

Aus dem
CharitéCentrum Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie,
Gastroenterologie und Nephrologie
Charité, Universitätsmedizin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Rainer Dietz

Ischämische und Nichtischämische Ursachen der Herzinsuffizienz

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von

Dr. med. Cemil Özcelik

aus Istanbul

eingereicht:	Juli 2008
Dekan:	Professor Dr. med. M. Paul
1. Gutachter	Professor Dr. med. G. Ertl, Würzburg
2. Gutachter	Professor Dr. med. R. Erbel, Essen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Ätiologie und Bedeutung der Herzinsuffizienz	5
1.2	Ursachen der Herzinsuffizienz	6
1.2.1	Koronare Herzkrankheit	6
1.2.2	In-Stent-Restenose als Komplikation nach Koronarstenting	7
1.2.3	In-Stent-Thrombose als Spätkomplikation nach Stenting	9
1.3	Kardiomyopathien	10
1.3.1	Dilatative Kardiomyopathie	11
1.3.1.1	Bedeutung des erbB2/HER2-Rezeptors für die myokardiale Funktion des Herzens	11
1.3.1.2	Manifestation einer dilatativen Kardiomyopathie bei Dysferlin-Defizienz	14
1.3.2	Hypertrophe Kardiomyopathie	18
2	ISCHÄMISCHE UND NICHT-ISCHÄMISCHE URSACHEN DER HERZINSUFFIZIENZ - EIGENE WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN-	21
2.1	Rolle des RAAS bei der In-Stent-Restenose	21
2.2	In-Stent Thrombosen (IST) bei Tumorpatienten	27
2.3	Bedeutung des erbB2-Rezeptors für die Ätiologie der DCM	30
2.4	Bedeutung des Membran-Reparaturenzyms Dysferlin für die Ätiologie der DCM	37
2.5	Charakterisierung des neuen HCM-Gens, Muscle LIM Protein, MLP (CSRP3)	51
3	DISKUSSION	94
4	ZUSAMMENFASSUNG	101
5	LITERATURVERZEICHNIS	103

Danksagung

Herrn Professor Dr. Rainer Dietz danke ich für die sehr grosse wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit an der Charité.

Besonders danke ich ihm für die hilfreiche Begleitung meiner Forschungsarbeit, für seine Anregungen und zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Bei Herrn Professor Dr. Michael Bader und Herrn Professor Dr. Ingo Morano möchte ich mich sehr herzlich für ihre fortwährende Förderung meiner Arbeitsgruppe und der Mitbetreuung meiner Doktoranden bedanken.

Bei meinen Kollegen Herrn Dr. Maximilian Posch, Dr. Christian Geier, Herrn Andreas Perrot und Dr. Katrin Wenzel bedanke ich mich für ihre tatkräftige Unterstützung beim Aufbau der Forschungsgruppe und der Labore am ECRC und Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Doktoranden Frau Anna Panek und Herrn Santhosh Kumar Ghadge, die mit ihrem grossen Eifer zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderen Dank schulde ich auch meinen technischen Assistentinnen Frau Tanja Schalow, Frau Andrea Köstner und Frau Nadine Junge für ihr grosses Engagement beim Durchführen der experimentellen Arbeiten.

Herrn Hänlein danke ich ganz besonders für technische Assistenz bei der Erstellung der Habilitationsschrift.

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AHA	American Heart Association
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
AT1	ANG II-Rezeptor Typ I
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CSRP3	Cysteine and Glycine Rich Protein 3, auch MLP
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EGF	Epidermal Growth Factor
ErbB1-4	EGF-Rezeptoren 1 bis 4
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
IST	In-Stent-Thrombose
KHK	Koronare Herzkrankheit
MLP	Muscle LIM Protein, auch CSRP3
PCI	Percutane Coronare Intervention
PTCA	Percutane Transluminale Coronare Angioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

1 Einleitung

1.1 Ätiologie und Bedeutung der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz zeichnet sich hämodynamisch durch eine inadäquat niedrige Perfusion der Organe mit nährstoffreichem Blut aus. Die weltweite Prävalenz der Herzinsuffizienz ist in den letzten Jahren nicht zuletzt wegen der zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung und insbesondere aufgrund der deutlich verbesserten Therapieansätze bei der Behandlung der koronaren Herzkrankung weiter angestiegen. In den USA wurden im Jahre 2007 mehr als 1 Million Patienten mit der Diagnose „Herzinsuffizienz“ für eine stationäre Behandlung ins Krankenhaus eingewiesen. Die Behandlungskosten summieren sich in den USA auf etwa 17 Milliarden Dollar pro Jahr. Man schätzt, dass etwa 300.000 Menschen in den USA jährlich an den Folgen der Herzinsuffizienz sterben. Die hohe Morbidität und Mortalität stellen nach wie vor eine grosse Herausforderung für die Gesellschaft dar (1).

Man unterscheidet die systolische Herzinsuffizienz mit reduzierter kardialer Kontraktilität von der diastolischen Herzinsuffizienz, die durch eine erhaltene systolische Funktion gekennzeichnet ist. Die häufigste Ursache der systolischen Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit (KHK) mit ihren schwerwiegenden Folgen wie Myokardinfarkt. Neben der hypertonen Herzkrankheit und der Myokarditis ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM) als weitere Ursache für die systolische Herzinsuffizienz von grosser klinischer Bedeutung. Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) dagegen zeichnet sich in aller Regel durch eine erhaltene systolische Funktion bei eingeschränkter diastolischer Relaxation aus. Klinisch manifestiert sie sich meist als diastolische Herzinsuffizienz. Nach neueren Untersuchungen ist die Prognose von Patienten

mit diastolischer Herzinsuffizienz ähnlich ernst wie die von Patienten mit einer systolischen Herzinsuffizienz (2).

1.2 Ursachen der Herzinsuffizienz

1.2.1 Koronare Herzkrankheit

Die KHK ist die führende Todesursache in den industrialisierten Ländern. Insgesamt sind die Herz-Kreislaufkrankungen in diesen Ländern für 45% und in den Entwicklungsländern für 24.5% der Gesamtmortalität verantwortlich (3). Nach den Daten der Framingham Heart Study sinkt bei gesunden Männern im Alter von 60 Jahren die Lebenserwartung von 20 auf 12.6 Jahren, wenn sie in den folgenden Jahren eine KHK entwickeln. Bei Auftreten eines Myokardinfarktes sinkt sie sogar auf 10.8 Jahre. Gesunde 60-jährige Frauen zeigen bei Auftreten einer KHK bzw. eines Herzinfarktes eine ähnlich grosse Abnahme der Lebenserwartung (4). Seit 1975 sind die Mortalitätsraten für ischämische Herzkrankheiten in den meisten Ländern aufgrund der Verbesserung der Therapien für KHK um ca. 24-28% zurückgegangen (5). Die Percutane Transluminale Coronare Angioplastie (PTCA) und die koronare Bypasschirurgie stellen dabei alternative Therapieverfahren bei der Behandlung der KHK dar.

1.2.2 In-Stent-Restenose als Komplikation nach Koronarstenting

Die Percutane Coronare Intervention (PCI) hat inzwischen die Bypasschirurgie als häufigsten therapeutischen Eingriff bei der KHK abgelöst. Trotz erheblicher Fortschritte bei der Entwicklung von Dilatationsballons und der Koronarstents erleiden weiterhin ca. 30-50% der Patienten nach einer Ballondilatation und 10-30% der Patienten, die sich einem Bare-metal-Stenting (= unbeschichtete Stents) unterzogen haben, eine Restenose (6). Die Pathophysiologie der Restenose ist ein komplexer Vorgang, da es nach der PCI zur Inflammation, Zellproliferation, Thrombose und erhöhter extrazellulärer Matrixproduktion kommt (7). Bei der Restenose unterscheidet man prinzipiell 3 Stadien: Elastisches *recoil*, vaskuläres Remodeling und neointimale Proliferation (8). Nach Implantation von unbeschichteten Koronarstents werden zwar elastisches *recoil* und vaskuläres Remodeling im wesentlichen unterdrückt, jedoch scheint sich die proliferative Komponente der Intima zu verstärken und neben der Inflammation, für die Restenose nach Stenting verantwortlich zu sein. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) mit seinem Hauptmediator Angiotensin II (ANG II) beim Prozess der neointimalen Proliferation und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen eine grosse Rolle spielt (9). So führte die Stimulation des ANG II-Typ I-Rezeptors (AT1) im Tiermodell zu einer Vermehrung und Wanderung von glatten Gefäßmuskelzellen und zur neointimalen Proliferation im Stent (10). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch Atherektomie gewonnene Proben von restenotischen Läsionen reichlich AT1-Rezeptoren aufweisen. Diese Daten lassen somit auf eine essentielle Funktion des RAAS

bei der Restenose schliessen (11). ANG II entsteht durch die Katalyse aus Angiotensin I (ANG I) mit Hilfe des Angiotensinkonversionsenzym (ACE). Das ACE-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 17. 1992 wurde ein Deletions/Insertions-Polymorphismus im Intron 16 erstmals nachgewiesen, der die grossen interindividuellen Unterschiede bei der ACE-Aktivität erklärt (12). So korreliert der ACE D/D-Polymorphismus mit höheren Plasma- und Gewebe-ANG II-Spiegel (13). In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der ACE D/D-Polymorphismus mit der Restenose nach PTCA assoziiert ist (14). Zur Klärung der Frage, ob RAAS-Polymorphismen auch bei der wiederholten Restenose nach Stenting mit unbeschichteten Stents eine signifikante Rolle spielen, haben wir neben dem ACE-Polymorphismus weitere Polymorphismen wie ANG Thr174Met, ANG Met235Thr und AT1 A1166C bestimmt (siehe Abbildung 1).

