

Aus dem  
Charité Centrum für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin  
Klinik für Kardiologie und Pulmologie  
Direktor: Professor Dr. Heinz-Peter Schultheiss

## Habilitationsschrift

# **Die intramyokardiale Inflammation als Ursache für Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Dirk Westermann  
Geboren am 01.02.1977 in Bremen

Eingereicht: April 2011

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Heusch

2. Gutachter: Prof. Dr. Ertel

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abkürzungen: .....  | 3  |
| Einleitung:.....  | 4  |
| Diagnose der HINEF .....  | 5  |
| Pathophysiologie der HINEF .....  | 5  |
| Kardiale extrazelluläre Matrix .....  | 6  |
| Kardiale Inflammation bei Herzinsuffizienz.....   | 7  |
| Fragestellung und Zielsetzung.....  | 8  |
| Ergebnisse (Eigene Arbeiten).....   | 9  |
| 1. Kardiale Inflammation und Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen bei<br>diabetischer Kardiomyopathie: Rolle der AT1 Rezeptor Antagonisten ..... | 9  |
| 2. Kardioprotektive und anti-inflammatorische Effekte eines Interleukin Converting<br>Enzym Inhibitors auf die diabetische Kardiomyopathie. ....      | 10 |
| 3. Die Rolle der LV Steifigkeit bei Patienten mit HINEF .....   | 11 |
| 4. Pharmakologische Aktivierung der endothelialen NO Synthase .....   | 12 |
| 5. Kardiale Inflammation führt zur Veränderung in der extrazellulären Matrix bei<br>Patienten mit HINEF .....   | 13 |
| Diskussion .....  | 14 |
| Zusammenfassung .....   | 19 |
| Literaturangaben .....  | 20 |
| Danksagung .....  | 26 |
| Eidesstattliche Erklärung .....   | 27 |

**Abkürzungen:**

|           |  |
|-----------|--|
| EF        | Ejektionsfraktion                                  |
| ESC       | European Society of Cardiology                     |
| EZM       | Extrazelluläre Matrix                              |
| HINEF     | Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion    |
| HIREF     | Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion |
| IL-1-beta | Interleukin-1-beta                                 |
| MMP       | Matrix Metalloproteinasen                          |
| TGF-beta  | Transforming Growth Faktor-beta                    |
| TNF-alpha | Tumor Nekrose Faktor-alpha                         |
| VCAM      | Vaskuläres Adhäsionsmolekül                        |

## Einleitung:

Etwa 50% aller Patienten mit den Symptomen einer Herzinsuffizienz haben eine normale linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF).<sup>1</sup> Diese Erkrankung nennt man daher Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion (HINEF) im Gegensatz zu Patienten mit Herzinsuffizienz und reduzierter EF (HIREF). Die Mortalität der Patienten mit HINEF ist ähnlich eingeschränkt wie bei Patienten mit HIREF und verglichen mit der erwarteten Sterblichkeit von etwa 2-3% in einem gleichalten Kontrollkollektiv ohne Herzinsuffizienz mit 16-22% bei beiden Erkrankungen sehr hoch.<sup>2</sup> Damit stellt die Herzinsuffizienz generell die kardiovaskuläre Erkrankung mit der höchsten Todesrate dar.

Die Zahl der Patienten mit HINEF steigt verglichen zu denen mit HIREF jährlich um etwa 1% an und man geht daher davon aus, dass die HINEF im nächsten Jahrzehnt die häufigste Manifestationsart der Herzinsuffizienz darstellen wird.<sup>3</sup> Auch die Morbidität ist bei Patienten mit HINEF ähnlich hoch wie bei Patienten mit HIREF, was durch eine 1-Jahres Hospitalisierungsrate von etwa 50% bei beiden Formen augenscheinlich wird.<sup>4</sup>

Die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz generell erscheint gut belegt und durch viele klinische Studien validiert zu sein. Interessanterweise beziehen sich aber fast alle großen klinischen Herzinsuffizienzstudien nur auf Patienten mit HIREF. HINEF galt lange als Ausschlusskriterium in den großen Studien zur Herzinsuffizienz, da die Prävalenz der Erkrankung und ihr schlechte Prognose lange Zeit unterschätzt wurden und so zu einem Ausschluss aus den großen doppelblind randomisierten klinischen Studien führte. Die medikamentöse Therapie der HIREF hat in den letzten Jahrzehnten zu einer Verbesserung der 5-Jahres Überlebenschancen geführt. Im Gegensatz dazu hat die momentane medikamentöse Therapie bei Patienten mit HINEF nicht zu einer Verbesserung der Überlebenschancen geführt, so dass im Umkehrschluss die Hälfte aller Patienten mit Herzinsuffizienz nicht mit einer Evidenz basierten und wirksamen Therapie behandelt werden können.<sup>2</sup>

Dieses fehlende Ansprechen auf aktuelle Therapeutika und das Fehlen von Alternativen wird u.a. auch durch unser noch geringes Verständnis der Pathophysiologie der HINEF erklärt. Im Gegensatz zu der HIREF ist die genaue Genese der HINEF unklar. Aus klinischen Daten weiß man allerdings, dass neben

dem Lebensalter auch das weibliche Geschlecht als Risikofaktor für die HINEF gilt. Zusätzlich sind die Erkrankungen arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Adipositas und damit das metabolische Syndrom wegweisend für die HINEF und sind hier wesentlich häufiger als in einem Kontrollkollektiv ohne Herzinsuffizienz.<sup>5-8</sup> Neben diesen häufigen prädisponierenden Erkrankungen gibt es auch seltenere Erkrankungen, die zur HINEF führen können. So kann zum Beispiel die akute virale Myokarditis nach der Ausheilung der akuten Inflammation auch zu einer chronischen Herzinsuffizienz im Sinne einer HINEF führen.<sup>9</sup>

### **Diagnose der HINEF**

Die Kriterien der Diagnosestellung der HINEF sind trotz der Häufigkeit der Erkrankung lange umstritten gewesen. Erst kürzlich sind durch eine Empfehlung der „European Society for Cardiology“ (ESC) die Diagnosekriterien genauer definiert worden und gelten heute vor allem im europäischen Raum als Richtlinien.<sup>1</sup> Dabei sind 3 Punkte als wesentlich erachtet worden:

1. Vorliegen von Zeichen und/oder Symptomen der Herzinsuffizienz.
2. Eine normale oder allenfalls gering eingeschränkte LV-Funktion (EF über 50%) mit normalen kardialen Dimensionen (LV enddiastolischer Volumenindex unter 97 ml/m<sup>2</sup>)
3. Vorhandensein einer diastolischen Füllungsstörung (invasiv oder nichtinvasiv dokumentiert)

