur Routinediagnostik der Herzinsuffizienz zum jetzigen Zeitpunkt nicht erfüllen kann. Jedoch ist es von Bedeutung, dass auf Basis neuer Erkenntnisse über die Hochregulation des PRR im Setting einer chronischen Herzinsuffizienz weitere pathophysiologische Zusammenhänge und damit die Möglichkeit eines gezielten Einsatzes des löslichen PRR als Biomarker für bestimmte diagnostische Fragestellungen erforscht werden. Die neuerhaltene Möglichkeit, den Plasmaspiegel des löslichen PRR im biologischem Material zu bestimmen, versetzt uns in die Lage, durch eine Verfolgung der Konzentrationsgradienten von löslichem PRR bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden sowie klinischen Merkmalen einer chronischen Herzinsuffizienz neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Biologie und die Bedeutung des kardialen PRR im Rahmen der Herzinsuffizienz zu erlangen.

9. Zusammenfassung

Die Mitbeteiligung des Proreninrezeptors in der Evolution der Herzinsuffizienz sowie der Entstehung der strukturellen Beschädigung des Herzmuskels ist seit seiner Entdeckung vermutet. Anhand unserer Ergebnisse kommt es durch die neuro-humorale Kompensationsmechanismen im Rahmen der Herzinsuffizienz zu verstärkter Aktivierung des Proreninrezeptors. Dementsprechend fanden wir bei den Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz ein erhöhter Plasmaspiegel von sPRR im Vergleich zu gesunden Probanden. Bei vorliegenden strukturellen Veränderungen des Myokardes kann im Setting einer chronischen Herzinsuffizienz ein erhöhter sPRR-Plasmaspiegel verzeichnet werden. Zudem korreliert sPRR negativ mit zunehmenden klinischen und echokardiografischen Merkmalen einer Herzschwäche. Jedoch reicht dies bei fehlender statistischer Signifikanz für die Subkategorisierung auf die Patienten mit HFREF oder HFPEF nicht aus.

Diabetes mellitus als Zustand mit erhöhtem Renin-Plasmaspiegel ist durch eine erhöhte sPRR-Plasmakonzentration gekennzeichnet. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die stabile chronische Niereninsuffizienz die sPRR-Plasmawerte bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nicht beeinflusst. Die Patienten unter der Therapie mit einem Beta-Blocker und Diuretika haben statistisch signifikant höheren sPRR-Plasmaspiegel im Vergleich zu den Patienten ohne dauerhafte Medikation mittels diesen Medikamenten.

sPRR ist als Prädiktor einer linksventrikulären Dilatation sowie der eingeschränkten linksventrikulären Ejektionsfraktion der prognostischen Fähigkeit des NT-proBNP im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität unterlegen. Obwohl sPRR die strengen Kriterien eines Biomarkers zur Routinediagnostik der Herzinsuffizienz zum jetzigen Zeitpunkt nicht erfüllen kann, es sollte weitere Forschung zur Entschlüsselung der Rolle von PRR in der kardiovaskulären Homöostase sowie in den pathophysiologischen Prozessen fortgeführt werden.

Literaturverzeichnis:

1. Dickstein K, Cohen-Solal GF, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson P A, Stromberg DJV, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa MN, Priori SG, Swedberg K. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment acute and chronic hearth failure. *European Heart Journal* 2008;29.
2. Wang TJ, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, LeRoy EC, Vasani RS. Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community. *Circulation* 2003;108:977-82.
3. Fischer D, Dettmer-Flugge A, Thiesemann R, Gogol M. Chronic cardiac insufficiency in the elderly. *Zeitschrift fur Gerontologie und Geriatrie* 2011;44:158-65.
4. Askoxylakis V, Pleger ST et al. Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: a systematic review. *BMC Cancer* 2010;10:105.
5. Schaefer HH, Dieterle T. Diagnosis and therapy of heart failure with normal ejection fraction. *Therapeutische Umschau Revue therapeutique* 2011;68:81-7.
6. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Heart Journal* 2012;33:1787–847.
7. Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1667-75.
8. The SOLVD investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991;325:293-302.
9. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987;316:1429–35.
10. Packer MP, Armstrong PW, Cleland JG, Horowitz JD, Massie BM, Ryden L, Thygesen K, Uretsky BF. Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group. *Circulation* 1999;100:2312–8.
11. Flather MD, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, Braunwald E. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. *Lancet* 2000;355:1575–81.
12. CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;353:9–13.
13. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999 353:2001–7.
14. Packer M, Roecker E, Coats J, Katus A, Krum H, Mohacsi P, Rouleau L, Tendera M, Staiger C, Holcslaw L, Amann-Zalan I, DeMets DL. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* 2002;106:2194–9.
15. Flather D, Coats J, Van Veldhuisen J, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P, Soler-Soler J, Tavazzi L, Spinarova L, Toman J, Bohm M, Anker D, Thompson G, Poole-Wilson A. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J* 2005;26:215–25.
16. Poole-Wilson A, Cleland G, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme J, Torp-Pedersen C, Scherhag A, Skene A. Comparison of carvedilol and

- metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362:7–13.
17. CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;353:9-13.
 18. Hjalmarson A, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjeksus J, Wikstrand J, El Allaf D, Vítovec J, Aldershvile J, Halinen M, Dietz R, Neuhaus KL, Jánosi A, Thorgeirsson G, Dunselman PH, Gullestad L, Kuch J, Herlitz J, Rickenbacher P, Ball S, Gottlieb S, Deedwania P. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA* 2000;283:1295-302.
 19. Felker GM, Bull DA, Redfield MM, Stevenson LW, Goldsmith SR, LeWinter MM, Deswal A, Rouleau JL, Ofili EO, Anstrom KJ, Hernandez AF, McNulty SE, Velazquez EJ, Kfoury AG, Chen HH, Givertz MM, Semigran MJ, Bart BA, Mascetti AM, Braunwald E, O'Connor CM; NHLBI Heart Failure Clinical Research Network. Diuretic Strategies in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *N Engl J Med* 2011;364:797-805.
 20. Pitt B, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709–17.
 21. Barnard C. Human Cardiac Transplantation An evaluation of the first two operations performed. *Am J Cardiol* 1968;22:584-96.
 22. Wahlers T, Fieguth HG, Demertzis S, Hausen B, Mügge A, Wolpers K, Heublein B, Borst HG. *Herztransplantation: Internist*; 1996.
 23. Middlekauf HR. Mechanisms and implications of autonomic nervous system dysfunction in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1997;12:265-75.
 24. Braith RW, Feigenbaum MS, Kluess HA, Pepine CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1170-5.
 25. Gottdiener JS, Marshall R, Shemanski L, Furberg CD, Kitzman DW, Cushman M, Polak J, Gardin JM, Gersh BJ, Aurigemma GP, Manolio TA. Outcome of congestive heart failure in elderly persons: influence of left ventricular systolic function. The Cardiovascular Health Study. *Ann Intern Med* 2002 137.
 26. Ramachandran V, Emelia B, Jane E, Craig R, Daniel L. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1948-55.
 27. Narang R, Erhardt L, Ball SG, Coats AJ, Cowley AJ, Dargie HJ, Hall AS, Hampton JR, Poole-Wilson PA. Mode of death in chronic heart failure. A request and proposition for more accurate classification. *Eur Heart J* 1996 17:1390-403.
 28. Rocchiccioli JP, McMurray JJ, Dominiczak AF. Biomarkers in heart failure: a clinical review. *Heart Fail Rev* 2010;15:251-73.
 29. de Bold AJ, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28:89–94.
 30. Maisel A, Guss D et al. Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT). *J Am Coll Cardiol* 2004:1328–33.
 31. Vasan RS. Expanding indications for natriuretic peptides: importance of better new (research) protocols. *American heart journal* 2004;148:743-6.
 32. Cat AN, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides* 2011;32:2141-50.
 33. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *European journal of heart failure* 2004;6:261-8.

