

Aus der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
Charité, Unviversitätsmedizin Berlin
Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Dietz

Habilitationsschrift

Molekulare Mechanismen kardialer Umbauprozesse

zur Erlangung der *Venia legendi*
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jens Fielitz

Geboren am 17.04.1970 in Berlin

Eingereicht:	November 2008
Vortrag vor dem Fakultätsrat	09. November 2009
Dekanin:	Univ.-Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Michael Böhm / Homburg Saar
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Stefanie Dimmeler / Frankfurt Main

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRAKT.....	I
ABSTRACT.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
I. EINLEITUNG.....	1
II. EIGENE ORIGINALARBEITEN.....	6
1. CHRONISCHE DRUCK- UND VOLUMENÜBERLASTUNG FÜHRT ZU EINER AKTIVIERUNG DES MYOKARDIALEN RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON SYSTEMS UND INTERSTITIELLER FIBROSE IM MENSCHLICHEN HERZEN.	6
2. DIE NEUTRALE ENDOPEPTIDASE IST IN KARDIOMYOZYTEN VON PATIENTEN MIT AORTENKLAPPENSTENOSE UND HERZINSUFFIZIENZ AKTIVIERT.....	9
3. DIE DIFFERENTIELLE REGULATION VON MATRIXMETALLOPROTEINASEN UND DEREN INHIBITOREN IM HERZEN VON PATIENTEN MIT AORTENKLAPPENSTENOSE IST MIT MYOKARDIALEM REMODELING ASSOZIIERT.	11
4. DIE HEMMUNG DER KOLLAGENQUERVERNETZUNG IM HERZEN DURCH EINEN KOLLAGEN-PROLYL-4-HYDROXYLASE-INHIBITOR VERBESSERT DIE KARDIALE FUNKTION IM HYPERTROPHIEMODELL DER RATTE.	14
5. PROTEINKINASE D1 IST EIN SCHLÜSSELENZYM FÜR DAS AUFTRETEN MYOKARDIALER UMBAPROZESSE.	16
6. DIE RING-FINGER E3-UBIQUITINLIGASE MUSCLE-RING-FINGER 3 IST VERANTWORTLICH FÜR DIE AUFRECHTERHALTUNG DER KARDIALEN STRUKTUR UND FUNKTION WÄHREND EINES MYOKARDINFARKTES.....	20
7. DER VERLUST DER RING-FINGER E3-UBIQUITINLIGASEN MUSCLE-RING-FINGER 1 UND 3 FÜHRT ZU PATHOLOGISCHEN MYOKARDIALEN UMBAPROZESSEN IM UNGESTRESSTEN HERZEN	23
III. DISKUSSION.....	26
IV. ZUSAMMENFASSUNG.....	30
V. AUSBLICK UND DARSTELLUNG WEITERER VORHABEN.....	33
DANKSAGUNG	41
ERKLÄRUNG	43

Abstrakt

Herzinsuffizienz ist eine der Haupttodesursachen in den entwickelten Industrienationen und ihre Inzidenz und Prävalenz nimmt stetig zu. Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind myokardiale Umbauprozesse, die durch arterielle Hypertonie, Koronare Herzerkrankung und Klappenfunktionsstörungen hervorgerufen werden sowie durch myozytäre Hypertrophie und Fibrose gekennzeichnet sind. Die molekularen Mechanismen, welche myokardiales Remodeling verursachen und die Progression in die Herzinsuffizienz fördern, sind bislang nur unzureichend bekannt. Klinische Studien zeigten, dass die pharmakologische Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des sympathischen Nervensystems (SNS) das Überleben herzinsuffizienter Patienten verlängert. Dennoch ist die Morbidität und Mortalität von Patienten mit Herzinsuffizienz sehr hoch, sodass neue Therapieansätze dringend benötigt werden. Untersuchungen der molekularen Mechanismen des kardialen Remodelings und seiner Progression in die Herzinsuffizienz könnten dazu beitragen.

Die Mechanismen myokardialer Umbauprozesse werden im Tier- und Zellkulturmodell intensiv untersucht. Es ist jedoch unklar, ob diese Befunde direkt auf Patienten übertragen werden können. Wir haben deshalb die molekularen Mechanismen von myokardialem Remodeling und Herzinsuffizienz im menschlichen Herzen untersucht. Wir fanden das kardiale RAAS und myokardiale Wachstumsfaktoren bei Patienten mit Aortenklappenstenose, Aortenklappeninsuffizienz und Dilatativer Kardiomyopathie aktiviert, wodurch interstitielle myokardiale Fibrose hervorgerufen wird. Diese molekularen und morphologischen Veränderungen traten schon sehr frühzeitig im Krankheitsverlauf auf, nahmen mit Krankheitsprogression zu und waren eng mit kardialer Funktionseinschränkung assoziiert, was zumindest teilweise die molekulare Basis der kardioprotektiven Effekte von RAAS-Inhibitoren sein könnte. Darüber hinaus wiesen wir eine Fehlregulation matrixumbauender Enzyme im hypertrophierenden und insuffizienten menschlichen Herzen nach. Die Beziehung zwischen myokardialer Fibrose und kardialer Funktionseinschränkung führte zur Annahme, dass eine Fibroshemmung die kardiale Funktion verbessert. Wir testeten und bestätigten diese Hypothese in einem Tiermodell der kardialen Hypertrophie. Eine Hemmung von myokardialer Fibrose in der Therapie myokardialer Umbauprozesse könnte dementsprechend sinnvoll sein. Die molekularen Mechanismen, wie RAAS und sein Effektorpeptid Angiotensin-II (AngII) zu kardialen Umbauprozessen führen, sind nicht bekannt. Es war daher das Ziel, die Signaltransduktionskaskade, welche AngII bei

myokardialen Umbauprozessen aktiviert, näher zu untersuchen. Von besonderem Interesse hierbei waren die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass AngII die Serin/Threonin Kinase Protein- Kinase D1 (PKD1) in glatten Gefäßmuskelzellen zeit- und dosisabhängig aktiviert¹, da PKD1 die transkriptionellen Repressoren Klasse-II-Histondeazetylasen (HDAC) phosphoryliert und inaktiviert. PKD1 hemmt so die Repression des prohypertrophen Transkriptionsfaktors MEF2 durch Klasse-II-HDAC. Eine zentrale Rolle dieser MEF2/Klasse-II-HDAC Regulationsachse in der kardialen Hypertrophie und der Herzinsuffizienz wurde bereits nachgewiesen^{2,3}. Allerdings war die Bedeutung des übergeordneten Regulators PKD1 in der Kontrolle der MEF2/Klasse-II-HDAC Achse bei kardialem Remodeling *in vivo* unklar. Zur Untersuchung der Rolle von PKD1 in AngII-vermittelten myokardialen Umbauprozessen generierten wir eine kardiomyozytenspezifische PKD1-Keimbahndeletion und wiesen damit eine Reduktion des myokardialen Remodeling nach.

Während unserer Untersuchungen zeigte sich, dass der posttranslationalen Modifikation von Proteinen und der Steuerung des Gleichgewichtes von Proteinsynthese und -abbau im myokardialen Remodeling eine zentrale Bedeutung zukommt. Diese Prozesse werden unter anderem durch die E3-Ubiquitinligasen Muscle-RING-Finger 1 und 3 (MuRF1 und 3), die spezifisch im Herzen und Skelettmuskel exprimiert werden, reguliert. Wir postulierten, dass der durch MuRF1 und 3 vermittelte Abbau von strukturellen Proteinen für das myokardiale Remodeling bedeutsam ist und bestätigten diese Hypothese durch die Verwendung von Mäusen mit einer Keimbahndeletion für MuRF1 und 3, die verschiedenen kardialen Stresssituationen ausgesetzt wurden. Die spezifischen Funktionen von MuRF1 und 3 bei myokardialem Remodeling sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Myokardialer Umbau stellt einen multifaktoriellen Prozess dar, welcher durch neuroendokrine Aktivierung, transkriptionelle und posttranslationelle Regulation sowie Proteinabbau reguliert wird. Die Therapie von myokardialem Remodeling und dessen Übergang in die Herzinsuffizienz erfordert daher einen multimodalen Ansatz.

Schlagerworte: Fibrose, kardiales Remodeling, Matrixmetalloproteinasen, Muscle-RING-Finger, myokardiale Hypertrophie, Myosinschwerketten, Proteindegradation, Proteinkinase D1, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Ubiquitin-Proteasom-System.

Abstract

The prevalence of heart failure is increasing worldwide, and most people with heart failure will die or be disabled as a consequence of cardiac remodeling, such as hospitalization and sudden cardiac death due to arrhythmias. Cardiac remodeling, the leading cause of heart failure, is characterized by myocyte hypertrophy and myocardial fibrosis and caused by arterial hypertension, coronary artery disease and valvular malfunction. However, the molecular mechanisms causing myocardial remodeling and its progression towards heart failure are only beginning to be understood. Clinical studies showed an improved survival of patients with left ventricular dysfunction and heart failure receiving inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS) and sympathetic nervous system. However, despite advances in heart failure therapy morbidity and mortality remains high. Uncovering molecular mechanisms of cardiac remodeling and its progression towards heart failure will provide novel therapeutic targets to treat this life threatening disease.

Although molecular mechanisms of heart failure are intensively studied in animal models and cell culture only few human data are available. Therefore, we first focused on the molecular mechanisms of cardiac remodeling and heart failure in the human heart. Importantly, using myocardial tissue of patients with aortic stenosis, aortic regurgitation and dilative cardiomyopathy we found an activation of the cardiac RAAS, upregulation of myocardial growth factors and occurrence of myocardial fibrosis. These molecular and morphological changes were dependent on the disease stage and had impact on cardiac function underlining the clinical evidence about cardioprotective effects of RAAS inhibition. Most importantly, these molecular changes were already observed when cardiac function was still normal indicating that treatment of early stages of cardiac remodeling in the absence of cardiac dysfunction could add therapeutic benefit for affected patients. A dysregulation of matrix remodeling enzymes mainly leading to inhibition of matrixmetalloproteinases was responsible, at least partially, for myocardial fibrosis in human hearts following chronic pressure overload due to aortic stenosis. Having elucidated that myocardial remodeling was associated with decreased systolic and diastolic cardiac function we hypothesized that inhibition of cardiac fibrosis or its main component cross-linking of collagenfibrills could lead to an improved cardiac function. This hypothesis was investigated and confirmed in an animal model of cardiac hypertrophy further supporting the clinical evidence that reverse remodeling could have beneficial effects on the progression of heart failure. Although, RAAS activation has been linked to

cardiac remodeling only few data linking its effector peptide angiotensin II (AngII) and transcriptional regulation are available. In this regard, AngII has been shown to mediate its effects through protein kinase D1 (PKD1) which in turn phosphorylates the transcriptional repressors class II histone deacetylases (HDAC) releasing repression from prohypertrophic / remodeling transcription factor MEF2. To investigate the role of PKD1 for AngII mediated cardiac remodeling we generated cardiomyocyte specific knockout mice and showed that deletion of PKD1 in cardiomyocytes inhibits AngII induced myocardial remodeling.

Our results showed that posttranslational modification of proteins and the balance between protein synthesis and degradation are important for myocardial remodeling. These processes are regulated by the key enzymes of the ubiquitin proteasome pathway Muscle RING-finger 1 and 3 (MuRF1 and 3) which are specifically expressed within the heart and skeletal muscle. We hypothesized that MuRF1 and 3 mediated degradation of structural proteins is important for myocardial remodeling and confirmed our assumption by applying different stress stimuli to MuRF1 and 3 knockout mice.

In summary, cardiac remodeling is mediated through a variety of mechanisms involving neuroendocrine activation, transcription, posttranslational regulation and protein turnover. In order to treat cardiac remodeling and its transition towards heart failure comprehensively novel therapeutic approaches need to target these different pathways.

Key words: cardiac remodeling, fibrosis, matrix metalloproteinase, muscle RING-finger, myocardial hypertrophy, myosin heavy chain, protein degradation, protein kinase d1, renin-angiotensin-aldosterone-system, ubiquitin proteasome system.