### **Pathophysiologie der HINEF**

Die diastolische Dysfunktion ist eines der Hauptmerkmale der HINEF.<sup>10,11</sup> Dabei geht man davon aus, dass eine Verlangsamung der aktiven Relaxation einerseits und eine erhöhte passive Steifigkeit andererseits das Füllungsverhalten des linken Ventrikels beeinträchtigt.<sup>12,13</sup> Ersteres wird vor allem auch durch Veränderungen des Kalzium-Stoffwechsels verursacht.<sup>14</sup> Eine Unterschiedliche Phosphorylierung des Proteins Titin, das im Herzen wie eine Feder wirkt, ist dagegen vor allem mit Veränderungen der passiven Steifigkeit beschrieben worden. Ein weiterer wesentlicher Modulator der passiven Steifigkeit ist die Akkumulation und Veränderung der extrazellulären Matrix.<sup>15</sup>

Zudem werden auch nicht diastolische Funktionseinschränkungen als Ursache für die HINEF diskutiert. Vor allem die chronotrope Inkompetenz scheint bei Patienten mit HINEF eine Rolle zu spielen und limitiert die kardiale Leistungsfähigkeit und führt so zu den Symptomen der Herzinsuffizienz.<sup>16,17</sup> Aktuelle Studien zeigen auch, dass bei Patienten mit HINEF eine endotheliale Dysfunktion nachzuweisen ist und das ventrikulär-arterielle *Coupling* verschlechtert ist.

Insgesamt kommt es durch diese Veränderungen zu einer deutlichen Limitation der Leistungsfähigkeit der HINEF Patienten bei schon geringer Belastung (20 Watt) verglichen mit Patienten ohne HINEF aber ähnlichen Nebenerkrankungen wie arterielle Hypertonie und Adipositas.<sup>18</sup>

### **Kardiale extrazelluläre Matrix**

Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus fibrillären und nicht-fibrillären Proteinen, die vor allem von Fibroblasten sezerniert werden und unterschiedlichen Aufgaben dienen.<sup>19</sup> Während z.B. in Knochen und Sehnen die EZM im Vergleich zu den jeweiligen Zellen deutlich mehr Raum einnimmt und die extrazelluläre Architektur dominiert, nimmt die EZM unter physiologischen Bedingungen im Herzen einen deutlich geringeren Raum ein. Dennoch ist die kardiale EZM für die strukturelle Integrität des Herzens von entscheidender Bedeutung und beeinflusst wesentlich Form und Funktion des Herzens.<sup>20-23</sup> Diese strukturelle Integrität ist hauptsächlich von den fibrillären Makromolekülen wie z.B. Kollagenfasern vom Typ I und III abhängig. Wir wissen aber, dass auch Veränderungen an den nicht-fibrillären Proteinen, z.B. an Proteoglykanen die u.a. für die Vernetzung von fibrillären Proteinen wesentlich sind, die Integrität der Matrix verändern können.<sup>24</sup> Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es zu einer Akkumulation der fibrillären Proteine kommen, so dass sich die Eigenschaften der EZM wesentlich verändert können. Nach diesen pathologischen Stimuli wie z.B. einem akutem Herzinfarkt aber auch einer chronischen Herzinsuffizienz kommt es einerseits zu einer gesteigerten Produktion dieser Proteine durch Fibroblasten. Dieses zeigt sich auch durch den erhöhten Nachweis von Kollagenprodukten im Serum, welche daher auch als Biomarker des EZM Remodeling eingesetzt werden.<sup>25</sup> Andererseits geht man davon aus, dass das Abbausystem der EZM Proteine, das sogenannte Matrix Metalloproteinasen (MMPs) System unterschiedlich exprimiert und in geringerem

Maße aktiviert wird, so dass der Kollagengehalt im Herzen durch einen geringeren Abbau erhöht wird. Diese Akkumulation von Kollagenfasern vor allem des Typs I, welcher biochemisch eine ähnliche Steifigkeit wie Stahl aufweist, führt vor allem zu einer verschlechterten Dehnbarkeit der EZM. Zusätzlich erscheint eine erhöhte Quervernetzung der Kollagenfasern gerade bei Patienten mit Herzinsuffizienz verstärkt zu sein und so die kardiale Funktion zusätzlich vermindert zu sein.<sup>26</sup> Wesentlich für diese unterschiedliche Expression von Kollagenfasern und MMPs sind vor allem pathologisch aktivierte Fibroblasten, die zu sogenannten Myofibroblasten transdifferenzieren.<sup>27-29</sup> Warum diese Zellen transdifferenzieren ist bisher im Herzen nur ungenügend verstanden.

### **Kardiale Inflammation bei Herzinsuffizienz**

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass für die Progression der Herzinsuffizienz auch eine inflammatorische Komponente mitverantwortlich sein könnte.<sup>30</sup> Initial wurden erhöhte systemische Biomarker der Inflammation, wie z.B. der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF-alpha) mit einer Progression der Herzinsuffizienz assoziiert.<sup>31-33</sup> Im weiteren Verlauf zeigten verschiedene Tiermodelle, dass neben der systemischen auch kardiale Inflammation wesentlich für den Verlauf von Herzinsuffizienz sein könnte und anti-inflammatorische Strategien erfolgreich erscheinen.<sup>34-37</sup> So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte transendotheliale Migration von Monozyten in das Herz mit einer Veränderung der EZM und folgender Progression der Herzinsuffizienz assoziiert war.<sup>35-37</sup> Während die Genese der Inflammation bei einer viralen Myokarditis durch das Pathogen definiert ist, sind die Trigger für die kardiale Inflammation bei unterschiedlichen Formen der chronischen Herzinsuffizienz noch unverstanden. Hier könnten auch die Risikofaktoren für die Herzinsuffizienz wie Diabetes mellitus als auch Hypertonie eine Rolle spielen. Zusätzlich sind die genauen Zusammenhänge zwischen inflammatorischen Zellen und der Dysregulation der kardialen EZM weiter unklar. Einerseits geht man davon aus, dass proinflammatorische Zytokine die kardiale Funktion direkt durch eine Veränderung der Myozyten beeinflussen, andererseits können diese Zytokine auch den Umbau der EZM beeinflussen und so indirekt die Progression der Erkrankung vorantreiben.

Anti-inflammatorische klinische Studien, die den Effekt einer TNF-alpha Blockade bei Patienten mit Herzinsuffizienz untersuchten, zeigten allerdings bisher enttäuschende Ergebnisse.<sup>32</sup> Dennoch erscheinen moderne und gezieltere anti-inflammatorische Strategien als mögliche zukünftige Therapieoptionen, wie ein Statement der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie herausstellt.<sup>38</sup> So werden heute bereits antiinflammatorische Wirkstoffe, wie z.B. Antagonisten von Interleukin-1-beta in der Primärprävention getestet. Ob solche Therapien auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz sicher und wirksam sind, wird in Zukunft getestet werden müssen.