34. Wei CM, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation Research* 1994;89:1580-6.
35. Pousset F, Lechat P, Kalotka H, Carayonf A, Maistret G, Escolano S, Thomas D, Komajda M. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. 1997;18.
36. Pousset F. Plasma adrenomedullin, a new independent predictor of prognosis in patients with chronic heart failure. *European Heart Journal* 2000;21:1009-14.
37. Nishikimi T, Horio T, Yoshihara F, Nagaya N, Takishita S, Yutani C, Matsuo H, Matsuoka H, Kangawa K. Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H3031-H9.
38. Goetze JP, Rehfeld JF, Carlsen J, et al. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease. *Regulatory peptides* 2006;133:134-8.
39. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *European journal of heart failure* 2006;8:355-60.
40. Alehagen U, Rehfeld JF, Goetze JP. Association of copeptin and N-terminal proBNP concentrations with risk of cardiovascular death in older patients with symptoms of heart failure. *JAMA* 2011;305:2088-95.
41. Ago T SJ. GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. *Circ Res* 2006;98:294-7.
42. Kempf T, Peter T et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007:1054-60.
43. Anand IS, Rector TS et al. Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial. *Circulation Research* 2010;122:1387-95.
44. Thygesen K, Mueller C et al. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: a position statement from the Study Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. *Eur Heart J* 2012;33:2001-6.
45. Hackenthal E, Ganten D, Taugner R. Morphology, Physiology, and Molecular Biology of Renin Secretion. *Physiological Reviews* 04.10.1990;70.
46. Berherds J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissemer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedian C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E *Pfysiologie*. Stuttgart: Thieme; 2010.
47. Gaspro KJC, T. Inagami, J. W. Wright, TH. Unger. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev* 200;52:415-72.
48. Iwai N. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *Federation of European Biochemical Societies* 1992;298:257-60.
49. De Gasparo M, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev* 2000.
50. Morishita R, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 90:8474-8.
51. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2010;50:439-65.
52. Tummala P, Sundell C, Laursen JB,. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:1223-9.

53. H. W. Farber, S. Rounds, . Components of the angiotensin system cause release of a neutrophil chemoattractant from cultured bovine and human endothelial cells. *European Heart Journal* 1990;11:100-7
54. Van Bockxmeer, Cyril D. S. Gibbons, Frances A. Burke, Valerie T, Roger R. Angiotensin-Converting Enzyme and Apolipoprotein E Genotypes and Restenosis After Coronary Angioplasty. *Circulation* 1995;92:2066-71.
55. Weber DT, C Molloy. Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. *The American Society for Clinical Investigation* 1994;93:788-98.
56. Gibbons G. Vasculoprotective and cardioprotective mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibition: the homeostatic balance between angiotensin II and nitric oxide. *Clin Cardiol* 1997;20(Suppl II):II-18-25.
57. Paul M, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev* 2006;86:747-803.
58. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovascular research* 2009;81:482-90.
59. Jan Danser AH. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003;35:759-68.
60. Lindpaintner K JM, Wilhelm MJ, Suzuki F, Linz W, et al. Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role. *Circulation* 1988;77(suppl 1):I-18-23.
61. Dazu VJ . Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 1987;59:59A-65A.
62. Campbell DJ . Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986;78:31-9.
63. Katwa LC, Cleutjens JP, Sun Y, Zhou G, et al. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res* 1995;29:57-64.
64. Saito K , Saavedra JM. Angiotensin II binding sites in the conduction system of rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1987;253:H1618-22.
65. Crabos M RM, Hahn AW, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *The Journal of clinical investigation* 1994 93:2372-8.
66. Koch-Weser J. Myocardial actions of angiotensin. *Circ Res* 1964;14:337-44.
67. Moura D, Paiva MQ, Guimaraes S. Prejunctional effects of angiotensin II and bradykinin in the heart and blood vessels. *J Auton Pharmacol* 1999;19:321-25.
68. Yan X, Price RL, Amende I, Liu FF, et al. Pressure overload-induced hypertrophy in transgenic mice selectively overexpressing AT2 receptors in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1274-81.
69. Arai M, Iso T, Takahashi T, Imai S, et al. Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995;268:H2084-91.
70. Yamazaki T. Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z Kardiol* 2000;89:1-6.
71. Welch WJ. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 2008;52:51-6.
72. Sadoshima J, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993 75:977-84.
73. Leri A , Li Q, Wang X, Reiss K, et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 1998;101.
74. Hamawaki M, Lashus A, Koide M, Zile MR, et al. Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;274.