Abkürzungsverzeichnis

AI	Aorteninsuffizienz
AngII	Angiotensin-II
AS	Aortenstenose
AT1	Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptor
cKO	konditionelle Keimbahndeletion („conditional knockout“)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ET1	Endothelin 1
HDAC	Histondeazetylasen
ISO	Isoproterenol
IVS	Dicke des interventrikulären Septums
KO	Keimbahndeletion („knockout“)
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Diameter
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVPW	Dicke der linksventrikulären Hinterwand
MEF2	MADS BOX transcription enhancer factor 2
α -MHC	α Myosinschwerkettenprotein
β -MHC	β Myosinschwerkettenprotein
MMP	Matrixmetalloproteinase
MuRF	Muscle-RING-Finger-Protein
MyoD	Myogenic differentiation antigen 1

NEP	Neutrale Endopeptidase
PKD1	Proteinkinase D1
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SNS	Sympathisches Nervensystem
TAC	Transverse Aortic Constriction
TGF β 1	Transforming-Growth-Ffactor- β 1
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WT	Wildtyp

I. Einleitung

Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Ursachen der hohen kardiovaskulären Mortalität und Morbidität in westlichen Industrienationen. Trotz kontinuierlicher Verbesserungen in Diagnostik und Therapie verläuft die Herzinsuffizienz progredient⁴ und weist eine Fünf-Jahres-Mortalität von ca. 50% auf.⁵ Eine der Hauptursachen der Herzinsuffizienz und der klinischen Verschlechterung der betroffenen Patienten sind Umbauprozesse des Herzens,⁶ die als myokardiales Remodeling bezeichnet werden. Myokardiales Remodeling wird durch chronische (z.B. arterielle Hypertonie, valvuläre Herzerkrankungen, Kardiomyopathie) und akute Myokardschädigungen (z.B. Myokardinfarkt und Myokarditis) hervorgerufen und führt zu kardialer Dilatation, Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod.^{6,7} Ebenso verschlechtern linksventrikuläre Dilatation und verminderte linksventrikuläre Ejektionsfraktion die Prognose der betroffenen Patienten.^{6,8}

Kardiale Hypertrophie und myokardiale Fibrose sind einerseits morphologische Kennzeichen des myokardialen Remodelings und andererseits selbst unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren, die zu gesteigerter Morbidität und Mortalität führen.⁹⁻¹² Die myokardiale Hypertrophie kann pathologische oder physiologische Ursachen haben. Pathologische Hypertrophie wird durch die chronische Aktivierung neurohumoraler Systeme, Aortenklappenstenose (AS), Aortenklappeninsuffizienz (AI), arterielle Hypertonie und ischämischen Myokardschaden hervorgerufen. Die physiologische Hypertrophie ist durch körperliches Training, Schwangerschaft und Wachstum bedingt. Im Gegensatz zur physiologischen steigert die pathologische Hypertrophie die Inzidenz von Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod.^{12,13} Die pathologische führt im Vergleich zur physiologischen Hypertrophie¹⁴ zu abnormen strukturellen, metabolischen und funktionellen Veränderungen,^{9,15-17} die auf einem Verlust von Myozyten, gestörter Kontraktilität, systolischer und diastolischer Funktionsstörung, gesteigerter Fibrose, Fehlorganisation des Sarkomers, verändertem Metabolismus und Kalziumstoffwechsel sowie „elektrischem“ Remodeling beruhen. Bei pathologischer Hypertrophie ist auch das fetale kardiale Genprogramm aktiviert^{15,18} und kann bei chronisch fortbestehendem Stress in die Herzinsuffizienz übergehen. Für diesen Übergang werden unter anderem die chronische Aktivierung von RAAS und SNS,¹⁹ eine inadäquate myokardiale Durchblutung²⁰ sowie die veränderte Expression kontraktiler Proteine¹⁷ verantwortlich gemacht.

Ein weiteres Kennzeichen des kardialen Remodelings ist die interstitielle und perivaskuläre Fibrose, die durch eine Vermehrung von Fibroblasten und Kollagenfibrillen sowie die Änderung des

Kollagentyps, der Quervernetzung von Kollagenfibrillen und Kollagenorganisation charakterisiert ist.²¹ Myokardiale Fibrose tritt frühzeitig im drucküberlasteten Herzen auf.²² Sie fördert den Übergang von der Hypertrophie in die Herzinsuffizienz²³ und nimmt dabei zu,^{24,25} reduziert die passive Dehnbarkeit des Herzmuskels und wird als Ursache für die diastolische und systolische Funktionsstörung im hypertrophierten Herzen angesehen.²⁶ Bisher war unklar, ob die Kollagensynthese im menschlichen Herzen bei chronischer Druck- und Volumenüberlastung gesteigert ist und myokardiale Fibrose auftritt. Des Weiteren war unklar, welchen Einfluss die myokardiale Fibrose auf die Funktion des erkrankten menschlichen Herzens hat.

Neben der gesteigerten Kollagensynthese ist auch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation extrazellulärer Matrixproteine (ECM-Proteine) für die myokardiale Fibrose und kardiale Funktionseinschränkung verantwortlich. Der Abbau von ECM-Proteinen, insbesondere von Kollagen und Fibronectin, erfolgt durch Matrixmetalloproteinasen (MMP).²⁷ Die Expression und Aktivität von MMP und ihrer Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP), sind in den Herzen von Patienten mit nicht-ischämischer und ischämischer Kardiomyopathie sowie im Tiermodell mit Druck- und Volumenüberlastung verändert und könnten daher in der Pathogenese der myokardialen Fibrose von Bedeutung sein.²⁸ Für die Entstehung myokardialer Umbauprozesse ist das Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP besonders wichtig, da ein gestörtes Gleichgewicht den Kollagenabbau beeinträchtigt und die interstitielle Fibrose begünstigt.^{27,29-31} Tierexperimentelle Studien mit MMP-Inhibitoren an transgenen Mäusen demonstrierten, dass MMP eine zentrale Rolle im myokardialen Remodeling und der Herzinsuffizienz nach einem Herzinfarkt innehaben.³² Diese Studien implizieren, dass durch MMP-Inhibitoren die Entwicklung einer periinfarziellen Herzinsuffizienz gehemmt wird. Allerdings war unklar, wie MMP und TIMP in drucküberlasteten menschlichen Herzen reguliert werden und welche MMP sinnvolle therapeutische Ziele darstellen.

Neben der gesteigerten Kollagenexpression und -akkumulation ist die interstitielle Fibrose im myokardialen Remodeling durch eine gesteigerte Quervernetzung von Kollagenfibrillen gekennzeichnet. Die vermehrte Kollagenquervernetzung verringert deren Elastizität und erhöht die Steifheit des Herzmuskels.^{33,34} Die Kollagenquervernetzung wird durch Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylasen (K-P4H) vermittelt. K-P4H sind Schlüsselenzyme in der Kollagenreifung. Sie katalysieren die posttranslationelle Hydroxylierung von Prolinresten in Kollagenfibrillen und führen so zu thermisch stabilem „triple-Helix“-Kollagen. Da kardiales Remodeling zur vermehrten Kollagenquervernetzung mit nachfolgender Reduktion der Herzmuskelelastizität³⁵ führt, könnte eine Hemmung der K-P4H die vermehrte Steifheit des sich umbauenden Herzmuskels reduzieren. Dieses neuartige Therapiekonzept wurde im Ratteninfarktmodell erfolgreich getestet. Die

Hemmung der K-P4H verminderte pathologische kardiale Umbauprozesse und verlängerte das Überleben.³⁵ Welchen Effekt die Hemmung der Kollagenquervernetzung auf die kardiale Funktion und Genexpression bei Hypertrophie hat, war unklar. Wir postulierten, dass die Gabe eines K-P4H-Hemmers bei kardialer Hypertrophie zur Verbesserung der diastolischen Funktion und darüber hinaus zur Normalisierung der durch Hypertrophie induzierten Veränderungen in der Genexpression führt und testeten diese Hypothese im Rattenmodell mit chronischer Druckbelastung durch Konstriktion der thorakalen Aorta.

Die genauen Signaltransduktionswege, die zu myokardialem Remodeling führen und den Übergang der kardialen Hypertrophie in die Herzinsuffizienz einleiten, sind unklar. Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz induzieren gegenregulatorische kompensatorische Mechanismen, welche die Herzfrequenz, Kontraktilität und Flüssigkeitsretention steigern und so die Herzleistung konstant halten. Hierbei kommt es sowohl zu einer Aktivierung neuroendokriner Systeme, wie dem RAAS-³⁶, SNS-³⁷ und Endothelin-System³⁸ als auch vasodilatatorischer Substanzen, wie natriuretischer Peptide, Kinine, Prostaglandin und Stickstoffmonoxid, die der exzessiven Vasokonstriktion durch Überaktivierung von RAAS und SNS entgegenwirken.³⁹ Die chronische Aktivierung neuroendokriner Systeme kann zu Herzinsuffizienz führen, sodass die Herzinsuffizienz als neurohumoraler Krankheitsprozess angesehen wird. Viele der Neurohormone, wie Angiotensin-II (AngII), Aldosteron, Norepinephrin, natriuretische Peptide, Endothelin 1 (ET1) und Tumor-Necrosis-Factor- α (TNF α) werden direkt im Herzen, u. a. in Kardiomyozyten, Fibroblasten und anderen kardialen Zellen synthetisiert. Darüber hinaus führt mechanischer Stress durch die vermehrte Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie AngII, ET1 und Transforming-Growth-Factor- β_1 (TGF- β_1), zur Aktivierung parakriner und autokriner Signaltransduktionswege im Herzen.⁴⁰

Wie diese neurohumoralen Systeme zu Hypertrophie und Fibrose führen, ist unklar. In myokardialen Umbauprozessen und der Progression der Herzinsuffizienz kommt dem RAAS eine besondere Bedeutung zu, da es bei Patienten mit kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz aktiviert ist^{36,41} und sein Effektorpeptid AngII den Krankheitsverlauf durch hypertrophie- und fibrosefördernde Eigenschaften⁴² unterstützt. So führt die chronische Gabe von AngII im Tiermodell zu kardialer Hypertrophie und perivaskulärer Fibrose.⁴³ Des Weiteren induziert AngII den Wachstumsfaktor TGF- β_1 , der die profibrotischen Effekte von AngII durch Induktion der Kollagensynthese in Kardiomyozyten und Fibroblasten vermittelt.^{44,45} Neben AngII stimuliert auch Aldosteron die Kollagensynthese in Fibroblasten.⁴⁶ Die Bedeutung des kardialen RAAS bei myokardialem Remodeling wird durch den klinischen Erfolg der ACE-Hemmer, Angiotensin-II-

Subtyp-1 (AT1)- Rezeptorblocker und Aldosteronantagonisten-Therapie unterstrichen, die kardiale Umbauprozesse hemmen und die Prognose von Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion und Herzinsuffizienz verbessern.^{47,48} Wie jedoch das RAAS im erkrankten menschlichen Herzen reguliert wird und wie diese Regulation mit der kardialen Funktionseinschränkung assoziiert ist, war unklar.

Der mortalitätsreduzierende Effekt von ACE-Hemmern erreicht bei herzinsuffizienten Patienten nach ca. fünf Jahren⁴⁹ ein Plateau und die Mortalität ist weiterhin hoch. Diese klinische Beobachtung spricht dafür, dass andere, myokardiales Remodeling und Herzinsuffizienz fördernde Systeme kompensatorisch aktiviert sind. Neuere Studien zeigen, dass Bradykinin einen Teil der günstigen ACE-Hemmer-Effekte am Herzen vermittelt.⁵⁰ Bradykinin zeigt antiproliferative und kardioprotektive Effekte,⁵¹ reduziert Hypertrophie und Fibrose und hemmt so die Progression von Herzinsuffizienz.⁵¹ Es wird vorwiegend durch die neutrale Endopeptidase (NEP; Nephilysin, EC 3.4.24.11) sowie das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) abgebaut.^{52,53} Da die myokardiale NEP Bradykinin abbaut, vermuteten wir, dass sie bei myokardialem Remodeling aktiviert ist und so die günstigen ACE-Hemmer-Effekte durch vermehrten Bradykininabbau umgeht. Wir untersuchten daher die Regulation von Aktivität und Expression der NEP im hypertrophierten und insuffizienten menschlichen Herzen.

Wie die Aktivierung neuroendokriner Systeme zu myokardialem Remodeling führt, ist unklar. Sie bewirkt eine Induktion Stress-induzierbarer Kinasen und Phosphatasen, wie Proteinkinase D1 (PKD1), Protein Kinase C (PKC), Kalzium/Kalmodulin-abhängige Kinase-II (CAMKII), cyclic-AMP-abhängige-Proteinkinase A (PKA), Mitogenaktivierte-Proteinkinase (MAPKs) und Kalzineurin.¹⁰ Dadurch werden Transkriptionsfaktoren, wie Myocyte-Enhancer-Factor 2 (MEF2) und Nuclear-Factor of Activated-T-Cells (NFAT), aktiviert, welche die Expression verschiedener Zielgene regulieren und so zur Veränderung von zellulärer Struktur, Größe, Form und Funktion des Herzens führen.¹⁰ Ein molekularer Mechanismus des AngII-vermittelten myokardialen Remodelings könnte die PKD1-vermittelte Phosphorylierung und Hemmung von Klasse-II-HDACs sein.⁵⁴⁻⁵⁶ So aktiviert AngII beispielsweise PKD1 in Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen.^{54,57-59} Außerdem wird die AngII-induzierte Hypertrophie von Kardiomyozyten durch Hemmung von PKD1 geblockt. Darüber hinaus bewirkt die Überexpression von PKD1 im Herzen myokardiales Remodeling mit Hypertrophie und Dilatation sowie interstitielle Fibrose, was im weiteren Verlauf zu Herzinsuffizienz und Tod führt.⁵⁸ Die AngII-vermittelte Aktivierung von PKD1 veranlasst deren Translokation in den Zellkern, wo PKD1 die Klasse-II-HDACs phosphoryliert und durch nukleären Export inaktiviert⁶⁰. Klasse-II-HDACs hemmen den Transkriptionsfaktor MEF2 und inhibieren so das myokardiale

Remodeling.^{3,61,62} Anhand dieses Mechanismus wird deutlich, dass PKD1 über die Hemmung von Klasse-II-HDACs indirekt MEF2-vermittelte myokardiale Umbauprozesse fördern könnte. Diese Befunde zeigen die zentrale Funktion von PKD1 im AngII-vermittelten kardialen Remodeling. Ein therapeutischer Eingriff in die AngII/PKC/PKD1/Klasse-II-HDACs/MEF2-Achse durch Hemmung der PKD1-Aktivität könnte daher den Verlauf von Hypertrophie und Herzinsuffizienz positiv beeinflussen. Welche Funktion PKD1 im Herzen *in vivo* einnimmt, war jedoch unklar.