### **Fragestellung und Zielsetzung**

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Charaktisierung von Veränderungen der extrazellulären Matrix anhand experimenteller Tiermodelle im Sinne einer HINEF. Weiterhin wurden humane endomyokardiale Proben von Patienten mit HINEF untersucht. Dabei wird besonders die Einwirkung von kardialer Inflammation auf die Veränderung der Matrix berücksichtigt. Weiterhin werden die möglichen Auswirkungen dieser Veränderungen auf die diastolische Funktion erneut im experimentellen Tiermodell aber auch an Patienten untersucht.

Die folgenden Originalpublikationen bilden dabei eine kumulative Habilitationsschrift. Eine abschließende Zusammenfassung stellt den thematischen Zusammenhang der einzelnen Publikationen dar.

## Ergebnisse (Eigene Arbeiten)

### 1. Kardiale Inflammation und Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen bei diabetischer Kardiomyopathie: Rolle der AT1 Rezeptor Antagonisten

Originalarbeit:

Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes*. 2007;56:641-646.

Westermann, D\*., Rutschow, S\*., Jager, S., Linderer, A., Anker, S., Riad, A., Unger, T., Schultheiss, H.P., Pauschinger, M. Tschope, C.

Diabetes mellitus ist einer der Risikofaktoren für die HINEF. In dieser Arbeit wurde in einem Mausmodell eine diabetische Kardiomyopathie durch die Gabe von Streptozotocin induziert. Streptozotocin zerstört die Betazellen im Pankreas und führt so zu einer kontinuierlichen Hyperglykämie durch eine Hypoinsulinämie. Wir konnten zeigen, dass nach 8 Wochen diese hyperglykämische diabetische Stoffwechsellage zu einer Vermehrung der kardialen Fibrose führte. Dieses ging zusätzlich mit einer erhöhten Expression des pro-inflammatorischen Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) einher. Die Aktivität der Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), einer Gelatinase und damit auch für den Abbau von Kollagenbruchstücken zuständig, war reduziert. Zusammen mit einer erhöhten Expression des Tissue Growth Factor-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) führte das zu einer Akkumulation von Kollagen I und Kollagen III in den Herzen der diabetischen Tiere. Diese Veränderungen führten zu einer LV Funktionsstörung. Sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion waren eingeschränkt, wobei die Ejektionsfraktion nicht eingeschränkt war und keine kardiale Dilatation vorlag. Eine medikamentöse Therapie mit einem AT1 Rezeptor Antagonisten konnte in diesem experimentellen Modell sowohl die Expression von IL-1 $\beta$ , von TGF- $\beta$  und zusätzlich die MMP-2 Aktivität auf Kontrollniveau normalisieren. Dieses ging auch mit einer Reduktion der kardialen Kollagenakkumulation einher. Dadurch konnte die kardiale Dysfunktion, vor allem auch die LV Steifigkeit, reduziert werden. Diese Daten zeigen das Zusammenspiel von IL-1 $\beta$  und von TGF- $\beta$  im Hinblick auf die Entwicklung der kardialen Fibrose. Hier konnte eine pharmakologische Inhibition des Renin-Angiotensin Systems sowohl kardiale Inflammation als auch Fibrose reduzieren und so die LV Dysfunktion verbessern.

## **2. Kardioprotektive und anti-inflammatorische Effekte eines Interleukin Converting Enzym Inhibitors auf die diabetische Kardiomyopathie.**

Originalarbeit:

Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2007;56:1834-1841.

Westermann, D., Van Linthout, S., Dhayat, S., Dhayat, N., Escher, F., Bucker-Gartner, C., Spillmann, F., Noutsias, M., Riad, A., Schultheiss, H.P. Tschöpe, C.

In einem ähnlichen Modell der diabetischen Kardiomyopathie wurde erneut der Effekt von Inflammation auf das kardiale Remodeling untersucht. Hier konnten wir zeigen, dass neben IL-1 $\beta$  auch die pro-inflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-18 und Interferon-beta in der diabetischen Kardiomyopathie erhöht exprimiert werden. Zusätzlich waren in diesem Modell die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 erhöht exprimiert. Diese ging mit einer erhöhten Anzahl von inflammatorischen Zellen (Makrophagen und Leukozyten) im Myokard einher. Hier konnte auch gezeigt werden, dass inflammatorische Zellen vor allem auch für die Zytokinproduktion im Herzen verantwortlich sind. Weiterhin zeigte sich eine vermehrte kardiale Apoptose in den diabetischen Tieren. Wieder waren diese Veränderungen mit einer Vermehrung des kardialen Kollagen und einer folgenden kardialen Dysfunktion ohne Dilatation assoziiert. Durch die Gabe eines Interleukin Converting Enzyme Inhibitors konnte die Expression von IL-1 $\beta$  reduziert werden. Dieses war mit einer Reduktion der kardialen Inflammation (Inflammatorische Zellen und pro-inflammatorischen Zytokine) verbunden und gleichzeitig war das kardiale Remodeling mit nur noch geringer Kollagenakkumulation normalisiert. Durch diese Veränderung konnte auch die LV Funktion in den behandelten Tieren verbessert werden.

Diese Daten zeigen den Zusammenhang von inflammatorischen Zellen als wesentliche Quelle von Zytokinen und kardialem Remodeling in der diabetischen Kardiomyopathie auf. Eine Reduktion dieser inflammatorischen Zellen führte zu einer Verbesserung des kardialen Remodeling und damit zu einer Verringerung der LV Dysfunktion.

### **3. Die Rolle der LV Steifigkeit bei Patienten mit HINEF**

Originalarbeit:

Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. Circulation. 2008;117:2051-2060

Westermann, D., Kasner, M., Steendijk, P., Spillmann, F., Riad, A., Weitmann, K., Hoffmann, W., Poller, W., Pauschinger, M., Schultheiss, H.P. Tschope, C.

In dieser Arbeit konnten wir erstmals die LV Funktion bei Patienten mit HINEF invasiv durch Messung mit Druck-Volumen Kurven bestimmen. Bisher gab es keine Arbeit die diese Technik an einem größeren Patientenkollektiv angewendet hatte, um die hämodynamische Situation bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu untersuchen. Generell gingen Arbeiten, die nicht invasive oder semi-invasive Techniken nutzen von einer Erhöhung der LV Steifigkeit aus. Wir konnten zeigen, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz und normaler EF verglichen mit Kontroll-Patienten ohne Herzinsuffizienz die diastolische Funktion gestört ist. Neben den Parametern der diastolischen Funktion, die abhängig vom Volumenstatus der Patienten sind (LV enddiastolischer Druck und die diastolische Relaxation) war vor allem auch die invasiv gemessene LV Steifigkeit erhöht. Zur Messung der Steifigkeit kam erstmals an diesem Patientenkollektiv eine Technik zum Einsatz, die mehrere Druck-Volumen Kurven während einer Last -Reduktion durch das Aufblasen eines Ballonkatheters in der Vena cava untersucht und so die LV Steifigkeit direkt aufzeichnet. Andere Untersuchungen, vor allem echokardiographische, können diese Steifigkeit nur indirekt abschätzen. Weiter waren die systolischen Parameter, die wir durch die Messung der Druck-Volumen Kurven analysierten, zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Steifigkeit beeinflusste auch das Verhalten bei einer Tachykardie, die durch einen atrialen Pacemaker ausgeöst wurde. So senkte sich bei diesen Patienten das Schlagvolumen ab und es kam nicht zu einem Herzfrequenz bedingten Anstieg der kardialen Auswurfleistung. Dieser hämodynamische Phänotyp könnte ein wesentlicher Grund für die Belastungsintoleranz der Patienten mit HINEF sein.