75. Booz GW. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1995;30:537-43.
76. Matsusaka T, Inagami T, Fogo A, Ichikawa I. Communication between myocytes and fibroblasts in cardiac remodeling in angiotensin chimeric mice. *J Clin Invest* 1999 103:1451-8.
77. Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010;21:18-23.
78. Pitchai Balakumar GJ. Cardiovascular and Renal Pathologic Implications of Prorenin, Renin, and the (Pro)renin Receptor: Promising Young Players From the Old Renin–Angiotensin–Aldosterone System. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56.
79. Fumiaki Suzuki, Tsutomu Nakagawa, Uddin Mohammad Nasir, Akio Ebihara AI, Yuichi Ishida, Yukio Nakamura, and Kazuo Murakami. Human Prorenin Has “Gate and Handle” Regions for Its Non-proteolytic Activation. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:22217-22.
80. Batenburg WW, Garrelds IM, de Vries R, de Bruin RJ, Burcklé CA, Müller DN, Bader M, Nguyen G, Danser AH. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J Hypertens* 2007;25:2441-53.
81. Luis C, Matavelli JH, and Helmy M. Siragy. (Pro)renin Receptor Contributes to Diabetic Nephropathy Through Enhancing Renal Inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:277–82.
82. Dinko Susic, Edward D. Frohlich, Howard Lipton, Martha Knight Cardiovascular effects of prorenin blockade in genetically spontaneously hypertensive rats on normal and high-salt diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1117–H21.
83. Nguyen G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci (Lond)* 2011;120:169-78.
84. Mercure C, Lacombe M, Silversides D, Reudelhuber T. Chronic increases in circulating prorenin are not associated with renal or cardiac pathologies. *Hypertension* 2009;53:1062-9.
85. Kinouchi K , Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* 2010;107:30-4.
86. Raymond K, Aractingi S, Lebrin F. The (pro)renin receptor controls Wnt signalling: promise from *Drosophila* and *Xenopus*. *Eur J Dermatol* 2013.
87. Noriyoshi Watanabe SM, Takeo Fujiwara, Tomo Suzuki,, Kosuke Taniguchi FM, Takashi Ando, Daisuke Watanabe,, Tadashi Kimura HS, and Atsuhiko Ichihara. Prediction of Gestational Diabetes Mellitus by Soluble (Pro)Renin Receptor During the First Trimester. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013,;98:2528–35.
88. Düngen HD, Inkrot S, Tahirović E, Krackhardt F, Pavlović M, Putniković B, Lainscak M, Gelbrich G, Edelmann F, Wachter R, Eschenhagen T, Waagstein F, Follath F, Rauchhaus M, Haverkamp W, Osterziel KJ, Dietz R. Bisoprolol vs. carvedilol in elderly patients with heart failure: rationale and design of the CIBIS-ELD trial. *Clin Res Cardiol* 2008:1-8.
89. Hans-Dirk Düngen, Simone Inkrot, Elvis Tahirovic,, Agnieszka Töpper FM, Christiane Prettin , Biljana Putnikovic,, Aleksandar N. Neskovic MK, Dejan Sakac, Mitja Lainsack,, Frank Edelmann RW, Thomas Rau, Thomas Eschenhagen,, Wolfram Doehner1 SDA, Finn Waagstein,, Christoph Herrmann-Lingen GGaRD. Titration to target dose of bisoprolol vs. carvedilol in elderly patients with heart failure: the CIBIS-ELD trial. *European journal of heart failure* 2011;13:670–80.