Die Bedeutung antihypertropher Regulationsmechanismen in der Entstehung der kardialen Hypertrophie wird erst seit Kurzem untersucht. Die Rationale dafür ist die Beobachtung, dass die kardiale Hypertrophie trotz weiterbestehendem Auslöser ein Gleichgewicht erreicht und reversibel ist.⁶³ Darüber hinaus zeigten unsere Untersuchungen, dass posttranslationale Modifikationen von Proteinen und ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -degradation für die Entstehung von myokardialen Umbauprozessen und den Übergang der kardialen Hypertrophie in die Herzinsuffizienz wichtig sind.^{64,65} Ein essentieller Mechanismus in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie ist der Abbau von langlebigen oder fehlsynthetisierten Proteinen, wie z.B. Komponenten des kontraktiven Apparates in quergestreiften Muskelzellen^{66,67} durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).⁶⁸ Kürzlich publizierte Daten demonstrierten eine Aktivierung des UPS bei myokardialem Remodeling;⁶⁹ seine Funktion hierbei war allerdings unklar. Die Substratspezifität des UPS wird durch E3-Ubiquitinligasen vermittelt.^{64,65,70} Hierbei kommt den RING (Really Interesting New Gene)-Finger-E3-Ligasen MuRF 1, 2 und 3 eine besondere Bedeutung zu, da sie spezifisch im Herz- und Skelettmuskel exprimiert werden.⁷¹ MuRF-Proteine sind am Sarkomer lokalisiert^{71,72} und formen Homo- und -Heterodimere.⁷¹⁻⁷³ Obgleich *in-vitro*-Untersuchungen auf eine Rolle von E3-Ubiquitinligasen in der PKC epsilon⁷⁴- bzw. Kalzineurin⁷⁵-induzierten Kardiomyozytenhypertrophie hinweisen, gab es keine *in-vivo*-Daten über deren Funktion bei myokardialem Remodeling.

Unser Ziel war es, die molekularen Mechanismen myokardialer Umbauprozesse und des Übergangs der kardialen Hypertrophie in die Herzinsuffizienz als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung dieser Krankheitsbilder detaillierter zu untersuchen.

II. Eigene Originalarbeiten

1. Chronische Druck- und Volumenüberlastung führt zu einer Aktivierung des myokardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems und interstitieller Fibrose im menschlichen Herzen.

Tierexperimentelle Studien zeigten, dass eine chronische Druck- und Volumenüberlastung zur Aktivierung des myokardialen RAAS führt⁷⁶, welches danach direkt und indirekt, durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren, myokardiale Umbauprozesse induziert.⁷⁶ Ob dieser Pathomechanismus auch im Herzmuskel von Patienten mit Hypertrophie und Herzinsuffizienz auftritt, war unklar. Wir postulierten, dass 1. das gewebeständige RAAS bei Patienten mit myokardialem Remodeling aktiviert ist; 2. die RAAS-Aktivierung mit einer gesteigerten Expression von Wachstumsfaktoren verbunden ist; 3. die molekularen Veränderungen mit der Schwere der Herzinsuffizienz korrelieren und 4. chronische Druck- und Volumenüberlastung zu myokardialer Fibrose führt, die mit einer verminderten systolischen und diastolischen kardialen Funktion einhergeht. Diese Hypothesen prüften wir unter Verwendung von Myokardbiopsien, die während einer Aortenklappenersatzoperation von Patienten mit einer operationsbedürftigen Aortenklappenstenose (AS; chronische Drucküberlastung) und Aortenklappeninsuffizienz (AI; chronische Volumenüberlastung) gewonnen wurden. Als Vergleichsgewebe dienten Myokardproben von Spenderherzen, die aus logistischen Gründen nicht implantiert wurden.

Wir konnten erstmals nachweisen, dass die myokardiale ACE-Expression und -Aktivität, als Maß für eine RAAS-Aktivierung, in menschlichen Herzen bei AS und AI induziert ist. Interessanterweise trat diese Aktivierung schon in einem frühen Krankheitsstadium bei noch erhaltener systolischer Funktion (linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) > 55%) auf. Durch immunhistochemische Analysen lokalisierten wir ACE auf Kardiomyozyten und bestätigten dessen Heraufregulation in Kardiomyozyten von AS und AI auf Proteinebene. Zusammen mit unseren früheren Daten³⁶ weisen diese Ergebnisse eine Aktivierung des gewebeständigen RAAS und seines Effektorpeptids AngII bei myokardialen Umbauprozessen nach. Da AngII seine Effekte teilweise durch eine gesteigerte Expression des myokardialen Wachstumsfaktors TGF- β 1 vermittelt, untersuchten wir die Menge an TGF- β 1 bei myokardialem Remodeling. Tatsächlich fanden wir eine Induktion von TGF- β 1 bei AS und AI, die indirekt proportional zur kardialen Funktion war. Darüber hinaus zeigte sich eine synergistische Zunahme von ACE und TGF- β 1. Diese Daten implizieren, dass die

kardialen AngII-Effekte zumindest teilweise über eine TGF- β 1-Induktion vermittelt werden. Unsere eigenen *in-vitro*-Studien und die anderer Gruppen an humanen kardialen Fibroblasten und Vorhofmyokardproben zeigten, dass TGF- β 1 die Kollagen-I- und -III-Expression induziert.^{45,77,78} Demnach könnte die gesteigerte TGF- β 1-Expression bei AS und AI die Kollagen-I-, -III- und Fibronektin-Synthese heraufregulieren und so das Auftreten myokardialer Fibrose begünstigen. In der Tat war die Expression von Kollagen I, III und Fibronektin bei AS und AI erhöht und es zeigte sich ebenfalls interstitielle Fibrose bei AS und AI. Diese gesteigerte Kollagensynthese war schon im frühen Krankheitsstadium, d.h. bei AS-Patienten mit normaler LVEF, nachweisbar und erhöhte sich weiter mit Abnahme der kardialen Funktion. Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung der myokardialen Fibrose beim Übergang von der kompensierten Hypertrophie in die Herzinsuffizienz. Diese Annahme wird durch die positiven Korrelationen zwischen Kollagen I, III, FN und linksventrikulärem enddiastolischem Füllungsdruck (LVEDP) sowie durch die negativen Korrelationen zwischen Kollagen I und III und LVEF unterstützt. Die Assoziation zwischen Kollagenexpression und LVEDP weist auf einen engen Zusammenhang zwischen myokardialer Fibrose und diastolischer Funktionseinschränkung hin.^{25,79} Die negative Korrelation zwischen der Kollagenexpression und der LVEF spricht für deren Beteiligung beim Auftreten kardialer Funktionseinschränkungen. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die eingeschränkte diastolische und systolische Funktion bei Patienten mit AS und AI eine Folge der myokardialen Fibrose sein könnte.

Zusammen mit unseren *in-vitro*-Daten⁷⁷ implizieren die Ergebnisse dieser Publikation, dass RAAS und myokardiale Wachstumsfaktoren sehr frühzeitig, d.h. vor dem Auftreten einer Herzinsuffizienz, bei AS und AI aktiviert werden, die RAAS-Aktivierung mit fortschreitender Herzinsuffizienz zunimmt und durch Induktion des myokardialen Wachstumsfaktors TGF- β 1 eine zentrale Funktion in der myokardialen Fibroseentstehung übernimmt. Unsere Daten unterstützen auf molekularer Ebene die klinische Beobachtung, dass AngII in der Genese der kardialen Dysfunktion bei mechanisch überlasteten menschlichen Herzen beteiligt ist.⁸⁰ Eine Hemmung des gewebeständigen RAAS, seiner Effektoren oder Signaltransduktionswege könnte daher das myokardiale Remodeling bei pathologischer Druck- und Volumenüberlastung hemmen.

J. Fielitz, S. Hein, M. Veselin, R. Pregla, HR. Zurbrügg, C. Warnecke, J. Schaper, E. Fleck, V. Regitz-Zagrosek, Activation of the Cardiac Renin Angiotensin System and Increased Myocardial Collagen Expression in Human Aortic Valve Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2001; 37:1443-9

2. Die Neutrale Endopeptidase ist in Kardiomyozyten von Patienten mit Aortenklappenstenose und Herzinsuffizienz aktiviert.

Die Therapie von herzinsuffizienten Patienten mit ACE-Hemmern führte zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität.⁴⁷ Allerdings erreicht dieser Effekt nach ca. fünf Jahren⁴⁹ ein Plateau und die Mortalität dieser Patienten ist trotz Optimierung der Herzinsuffizienztherapie sehr hoch.⁸¹ Diese Befunde sprechen unter anderem dafür, dass die ACE-Hemmung durch Aktivierung anderer, das myokardiale Remodeling und Herzinsuffizienz fördernder Systeme, umgangen wird. Da kürzlich publizierte Daten implizieren, dass die Effekte von ACE-Hemmer teilweise durch Bradykinin vermittelt werden⁸² und NEP das hauptsächlich Bradykinin-abbauende Enzym im menschlichen Herzen ist,⁵² vermuteten wir, dass eine Aktivierung der NEP die günstigen ACE-Hemmer-Effekte abschwächen könnte. Allerdings war die subzelluläre Lokalisation und Regulation der NEP im menschlichen Herzen unbekannt. Myokardbiopsien, die während einer Aortenklappenersatzoperation von Patienten mit AS oder während einer Herztransplantation von Patienten mit idiopathischer Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) im Endstadium der Herzinsuffizienz gewonnen wurden, dienten als Grundlage zur Überprüfung der Hypothese der Heraufregulation und Aktivierung von NEP bei Herzinsuffizienz. Als Vergleichsgewebe nutzten wir Myokardproben von Spenderherzen, die aus logistischen Gründen nicht implantiert wurden.

Mittels *in-situ*-PCR und Immunhistochemie konnten wir erstmals nachweisen, dass NEP sowohl auf Kardiomyozyten als auch auf Nichtmyozyten lokalisiert und bei AS und DCM vor allem in den Kardiomyozyten heraufreguliert ist. Quantitative RT-PCR bestätigte die Heraufregulation der NEP-mRNA bei AS, welche bei Patienten mit einer reduzierten LVEF (LVEF < 35% vs. > 35%) deutlich stärker ausgeprägt war. Vergleichbare Ergebnisse zeigten DCM-Biopsien. Parallel dazu war auch die NEP-Aktivität bei AS- und DCM-Patienten mit erhöhtem LVEDP stärker.

Unsere Daten und die anderer Gruppen^{51,83} lassen vermuten, dass eine gesteigerte NEP-Aktivität, wie sie bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz auftritt, zu einem gesteigerten Abbau von myokardialen Bradykinin, ANP und BNP führt und auf diese Weise die Progredienz von myokardialen Remodeling begünstigt. Eine erhöhte NEP-Aktivität könnte bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz trotz ACE-Hemmer-Therapie weiterhin Bradykinin abbauen und so den Therapieeffekten entgegenwirken. Eine kombinierte ACE- und NEP-Hemmer-Therapie könnte einen neuen Ansatz für die Therapie der Herzinsuffizienz und den Übergang der kardialen Hypertrophie in die Herzinsuffizienz bieten.⁸⁴

J. Fielitz, A. Dendorfer, R. Pregla, E. Ehler, HR Zurbrügg, J. Bartunek, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek, Neutral Endopeptidase is activated in cardiomyocytes in human aortic valve stenosis and heart failure. *Circulation*. 2002; 105:286-289

3. Die differentielle Regulation von Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren im Herzen von Patienten mit Aortenklappenstenose ist mit myokardialem Remodeling assoziiert.

Unsere Voruntersuchungen zeigten, dass die Kollagen-I-, -III- und Fibronektin-Synthesen bei Patienten mit chronischer Druck- und Volumenüberlastung (AS, AI) und Herzinsuffizienz (DCM) gesteigert sind und dabei das Myokard umgebaut wird. Diese myokardialen Umbauprozesse sind durch linksventrikuläre Hypertrophie und Fibrose gekennzeichnet und gehen mit einer gestörten diastolischen und systolischen Funktion einher. Die Mechanismen, wie die gesteigerte Kollagensynthese zu einer pathologischen Akkumulation von ECM-Proteinen und myokardialer Fibrose führt, waren unklar. Voruntersuchungen ließen vermuten, dass ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Kollagensynthese und -degradation ursächlich dafür sein kann. So ist der Abbau von ECM-Proteinen bei Patienten mit ischämischer und nicht-ischämischer Kardiomyopathie durch eine Fehlregulation von MMP und deren Inhibitoren gestört, was zu myokardialer Fibrose führt.⁸⁵ Anhand von Tiermodellen der linksventrikulären Hypertrophie, Herzinsuffizienz und dem Myokardinfarkt wurden krankheitsspezifische und differentielle Regulationen von MMP und TIMP im Myokard nachgewiesen.^{30,86} Diese Studien implizierten, dass die Kollagenakkumulation und myokardiale Fibrose bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz durch eine reduzierte MMP-Aktivität gefördert wird.^{27,87,88} Daten zur Regulation von MMP und TIMP in Patienten mit hypertrophiebedingtem linksventrikulären Remodeling waren nicht verfügbar.

Wir postulierten, dass eine chronische Drucküberlastung im Herzen von AS-Patienten zu einer Fehlregulation von MMP und TIMP führt, wodurch das Gleichgewicht zwischen Kollagensynthese und -abbau gestört und myokardiales Remodeling induziert wird. Da die Kollagensynthese bei linksventrikulärer Hypertrophie gesteigert ist, könnte ein verminderter Kollagenabbau die Kollagenakkumulation im Herzen fördern und für myokardiales Remodeling mitverantwortlich sein. Wir untersuchten die Regulation von MMP und TIMP in Herzmuskelbiopsien von Patienten mit operationsbedürftiger AS, die während einer Aortenklappenersatzoperation gewonnen wurden. Als Vergleichsgewebe wurden Proben von Spenderherzen, die aus logistischen Gründen nicht implantiert wurden, verwendet.