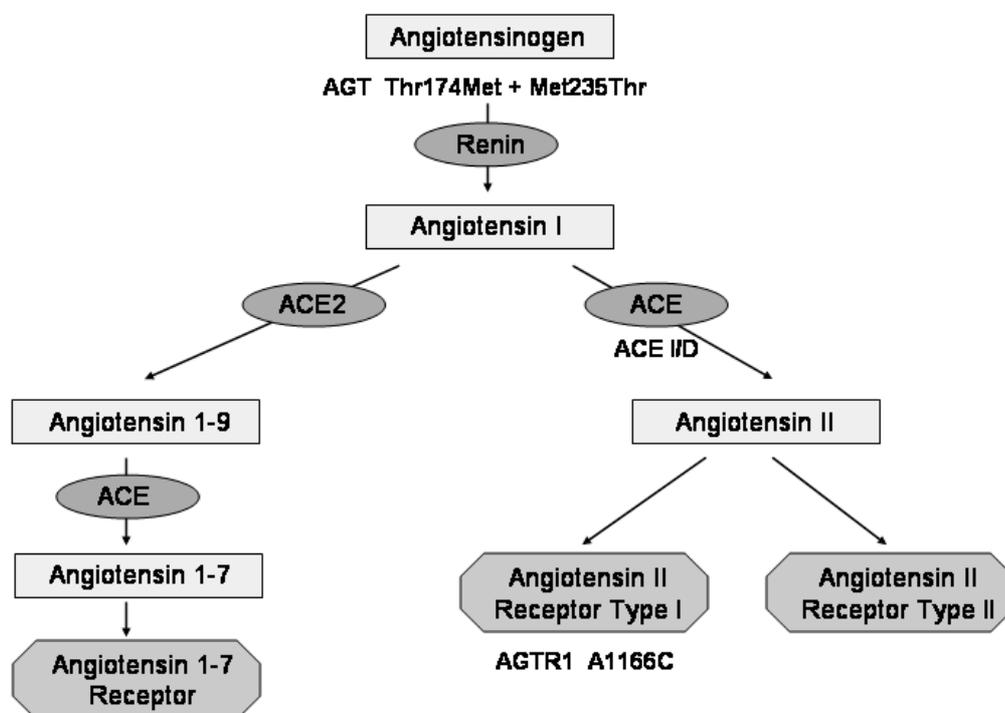


Abbildung 1: Das Renin-Angiotensin-System und genetisch untersuchte Polymorphismen.

Nach einer Follow-up-Phase von insgesamt 12 Monaten konnte bei einem Kollektiv von 272 Patienten nach Stenting mit einem unbeschichteten Stent kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen wiederholter In-Stent-Restenose und einem der gemessenen Polymorphismen nachgewiesen werden. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass bei der In-Stent-Restenose, die Intimaproliferation noch durch weitere Vorgänge wie möglicherweise durch elastisches *recoil* überlagert wird.

1.2.3 In-Stent-Thrombose als Spätkomplikation nach Stenting

Neben der In-Stent-Restenose stellen die In-Stent-Thrombosen (IST) eine wichtige Komplikation nach Koronarstenting dar. In den letzten Jahren konnte durch Verbesserungen in der Stenttechnologie und die Anwendung der dualen Thrombozytenaggregationshemmung die Inzidenz von IST bei unbeschichteten Stents auf 0.5-2% gesenkt werden (15). Darüber hinaus haben Untersuchungen gezeigt, dass die Ballon-Hochdruckdilatation und die Beseitigung proximal oder distal der Läsion vorhandener Flusshindernisse zur Verhinderung der IST beitragen. Hingegen führen Resistenz gegen Plättchenaggregationshemmer, nicht abgedeckte Koronardissektionen sowie überlange oder malpositionierte Stents zur IST (16). Wenig Klarheit herrscht darüber, ob auch Tumorpatienten nach Stenting ein erhöhtes IST-Risiko haben. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass das Vorhandensein von Malignomen zu einem hyperkoagulablen Zustand führt (17). Dabei spielen Interaktionsvorgänge zwischen Tumorzellen und dem hämostasiologischen System des Körpers, mit der Folge einer Aktivierung, eine wichtige Rolle.

Zur Klärung der Frage, ob die Co-Inzidenz von Malignomen ein Risikofaktor für das Auftreten von IST darstellen, haben wir mehr als 7000 Patienten, die sich einem Stenting mit unbeschichteten Stents unterzogen haben, untersucht. Bei Tumorpatienten war die Inzidenz der IST mehr als 7 mal so häufig als bei Patienten ohne Tumor. Da thrombotische Ereignisse einen wesentlichen Faktor für Morbidität und Mortalität darstellen, implizieren die Ergebnisse unserer Untersuchung, dass Tumorpatienten nach Stenting eine optimale plättchenaggregationshemmende Therapie bekommen sollten. Ob darüber hinaus eine begleitende intermittierende Therapie mit niedermolekularem Heparin angewendet werden sollte, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

1.3 Kardiomyopathien

Nach Definition der „American Heart Association (AHA)“ handelt es sich bei den Kardiomyopathien um eine „heterogene Gruppe von myokardialen Erkrankungen, die mit mechanischer und/oder elektrischer Dysfunktion einhergehen und gewöhnlich eine ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation zeigen“ (18). Man unterscheidet genetische, gemischte und erworbene primäre Kardiomyopathien. Zu den primär genetischen Kardiomyopathien zählen beispielsweise die Hypertrophe Kardiomyopathie und die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Dysplasie/Kardiomyopathie. Aufgrund des derzeitigen Wissensstands und dem seltenen Nachweis familiärer Formen, wird die DCM als eine gemischte primäre Kardiomyopathie angesehen (18).

1.3.1 Dilatative Kardiomyopathie

1.3.1.1 Bedeutung des erbB2/HER2-Rezeptors für die myokardiale Funktion des Herzens

Die Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren erbB1-4 (HER1-4) vermittelt Signale der Wachstumsfaktoren aus der Familie der „Epidermal Growth Factors“ (EGF). Da ErbB2 keinen der bekannten Wachstumsfaktoren mit nennenswerter Affinität bindet, dient dieser Rezeptor vor allen Dingen als Co-Rezeptor für die anderen erbB-Rezeptoren. Die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne von erbB2 wird dabei durch Heterodimerisierung aktiviert. Die Fähigkeit von erbB2 mit erbB1, erbB3 und erbB4 zu heterodimerisieren, führt zu einer ausgeprägten Diversifikation der Ligandenbindungsfähigkeit und der Signalübertragungsmöglichkeiten (19-21). Anhand von Knockout-Studien bei denen verschiedene erbB-Rezeptoren oder der Ligand Neuregulin-1 ausgeschaltet wurden, konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren erbB2, erbB4, sowie der Ligand Neuregulin-1 für die embryonale Entwicklung und Funktion des Herzens von essentieller Bedeutung sind (22-24). Während der embryonalen Entwicklung bindet der im Endokard gebildete Ligand Neuregulin-1 parakrin die myokardialen erbB2/erbB4-Rezeptor-Heteromere (siehe Abbildung 2).