90. Anne-Mari Moilanen , Raisa Serpi , Erja Mustonen , Zolta'n Szabo, Jani Aro ,, Juha Näpänkangas OT, Meeri Sutinen, Tuula Salo, Heikki Ruskoaho. Pro)renin Receptor Triggers Distinct Angiotensin II-Independent Extracellular Matrix Remodeling and Deterioration of Cardiac Function. PLoS One July 2012;7:e41404.
91. Toei M, Forgac M. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* 2010 Jun;49:4715-23.
92. Bilic J, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 2007 Jun;316:1619-22.
93. Riediger F, Qadri F, Hartleben B, Park JK, Potthoff SA, Sohn D, Sihn G, Rousselle A, Fokuhl V, Maschke U, Purfürst B, Schneider W, Rump LC, Luft FC, Dechend R, Bader M, Huber T, Nguyen G, Muller D. Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011 22:2193-202.
94. Hirose T, Totsune K, Morimoto R, Maejima T, Kawamura T, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzaki M, Takahashi K, Imai Y. Gene expression of (pro)renin receptor is upregulated in hearts and kidneys of rats with congestive heart failure. *Peptides* 2009;30:2316-22.
95. Miriam T, Rademaker TGY, Leigh J. Ellmers, Christopher J. Charles, M. Gary Nicholls and A. Mark Richards. Hemodynamic, Hormonal, and Renal Effects of (Pro)Renin Receptor Blockade in Experimental Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2012;5:645-52.
96. Burcklé CA, Müller DN, Garrelds IM, Gasc JM, Popova E, Plehm R, Peters J, Bader M, Nguyen G. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* 2006 47:552-6.
97. Nagai Y, Nakano D, Kimura S, Pelisch N, Fujisawa Y, Hitomi H, Hosomi N, Kiyomoto H, Kohno M, Ito H, Nishiyama A. Possible contribution of the non-proteolytic activation of prorenin to the development of insulin resistance in fructose-fed rats. *Exp Physiol* 2009 Sep;94(9):1016-23.
98. Düngen HD, Inkrot S, Apostolović S, Edelmann F, Lainščak M, Sekularac N, Störk S, Tahirovic E, Tscholl V, Krackhardt F, Loncar G, Trippel TD, Gelbrich G. Heart rate following short-term beta-blocker titration predicts all-cause mortality in elderly chronic heart failure patients: insights from the CIBIS-ELD trial. *European journal of heart failure* 2014;16(8):907-14.
99. Packer M, Roecker EB, Coats AJ, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Staiger C, Holcslaw TL, Amann-Zalan I, DeMets DL; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Study Group. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* 2002 Oct;106(17):2194-9.
100. Maisel A, Adams K Jr et al. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *European journal of heart failure* 2008;10:824–39.
101. Maeda K, Wada A et al. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *American heart journal* 1998;135:825–32.
102. Neuhold S, Strunk G et al. Comparison of copeptin, B-type natriuretic peptide, and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure: prediction of death at different stages of the disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:266–72.

Abstrakt:

Zielstellung: In der vorliegenden Arbeit wollten wir evaluieren (1) ob der lösliche Proreninrezeptor bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz dysreguliert ist (2) ob die Art und das Ausmaß dieser Dysregulation den Einsatz des sPRR als potenzielles Biomarkers der Herzinsuffizienz zulässt.

Material und Methoden: Wir haben die Blutproben von insgesamt 556 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz für die Bestimmung von sPRR benutzt. Als Vergleichsgruppe dienten die Blutproben von insgesamt 198 gesunden Probanden, bei denen in der klinischen und echokardiografischen Untersuchung relevante kardiovaskuläre Krankheit ausgeschlossen wurde. Die Bestimmung von sPRR erfolgte mittels neues „sandwich“ ELISA-Testverfahrens.

Resultaten: Bei Patienten mit einer stabilen chronischen Herzinsuffizienz wurden hochstatisch signifikant höhere sPRR- Plasmakonzentration im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt ($p=0,0002$). Bei Patienten mit echokardiografischen Zeichen einer eingeschränkter linksventrikulären Ejektionsfraktion ($EF < 55\%$) sowie einer linkeventrikulären Dilatation ($LVDED > 55\text{mm}$) sahen wir einen erhöhten sPRR- Plasmaspiegel im Vergleich zu den Patienten ohne diesen echokardiografischen Zeichen ($p=0,30$ bzw. $p=0,07$). Die Patienten unter der Therapie mit Medikamenten, die die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse beeinflussen (ACE-Hemmer $p=0,01$, Angiotensinrezeptorblocker $p=0,42$ und Aldosteron-Antagonisten $p=0,13$), als auch mit Beta-Blocker ($p=0,005$) und Diuretika ($p=0,02$), zeigten höhere sPRR-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Patienten ohne diesen Medikamenten in der Herzinsuffizienztherapie

Zusammenfassung: sPRR ist bei den Patientin mit chronischer Herzinsuffizienz hochreguliert und korreliert bis zum bestimmten Ausmaß mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz. Obwohl sPRR die strengen Kriterien eines Biomarkers zur Routinediagnostik der Herzinsuffizienz zum jetzigen Zeitpunkt nicht erfüllen kann, es sollte weitere Forschung zur Entschlüsselung der Rolle von sPRR in der kardiovaskulären Homöostase sowie pathophysiologischen Prozessen fortgeführt werden.

Abstract

Aims: The objectives of our study were (1) to determine whether the (P)RR is up- or down-regulated in chronic heart failure patients (2) to establish whether eventually association between s(P)RR and severity of heart failure could be used for diagnostic and prognostic purposes.

Materials & Methods: We used blood probes of 556 subjects with a chronic heart failure in our study. As control group we used the plasma samples from 198 healthy subjects, by whom there was now signs of cardiovascular diseases after clinical examination and echocardiography. Control group was not age and sex matched to study subjects. The s(P)RR was detected by novel sandwich ELISA.

Results: The patients with chronic heart failure exhibited higher plasma levels than healthy subjects ($p=0,0002$). By signs of deteriorated left ventricular ejection fraction ($EF<55\%$) and dilatation of left ventricle ($LVDED> 55\text{mm}$) we found higher plasma levels of s(P)RR compared with subjects without these echocardiographic signs ($p=0,3$ and $p=0,07$ respectively). The patients under the treatment with renin-angiotensin-aldosterone blockers (ACE inhibitor $p=0,13$, angiotensin receptor blocker $p=0,43$, and aldosterone inhibitors $p=0,13$) as well as with beta blockers ($p=0,005$) and diuretics ($p=0,02$) have showed higher s(P)RR concentrations in blood samples than patients without these medications.

Conclusion: The s(P)RR is up-regulated in chronic heart failure and correlates to certain extent with severity of chronic heart failure. This correlation is not enough to justify the use of s(P)RR as biomarker for the heart failure

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Danilo Obradovic, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung des löslichen (Pro)Reninrezeptors als Biomarker für Patienten mit Herzinsuffizienz“ 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 Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen:

Danilo Obradovic hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen/Präsentationen:

Publikation 1: Obradovic D, Düngen HD, Trippel TD, Heidecke H, Pieske B, Mueller DN, Busjahn A, Dechend R. Soluble prorenin receptor (sPRR) in chronic heart failure patients. Presented at 80th Annual Meeting of the German Cardiac Society, Session: Use of novel biomarkers in heart failure, Mannheim 2014

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

Publikation 1: Latas M, Obradović D, Pantić M. [Fear of body symptoms and sensations in patients with panic disorders and patients with somatic diseases]. *Srp Arh Celok Lek.* 2009 Nov-Dec;137(11-12):659-63

Publikation 2: Latas M, Pantić M, Obradović D. [Analysis of test anxiety in medical students]. *Med Pregl.* 2010 Nov-Dec;63(11-12):863-6.

Danksagung

Der größte Dank geht an meine Familie, die mir geduldig und liebevoll hilft, meine Ziele zu erreichen, sowie an meine Eltern und meinen Bruder, die mir nicht nur meine Ausbildung ermöglicht haben, sondern mich auch in allen Lebenssituationen begleiten und unterstützen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD. Dr. med. Ralf Dechend, der mich bei der Erstellung der Arbeit kontinuierlich begleitet und gefördert hat, und den ich in dieser Zeit als Kardiologen und Wissenschaftler sehr zu schätzen gelernt habe.

Weiterhin möchte ich mich bei PD dr.med Hans-Dirk-Düngen und Herrn Elvis Tahirovic bedanken. Sie haben mir ermöglicht, mit meiner ärztlichen Weiterbildung und der wissenschaftlichen Entwicklung in Deutschland anzufangen.

Ein Dankeschön geht auch an Firma CellTrend und Herrn Heidecke für ihre wertvolle Beteiligung an diesem Projekt.

Besonderen Dank schulde ich den Patienten, die sich bereit erklärt haben an CIBIS-ELD-Studie teilzunehmen, sowie ihren Angehörigen.