#### 4. Pharmakologische Aktivierung der endothelialen NO Synthase

Originalarbeit:

Enhancement of the endothelial NO synthase attenuates experimental diastolic heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2009;104:499-509.

Westermann, D., Riad, A., Richter, U., Jager, S., Savvatis, K., Schuchardt, M., Bergmann, N., Tolle, M., Nagorsen, D., Gotthardt, M., Schultheiss, H.P. Tschope, C.

In einem weiteren Tiermodell untersuchten wir den Einfluss der NO Synthase auf die Entwicklung der HINEF. Im Gegensatz zu den diabetischen Tiermodellen der vorhergegangenen Studien nutzten wir hier ein Modell der Hypertonie bedingten Herzinsuffizienz. Wir untersuchten die Ratten mit einem salzbedingten Hypertonus zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine LV Dilatation nachzuweisen war. Auch dieses Modell zeigte eine diastolische Dysfunktion ohne LV Dilatation bei hypernormaler systolischen Funktion. Diese Tiere zeigten ebenfalls Veränderungen im kardialen Remodeling mit erhöhter kardialer Fibrose als auch Hypertrophie der Kardiomyozyten. Neben Veränderungen in denen mit Hypertrophie und Remodeling assoziierten intrazellulären Kinasen wie Calcineurin, AKT und ERK1/2 waren hier interessanterweise keine Veränderungen in den unterschiedlich steifen Isoformen des Titins aufzuzeigen, obwohl dieses von anderen Gruppen beobachtet wurde. Eine pharmakologische Behandlung mit AVE3085 führte zu einer Aktivierung der endothelialen NO Synthase und dadurch zu einer Verbesserung der kardialen Hypertrophie und des kardialen Remodeling. So könnte eine Aktivierung der bei HINEF supprimierten endothelialen NO Synthase eine Therapieoption für HINEF sein. Interessanterweise konnten wir hier auch die Erhöhung des oxidativem Stress im Herzen in diesem Modell der HINEF zeigen. Eine Therapie war auch hier mit einer Normalisierung assoziiert. Die Verbesserung der Hypertrophie, des kardialen Remodeling und des oxidativen Stress durch die Aktivierung der endothelialen NO Synthase führte zu einer Verbesserung der LV diastolischen Funktion und der Steifigkeit ohne dass die Blutdruckwerte in diesem Modell der salzbedingten Hypertonie verändert gewesen wären. Zukünftige Studien werden zeigen, ob diese Therapieoption auch für Patienten mit HINEF in Frage kommt.

## 5. Kardiale Inflammation führt zur Veränderung in der extrazellulären Matrix bei Patienten mit HINEF

Originalarbeit:

Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail.* 2011;4:44-52.

Westermann, D., Lindner, D., Kasner, M., Zietsch, C., Savvatis, K., Escher, F., von Schlippenbach, J., Skurk, C., Steendijk, P., Riad, A., Poller, W., Schultheiss, H.P. Tschope, C.

In dieser Arbeit zeigen wir nun, dass analog zu den Tiermodellen auch bei Patienten mit HINEF der Anteil des kardialen Kollagens in endomyokardialen Biopsien verglichen zu Kontrollpatienten erhöht ist. Zusätzlich war die kardiale Kollagenase (Matrixmetalloproteinase-1, MMP-1) in den Biopsien von Patienten mit HINEF verringert exprimiert. Dabei korrelierte das Ausmaß der diastolischen Funktionsstörung (erneut durch Druck-Volumen Kurven gemessen) signifikant mit dem Anteil von kardialem Kollagen, so dass diese Akkumulation von Proteinen der EZM ein wichtiger Faktor in dieser Erkrankung sein könnte. Weiterhin zeigten wir, dass in den Biopsien von HINEF Patienten signifikant mehr inflammatorische Zellen vorhanden waren. Wir konnten zeigen, dass diese inflammatorischen Zellen den profibrotischen Wachstumsfaktor TGF-beta ausschütteten. Für weitere *in vitro* Untersuchungen nutzten wir erstmals ein neu etabliertes Zellkultursystem, in dem wir humane kardiale Fibroblasten aus endomyokardialen Biopsien kultivierten. Diese Fibroblasten wurden jetzt *in vitro* mit TGF-beta stimuliert. Durch diese Stimulation wurden normale Fibroblasten zu sogenannten Myofibroblasten transdifferenziert. Wir konnten zeigen, dass diese Transdifferenzierung vor allem mit einer pathologischen Expression von alpha-smooth muscle-Aktin einhergeht. Diese pathologisch aktivierten Myofibroblasten produzierten u.a. vermehrt Kollagen und weniger MMP-1, so dass wir *in vitro* die *in vivo* an den Biopsien gewonnenen Daten bestätigen konnten. So konnten wir erstmals zeigen, dass bei Patienten mit HINEF kardiale Inflammation vorhanden ist und diese inflammatorischen Zellen im Herzen über parakrine Mechanismen die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten fördern. Damit könnten anti-inflammatorische Therapien für diese Patienten, die bisher nicht Evidenz-basiert therapiert werden können, eine neue mögliche Option sein.

## Diskussion

Die Herzinsuffizienz mit normaler EF ist eine wesentliche Problematik im klinischen Alltag und ihre Pathogenese ist noch nicht gänzlich geklärt. In der vorgelegten kumulativen Habilitationsschrift wird anhand fünf ausgewählten Publikationen eine pathophysiologische Verbindung zwischen kardialen Remodeling im Sinne einer Akkumulation von Kollagen und der Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion mit einer Erhöhung der LV Steifigkeit diskutiert. Im Weiteren wird die kardiale Inflammation als ein Auslöser der Veränderung des kardialen Remodeling bei diesem Krankheitsbild diskutiert.

Alle hier vorgestellten Arbeiten beschäftigen sich mit der Herzinsuffizienz mit normaler EF. Sowohl die experimentellen Arbeiten, die das kardiale Remodeling anhand der diabetischen Kardiomyopathie als auch anhand der hypertensiven Kardiomyopathie untersuchen, zeigen, dass eine Veränderung der EZM mit einer Verschlechterung der LV Funktion einhergeht. Dabei führt vor allem eine Akkumulation von Kollagen Typ I zu einer Veränderung der diastolischen Funktion. Alle Arbeiten nutzen die Methode der Druck-Volumen Kurven zur Analyse der hämodynamischen Funktion. Hier kommt vor allem der invasiven Messung der LV Steifigkeit die Hauptbedeutung zu. Diese Messung untersucht anhand mehrerer LV Druck-Volumen Kurven, die während einer Reduktion der Vorlast aufgezeichnet werden, die Dehnbarkeit des LV, so dass sich aus diesen invasiv gemessenen Daten die tatsächliche Steifigkeit des LV errechnen lässt. Diese Methode ist auch in den beiden letzten Arbeiten an Patienten mit HINEF genutzt worden. Hier konnte ebenfalls die erhöhte LV Steifigkeit als wesentliche Pathologie der Patienten mit HINEF herausgearbeitet werden und so der hämodynamische Phänotyp der HINEF beschrieben werden. Interessanterweise korreliert dabei das Ausmaß der Kollagenakkumulation, untersucht an endomyokardialen Biopsien von Patienten mit HINEF oder im kardialen Gewebe der Tiermodelle direkt mit der invasiv gemessenen LV Steifigkeit. So kann geschlussfolgert werden, dass das kardiale Remodeling wichtig für die Genese der HINEF ist. In weiteren Arbeit konnten wir zeigen, dass der echokardiographische Parameter  $E/E'$  (ein Ratio aus konventionellem Mitraleinfluss und der Geweberelaxation gemessen im Gewebedoppler) mit der invasiv gemessenen Steifigkeit korreliert<sup>39</sup>. Auch hier war das Ausmaß der Fibrose mit dem

echokardiographische Parameter  $E/E'$  als nicht invasiv gemessener Steifigkeit korreliert.<sup>40</sup> Die invasiven Messungen an Patienten mit HINEF tragen also zum besseren Verständnis der Pathophysiologie einerseits aber auch zur Validierung von anderen Messmethoden, die weniger invasiv und daher leichter durchzuführen sind, bei.

Andere Arbeiten zeigen an Patienten mit HINEF auch Einschränkungen in der systolischen Funktion, wobei vor allem spezielle Echokardiographie Messungen, wie das „*Speckle Tracking*“ verwendet wurden.<sup>41,42</sup> In der hier vorgestellten invasiven hämodynamischen Messung konnte keine Einschränkung der systolischen LV Funktion nachgewiesen werden. Erklärend für diese Unterschiede könnte auch das relativ junge Alter des untersuchten Patientenkollektivs sein. Insgesamt ist eine systolische Funktionsveränderung bei Patienten mit HFNEF nicht unwahrscheinlich; wesentlich ist aber, dass insgesamt die Pumpfunktion nicht deutlich eingeschränkt ist.

Die bisher vorhanden Tiermodelle und auch hier genutzten Modelle für HINEF sind nicht optimal. In dem Modell der diabetischen Kardiomyopathie handelt es sich am ehesten um einen Diabetes mellitus vom Typ I, der in der HINEF Bevölkerung deutlich seltener ist als Diabetes mellitus Typ II, der als einer der wesentlichen Risikofaktoren gilt. Es kommt in diesem Tiermodell aber auch durch die starke Dehydration der Tiere zu einem geringen Abfall der systolischen Funktion, wobei allerdings die EF im Tiermodell nicht eingeschränkt wird. Dieses ist im Einklang mit den Leitlinien, wo eine normale systolische Funktion oder nur geringe Einschränkung der systolischen Funktion für die Diagnose der HINEF gefordert wird. Auch das Modell der Salz-sensitiven Ratten, die eine arterielle Hypertonie entwickeln ist nicht optimal. Man weiß, dass dieses Tiermodell im Verlauf nach einer HINEF eine HIREF entwickelt. Diese Transition von HINEF zu HIREF kommt bei Patienten nur selten vor. Rame et al zeigten, dass eine solche Transition fast ausschließlich durch das Neuauftreten eines Myokardinfarktes bedingt war. Bei Patienten mit HINEF ohne ischämisches Ereignis kam es im Verlauf nur sehr selten (14%) zu einer Einschränkung der EF.<sup>43</sup> Longitudinale Langzeitstudien an großen Kollektiven mit HINEF stehen aber bisher noch aus. Die gewählten Tiermodelle sind also nicht ideal, aber durch die hier aufgezeigten Gemeinsamkeiten in der Hämodynamik, vor allem der normalen EF und der erhöhten LV Steifigkeit, eine Möglichkeit die

Pathophysiologie der HINEF zu untersuchen. Alle anderen verfügbaren Modelle der HINEF haben ebenfalls deutliche Limitationen, so dass heute vor allem auch an der Entwicklung von besseren Tiermodellen geforscht wird. Wie bei allen tierexperimentellen Studien müssen die Ergebnisse natürlich erst auf ihre Übertragbarkeit auf den Patienten geprüft werden. Wir nutzten dafür die Hämodynamik und die endomyokardialen Proben von Patienten mit HINEF.

In den tierexperimentellen Arbeiten konnten wir zeigen, dass das Ausmaß kardialer Inflammation, gemessen an der Anzahl der in das kardiale Gewebe infiltrierten inflammatorischen Zellen mit dem kardialen Remodeling assoziiert war. In allen hier vorgestellten Arbeiten zeigte sich, dass eine Reduktion der kardialen Inflammation auch zu einer Verringerung der Fibrose führte. Dieses war immer auch mit einer Verbesserung der hämodynamischen Situation verbunden. Die transendotheliale Migration von inflammatorischen Zellen in das kardiale Gewebe könnte somit ein wesentlicher Punkt in der Genese der HINEF im Sinne des kardialen Remodeling sein. Hier konnten wir zeigen, dass die endothelialen Adhäsionsmoleküle (vor allem VCAM-1) in den Tiermodellen der diabetischen Kardiomyopathie hochreguliert waren. Dieses konnten wir erstmals auch bei Patienten mit HINEF zeigen, wo sich ein ähnliches Bild an endomyokardialen Biopsien zeigte. Bisher ist der genaue Grund für diese Hochregulation, die ja auch der initiale Auslöser der Inflammation sein könnte, noch unklar. Es spricht allerdings einiges dafür, dass neben den spezifischen Risikofaktoren der HINEF (z.B. Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie) auch andere Mechanismen, die direkt mit der HINEF (erhöhte Steifigkeit und Wandstress) verbunden sind, hierfür verantwortlich sein könnten. Diese Problematik soll in zukünftigen Arbeiten aufgearbeitet werden. Inflammation ist nicht spezifisch für HINEF sondern kann auch bei anderen Formen der Herzinsuffizienz nachgewiesen werden. Ob die Genese für diese Inflammation unterschiedlich ist, muss ebenfalls in zukünftigen Studien untersucht werden.