Unsere Daten zeigen erstmals eine selektive und koordinierte Regulation von verschiedenen MMP und TIMP auf mRNA-, Protein-, und Aktivitätsebene im Myokard von Patienten mit ventrikulärem Remodeling auf Basis einer chronischen Drucküberlastung. Die Ursachen der differentiellen Regulation von MMP und TIMP sind unklar. Trotz erhöhter Expression einiger MMP verschob sich

das Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP im Sinne unserer Ausgangshypothese in Richtung MMP-Inhibition. Diese Ergebnisse demonstrieren Übereinstimmung mit dem Konzept des reduzierten Kollagenabbaus und gesteigerter Kollagenakkumulation durch eine verminderte myokardiale MMP-Aktivität im Verlauf einer kardialen Hypertrophie.^{27,87} Darüber hinaus ist unsere Beobachtung zur Regulation bestimmter MMP und TIMP bei AS konsistent mit Daten von Patienten mit einer ischämischen und nichtischämischen Kardiomyopathie.^{29,85}

Zusammenfassend ist das Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP in Herzen von AS-Patienten hin zu einer verminderten MMP-Aktivität verschoben. Da bei diesen Patienten die Kollagensynthese gesteigert ist, könnte eine verminderte MMP-Aktivität das Gleichgewicht zwischen Kollagensynthese und -abbau hin zu einer vermehrten Kollagenakkumulation verschieben. Dieser Pathomechanismus könnte eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer antifibrotischer Medikamente spielen.

J. Fielitz, M. Leuschner, L. Herda, B. Hannack, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek. Differential regulation of matrixmetalloproteinases and their inhibitors in human left ventricular hypertrophy due to aortic valve stenosis. *J Mol Med.* 2004 Dec;82(12):809-20

4. Die Hemmung der Kollagenquervernetzung im Herzen durch einen Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitor verbessert die kardiale Funktion im Hypertrophiemodell der Ratte.

Unsere bisherigen Daten zeigten, dass die myokardiale Fibrose von AS-Patienten eng mit einer Verschlechterung der systolischen und diastolischen Ventrikelfunktion assoziiert ist.⁸⁹ Weitere Untersuchungen zeigten, dass es bei myokardialen Remodeling zu pathologischer Kollagenquervernetzung kommt, die dann zu einer gesteigerten myokardialen Steifigkeit führt.^{33,90} Im Umkehrschluss implizierten diese Daten, dass die Hemmung von myokardialer Fibrose und Kollagenquervernetzung der Entstehung einer hypertrophieinduzierten Herzinsuffizienz entgegenwirken könnte. Um diese Hypothese zu testen, untersuchten wir die kardialen Effekte eines oral verfügbaren Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase-Hemmers (K-P4HI), der die Hydroxylierung von Prolinresten in Kollagenmolekülen und so die Kollagenquervernetzung hemmt,^{35,91} in einem Hypertrophiemodell der Ratte.³⁵ In diesem Modell wird kardiales Remodeling mit Hypertrophie und interstitieller Fibrose durch Konstriktion der thorakalen Aorta (TAC) induziert.⁹² In früheren Untersuchungen reduzierte der hier verwendete K-P4HI erfolgreich Kollagenhydroxylierung, Kollagenquervernetzung, linksventrikuläres Remodeling und verbesserte das Überleben in einem Ratteninfarktmodell.³⁵

Wir fanden, dass die Gabe des K-P4HI die Kollagenhydroxylierung (gemessen an der Hydroxyprolin/Prolin-Ratio) bei TAC-Tieren normalisierte und kardiales Remodeling verhinderte. Der K-P4HI verbesserte die systolische und diastolische kardiale Funktion, gemessen an einer Reduktion des durch TAC gesteigerten LVEDP und relativen Lungengewichts sowie einer Verbesserung der durch TAC bedingten Reduktion der kardialen Kontraktilität. Die funktionelle Verbesserung wurde von einer Reduktion der lastinduzierten Kollagensynthese, einer Normalisierung der lastinduzierten Veränderungen des MMP/TIMP-Systems und einer verminderten Expression der kardialen Wachstumsfaktoren CTGF, TGF- β 1 und ITG- β 1 begleitet. Zusammenfassend zeigten unsere Daten, dass die Hemmung der Kollagenquervernetzung durch K-P4HI myokardiale Umbauprozesse verhindert und die Hemmung einer TAC-induzierten Fibrose günstige Wirkungen auf die kardiale Funktion und hypertrophieassoziierte Genexpression hat. Die Hemmung der Kollagenquervernetzung führte zu einer verbesserten systolischen Funktion und einer verminderten Steifheit des linken Ventrikels trotz weiterhin bestehender chronischer Drucküberlastung. K-P4HI könnten daher nützlich in der Therapie des druckinduzierten linksventrikulären Remodelings sein.

J. Fielitz, S. Philipp, L.R. Herda, E. Schuch, B. Pilz, C. Schubert, V. Günzler, R. Willenbrock, V. Regitz-Zagrosek. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase prevents left ventricular remodeling in rats with thoracic aortic banding. *European Journal of Heart Failure* 2007 Apr;9(4):336-42

5. Proteinkinase D1 ist ein Schlüsselenzym für das Auftreten myokardialer Umbauprozesse.

Gegenwärtig ist unklar, wie die Aktivierungen des RAAS und seines Effektorpeptids AngII zu myokardialem Remodeling mit kardialer Hypertrophie und Fibrose führen. Unsere Vorarbeiten zeigten, dass das myokardiale RAAS bei Patienten mit AS und Herzinsuffizienz aktiviert ist⁸⁹ und AngII prohypertrophe und profibrotische Effekte am Herzen bewirkt.⁷⁷ Entsprechend führt die chronische Gabe von AngII zu kardialer Hypertrophie und perivaskulärer Fibrose im Mausmodell.⁶¹ Welche Signaltransduktionswege durch AngII im Herzen aktiviert werden und die AngII-Effekte vermitteln, war unklar. Aufgrund von Daten, die in der Zellkultur und mittels transgener Tiere gewonnen wurden,^{54,55} postulierten wir, dass die AngII-Effekte in Muskelzellen hauptsächlich durch PKD1 vermittelt werden.⁵⁶ So aktiviert AngII die PKD1, welche dann Klasse-II-HDACs phosphoryliert, wodurch die wachstums- und umbaufördernden MEF2-Transkriptionsfaktoren enthemmt und myokardiale Umbauprozesse induziert werden. Allerdings wird PKD1 auch durch andere neuroendokrine Effektoren (z.B. ET1), Wachstumsfaktoren, arterielle Hypertonie und chronische Drucküberlastung aktiviert,^{54,56-59} sodass PKD1 als Knotenpunkt bei der Vermittlung myokardialer Umbauprozesse agieren könnte. Darüber hinaus hemmt die Elimination von PKD1 mit siRNA myozytäre Hypertrophie, wohingegen die kardiale Überexpression von PKD1 myokardiales Remodeling mit Hypertrophie, linksventrikulärer Dilatation und interstitieller Fibrose bewirkt und im weiteren Verlauf zu Herzinsuffizienz und Tod führt.⁵⁸ Ob PKD1 eine Rolle bei myokardialen Remodeling *in vivo* spielt, war unklar.

Das Postulat der Schlüsselrolle von PKD1 im AngII-induzierten myokardialen Remodeling sollte *in vivo* geprüft werden. Zu diesem Zweck generierten wir ein Mausmodell mit einer konditionellen PKD1-Keimbahndeletion, in der eine Deletion des *Prkcm*-Gens unter Zuhilfenahme des CRE-loxP-Rekombinationssystems zellspezifisch erfolgen kann. Hierfür wurden den Exons 12 bis 14 flankierende LoxP-Stellen in den genomischen Lokus von *Prkcm* inseriert. Diese Exons kodieren für das katalytische Zentrum einschließlich des ATP-Bindungsmotivs von PKD1. Die kardiomyozytenspezifische Deletion wurde durch Verwendung von α -MHC-CRE-transgenen Mäusen,⁹³ welche die CRE-Rekombinase spezifisch in Kardiomyozyten exprimieren, generiert. Mäuse mit einer kardiomyozytenspezifischen Deletion von PKD1 (PKD1-cKO) waren nicht von ihren Wildtyp (WT)- Geschwistertieren zu unterscheiden. Die Expression von *Prkcm2* (kodiert PKD2) und *Prkcn* (kodiert PKD3) war nicht kompensatorisch heraufreguliert.

Unsere Ausgangshypothese der Vermittlung des AngII-induzierten myokardialen Remodelings durch PKD1 prüften wir durch die Behandlung der PKD1-cKO- und WT-Tiere entweder mit AngII-

oder Lösungsmittel (Vehicle)- tragenden miniosmotischen Pumpen. Die Herzen der Tiere wurden grobmorphologisch, histologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch analysiert. Im Vergleich zu WT-Tieren präsentierten PKD1-cKO-Tiere deutlich weniger kardiale Hypertrophie nach AngII-Gabe. Interessanterweise zeigten PKD1-cKO-Tiere weniger AngII-induzierte perivaskuläre Fibrose im Vergleich zu WT-Tieren. Auch die AngII-vermittelte höhere Expression von ANP und Prokollagen Typ I α 2 (Kol1 α 2) war in PKD1-cKO- geringfügiger als in WT-Tieren, was auf geringeren myokardialen Stress in den PKD1-cKO-Tieren hinweist. Zusammenfassend demonstrierten wir, dass die myozytäre PKD1 eine Schlüsselrolle beim AngII-induzierten ventrikulären Remodeling innehat. Der Nebenbefund, dass die AngII-induzierte perivaskuläre Fibrose durch myozytäre PKD1 vermittelt wird, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die Spezifität einer PKD1-Inaktivierung für AngII überprüften wir durch die Analyse der myokardialen Umbauprozesse in PKD1-cKO- und WT-Tieren nach chronischer Applikation des betaadrenergen Agonisten Isoproterenol (ISO). Interessanterweise fanden wir weniger kardiales Remodeling mit reduzierter Hypertrophie und weniger interstitieller Fibrose sowie eine reduzierte Aktivierung des fetalen Genprogramms in PKD1-cKO-Tieren nach ISO-Gabe, obwohl PKD1 durch ISO *in vitro* nicht aktiviert wird.⁵⁸ Gegenwärtig wird die Ursache hierfür näher untersucht.

Die Grundlage zur Prüfung der Hypothese, dass PKD1 ein Knotenpunkt in der Entstehung von drucklastinduziertem myokardialen Remodeling ist, bildete das TAC-Model (siehe Punkt 4). Die TAC-induzierte linksventrikuläre Hypertrophie war in den PKD1-cKO-Tieren wesentlich geringer als in den WT-Tieren (23% vs. 47%; $p < 0.01$). Die Drucküberlastung wurde in den WT-Tieren von einer massiven interstitiellen Fibrose begleitet, die in PKD1-cKO- Herzen deutlich geringer war. Die myokardiale Funktion, gemessen mit Echokardiographie, präsentierte sich nach drei Wochen TAC in den PKD1-cKO- besser erhalten als in den WT-Tieren. Zusätzlich zeigte die Analyse des fetalen Genprogramms, dass PKD1 für dessen maximale Aktivierung bei TAC erforderlich ist. Die TAC-induzierte Heraufregulation der molekularen Hypertrophiemarker ANP, BNP und β -Myosin Heavy Chain (β -MHC; Myosinschwerkettenprotein) war in PKD1-cKO-Tieren erheblich reduziert. Die Heraufregulation von Kol1 α 2 war ebenfalls bei PKD1-cKO vermindert. Diese Daten demonstrieren, dass PKD1 im chronisch drucküberlasteten Herzen eine Schlüsselrolle im myokardialen Remodeling und der funktionellen Verschlechterung einnimmt.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse erstmals, dass die myozytäre PKD1 eine kritische Komponente derjenigen Signaltransduktionswege ist, durch die AngII, adrenerge Stimuli und eine chronische Drucküberlastung zu myokardialem Remodeling führen. Die Aktivierung von PKD1 durch verschiedene myokardiales Remodeling induzierende Stimuli, die Aktivierung von PKD1 im

insuffizienten menschlichen Herzen, die Induktion von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz in PKD1-transgenen Tiermodellen^{58,59} und das offensichtliche Erfordernis von PKD1 für eine maximale hypertrophe Antwort im Mausmodell weisen darauf hin, dass PKD1 ein vielversprechendes Target in der Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung von myokardialem Remodeling zu sein scheint.