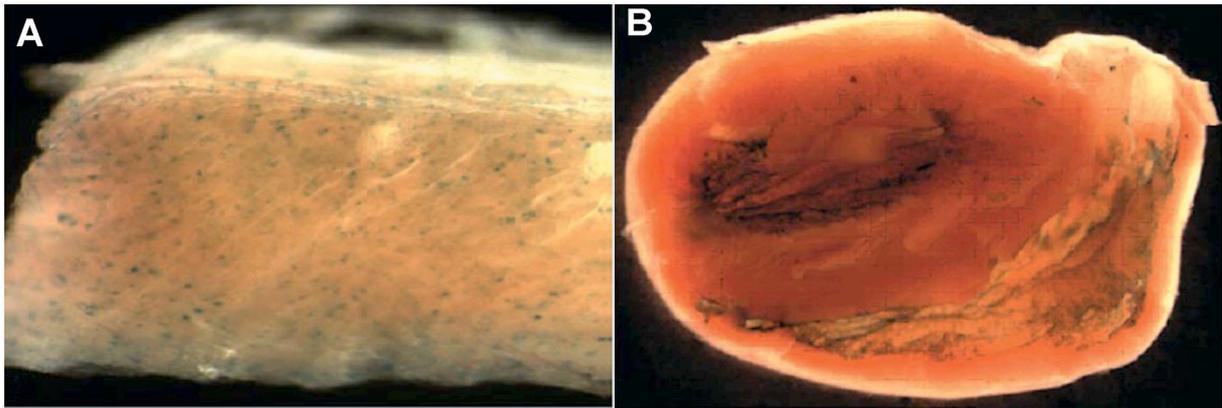


Abbildung 2: Genexpressionsanalyse mittels β -Galaktosidasefärbung im Mäuseherzen. **A:** erbB2-Expression im Myokard. **B:** Neuregulin-1-Expression im Endokard (aus (25)).

Entsprechend zeigten sowohl Neuregulin-1-defiziente Mäuse, wie auch Knockout-Tiere von erbB2 und erbB4 eine fehlende Trabekularisierung der Herzkammern. Die homozygot defizienten Mäuse starben mittigestional am Tag 10.5 (E10.5) der embryonalen Entwicklung. Die Beobachtung, dass der beobachtete Herzphänotyp kausal mit der embryonalen Letalität in Zusammenhang steht, konnte durch die Studien von Woldeyesus et al. untermauert werden. Durch die isolierte kardiale Expression von erbB2 bei erbB2-Defizienz in den übrigen Geweben, überlebten die Mäuse den kritischen Zeitraum (E10.5) während der embryonalen Entwicklung (26). Im adulten Herzen konnte die Funktion des erbB2/erbB4-Heteromers, sowie des Liganden Neuregulin-1 nicht untersucht werden, da die Mäuse bei homozygoter Deletion eines der Proteine intrauterin verstarben. Um die Funktion von erbB2 im adulten Herzen dennoch zu untersuchen, haben wir ein gefloxtes Allel des erbB2-Gens hergestellt und unter Verwendung der Stammzelltechnologie in embryonale Stammzellen von Mäusen eingebracht. Durch Verpaarung der erbB2-geflochten

Mäuse mit MLC2v-Cre-Mäusen konnte erbB2 konditionell inaktiviert werden. Die so kardial defizienten Mäuse wurden geboren, erreichten das Erwachsenenalter und zeigten keine Beeinträchtigung ihrer Fertilität. Im Alter von 2 Monaten entwickelten konditionell erbB2-defiziente Mäuse eine schwere DCM mit einer hochgradig eingeschränkten systolischen Funktion. In eigenen histologischen Untersuchungen konnte eine Dilatation aller Herzkammern einhergehend mit einer Ausdünnung der Herzwände nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 3**) (27,28).

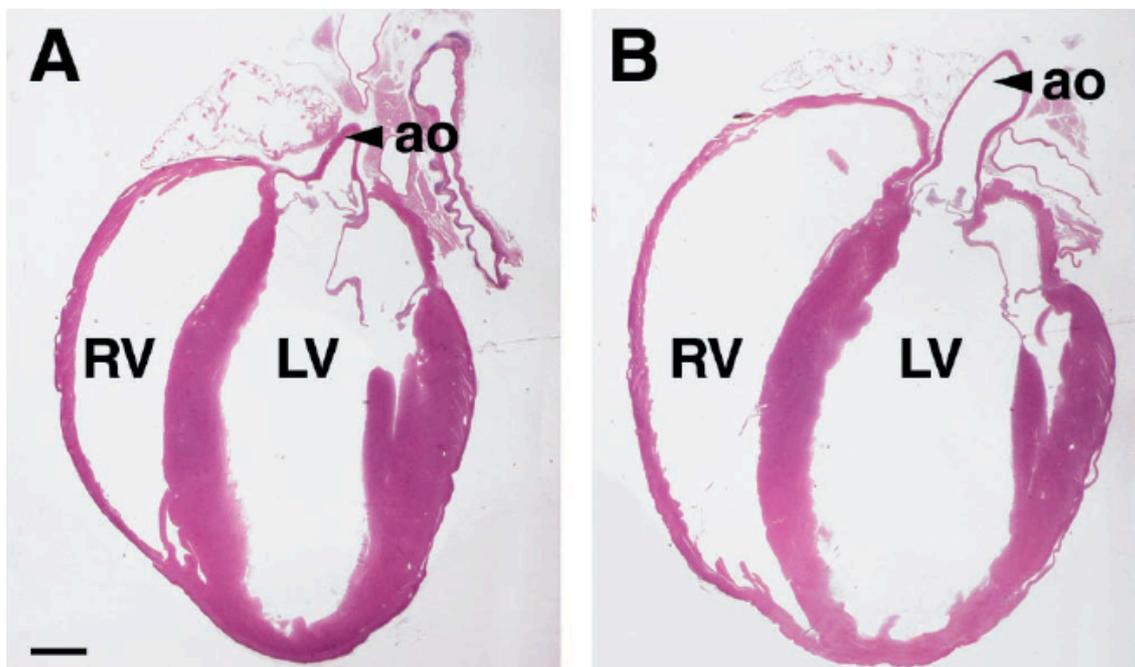


Abbildung 3: **A:** Herz einer adulten Wildtyp-Maus, **B:** DCM bei erbB2-Knockout-Tieren.

Auch in klinischen Studien konnte die Bedeutung eines intakten Neuregulin-1-erbB2-Signalwegs durch die Anwendung des humanisierten Anti-erbB2-Antikörpers, Trastuzumab, bei Frauen mit erbB2-überexprimierenden Mammakarzinom, untermauert werden. In ca. 20-30% der Patientinnen mit Mammakarzinom kann eine prognostisch ungünstige Amplifikation des erbB2-

Gens beobachtet werden (29). Die Anwendung von Trastuzumab, zusätzlich zu einer Standardchemotherapie, führte in einer grossen klinischen Studie, zwar zu einer deutlichen Besserung der Tumorprogression und des Überlebens, jedoch war die häufigste Komplikation der Trastuzumab-Gruppe die hohe Inzidenz einer schweren Herzinsuffizienz (27% vs. 8%) (30). Aus dieser Studie lässt sich schlussfolgern, dass die unselektive Blockade kardialer erbB2-Rezeptoren durch Trastuzumab zur Manifestation einer DCM führt. Das von uns etablierte Mausmodell des konditionellen Knockouts von erbB2 stellt somit ein neues Tiermodell für die trastuzumab-induzierte dilatative Kardiomyopathie dar.

1.3.1.2 Manifestation einer dilatativen Kardiomyopathie bei Dysferlin-Defizienz

Im Gegensatz zur HCM, bei der es sich prinzipiell um eine genetische Erkrankung handelt, kann der Phänotyp der DCM, neben der genetischen Vererbung, noch durch weitere Faktoren wie beispielsweise Infektionen, arterielle Hypertonie, Schwangerschaft, Alkohol und Autoimmunerkrankungen verursacht werden (1). Burket und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass bei echokardiographischem Scening von Personen mit asymptomatischer linksventrikulärer Dilatation etwa 20-50% der idiopathischen DCM-Patienten einen familiären Hintergrund zeigten (31). Erschwert werden die genetischen Untersuchungen von DCM-Patienten oftmals durch eine inkomplette Penetranz der Erkrankung, die häufig zudem altersabhängig ausgeprägt ist, sowie durch die schlechte Prognose der betroffenen Personen. Ein Teil der DCM-Patienten weist neben der DCM auch eine Skelettmuskelbeteiligung, eine Myopathie oder Skelettmuskeldystrophie, auf. So findet sich bei der Duchenne'schen Dystrophie in etwa 80% der Fälle auch eine DCM, während bei der Dystrophie

vom Typ Becker, die klinisch milder verläuft, eine kardiale Dysfunktion in 10% der Fälle nachweisbar ist (1). In beiden Erkrankungen liegt eine Mutation des Dystrophin-Gens vor. Es stellte sich für uns daher die Frage, ob auch andere Muskeldystrophien, insbesondere die Gliedergürteldystrophie Typ 2B eine kardiale Mitbeteiligung zeigen. Ursächlich für diese Erkrankung ist eine Mutation im Dysferlin-Gen auf Chromosom 2p13.3-p13.1, die auch für die 1986 erstmals beschriebene Miyoshi-Muskeldystrophie verantwortlich ist. Dysferlin ist ein 230 kDa grosses sarkolemmales Protein, das an Reparaturvorgängen an der Muskelmembran essentiell beteiligt ist. Bei Schädigung der Zellmembran kommt es in der gesunden Zelle zu einer sarkolemmalen Anreicherung von Dysferlin mit nachfolgender Ca^{2+} -abhängiger Wiederherstellung der Membranintegrität. Dysferlin-defiziente Mäuse hingegen zeigen eine gestörte Fähigkeit, den Membrandefekt zu verschliessen. Als Ausdruck dieses Defekts findet sich eine subsarkolemmale Akkumulation von Dysferlin in Vesikeln (32).