In den Tiermodellen konnten wir weiterhin zeigen, dass die inflammatorischen Zellen im Myokard proinflammatorische Zytokine sowie Wachstumsfaktoren exprimierten. Andere experimentelle Arbeiten zeigen auf, dass diese proinflammatorischen Zytokine direkt und indirekt die LV Funktion beeinflussen können. Dabei kann z.B. die Kalzium-Homöostase in den Myozyten verändert werden und so direkt die Kontraktilität und Relaxation beeinflusst werden. Ob dieses auch für die HINEF gilt ist

bisher noch unklar. Anhand der letzten Arbeit zeigen wir einen weiteren Weg auf, in dem inflammatorische Zellen das kardiale Remodeling beeinflussen können. Analog zu den tierexperimentellen Arbeiten zeigen wir an endomyokardialen Biopsien von Patienten mit HINEF, dass die inflammatorischen Monozyten im kardialen Gewebe u.a. TGF-beta exprimierten. Diese TGF-beta mRNA und Proteinproduktion erfolgte vor allem nach Aktivierung der inflammatorischen Zellen, was charakteristisch für den Zustand von Zellen nach einer transendothelialen Migration ist. Um die Assoziation von inflammatorischen Zellen und Veränderung der EZM weiter zu untersuchen, zeigten wir in der letzten hier vorgestellten Arbeit, dass sich primäre humane kardiale Fibroblasten, die aus endomyokardialen Biopsien von Patienten mit HINEF gewonnen wurden nach der Stimulation mit TGF-beta von normalen Fibroblasten zu sogenannten Myofibroblasten transdifferenzierten. Diese Myofibroblasten produzieren nun vermehrt Kollagen und führen so nach ihrer Transdifferenzierung zu einer Akkumulation von kardialen Kollagen in den Herzen der HINEF Patienten. Bisher gab es keine Daten zu Myofibroblasten und HINEF und wenig Daten zu diesem Zelltyp an humanen kardialen Proben. Ähnlich wie aus anderen fibrotischen Organerkrankungen an der Lunge und Niere bekannt, war die Transdifferenzierung mit einer erhöhten Expression von alpha-smooth muscle actin begleitet. So konnte die aus den Tiermodellen gewonnene Assoziation zwischen kardialer Inflammation und Fibrose erweitert und erste mögliche pathophysiologische Erklärungen gefunden werden. Allerdings kann auch ein direkter Zell-Zellkontakt zu Veränderungen an den Fibroblasten führen. Diese Möglichkeit soll in zukünftigen Studien untersucht werden.

In diesem Zusammenhang ist wesentlich, dass anti-inflammatorische Strategien, wie eine Inhibition des Interleukin-Converting Enzyms, eine Reduktion der Fibrose und der kardialen Inflammation im diabetischen Tiermodell bewirkten und so auch die kardiale Funktion verbessert werden konnte. Diese Therapiestrategien wurden bereits an Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 getestet und es zeigte sich ein generell anti-inflammatorisch und anti-diabetogener Effekt.<sup>44</sup> Eine Analyse der Herzfunktion fand bei dieser Studie allerdings nicht statt, so dass eine Übertragbarkeit zu Patienten im Sinne einer kardialen Funktionsverbesserung erst noch getestet werden muss. Interessanterweise wird diese Substanz jetzt auch in klinischen Präventionsstudien getestet, da wir wissen, dass Inflammation zur Progression der Arteriosklerose beiträgt.

Neben der verstärkten Kollagenproduktion kam es in den Tiermodellen auch zu einer Inhibition der Matrix Metalloproteinasen (im diabetischen Modell wurde die MMP-2 untersucht), welche u.a. für den Abbau der Kollagenfasern verantwortlich sind und so die Akkumulation von Kollagen im Herzen weiter erklären kann. Auch anhand der humanen Biopsien konnte gezeigt werden, dass im Menschen die humane Kollagenase MMP-1 herunter reguliert war, beziehungsweise ihre Aktivität gemessen durch Expression von MMP-1 zu ihrem Inhibitor TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) reduziert war. Erneut wurde diese Dysregulation nach der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beobachtet, so dass wieder kardiale Inflammation als ein Auslöser herausgearbeitet werden konnte. In einem hier vorgestellten diabetischen Tiermodell konnte diese Dysregulation durch die Gabe eines Angiotensin Rezeptor Blockers (Irbesartan) normalisiert und so die diastolische Dysfunktion verbessert werden. Eine kleinere Studie an Patienten mit HINEF zeigte durch Irbesartan eine Verbesserung<sup>45</sup>, während in einer großen doppelblind randomisierten klinischen Studie an Patienten mit HINEF Irbesartan nur einen neutralen Effekt auf das Überleben von Patienten mit HINEF hatte.<sup>46,47</sup>

Eine weitere therapeutische Option, die wir im Tiermodell erfolgreich testeten, war die Aktivierung der NO Synthase. Wir zeigten, dass kardiales Remodeling sich nach der Gabe eines pharmakologischen NO Aktivators verbesserte. Neben der kardialen Fibrose konnte so auch der oxidative Stress, der sich vermutlich aufgrund hoher Wandspannung bildete, verbessert werden. Dieser therapeutische Ansatz wird momentan in weiteren Tiermodellen aber auch in einer großen doppelblind randomisierten klinischen Studie untersucht. In der RELAX Studie wird die Wirkung von Phosphodiesterase-5 Inhibitoren, die u.a. auch einen NO donatorischen Effekt haben bei Patienten mit HINEF untersucht. Weitere laufende Studien untersuchen den Einfluss von Aldosteronantagonisten, von Renin-Inhibitoren und die Wirkung von Schrittmachern auf die Progression der HINEF.

Die Zukunft wird zeigen, ob diese neuen Strategien erfolgreich sind und wir damit unseren Patienten mit HINEF eine wirksame Therapie anbieten können, die das kardiovaskuläre Outcome der Patienten verbessert.

## Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser kumulativen Habilitationsschrift stehen Arbeiten, die die Veränderung der extrazellulären Matrix und der kardialen Inflammation sowie den Einfluss dieser Faktoren auf die LV Funktion an tierexperimentellen Modellen der Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion als auch an endomyokardialen Biopsien von Patienten mit Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion untersucht.

In allen hier vorgelegten Arbeiten zeigte sich, dass die Steifigkeit des LV mit einer Erhöhung des Kollagens im Herzen assoziiert ist. In den humanen endomyokardialen Biopsien von Patienten mit HINEF zeigte sich in diesem Sinne eine positive Korrelation. Weiterhin zeigten die diabetischen Tiermodelle der HINEF als auch die endomyokardialen Biopsien den Hinweis, dass kardiale Inflammation im Sinne von einwandernden inflammatorischen Zellen im bei HINEF vermehrt zu dokumentieren sind. Eine hier vorgestellte Möglichkeit der Interaktion von Inflammation mit kardialen Remodeling ist der parakrin wirkende *Transforming Growth Factor beta*, der die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert und so zu einer kardialen Kollagenakkumulation führt. Weiterhin war in den Modellen der HINEF als auch bei Patienten das Degradationssystem des Kollagen weniger aktiv, so dass vorhandenes Kollagen nicht oder langsamer abgebaut werden kann. Auch hier konnte der hemmende Einfluss von Inflammation auf das Degradationssystem anhand humaner Proben dokumentiert werden.

Die Quintessenz der vorgelegten Arbeiten ist es, dass kardiale Inflammation den Umbau der extrazellulären Matrix mit einer Kollagenakkumulation fördert und so die LV Funktion beeinflusst. Einer der möglichen Mechanismen ist die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche durch inflammatorische Zellen gefördert wird.

## Literaturangaben

1. Paulus, W.J., Tschope, C., Sanderson, J.E., Rusconi, C., Flachskampf, F.A., Rademakers, F.E., Marino, P., Smiseth, O.A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A.F., Borbely, A., Edes, I., Handoko, M.L., Heymans, S., Pezzali, N., Pieske, B., Dickstein, K., Fraser, A.G. Brutsaert, D.L. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2007; 28:2539-2550.
2. Owan, T.E., Hodge, D.O., Herges, R.M., Jacobsen, S.J., Roger, V.L. Redfield, M.M. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2006; 355:251-259.
3. Paulus, W.J. van Ballegoij, J.J. Treatment of heart failure with normal ejection fraction: an inconvenient truth! *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55:526-537.
4. Tribouilloy, C., Rusinaru, D., Mahjoub, H., Souliere, V., Levy, F., Peltier, M., Slama, M. Massy, Z. Prognosis of heart failure with preserved ejection fraction: a 5 year prospective population-based study. *Eur Heart J.* 2008; 29:339-347.
5. Tschope, C. Westermann, D. Heart failure with normal ejection fraction. Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Herz.* 2009; 34:89-96.
6. Wachter, R., Luers, C., Kleta, S., Griebel, K., Herrmann-Lingen, C., Binder, L., Janicke, N., Wetzel, D., Kochen, M.M. Pieske, B. Impact of diabetes on left ventricular diastolic function in patients with arterial hypertension. *Eur J Heart Fail.* 2007; 9:469-476.
7. Stahrenberg, R., Edelmann, F., Mende, M., Kockskamper, A., Dungen, H.D., Scherer, M., Kochen, M.M., Binder, L., Herrmann-Lingen, C., Gelbrich, G., Hasenfuss, G., Pieske, B. Wachter, R. Association of glucose metabolism with diastolic function along the diabetic continuum. *Diabetologia.* 2010; 53:1331-1340.
8. Pieske, B. Wachter, R. Impact of diabetes and hypertension on the heart. *Curr Opin Cardiol.* 2008; 23:340-349.
9. Escher, F., Westermann, D., Gaub, R., Pronk, J., Bock, T., Al-Saadi, N., Kuhl, U., Schultheiss, H.P. Tschope, C. Development of diastolic heart failure in a 6-year follow-up study in patients after acute myocarditis. *Heart.* 2010;

10. Zile, M.R. Brutsaert, D.L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation*. 2002; 105:1503-1508.
11. Zile, M.R. Nappi, J. Diastolic Heart Failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2000; 2:439-450.
12. Zile, M.R., Baicu, C.F. Gaasch, W.H. Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med*. 2004; 350:1953-1959.
13. Wachter, R., Schmidt-Schweda, S., Westermann, D., Post, H., Edelmann, F., Kasner, M., Luers, C., Steendijk, P., Hasenfuss, G., Tschope, C. Pieske, B. Blunted frequency-dependent upregulation of cardiac output is related to impaired relaxation in diastolic heart failure. *Eur Heart J*. 2009; 30:3027-3036.
14. Hasenfuss, G. Pieske, B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34:951-969.
15. van Heerebeek, L., Hamdani, N., Handoko, M.L., Falcao-Pires, I., Musters, R.J., Kupreishvili, K., Ijsselmuiden, A.J., Schalkwijk, C.G., Bronzwaer, J.G., Diamant, M., Borbely, A., van der Velden, J., Stienen, G.J., Laarman, G.J., Niessen, H.W. Paulus, W.J. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*. 2008; 117:43-51.
16. Kass, D.A., Kitzman, D.W. Alvarez, G.E. The restoration of chronotropic competence in heart failure patients with normal ejection fraction (RESET) study: rationale and design. *J Card Fail*. 2010; 16:17-24.
17. Borlaug, B.A., Melenovsky, V., Russell, S.D., Kessler, K., Pacak, K., Becker, L.C. Kass, D.A. Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation*. 2006; 114:2138-2147.
18. Borlaug, B.A. Paulus, W.J. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J*. 2011; 32:670-679.
19. McCurdy, S., Baicu, C.F., Heymans, S. Bradshaw, A.D. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48:544-549.
20. Jourdan-Lesaux, C., Zhang, J. Lindsey, M.L. Extracellular matrix roles during cardiac repair. *Life Sci*. 2010; 87:391-400.

21. Brown, L. Cardiac extracellular matrix: a dynamic entity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289:H973-974.
22. Bendall, J.K., Heymes, C., Ratajczak, P. Samuel, J.L. Extracellular matrix and cardiac remodelling. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2002; 95:1226-1229.
23. D'Armiento, J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12:97-101.
24. Westermann, D., Mersmann, J., Melchior, A., Freudenberger, T., Petrik, C., Schaefer, L., Lullmann-Rauch, R., Lettau, O., Jacoby, C., Schrader, J., Brand-Herrmann, S.M., Young, M.F., Schultheiss, H.P., Levkau, B., Baba, H.A., Unger, T., Zacharowski, K., Tschope, C. Fischer, J.W. Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation.* 2008; 117:1269-1276.
25. Zile, M.R., Desantis, S.M., Baicu, C.F., Stroud, R.E., Thompson, S.B., McClure, C.D., Mehurg, S.M. Spinale, F.G. Plasma Biomarkers That Reflect Determinants of Matrix Composition Identify the Presence of Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2011;
26. Norton, G.R., Tsoetsi, J., Trifunovic, B., Hartford, C., Candy, G.P. Woodiwiss, A.J. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 1997; 96:1991-1998.
27. Santiago, J.J., Dangerfield, A.L., Rattan, S.G., Bathe, K.L., Cunnington, R.H., Raizman, J.E., Bedosky, K.M., Freed, D.H., Kardami, E. Dixon, I.M. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn.* 2010; 239:1573-1584.
28. Swaney, J.S., Roth, D.M., Olson, E.R., Naugle, J.E., Meszaros, J.G. Insel, P.A. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:437-442.
29. Wang, J., Chen, H., Seth, A. McCulloch, C.A. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H1871-1881.