J. Fielitz, M. Kim, JM Shelton, X. Qi, JA Hill, JA Richardson, R. Bassel-Duby, and EN Olson. Requirement of Protein Kinase D1 for Pathological Cardiac Remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 26;105(8):3059-63

6. Die RING-Finger E3-Ubiquitinligase Muscle-RING-Finger 3 ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der kardialen Struktur und Funktion während eines Myokardinfarktes

Ein wesentlicher Mechanismus in der Entstehung von kardialem Remodeling und Kardiomyopathien ist ein gestörter Abbau intrazellulärer Proteine.⁹⁴ Der Abbau langlebiger Strukturproteine in Muskelzellen erfolgt hauptsächlich durch das UPS,⁶⁶ das bei myokardialen Umbauprozessen und kardialer Hypertrophie aktiviert ist.⁶⁹ Allerdings ist die genaue Funktion des UPS hierbei unklar. Die Substratspezifität des UPS im Herzen wird vor allem durch die muskelspezifischen E3-Ubiquitinligasen MuRF1 und 3 vermittelt. Da MuRF3 am Sarkomer lokalisiert ist,⁷² an Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert,⁷¹ postulierten wir, dass MuRF3 eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Kardiomyozyten unter akuten Stressbedingungen spielt. Um diese Hypothese zu testen, generierten wir eine Keimbahndeletion von MuRF3 (MuRF3-KO) und induzierten einen akuten Myokardinfarkt durch Abbinden des *Ramus interventrikularis anterior*. Nach Myokardinfarkt zeigten MuRF3-KO-Mäuse Zeichen der Herzinsuffizienz und eine höhere Mortalität als WT-Tiere. Echokardiographisch zeigten MuRF3-KO-Mäuse eine stärkere Vergrößerung der linksventrikulären Diameter (linksventrikulärer enddiastolischer LVEDD und endsystolischer Diameter LVESD), eine signifikante Abnahme der systolischen Funktion und eine Verringerung der linksventrikulären Wanddicke nach Myokardinfarkt als WT-Mäuse. Der gesteigerte kardiale Stress in MuRF3-KO-Mäusen führte zu einer stärkeren Aktivierung des fetalen Genprogramms, ANP, α -MHC und des kardialen Stressmarkers c-fos. Diese Daten zeigen, dass ein akuter Myokardinfarkt zu einem gesteigerten ventrikulären Remodeling und Herzinsuffizienz in MuRF3-KO- verglichen mit WT-Mäusen führt. MuRF3 ist demnach für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion nach Myokardinfarkt unerlässlich. Als Ursache für die gesteigerte Mortalität von MuRF3-KO-Tieren fanden wir eine Ventrikelruptur, die im Bereich der Infarktgrenzzone auftrat. Die Infarktgrenzzone in MuRF3-KO-Mäusen war durch degenerierte und TUNEL-positive Myozyten, ein Hinweis auf gesteigerten Zelltod, und intramurale Einblutungen gekennzeichnet. Zusammenfassend zeigen unsere Befunde, dass MuRF3 für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und Funktion des Herzens während eines akuten Myokardinfarktes wichtig ist.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen des kardialen Phänotyps der MuRF3-KO-Mäuse führten wir einen Yeast-Two-Hybrid-Assay unter Verwendung einer humanen kardialen cDNA-Bibliothek und MuRF3 durch. Ziel war das Auffinden von Zielproteinen, die mit MuRF3 interagieren,

durch MuRF3 ubiquitiniert und durch das UPS degradiert werden. Wir fanden, dass MuRF3 mit dem Four-and-a-half-LIM-domain-Protein (FHL2) und γ -Filamin interagiert und dass der über MuRF3 vermittelte Abbau von FHL2 und γ -Filamin an der kardioprotektiven Funktion von MuRF3 beteiligt ist. Da FHL2 Apoptose fördert,⁹⁵ untersuchten wir, ob die Akkumulation von FHL2 die MuRF3-KO-Herzen auf Apoptose sensibilisiert. Wir konnten zeigen, dass die Applikation von ISO, einem etablierten Apoptoseinduktor,⁹⁶ über sieben Tage zu einer geringeren kardialen Hypertrophie in MuRF3-KO-Tieren führte. Echokardiographisch stellte sich bei MuRF3-KO-Tieren ein vergrößerter LVESD und eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion dar. Mittels TUNEL-Assay konnten wir dann im Sinne unserer Ausgangshypothese nachweisen, dass ISO zu einem zweifachen Anstieg der Apoptose in Kardiomyozyten führte. Diese Daten unterstreichen unsere Vermutung, dass die Abwesenheit von MuRF3 die Empfindlichkeit des Herzens für Apoptose in kardialen Stresssituationen steigert.

Wir schlussfolgern, dass die muskelspezifische E3-Ubiquitinligase MuRF3 eine wichtige Rolle in der frühen Phase des periinfarziellen myokardialen Remodelings spielt und essentiell in der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion und Integrität während eines Myokardinfarktes ist. Des Weiteren ist der über MuRF3 vermittelte Abbau von FHL2 und γ -Filamin im Herzen zumindest teilweise für die kardioprotektiven Effekte von MuRF3 verantwortlich.

J. Fielitz, J. Spencer, E. van Rooij, L. De Windt, J. Hill, J. Richardson, R. Bassel-Duby, EN Olson. Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 13;104(11):4377-82

7. Der Verlust der RING-Finger E3-Ubiquitinligasen Muscle-RING-Finger 1 und 3 führt zu pathologischen myokardialen Umbauprozessen im ungestressten Herzen

Die Familie der MuRF-Proteine (MuRF1, 2 und 3) ist spezifisch im Herz- und Skelettmuskel exprimiert, weist eine starke Homologie in den funktionellen Domänen auf, homo- und heterodimerisiert und die einfachen Keimbahndeletionen von MuRF1 und 3 präsentieren keinen basalen Phänotyp.^{65,97} Aus diesen Gründen könnten die beschriebenen Phänotypen der MuRF-KO-Mäuse nicht die Gesamtfunktion der MuRF-Proteine bei kardialem Remodeling widerspiegeln. Zur Untersuchung einer möglichen funktionellen Redundanz der MuRFs im Herzen und der genaueren Charakterisierung ihrer Funktionen generierten wir eine doppelte Keimbahndeletion von MuRF1 und 3 (DKO).

Interessanterweise waren die DKO-Hezen im Vergleich zu WT-, MuRF1-KO- und MuRF3-KO-Mäusen deutlich hypertrophiert. Echokardiographisch war die systolische Herzfunktion der DKO-Hezen stark eingeschränkt, was sich auch in einer vermehrten Expression des kardialen Stressmarkers ANP manifestierte. Histologisch und elektronenmikroskopisch war die subsarkolemmale Akkumulation eines noch zu identifizierenden Proteins in Kardiomyozyten von DKO-Tieren evident. Darüber hinaus wiesen die DKO-Mäuse einen myopathischen Phänotyp im Skelettmuskel auf. Histologische Untersuchungen der Skelettmuskulatur zeigten ebenfalls eine subsarkolemmale Proteinakkumulation entlang der gesamten Muskelfaserlänge und um einen zentralen Myofibrillenkern herum. Die Myofibrillen von DKO-Mäusen zeigten eine abnorme Größenvariabilität, atrophische Muskelfasern und zentralisierte Zellkerne als unspezifische Zeichen einer Myopathie. Durch elektrophysiologische Messungen konnte eine stark reduzierte maximale Kraftentwicklung des DKO-Skelettmuskels nachgewiesen werden.

Mittels SDS-PAGE, Massenspektrometrie, Elektronenmikroskopie, Western Blot und Immunhistochemie wurde das in Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen akkumulierende Protein als Myosinschwerkettenprotein (MHC) identifiziert. Unsere Befunde verdeutlichen, dass MuRF1 und 3 Schlüsselenzyme für den UPS-vermittelten Abbau von MHC in Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen sind und beide dabei redundant funktionieren. Mittels Ko-Immunopräzipitation und *in-vitro*-Ubiquitinierungsassays wiesen wir nach, dass MuRF1 und 3 mit β -MHC und MHCIIa interagieren, diese mit Hilfe der E2-ubiquitinkonjugierenden Enzyme UbcH5a, b, c ubiquitinieren und so den Abbau von β -MHC und MHCIIa durch das UPS vermitteln. Diese Ergebnisse konnten wir in nachfolgenden Zellkultur- und Tierexperimenten *in vitro* und *in vivo* bestätigen. Wir demonstrierten einerseits, dass eine Überexpression von MuRF1 und MuRF3 in

Skelettmuskelzellen zu einem gesteigerten Abbau von MHC *in vitro* führt. Andererseits zeigten wir, dass die Halbwertszeit von β -MHC im Herzen in Abwesenheit von MuRF1 und 3 in MuRF1- und -3-KO-Mäusen verlängert ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse unserer Studie erstmals, dass MuRF1 und 3 redundant den UPS-abhängigen Abbau von β -MHC und MHCIIa in Muskelzellen kontrollieren und der Abbau von β -MHC und MHCIIa durch MuRF1 und 3 unter Zuhilfenahme der E2-ubiquitinkonjugierenden Enzyme UbcH5a, b und c reguliert wird. Die Deletion von MuRF1 und 3 führte daher zu einer Akkumulation von MHC-Proteinen in Muskelzellen und ultrastrukturellen Veränderungen von Herz- und Skelettmuskelzellen, die eine dramatische Reduktion der Muskelfunktion mit Herzinsuffizienz und Skelettmuskeldystrophie bewirken. Wir schlussfolgern, dass MuRF1 und MuRF3 eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Herz- und Skelettmuskelfunktion – wenigstens teilweise über die Regulation der Ubiquitinierung und des Abbaus von MHC – spielen.

J. Fielitz, M. Kim, J. Shelton, S. Latif, JA Spencer, DA Glass, JA Richardson, R. Bassel-Duby, EN Olson. Myosin accumulation and striated muscle myopathy resulting from the loss of Muscle RING Finger 1 and 3. *J Clin Invest.* 2007 Sep;117(9):2486-95

III. Diskussion

In den hier zusammengefassten Arbeiten wurden mit den Methoden der Molekularbiologie und Biochemie die molekularen Mechanismen von myokardialem Remodeling, hervorgerufen durch kardiale Stresssituationen, näher untersucht. Darüber hinaus wurden neue Erkenntnisse zur spezifischen Rolle der Proteinkinase D1 und des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Pathogenese dieses Krankheitsprozesses vorgestellt. Die Publikationen bilden die Grundlage für eine Reihe von Anschlussarbeiten, die unser pathophysiologisches Verständnis über die Entstehung von myokardialem Remodeling vertiefen und so die Basis zur Entwicklung neuer Therapieansätze sein können.

Die Verfügbarkeit von humanem Herzmuskelgewebe aus Patienten mit myokardialem Remodeling ist stark limitiert, sodass bisher nur in Ausnahmefällen geprüft werden konnte, ob die in der Zellkultur und im Tiermodell beschriebenen molekularen Mechanismen auch im Menschen Gültigkeit besitzen. Die Erkenntnisse, dass das gewebeständige RAAS im Herzen von Patienten mit chronischer Druck- und Volumenüberlastung aktiviert ist und diese Aktivierung mit einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixproteinen einhergeht, unterstreichen die Bedeutung des RAAS für Pathogenese und Therapie der Herzinsuffizienz. Diese Ergebnisse unterstreichen ebenso die Annahme, dass myokardiales Remodeling mit kardialer Hypertrophie und Fibrose und dessen Progression in die Herzinsuffizienz als neuroendokrine Erkrankung gewertet werden muss. Sie verdeutlichen, dass eine chronische Druck- und Volumenüberlastung eine dauerhafte Aktivierung des RAAS, myokardialer Wachstumsfaktoren und ECM-Proteine bewirkt und implizieren, dass nur eine dauerhafte Blockade der neuroendokrinen Systeme myokardiales Remodeling und dessen Übergang in die Herzinsuffizienz hemmen kann.

Die Erkenntnis, dass die Neutrale Endopeptidase im Herzen von Patienten mit chronischer Drucküberlastung und Herzinsuffizienz aktiviert ist, erklärt partiell den Wirkungsverlust von ACE-Hemmern bei Dauertherapie. Die Daten verdeutlichen auch, dass die medikamentöse Hemmung eines neuroendokrinen Pathomechanismus die kompensatorische Aktivierung eines alternativen Pathomechanismus nach sich ziehen kann. Es könnte demnach erfolgversprechend sein, die Pharmakotherapie des myokardialen Remodelings durch Substanzen zu erweitern, die sich nicht nur auf die Hemmung einzelner neuroendokriner Systeme beschränken, sondern gemeinsame Signaltransduktionswege oder Knotenpunkte verschiedener neuroendokriner Systeme zu hemmen.

Ein solcher zentraler Signaltransduktionsweg bzw. Knotenpunkt ist z.B. PKD1, da die Hemmung von PKD1 in Kardiomyozyten das durch AngII, ISO und TAC induzierte myokardiale Remodeling bremst.

Die differentiellen Regulationen von MMP und TIMP im Myokard von AS-Patienten belegen, dass die interstitielle Fibrose bei myokardialem Remodeling nicht nur durch eine gesteigerte Kollagensynthese, sondern auch durch einen gestörten Kollagenabbau bedingt ist, wobei dieser aus einem Ungleichgewicht zwischen MMP und TIMP resultiert. Therapeutische Strategien, die das Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP normalisieren, könnten daher wertvoll für die Hemmung myokardialer Umbauprozesse sein und den Übergang in die Herzinsuffizienz verzögern. So konnten myokardiale Umbauvorgänge, Dilatation und Wandstress in Tiermodellen mit Herzinsuffizienz durch Gabe nichtselektiver MMP-Inhibitoren gehemmt werden.⁹⁸ Allerdings traten erhebliche Nebenwirkungen bei den behandelten Patienten auf.⁹⁹ Die Entwicklung spezifischer MMP-Inhibitoren, die lediglich diejenigen MMP hemmen, die bei myokardialem Remodeling im menschlichen Herzen aktiviert sind, ist deshalb dringend erforderlich. Unsere Daten könnten eine Grundlage dafür sein, da wir eine spezifische Aktivierung von MMP-2, -3, und EMMPRIN bei myokardialer Hypertrophie nachweisen konnten, sodass diese Enzyme als potentielle Medikamententargets dienen könnten.