Bei 2 Patienten mit einer Gliedergürteldystrophie Typ 2B konnten wir eine kardiale Beteiligung in Form einer DCM mit den typischen Symptomen der Herzinsuffizienz nachweisen. Eine KHK als Ursache der Herzinsuffizienz konnte mittels Koronarangiographie ebenso wie andere ätiologisch relevante Erkrankungen (wie arterielle Hypertonie) ausgeschlossen werden. Elektrokardiographisch zeigen die Patienten keine atrioventrikulären Überleitungsstörungen. In Myokardbiopsien konnten die typischen Merkmale der DCM, insbesondere hypertrophierte Kardiomyozyten, diffuse perivaskuläre Infiltrate sowie eine ausgeprägte interstitielle Fibrose festgestellt werden (33). Immunhistochemisch konnte erstmals gezeigt werden, dass Dysferlin in den Kardiomyozyten und nicht im Sarkolemma lokalisiert war. Aufgrund der nachgewiesenen kardialen Beteiligung bei einem Teil der Dysferlin-defizienten

Patienten evaluierten wir die Herzfunktion bei 2 natürlich vorkommenden Mauslinien mit Dysferlin-Mutationen.

In SJL/J-Mäusen (Träger einer „splice-site“ Mutation mit einer 171 Basenpaar grossen in-frame Deletion) konnte in Ruhe eine Reduktion der invasiv gemessenen linksventrikulären Kontraktilität im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden (4093 ± 374 mmHg/s vs. 3261 ± 110 mmHg/s). In einem zweiten Versuch wurde die Regenerationskapazität der dysferlin-mutanten SJL/J-Mäuse durch die wiederholte subcutane Isoproterenol-Applikation überprüft. Dysferlin-mutante Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine deutliche Zunahme der myokardialen Fibrose und damit ein insgesamt schlechteres Remodeling als die Wildtyp-Mäuse (siehe Abbildung 4).

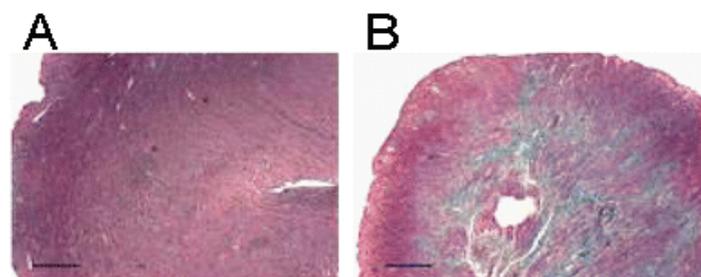


Abbildung 4: Histologische Untersuchung von Mäuseherzen nach Isoproterenol-Applikation. Deutliche Zunahme des Bindegewebes (blau) in Dysferlin-defizienten Mäusen (B) vs. Wildtyp-Mäuse (A). Trichome-Masson-Goldner-Färbung.

Darüber hinaus zeigten A/J-Mäuse, die durch ein ETn-Retrotransposon im Intron 4 Dysferlin-defizient sind, im Isoproterenol-Experiment neben einer erhöhten Mortalität eine deutlich erhöhte Zellmembranpermeabilität, die nach Gabe von Evans-Blue eindrucksvoll dargestellt werden konnte (siehe Abbildung 5) (33).

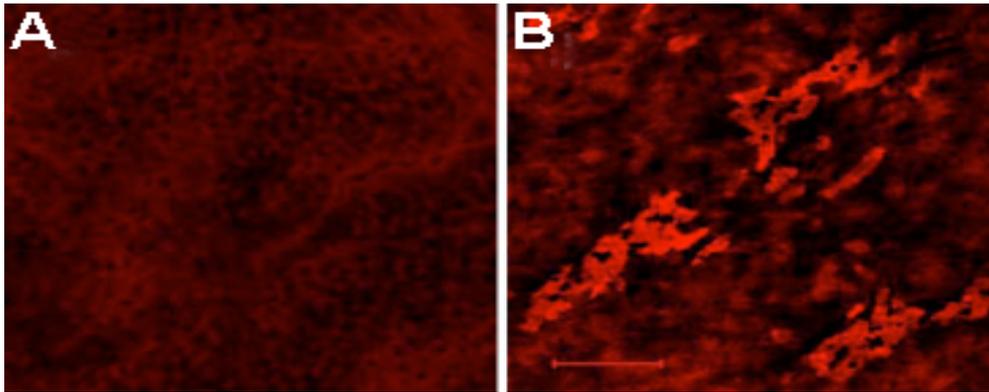


Abbildung 5: Nachweis der sarkolemmalen Membranschädigung nach Isoproterenol-Injektionen. Deutliche Anreicherung der Evans-Blau-Farbstoffs in adulten Kardiomyozyten von Dysferlin-defizienten Mäusen als Ausdruck der erheblichen Membranschädigung (B). Kontrolle (A).

Aus den von uns erhobenen klinischen Daten und der tierexperimentellen Untersuchungen in Dysferlin-defizienten Mäusen lässt sich folgern, dass bei Patienten mit bekannter Dysferlinopathie eine kardiale Mitbeteiligung vorliegen kann. Eine DCM sollte bei diesen Patienten durch engmaschige echokardiographische Untersuchungen erkannt werden, um eine Herzinsuffizienztherapie frühzeitig einzuleiten.

1.3.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die HCM, mit einer Prävalenz von 1:500 in der Bevölkerung die häufigste genetische Kardiomyopathie, ist phänotypisch durch eine inadäquate linksventrikuläre Hypertrophie gekennzeichnet (34). Das klinische Bild der Herzinsuffizienz ist überwiegend geprägt durch die diastolische Dysfunktion (35). In nur etwa 10% der Fälle kommt es im weiteren Verlauf der Erkrankung auch zur Manifestation einer systolischen Herzinsuffizienz („burned-out“-Phase) (36). Genetische Analysen in betroffenen Familien führten zur Identifikation von mehr als 12 HCM-Genen und mehr als 400 verschiedenen Mutationen. Bei den entdeckten HCM-Genen handelt es sich überwiegend um Gene, die für sarkomere Proteine enkodieren. Dies führte schliesslich zu der Hypothese, dass es sich bei der HCM um eine Erkrankung des Sarkomers handelt (1).

Systematisches Screening in Sarkomer-Genen ergab, dass in 2/3 der Fälle die krankheitsverursachende Mutation gefunden werden konnte (37). Umgekehrt kann man hieraus folgern, dass weitere HCM-Gene noch unentdeckt sind.

Bei einem von uns neu-entdeckten HCM-Gen handelt es sich um das „Muscle LIM Protein“ (MLP) oder auch „Cysteine and Glycin-rich Protein 3“ (CSRP3). MLP hat eine Reihe von biologischen Funktionen wie die Regulation von Zelldifferenzierung und Zellwachstum. Knöll und Kollegen konnten nachweisen, dass MLP darüber hinaus durch die Interaktion mit Telethonin und Titin eine Stretch-Sensor-Funktion zukommt (38,39). Die Deletion von MLP in der Maus zeigte zwei unterschiedliche Phänotypen: Zum einen das Bild einer HCM mit Hypertrophie der Herzwände und zum anderen das Bild einer DCM (40). Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden,

dass MLP vielmehr im Zytosol von Kardiomyozyten als an der Z-Scheibe lokalisiert ist (41,42). Da sich sowohl das klinische Bild der betroffenen Mutationsträger, wie septale Hypertrophie als auch histologische Untersuchungen von Myokardbiopsien („Disarray“, Fibrose), nicht von anderen Formen der HCM unterscheiden, erweitert MLP das Spektrum der ursächlichen sarkomeren HCM-Gene zusätzlich um ein zytosolisches Gen. Das zytosolisch lokalisierte MLP ist möglicherweise am Stretch-Sensing über die Induktion von „Brain Natriuretic Peptide“ (BNP) involviert. In in-vitro Untersuchungen mit mutiertem MLP-Protein (C58G-Mutation) konnte eine verminderte Stabilität des mutierten Proteins nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6).

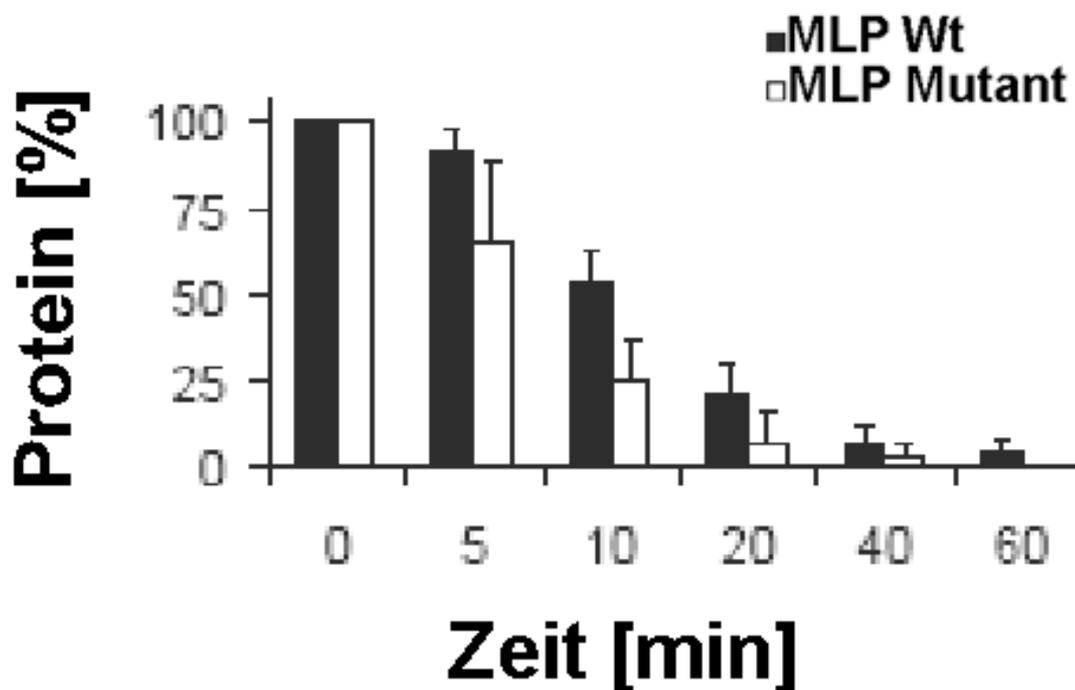


Abbildung 6: Stabilität von MLP Wildtyp (schwarze Balken) und C58G-mutiertem MLP (weisse Balken) nach Inkubation mit Thermolysin. Schnellere und verstärkte Degradation von C58G-mutiertem MLP.

Die neuen funktionellen Daten legen die Vermutung nahe, dass pathogenetisch das gestörte Stress-Sensing bei Patienten mit MLP-Mutation nicht durch die Mutation selbst, sondern über eine verminderte BNP-Induktion durch das instabile aberrante MLP-Protein zustande kommt (41).

2 Ischämische und Nicht-Ischämische Ursachen der Herzinsuffizienz -eigene wissenschaftliche Arbeiten-

2.1 Rolle des RAAS bei der In-Stent-Restenose

Eine häufig zu beobachtende Komplikation nach Stenting mit unbeschichteten Stents stellen nach wie vor die In-Stent-Restenosen dar. Sie können zu subklinischen unbemerkten Myokardischämien und über ein progressives Remodeling zur Manifestation einer Herzinsuffizienz führen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das RAAS pathophysiologisch am Prozess der Restenose beteiligt ist.

Zur Evaluation der Rolle des RAAS bei Hochrisiko-Patienten mit wiederholter In-Stent-Restenose haben wir 272 Patienten über einen Zeitraum von 12 Monaten nachverfolgt. Darüber hinaus wurden bei diesen Patienten verschiedene Polymorphismen des RAAS, wie ACE D/I, ANG T174M, M235T und der AT1 A1166C gemessen und mit der Inzidenz einer wiederholten In-Stent-Restenose verglichen. Nach 6 Monaten zeigten sich bei 81 Patienten (29.8%) eine angiographisch signifikante In-Stent-Restenose. Diese Patienten wurden einer erneuten Angioplastie unterzogen und für weitere 6 Monate nachverfolgt. Nach etwa einem Jahr entwickelten 42 Patienten eine erneute In-Stent-Restenose, während bei 39 Patienten keine erneute In-Stent-Stenose gesehen werden konnte. Die Inzidenz eines bestimmten Polymorphismus korrelierte bei diesen Hochrisiko-Patienten nicht mit einer wiederholten In-Stent-Restenose.

Diese Daten lassen schlussfolgern, dass der Mechanismus der repetitiven In-Stent-Restenose einen komplexen Prozess darstellt und die neointimale

Proliferation möglicherweise von anderen Vorgängen wie dem elastischen *recoil* begleitet wird.

Quelle für Seiten 23-26

Gross CM, Perrot A, Geier C, Posch MG, Hassfeld S, Kramer J, Schmidt S, Derer W, Dietz R, Ozcelik C. Recurrent in-stent restenosis is not associated with the angiotensin-converting enzyme D/I, angiotensinogen Thr174Met and Met235Thr, and the angiotensin-II receptor 1 A1166C polymorphism. *The Journal of invasive cardiology*. 2007;19(6):261-264.

2.2 In-Stent Thrombosen (IST) bei Tumorpatienten

Neben der In-Stent-Restenose bleiben IST weiterhin eine grosse Herausforderung in der interventionellen Kardiologie. Die Verbesserung der Stenttechnologie und die konsequente Anwendung der doppelten Plättchenaggregationshemmung führten zwar zu einem Rückgang der IST bei unbeschichteten Stents von >5% auf unter 2%.

Wir testeten die Hypothese, ob Patienten mit Malignomen ein höheres Risiko für IST haben als KHK-Patienten ohne begleitende Tumorerkrankung. In einer retrospektiven Studie wurden daher 7081 Patienten ohne Tumorerkrankung, die sich einem Stenting mit unbeschichteten Stents unterzogen hatten, eingeschlossen. Während 0.78% der 7081 Patienten ohne Malignome eine IST erlitten, waren es in der Tumorgruppe 5.6%. Dies entspricht einer Odds Ratio von 7.1. Die mediane Zeit bis zum Auftreten der IST betrug in der Tumorgruppe 7 Tage vs. 4 Tage bei KHK-Patienten ohne Malignome. Beim Vergleich der gestenteten Gefässe, der verwendeten Stentdiameter und der Stentlänge gab es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Diese Studie belegt, dass KHK-Patienten mit einer Tumor-Begleiterkrankung einem erhöhtem Risiko für IST ausgesetzt sind. Mehrere Faktoren kommen hierbei zu tragen. Dies sind zum einen der hyperkoagulable Zustand, in dem sich Tumorpatienten befinden und zum anderen die oftmals endothelverletzenden Chemotherapien. Eine optimale plättchenaggregationshemmende Therapie in Kombination mit der Anwendung einer intermittierenden niedermolekularen Heparintherapie stellt möglicherweise eine Verbesserung der Therapie nach Stenting bei Patienten mit konkomitanter Tumorerkrankung dar.

Quelle für Seiten 28-29

Gross CM, Posch MG, Geier C, Olthoff H, Kramer J, Dechend R, Dietz R, Ozcelik C. Subacute coronary stent thrombosis in cancer patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(12):1232-1233.

2.3 Bedeutung des erbB2-Rezeptors für die Ätiologie der DCM

Bei der nichtischämischen Herzinsuffizienz ist ätiologisch neben der hypertonen Herzkrankheit und der Myokarditis die DCM von grosser klinischer Bedeutung. Der Tyrosinkinaserzeptor erbB2 findet sich in ca. 20-30% aller Mammakarzinome überexprimiert. Die Amplifikation des Rezeptors im Tumorgewebe dieser Patienten korreliert mit einer schlechteren Überlebensrate. Eine signifikante Verbesserung der hohen Mortalitätsraten konnte mit der Einführung von humanisierten erbB2-Rezeptoren (Trastuzumab) erzielt werden. Die Applikation dieses nicht-selektiven erbB2-Antikörpers, in Kombination mit einer Standard-Chemotherapie, führte jedoch zu einer ca. 6-fach höheren Inzidenz einer schweren Herzinsuffizienz.

In einem konditionellen Knockout-Ansatz haben wir ein genetisches Modell für die erbB2-Inhibition hergestellt. Hierfür wurden Mäuse, die ein „gefloxtes“ erbB2-Allel trugen, mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des kardial-spezifischen MLC2v-Promoters exprimierten. Der konditionelle Knockout des erbB2-Rezeptors führte zu einer Überwindung der kritischen Phase während der embryonalen Entwicklung des Herzens. Die erbB2-defizienten Mäuse erreichten das Erwachsenenalter und entwickelten im Alter von 2 Monaten eine schwere DCM mit den typischen morphologischen und histologischen Veränderungen. Immunhistochemisch konnte ferner gezeigt werden, dass erbB2 im T-Tubulus-System von Kardiomyozyten lokalisiert ist. Die klinischen Daten und das von uns neu etablierte Modell der genetischen erbB2-„Inhibition“ belegen, dass erbB2 für die Aufrechterhaltung der myokardialen Funktion im adulten Herzen essentiell ist.

Quelle für Seiten 31-36

Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hubner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(13):8880-8885.

2.4 Bedeutung des Membran-Reparaturenzyms Dysferlin für die Ätiologie der DCM

Eine Reihe von Patienten mit einer Skelettmuskel-Myopathie weisen auch eine kardiale Mitbeteiligung auf. So findet sich beispielsweise bei der Duchenne'schen Dystrophie in ca. 80% der Patienten auch eine DCM. Ziel des Projekts war es herauszufinden, ob auch Patienten mit einer Gliedergürteldystrophie Typ 2B ebenfalls eine kardiale Beteiligung zeigen. Das für diese Myopathie ursächliche Gen ist Dysferlin, ein sarkolemmales Protein, das an Reparaturvorgängen der Muskelmembran wesentlich beteiligt ist. Bei 2 von 7 Patienten mit Dysferlin-Defizienz konnte eine DCM mit den typischen Symptomen einer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden. Mittels ausführlicher Anamnese, nicht-invasiver Blutdruckmessung, Holter und Koronarangiographie konnten andere Ursachen der DCM ausgeschlossen werden. Eine Myokardbiopsie bei einem betroffenen Patienten zeigte die aus Mausmodellen bekannten charakteristischen Veränderungen, wie ballonierte Nuklei sowie perivaskuläre und interstitielle Fibrose. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass mutiertes Dysferlin von dem Sarkolemma ins Zytosol transloziert war. Aufgrund der klinischen Daten re-evaluierten wir natürlich vorkommende Mauslinien mit aberranter Dysferlin-Expression in einem translationalen Ansatz. Sowohl in SJL/J- als auch in AJ-Mäusen konnte in invasiven und echoardiographischen Untersuchungen eine diskret eingeschränkte kardiale Funktion beobachtet werden. In einem kardialen Stressmodell zeigten sich nach wiederholten Isoproterenol-Injektionen eine extensive Membranschädigung im Herzen der Dysferlin-mutanten Mäuse, während bei Wildtyp-Mäusen eine nur unwesentliche Schädigung des Sarkolemmas nachgewiesen werden konnte. Die tierexperimentellen Untersuchungen ergänzen die beim Menschen von uns

nachgewiesene kardiale Mitbeteiligung bei Patienten mit einer Dysferlinopathie.
Eine genaue kardiale Evaluation von Patienten mit bekannter Gliedergürteldystrophie vom Typ 2B erscheint als Konsequenz dieser Daten indiziert zu sein.

Quelle für Seiten 39-50:

Wenzel K, Geier C, Qadri F, Hubner N, Schulz H, Erdmann B, Gross V, Bauer D, Dechend R, Dietz R, Osterziel KJ, Spuler S, Ozcelik C. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *Journal of molecular medicine*. 2007;85(11):1203-1214.

2.5 Charakterisierung des neuen HCM-Gens, Muscle LIM Protein, MLP (CSRP3)

Die HCM manifestiert sich klinisch im Gegensatz zur DCM meist als diastolische, nicht-ischämische Herzinsuffizienz. Systematisches Screening in HCM-Familien führte zu der Erkenntnis, dass nur ca. 60% der HCM-Gene bekannt sind. Da die meisten bekannten krankheitsverursachenden HCM-Gene für sarkomere Proteine kodieren, nahm man bislang an, dass es sich bei der HCM um eine sarkomere Erkrankung handelt. Durch die Identifikation von MLP/CSRP3 als neuem HCM-Gen konnten wir zeigen, dass auch primär nicht-sarkomere Proteine zur HCM führen können. In einer grossen Familie mit 54 Mitgliedern konnten wir eine Mutation (C58G) im MLP-Gen als ursächliche Mutation für die HCM (LOD-Score 5.9) identifizieren. Die Myokardbiopsie eines betroffenen HCM-Patienten zeigte die typischen histologischen Veränderungen, die sich nicht von anderen HCM-Formen unterschieden. Interessanterweise zeigten Skelettmuskelbiopsien von betroffenen MLP-Patienten eine myofibrilläre Myopathie, so dass ähnlich wie bei der Dysferlinopathie auch MLP-Patienten neben der kardialen eine Skelettmuskelbeteiligung aufwiesen. In immunhistochemischen Untersuchungen (Antikörper-Färbungen und Western-Blots) konnten wir nachweisen, dass MLP primär im Zytosol von Kardiomyozyten lokalisiert ist. Weitere in-vitro Experimente ergaben darüber hinaus, dass die Stabilität des mutierten MLP deutlich herabgesetzt ist. Die neuen funktionellen Daten belegen, dass eine Störung des Stress-Sensings bei Patienten mit aberrantem MLP-Protein vielmehr über die verminderte BNP-Induktion des instabilen Proteins als durch die Mutation selbst zustande kommt.

Quelle für Seiten 52-93

Geier C, Gehmlich K, Ehler E, Hassfeld S, Perrot A, Hayess K, Cardim N, Wenzel K, Erdmann B, Krackhardt F, Posch MG, Bublak A, Nagele H, Scheffold T, Dietz R, Chien KR, Spuler S, Furst DO, Nurnberg P, Ozcelik C. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Human molecular genetics*. 2008;17(18):2753-2765.

3 Diskussion

In den hier aufgeführten Arbeiten wurden mit den Methoden der molekularen Genetik Prädiktoren und monogenetische Ursachen der Ischämischen- und Nicht-Ischämischen Herzinsuffizienz untersucht. Das komplexe Syndrom der Herzinsuffizienz ist durch die Unfähigkeit des Herzens charakterisiert, dass vom Körper benötigte Blutvolumen bei normalem enddiastolischem Füllungsdruck zu gewährleisten. Im Allgemeinen führen strukturelle oder funktionelle Veränderungen des Myokards zu einer Beeinträchtigung der Auswurfsleistung oder Füllung des Herzens. Prinzipiell kann zwischen ischämischen- und nicht-ischämischen Ursachen der Herzinsuffizienz unterschieden werden.

Die Koronare Herzkrankheit, die bedeutendste Ursache der ischämischen Herzinsuffizienz, kann über eine persistierende oder intermittierend auftretende Perfusionsstörung des Herzens zur Beeinträchtigung der Kontraktilität führen. Neben dem Apoptose und Nekrose der betroffenen Myokardareale kommt es unter Umständen über ein ungünstiges Remodeling und Narbenexpansion zu einer weiteren Verschlechterung der LV-Funktion. Die Percutanene Transluminale Coronare Angioplastie (PTCA) mit dem Ziel der Wiederherstellung oder Verbesserung des koronaren Blutflusses stellt bei anhaltender Myokardischämie einen kausalen Therapieansatz dar. Erstmals 1977 von Andreas Grüntzig durchgeführt ist die PTCA inzwischen mit 1 Million Eingriffen pro Jahr in den USA das bevorzugte Revaskularisationsverfahren. Trotz deutlicher Verbesserungen in der Stent-Technologie bleibt die In-Stent-Restenose oder gar der subakute Stentverschluss ein wichtiges klinisches Problem. In der Literatur werden verschiedene Ursachen der In-Stent-Restenose von unbeschichteten Stent diskutiert. Die extensive neointimale Proliferation, ein Prozess, der sich aus der Proliferation von glatten

Gefäßmuskelzellen und der Synthese von extrazellulärer Matrix zusammensetzt, scheint hierbei im Vordergrund zu stehen. Da in einer Reihe von früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bei der In-Stent-Restenose eine wichtige Rolle spielt, haben wir die Bedeutung des RAAS bei einer Gruppe von Hochrisiko-Patienten untersucht, die wiederholt In-Stent-Restenosen gezeigt haben. Ziel war es einen genetischen Prädiktor zu identifizieren, der mit einer wiederholten In-Stent-Restenose korreliert. Die Genotypen der untersuchten Polymorphismen von Genen des RAAS unterschieden sich bei Hochrisiko-Patienten mit wiederholten In-Stent-Restenosen nicht signifikant von Patienten mit einmaliger In-Stent-Restenose. Obgleich in tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Angiotensin II bei der Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen in restenotischen Läsionen eine wichtige Rolle spielt, scheint der Prozess der wiederholten Restenose hiervon unbeeinflusst zu bleiben. Insbesondere scheinen höhere Serumspiegel von Angiotensin II, die bei Patienten mit dem ACE D/D-Polymorphismus vorliegen, keinen zusätzlichen Risikofaktor darzustellen. Die Genchip-Untersuchung restenotischer Gefäßareale könnte bei der Identifikation bedeutender Prädiktoren bei Hochrisiko-Patienten von grosser Bedeutung sein.

Ein weiteres wichtiges Problem der modernen Stenttechnologie stellen nach wie vor die Stent-Thrombosen dar. Die Verbesserung der Stenttechnologie mit Aufkommen neuerer innovativer Stents sowie die konsequente Anwendung der doppelten Plättchenaggregationshemmung führten zu einem Rückgang der In-Stent-Thrombosen auf unter 2%. Dennoch belegen gerade neuere Studien mit beschichteten Stents, dass das Problem der In-Stent-Thrombosen weiterhin ein grosses klinisches Problem darstellt.

Die Koronare Herzkrankheit und maligne Erkrankungen stellen aufgrund der hohen Co-Inzidenz beider Erkrankungen in unserer Gesellschaft eine häufige Co-Morbidität dar. In einigen kleineren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Malignome eine thrombophile Situation verursachen können. Patienten mit begleitender Tumorerkrankung nach Stenting sind daher besonders vulnerabel für Stent-Thrombosen. Die Pathogenese der Hyperkoagulabilität bei Tumor-Patienten ist vielschichtig. Einen relevanten Faktor stellt die Aktivierung des hämostasiologischen System durch Tumorzellen selbst dar. In einer retrospektiven Untersuchung von mehr als 7000 Patienten nach koronarem Stenting haben wir daher die Hypothese getestet, ob Patienten mit begleitender Tumorerkrankung im Vergleich zu Patienten ohne begleitende Tumorerkrankung, ein erhöhtes Risiko für In-Stent-Thrombosen haben. Die Analyse ergab, dass Krebs-Patienten ein mehr als 7-fach erhöhtes Risiko für Stent-Thrombosen haben als Patienten ohne begleitender maligner Erkrankung. Beim Vergleich der gestenteten Gefässe, der verwendeten Stentdiameter und der Stentlänge gab es zwischen den Gruppen keine Unterschiede. In der vorliegenden Untersuchung wurden ausschliesslich unbeschichtete Stents berücksichtigt. Neben der bekannten vorliegenden Hyperkoaguabilität bei Tumor-Patienten kommt den endothelverletzenden Chemotherapien eine bedeutende Rolle zu. Die Ergebnisse unserer Studie sind von grosser klinischer Bedeutung, da sie eine optimale plättchenaggregationshemmende Therapie, möglicherweise in Kombination mit einer zusätzlichen niedermolekularen Heparintherapie, nahelegen.

Bei den nicht-ischämischen Ursachen der Herzinsuffizienz standen in den letzten Jahren die Identifikation neuer genetischer Ursachen für die dilatative

Kardiomyopathie (DCM) und die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) im Fokus unserer Untersuchungen. Im Gegensatz zur DCM, die durch eine systolische Dysfunktion gekennzeichnet ist, ist die HCM in aller Regel durch eine diastolische Dysfunktion charakterisiert.

Mit der Herstellung einer erbB2-defizienten Mauslinie ist es uns gelungen, in einem translationalen Ansatz ein Mausmodell für die trastuzumab-induzierte Herzinsuffizienz zu etablieren. Frauen mit einem metastasiertem Mammakarzinom weisen in ca. 20-30% der Fälle eine prognostisch ungünstige Überexpression von erbB2/HER2 im Tumorgenom auf. Die Anwendung des humanisierten Antikörpers gegen den erbB2/HER2-Rezeptors, Trastuzumab, führte bei bis zu 27% der Patientinnen zur Manifestation einer schweren Herzinsuffizienz. Zur Klärung der Frage, welche Bedeutung dem erbB2-Rezeptor für die Aufrechterhaltung der myokardialen Kontraktilität im adulten Säugtierherzen zukommt, haben wir den erbB2-Rezeptor in der Maus ausgeschaltet. Hierfür wurde in einer konditionellen Knockout-Technik der erbB2-Rezeptor in der Maus deletiert. Die adulten erbB2-defizienten Mäuse entwickelten im Alter von 2 Monaten eine schwere DCM mit einer hochgradig eingeschränkten systolischen Funktion. Da nach eigenen, bislang unpublizierten Daten, auch die Deletion des Liganden Neuregulin-1 zur Manifestation einer DCM führt, scheint ein funktionierendes Neuregulin-1/erbB2-Signalweg für die Herzfunktion in der adulten Maus von essentieller Bedeutung zu sein. Weitere eigene immunhistochemische Analysen suggerieren, dass erbB2 möglicherweise am Ca^{2+} -Stoffwechsel der Kardiomyozyten beteiligt ist. Die klinische Bedeutung des etablierten neuen Mausmodells liegt zum einen in der Möglichkeit den Pathomechanismus der kardialen Dysfunktion bei erbB2-Defizienz anhand weiterer Untersuchungen

(Calcium-Cycling) am Mausmodell aufzuklären und zum anderen in der Möglichkeit präventive pharmakologische Studien, wie beispielsweise den frühzeitigen Einsatz von AT1-Antagonisten, durchzuführen.

Eine Reihe von DCM-Patienten zeigen neben der kardialen Dysfunktion eine Mitbeteiligung von Skelettmuskeln. Im Gegensatz zur Duchenne'schen Dystrophie oder zur Dystrophie vom Typ Becker, konnte bei erbB2-defizienten Mäusen bislang keine Myopathie oder Skelettmuskeldystrophie aufgezeigt werden. Es stellte sich für uns die Frage, ob andere Muskeldystrophien, insbesondere die Gliedergürteldystrophie Typ 2B, eine kardiale Mitbeteiligung zeigen. Ursächlich für diese Erkrankung ist eine Mutation im Dysferlin-Gen, die auch für die Miyoshi-Muskeldystrophie verantwortlich ist. Bei 2 Patienten mit einer Gliedergürteldystrophie Typ 2B konnten wir erstmals eine kardiale Beteiligung in Form einer DCM nachweisen. Andere Ursachen der DCM konnten ausgeschlossen werden. In Myokardbiopsien konnten die DCM-typischen Merkmale gesehen werden. Dysferlin ist ein sarkolemmales Protein, das an Reparaturvorgängen an der Muskelmembran essentiell beteiligt ist. Bei Schädigung kommt es in der gesunden Zelle zur einer sarkolemmalen Anreicherung von Dysferlin mit nachfolgender Ca²⁺-abhängiger Wiederherstellung der Membranintegrität. Imm histochemisch konnten wir bei einem Patienten mit Dysferlin-Mutation als mögliche Ursache der DCM eine Translokation von Dysferlin in das Zytosol der Kardiomyozyten nachweisen. Die Dysferlin-Dislokation legt die Vermutung nahe, dass Schädigungen der Kardiomyozyten-Zellmembran infolge von Stresssituationen nicht angemessen repariert werden können. Mit Hilfe von 2 natürlich vorkommenden Dysferlin-defizienten Mauslinien konnte diese Hypothese untermauert werden. In einem Versuch bei dem die Regenerationskapazität Dysferlin-mutanter Mäuse durch

wiederholte subcutane Isoproteronol-Injektionen getestet wurde, zeigten die Dysferlin-mutanten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine deutlich erhöhte Zellmembranpermeabilität infolge der Schädigung, eine deutliche Zunahme der myokardialen Fibrose sowie ein insgesamt schlechteres Remodeling. Die von uns erhobenen Daten zeigen, dass kardialer Stress bei gleichzeitiger Dysferlin-Defizienz zur Manifestation einer DCM führen kann. Der Nachweis einer milden kardialen Dysfunktion bei Dysferlin-defizienten Mäusen im Basalzustand und eine deutliche Progression der DCM nach Belastung (Isoproteronol-Test) zeigen, dass sich die Dysferlin-mutanten Mäuse für präventive pharmakologisch Therapiestudien eignen und die Ergebnisse unter Umständen auf Patienten mit Gliedergürteldystrophie 2 B übertragen werden können.

Das klinische Bild der Herzinsuffizienz bei der HCM ist geprägt durch eine primäre diastolische Dysfunktion. Mit einer Prävalenz von 1:500 in der Bevölkerung ist die HCM die häufigste genetische Kardiomyopathie. Genetische Untersuchungen in Familien führten zur Identifikation von 12 HCM-Genen und weit mehr als 400 Mutationen. Da die bislang charakterisierten HCM-Gene für sarkomere Proteine enkodieren, vermutete man, dass es sich bei der HCM um eine Erkrankung des Sarkomers handelt. Mit der Entdeckung des MLP/CSRP3-Gen als neuem HCM-Gen durch unsere Arbeitsgruppe, konnten wir zeigen, dass auch primär nicht-sarkomere Proteine zur HCM führen können. Eigene immunhistochemische Untersuchungen belegten, dass MLP primär im Zytosol und nicht im Sarkomer von Kardiomyozyten vorkommt.

In einer grossen Familie mit 54 Angehörigen konnten wir eine Mutation im MLP-Gen als ursächliche Mutation der HCM identifizieren (LOD-Score 5.9). Die Myokardbiopsie eines betroffenen Patienten zeigte die HCM-typischen Veränderungen, so dass sich diese HCM-Form nicht von anderen bekannten

Formen unterschied. MLP ist an einer Reihe von biologischen Vorgängen wie Zelldifferenzierung und Zellwachstum beteiligt. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass MLP durch die Interaktion mit Telethonin und Titin zusätzlich eine Stretch-Sensor-Funktion zukommt. Hierbei scheint die BNP-Induktion ein Schlüsselereignis darzustellen. So ist bekannt, dass MLP-defiziente Kardiomyozyten, die gedehnt werden, unfähig sind BNP zu induzieren. Weitere eigene Untersuchungen am Biopsiematerial eines betroffenen HCM-Patienten mit einer MLP-Mutation ergaben, dass die Stabilität des mutierten MLP-Proteins deutlich reduziert war.

Diese neuen funktionellen Daten belegen, dass die HCM möglicherweise auf eine Störung des Stress-Sensings zurückzuführen ist und dass eine Störung des Stress-Sensings bei Patienten mit aberrantem MLP-Protein vielmehr über die verminderte BNP-Induktion des instabilen Proteins als durch die Mutation selbst zustande kommt.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden genetische Prädiktoren einer In-Stent-Restenose bei Hochrisiko-Patienten mit wiederholter In-Stent-Restenose untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen des RAAS nicht mit einer höheren Inzidenz der Restenose assoziiert sind.

Als weitere wesentliche Komplikation nach koronarem Stenting evaluierten wir die In-Stent-Thrombosehäufigkeit bei KHK-Patienten mit begleitender Tumorerkrankung, die sich einem Stenting mit unbeschichteten Stents unterzogen. Wir konnten ein mehr als 7-fach höheres Risiko für die In-Stent-Thrombose bei Tumorpatienten nachweisen. In-Stent-Restenosen und In-Stentthrombosen können über chronische Myokardischämie und ungünstigem Remodeling zur systolischen Herzinsuffizienz führen. Eine weitere Ursache der systolischen, primär nicht-ischämischen Herzinsuffizienz ist die DCM. Bei Patienten mit einer Gliedergürteldystrophie Typ 2B, die eine Mutation im Gen Dysferlin tragen, konnten wir erstmals eine kardiale Mitbeteiligung nachweisen. In einem translationalen Ansatz haben wir mit Hilfe von tierexperimentellen Untersuchungen den möglichen Pathomechanismus der kardialen Dysfunktion aufklären können. Durch konditionale Deletion des erbB2-Rezeptors konnte ein weiteres neues DCM-Modell etabliert werden. Der genetische Ansatz, wie auch die klinisch bekannte kardiale Dysfunktion nach pharmakologischer erbB2-Inhibition (Trastuzumab) belegen die essentielle Bedeutung von erbB2 für die kardiale Funktion im adulten Herzen. Im Gegensatz zur DCM zeigen Patienten mit einer HCM meist eine erhaltene systolische Funktion, leiden jedoch unter der eingeschränkten diastolischen Compliance des verdickten Herzmuskels. Bei einer HCM-Familie konnten wir mit Hilfe von Kopplungsanalysen eine

Mutation im MLP/CSRP3 als ursächliches Gen der HCM identifizieren. MLP ist im Gegensatz zu den bislang bekannten HCM-Proteinen ein überwiegend im Zytosol lokalisiertes Protein, das am Stretching-Sensing der Kardiomyozyten beteiligt ist. Darüber hinaus erweitert es die bislang gültige Auffassung, wonach die HCM eine sarkomere Erkrankung ist.

5 Literaturverzeichnis

1. Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1251-64.
2. Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med* 2006;355:260-9.
3. Murray DM, Hannan PJ, Jacobs DR, et al. Assessing intervention effects in the Minnesota Heart Health Program. *Am J Epidemiol* 1994;139:91-103.
4. Peeters A, Mamun AA, Willekens F, Bonneux L. A cardiovascular life history. A life course analysis of the original Framingham Heart Study cohort. *Eur Heart J* 2002;23:458-66.
5. Dorner T, Rieder A. Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit und Bedeutung für die Prävention. *Journal für Kardiologie* 2005;12 (Suppl):13-15.
6. Weintraub WS. The pathophysiology and burden of restenosis. *Am J Cardiol* 2007;100:3K-9K.
7. Nikol S, Huehns TY, Hofling B. Molecular biology and post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis* 1996;123:17-31.
8. Rajagopal V, Rockson SG. Coronary restenosis: a review of mechanisms and management. *Am J Med* 2003;115:547-53.
9. Langeveld B, Roks AJ, Tio RA, Voors AA, Zijlstra F, van Gilst WH. Renin-angiotensin system intervention to prevent in-stent restenosis: an unclosed chapter. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:88-98.
10. Hafizi S, Chester AH, Allen SP, Morgan K, Yacoub MH. Growth response of human coronary smooth muscle cells to angiotensin II and influence of angiotensin AT1 receptor blockade. *Coron Artery Dis* 1998;9:167-75.
11. Wagenaar LJ, van Boven AJ, van der Wal AC, et al. Differential localisation of the renin-angiotensin system in de-novo lesions and in-stent restenotic lesions in in-vivo human coronary arteries. *Cardiovasc Res* 2003;59:980-7.
12. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992;51:197-205.
13. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:1433.
14. Koch W, Mehilli J, von Beckerath N, Bottiger C, Schomig A, Kastrati A. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors and restenosis after coronary artery stenting in patients with the DD genotype of the ACE gene. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1957-61.
15. Cutlip DE, Baim DS, Ho KK, et al. Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials. *Circulation* 2001;103:1967-71.
16. Gross CM, Posch MG, Geier C, et al. Subacute coronary stent thrombosis in cancer patients. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1232-3.
17. Falanga A. Thrombophilia in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2005;31:104-10.
18. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113:1807-16.
19. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med* 2001;7:548-52.
20. Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997;18:847-55.
21. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.
22. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, et al. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 1995;378:390-4.

23. Meyer D, Birchmeier C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 1995;378:386-90.
24. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995;378:394-8.
25. Geier C, Posch MG, Dietz R, Garratt AN, Ozcelik C. Molekulare Mechanismen der Kardiotoxizität von Tyrosinkinaseinhibitoren. *Der Kardiologe* 2007;1:209-16.
26. Woldeyesus MT, Britsch S, Riethmacher D, et al. Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* 1999;13:2538-48.
27. Crone SA, Zhao YY, Fan L, et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2002;8:459-65.
28. Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B, et al. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8880-5.
29. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
30. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
31. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:969-81.
32. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423:168-72.
33. Wenzel K, Geier C, Qadri F, et al. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med* 2007;85:1203-14.
34. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* 1995;92:785-9.
35. Frenneaux MP, Porter A, Caforio AL, Odawara H, Counihan PJ, McKenna WJ. Determinants of exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1521-6.
36. Maron BJ, Spirito P. Implications of left ventricular remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;81:1339-44.
37. Richard P, Charron P, Carrier L, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-32.
38. Knoll R, Hoshijima M, Chien K. Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *J Mol Med* 2003;81:750-6.
39. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002;111:943-55.
40. Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr., et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997;88:393-403.
41. Geier C, Gehmlich K, Ehler E, et al. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2008.
42. Geier C, Perrot A, Ozcelik C, et al. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;107:1390-5.

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,
- 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