30. Kindermann, I., Kindermann, M., Kandolf, R., Klingel, K., Bultmann, B., Muller, T., Lindinger, A. Bohm, M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*. 2008; 118:639-648.
31. Rauchhaus, M., Doehner, W., Francis, D.P., Davos, C., Kemp, M., Liebenthal, C., Niebauer, J., Hooper, J., Volk, H.D., Coats, A.J. Anker, S.D. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000; 102:3060-3067.
32. Deswal, A., Petersen, N.J., Feldman, A.M., Young, J.B., White, B.G. Mann, D.L. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*. 2001; 103:2055-2059.
33. Bozkurt, B., Mann, D.L. Deswal, A. Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2010; 15:331-341.
34. Paulus, W.J. Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit*. 2000; 1:50-56.
35. Bryant, D., Becker, L., Richardson, J., Shelton, J., Franco, F., Peshock, R., Thompson, M. Giroir, B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*. 1998; 97:1375-1381.
36. Kubota, T., McTiernan, C.F., Frye, C.S., Slawson, S.E., Lemster, B.H., Koretsky, A.P., Demetris, A.J. Feldman, A.M. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*. 1997; 81:627-635.
37. Kubota, T., McTiernan, C.F., Frye, C.S., Demetris, A.J. Feldman, A.M. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Card Fail*. 1997; 3:117-124.
38. Heymans, S., Hirsch, E., Anker, S.D., Aukrust, P., Balligand, J.L., Cohen-Tervaert, J.W., Drexler, H., Filippatos, G., Felix, S.B., Gullestad, L., Hilfiker-Kleiner, D., Janssens, S., Latini, R., Neubauer, G., Paulus, W.J., Pieske, B., Ponikowski, P., Schroen, B., Schultheiss, H.P., Tschope, C., Van Bilsen, M., Zannad, F., McMurray, J. Shah, A.M. Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2009; 11:119-129.
39. Kasner, M., Westermann, D., Steendijk, P., Gaub, R., Wilkenshoff, U., Weitmann, K., Hoffmann, W., Poller, W., Schultheiss, H.P., Pauschinger, M.

- Tschope, C. Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study. *Circulation*. 2007; 116:637-647.
40. Kasner, M., Westermann, D., Lopez, B., Gaub, R., Escher, F., Kuhl, U., Schultheiss, H.P. Tschope, C. Diastolic tissue Doppler indexes correlate with the degree of collagen expression and cross-linking in heart failure and normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57:977-985.
41. Galderisi, M., Lomoriello, V.S., Santoro, A., Esposito, R., Olibet, M., Raia, R., Dario Di Minno, M.N., Guerra, G., Mele, D. Lombardi, G. Differences of myocardial systolic deformation and correlates of diastolic function in competitive rowers and young hypertensives: a speckle-tracking echocardiography study. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010; 23:1190-1198.
42. Mu, Y., Qin, C., Wang, C. Huojiaabudula, G. Two-dimensional ultrasound speckle tracking imaging in evaluation of early changes in left ventricular diastolic function in patients with essential hypertension. *Echocardiography*. 2010; 27:146-154.
43. Rame, J.E., Ramilo, M., Spencer, N., Blewett, C., Mehta, S.K., Dries, D.L. Drazner, M.H. Development of a depressed left ventricular ejection fraction in patients with left ventricular hypertrophy and a normal ejection fraction. *American Journal of Cardiology*. 2004; 93:234-237.
44. Larsen, C.M., Faulenbach, M., Vaag, A., Volund, A., Ehres, J.A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T. Donath, M.Y. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2007; 356:1517-1526.
45. Yip, G.W., Wang, M., Wang, T., Chan, S., Fung, J.W., Yeung, L., Yip, T., Lau, S.T., Lau, C.P., Tang, M.O., Yu, C.M. Sanderson, J.E. The Hong Kong diastolic heart failure study: a randomised controlled trial of diuretics, irbesartan and ramipril on quality of life, exercise capacity, left ventricular global and regional function in heart failure with a normal ejection fraction. *Heart*. 2008; 94:573-580.
46. Zile, M.R., Gaasch, W.H., Anand, I.S., Haass, M., Little, W.C., Miller, A.B., Lopez-Sendon, J., Teerlink, J.R., White, M., McMurray, J.J., Komajda, M., McKelvie, R., Ptaszynska, A., Hetzel, S.J., Massie, B.M. Carson, P.E. Mode of death in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: results

- from the Irbesartan in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Study (I-Preserve) trial. *Circulation*. 2010; 121:1393-1405.
47. Massie, B.M., Carson, P.E., McMurray, J.J., Komajda, M., McKelvie, R., Zile, M.R., Anderson, S., Donovan, M., Iverson, E., Staiger, C. Ptaszynska, A. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2008; 359:2456-2467.

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Heinz-Peter Schultheiss sowie Professor Dr. med. Carsten Tschöpe. In der Arbeitsgruppe von Carsten Tschöpe begann mein wissenschaftlicher Werdegang. Er betreute mich dabei nicht nur während der Zeit meiner Promotion sondern ermöglichte mir im weiteren Verlauf eine eigenständige wissenschaftliche Entwicklung, die erst durch die anregende Diskussion im gemeinsamen Arbeiten möglich wurde. Herr Prof. Schultheiss unterstütze mich nicht nur bei der Entwicklung meiner wissenschaftlichen, sondern auch meiner klinischen Laufbahn wesentlich und ich fand in seiner Klinik immer die besten Voraussetzungen für meine Entwicklung während dieser Zeit.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, mit denen ich im Laufe der Zeit zusammenarbeiten durfte. Besonders wesentlich waren hier Dr. Alexander Riad, Dr. Mario Kasner und Dr. Diana Lindner. Ohne ihre Hilfe wären die hier zugrunde liegenden Arbeiten nicht möglich gewesen.

Herzlichst bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich nicht nur während meines Studiums sondern auch während meiner wissenschaftlichen und klinischen Arbeit immer unterstützt und motiviert hat. Herausragend danken möchte ich auch meiner langjährigen Freundin Meike Sobirey, die ich initial auch über diese wissenschaftliche Arbeit kennen und lieben gelernt habe. Ich danke Ihr für die Entbehrungen, die sie verständnisvoll und selbstlos in Kauf genommen hat und mir so das wissenschaftliche Arbeiten möglich macht.

## **Eidesstattliche 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.

April 2011

.....

Dirk Westermann