Die pathophysiologische Bedeutung einer vermehrten Kollagenquervernetzung im hypertrophierenden Herzen wurde mit einem K-P4H-Hemmer im Rattenhypertrophiemodell getestet. Wir konnten nachweisen, dass die Inhibition von Kollagenquervernetzung positive Effekte auf die kardiale Funktion und die durch TAC induzierte kardiale Genexpression hat. Diese Daten belegen, dass bei kardialem Remodeling nicht nur die Kollagenakkumulation, sondern auch die Kollagenquervernetzung von erheblicher pathophysiologischer Bedeutung ist. Die Ergebnisse unserer Studie präsentieren ein neuartiges Therapieprinzip, welches für die Hemmung myokardialer Umbauprozesse bei chronischer Drucküberlastung klinische Relevanz erlangen, und für die Weiterentwicklung der verwendeten Substanz zu einem Medikament dienen könnte.

Unsere Arbeiten demonstrierten weiterhin, dass RAAS und sein Effektorpeptid AngII bei myokardialem Remodeling im menschlichen Herzen aktiviert sind und PKD1 eine zentrale Rolle beim AngII-vermittelten myokardialen Remodeling spielt. Sie zeigen aber auch, dass PKD1 nicht spezifisch für AngII ist, sondern auch ISO- und TAC-induziertes Remodeling vermittelt. Unsere Daten belegen erstmals, dass eine Klasse-II-HDAC-Kinase das stressinduzierte myokardiale Remodeling *in vivo* reguliert. Die verminderte hypertrophe Antwort von PKD1-cKO-Tieren ist mit der von MEF2-KO-Mäusen vergleichbar,¹⁰⁰ was die Bedeutung des hypertrophen

Signaltransduktionsweges von PKD1 über Klasse-II-HDACs zu MEF2 *in vivo* unterstreicht. Zusätzlich könnte PKD1 Teil eines die kardiale Fibrose fördernden, positiven Rückkoppelungsmechanismus sein, da das profibrotische Mineralokortikoid Aldosteron PKD1 aktiviert¹⁰¹ und PKD1 selbst die Aldosteronproduktion durch Heraufregulation der Aldosteron-Synthase¹⁰¹ stimuliert. Eine medikamentöse Hemmung der kardialen PKD1 könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatz in der Therapie von myokardialen Umbauprozessen liefern.

Da PKD1 eines von drei PKD-Familienmitgliedern¹⁰² ist und jede der PKD-Isoformen die Klasse-II-HDACs 4, 5, 7 und 9 phosphoryliert und inaktiviert, könnten die PKD-Isoformen redundant in der Kontrolle der Klasse-II-HDAC-Aktivität agieren. Diese Hypothese wird einerseits dadurch gestärkt, dass die Hemmung von PKD1 in kultivierten Kardiomyozyten den nukleären Export von HDAC5 reduziert, aber nicht verhindert,⁵⁵ und andererseits nur die gleichzeitige Hemmung von PKD1 und 3 die signalabhängige Phosphorylierung von HDAC5 als Antwort auf Antigenrezeptoraktivierung in B-Lymphozyten vollständig hemmt.¹⁰³ Die residuelle kardiale Hypertrophie und Aktivierung des fetalen Genprogramms in PKD1-cKO-Tieren weist auch auf eine redundante Funktion der PKD-Familienmitglieder hin. Wie stark die funktionelle Relevanz dieser Redundanz ist, kann abschließend noch nicht beurteilt werden. Insbesondere die stark verminderte hypertrophe Antwort in PKD1-cKO-Tieren zeigt, dass PKD2 und 3 den Verlust von PKD1 in Kardiomyozyten nicht kompensieren können. Eine weitere Differenzierung der Effekte von PKD1, 2 und 3 wird nach Elimination aller drei PKD-Familienmitglieder möglich sein.

Die Grundlagen für die Entwicklung eines völlig neuen Therapiekonzeptes in der Behandlung eines akuten Myokardinfarktes und seiner Komplikationen, wie der ischämischen Kardiomyopathie, dem kardiogenen Schock und der Ventrikelruptur, werden durch unsere Daten, die eine wichtige Funktion von MuRF3 in der Aufrechterhaltung der periinfarziellen funktionellen und strukturellen Integrität des Herzens nachweisen, gelegt. Wir postulierten, dass der MuRF3-vermittelte Abbau von FHL2 und γ -Filamin die kardioprotektiven Effekte bewirkt; ein Nachweis steht noch aus. Im weiteren Verlauf der Arbeit soll näher untersucht werden, wie die Abwesenheit von MuRF3 das Auftreten von Herzinsuffizienz und Ventrikelruptur begünstigt.

Unsere Erkenntnis, dass MuRF1 und 3 redundant den Abbau von MHC-Proteinen im Herz- und Skelettmuskel vermitteln, beschreibt einen neuen, bisher unbekanntem Mechanismus des MHC-Abbaus und identifiziert neue MuRF1- und -3- Zielproteine. Die Akkumulation von MHC-Proteinen in Abwesenheit von MuRF1 und 3 unterstreicht deren zentrale Bedeutung beim Abbau von MHCs. Unsere Ergebnisse zeigen außerdem, dass der Abbau von MHC-Proteinen vor allem durch das

UPS erfolgt und eine Störung des UPS in Myozyten auch einen verminderten MHC-Abbau bedingt. Die Akkumulation von MHC-Proteinen wurde von Herzmuskelhypertrophie, einer verminderten kardialen Funktion und einer reduzierten maximalen Kraftentwicklung im Skelettmuskel begleitet. Interessanterweise waren die zentral lokalisierten sarkomerischen Strukturen nicht betroffen, was für eine Präferenz von MuRF1 und 3 für zytosolische MHCs sprechen könnte. Da MuRF1 und 3 auch strukturelle Effekte haben, könnten die beobachteten Phänotypen nicht nur durch die fehlende E3-Ubiquitinligaseaktivität, sondern auch durch fehlende strukturelle Effekte von MuRF1 und 3 bedingt sein. Allerdings sprechen sowohl die MHC-Akkumulation in Abwesenheit von MuRF1 und 3 als auch der durch MuRF1 und 3 vermittelten Abbau von β -MHC und MHCIIa dafür, dass die fehlende E3-Ubiquitinligaseaktivität von MuRF1 und 3 die Akkumulation von MHC-Proteinen bewirkt.

MuRF1 spielt eine wichtige Rolle bei Muskelatrophie,⁹⁷ die z. B. bei kardialer Kachexie auftritt. Diese Muskelatrophie hat einen negativen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten.¹⁰⁴ Es wurde postuliert, dass MuRF-Inhibitoren in der Therapie der Muskelatrophie nützlich sein könnten.⁹⁷ Allerdings sprechen unsere Daten gegen eine unspezifische und globale MuRF-Hemmung und für die Entwicklung von isoformspezifischen MuRF-Inhibitoren, welche die Interaktion zwischen MuRF1 und 3 und MHC-Proteinen spezifisch hemmen.

IV. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die molekularen Mechanismen von myokardialem Remodeling im menschlichen Herzen und die konsequente Weiterverfolgung der Krankheitsmechanismen im Tier- und Zellkulturmodell. Die Quintessenz der vorliegenden Untersuchungen ist, dass myokardiales Remodeling durch verschiedene pathophysiologische Reize, neurohumorale Faktoren, molekulare Mechanismen und Signaltransduktionswege vermittelt wird, sodass eine erfolgreiche therapeutische Beeinflussung dieses Prozesses nur durch die gleichzeitige Hemmung mehrerer Pathomechanismen möglich sein wird. Unsere Daten sprechen für eine zentrale Rolle des RAAS und seines Effektorpeptids AngII im myokardialen Remodeling. Wir beschreiben einerseits unterschiedliche Regulationsmechanismen von myokardialem Remodeling und versuchen andererseits, die erhobenen Befunde in therapeutische Konzepte umzusetzen, die wir in experimentellen Modellen des kardialen Remodelings, transgenen Tiermodellen und in der Zellkultur überprüfen.

Da tierexperimentelle Daten nur begrenzt auf humane Krankheitsbilder übertragbar sind war die Akquisition von humanen Herzmuskelproben und deren Analyse durch ein sehr breites Spektrum modernster molekularbiologischer und biochemischer Techniken sehr wichtig für unser Verständnis der humanen Pathomechanismen. Diese Untersuchungen geben einen sehr wichtigen Einblick in die molekularen Veränderungen während des myokardialen Remodelings bei klassischen kardiologischen Erkrankungen, wie AS, AI und DCM. Die Verwendung von tierexperimentellen Modellen des myokardialen Remodelings, wie TAC, Myokardinfarkt und Implantation miniosmotischer Pumpen zur kontinuierlichen Verabreichung von AngII und ISO ermöglichte die Testung von Hypothesen bezüglich der Funktion spezifischer Proteine und antifibrotischer Substanzen. Ferner werden zahlreiche molekularbiologische und biochemische Methoden, wie die Generierung von konventionellen und konditionalen Keimbahndeletionen, immunhisto- und immunzytochemische Analysen, elektronenmikroskopische Untersuchungen, *in-vitro*-Ubiquitinierungsassays, und Standardverfahren, wie quantitative RT-PCR, *in-situ*-PCR, Western-Blot, Zymographie, Sequenzierung und Reporterassays, angewandt.

Im ersten Teil der Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der molekularen Charakterisierung von myokardialen Umbauprozessen bei Patienten mit AS, AI und DCM. Wir zeigten, dass es zu einer Aktivierung des gewebeständigen RAAS kommt, myokardiale Wachstumsfaktoren aktiviert sind und myokardiale Fibrose auftritt. Diese Veränderungen treten bereits bei normaler kardialer

Funktion auf und nehmen mit Fortschreiten der Herzinsuffizienz zu. Die myokardiale Fibrose war dabei eng mit systolischer und diastolischer Dysfunktion assoziiert. Darüber hinaus konnten wir erstmals zeigen, dass die myokardiale NEP bei AS und DCM aktiviert ist, was partiell den Verlust der ACE-Hemmung erklären könnte. Ein weiterer Teil der Arbeit konzentrierte sich auf die Mechanismen der Entstehung der myokardialen Fibrose im erkrankten menschlichen Herzen. Wir konnten zeigen, dass die Expression von ECM-Proteinen bei myokardialen Umbauprozessen heraufreguliert ist und vermuteten daher, dass das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von ECM-Proteinen gestört ist. In der Tat demonstrierten wir einer Dysregulation im MMP/TIMP-System bei myokardialem Remodeling, sodass eine verminderte MMP-Aktivität resultiert. Diese verminderte MMP-Aktivität könnte eine Akkumulation von ECM-Proteinen im Herzen und auf diese Weise myokardiale Fibrose bewirken.

In einem weiteren Teil der Arbeit testeten wir ein neuartiges Therapiekonzept in der Behandlung myokardialer Fibrose. Unsere Voruntersuchungen⁸⁹ und die anderer Gruppen¹⁰⁵ implizierten, dass myokardiale Fibrose und eine pathologische Kollagenquervernetzung zu systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz führen. Unsere Arbeiten präsentierten eine Verbesserung der kardialen Funktion durch Hemmung der Kollagenquervernetzung im Hypertrophiemodell der Ratte. Diese Befunde unterstreichen, dass eine frühzeitige Fibrose an der funktionellen Verschlechterung beteiligt ist und die frühzeitige Hemmung des myokardialen Remodelings die kardiale Funktion günstig beeinflusst.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasst sich mit den molekularen Mechanismen des AngII-induzierten myokardialen Remodelings mit Fokus auf die Rolle von PKD1. Die Deletion von PKD1 in Kardiomyozyten schützte sowohl vor AngII- als auch ISO- und TAC-vermitteltem myokardialen Remodeling *in vivo*. Wir schlussfolgern, dass PKD1 in Kardiomyozyten ein Knotenpunkt in der Vermittlung von stressbedingtem myokardialen Remodeling ist. Unsere Daten lassen auch vermuten, dass die AngII-induzierte perivaskuläre Fibrose zumindest teilweise durch einen myozytären PKD1-abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den Effekten des UPS und seiner Schlüsselmoleküle MuRF1 und 3 bei myokardialem Remodeling. Die Erkenntnis, dass MuRF3 für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion und Integrität während eines akuten Myokardinfarktes wichtig ist, könnte zur Entwicklung eines völlig neuen Therapiekonzeptes in der Behandlung eines akuten Myokardinfarktes und seiner Komplikationen, wie dem kardiogenen Schock, der ischämischen Kardiomyopathie und der infarktbedingten Ventrikelruptur, führen. Allerdings waren unsere Kenntnisse zu Funktion und Regulation von MuRF-Proteinen und ihrer Zielproteine

lückenhaft, weshalb sich eine weitere Arbeit mit der Funktion von MuRF1 und 3 im Herzen beschäftigte. Wir konnten nachweisen, dass MuRF1 und 3 redundant beim Abbau von MHC-Proteinen funktionieren. Wir beschrieben erstmals, dass MuRF3 eine E3-Ubiquitinligaseaktivität besitzt, MuRF1 und 3 dieselben E2 ubiquitinkonjugierenden Enzyme für die Ubiquitinierung von MHC verwenden und dass MuRF1 und 3 eine Schlüsselrolle beim MHC-Abbau spielen, da MHC in Muskelzellen, die weder MuRF1 noch MuRF3 exprimieren, akkumuliert, was zu einer verminderten Muskelfunktion führt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das UPS und die MuRF eine wesentliche Rolle bei myozytären Stressreaktionen spielen.

Zusammenfassend konnten wir mit den vorliegenden Publikationen dieser Habilitationsarbeit zahlreiche Aspekte der molekularen und pathophysiologischen Grundlagen des myokardialen Remodelings analysieren. Unsere Daten legen die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieoptionen in der Behandlung von myokardialem Remodeling. Die therapeutische Beeinflussung von PKD1 und MuRF1 und 3 scheint hierfür vielversprechend zu sein.

V. Ausblick und Darstellung weiterer Vorhaben

Die weiteren molekularbiologischen und biochemischen Arbeiten werden sich mit der Untersuchung der Regulation der Enzymaktivität und Funktion von PKD1 bei myokardialem Remodeling beschäftigen. Wir konnten nachweisen, dass PKD1 ein Schlüsselenzym in der Vermittlung von AngII-induziertem myokardialem Remodeling ist. Interessanterweise reduzierte die myozytäre Deletion von PKD1 die AngII-vermittelte perivaskuläre und die ISO- und TAC-induzierte interstitielle Fibrose. Warum die myozytäre Deletion von PKD1 die Fibrose hemmt, ist unklar und soll nachfolgend analysiert werden.

Das α MHC-CRE-Transgen, das hier verwendet wurde, um PKD1 im Herzen zu entfernen, ist schon während der Embryonalentwicklung aktiv und entfernt ab diesem Zeitpunkt PKD1 aus der Keimbahn von Kardiomyozyten. Obwohl kein veränderter Phänotyp in den PKD1-cKO- verglichen mit WT-Tieren nachweisbar war, könnte diese frühe PKD1-Deletion auch Effekte auf die Herzentwicklung haben und der Phänotyp teilweise dadurch bedingt sein. Wir planen daher, PKD1-loxP/loxP-Mäuse mit einer induzierbaren CRE-Maus ($mer\text{-}cre\text{-}mer^{106}$) zu kreuzen, um so ein Modell zu erhalten, mit dem wir PKD1 zu beliebigen Zeitpunkten nach Abschluss der Herzentwicklung entfernen und so spezifisch das AngII-, ISO- und TAC-induzierte kardiale Remodeling untersuchen zu können. Diese Analysen sollen als Grundlage für die Entwicklung von PKD1-Inhibitoren dienen.

In einem weiteren Schwerpunkt werden wir uns mit der Wirkungsweise und Funktion der RING-Finger-E3-Ubiquitinligasen MuRF1 und 3 beschäftigen, um damit eine Voraussetzung für die Entwicklung von MuRF-Inhibitoren zu schaffen. Es soll untersucht werden, welche Bedeutung die E3-Ubiquitinligase Aktivität für die Funktion von MuRF-Proteinen im Herzen und Skelettmuskel hat. Hierfür sollen zuerst die spezifischen Aminosäuren in der MuRF1-RING-Finger-Domäne, welche die E3-Ubiquitinligase-Aktivität vermitteln, gefunden und dann durch Keimbahnmutation im MuRF1-Lokus mutiert (MuRF1-KI) werden. Nach Induktion von kardialer Hypertrophie soll dann durch den Vergleich der Phänotypen der MuRF1-KO- und MuRF1-KI-Tiere die Frage beantwortet werden, ob die fehlende E3-Ubiquitinligase-Aktivität für die Funktion von MuRF1 bei myokardialem Remodeling von Bedeutung ist. Darüber hinaus soll die Interaktion zwischen MuRF1 und 3 und den Myosinschwerketten β -MHC und MHCIIa strukturell und funktionell näher charakterisiert werden. Es wird untersucht, ob die Stärke dieser Interaktionen und die Fähigkeit und Effizienz von MuRF1 und 3, β -MHC und MHCIIa zu ubiquitinieren, durch hypertrophe Signaltransduktionswege

beeinflusst wird. Dadurch soll die Frage geklärt werden, ob der MuRF-vermittelte Abbau von Strukturproteinen in Herzmuskelzellen ein signalgesteuerter Prozess ist.

Das ultimative Ziel ist es, Erkrankungen, die durch eine Überaktivierung von MuRFs und dem MuRF-vermittelten Abbau kontraktiler Proteine bedingt sind, durch eine zielgerichtete MuRF-Hemmung zu therapieren. Dieses Ziel kann nur dadurch erreicht werden, dass Funktion und Wirkungsweise von MuRF-Proteinen bei myokardialem Remodeling im Detail bekannt sind.

Literaturverzeichnis

- 1 X. Xu, C. H. Ha, C. Wong et al., *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27** (11), 2355 (2007).
- 2 S. Chang, S. Bezprozvannaya, S. Li et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (23), 8120 (2005).
- 3 C. L. Zhang, T. A. McKinsey, S. Chang et al., *Cell* **110** (4), 479 (2002).
- 4 S. A. Hunt, *Journal of the American College of Cardiology* **46** (6), e1 (2005).
- 5 M. Jessup and S. Brozena, *The New England journal of medicine* **348** (20), 2007 (2003).
- 6 J. N. Cohn, R. Ferrari, and N. Sharpe, *Journal of the American College of Cardiology* **35** (3), 569 (2000).
- 7 J. M. Gardin and M. S. Lauer, *Jama* **292** (19), 2396 (2004); B. A. Vakili, P. M. Okin, and R. B. Devereux, *American heart journal* **141** (3), 334 (2001); T. A. McKinsey and E. N. Olson, *The Journal of clinical investigation* **115** (3), 538 (2005); D. L. Mann, *Journal of cardiac failure* **10** (6 Suppl), S202 (2004); D. L. Mann, *Circulation* **100** (9), 999 (1999); P. W. Fedak, S. Verma, R. D. Weisel et al., *Cardiovasc Pathol* **14** (3), 109 (2005).
- 8 M. Gheorghiade, K. F. Adams, Jr., W. A. Gattis et al., *American heart journal* **145** (2 Suppl), S67 (2003); J. E. Udelson and M. A. Konstam, *Journal of cardiac failure* **8** (6 Suppl), S465 (2002).
- 9 N. Frey, H. A. Katus, E. N. Olson et al., *Circulation* **109** (13), 1580 (2004).
- 10 N. Frey and E. N. Olson, *Annual review of physiology* **65**, 45 (2003).
- 11 J. Mathew, P. Sleight, E. Lonn et al., *Circulation* **104** (14), 1615 (2001).
- 12 P. Verdecchia, G. Carini, A. Circo et al., *Journal of the American College of Cardiology* **38** (7), 1829 (2001).
- 13 G. Schillaci, P. Verdecchia, C. Porcellati et al., *Hypertension* **35** (2), 580 (2000); W. B. Kannel, T. Gordon, W. P. Castelli et al., *Annals of internal medicine* **72** (6), 813 (1970); W. B. Kannel, T. Gordon, and D. Offutt, *Annals of internal medicine* **71** (1), 89 (1969); D. Levy, P. W. Wilson, K. M. Anderson et al., *American heart journal* **119** (3 Pt 2), 712 (1990); D. Levy, M. G. Larson, R. S. Vasan et al., *Jama* **275** (20), 1557 (1996); M. J. Koren, R. B. Devereux, P. N. Casale et al., *Annals of internal medicine* **114** (5), 345 (1991).
- 14 B. H. Lorell and B. A. Carabello, *Circulation* **102** (4), 470 (2000); G. W. Dorn, 2nd, J. Robbins, and P. H. Sugden, *Circulation research* **92** (11), 1171 (2003).
- 15 K. R. Chien, *Cell* **98** (5), 555 (1999).
- 16 J. Scheuer, A. Malhotra, C. Hirsch et al., *The Journal of clinical investigation* **70** (6), 1300 (1982); S. Miyata, W. Minobe, M. R. Bristow et al., *Circulation research* **86** (4), 386 (2000).
- 17 K. Nakao, W. Minobe, R. Roden et al., *The Journal of clinical investigation* **100** (9), 2362 (1997).

- 18 A. R. Marks, *Circulation* **107** (11), 1456 (2003); E. N. Olson and M. D. Schneider, *Genes & development* **17** (16), 1937 (2003).
- 19 H. A. Rockman, W. J. Koch, and R. J. Lefkowitz, *Nature* **415** (6868), 206 (2002).
- 20 I. Shiojima, K. Sato, Y. Izumiya et al., *The Journal of clinical investigation* **115** (8), 2108 (2005); W. H. Gaasch, M. R. Zile, P. K. Hoshino et al., *Circulation* **79** (4), 872 (1989); M. Sano, T. Minamino, H. Toko et al., *Nature* **446** (7134), 444 (2007).
- 21 G. W. Dorn, 2nd, *Hypertension* **49** (5), 962 (2007).
- 22 S. Hein, E. Arnon, S. Kostin et al., *Circulation* **107** (7), 984 (2003).
- 23 K. T. Weber, *Circulation* **96** (11), 4065 (1997).
- 24 K. T. Weber and C. G. Brilla, *Circulation* **83** (6), 1849 (1991); M. O. Boluyt, L. O'Neill, A. L. Meredith et al., *Circulation research* **75** (1), 23 (1994).
- 25 B. Swynghedauw, *Physiological reviews* **79** (1), 215 (1999).
- 26 J. E. Jalil, C. W. Doering, J. S. Janicki et al., *Circulation research* **64** (6), 1041 (1989).
- 27 F. G. Spinale, *Circulation research* **90** (5), 520 (2002).
- 28 Y. Y. Li, C. F. McTiernan, and A. M. Feldman, *Cardiovasc Res* **42** (1), 162 (1999); H. Nagase and J. F. Woessner, Jr., *The Journal of biological chemistry* **274** (31), 21491 (1999); M. D. Sternlicht and Z. Werb, *Annual review of cell and developmental biology* **17**, 463 (2001).
- 29 F. G. Spinale, M. L. Coker, L. J. Heung et al., *Circulation* **102** (16), 1944 (2000).
- 30 T. Walther, A. Schubert, V. Falk et al., *Circulation* **104** (12 Suppl 1), I54 (2001).
- 31 Y. Iwanaga, T. Aoyama, Y. Kihara et al., *Journal of the American College of Cardiology* **39** (8), 1384 (2002); M. L. Lindsey, D. L. Mann, M. L. Entman et al., *Annals of medicine* **35** (5), 316 (2003).
- 32 E. E. Creemers, J. P. Cleutjens, J. F. Smits et al., *Circulation research* **89** (3), 201 (2001); F. G. Spinale, M. L. Coker, S. R. Krombach et al., *Circulation research* **85** (4), 364 (1999); F. J. Villarreal, M. Griffin, J. Omens et al., *Circulation* **108** (12), 1487 (2003).
- 33 G. R. Norton, J. Tsotetsi, B. Trifunovic et al., *Circulation* **96** (6), 1991 (1997).
- 34 A. J. Woodiwiss, O. J. Tsotetsi, S. Sprott et al., *Circulation* **103** (1), 155 (2001).
- 35 J. I. Nwogu, D. Geenen, M. Bean et al., *Circulation* **104** (18), 2216 (2001).
- 36 V. Regitz-Zagrosek, J. Fielitz, R. Dreysse et al., *Cardiovasc Res* **35** (1), 99 (1997); V. Regitz-Zagrosek, J. Fielitz, and E. Fleck, *Basic research in cardiology* **93 Suppl 2**, 37 (1998); V. Regitz-Zagrosek, J. Fielitz, M. Hummel et al., *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **74** (12), 777 (1996).
- 37 R. Buchhorn, M. Hulpke-Wette, W. Ruschewski et al., *Cardiology in the young* **13** (1), 36 (2003); R. Buchhorn, M. Hulpke-Wette, W. Ruschewski et al., *The Annals of thoracic surgery* **73** (2), 610 (2002).
- 38 H. Schunkert, H. D. Orzechowski, W. Bocker et al., *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **77** (8), 623 (1999).

- 39 J. A. Hill and E. N. Olson, *The New England journal of medicine* **358** (13), 1370 (2008).
- 40 J. Sadoshima and S. Izumo, *Annual review of physiology* **59**, 551 (1997); G. G. Serner, P. A. Modesti, M. Boddi et al., *Circulation research* **85** (1), 57 (1999); P. Martinka, J. Fielitz, A. Patzak et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288** (3), R767 (2005).
- 41 U. C. Brewster, J. F. Setaro, and M. A. Perazella, *The American journal of the medical sciences* **326** (1), 15 (2003).
- 42 J. Varagic and E. D. Frohlich, *Journal of molecular and cellular cardiology* **34** (11), 1435 (2002).
- 43 D. C. Crawford, A. V. Chobanian, and P. Brecher, *Circulation research* **74** (4), 727 (1994).
- 44 H. S. Sharma, H. A. van Heugten, M. A. Goedbloed et al., *Biochemical and biophysical research communications* **205** (1), 105 (1994); D. J. Campbell, F. Anastasopoulos, A. M. Duncan et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **287** (2), 567 (1998); Y. Sun, J. Q. Zhang, J. Zhang et al., *Journal of molecular and cellular cardiology* **30** (8), 1559 (1998); S. Kim, K. Ohta, A. Hamaguchi et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **273** (1), 509 (1995).
- 45 F. J. Villarreal and W. H. Dillmann, *The American journal of physiology* **262** (6 Pt 2), H1861 (1992).
- 46 G. Zhou, J. C. Kandala, S. C. Tyagi et al., *Molecular and cellular biochemistry* **154** (2), 171 (1996).
- 47 M. A. Pfeffer, E. Braunwald, L. A. Moya et al., *The New England journal of medicine* **327** (10), 669 (1992); D. Nauman and B. Greenberg, *The American journal of geriatric cardiology* **2** (1), 28 (1993).
- 48 B. Pitt, P. A. Poole-Wilson, R. Segal et al., *Lancet* **355** (9215), 1582 (2000); B. Pitt, F. Zannad, W. J. Remme et al., *The New England journal of medicine* **341** (10), 709 (1999).
- 49 D. V. Exner, D. L. Dries, M. J. Domanski et al., *The New England journal of medicine* **344** (18), 1351 (2001).
- 50 J. N. Sharma and J. Sharma, *Current medical research and opinion* **18** (1), 10 (2002).
- 51 K. C. Wollert, R. Studer, K. Doerfer et al., *Circulation* **95** (7), 1910 (1997).
- 52 J. O. Kokkonen, A. Kuoppala, J. Saarinen et al., *Circulation* **99** (15), 1984 (1999); A. Dendorfer, S. Wolfrum, P. Wellhoner et al., *British journal of pharmacology* **122** (6), 1179 (1997).
- 53 E. G. Erdos and R. A. Skidgel, *Faseb J* **3** (2), 145 (1989).
- 54 B. C. Harrison, M. S. Kim, E. van Rooij et al., *Molecular and cellular biology* **26** (10), 3875 (2006).
- 55 R. B. Vega, B. C. Harrison, E. Meadows et al., *Molecular and cellular biology* **24** (19), 8374 (2004).
- 56 M. Tan, X. Xu, M. Ohba et al., *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24** (12), 2271 (2004).

- 57 M. Avkiran, J. A. Rowland, F. Cuello et al., *Circulation research* **102**, in print (2008); R. S. Haworth, F. Cuello, T. J. Herron et al., *Circulation research* **95** (11), 1091 (2004).
- 58 R. S. Haworth, M. W. Goss, E. Rozengurt et al., *Journal of molecular and cellular cardiology* **32** (6), 1013 (2000).
- 59 R. S. Haworth, N. A. Roberts, F. Cuello et al., *Journal of molecular and cellular cardiology* **43** (6), 686 (2007).
- 60 T. A. McKinsey, *Cardiovasc Res* **73** (4), 667 (2007).
- 61 K. Song, J. Backs, J. McAnally et al., *Cell* **125** (3), 453 (2006).
- 62 Y. Kim, D. Phan, E. van Rooij et al., *The Journal of clinical investigation* **118** (1), 124 (2008).
- 63 H. P. Krayenbuehl, O. M. Hess, E. S. Monrad et al., *Circulation* **79** (4), 744 (1989).
- 64 J. Fielitz, M. S. Kim, J. M. Shelton et al., *The Journal of clinical investigation* **117** (9), 2486 (2007); J. Fielitz, M. S. Kim, J. M. Shelton et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (8), 3059 (2008); J. Fielitz, M. Leuschner, H. R. Zurbrugg et al., *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **82** (12), 809 (2004); J. Fielitz, S. Philipp, L. R. Herda et al., *Eur J Heart Fail* (2006).
- 65 J. Fielitz, E. van Rooij, J. A. Spencer et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (11), 4377 (2007).
- 66 A. Ciechanover, *Neurology* **66** (2 Suppl 1), S7 (2006).
- 67 S. Ventadour and D. Attaix, *Current opinion in rheumatology* **18** (6), 631 (2006).
- 68 T. N. Stitt, D. Drujan, B. A. Clarke et al., *Molecular cell* **14** (3), 395 (2004); M. Sandri, C. Sandri, A. Gilbert et al., *Cell* **117** (3), 399 (2004); C. Skurk, Y. Izumiya, H. Maatz et al., *The Journal of biological chemistry* **280** (21), 20814 (2005); Y. G. Ni, K. Berenji, N. Wang et al., *Circulation* **114** (11), 1159 (2006).
- 69 C. Depre, Q. Wang, L. Yan et al., *Circulation* **114** (17), 1821 (2006).
- 70 S. R. Powell, *American journal of physiology* **291** (1), H1 (2006).
- 71 J. A. Spencer, S. Eliazar, R. L. Ilaria, Jr. et al., *The Journal of cell biology* **150** (4), 771 (2000).
- 72 T. Centner, J. Yano, E. Kimura et al., *Journal of molecular biology* **306** (4), 717 (2001); A. S. McElhinny, C. N. Perry, C. C. Witt et al., *Journal of cell science* **117** (Pt 15), 3175 (2004).
- 73 A. S. McElhinny, K. Kakinuma, H. Sorimachi et al., *The Journal of cell biology* **157** (1), 125 (2002).
- 74 R. Arya, V. Kedar, J. R. Hwang et al., *The Journal of cell biology* **167** (6), 1147 (2004).
- 75 H. H. Li, V. Kedar, C. Zhang et al., *The Journal of clinical investigation* **114** (8), 1058 (2004).
- 76 B. H. Lorell, *Basic research in cardiology* **87 Suppl 2**, 163 (1992).
- 77 C. Kupfahl, D. Pink, K. Friedrich et al., *Cardiovasc Res* **46** (3), 463 (2000).

- 78 S. E. Campbell and L. C. Katwa, *Journal of molecular and cellular cardiology* **29** (7), 1947 (1997).
- 79 G. Zimmer, R. Zimmermann, O. M. Hess et al., *Journal of the American College of Cardiology* **20** (5), 1135 (1992).
- 80 S. P. Friedrich, B. H. Lorell, M. F. Rousseau et al., *Circulation* **90** (6), 2761 (1994).
- 81 D. Levy, S. Kenchaiah, M. G. Larson et al., *The New England journal of medicine* **347** (18), 1397 (2002); D. M. Lloyd-Jones, M. G. Larson, E. P. Leip et al., *Circulation* **106** (24), 3068 (2002).
- 82 W. Linz, G. Wiemer, P. Gohlke et al., *Pharmacological reviews* **47** (1), 25 (1995).
- 83 N. K. Farina, C. I. Johnston, and L. M. Burrell, *Journal of hypertension* **18** (6), 749 (2000); W. Gonzalez, J. M. Soleilhac, M. C. Fournie-Zaluski et al., *European journal of pharmacology* **345** (3), 323 (1998).
- 84 M. T. Rademaker, C. J. Charles, E. A. Espiner et al., *Journal of cardiovascular pharmacology* **31** (1), 116 (1998); N. C. Trippodo, M. Fox, T. M. Monticello et al., *Journal of cardiovascular pharmacology* **34** (6), 782 (1999).
- 85 M. L. Coker, J. L. Zellner, A. J. Crumbley et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* **878**, 559 (1999).
- 86 J. P. Cleutjens, J. C. Kandala, E. Guarda et al., *Journal of molecular and cellular cardiology* **27** (6), 1281 (1995); J. T. Peterson, H. Hallak, L. Johnson et al., *Circulation* **103** (18), 2303 (2001); F. G. Spinale, M. L. Coker, C. V. Thomas et al., *Circulation research* **82** (4), 482 (1998).
- 87 H. Li, H. Simon, T. M. Bocan et al., *Cardiovasc Res* **46** (2), 298 (2000); V. S. Mujumdar and S. C. Tyagi, *Journal of hypertension* **17** (2), 261 (1999).
- 88 T. M. Seccia, E. Bettini, V. Vulpis et al., *Blood pressure* **8** (1), 57 (1999).
- 89 J. Fielitz, S. Hein, V. Mitrovic et al., *Journal of the American College of Cardiology* **37** (5), 1443 (2001).
- 90 D. Badenhorst, M. Maseko, O. J. Tsotetsi et al., *Cardiovasc Res* **57** (3), 632 (2003).
- 91 A. R. Walmsley, M. R. Batten, U. Lad et al., *The Journal of biological chemistry* **274** (21), 14884 (1999).
- 92 H. A. Rockman, R. S. Ross, A. N. Harris et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88** (18), 8277 (1991).
- 93 R. Agah, P. A. Frenkel, B. A. French et al., *The Journal of clinical investigation* **100** (1), 169 (1997).
- 94 X. Wang and J. Robbins, *Circulation research* **99** (12), 1315 (2006).
- 95 J. Sun, G. Yan, A. Ren et al., *Circulation research* **99** (5), 468 (2006).
- 96 S. Saito, Y. Hiroi, Y. Zou et al., *The Journal of biological chemistry* **275** (44), 34528 (2000).
- 97 S. C. Bodine, E. Latres, S. Baumhueter et al., *Science* **294** (5547), 1704 (2001).
- 98 L. E. Rohde, A. Ducharme, L. H. Arroyo et al., *Circulation* **99** (23), 3063 (1999).

- ⁹⁹ A. H. Drummond, P. Beckett, P. D. Brown et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* **878**, 228 (1999); N. C. Levitt, F. A. Eskens, K. J. O'Byrne et al., *Clin Cancer Res* **7** (7), 1912 (2001).
- ¹⁰⁰ J. Backs and E. N. Olson, *Circulation research* **98** (1), 15 (2006).
- ¹⁰¹ V. McEneaney, B. J. Harvey, and W. Thomas, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **107** (3-5), 180 (2007).
- ¹⁰² A. Asada, Y. Zhao, H. Komano et al., *Immunology* **101** (3), 309 (2000).
- ¹⁰³ A. Asada, Y. Zhao, S. Kondo et al., *The Journal of biological chemistry* **273** (43), 28392 (1998).
- ¹⁰⁴ S. D. Anker, A. Negassa, A. J. Coats et al., *Lancet* **361** (9363), 1077 (2003).
- ¹⁰⁵ B. Villari, S. E. Campbell, O. M. Hess et al., *Journal of the American College of Cardiology* **22** (5), 1477 (1993).
- ¹⁰⁶ D. S. Sohal, M. Nghiem, M. A. Crackower et al., *Circulation research* **89** (1), 20 (2001).

Danksagung

Ich danke meinen Eltern Harri und Karin Fielitz und meinem Bruder Torsten Fielitz, die mir in jeder erdenklichen Lebenslage stets zu Seite gestanden haben und ohne die ich meinen wissenschaftlichen und persönlichen Werdegang nicht realisiert hätte. Sie haben die Grundlage dafür geschaffen, dass ich meine Ideen in die Realität umsetzen konnte.

Meiner Ehefrau Britta und meinem Sohn Paul gilt besonderer Dank, da sie mich mit sehr viel Liebe und Geduld, bei jedem auf und ab und aller Frustration, die experimentelle Forschung mit sich bringt, liebevoll unterstützt haben. Britta und Paul waren die Motivation, die ich dafür gebraucht habe und sind mein fortwährender Quell für nachhaltige Inspiration. Ich danke ihnen für die Entbehrungen, die sie mit tiefem Verständnis und selbstlos in Kauf genommen haben.

Herrn Professor Dr. Rainer Dietz danke ich für die umfassende wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit in der Charité. Besonders danke ich ihm für die Unterstützung und Motivation während meiner Forschungszeit in den USA. Seinem Engagement und seiner Förderung habe ich es zu verdanken, dass ich nunmehr meine eigene molekularbiologische Arbeitsgruppe am Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch (MDC) und dem Experimental and Clinical Research Center (ECRC) in Berlin-Buch habe. Herrn Professor Dr. med. h. c. Friedrich C. Luft danke ich sehr für sein stetiges Interesse an meiner Forschung und seine kontinuierliche Unterstützung. Herr Professor Luft hat mich als Wissenschaftler, Lehrer und Kliniker tief und nachhaltig beeindruckt und mir gezeigt, dass durch die ihre Synergie ein phantastischer Beruf resultiert. Sein unermüdliches Interesse an der Ausbildung werden für immer ein Vorbild für mich sein. Meinen beiden Mentoren, Herrn Professor Dr. Rainer Dietz Herrn Professor Dr. med. h. c. Friedrich C. Luft, sind meine Ideale für klinisch tätige Wissenschaftler.

Meiner früheren Betreuerin und Mentorin Frau Professor Dr. Vera Regitz-Zagrosek, verdanke ich die Einführung in dieses Forschungsgebiet. Sie war meine wissenschaftliche Lehrerin und hat mir ermöglicht als klinisch tätiger Mediziner meine experimentellen Forschungsarbeiten fortzuführen. Erst in ihrem Labor wurde mein Interesse an der molekularen Kardiologie geweckt und gefestigt.

Ohne ihre Unterstützung hätte diese Schrift nicht vorgelegt werden können. Ihr danke ich sehr herzlich.

Meinem Mentor Professor Eric N. Olson bin ich dankbar für seinen Enthusiasmus und seine Inspiration während meiner Zeit als Postdoc in seinem Labor. Erst seine Weitsicht, Energie und Ideen haben fantastische Projekte ermöglicht und waren prägend für meine weitere Forschung. Die Arbeit in seinem Labor hat für mich eine völlig neue Welt molekularer Mechanismen eröffnet, mein Herangehen an die Untersuchung von Krankheitsprozessen grundlegend verändert und mein Methodenspektrum erheblich erweitert. Darüber hinaus haben sie meiner Forschung eine neue Richtung gegeben. Die Forschungsprojekte, die ich in seinem Labor angefertigt habe, sind ein zentraler Bestandteil dieser Schrift, und sind darüber hinaus Kernbestandteil der wissenschaftlichen Arbeit meiner eigenen Arbeitsgruppe.

Die Untersuchungen zur Charakterisierung des RAAS im menschlichen Herzen wären ohne die Herzmuskelproben von Patienten nicht möglich gewesen, die ich dem Fleiß von Herrn Dr. Reinhard Pregla und der kontinuierlichen Unterstützung von Herrn Prof. Roland Hetzer zu verdanken habe.

Meinen ehemaligen Doktoranden Herrn Dr. med. Lars R. Herda, Frau Dr. Evelin Schuch, Frau Dr. Janine Schmalowsky, Frau Dr. med. Manuela Leuschner, verdanke ich eine lebhaft wissenschaftliche Atmosphäre und viele inspirierende Diskussionen. Erst ihr Fleiß und ihre Kontinuität haben zum erfolgreichen Abschluss der Forschungsprojekte geführt.

Meinen Kooperationspartnern danke ich für die enge und konstruktive Zusammenarbeit, die die Grundlage für die Durchführung vieler Projekte waren und sind.

Die vorliegende Arbeit wurde umfassend von der Charité, der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, der American Muscular Dystrophy Association und der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift