

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Martin J. Lohse

**Effekte kardioprotektiver Zyklopeptide auf Funktion und
Morphometrie des Herzens im Rattenmodell
der dilatativen Immunkardiomyopathie**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Markus Müller

aus Veitshöchheim

Würzburg, Februar 2014

Referent: Prof. Dr. Roland Jahns
Korreferent: Prof. Dr. Martin J. Lohse
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.08.2014

Der Promovend ist Arzt

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Einführung und Aufgabenstellung.....	1
1.2.	Definitionen und Klassifikation der Kardiomyopathien.....	2
1.2.1.	Allgemeine Definition der Kardiomyopathie	2
1.2.2.	Klassifikation	2
1.2.3.	Primäre Kardiomyopathien.....	3
1.2.3.1.	Genetisch	3
1.2.3.2.	Gemischt	3
1.2.3.3.	Erworben.....	4
1.3.	Dilatative Kardiomyopathie	6
1.3.1.	Epidemiologie und Klinik.....	6
1.3.2.	Ätiologie	7
1.3.2.1.	Genetische Ursache	7
1.3.2.2.	Toxische Genese.....	7
1.3.2.3.	Infektiöse und autoimmune Genese.....	7
1.4.	Der β -adrenerge Rezeptor.....	8
1.4.1.	Physiologische Bedeutung	8
1.4.2.	Struktur und Regulation.....	9
1.4.2.1.	Struktur	9
1.4.2.2.	Regulation	11
1.4.3.	Adaptation bei Herzinsuffizienz	11
1.4.4.	Die Rolle als Autoantigen	12
1.4.5.	Pathogenetische Bedeutung stimulierender Autoantikörper.....	14
1.4.6.	Klinische Relevanz kardialer Autoantikörper	15
1.5.	Therapie.....	16
1.5.1.	Allgemeine Maßnahmen.....	16
1.5.2.	Pharmakologische Therapie.....	16
1.5.3.	Nicht-pharmakologische Therapie	18
1.5.4.	Immunomodulatorische Therapie	19
1.5.4.1.	Immunsuppression.....	19
1.5.4.2.	Intravenöse Immunglobulintherapie	19
1.5.4.3.	Immunoabsorption	19
1.5.4.4.	Zyklopeptidtherapie	20
2.	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1.	Immunisierung und Therapie der Tiere	21
2.2.	Echokardiographie	22
2.3.	Herzkatheteruntersuchung und Organentnahme.....	23

2.4.	Histologie	25
2.4.1.	Erstellen der Paraffinschnitte	25
2.4.2.	Makroskopisch-morphometrische Analyse	25
2.4.3.	Mikroskopisch-morphometrische Analyse	26
2.5.	Kollagenanalyse	29
2.5.1.	Immunhistochemie	29
2.5.2.	Quantitative real-time PCR	30
2.6.	Statistische Analyse	32
3.	ERGEBNISSE	33
3.1.	Antikörpertiter	33
3.2.	Echokardiographie	34
3.2.1.	Dimensionen des linken Ventrikels	34
3.2.2.	Funktionelle linksventrikuläre Parameter	36
3.3.	Herzkatheteruntersuchung und Herzgewicht	37
3.4.	Histologisch-morphometrische Analyse des Herzgewebes	39
3.4.1.	Makroskopische Morphometrie	39
3.4.2.	Mikroskopische Morphometrie	41
3.5.	Kollagenquantifizierung	43
4.	DISKUSSION	47
4.1.	Bedeutung der Antikörper	47
4.2.	Effekte linearer und zyklischer Peptide	48
4.2.1.	Morphologie der Rattenherzen	48
4.2.2.	Funktionelle Veränderungen am Herzen	52
4.3.	Therapeutische Effekte kardioprotektiver Peptide	52
4.4.	Implikationen für den klinischen Einsatz	55
4.5.	Ausblick	57
5.	ZUSAMMENFASSUNG	59
6.	LITERATURVERZEICHNIS	61

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AS	Aminosäure
β_1 -AR	β_1 -adrenerger Rezeptor
β_1 -EC _{II}	zweite extrazelluläre Domäne des β_1 -adrenergen Rezeptors
CFP	cyan fluorescent protein (grün fluoreszierend)
CI	Herzindex
DCM	dilatative Kardiomyopathie
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FS	fractional shortening (Verkürzungsfraction)
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
IgG	Immunglobulin G
KG	Körpergewicht
LV	linksventrikulär
LVA	linksventrikuläre Querschnittsfläche
LVCA	Querschnittsfläche der linksventrikulären Herzhöhle
LVCD	Durchmesser der linksventrikulären Herzhöhle
LVED	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVES	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVP	linksventrikulärer systolischer Druck
LVWA	Querschnittsfläche der linksventrikulären Herzwand
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
MMP	matrix metalloproteinase
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
YFP	yellow fluorescent protein (gelb fluoreszierend)

1. EINLEITUNG

1.1. Einführung und Aufgabenstellung

Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen. Formen, die ohne erkennbare Ursache zu einer progredienten Dilatation und Reduktion der Kontraktilität führen, werden als idiopathische dilatative Kardiomyopathie bezeichnet. Sie ist der Hauptgrund für schwere Herzinsuffizienz und die damit assoziierten Einschränkungen der Lebensqualität bei jungen Erwachsenen. Neben der beeinträchtigten kardialen Funktion weisen diese Patienten oftmals auch Veränderungen im Bereich der humoralen und zellulären Immunität auf; einige der Betroffenen entwickeln kreuzreagierende und/oder Autoantikörper gegen Bestandteile des Herzens wie Membran- oder Strukturproteine. Stimulierende (Auto)Antikörper, die gegen die zweite extrazelluläre Domäne des kardialen β_1 -adrenergen Rezeptors (β_1 -EC_{II}) gerichtet sind, können im Rattenmodell eine dilatative Immunkardiomyopathie auslösen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Evaluation der Antikörper-neutralisierenden und kardioprotektiven Eigenschaften eines kürzlich entwickelten β_1 -EC_{II}-homologen 25 Aminosäure (AS) Zyklopeptids und einer neuartigen 18 AS Cystein/Serin Zyklopeptid-Mutante im Vergleich zu ihren linearen Pendants. Als Versuchstiere wurden Ratten ausgewählt, da die Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Domäne des β_1 -Rezeptors zwischen Mensch und Ratte identisch ist (100 % Homologie) [51, 111].

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der morphometrischen Analyse der Rattenherzen nach einer Behandlungsdauer von zwölf Monaten durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen. Darüber hinaus wurde die Herzfunktion nicht-invasiv mittels Echokardiographie (Verlaufskontrollen) und invasiv mittels Linksherzkatheteruntersuchung beurteilt.

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprogramms des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) angefertigt. Ziel dieses Programms war die Etablierung einer kardioprotektiven Therapie der Rezeptor-Antikörper-positiven Herzinsuffizienz.

1.2. Definitionen und Klassifikation der Kardiomyopathien

1.2.1. Allgemeine Definition der Kardiomyopathie

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die mit einer mechanischen und/oder elektrischen Dysfunktion verbunden sind und die in den meisten Fällen eine unangemessene Hypertrophie oder Dilatation der Ventrikel aufweisen. Ihre Ursache ist bei ca. 30 % der Fälle genetisch. Kardiomyopathien sind per Definition auf das Herz beschränkt, können aber auch als Teil generalisierter systemischer Funktionsstörungen auftreten, und führen oft zum plötzlichen Herztod (meist letale Arrhythmien) oder zum Tod durch fortschreitendes Pumpversagen [117].

1.2.2. Klassifikation

Kardiomyopathien werden nach ihrer vorwiegenden Organbeteiligung in die zwei großen Gruppen *primär* und *sekundär* unterteilt. *Primäre Kardiomyopathien* sind ausschließlich oder vornehmlich auf den Herzmuskel beschränkt und stellen einen relativ kleinen Anteil dar. Sie lassen sich in genetische, gemischte (genetisch und nicht-genetisch) sowie erworbene Formen einteilen (Abbildung 1). Zu den überwiegend genetisch determinierten Formen zählen unter anderem die hypertrophe und die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie sowie die mitochondrialen Myopathien und (erbliche) Kanaldefekte. Zu den Mischformen bzw. den nicht-genetischen primären Kardiomyopathien gehören Herzschädigungen beispielsweise durch entzündliche oder endokrine Erkrankungen sowie solche, die als Folge einer toxischen Medikamentenwirkung oder einer onkologischen Therapie mit Anthrazyklinen und therapeutischen Antikörpern (z.B. Trastuzumab) auftreten [117].

Bei *sekundären Kardiomyopathien* ist das Herz im Rahmen unterschiedlicher Systemerkrankungen wie Lupus erythematodes oder Amyloidose involviert, wobei Häufigkeit und Schweregrad dieser sekundären Herzbeteiligung abhängig von den einzelnen Krankheiten deutlich variieren.

1.2.3. Primäre Kardiomyopathien

1.2.3.1. Genetisch

a) Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist durch eine meist asymmetrische und das interventrikuläre Septum involvierende Hypertrophie des linken und/oder rechten Ventrikels gekennzeichnet, wobei das Volumen des linken Ventrikels normal oder reduziert ist. Oftmals tritt diese Erkrankung familiär auf, ihre Vererbung ist vornehmlich autosomal-dominant [173].

b) Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)

Die ARVC zeichnet sich durch einen zunächst regional, später global zunehmenden fibrotisch-fettigen Umbau des rechtsventrikulären Myokards mit Aussparung des Septums aus [125]. Dieser häufig familiären Erkrankung liegt meist ein autosomal-dominanter Erbgang zugrunde. Sie manifestiert sich besonders bei jungen Menschen durch Arrhythmien und Herztod. [165].

1.2.3.2. Gemischt

a) Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Charakteristisch für die DCM sind die Dilatation sowie verminderte Kontraktionskraft des linken oder beider Ventrikel. Ihre Ursache kann idiopathisch, genetisch, viral und/oder immun sein, die Histologie ist unspezifisch. Die dilatative Kardiomyopathie äußert sich klinisch in den meisten Fällen durch progrediente Herzinsuffizienz. Arrhythmien, Thromboembolien und plötzlicher Herztod sind häufig mit ihr assoziiert und können im Verlauf der Erkrankung zu jedem Zeitpunkt auftreten [151].

b) Restriktive Kardiomyopathie (RCM)

Die RCM, eine seltene Form der Herzmuskelerkrankung und Ursache von Herzinsuffizienz, ist durch ein normales oder vermindertes Volumen eines oder beider Ventrikel, verbunden mit einer Vergrößerung beider Vorhöfe, gekennzeichnet. Bei

eingeschränktem ventrikulärem Füllungsvermögen bleiben systolische Funktion sowie Wanddicke weitgehend normal. Für diese Erkrankung sind sowohl sporadische als auch familiäre Formen beschrieben [101].

1.2.3.3. Erworben

a) Inflammatorisch (Myokarditis)

Unter Myokarditis versteht man ein akutes oder chronisches entzündliches Geschehen im Bereich des Herzmuskels, das von einem breiten Spektrum an Toxinen, Drogen und Mikroorganismen ausgelöst werden kann. Die Myokarditis durchläuft typischerweise verschiedene Stadien, die durch Zellinfiltration, interstitielles Ödem und schließlich fibrotischen Umbau des betroffenen Gewebes gekennzeichnet sind.

b) Stress-induziert (Tako-Tsubo)

Bei der Tako-Tsubo Kardiomyopathie handelt es sich um eine erst kürzlich beschriebene klinische Entität mit vorübergehender regionaler systolischer Dysfunktion im apikalen oder mittleren Bereich des linken Ventrikels bei Abwesenheit einer koronaren Herzerkrankung [57]. Sie betrifft vor allem ältere Frauen. Den Symptomen, die meist als plötzlich einsetzende Angina pectoris-Beschwerden wahrgenommen werden, geht häufig emotionaler oder physischer Stress mit abnormer Aktivierung des sympathikoadrenergen Systems voraus.

c) Peripartum

Die Peripartum Kardiomyopathie ist eine seltene, vermutlich durch Prolaktin-Spaltprodukte ausgelöste Form einer linksventrikulären Kontraktilitätsstörung [69]. Sie äußert sich durch die Symptome einer Herzinsuffizienz und manifestiert sich klinisch im Zeitraum zwischen drittem Trimenon und den ersten fünf postpartalen Monaten. Betroffen sind in erster Linie adipöse Frauen, die älter als 30 Jahre sind, mehr als ein Kind geboren haben und mit Präeklampsie in der Anamnese. Wenngleich der Verlauf ungünstig sein kann, erholt sich etwa die Hälfte der Patientinnen innerhalb eines halben Jahres von der Erkrankung.

d) Andere

Infolge anhaltender supraventrikulärer oder ventrikulärer Tachykardien kann eine dilatative Kardiomyopathie mit Fehlfunktion des Myokards im linken Ventrikel resultieren, die mit Beendigung der Tachykardie meist vollständig reversibel ist. Das gleiche gilt für die DCM, die durch übermäßigen Alkoholkonsum bedingt ist. Auch sie ist bei Einhaltung einer Alkoholkarenz grundsätzlich rückbildungsfähig. Neben den beiden genannten gehört die Kardiomyopathie bei Kindern Insulin-abhängiger Mütter ebenfalls in diese Subgruppe.

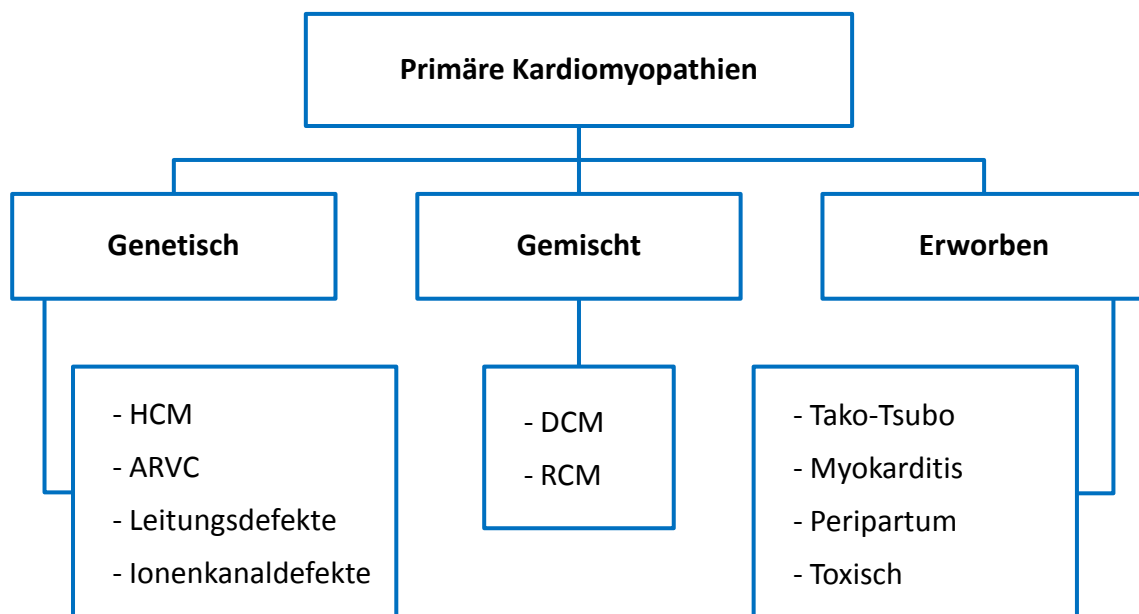


Abbildung 1: Primäre Kardiomyopathien

Bei den dargestellten primären Kardiomyopathien ist im Verlauf des Krankheitsprozesses ausschließlich oder zumindest hauptsächlich das Myokard betroffen. Die einzelnen Entitäten sind entsprechend ihrer genetischen und nicht-genetischen Ätiologie aufgeteilt [117].

1.3. Dilatative Kardiomyopathie

1.3.1. Epidemiologie und Klinik

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist definiert als Erkrankung des Herzmuskels, die nicht durch eine hämodynamisch relevante Stenose der Herzkranzgefäße bedingt ist und die durch die pathologische Erweiterung zumindest des linken Ventrikels sowie eine eingeschränkte systolische Pumpfunktion gekennzeichnet ist [151].

Sie stellt mit einer jährlichen Inzidenz von bis zu 100 Patienten und einer Prävalenz von 300-400 Patienten pro Million den häufigsten Grund für eine schwere Herzinsuffizienz bei jungen Erwachsenen dar [21, 152]. Obwohl die Erstmanifestation der Erkrankung bei den meisten Patienten im mittleren Lebensalter liegt, können jedoch sowohl Kinder wie auch ältere Erwachsene betroffen sein [43, 91]. Die DCM als weitgehend irreversible Form einer Herzmuskelerkrankung stellt gegenwärtig die dritthäufigste Ursache einer Herzinsuffizienz und den häufigsten Grund für eine Herztransplantation dar [117].

Wenngleich sich die DCM auch selten durch eine fulminante Embolie oder plötzlichen Herztod manifestieren kann, weisen die Patienten in den meisten Fällen zunächst typischerweise Symptome einer pulmonalen Stauung (Belastungsdyspnoe) auf und/oder haben ein niedriges kardiales Auswurfvolumen bei oftmals schon über Monate oder Jahre bestehenden belastungsabhängigen Beschwerden oder Abgeschlagenheit. Akute Erkrankungen oder das Auftreten von Arrhythmien, insbesondere von Vorhofflimmern, können bei niedriger systolischer Auswurfleistung zu einer kardialen Dekompensation führen. Die Diagnose einer DCM wird nicht selten auch nur zufällig bei medizinischen Routineuntersuchungen oder im Rahmen der Familienanamnese bzw. Familienuntersuchung gestellt [30]. Symptome treten im Allgemeinen erst recht spät im Krankheitsverlauf auf, die 5-Jahres-Überlebensrate nach Einsetzen einer klinischen Symptomatik liegt zur Zeit, unter optimaler Medikation, bei etwa 80% [99].

1.3.2. Ätiologie

1.3.2.1. Genetische Ursache

Mindestens 25% der Patienten aus der westlichen Bevölkerung weisen eine familiäre Genese bei überwiegend autosomal-dominanter Vererbung auf [12, 23, 128]. Die Mehrzahl der autosomal-dominanten Formen wird durch Mutationen von Sarkomerproteinen verursacht, welche unter anderem die Gene für Aktin, Myosin und Laminin A/C betreffen [132]. Daneben können auch andere Gene verändert sein, die für Proteine des Zytoskeletts, des Sarkolemmes oder der Kernmembran kodieren [31]. Neben selteneren X-chromosomalen Erbgängen (Muskeldystrophie Duchenne mit Mutation im Dystrophin-Gen [48]) sind bei der DCM auch autosomal-rezessive Vererbungsmodi bekannt [134, 166]. Als gemeinsame Folge solcher Gendefekte ist die Integrität und Stabilität der myokardialen Architektur beeinträchtigt.

1.3.2.2. Toxische Genese

Auch exogen-toxisch verursachte Formen der DCM sind beschrieben. Hoher Alkoholkonsum ist dabei die häufigste Noxe, die in dieser Gruppe zu einer DCM führt [37]. Daneben können auch Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin) sowie Kokain und Ecstasy eine Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielen [43, 129].

1.3.2.3. Infektiöse und autoimmune Genese

Bei vielen ätiologisch nicht genau zuordenbaren Fällen von DCM geht man in der Mehrzahl von einer beispielsweise viral bedingten akuten Myokarditis in der Vorgeschichte aus. Eine chronisch-persistierende Infektion des Herzmuskels kann dann Basis für die Entwicklung einer Kardiomyopathie sein [90, 143]. Als häufigste Erreger gelten Coxsackie-B-Viren und Enteroviren. Darüber hinaus kann eine DCM auch von Adenoviren sowie vom Parvovirus, Zytomegalievirus und Epstein-Barr-Virus ausgelöst werden [96, 100, 118]. Patienten mit myokardialer Viruspersistenz weisen häufig auch Veränderungen in der humoralen und zellulären Immunität auf [110, 139]. Nach einer prompten Aktivierung des Immunsystems kann eine ab-

norme oder inadäquate Immunantwort eine chronische Schädigung des Herzens hervorrufen, aus der bei chronisch-persistierender Inflammation letztlich eine progrediente Dilatation und Pumpversagen resultieren können [93, 112]. Im Zusammenhang mit der infektbedingten chronischen Aktivierung des Immunsystems bei gleichzeitig gestörter humoraler Immunantwort entwickeln viele dieser Patienten kreuzreagierende und/oder Autoantikörper gegen verschiedene kardiale Antigene wie Membranproteine [50, 78], mitochondriale Proteine [157] und Strukturproteine der Myozyten (d.h. Aktin, Laminin, Myosin, Troponin) [17, 136, 141]. Die Strukturverwandtschaft zwischen myokardialen Epitopen und mikrobiellen Proteinen kann zur Bildung kreuzreaktiver Antikörper führen [71, 130]. Dieser Mechanismus des Antigen-Mimikry scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Chagas-Kardiomyopathie, einer sich langsam entwickelnden Herzbeteiligung im Rahmen einer Infektion mit dem Parasiten *Trypanosoma cruzi*, zu spielen [45, 161]. Etwa 30 % der betroffenen Patienten entwickeln anti-parasitäre Antikörper, die mit der zweiten extrazellulären Domäne des humanen β_1 -adrenergen Rezeptors interagieren können [8, 29]. Nachdem bei etwa genauso vielen Patienten mit DCM zirkulierende Autoantikörper gegen die gleiche Domäne nachgewiesen werden können [81], ist deren Induktion durch zum Beispiel ein virales Pathogen oder eine Kreuzreaktivität mit viralen Komponenten grundsätzlich vorstellbar [113].

1.4. Der β -adrenerge Rezeptor

1.4.1. Physiologische Bedeutung

Das adrenerge System hat als Teil des sympathischen Nervensystems im menschlichen Körper Einfluss auf die Funktion wichtiger Organe wie Herz, Gefäße, Lunge, Nieren und Gehirn. Transmittersubstanzen dieses Systems sind die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, deren Wirkung über die Rezeptoren in der Zellmembran des entsprechenden Gewebes vermittelt wird. Aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften werden adrenerge Rezeptoren in die Typen α_1 , α_2 und β unterteilt [6, 102], wobei die β -adrenergen Rezeptoren wiederum in drei Subtypen eingeteilt werden [107]. Die bei physischem oder psychischem Stress vom Körper

ausgeschütteten Katecholamine führen über β_1 -Rezeptoren am Herzen zu einer Steigerung der Kontraktilität und Schlagfrequenz [11, 24], über β_2 -Rezeptoren im Bronchialsystem der Lunge und den peripheren Gefäßen zur Relaxation der glatten Muskulatur und damit zur Dilatation [59, 98]. Der β_3 -Subtyp dient der Lipolyse im braunen Fettgewebe [32, 33]. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die lokal unterschiedliche und gewebespezifische Verteilung der β -Rezeptoren. Während der β_1 -adrenerge Rezeptor (β_1 -AR) mit einem Anteil von 70-80 % der am häufigsten exprimierte Rezeptor im menschlichen Myokard ist [11, 51, 149], ist der β_2 -AR dort nur zu 20-25 % vorhanden. Im Gegensatz dazu überwiegt letztgenannter in der Lunge sowie in den peripheren Gefäßen [18, 88, 102].

1.4.2. Struktur und Regulation

1.4.2.1. Struktur

Die adrenergen Rezeptoren gehören zusammen mit dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor und dem Serotonin-(5HT-)Rezeptor zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren [51, 135]. Sie bestehen aus sieben hydrophoben transmembranen α -Helices, die durch drei intrazelluläre (IC_{I-III}) und drei extrazelluläre (EC_{I-III}) Schleifen (sog. Loops) miteinander verbunden sind. Der carboxyterminale Anteil des Rezeptorproteins befindet sich innerhalb der Zelle, der Aminoterminus an der Außenseite der Zellmembran [16, 171]. Bei β -adrenergen Rezeptoren sind die intrazellulären Domänen an stimulierende G-Proteine (G_s) gekoppelt, welche bei Aktivierung ein Rezeptorsignal in einen zellulären Effektormechanismus überführen [64]. Die Stimulation des β_1 -AR durch seine physiologischen Liganden Noradrenalin und Adrenalin triggert eine Signalkaskade, die zur Aktivierung und anschließenden Dissoziation des heterotrimeren G_s -Proteins in G_α und $G_{\beta\gamma}$ Untereinheiten führt [58]. G_α aktiviert daraufhin eine Adenylatzyklase, die aus zytosolischem Adenosintriphosphat (ATP) die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert; cAMP aktiviert seinerseits dann die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Die aktivierte PKA phosphoryliert unterschiedliche zelluläre Moleküle, die unter anderem Einfluss auf die Regulation der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration haben. Auf diese Weise werden die Kontraktilität des Myo-

kards sowie die Herzfrequenz erhöht [34, 50, 109]. Der Abbau des zellulären cAMP erfolgt durch zytosolische Phosphodiesterasen [72].

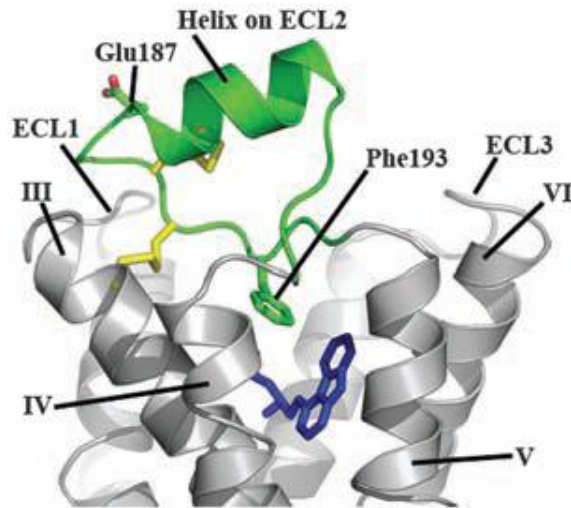


Abbildung 2: Extrazelluläre Domänen des β_2 -adrenergen Rezeptors

Die in grün dargestellte zweite extrazelluläre Domäne (ECL2) enthält eine kurze α -Helix sowie zwei gelb markierte Disulfidbindungen. ECL2 verbindet die Transmembran-Helices IV und V, und besitzt eine komplexere Struktur als ECL1 und ECL3. Der gesamte Loop wird durch die starre α -Helix und die Disulfidbindungen von der tiefen Ligandenbindungsstelle ferngehalten. Abbildung übernommen aus [19].

Die extrazellulären Loops und die Aminotermini der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bilden gemeinsam mit bestimmten Transmembran-Helices die Ligandenbindungstasche eines jeden Rezeptors [5]. Aus diesem Grund spielen die ECs eine wichtige Rolle für die pharmakologischen Eigenschaften dieser Rezeptoren. Im Allgemeinen binden kleinmolekulare Liganden tiefer in der von den Transmembran-Helices gebildeten Tasche, während größere Liganden wie beispielsweise Peptide oberflächlicher in der Nähe der ECs binden [56, 87]. Im Fall des β_1 -AR und des β_2 -AR hat EC_{II} eine komplexere Struktur als EC_I und EC_{III} und beinhaltet außerdem eine kurze α -Helix (Abbildung 2). Zusätzlich existiert eine Disulfidbindung zwischen zwei Cysteinen innerhalb des Loops, die zur Stabilisierung des EC_{II} bei-

trägt, und eine zweite Disulfidbrücke, die EC_{II} mit der Transmembran-Helix III verbindet [138]. Die Cysteine spielen funktionell eine entscheidende Rolle, da durch Reduktion oder Mutation eines oder mehrerer dieser Cysteine die Affinität für Agonisten und Antagonisten abnimmt [26, 49]. Somit scheint die korrekte räumliche Anordnung der extrazellulären Loops für die korrekte Ausbildung der Ligandenbindungstasche im β -AR essentiell zu sein und könnte auch erklären, warum gegen diese Loops gerichtete Antikörper mit der Ligandenbindung interferieren, die Konformation des Rezeptors verändern und darüber letztlich auch dessen Aktivität modulieren können [76].

1.4.2.2. Regulation

Die dynamische Adaptation der β -adrenergen Rezeptoren an hohe Stimulationsfrequenzen erfolgt auf Rezeptorebene durch Desensibilisierung [63, 108] und Downregulation [9, 10]. Desensibilisierung ist eine schnelle, reversible Form der Anpassung durch Entkopplung des Rezeptors von seinem zugehörigen G-Protein. Das Rezeptorsignal kann auf diese Weise um bis zu 75 % reduziert werden [107]. Permanente Agoniststimulation führt hingegen zu einer substantiellen Reduktion der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche [44, 55, 89]. Bei diesem als Rezeptor-Downregulation bezeichneten Vorgang werden aktivierte β -adrenerge Rezeptoren aus der Zellmembran entfernt (Internalisation) und in Vesikel verpackt ins Zytosol aufgenommen, von wo aus sie entweder in die Zellmembran reintegriert (Recycling) oder endgültig abgebaut werden können [146, 169, 178]. Zum anderen führt auch eine Destabilisierung der β -AR mRNA zu einer intrazellulären Reduktion der Rezeptorexpression [9, 22, 62].

1.4.3. Adaptation bei Herzinsuffizienz

Jede Veränderung der Herzleistung, die eine Bedrohung der zerebralen Blutversorgung darstellt, wird von entsprechenden Rezeptoren im Herz und den großen Gefäßen registriert. Diese Barorezeptoren senden normalerweise inhibitorische Impulse an das zentrale Nervensystem und verhindern so die Aktivierung des sympathikoadrenergen Systems und die Freisetzung von Vasopressin aus der Hy-

pophyse. Bei Abfall des kardialen Auswurfvolumens oder des systemischen Blutdrucks erhöhen Adrenalin und Vasopressin den Blutdruck und das intravasale Volumen und sichern dadurch die zerebrale Perfusion. Bei Vorliegen einer chronischen Herzinsuffizienz ist die Funktionsfähigkeit der atrialen und arteriellen Barorezeptoren jedoch gestört, so dass die Suppression des Sympathikus und die Vasopressin-Freisetzung deutlich beeinträchtigt sind [70]. Die Rezeptoren werden trotz des gestiegenen Drucks infolge der Volumenexpansion nicht mehr adäquat erregt, so dass es statt einer Inhibierung zu einer Verstärkung der neurohormonalen Aktivität kommt. Dementsprechend weisen viele herzinsuffiziente Patienten eine exzessive Sympathikusaktivierung auf, wobei das Ansprechen auf endogene oder exogene Katecholamine allerdings merklich abgeschwächt ist [38]. Das verminderte Ansprechen ist in diesem Fall nicht durch einen Verlust kontraktile Einheiten im Myokard bedingt, sondern vielmehr durch Veränderungen im Bereich des zellulären Effektormechanismus. Die chronische Stimulation führt zu einer Downregulation des myokardialen β_1 -adrenergen Rezeptors und zieht einen Aktivitätsabfall der Adenylatzyklase sowie eine ineffizientere Muskelkontraktion nach sich [47]. Weil die gestörte Hämodynamik auf diese Weise nicht dauerhaft korrigiert werden kann, bleibt die Aktivierung des sympathikoadrenergen Systems bestehen und es kommt zu einer weiteren Ausschüttung von Adrenalin und Vasopressin. Dadurch entwickelt sich letztlich eine Eigendynamik im Sinne eines Circulus vitiosus, der zu einer progredienten Rezeptor-Downregulation mit weiterer Verschlechterung der Pumpfunktion bei gleichzeitig chronisch erhöhten Adrenalin/Vasopressin-Spiegeln führt [109].

1.4.4. Die Rolle als Autoantigen

Homologien zwischen Oberflächenmolekülen der Myozyten wie Membranrezeptoren und viralen oder bakteriellen Proteinen werden als ein denkbarer Mechanismus für die Entstehung endogener Rezeptor-Autoantikörper durch Antigen-Mimikry betrachtet [71]. Eine der am besten untersuchten kardialen Erkrankungen ist in diesem Zusammenhang die bereits beschriebene Chagas-Erkrankung. Eine weitere Hypothese zur Ätiologie derartiger Autoantikörper ist die Schädigung von Myozyten, die eine plötzliche oder chronische Freisetzung von - unter physio-

logischen Bedingungen dem Immunsystem verborgenen - Autoantigenen aus der Membran oder dem Zytosol nach sich zieht. Eine solche Schädigung tritt am ehesten bei akut infektiösen (Myokarditis), toxischen oder ischämischen (Myokardinfarkt) Ereignissen auf, die zu einer Apoptose und/oder Nekrose von Myozyten führen [17, 154]. Die anschließende Präsentation bis dahin „unbekannter“ myokardialer Autoantigene an das Immunsystem könnte schließlich eine Autoimmunantwort induzieren, welche im ungünstigsten Fall eine persistierende immunvermittelte Schädigung des Herzgewebes unter Beteiligung der zellulären (T-Zell) oder humoralen (B-Zell) Immunantwort oder eine simultane Aktivierung beider Systeme hervorruft [36, 154].

Um als Antigen zu wirken, müssen Membranrezeptoren zu Oligopeptiden abgebaut werden, und mindestens eines von diesen Peptiden sollte in der Lage sein, einen Komplex mit MHC Klasse II Molekülen der Wirtszelle auszubilden. Die Analyse des humanen β_1 -AR hinsichtlich potentiell immunogener Aminosäureabschnitte ergab, dass ausschließlich die zweite extrazelluläre Domäne für Antikörper zugängliche B- und T-Zell-Epitope enthält [71, 114]. Diese Tatsache könnte den erfolgreichen Einsatz von β_1 -EC_{II}-homologen Peptiden zur Generierung β_1 -spezifischer Antikörper in verschiedenen Tiermodellen erklären [15, 74, 85]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die meisten der gegen den zweiten Loop gerichteten Antikörper den Rezeptor vornehmlich in seiner nativen Konformation erkennen [14, 76]. Darüber hinaus ergaben funktionelle Tests, dass genau diese Antikörper die Rezeptorfunktion beeinflussen und als allosterische Modulatoren der Rezeptoraktivität agieren können, indem sie Konformationsänderungen des Rezeptors - ähnlich wie Agonisten oder partielle Agonisten - reduzieren, induzieren und/oder stabilisieren [86, 168]. Da das schädigende Potential eines spezifischen (Auto)Antikörpers sowohl von der Erreichbarkeit als auch von der funktionellen Relevanz seiner Zielstruktur abhängt, spielen solche Antikörper, die an der Zelloberfläche binden und die Kardiomyozytenfunktion zum Beispiel durch Modulation des β_1 -AR beeinflussen können, möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz [34, 50, 113].

1.4.5. Pathogenetische Bedeutung stimulierender Autoantikörper

Der Nachweis der autoimmunen Genese einer Erkrankung kann entsprechend den Koch'schen, von Witebsky leicht modifizierten Postulate [155] sowohl direkt als auch indirekt erbracht werden. Für den direkten Nachweis sollte dabei ein Transfer homologer pathogener Antikörper oder autoreaktiver T-Zellen von einem zum anderen Organismus derselben Spezies dieselbe Erkrankung reproduzieren [155]. Zur Analyse des pathogenetischen Potentials stimulierender β_1 -EC_{II}-Antikörper wurden Inzuchtratten mit einem Fusionsprotein, welches β_1 -EC_{II} enthielt, immunisiert. Die Tiere entwickelten daraufhin sowohl stimulierende β_1 -EC_{II}-Antikörper als auch eine langsam progrediente kardiale Dilatation und Dysfunktion, die dem Phänotyp einer DCM entsprachen. Dieser Phänotyp konnte durch anschließende Übertragung der Autoantikörper auf herzgesunde isogene Ratten reproduziert werden [75]. Bei der detaillierten Untersuchung der zeitlichen Entwicklung des kardiomyopathischen Phänotyps dieser Ratten zeigte sich in den ersten Monaten ein progredienter Anstieg des systolischen Blutdrucks sowie eine linksventrikuläre Hypertrophie, die ab dem neunten Monat einer Dilatation mit langsam, aber stetig ansteigenden linksventrikulären Durchmessern wich [79]. Zudem kam es mit der Ausbildung der DCM auch zu einer selektiven β_1 -AR-Downregulation, ein Phänomen, das bei der humanen DCM ebenfalls auftritt [109]. Diese Ergebnisse deuten zusammen mit dem gezeigten Agonist-ähnlichen Kurzzeiteffekt (moderater Anstieg von Kontraktilität und Blutdruck) der Antikörper in vivo [75] darauf hin, dass der induzierte und transferierte kardiomyopathische Phänotyp in erster Linie einer milden, aber permanenten Rezeptoraktivierung durch stimulierende β_1 -EC_{II}-Antikörper zuzuschreiben ist. Diese Hypothese wird durch eine große Anzahl an Daten zu kardiotoxischen Effekten einer exzessiven und/oder anhaltenden Aktivierung des β -adrenergen Systems durch genetische oder pharmakologische Manipulation untermauert [35, 175]. Aufgrund des erfolgreichen Induktions- und Transferexperiments sollte die mit β_1 -AR-Antikörpern assoziierte dilatative Immunkardiomyopathie als eigenständige Krankheitsentität betrachtet werden, analog anderer Rezeptor-vermittelter Autoimmunerkrankungen wie z.B. die Myasthenia gravis oder der Morbus Basedow [50, 67].

1.4.6. Klinische Relevanz kardialer Autoantikörper

Die tatsächliche klinische Bedeutung von Autoantikörpern gegen kardiale Antigene ist schwer zu beurteilen, da niedrige Titer solcher Antikörper als Teil des natürlichen immunologischen Repertoires auch bei Gesunden vorkommen [154]. Die Prävalenz funktionell aktiver, d.h. stimulierender β_1 -AR-Antikörper ist mit weniger als 1 % bei gesunden Individuen aber vernachlässigbar gering, wenn der β_1 -AR für das Antikörper-Screening in seiner natürlichen Konformation präsentiert wird [81]. Unter dieser Prämisse sind auch bei Patienten mit Herzklappenerkrankungen und/oder hypertensiver Herzerkrankung kaum relevante Mengen zirkulierender Antikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor detektierbar [80]. Im Gegensatz dazu lassen sich stimulierende β_1 -EC_{II}-Antikörper bei ca. 15 % der Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und sogar bei bis zu 30 % der Patienten mit DCM nachweisen [81, 164]. Ihre Prävalenz liegt damit bei diesen Erkrankungen deutlich über derjenigen gesunder Probanden, aber im unteren Wertespektrum älterer Studien, bei denen Antikörperprävalenzen zwischen 33 % und 95 % berichtet wurden [105, 115, 170]. Für die große Variation dieser Angaben sind wahrscheinlich Unterschiede in den zur Detektion konformationaler β_1 -AR-Antikörper verwendeten Screening-Methoden verantwortlich. In Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe war nur ein kleiner Anteil der mit ELISA nachgewiesenen Antikörper auch tatsächlich in der Lage, an den nativen β -AR zu binden, und nur diese Fraktion erkannte und aktivierte auch den in der Zellmembran intakter Zellen exprimierten humanen β_1 -AR [76, 81]. Deshalb sollten für die Detektion von funktionell relevanten β_1 -AR-Antikörpern zukünftig nurmehr Zellsysteme eingesetzt werden, die die Zielstruktur (resp. den β_1 -AR) in ihrer natürlichen Konformation präsentieren [137].

Klinische Pilotstudien mit DCM-Patienten deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen oder Auftreten funktionell aktiver β_1 -AR-Antikörper, einer stärkeren Einschränkung der kardialen Pumpfunktion [81], dem Auftreten von schwerwiegenderen ventrikulären Arrhythmien [20] und einer höheren Inzidenz des plötzlichen Herztodes [73] im Vergleich zu Antikörper-negativen Patienten hin. In einer Follow-up Studie, die Antikörper-positive und Antikörper-negative

DCM-Kollektive über einen Zeitraum von mehr als zehn Jahren vergleichend untersuchte, bestätigte sich eine höhere Prävalenz ventrikulärer Arrhythmien bei β_1 -AR-Antikörper-positiven Patienten. Zudem ergab sich, dass das Vorhandensein solcher funktionell aktiver Antikörper mit einem dreifach erhöhten kardiovaskulären Mortalitätsrisiko einherging [164]. Zusammengefasst unterstreichen diese Daten die potentielle klinische Relevanz funktionell aktiver β_1 -AR-Antikörper, sodass die Entwicklung von gezielt Antikörper-gerichteten Therapieansätzen weiter vorangetrieben werden sollte [50, 67].

1.5. Therapie

1.5.1. Allgemeine Maßnahmen

Für die meisten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sind keine spezifischen Therapievorschriften vorhanden. Vorrangige Behandlungsziele sind deshalb die Kontrolle der Symptomatik sowie die Prävention des Fortschreitens der Erkrankung und des Auftretens der damit verbundenen Komplikationen wie plötzlicher Herztod und Thromboembolien. Die Aufklärung der Patienten über die Erkrankung ebenso wie die Sicherstellung der Compliance sind wichtige Säulen im Behandlungskonzept der DCM. Der Patient sollte die mit ihr assoziierten Symptome, Risikofaktoren und Therapieoptionen mit den jeweiligen Nebenwirkungen kennen. Durch ihn selbst beeinflussbare Faktoren wie Gewichtskontrolle, Nikotinkarenz, Blutdrucküberwachung und körperliche Aktivität können die Progression der DCM verzögern und die Lebensqualität erhöhen [25].

1.5.2. Pharmakologische Therapie

Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz, unabhängig von der ihr zugrunde liegenden Ätiologie. Aus diesem Grund sind *angiotensin converting enzyme (ACE) Hemmer* Basistherapeutika zur Behandlung der Herzinsuffizienz. Sie verbessern mittelfristig die ventrikuläre Funktion und Belastbarkeit, reduzieren

die Hospitalisierungsrate und senken die kardiovaskuläre Mortalität [150]. Sie beugen außerdem einem Fortschreiten der Erkrankung und dem linksventrikulären Remodeling vor [124].

Der zirkulierende Angiotensin II-Spiegel kann sich bei einer langfristigen ACE-Hemmung wieder erhöhen. *Angiotensin II-Rezeptor-Blocker (ARB)* binden kompetitiv an den AT₁-Rezeptor und können so dieses Escape-Phänomen umgehen [13]. In einer großen Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass ARBs allerdings vorwiegend bei solchen Patienten eingesetzt werden sollten, die unter den Nebenwirkungen eines ACE-Hemmers leiden [103].

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass eine übermäßige sympathische Aktivität zu den klinischen Symptomen der Herzinsuffizienz beiträgt. Die *β-Rezeptorblocker* greifen direkt in diesen Mechanismus ein und verhindern eine Downregulation der *β*-adrenergen Rezeptoren in der Kardiomyozytenmembran [160]. Daneben kommt es durch eine Verlängerung der Diastolendauer zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung des Herzens. Bei Aktivierung des *β*₁-AR durch Autoantikörper können deren stimulierende Effekte mit *β*-Blockern zum Teil deutlich abgeschwächt werden [50, 76, 120]. Außerdem kann durch *β*-Blocker das Risiko für plötzlichen Herztod und für Tod durch Aggravation der Herzinsuffizienz deutlich reduziert werden. Als gesichert gilt dieser Effekt jedoch nur für die Wirkstoffe Carvedilol [142], Bisoprolol [1], Metoprolol [2] und Nebivolol [46].

Im Plasma von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz findet man häufig hohe Aldosteronkonzentrationen. Aldosteron trägt zu Natriumretention, Kaliumverlust, Sympathikusaktivierung, myokardialer Fibrose und Barorezeptordysfunktion bei. Patienten mit Myokardinfarkt in der Anamnese und einer EF ≤ 40 % sowie NYHA Klasse III oder IV, wahrscheinlich aber auch NYHA II, profitieren von der zusätzlichen Einnahme der *Aldosteronantagonisten* Spironolacton oder Eplerenon, indem Hospitalisierungsrate und Mortalitätsrisiko reduziert werden [147, 148, 177].

Die symptomatische Gabe von *Diuretika* kommt in Frage, wenn Zeichen einer exzessiven Flüssigkeitsretention wie pulmonale Stauung oder periphere Ödeme auftreten. Diuretika sollten jedoch nicht als alleiniges Medikament eingesetzt werden, da sie die neurohumorale Aktivierung verstärken und auf diese Weise die Herzinsuffizienz auch verschlimmern können [30].

1.5.3. Nicht-pharmakologische Therapie

Der Einsatz von Schrittmachern wird heute regelmäßig als (mechanisch-)therapeutischer Ansatz bei Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz diskutiert, bei denen nach Ausschöpfung der Pharmakotherapie keine Verbesserung der Symptome erzielt werden konnte. In jüngerer Zeit wurde vermehrt die kardiale Resynchronisationstherapie mit biventrikulärer Stimulation eingesetzt, um Patienten mit Leitungsstörungen wie ventrikulären Arrhythmien, die durch die Herzinsuffizienz induziert waren, zu behandeln. In vielen Fällen konnte dadurch die NYHA Klasse, die Ejektionsfraktion und die Lebensqualität verbessert werden [3]. Die Auswertung einer Metaanalyse bestätigte in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Herzerkrankung bei bestimmten Patientenkollektiven sogar eine signifikante Senkung der Morbidität und Mortalität durch diese Therapieform [123].

Patienten, die auf eine medikamentöse Therapie nicht ansprechen und sich in einem fortgeschrittenen Stadium oder im Endstadium der Erkrankung befinden, kann letztlich nur mit einer Herztransplantation geholfen werden. Es besteht Konsensus, dass dadurch Überleben, Belastbarkeit und Lebensqualität im Vergleich zu einer konventionellen Behandlung deutlich erhöht werden können. Diese Therapieoption ist wegen der langen Wartezeit auf ein Spenderherz und dem Mangel an verfügbaren Organen allerdings mit deutlichen Einschränkungen verbunden.

Bei Patienten im Endstadium der Herzinsuffizienz, die auf eine Herztransplantation warten, kann die Implantation eines *left ventricular assist device (LVAD)* die Zeit überbrücken, bis ein geeignetes Organ verfügbar ist. Ein LVAD trägt unter Umständen dazu bei, die hämodynamischen Parameter und die Funktion des Herzens zu verbessern, erhöht meist die Belastbarkeit und ermöglicht den Patienten ein Leben außerhalb der Klinik, wenngleich bei der LVAD-Therapie auch Komplikationen wie Infektion, Geräteausfall oder Blutung auftreten können [153].

1.5.4. Immunomodulatorische Therapie

1.5.4.1. Immunsuppression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Autoimmunität eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der dilatativen Immunkardiomyopathie spielt [75], rückt in den letzten Jahren das Immunsystem als therapeutischer Angriffspunkt mehr und mehr in den Fokus neuer Therapieansätze.

Bei gesicherter autoimmuner Genese wäre eine Immunsuppression zur Behandlung dieser Krankheitsentität durchaus vorstellbar. Der Einsatz von Prednisolon, Cyclosporin oder Azathioprin konnte bisher aber keinen überzeugenden Effekt bezüglich hämodynamischer Parameter oder Mortalitätsreduktion hervorrufen [119]. Zwei Studien an Patienten mit inflammatorischer dilatativer Kardiomyopathie konnten unter bestimmten Voraussetzungen (myokardbiopischer Ausschluss einer Virusreplikation bei positiven Zellinfiltraten) eine Verbesserung kardialer Parameter durch Prednison und Azathioprin zeigen [52, 174], so dass in solchen Fällen eine immunsuppressive Therapie möglicherweise angezeigt ist.

1.5.4.2. Intravenöse Immunglobulintherapie

Die intravenöse Verabreichung von Immunglobulin G (IgG) wird seit vielen Jahren erfolgreich zur Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen eingesetzt [94]. Auch für die DCM wurden Studien mit IgG durchgeführt, die aber keine einheitlichen Resultate erbrachten und keinen eindeutigen Benefit dieser Therapieform nachweisen konnten [60, 126]. Somit bleibt ihr Nutzen fragwürdig, zumal sie mit hohen Kosten verbunden ist.

1.5.4.3. Immunoabsorption

Einen interessanten therapeutischen Ansatz stellt die Elimination stimulierender β_1 -AR-Antikörper mittels unselektiver oder selektiver Immunoabsorption (IA) dar [67, 133]. In mehreren Studien konnte für beide Verfahren sowohl eine kurzfristige als auch eine langfristige Verbesserung funktioneller und struktureller Parameter sowie eine Reduktion der zirkulierenden Antikörpermenge nachgewiesen wer-

den [40, 122, 131]. Da die unselektive IA, bei der verschiedene Antikörperklassen eliminiert werden, wie auch die selektive IA vergleichbare Resultate liefern, bleibt unklar, welche weiteren Faktoren zum Erfolg dieses Verfahrens beitragen. Mobini et al. beobachteten eine Verbesserung hämodynamischer Parameter sowohl in der β_1 -AR-Antikörper-positiven als auch in der β_1 -AR-Antikörper-negativen Gruppe, so dass sich der therapeutische Effekt wahrscheinlich auf die Entfernung vieler unterschiedlicher Immunglobulinklassen mit eventuell synergistischer Wirkung zurückführen lässt [131].

1.5.4.4. Zylopeptidtherapie

Ein neues und ersten tierexperimentellen Studien zufolge vielversprechendes Verfahren ist die Neutralisierung bzw. Eliminierung aktivierender β_1 -AR-Antikörper [84] und die Induktion einer Immuntoleranz durch Modulation der Antikörper produzierenden B-Zellen [4]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die prophylaktische Applikation eines kürzlich entwickelten β_1 -EC_{II}-homologen Zylopeptids im Rattenmodell die Menge zirkulierender β_1 -EC_{II}-Antikörper signifikant senkt und der Entwicklung einer Dilatation oder Dysfunktion des Herzens vorbeugt [77]. Innerhalb weniger Therapiemonate wurde zudem trotz fortgesetzter Immunisierung die Nachproduktion solcher β_1 -EC_{II}-Antikörper weitgehend gestoppt [79, 84].

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Immunisierung und Therapie der Tiere

Die Versuche wurden mit männlichen Inzuchtratten vom Stamm Lewis/CrlBR nach Antragsvorlage und Genehmigung durch die Tierethikkommission der Universität Würzburg durchgeführt. 40 Ratten wurden über einen Zeitraum von 20 Monaten monatlich subkutan mit einem Fusionsprotein zwischen Glutathion-S-Transferase (GST) und der zweiten extrazellulären Domäne des β_1 -adrenergen Rezeptors (β_1 -EC_{II}; Aminosäuren 195-225) immunisiert [75]. Neun Monate nach der im ELISA und im Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) assay [137] nachgewiesenen Generierung funktionell aktivierender Antikörper gegen β_1 -EC_{II} und Induktion eines dilatativen kardiomyopathischen Phänotyps wurde einem Teil der Ratten ein lineares bzw. ein neu entwickeltes β_1 -EC_{II}-homologes zyklisches Peptid aus 18 bzw. 25 Aminosäuren (AS) appliziert. Bei diesen Peptiden wurde entweder die primäre Aminosäuresequenz von β_1 -EC_{II} beibehalten oder es wurde ein Cystein in der Kette gegen ein Serin ausgetauscht (Abbildung 3). Die Behandlungsgruppen umfassten monatliche intravenöse Gaben von 1,0 mg/kg Körpergewicht eines

- (a) 25 AS langen zyklischen Peptids (EC_{II}-25CP), n=10
- (b) 25 AS langen linearen Peptids (EC_{II}-25LIN), n=5
- (c) 18 AS langen mutierten zyklischen Peptids (EC_{II}-18CPm), bei dem ein Cystein durch ein Serin ersetzt wurde, n=10
- (d) 18 AS langen mutierten linearen Peptids (EC_{II}-18LINm), n=5.

Eine immunisierte Versuchsgruppe erhielt keine spezifische Behandlung (Beta1 unbehandelt, positive Kontrollgruppe), n=10.

Als Kontrolle dienten nicht immunisierte Ratten, denen monatlich 0,9% NaCl injiziert wurde (negative Kontrollgruppe), n=10.

Die spezifischen Antikörpertiter gegen β_1 -EC_{II} wurden jeweils direkt vor sowie 24 Stunden nach der Peptidinjektion mittels ELISA kontrolliert. Hierzu wurde den Versuchstieren jeweils 500 μ l Blut aus der Schwanzvene entnommen.

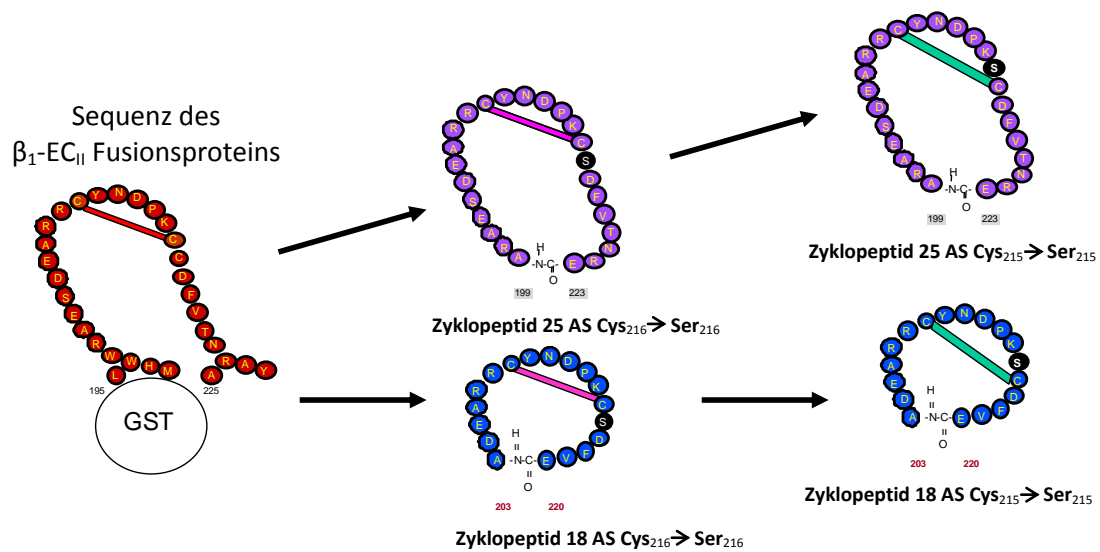


Abbildung 3: Struktur der Cystein/Serin Zyklopeptide

Die Abbildung zeigt Beispiele möglicher Cystein/Serin Austauschvarianten mit verschiedenen Cystein-haltigen Zyklopeptidvarianten der zweiten extrazellulären Schleife des β_1 -adrenergen Rezeptors.

AS ist dabei die Abkürzung für Aminosäuren, die voranstehende Zahl beziffert die Anzahl der im Ring vorhandenen Aminosäuren. Der Balken innerhalb der Ringstruktur stellt die wahrscheinliche Disulfidbrücke dar.

2.2. Echokardiographie

Die Versuchstiere wurden vor Beginn der Immunisierung und im weiteren Verlauf alle drei Monate echokardiographisch untersucht und gewogen. Die Untersuchung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Echokardiographiegerät (Vevo 770, VisualSonics Inc.; Toronto, Canada), ausgestattet mit einem 17,5 MHz Schallkopf. Die Ratten wurden mit 40 mg/kg KG Ketamin-HCl und 7,5 mg/kg KG Xylazin intraperitoneal leicht anästhesiert, sodass nach wenigen Minuten eine ausreichend tiefe Sedierung ohne Beeinträchtigung der Spontanatmung erzielt wurde. Dann wurde das Fell im thorakalen Bereich mit einem veterinären Langhaarschneidegerät ent-

fernt. Das zu untersuchende Tier wurde anschließend in Rückenlage auf einer speziell konstruierten und auf 37 °C gewärmten Tischvorrichtung fixiert. Die M-Mode Registrierungen erfolgten in der parasternalen Längs- und Querachse des Herzens. Der Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstrakts wurde enddiastolisch auf Höhe der Aortenklappe (Aortendurchmesser), die Dicken der linksventrikulären Vorder- (AW) und Hinterwand (PW) endsystolisch auf Papillarmuskelebene gemessen. Zusätzlich wurden die Durchmesser der linken Herzhöhle enddiastolisch (LVED) und endsystolisch (LVES) den Leitlinien der American Society for Echocardiography [106] entsprechend bestimmt und hieraus die Verkürzungsfraction (fractional shortening, FS) des linken Ventrikels errechnet. Der Pulsed-Wave-Doppler wurde im apikalen Fünfkammerblick zur Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit über der Aortenklappe eingesetzt. Aus dem Flussprofil wurde das Geschwindigkeits-Zeit-Integral (VTI) des LV-Ausflusses bestimmt, das dann zusammen mit dem Aortendurchmesser und der instantanen Herzfrequenz der Berechnung des Schlag- (SV) bzw. Herzzeitvolumens (HZV) diene. Aus dem HZV, bezogen auf das Körpergewicht der Ratte, wurde der Herzindex (CI) errechnet. Der Untersucher war bezüglich der Zugehörigkeit der Tiere zu den einzelnen Gruppen geblindet.

2.3. Herzkatheteruntersuchung und Organentnahme

Zwei bis drei Tage nach der letzten Echokardiographieuntersuchung wurden die Ratten invasiv mittels Linksherzkatheter untersucht. Die Tiere wurden dazu, wie zur Echokardiographie, leicht anästhesiert, mit dem Rücken auf einen 37 °C warmen Tisch gelegt und an den Extremitäten fixiert. Nach mikroskopisch durchgeführter Präparation der rechten Arteria carotis interna wurde ein 2,1 F Katheter (Millar Instruments Inc.; Houston, TX, USA) unter permanenter Druckkontrolle über eine ca. 0,5 mm lange Inzision der Gefäßwand via Aorta ascendens in den linken Ventrikel vorgeschoben und die Druckkurve des linken Ventrikels danach über mindestens 15 Minuten digital aufgezeichnet (PowerLab, A.D. Instruments; Colorado Springs, CO, USA). Die Auswertung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt off-

line und verblindet. Registriert wurden zudem die Herzfrequenz (HF), der maximale linksventrikuläre systolische (LVP) und enddiastolische (LVEDP) Druck sowie die Druckanstiegsgeschwindigkeit (Kontraktilität $+dP/dt$) und die Druckabfallsgeschwindigkeit (Relaxation $-dP/dt$).

Nach Herausziehen des Katheters aus der Arteria carotis interna wurde über die vorhandene Öffnung in der Gefäßwand eine Blutprobe des Tieres entnommen.

Unmittelbar anschließend wurden die Ratten tief narkotisiert (70 mg/kg KG Pentobarbital intraperitoneal). Nach Ausbleiben aller (provozierten) Schmerzreaktionen wurde zunächst die Bauchhöhle durch einen Mittellinien- und Rippenbogenrandschnitt eröffnet, dann wurde der Thorax durch Inzision des Zwerchfells und beidseitige parasternale Längsschnitte bis zur Clavicula offengelegt. Obere und untere Hohlvene wurden jeweils an der Mündung in den rechten Vorhof, die Pulmonalarterienstämme und die Aorta ascendens wurzelnah abgesetzt und das Herz entnommen. Der Zeitbedarf zwischen der Applikation von Pentobarbital und Herzentnahme betrug stets weniger als zwei Minuten. Das noch schlagende Herz wurde sofort in eisgekühlten Relaxationspuffer (5% Dextrose, 25mmol/L KCl in PBS) überführt und mit derselben Lösung gespült. Anhängende Gewebeteile anderer Organe wie Thymus oder Lunge wurden entfernt und das feuchte Herzgewicht nach kurzem Abtropfen ermittelt.

Für die weitere Analyse des Herzgewebes wurden apikal 3 mm der Herzspitze abgetrennt, sofort in Isopentan (-56 °C) eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Damit wurden später Kryoschnitte angefertigt und der Kollagengehalt des Gewebes unter Einsatz kollagenspezifischer Antikörper mittels Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Aus dem Herzrumpf wurden Paraffinschnitte erstellt, anhand derer das Herz nach HE- bzw. WGA-Färbung der Schnitte histologisch und morphometrisch analysiert werden konnte.

2.4. Histologie

2.4.1. Erstellen der Paraffinschnitte

Die Herzrumpfe wurden im Rahmen der automatisierten Routinepräparation im Institut für Pathologie der Universität Würzburg in flüssiges, 60 °C heißes Paraffin überführt, durch aufsteigende Ethanollösungen entwässert, in Paraffinblöcke gegossen und anschließend auf einer Kälteplatte ausgehärtet.

Pro Herz wurden am Mikrotom (Leica Microsystems; Nussloch, Deutschland) mehrere 2 µm dicke Gewebescheiben geschnitten, wobei die Schnittebene jeweils so gewählt wurde, dass sie die Papillarmuskeln des Ventrikels enthielt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die morphometrische Auswertung nicht durch unterschiedliche Durchmesser in variierenden Ebenen verfälscht wurde. Während die Paraffinblöcke nicht bearbeitet wurden, lagen sie permanent zum Kühlen auf einer Kälteplatte. Die Paraffinschnitte wurden auf Objektträger (Super Frost Plus, R. Langenbrinck; Teningen, Deutschland) aufgebracht und anschließend bei 37 °C getrocknet.

2.4.2. Makroskopisch-morphometrische Analyse

Die Bestimmung von Strecken und Flächen des Herzens erfolgte an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Paraffinschnitten. Dazu wurden die nativen Schnitte mit Roti-Histol und absteigend konzentrierten Ethanollösungen entparaffinisiert und in destilliertes Wasser überführt. Als nächstes folgte die Färbung mit HE und das Durchlaufen von Ethanollösungen aufsteigender Konzentration (Tabelle 1), bevor die fertig gefärbten Schnitte im letzten Schritt mit Deckgläsern eingedeckt wurden. Anschließend wurde ein Gewebeschnitt pro Tier ausgewählt, digitalisiert und codiert, sodass eine direkte Zuordnung zu den einzelnen Versuchsgruppen nicht mehr möglich war. Analog zu der echokardiographischen Untersuchung wurde jeweils die Dicke der linksventrikulären Vorderwand (AW) und Hinterwand (PW) sowie der Durchmesser der linken Herzhöhle (LVCD) gemessen. Daneben wurden die Querschnittsflächen des gesamten linken Ventrikels (LVA) und der linken Herzhöhle (LVCA) bestimmt. Aus den so gewonnenen Werten ließen sich die Mus-

kelquerschnittsfläche des linken Ventrikels (LVWA) und deren Anteil an der totalen Ventrikelquerschnittsfläche (LVWA/LVA) berechnen (Abbildung 4).

Die Digitalisierung erfolgte mit einem Computerscanner (Epson Expression 1600), die Auswertung computergestützt mit Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.; San Jose, CA, USA).

Vorgang	Agens	Zeit
Entparaffinieren	Roti-Histol	3 x 4 Min.
	Ethanol-Lösung (100 %)	3 x 2 Min.
	Ethanol-Lösung (70 %)	2 Min.
	Aqua dest.	4 x 30 Sek.
Färben	Hämalaun	10 Min.
	Leitungswasser	10 Min.
	Eosin	50 Sek.
	Aqua dest.	2 x 30 Sek.
Entwässern	Ethanol-Lösung (70 %)	1 Min.
	Ethanol-Lösung (100 %)	4 x 2 Min.
	Roti-Histol	2 x 3 Min.

Tabelle 1: Protokoll der HE-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst über Roti-Histol und Ethanollösungen entparaffiniert und in Aqua dest. überführt, bevor die Färbung mit Hämalaun und Eosin erfolgte. Alle Schnitte wurden schließlich nach aufsteigender Ethanolreihe und Roti-Histol eingedeckt.

2.4.3. Mikroskopisch-morphometrische Analyse

Für die Größenbestimmung von Zellen und deren Zellkernen wurden die nativen Paraffinschnitte mit einer Kombination der fluoreszenzmarkierten Farbstoffe WGA (Weizenkeim-Agglutinin) und Hoechst gefärbt (Tabelle 2). WGA lagert sich in die Zellmembranen, der Farbstoff Hoechst in die Zellkerne ein. Unter Anregung mit ultraviolettem Licht und Einsatz von Filtern mit Maxima im grünen bzw. blauen

Spektrum wurden die grün angefärbten Zellmembranen und die blau angefärbten Zellkerne unter dem Mikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss; Göttingen, Deutschland) sichtbar. Aus der Wand des linken Ventrikels wurden bei jedem Tier mikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung sechs Bereiche ausgewählt und mittels angeschlossener Fotokamera (AxioCam HRc, Carl Zeiss) sowie zugehöriger Software (AxioVision V4.6, Carl Zeiss) digitalisiert. Pro aufgenommenem Bereich wurde später computergestützt die Fläche von zehn quer geschnittenen Zellen einschließlich Zellkernen analysiert (Abbildung 5). Die Auswertung erfolgte wiederum verblindet.

Agens	Zeit
Roti-Histol	3 x 4 Min.
Ethanol-Lösung (100 %)	3 x 2 Min.
Ethanol-Lösung (70 %)	2 Min.
Aqua dest.	4 x 30 Sek.
PBS	2 x 1 Min.
Proteinase K	20 Min. bei 37 °C
PBS	2 x 1 Min.
WGA + Hoechst	30 Min. bei 37 °C
PBS	3 x 5 Min.

Tabelle 2: Protokoll für die Färbung mit WGA und Hoechst

Nach Entparaffinisieren und Waschen der Schnitte wurde Proteinase K aufgebracht, um eine Anlagerung der Farbstoffe an Proteine zu verhindern. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe im Brutschrank mit Weizenkeim-Agglutinin (WGA) und Hoechst inkubiert, danach unspezifisch gebundener Farbstoff durch Waschen entfernt und die Schnitte abschließend eingedeckt. PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung.

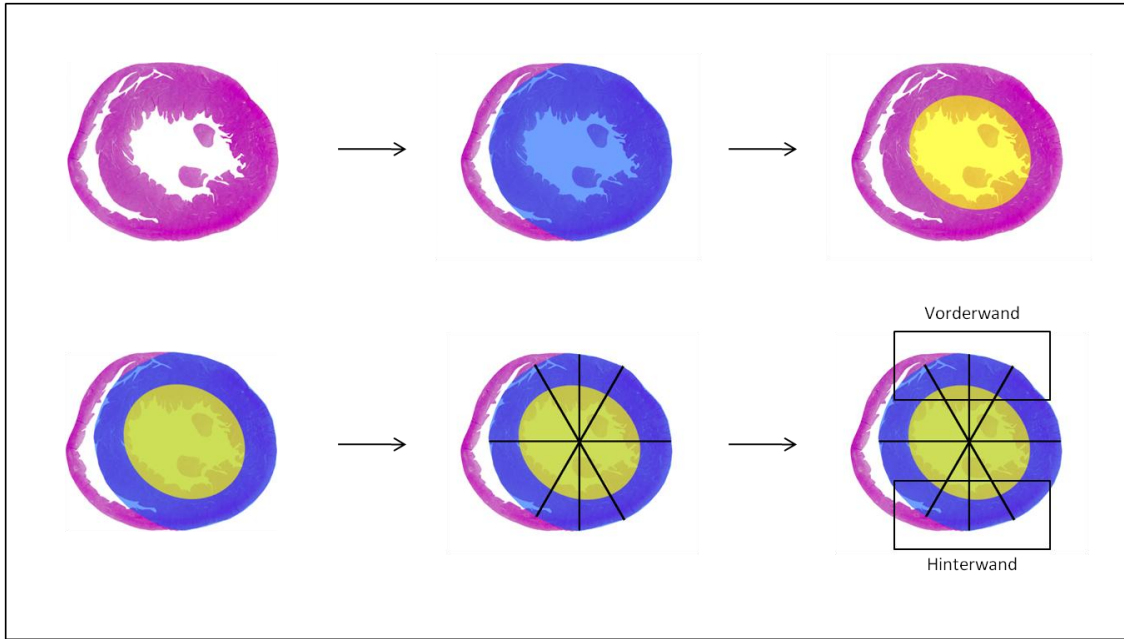


Abbildung 4: Makroskopisch-morphometrische Auswertung der Paraffinschnitte

Abgebildet ist ein HE-gefärbter Querschnitt eines Rattenherzens mit den gut erkennbaren Papillarmuskelanschnitten (oben links). Die Flächen von LVA (blau, oben Mitte) und LVCA (gelb, oben rechts) wurden, wie dargestellt, computergestützt ermittelt. Der LVCD ergab sich aus dem Mittelwert der vier dargestellten Strecken (unten Mitte), für die Dicke der Vorder- und Hinterwand wurden je drei Messungen durchgeführt (unten rechts). Erläuterung der Abkürzungen siehe Text.

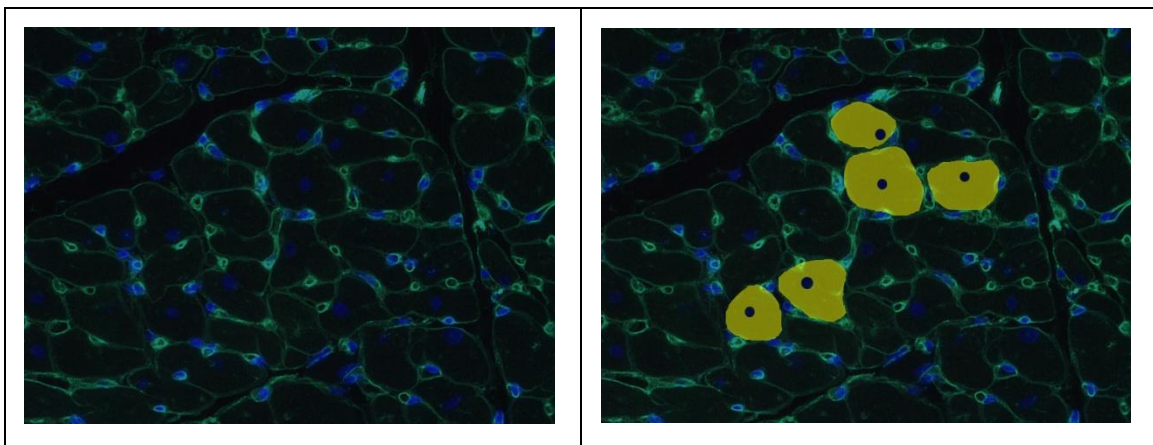


Abbildung 5: Mikroskopisch-morphometrische Auswertung

Im hier dargestellten Ausschnitt aus dem linken Ventrikel sind die Zellmembranen und die Nuclei grün bzw. blau angefärbt (links). Zellen, die die vorgegebenen Kriterien erfüllten, wurden zunächst farblich markiert (rechts), bevor ihre Flächen sowie die Größe der entsprechenden Zellkerne computergestützt ermittelt wurden.

2.5. Kollagenanalyse

2.5.1. Immunhistochemie

Zur Darstellung einzelner Kollagentypen wurden spezifisch gegen Kollagen I bzw. III gerichtete Primärantikörper verwendet, an die in einem zweiten Schritt entsprechende Immunfluoreszenz-markierte Sekundärantikörper gekoppelt wurden. Kryoschnitte der Dicke 5 µm wurden bei -28 °C mit dem Cryostat (Leica CM3050 S; Wetzlar, Deutschland) erstellt, auf Objektträger aufgebracht und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Für die Antikörperfärbung wurden die Schnitte für 5 Min. in kaltem Aceton (-20 °C) fixiert und danach 3 x 5 Min. unter permanenter Bewegung in PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit einem Blockierpuffer (2 % BSA und 2 % NGS in PBS) in der Feuchtigkeitskammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt, bevor das Gewebe über Nacht bei 4 °C mit den spezifischen Antikörpern inkubiert wurde. Hierzu wurden monoklonale Mausantikörper gegen Kollagen I (Abcam; Cambridge, UK) und polyklonales Immunglobulin G (IgG) Kaninchen anti-Ratte gegen Kollagen III (AbD Serotec; Düsseldorf, Deutschland), jeweils 1:200 in Inkubationspuffer (2 % BSA und 1 % NGS in PBS) verdünnt, eingesetzt. Als Negativkontrolle mitgeführte Schnitte wurden anstelle des Primärantikörpers nur mit Puffer inkubiert. Danach wurden die Präparate 3 x 10 Min. in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden in der Dunkelkammer die lichtempfindlichen Sekundärantikörper Cy3 Ziege anti-Maus IgG (Dianova; Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:800 bzw. Alexa 488 (Invitrogen; Paisley, UK) Ziege anti-Kaninchen in einer Verdünnung von 1:100 aufgebracht und für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3 x 10 Min. unter ständiger Bewegung in PBS wurden die Schnitte abschließend mit Mowiol eingedeckt.

Die Analyse des Gehalts an Kollagen I und III erfolgte durch systematische Aufnahme von sechs Bereichen des Myokards pro Schnitt bei 200-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop und nachfolgender geblindeter computergestützter Auswertung.

2.5.2. Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) ist ein Verfahren, mit dem Nukleinsäuren auf Grundlage der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und gleichzeitig (durch Messung eines Fluoreszenzsignals) quantifiziert werden.

Dafür wurde zunächst die RNA aus 30 mg gefrorenem Herzgewebe pro Ratte mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) isoliert und deren Menge spektrometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Synthese der komplementären DNA unter Einsatz des High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) mit folgendem Reaktionsansatz:

6 µl RNase-freies Wasser
4 µl Master Mix + RT-Puffer
10 µl RNA (0,1 µg/µl)

Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert, bevor die reverse Transkription nach folgendem Schema im Thermocycler (GeneAmp 9700, Applied Biosystems) ablief:

5 Min. bei 25 °C
30 Min. bei 42 °C
5 Min. bei 85 °C
Konservierung bei 4 °C

Für die quantitative real-time PCR wurden der Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies; La Jolla, CA, USA) und die entsprechenden Primer (Tabelle 3) verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus:

0,2 µl Vorwärtsprimer (20 pmol/µl)
0,2 µl Rückwärtsprimer (20 pmol/µl)
3,6 µl Nuclease-freies PCR-grade Wasser
6,0 µl Master Mix
10 ng cDNA

Die Reaktion lief im Thermocycler (CFX384, Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) unter folgenden Bedingungen ab:

Temperatur	Dauer pro Zyklus	Zyklen
95 °C	3 Min.	1
95 °C	5 Sek.	40
60 °C	10 Sek.	

Die Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse kontrolliert. Die relativen Expressionslevel wurden aus einer Standardkurve abgeleitet und gegen GAPDH, das als endogene Kontrolle diente, normalisiert.

Primer	5' - 3' Sequenz
Kollagen I	
Vorwärtsprimer	AAGGCAACAGTCGATTCACC
Rückwärtsprimer	ATGACTGTCTTGCCCCAAGT
Kollagen III	
Vorwärtsprimer	ACACAGTTCTAGAGGATGGCTGCAC
Rückwärtsprimer	GGGAGTCTCATGGCCTTGCGTG

Tabelle 3: Primer für die quantitative real-time PCR

2.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA, USA). Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Entwicklung der echokardiographisch bestimmten linksventrikulären Durchmesser der Versuchsgruppen wurde mittels two-way ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test auf Unterschiede getestet. Die weiteren morphologischen und funktionellen Parameter aus Echokardiographie und Herzkatheteruntersuchung sowie die aus Paraffin-fixiertem oder nativem Herzgewebe ermittelten molekularen, morphometrischen und immunhistochemischen Daten wurden mit einem one-way ANOVA gefolgt von einem Dunnett-Test auf signifikante Unterschiede überprüft. In der Arbeit jeweils angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) der jeweiligen Messungen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Antikörpertiter

Die Konzentration von β_1 -EC_{II}-Immunglobulin G (IgG) zeigte im Verlauf des Beobachtungszeitraums bei den Ratten, die Zyklopeptidinjektionen erhielten, eine deutliche Abnahme gegenüber immunisierten unbehandelten Tieren. Der Titer stieg bei β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Tieren während der ersten beiden Studienmonate um 21 % gegenüber dem Ausgangswert an, bevor er im weiteren Verlauf kontinuierlich abnahm und am Ende bei 60 % des initialen Wertes lag. Durch Applikation der zyklischen Peptide gelang es, den Antikörpertiter zu senken, wobei der deutlichste Effekt bei Einsatz von EC_{II}-25CP zu beobachten war. Hier wurde die IgG Konzentration bei der ersten Verabreichung unmittelbar auf 30 % des Ausgangswertes gesenkt und lag am Ende des Beobachtungszeitraums bei weniger als 6 % des initialen Wertes. Auch mit EC_{II}-18CPm konnte eine signifikante Reduktion der β_1 -EC_{II}-Antikörper erzielt werden (Abbildung 6). Die linearen Peptide hingegen besaßen eine schlechtere Wirksamkeit und erreichten keine relevante Reduktion der zirkulierenden Antikörper.

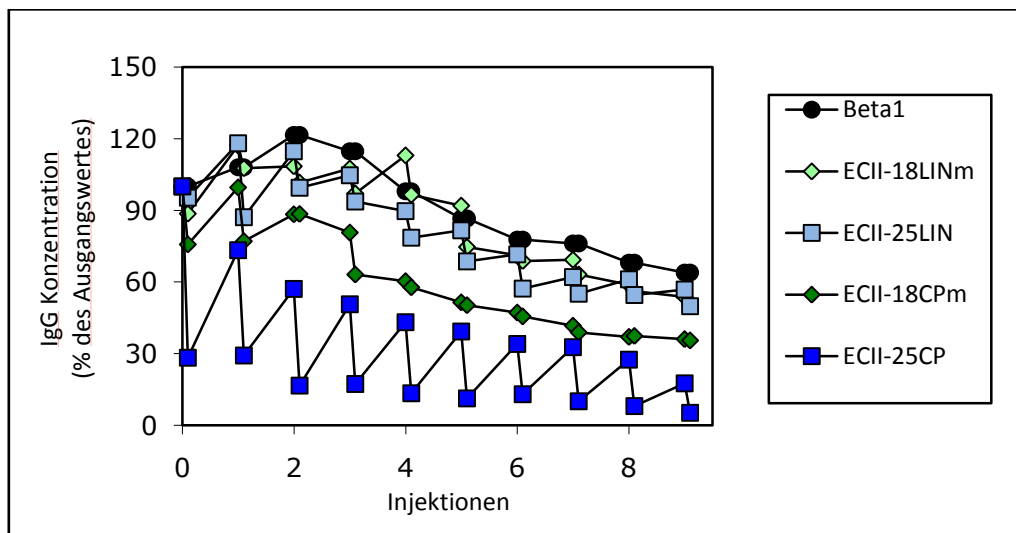


Abbildung 6: Verlauf des Antikörpertiters im Behandlungszeitraum

Die IgG Konzentrationen der einzelnen Gruppen zeigen eine Überlegenheit der zyklischen Peptide hinsichtlich einer Senkung der β_1 -EC_{II}-Antikörpertiter [83]. In der nicht immunisierten Kontrollgruppe ließen sich diese Antikörper nicht nachweisen (jew. Triplikatmessungen). Auf die Darstellung des SEM wurde wegen Übersichtlichkeit verzichtet.

3.2. Echokardiographie

3.2.1. Dimensionen des linken Ventrikels

Echokardiographisch war ab dem sechsten Monat nach Beginn der Immunisierung bei unbehandelten Ratten eine Vergrößerung der Dimensionen des linken Ventrikels nachzuweisen. Mit Beginn der Behandlung im neunten Immunisierungsmonat gemäß Abschnitt 2.1 konnten das Fortschreiten der Dilatation reduziert und die Dimensionen bei Einsatz zyklischer Peptide sogar wieder weitgehend normalisiert werden. Am Ende des Beobachtungszeitraums lagen die LV-Durchmesser nach Applikation von EC_{II}-25CP und EC_{II}-18CPm im Bereich der Kontrollgruppe, während EC_{II}-25LIN und EC_{II}-18LINm deutlich weniger kardioprotektiv waren (Abbildung 7). Hinsichtlich der Dicke der linksventrikulären Vorder- bzw. Hinterwand konnte die abschließende echokardiographische Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen nachweisen.

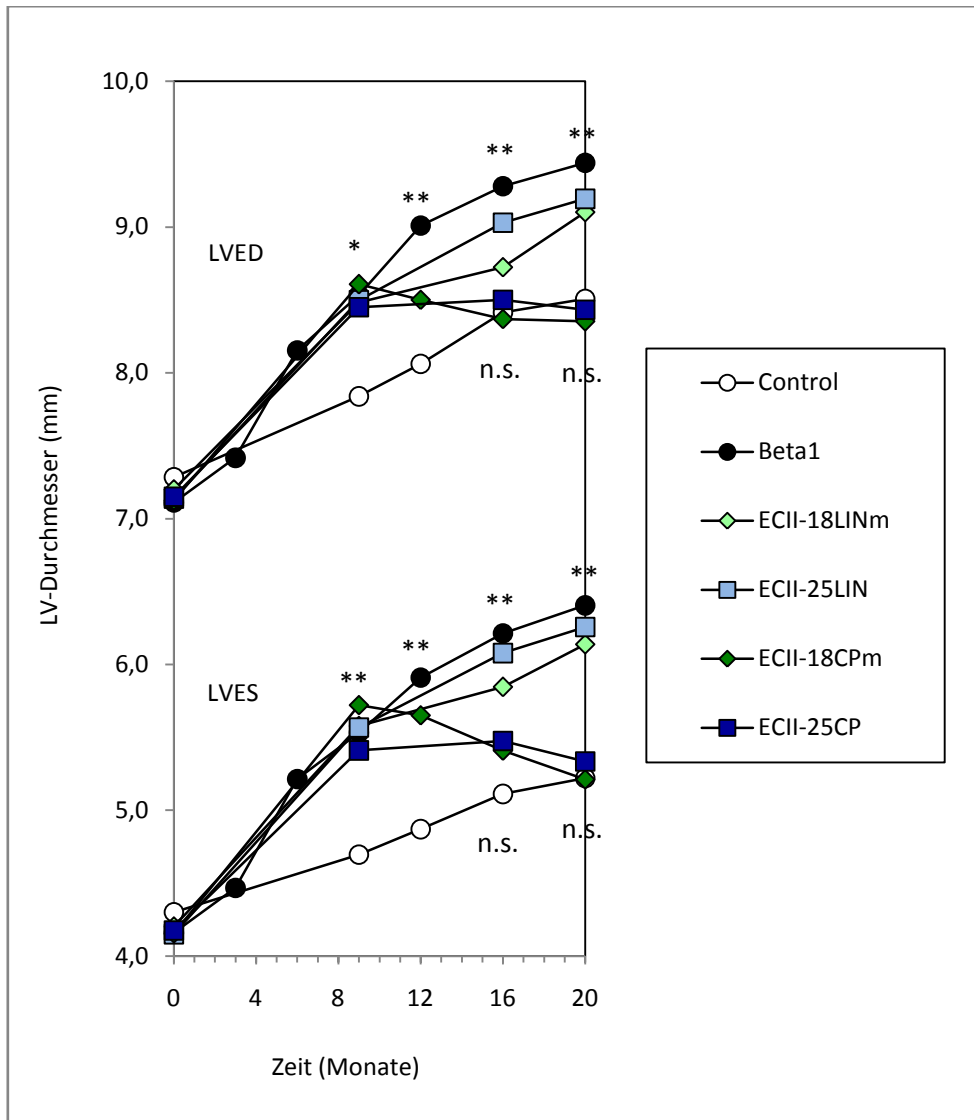


Abbildung 7: Echokardiographischer Verlauf der LV-Durchmesser

Echokardiographisch gemessene Strecken im linken Ventrikel am Ende der Systole bzw. der Diastole. Die Therapie mit den Peptiden wurde im neunten Monat begonnen [82].

LVED/LVES: linksventrikulärer enddiastolischer/endsystolischer Durchmesser.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ Beta1 unbehandelt gegen Kontrollen; n.s. = nicht signifikant Zylo-peptide gegen Kontrollen (two-way ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test).

Auf die Darstellung des SEM der jeweiligen Messpunkte wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

3.2.2. Funktionelle linksventrikuläre Parameter

Die Verkürzungsfraction (FS) des linken Ventrikels war bei den unbehandelten β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Ratten als Ausdruck einer systolischen Kontraktionsstörung gegenüber der Kontrollgruppe deutlich reduziert ($32,2 \pm 0,3$ vs. $38,6 \pm 0,4$ %, $p < 0,001$). Während die Behandlung mit einem der linearen Peptide nicht zu einer signifikanten Verbesserung des FS führte (Abbildung 8), waren EC_{II}-18CPm und EC_{II}-25CP in der Lage, es wieder auf das Niveau der gesunden Tiere anzuheben ($37,6 \pm 0,6$ bzw. $38,4 \pm 1,0$ %, $p < 0,001$).

Bei ähnlichen Herzfrequenzen in den einzelnen Gruppen lag das HZV der immunisierten um mehr als 30 % unter dem der nicht immunisierten Tiere. Lineare waren hinsichtlich einer Steigerung des HZV deutlich weniger wirksam als zyklische Peptide, wobei der Effekt bei Einsatz von EC_{II}-18CPm (+ 32 %, $p < 0,001$) am ausgeprägtesten war. Der Herzindex (CI) als gewichtsbezogener Indikator der kardialen Funktion war in β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Ratten gegenüber gesunden Ratten deutlich reduziert ($0,20 \pm 0,005$ vs. $0,28 \pm 0,003$ ml/min/g, $p < 0,001$). Sowohl die linearen als auch die zyklischen Peptide konnten den CI anheben (Abbildung 8), vor allem aber letztere erreichten mit Werten von $0,26 \pm 0,004$ bzw. $0,25 \pm 0,003$ ml/min/g eine signifikante Verbesserung der Kontraktilität ($p < 0,001$).

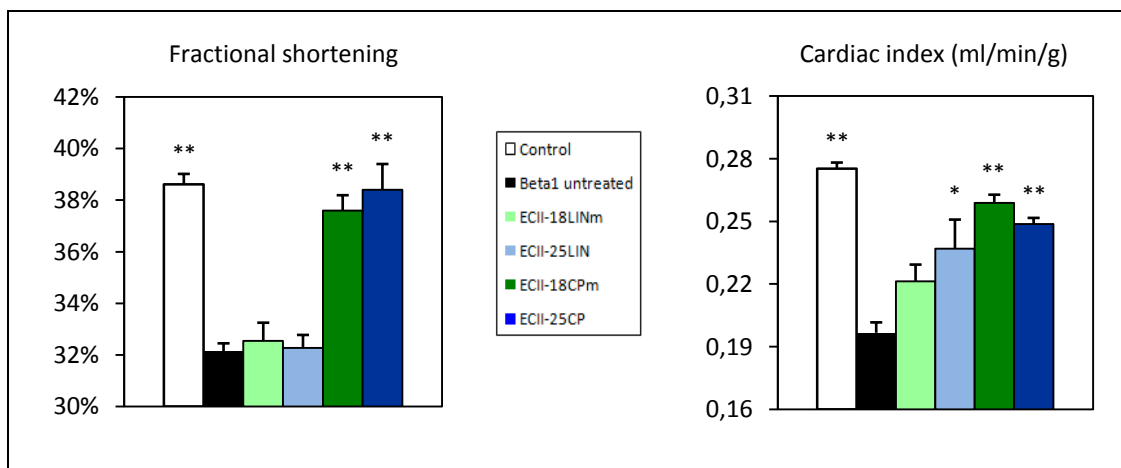


Abbildung 8: Verkürzungsfraction und Herzindex im Vergleich

Das fractional shortening unterstreicht die Wirksamkeitsunterschiede zwischen linearen und zyklischen Peptiden. Lineare Peptide hatten keinen Einfluss auf das reduzierte FS, Zyklopeptide hingegen waren imstande, es auf das Level der Kontrolltiere anzuheben. Beim Herzindex waren die Unterschiede nicht so deutlich, die Tendenz jedoch ähnlich.

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs. Beta1 unbehandelt.

3.3. Herzkatheteruntersuchung und Herzgewicht

Nach 20 Studienmonaten erfolgte als abschließende in vivo Untersuchung bei allen Ratten eine Linksherzkatheterisierung. Die Auswertung der digital aufgezeichneten Parameter ergab eine gegenüber gesunden Kontrolltieren signifikant reduzierte kardiale Funktion bei β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Ratten, die einen maximalen linksventrikulären Druck (LVP) von nur 112 mmHg erreichten. Der LV-enddiastolische Druck (LVEDP) von mehr als 15 mmHg verdeutlichte in dieser Gruppe die kompromittierte Herzauswurfleistung. Nicht immunisierte Ratten wiesen LVP-Werte von mehr als 127 mmHg und einen LVEDP von 9 mmHg auf (jeweils $p < 0,001$). Die Applikation beider linearen Peptide führte dabei nur tendenziell zu einer funktionellen Verbesserung, während EC_{II}-25CP und besonders EC_{II}-18CPm beide Werte nahezu normalisieren konnten ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$). Ebenso war die maximale linksventrikuläre Druckerhöhung bzw. Druckabfallsrate als Parameter für die Kontraktilität bzw. Relaxation des Herzmuskels bei β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Versuchstieren signifikant erniedrigt. Eine Therapie mit EC_{II}-18LINm oder EC_{II}-25LIN war hinsichtlich dieser Parameter nicht wirksam. Bei Verabreichung von zyklischen Peptiden hingegen kam es fast zu einer Normalisierung der linksventrikulären Kontraktilität und Relaxation (Tabelle 4). Das Nassgewicht der Herzen von immunisierten unbehandelten Ratten war deutlich größer als das der gesunden Ratten (1860 ± 121 mg vs. 1500 ± 440 mg, $p < 0,01$). Das Körpergewicht betrug bei den β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Ratten im Mittel 623,0 g und damit 68,7 g weniger als bei der Kontrollgruppe ($p < 0,05$); keine der angewandten Therapieoptionen führte zu einer signifikanten Änderung des absoluten Herzgewichts. Ein unterschiedlicher Effekt zwischen zyklischen und linearen Peptiden wurde jedoch beim Herzgewichtsindex deutlich: bei immunisierten nicht therapierten Tieren war das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, verglichen mit der Kontrollgruppe, um mehr als 37 % erhöht ($p < 0,001$). Beide linearen Peptide konnten das Verhältnis zwar reduzieren, die Werte erreichten aber keine statistische Signifikanz. Unter Zylopeptiden reduzierte sich der Quotient hingegen deutlich ($p < 0,01$) und entsprach nach zwölf Therapiemonaten nahezu dem der Kontrolltiere (Abbildung 9).

	Control	Beta1	EC _{II} -18LINm	EC _{II} -25LIN	EC _{II} -18CPm	EC _{II} -25CP
LVP [mmHg]	127,7 ± 1,0	111,8 ± 4,8	116,7 ± 2,5	115,1 ± 5,2	128,4 ± 1,1	128,8 ± 1,7
LVEDP [mmHg]	9,0 ± 0,5	15,1 ± 1,6	14,0 ± 1,0	14,3 ± 1,6	9,9 ± 0,4	11,0 ± 0,6
+dP/dt _{max} [mmHg/s]	6964 ± 77	6004 ± 151	6226 ± 77	5950 ± 187	6803 ± 63	6758 ± 102
-dP/dt _{max} [mmHg/s]	5612 ± 105	4702 ± 238	4978 ± 209	4872 ± 226	5516 ± 63	5550 ± 59

Tabelle 4: Ergebnisse der Linksherzkatheteruntersuchung

Nach 12 Therapiemonaten wurden alle Ratten invasiv untersucht und der Behandlungserfolg zwischen den Gruppen analysiert.

LVP: linksventrikulärer systolischer Druck; LVEDP: linksventrikulärer enddiastolischer Füllungsdruck; +dP/dt: Kontraktilität; -dP/dt: Relaxation

Farbkodierung der p-Werte (getestet gegen Beta1 unbehandelt): grün: p < 0,001; blau: p < 0,01; gelb: p < 0,05; braun: n. s.

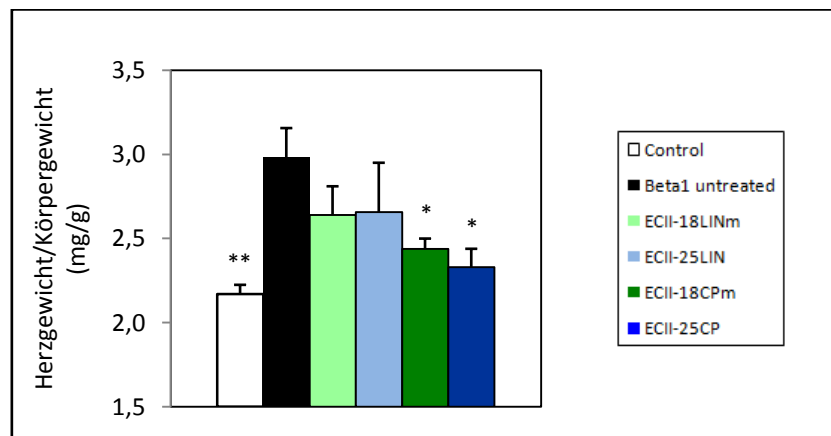


Abbildung 9: Herzgewichtsindex

Das Herzgewicht der immunisierten unbehandelten Ratten war signifikant höher als das der nicht immunisierten Kontrolltiere. Dieser Befund verdeutlicht die zentrale Rolle der Dilatation und Herzvergrößerung im Rahmen der induzierten DCM. Keine der therapeutischen Optionen hob das Körpergewicht wesentlich an, aber zyklische Peptide reduzierten die Herzmasse in einem Ausmaß, dass der Quotient signifikant abnahm. *p < 0,01; **p < 0,001 vs. Beta1 unbehandelt.

3.4. Histologisch-morphometrische Analyse des Herzgewebes

3.4.1. Makroskopische Morphometrie

In Anlehnung an die echokardiographischen Parameter wurden an den HE-gefärbten Schnitten der Rattenherzen der Durchmesser der Herzhöhle sowie die Dicke der linksventrikulären Vorder- und Hinterwand gemessen. Zusätzlich wurden die Fläche des Lumens der linken Herzhöhle und die Gesamtfläche des Herzmuskelrings computergestützt ermittelt.

Zum Zeitpunkt der Auswertung, d.h. 20 Monate nach Studienbeginn, bestätigten sich die Ergebnisse, die sich bereits im Laufe der sequentiellen Echokardiogramme angedeutet hatten. In der histologischen Auswertung der Herzwand wiesen bei immunisierten Tieren sowohl Vorder- als auch Hinterwand des linken Ventrikels verminderte Dicken im Vergleich zu gesunden Tieren auf. Die linearen Peptide konnten diese relative Wandverdünnung (i.R. der Kardiomyopathie-Entwicklung) nicht wirksam umkehren, vielmehr schritt sie unter EC_{II}-25LIN voran und die Wanddiameter lagen am Ende sogar unter denjenigen von immunisierten unbehandelten Tieren. Der Durchmesser der linken Herzhöhle war bei β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Ratten nahezu 15 % größer als bei gesunden Kontrolltieren ($6,2 \pm 0,1$ mm vs. $5,4 \pm 0,1$ mm, $p < 0,001$). Mit EC_{II}-18CPm konnte dieser Durchmesser wieder auf $5,9 \pm 0,1$ mm, bei Applikation von EC_{II}-25CP sogar auf $5,6 \pm 0,1$ mm ($p < 0,01$) verringert werden. Der Einsatz zyklischer Peptide führte demzufolge zu einer Reduktion des Cavumdurchmessers und damit zu einem Rückgang der Dilatation, während lineare Peptide den LV-Diameter nicht verkleinern konnten. Die morphometrische Auswertung der Herzen ergab zudem bei immunisierten unbehandelten Tieren vergrößerte Flächen der Herzhöhlen ebenso wie erhöhte Werte bei der totalen linksventrikulären Fläche. Die mehr als 12 % größere LV-Gesamtfläche war überwiegend durch eine Zunahme der linksventrikulären Cavumfläche um fast 30 % ($p < 0,001$) bedingt. Hingegen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der LV-Wandfläche (Muskelring). Bezogen auf die gesamte linksventrikuläre Fläche war der relative Muskelanteil mit $54,4 \pm 0,6$ % bei β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Ratten jedoch signifikant niedriger als bei gesunden Ratten mit $60,5 \pm 0,7$ % ($p < 0,001$). Eine Therapie mit EC_{II}-25LIN oder EC_{II}-18LINm

konnte keine relevante Veränderung bewirken. Die Applikation der zyklischen Peptide führte jedoch zu einer deutlichen Reduktion der linksventrikulären Cavumfläche ohne signifikante Veränderungen der Wand- und Gesamtfläche. Damit konnte sowohl mit EC_{II}-25CP als auch mit EC_{II}-18CPm das Verhältnis von LVCA zu LVA auf Kontrollgruppenniveau gesenkt (jeweils $p < 0,001$) und eine fast vollständige Rückbildung der Dilatation sowie Restitution der Proportionen des linken Ventrikels erreicht werden (Tabelle 5).

	Control	Beta1	EC _{II} -18LINm	EC _{II} -25LIN	EC _{II} -18CPm	EC _{II} -25CP
LVCD [mm]	5,4 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,2 ± 0,3	5,9 ± 0,1	5,6 ± 0,1
AW [mm]	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0
PW [mm]	1,8 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,0
LVA [mm ²]	60,9 ± 1,9	68,3 ± 0,8	70,9 ± 1,4	66,4 ± 5,5	69,5 ± 2,1	65,2 ± 2,5
LVCA [mm ²]	24,1 ± 0,9	31,2 ± 0,3	33,6 ± 1,7	31,7 ± 2,5	28,3 ± 0,9	25,6 ± 1,0
LVWA [mm ²]	36,9 ± 1,3	37,2 ± 0,7	38,5 ± 0,8	34,8 ± 3,2	41,2 ± 1,5	39,6 ± 1,7
LVCA/LVA [%]	39,5 ± 0,7	45,6 ± 0,6	44,9 ± 1,2	47,7 ± 1,1	40,7 ± 0,8	39,3 ± 0,8

Tabelle 5: Ergebnisse der makroskopisch-morphometrischen Analyse

Die Daten implizieren eine bessere Wirksamkeit der zyklischen Peptide, die sich vor allem im Bereich der Herzhöhle bemerkbar macht. Lineare Peptide scheinen hinsichtlich dieser Parameter ineffizient zu sein. Erläuterung der Abkürzungen s. Text.

Farbkodierung der p-Werte (getestet vs. Beta1 unbehandelt): grün: $p < 0,001$; blau: $p < 0,01$; braun: n. s.

3.4.2. Mikroskopische Morphometrie

Die mikroskopisch-morphometrische Analyse erfolgte an mit WGA/Hoechst gefärbten Paraffinschnitten bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Es wurden die Querschnittsflächen der Zellkerne und der Myozyten untersucht und anschließend deren Verhältnis zueinander ermittelt. Zur möglichst objektiven Vergleichbarkeit wurde auf die „Rundheit“ der Zellen geachtet, um eine Überschätzung der Fläche z.B. durch schräge Anschnitte weitgehend auszuschließen. Ferner wurden bei der Auswertung nur Zellen berücksichtigt, deren Nuclei nach allen Seiten einen möglichst gleichmäßigen Abstand zur Zellmembran hatten und somit mittig lagen.

Die mittlere Querschnittsfläche der Myozyten war bei immunisierten unbehandelten Tieren mit $629 \pm 28 \mu\text{m}^2$ im Vergleich zur Kontrollgruppe etwa $29 \mu\text{m}^2$ größer. Während zwischen den beiden zyklischen Peptiden eine deutliche Differenz bestand, war die Myozytengröße bei den linearen Peptiden identisch (Tabelle 6). Keine der behandelten Gruppen unterschied sich jedoch signifikant vom Niveau der immunisierten nicht therapierten Ratten. Bei den Zellkernen wiesen die immunisierten unbehandelten Tiere mit durchschnittlich $26,6 \mu\text{m}^2$ eine rund 12 % größere Querschnittsfläche als gesunde Kontrolltiere auf. Weder eine Therapie mit linearen noch mit zyklischen Peptiden führte diesbezüglich zu einer signifikanten Änderung. Die Applikation von EC_{II}-18CPm konnte eine weitere Zunahme der Kerngröße am effizientesten verhindern, während dies mit EC_{II}-18LINm (+ $3,8 \mu\text{m}^2$) nicht gelang. Trotz der Differenzen sowohl hinsichtlich Myozytengröße als auch Nucleusgröße war der prozentuale Anteil der Zellkernfläche an der Gesamtfläche der Zelle über alle Gruppen hinweg mit Werten zwischen 4-5 % bemerkenswert konstant (Abbildung 10).

	Myozytengröße [μm^2]	Nucleusgröße [μm^2]	Nucleus/Myozyt [%]
Control	599,9 \pm 27,3	23,7 \pm 1,1	4,0 \pm 0,2
Beta1	629,2 \pm 28,0	26,6 \pm 2,5	4,3 \pm 0,4
EC _{II} -18LINm	638,8 \pm 36,0	30,4 \pm 0,2	4,8 \pm 0,3
EC _{II} -25LIN	638,9 \pm 63,9	28,0 \pm 3,9	4,4 \pm 0,3
EC _{II} -18CPm	648,6 \pm 21,8	27,6 \pm 1,2	4,3 \pm 0,2
EC _{II} -25CP	698,9 \pm 54,9	29,1 \pm 1,4	4,2 \pm 0,4

Tabelle 6: Ergebnisse der mikroskopisch-morphometrischen Analyse

Die Applikation von Peptiden lässt keinen signifikanten Effekt auf die Einzelparameter Myozytengröße und Kerngröße erkennen. Bei der relativen Nucleus-/Myozytengröße zeigt sich allerdings dennoch tendenziell ein gewisser (jedoch nicht signifikanter) Effekt von zyklischen gegenüber linearen Peptiden.

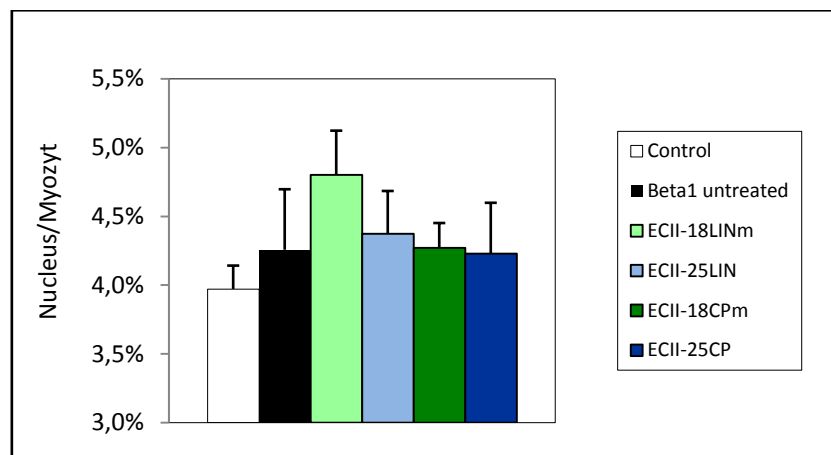


Abbildung 10: Relation von Zellkerngröße zu Myozytengröße

Die Größe des Zellkerns liegt im Verhältnis zur gesamten Zellfläche bei allen getesteten Gruppen auf einem ähnlichen Niveau. Wenngleich die Unterschiede nicht signifikant sind, scheinen die beiden zyklischen Peptide jedoch eine günstigere Wirkung als die linearen zu erreichen.

3.5. Kollagenquantifizierung

Die Analyse des myokardialen Kollagengehalts erfolgte durch die quantitative real-time PCR sowie immunhistochemisch an Kryoschnitten mittels spezifischer Antikörper gegen die Kollagentypen I und III.

Die histologische Auswertung ergab, dass sich nach Immunisierung der Tiere der Gehalt an Kollagen I und Kollagen III in entgegengesetzte Richtungen veränderte (Abbildung 11). Die Menge an Kollagen I war im Myokard der β_1 -EC_{II}-Antikörper-negativen NaCl-behandelten Kontrolltiere mit $8,7 \pm 1,3$ % geringfügig höher als in der immunisierten unbehandelten Gruppe ($7,2 \pm 1,2$ %). Weder die Behandlung mit einem der linearen noch mit zyklischen Peptiden führte hier zu einer signifikanten Veränderung. Die erzielten Werte betragen $7,0 \pm 1,3$ % bzw. $7,2 \pm 1,4$ % für EC_{II}-18LINm bzw. EC_{II}-25LIN und $7,3 \pm 1,3$ % bzw. $7,4 \pm 1,2$ % bei Anwendung von EC_{II}-18CPm bzw. EC_{II}-25CP. Der Kollagen III Gehalt hingegen nahm in der Gruppe der unbehandelten β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Ratten zu und lag mit einem Wert von $11,5 \pm 0,9$ % über demjenigen der Kontrollgruppe, in der er $8,9 \pm 1,3$ % betrug. Die Applikation eines linearen Peptids hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Menge an Kollagen III, die sich mit $11,2 \pm 1,2$ % (EC_{II}-18LINm) bzw. $11,1 \pm 1,1$ % (EC_{II}-25LIN) weiterhin auf dem Niveau der immunisierten nicht therapierten Tiere bewegte. Nach einer Behandlung mit EC_{II}-18CPm konnte die Expression von Kollagen III im Herzgewebe zumindest auf $10,8 \pm 1,2$ %, nach EC_{II}-25CP sogar auf $10,2 \pm 1,1$ % reduziert werden. Wenngleich die Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant waren, scheinen zyklische Peptide in dieser Hinsicht tendenziell einen positiven Effekt zu haben.

Das bei gesunden Tieren nahezu ausgeglichene Verhältnis zwischen den beiden Kollagentypen (Kollagen I/Kollagen III = 0,98) verschob sich bei immunisierten unbehandelten Tieren hin zu einem Überwiegen von Kollagen III durch dessen Zunahme bei simultaner Abnahme von Kollagen I (Kollagen I/III = 0,63). Diese Relation blieb auch bei Gabe von EC_{II}-18LINm oder EC_{II}-25LIN unverändert. Nach Applikation von zyklischen Peptiden erhöhte sich der relative Anteil an Kollagen I, vor allem bedingt durch die Reduktion von Kollagen III, wieder bis auf 0,72 (EC_{II}-25CP).

Die Abnahme von Kollagen I auf Proteinebene wurde von einem Anstieg der Genexpression für diesen Kollagentyp begleitet. In der qRT-PCR war die Expression von Kollagen I bei immunisierten nicht therapierten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren um den Faktor $1,35 \pm 0,16$ erhöht ($p = 0,06$). Während EC_{II}-18LINm ($1,38 \pm 0,18$) und EC_{II}-18CPm ($1,45 \pm 0,21$) nur zu geringen Veränderungen führten, stieg der Faktor bei Einsatz von EC_{II}-25LIN auf $1,75 \pm 0,40$ an. Indessen konnte die Kollagen I Expression bei Verabreichung von EC_{II}-25CP ($1,07 \pm 0,24$) auf das Niveau der nicht immunisierten Tiere gesenkt werden. Die Kollagen III Expression war bei unbehandelten β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven im Vergleich zu nicht immunisierten Ratten um den Faktor $1,37 \pm 0,16$ erhöht ($p = 0,07$) und blieb auch bei Applikation von EC_{II}-18LINm ($1,52 \pm 0,30$), EC_{II}-25LIN ($1,63 \pm 0,33$) oder EC_{II}-18CPm ($1,45 \pm 0,12$) oberhalb dieses Levels. Nach einer Therapie mit EC_{II}-25CP ($1,06 \pm 0,13$) bestand in der Expression von Kollagen III gegenüber gesunden Kontrolltieren jedoch fast keine Abweichung mehr (Abbildung 12). Sowohl bei Kollagen I als auch bei Kollagen III unterschied sich die Gruppe der immunisierten unbehandelten Tiere nicht signifikant von den anderen untersuchten Gruppen.

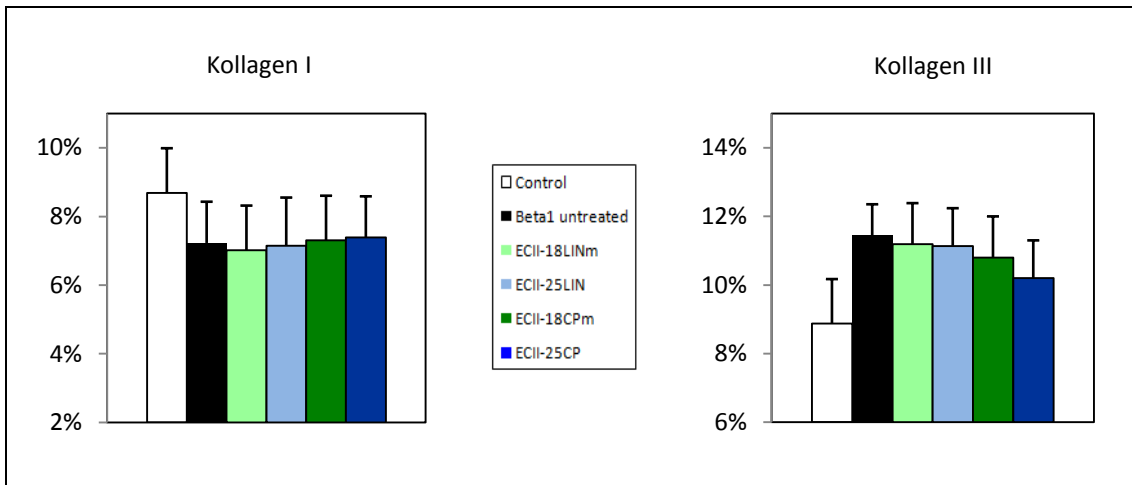


Abbildung 11: Immunhistochemische Kollagenquantifizierung

Während der relative Anteil beider Kollagentypen in der Kontrollgruppe nahezu ausgeglichen war, zeigte sich bei den immunisierten unbehandelten Tieren eine Abnahme von Kollagen I. Dieses zugunsten von Kollagen III verschobene Verhältnis war auch unter Therapie nicht vollständig regressiert. Angegeben ist der Anteil des jeweiligen Kollagentyps in % des Myokards.

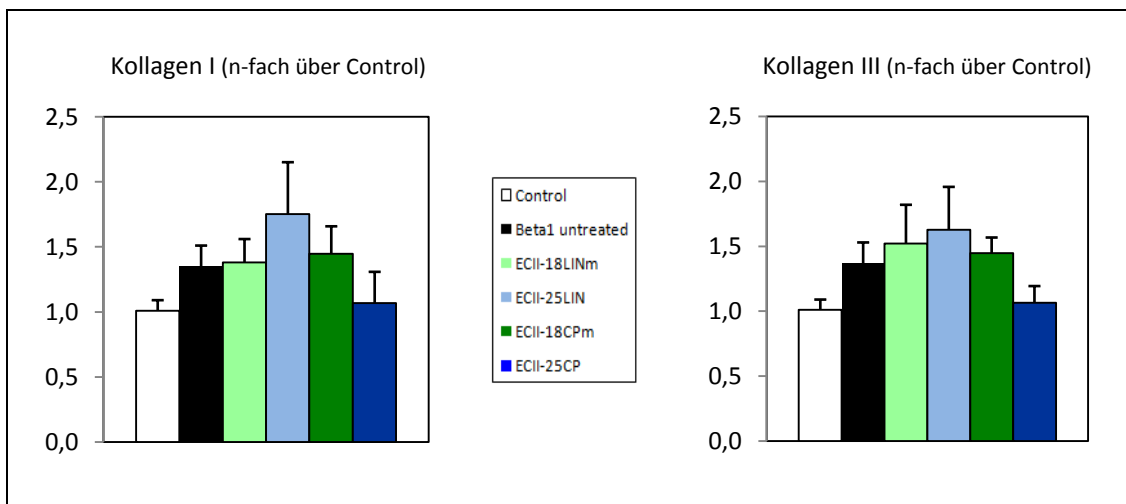


Abbildung 12: Kollagenexpression in der quantitative real-time PCR

In der Gruppe der immunisierten nicht therapierten Tiere war sowohl die Expression von Kollagen I als auch von Kollagen III (nicht signifikant) erhöht. Beide Kollagentypen erreichten unter EC_{II}-25CP wieder das Niveau der Kontrollgruppe, während die anderen Peptide keine Reduktion bewirken konnten. Die Kollagenexpression in den einzelnen Gruppen ist jeweils als n-faches der Kontrollgruppe (1,0) dargestellt.

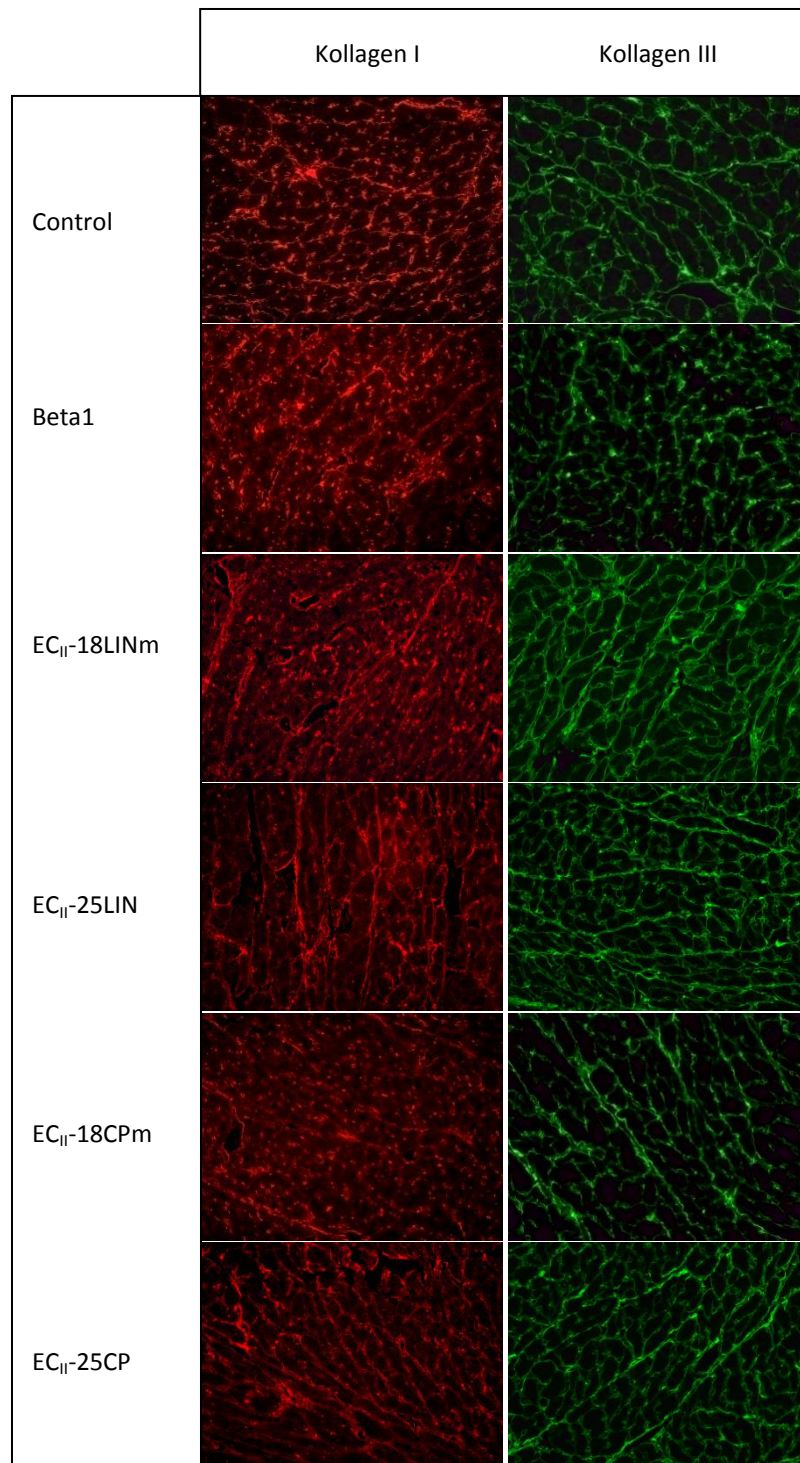


Abbildung 13: Immunhistochemische Kollagenfärbung von Kryoschnitten

Repräsentative histologische Schnitte der verschiedenen Versuchsgruppen mit der Verteilung von Kollagen I (links) und Kollagen III (rechts) in kryokonserviertem und anschließend mit spezifischen Fluoreszenzantikörpern angefärbtem Herzgewebe.

4. DISKUSSION

4.1. Bedeutung der Antikörper

In den vergangenen zwei Jahrzehnten hat das Wissen um die potentielle pathophysiologische Bedeutung von Autoimmunphänomenen bei Herzerkrankungen und besonders der Herzinsuffizienz auf dem Boden einer bisher als „idiopathisch“ klassifizierten Kardiomyopathie zugenommen [50, 53, 78]. Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahren sind die pharmakologischen Therapieoptionen bei Herzinsuffizienz jedoch weiterhin limitiert. Die Elimination oder Neutralisierung der für eine Progression der Herzinsuffizienz möglicherweise relevanten Faktoren ist deshalb das Ziel neuer Behandlungsstrategien [68, 159].

Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals nachweisen, dass sowohl eine Immunisierung gegen das β_1 -EC_{II}-Antigen als auch die isogene Übertragung solcher Antikörper in der Ratte zur Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie führt, die durch eine progrediente linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion mit relativer Abnahme der linksventrikulären Wanddicke gekennzeichnet ist [75]. Die dilatative Immunkardiomyopathie kann aufgrund der erfüllten Koch'schen Postulate nunmehr als eigenständige Krankheitsentität angesehen und in die Gruppe der anderen bekannten Rezeptor-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der Myasthenia gravis oder dem Morbus Basedow eingeordnet werden.

Die Entfernung aktivierender β_1 -EC_{II}-Antikörper durch selektive oder nicht selektive Immunoabsorption oder eine Beeinflussung des Immunsystems auf Ebene der Antikörper produzierenden B-Zellen könnten daher neue therapeutische Optionen darstellen [4, 67, 167]. Die positiven Effekte einer Immunoabsorption auf Struktur und Funktion des Herzens konnten bereits in früheren Studien demonstriert werden [27, 122]. Einen neuen Therapieansatz stellt nun die Anwendung von β_1 -EC_{II}-homologen Peptiden dar. Sie enthalten die Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Domäne und imitieren damit das Epitop, das für die Rezeptorbindung relevant ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirksamkeitsunterschiede sowie die Langzeiteffekte vier verschiedener potentiell therapeutisch nutzbarer Peptide auf die Morphometrie und Funktion des Herzens untersucht. Hierfür wurde

ein aus 25 Aminosäuren bestehendes zyklisches Peptid bzw. ein aus 18 Aminosäuren zusammengesetztes mutiertes zyklisches Peptid verwendet, bei dem ein potentiell brückenbildendes Cystein durch Serin ersetzt wurde. Diese beiden zyklischen Peptide wurden mit linearen Peptiden derselben Aminosäurezusammensetzung verglichen. Serin zeichnet sich dadurch aus, dass es hinsichtlich Struktur und Ladung der Aminosäure Cystein ähnelt. Es enthält im Gegensatz zu Cystein jedoch kein Schwefel, so dass die Ausbildung einer Disulfidbrücke nicht möglich ist.

4.2. Effekte linearer und zyklischer Peptide

4.2.1. Morphologie der Rattenherzen

Nach Generierung funktionell aktivierender Antikörper und Induktion eines dilatativen kardiomyopathischen Phänotyps (Erweiterung des linken Ventrikels und Abnahme der linksventrikulären Wanddicke) wurden ab dem neunten Immunisierungsmonat vier Gruppen erkrankter Tiere jeweils mit einem der verschiedenen linearen und zyklischen Peptidkonstrukte behandelt.

Immunisierte unbehandelte Tiere zeigten echokardiographisch während des gesamten Untersuchungszeitraums einen progredienten Verlauf der Kardiomyopathie mit kontinuierlich zunehmender Dilatation der linken Herzkammer. In der nicht immunisierten Kontrollgruppe vergrößerten sich der linksventrikuläre end-systolische und enddiastolische Durchmesser nur mäßig, wobei die Veränderung als altersentsprechende Anpassung des Herzens aufgefasst werden kann. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus früheren Studien [75, 121]. Die mit Beginn der Applikation von EC_{II}-18CPm und EC_{II}-25CP einsetzende Abnahme der linksventrikulären Diameter deutet auf eine unmittelbare Wirksamkeit dieser Behandlung hin, ähnlich wie der Akuteffekt einer Immunoabsorption [122]. Während der Behandlungsphase nahmen die LV-Durchmesser unter Zylopeptidapplikation kontinuierlich weiter ab und entsprachen nach zwölf Monaten weitgehend denjenigen gesunder Kontrollherzen. Histologisch konnte nach Anwendung der Zylopeptide bei zuvor immunisierten Tieren eine Normalisierung der Wanddicke des linken Ventrikels beobachtet werden, zudem kam es zu einer Abnahme

des linksventrikulären Cavumdurchmessers. Die bei immunisierten unbehandelten Ratten signifikant erhöhte Cavumfläche wurde unter Zylopeptidgabe ebenfalls deutlich reduziert, so dass schließlich eine fast vollständige Normalisierung der Proportionen des linken Ventrikels erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den echokardiographischen in vivo Untersuchungen und belegen, dass sich die Progression der Dilatation bei Einsatz dieser Therapie nicht nur aufhalten, sondern bis zu einem gewissen Grad sogar umkehren lässt. Die linearen Peptide zeigten keine Effekte hinsichtlich einer Reversion oder Stabilisierung der untersuchten morphologischen Parameter. Da sich die Wirksamkeit der zyklischen Peptide untereinander kaum, gegenüber den linearen Äquivalenten jedoch merklich unterscheidet, scheint die Struktur des Peptidkonstrukts wichtiger zu sein als die Peptidlänge oder ein konservativer Austausch von einzelnen Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz.

Die mikromorphometrische Analyse der Herzen ergab bei der absoluten Größe von Myozyten und Zellkernen bei behandelten Tieren keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Hingegen wiesen sowohl die Myozyten als auch deren Nuclei bei immunisierten unbehandelten Ratten durchschnittlich größere Flächen als bei nicht immunisierten Kontrolltieren auf. Ähnliche Ergebnisse hatte bereits die histologische Untersuchung des Herzgewebes von DCM-Patienten erbracht [75, 176]. Das knapp verpasste Signifikanzniveau kann auf die recht strengen Selektionskriterien für die in den Schnitten analysierten Myozyten und Zellkerne zurückzuführen sein. Es wurden nur transversal getroffene, gleichmäßig runde Myozyten vermessen, um eine schnittbedingte artifizielle Flächenvergrößerung zu vermeiden. Außerdem wurden nur mittig liegende und runde Nuclei in die Auswertung einbezogen, so dass eine durch die Immunisierung möglicherweise hervorgerufene Hypertrophie und Formveränderung der Zellkerne nicht berücksichtigt wurde [156]. Bezogen auf die gesamte Myozytengröße lag die relative Kerngröße bei Gabe von EC_{II}-25CP wieder fast im Bereich der gesunden Kontrollgruppe, was vermuten lässt, dass die zyklischen Peptide auch hinsichtlich zellulärer Veränderungen einen günstigeren Effekt haben als ihre linearen Korrelate.

Zu den wesentlichen Komponenten der extrazellulären Matrix gehören die Kollagentypen I und III, die die strukturelle Integrität zwischen den einzelnen Myozyten gewährleisten und die Verbindung zum umgebenden Gewebe herstellen [172]. Die Herzen der immunisierten unbehandelten Ratten wiesen in der immunhistochemischen Untersuchung bei diesen beiden Kollagentypen einen Gehalt auf, wie er auch bei Patienten mit DCM zu beobachten ist [65]. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur nicht immunisierten Kontrollgruppe war bei keinem Kollagentyp nachzuweisen. Dies entspricht früheren Ergebnissen eigener und Untersuchungen anderer, bei denen ebenfalls keine gravierenden Veränderungen des Kollagengehalts nach Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie auftraten [75, 175]. Das bei gesunden Ratten nahezu ausgeglichene Verhältnis von Kollagen I zu III verschob sich bei immunisierten unbehandelten Tieren zugunsten des Typ III. Im Gegensatz dazu haben frühere Untersuchungen in anderen pathophysiologischen Rattenmodellen (u.a. Infarktmodell, Myokarditismodell) eine Zunahme des Kollagengehalts sowie eine Verschiebung der Relation hin zu Kollagen I beschrieben [61, 97, 144]. Für die Beurteilung solcher Veränderungen ist allerdings der Zeitpunkt der Analyse wichtig, da die Entwicklung der Fibrosierung wahrscheinlich ein kontinuierlicher Prozess ist, der mit dem Verlauf der jeweiligen Erkrankung unter Umständen auch unterschiedlich schnell voranschreitet und dementsprechend in fortgeschrittenen Stadien meist ausgeprägter ist. Unsere Ergebnisse stehen aber auch in Einklang mit Studien, die zeigen konnten, dass in der frühen Phase des Remodelings vermehrt Kollagen III exprimiert wird, während Kollagen I erst später im Rahmen der Reparaturvorgänge vermehrt gebildet wird [95, 140]. In der frühen Phase des kardialen Remodelings wird korrekt vernetztes Kollagen I in zunehmendem Maß abgebaut und durch Kollagen III ersetzt, das weniger stark quervernetzt ist. Die Verschiebung der Anteile von Kollagen Typ I und III beeinflusst schließlich die mechanischen Eigenschaften des Myokards, wobei durch die größere Menge an Kollagen III das Gewebe elastischer wird und so die Entwicklung einer Dilatation begünstigt [7, 175].

Die auf Proteinebene für Kollagen III beobachteten Veränderungen wurden auch auf Ebene der Genexpression bestätigt. Es zeigte sich bei immunisierten unbehandelten Tieren ebenfalls ein Trend zu einer erhöhten Expression im Vergleich zu

gesunden Kontrolltieren. Abweichend vom histologischen Ergebnis lag in der molekularbiologischen Untersuchung bei β_1 -EC_{II}-Antikörper-positiven Tieren allerdings auch die Expression von Kollagen I über dem Level der nicht immunisierten Gruppe. Eine mögliche Ursache für die geringere immunhistochemisch nachgewiesene Menge an Kollagen I könnte in der Zunahme von Kollagen III selbst liegen, das dann seinerseits die Fasern anderer Kollagentypen partiell überlagert. Wenn die Epitope von Kollagen I für die zur Detektion eingesetzten spezifischen Antikörper nicht mehr vollständig zugänglich sind, kann eine akkurate Quantifizierung mit immunhistochemischen Techniken schwierig werden. Es ist auch vorstellbar, dass der erniedrigte Kollagen I Gehalt durch eine veränderte Aktivität von Enzymen verursacht ist, die einen Einfluss auf den turnover von Proteinen der extrazellulären Matrix und damit auch auf die interstitielle Fibrosierung haben. Für Matrix-Metalloproteinasen (MMP) ist bekannt, dass sie im Zusammenspiel mit ihren endogenen Inhibitoren (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) eine entscheidende Rolle beim kardialen Remodeling spielen [145, 158]. Diese beiden Enzyme stehen unter physiologischen Bedingungen in einem ausgeglichenen Verhältnis zueinander und tragen dazu bei, dass sich die Synthese und der Abbau von Kollagen die Waage halten. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP mit einem Überwiegen von MMP führt jedoch zu einer gesteigerten Degradation einzelner Kollagentypen und einer reduzierten Quervernetzung der Kollagenfasern [104]. Die kompromittierte Quervernetzung begünstigt einen Abbau der extrazellulären Matrix und trägt somit zur Fibrosierung bei, was sich konsekutiv auf die systolische und diastolische Herzfunktion auswirkt [92, 175]. In der Histologie wiesen die einzelnen Bereiche des untersuchten Herzgewebes bei einigen Ratten teils deutliche Unterschiede im Kollagenanteil auf, was ein Grund für die (knapp) nicht erreichte Signifikanz sein könnte. Diese Streuung der Werte kann aber auch ein Abbild der an verschiedenen Stellen innerhalb des Myokards unterschiedlich ausgeprägten Kollagenexpression und Fibrosierung sein [66]. Dennoch war, insbesondere bei Therapie mit EC_{II}-25CP, ein Trend zur Normalisierung des Kollagengehalts zu erkennen. Die partielle Reversion der bei immunisierten unbehandelten Tieren veränderten Relation von Kollagen I zu Kollagen III kann als möglicher Hinweis auf die Wirksamkeit der Zylopeptide interpretiert werden.

4.2.2. Funktionelle Veränderungen am Herzen

Die echokardiographischen Verlaufsuntersuchungen belegten die erwartete kardiale Dilatation nach neunmonatiger Immunisierung mit dem Fusionsprotein zwischen GST und der zweiten extrazellulären Domäne des β_1 -adrenergen Rezeptors. Die mit den morphologischen Veränderungen einhergehende linksventrikuläre Dysfunktion wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits früher nachgewiesen [75]. Die reduzierte Verkürzungsfraction als Ausdruck einer systolischen Kontraktionsstörung konnte bei Anwendung von zyklischen Peptiden ebenso wie der kardiale Index im Vergleich zur immunisierten nicht therapierten Gruppe signifikant angehoben werden. EC_{II}-18CPm und EC_{II}-25CP waren dabei im Wesentlichen gleich effektiv. Die Zylopeptide hatten auch auf die invasiv in der linken Herzkammer gemessenen Parameter einen günstigeren Einfluss als die getesteten linearen Peptide und führten gegenüber immunisierten unbehandelten Tieren zu einer signifikanten Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) bei gleichzeitiger Verbesserung von LV-Kontraktilität und LV-Relaxation. Die nahezu vollständige Normalisierung des kardiomyopathischen Phänotyps nach zwölf Therapiemonaten könnte somit auf die Wirkung der Zylopeptide zurückgeführt werden. Als zellulärer Mechanismus, durch den die Veränderung der hämodynamischen Parameter zustande kommt, ist eine Modulation der Rezeptoraktivität vorstellbar. Zyklische Peptide könnten die durch aktivierende β_1 -EC_{II}-Antikörper erhöhte basale Rezeptoraktivität verringern, indem sie vornehmlich an Rezeptoren im inaktiven Zustand binden und deren Konformation stabilisieren oder indem sie die Rezeptoraktivität reduzieren bzw. den Rezeptor inaktivieren.

4.3. Therapeutische Effekte kardioprotektiver Peptide

Im Gegensatz zu immunisierten unbehandelten Ratten fiel der β_1 -EC_{II}-Antikörpertiter bei immunisierten behandelten Tieren schon nach wenigen Injektionen von EC_{II}-25CP auf etwa 10 % des initialen Wertes ab. Auch mit EC_{II}-18CPm konnte eine signifikante Reduktion der zirkulierenden Antikörpermenge erzielt werden. Die linearen Peptide hingegen waren deutlich weniger effektiv und konn-

ten den Titer auf nicht einmal 50 % der Ausgangswerte vor Therapiebeginn reduzieren. Lineare Peptide besitzen an ihren beiden Enden der Kette jeweils freiliegende Aminosäuren, die für Enzyme gut erreichbar sind und einen raschen Kettenabbau ermöglichen. Der Zugang zu einzelnen Aminosäuren ist bei zyklischen Peptiden aufgrund ihrer geschlossenen Form für Peptidasen erschwert, so dass diese Peptide nur langsam abgebaut werden können. Durch die größere Stabilität können sie ihre Scavenger-Effekte folglich länger ausüben. Die Peptidstruktur scheint demnach sowohl für die Effizienz der kurzfristigen Antikörper-Clearance als auch für die nachhaltige Unterdrückung der Antikörperproduktion eine zentrale Rolle zu spielen. Eine anhaltende Reduktion der Antikörperspiegel trotz fortgesetzter Immunisierung war während des gesamten Behandlungszeitraums zu sehen und bei der Applikation von EC_{II}-25CP am deutlichsten ausgeprägt. Lineare Peptide konnten den Titer allenfalls unmittelbar nach Injektion gering, langfristig jedoch nicht in relevantem Umfang senken; demzufolge ist die therapeutische Weiterentwicklung linearer Peptide vermutlich wenig sinnvoll. Der beobachtete Wiederanstieg des Antikörperspiegels nach Senkung durch die Peptidgabe ist neben einem direkten Boost-Effekt möglicherweise auch auf die Mobilisierung der Antikörper von den B-Zell-Kompartimenten ins Blut zurückzuführen [122] und nahm folglich mit fortschreitender Therapiedauer kontinuierlich ab. Im Rahmen einer weiteren Promotionsarbeit wurden gezielt die Peptideffekte auf immunologischer Ebene untersucht [127]. Dabei konnte unter Therapie mit Zylopeptiden eine signifikante Reduktion der β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen in der Milz nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte mit keinem der beiden linearen Peptide eine signifikante Reduktion β_1 -EC_{II}-spezifischer Memory B-Zellen erzielt werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass in vivo nur das zyklische Antigen-mimetische Peptid (der zweiten extrazellulären Domäne des β_1 -AR entsprechend) zirkulierende β_1 -EC_{II}-Antikörper im Blut und ortsständig auf Memory B-Zellen (B-Zell-Rezeptor) binden und abfangen oder blockieren kann.

Die Aminosäurelänge der Peptide ist für eine Reduktion der Antikörpertiter und die Restitution der kardialen Dimensionen offenbar nicht so entscheidend wie deren Struktur, aber dennoch erzielten bei beiden Peptidformen diejenigen mit der höheren Anzahl der von der Targetsequenz enthaltenen Aminosäuren bessere Re-

sultate. Die größere Dimension des Konstrukts ermöglicht scheinbar eine günstigere und stabilere Antigen-Antikörper-Interaktion und kann deshalb vermutlich mehr Antikörper mit höherer Avidität binden. Sowohl lineare als auch zyklische Peptide haben mit ca. 3-4 Minuten relativ kurze Plasmahalbwertszeiten, sie unterscheiden sich aber deutlich in ihrer Stabilität und somit Gewebahalbwertszeit. Durch die Zyklisierung eines Peptids kann insbesondere dessen Stabilität und somit auch die Wirkdauer erhöht werden. Die geringere Effizienz der linearen Peptide begründet sich vermutlich auch durch ihre Primärstruktur, bei der die einzelnen Aminosäuren lediglich aneinandergereiht sind und sich an beiden Enden des Konstrukts freiliegende Aminosäuren befinden. Da Aminoterminus und Carboxyterminus ungeschützt für einen enzymatischen Abbau zugänglich sind, können solche Konstrukte durch Peptidasen einfacher und schneller abgebaut werden. Zylopeptide mit ihrer ringförmigen Anordnung der einzelnen Aminosäuren hingegen bilden ein geschlossenes Ringkonstrukt, in dem keine endständigen Aminosäuren enthalten sind. Somit ist der enzymatische Abbau schwieriger und langsamer, da zunächst die geschlossene Ringstruktur geöffnet werden muss, bevor eine Degradation von den freien Termini ausgehend stattfinden kann. Darüber hinaus spielt die Form des Konstrukts eine entscheidende Rolle für die Bindung der Antikörper. Durch den geschlossenen Ring und die stabilisierende Wirkung der intramolekularen Disulfidbrücke ist die räumliche Anordnung der Zylopeptide weniger flexibel als die linearer Peptide. Die zyklische Form imitiert dadurch vermutlich besser die reale Konformation des Target-Antigens, weshalb ein besserer Antikörper-Scavenger-Effekt erwartet werden kann. Tatsächlich decken sich die erzielten Ergebnisse mit dieser Hypothese, so dass eine avidere und stabilere Bindung zwischen β_1 -EC_{II}-Antikörpern und den als „Antigen“ fungierenden Zylopeptiden postuliert werden kann. Die etwas schlechtere Wirkung von EC_{II}-18CPm, die bei einigen der untersuchten Parameter beobachtet wurde, kann am ehesten durch die im Vergleich zur nativen Rezeptordomäne weniger konkordante Struktur erklärt werden. Für die Wirksamkeit der Antikörperelimination ist jedoch nicht allein die Existenz einer Schwefelbrücke ausschlaggebend, sondern auch deren Position. Durch den Austausch des dritten Cystein der Primärsequenz von β_1 -EC_{II} gegen Serin enthält das mutierte Molekül nur noch zwei Cysteine (in Position 209 und

215/216), durch die eine einzige Disulfidbrücke definiert ist (vgl. Abbildung 3). Es kann somit keine alternative Schwefelbrücke ausgebildet werden, wodurch eine veränderte Konformation des Peptids selbst wie auch eine mögliche Aggregation mit anderen Peptiden oder Proteinen unterbunden wird. Zyklopeptide mit der auch physiologisch ausgebildeten kurzen Disulfidbrücke (Cys₂₀₉ → Cys₂₁₅) innerhalb des Rings waren in Vorversuchen deutlich effektiver als diejenigen mit der nur unwesentlich längeren Brücke (Cys₂₀₉ → Cys₂₁₆). Diese Tatsache spielt vor allem für eine exakte peptidchemische Charakterisierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die GMP-konforme Herstellung solcher Peptide für eine spätere pharmakotherapeutische und/oder diagnostische Anwendung eine wichtige Rolle.

4.4. Implikationen für den klinischen Einsatz

Die Herzen der mit β_1 -EC_{II}-Antigen immunisierten Ratten zeigten das charakteristische Bild einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer kompromittierten Kontraktilität und Pumpleistungsminderung des Herzmuskels sowie einem vergrößerten linken Ventrikel mit relativ dünnen Herzwänden. Zyklische Peptide konnten die Progression des Antikörper-induzierten kardiomyopathischen Phänotyps mit Beginn der Applikationen aufhalten und im weiteren Verlauf sogar weitgehend umkehren, so dass nach zwölf konsekutiven Therapiemonaten die linksventrikulären Durchmesser sowie die relativen Wand- und Kammerproportionen wieder in dem Bereich gesunder Kontrollherzen lagen. Dieser auch als „reverse remodeling“ bezeichnete Reparaturprozess im Herzgewebe [116] konnte im Modell der dilatativen Immunkardiomyopathie durch Applikation von linearen Peptiden nicht erzielt werden.

Die Immunisierung von Kaninchen mit einem Peptid, das der zweiten extrazellulären Schleife des humanen β_1 -adrenergen Rezeptors entspricht, induziert am Herzen ähnliche morphologische Veränderungen wie bei Patienten mit DCM [54, 74, 121]. Von unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass die aktive Immunisierung von Ratten mit einem Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase

und der zweiten extrazellulären Domäne des β_1 -adrenergen Rezeptors eine schwere linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion hervorruft [75]. Weil β_1 -EC_{II} bei Ratte und Mensch 100 % homolog ist, stellt das Rattenmodell ein geeignetes Instrument zur Entwicklung und Evaluation neuer therapeutischer Ansätze dar.

Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass durch Immunoabsorption kardialer Antikörper eine Verbesserung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Herzens erreicht werden kann [28, 42, 122, 133]. Die erzielte hämodynamische Verbesserung ist dabei wahrscheinlich nicht nur auf das reine Entfernen stimulierender Antikörper zurückzuführen, sondern die daran beteiligten Vorgänge scheinen komplexer zu sein [39]. Vorstellbar ist ein synergistischer Effekt, bei dem neben der Elimination von Antikörpern und Antikörperkomplexen auch die Homöostase des Immunsystems moduliert wird. In letzter Zeit ist dabei auch eine mögliche funktionelle Relevanz des Fc γ -Rezeptors IIa, der in der Membran der Kardiomyozyten bei Mensch und Ratte exprimiert wird, näher untersucht worden [162]. In der Theorie könnten Antikörper von Patienten mit DCM mit ihren Fab-Fragmenten an kardiale Antigene binden; der Fc-Teil der Antikörper könnte dann über eine Bindung an den Fc γ -Rezeptor IIa eine intrazelluläre Signalkaskade mit negativ inotropem Effekt auslösen. Mit der Theorie der Fc γ -Rezeptor-abhängigen Aktivierung von Kardiomyozyten könnte erklärt werden, warum Antikörper trotz unterschiedlicher Zielantigene auf den Kardiomyozyten negativ inotrope Effekte hervorrufen können. In diesem Fall bietet die unspezifische Immunoabsorption eine gute therapeutische Option zur Elimination unterschiedlicher kardialer Antikörper, die zwar an verschiedene spezifische kardiale Epitope, mit ihrem Fc-Teil jedoch alle an den Fc γ -Rezeptor IIa binden.

Der Nachteil einer Immunoabsorption ist allerdings darin zu sehen, dass eine Behandlung zeitaufwendig, invasiv und für die Patienten damit belastend ist, was zu einer eingeschränkten Compliance führen kann. Bei Anwendung dieses Verfahrens ist zudem eine IgG-Substitution zur Infektionsprophylaxe erforderlich [163]. Nicht zuletzt spielen finanzielle Aspekte hinsichtlich der Anschaffung und Instandhaltung der Geräte sowie dem für die Behandlung notwendigen Personal eine Rolle [41]. Die Applikation von speziellen Zyklopeptiden induzierte am Herzen eine signifikante Verbesserung sowohl der systolischen als auch der diastolischen Funk-

tion und stellt damit einen neuen Therapieansatz für die Behandlung der dilatativen Immunkardiomyopathie dar. Die Injektionen der Peptide wurden lediglich einmal monatlich vorgenommen und wären mit einem solchen Regime patientenfremdlicher als eine tägliche Medikation oder regelmäßig nötige Immunoabsorptionen.

4.5. Ausblick

Obwohl die Mortalität der Herzinsuffizienz in der letzten Dekade durch medikamentöse Fortschritte und die Entwicklung anderer mehr mechanischer Therapieformen (ICD, biventrikuläre Schrittmachersysteme, LVAD) deutlich gesenkt werden konnte, bleibt die chronische Herzinsuffizienz in der industrialisierten Welt eine der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität und ist zudem mit einer hohen Hospitalisierungsrate assoziiert. Dadurch entstehen für das Gesundheitssystem enorme Kosten, die mehr als doppelt so hoch wie diejenigen für Krebserkrankungen sind. Ein wesentlicher Grund liegt darin, dass die bisherige Behandlung der Herzinsuffizienz vor allem auf die Behebung der Symptome und der gestörten neurohumoralen Balance abzielt, nicht aber die zugrunde liegenden Ursachen beseitigt. Nachdem im Tiermodell bereits ein kausaler Zusammenhang zwischen stimulatorischen Antikörpern gegen den β_1 -AR und der Induktion einer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz nachgewiesen wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nun gezeigt werden, dass sich diese schädlichen Antikörper durch spezielle, nur aus natürlichen Aminosäuren zusammengesetzte, zyklische Peptide wirksam binden und neutralisieren lassen. Dadurch kann schließlich die Überstimulation des Rezeptors unterbrochen werden. Darüber hinaus konnte mit solchen Peptiden eine Antikörper-induzierte Herzinsuffizienz sowohl funktionell als auch morphologisch weitgehend wieder rückgängig gemacht werden.

Das Zyklopeptid EC_{II}-18CPm wurde aufgrund seiner kardioprotektiven Wirkung und der pharmakochemischen Vorteile als Kandidat für eine Anwendung am Menschen weiterentwickelt. Nach den präklinischen Studien und der toxikologischen Prüfung wurde inzwischen Phase I der klinischen Studie erfolgreich abgeschlossen.

Dabei wurde neben der Sicherheit, Verträglichkeit und Pharmakokinetik auch die potentielle Induktion einer Zytokinfreisetzung untersucht. Es traten keine relevanten Arzneimittelnebenwirkungen auf, zudem entwickelte auch keine der Versuchspersonen neutralisierende Antikörper gegen das applizierte Peptid. Außerdem wurde der Effekt einer Bindung und Neutralisation stimulierender β_1 -AR-Antikörper durch EC_{II}-18CPm ex vivo bestätigt. Diese vielversprechenden Daten erlauben nun die Durchführung der klinischen Phase II zur Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit des Zyklopeptids bei Patienten mit Antikörper-positiver Herzinsuffizienz.

Für die zielgerichtete Anwendung dieses Antikörper-neutralisierenden Zyklopeptids ist es entscheidend, diejenigen Patienten zu identifizieren, bei denen die zirkulierenden Antikörper ihre schädliche Wirkung de facto entfalten. Von den im einfachen ELISA nachgewiesenen Antikörpern gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor ist nur ein Teil in der Lage, den Rezeptor tatsächlich zu erkennen und dann auch zu aktivieren [81]. Die schnelle und zuverlässige Detektion dieser Antikörper ist mit einem neuartigen Diagnoseverfahren möglich, bei dem ein Sensor für den adrenergen Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) die Veränderung des sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) erfasst [137]. Die Rezeptoraktivierung durch Agonisten und/oder stimulierende β_1 -AR-Antikörper führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP, das an ein hochempfindliches, an seinen beiden Enden mit je einem Fluorophor (CFP/YFP) markiertes cAMP-Sensormolekül bindet und dort eine Konformationsänderung hervorruft, dass der Abstand zwischen den Chromophoren gegenüber dem Ruhezustand zunimmt. Dadurch kommt es bei Bestrahlung mit monochromatischem Licht zu einer Abnahme des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers zwischen den eingesetzten Chromophoren, wodurch das gemessene FRET-Signal abfällt [84]. Patienten, bei denen funktionell aktive Antikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor nachgewiesen werden, könnten dann das Antikörper-neutralisierende Zyklopeptid erhalten, um eine Herzinsuffizienz zu behandeln oder gar die Entstehung einer Antikörper-induzierten Herzinsuffizienz bei prophylaktischer Gabe zu verhindern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen. Formen, die ohne erkennbare Ursache (wie z.B. KHK, Herzklappenfehler, genetische Defekte) zu einer progredienten Dilatation und Reduktion der Kontraktilität der linken oder beider Herzkammern führen, werden als idiopathische dilatative Kardiomyopathie (DCM) bezeichnet. Sie ist mit einer Inzidenz von 100 Patienten und einer Prävalenz von etwa 400 Patienten pro Million der Hauptgrund für schwere Herzinsuffizienz und die damit assoziierten Einschränkungen der Lebensqualität bei jungen Erwachsenen. Neben der beeinträchtigten kardialen Funktion weisen diese Patienten oftmals auch Veränderungen im Bereich der humoralen und zellulären Immunität auf. Ein Teil der Patienten entwickelt Autoantikörper, die sich gegen den kardialen β_1 -adrenergen Rezeptor richten und ihn ähnlich wie der natürliche Ligand Adrenalin aktivieren. Hieraus resultiert eine chronische Überstimulation des Rezeptors, die über eine initiale Hypertrophie dann zu einer eingeschränkten Pumpfunktion führt.

Nachdem sich die Therapie der Antikörper-vermittelten Immunkardiomyopathie bisher auf die Behandlung der Herzinsuffizienz und die Kontrolle der Herzinsuffizienzsymptome beschränkt, könnten β_1 -EC_{II}-homologe Peptide als Antikörper-Fänger bei Antikörper-positiven Patienten nun einen kausalen Therapieansatz darstellen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden diesbezüglich ein aus 25 Aminosäuren bestehendes zyklisches Peptid, eine aus 18 Aminosäuren bestehende Zylopeptid-Mutante und ihre jeweiligen linearen Äquivalente im Rattenmodell auf Antikörper-neutralisierende Effekte und potentielle therapeutische Wirksamkeit getestet. Das Rattenmodell ist hierfür besonders geeignet, da die Aminosäuresequenz der funktionell wichtigen zweiten extrazellulären Domäne des β_1 -adrenergen Rezeptors (β_1 -EC_{II}) bei Mensch und Ratte absolut identisch ist. An diesem Modell konnte im Vorfeld schon gezeigt werden, dass die monatliche Immunisierung mit β_1 -EC_{II}-Antigen innerhalb von sechs bis neun Monaten den Phänotyp einer DCM induziert, und dass die isogene Übertragung der generierten „Auto“antikörper bei herzgesunden Tieren ebenfalls zur Ausbildung einer DCM führt.

Auf immunologischer Ebene konnte der Titer der krankheitsinduzierenden β_1 -EC_{II}-Antikörper bereits nach der ersten Applikation zyklischer Peptide relevant gesenkt werden und nahm im weiteren Verlauf der Behandlung kontinuierlich ab. Morphologisch kam es am Herzen nach Zylopeptidgabe zu einer Reduktion des linksventrikulären Durchmessers und zu einer relativen Zunahme der Wanddicke. Durch die Zylopeptide konnte die Progression der Dilatation verhindert und eine fast vollständige Normalisierung der anatomischen Proportionen erreicht werden. Auf die Morphologie der Myozyten selbst und auch den Kollagengehalt des Gewebes hatte die Zylopeptidtherapie jedoch keinen wesentlichen Einfluss. Die funktionellen Eigenschaften des Herzens ließen sich durch die Neutralisation stimulatorischer β_1 -EC_{II}-Antikörper mittels intravenöser Zylopeptidapplikation dennoch deutlich verbessern: Die Verkürzungsfraction des linken Ventrikels und der Herzindex (ml/min/g) als Parameter für die kardiale Leistungsfähigkeit konnten durch die Behandlung wieder weitgehend normalisiert werden. Die systolischen und diastolischen Druckverhältnisse sowie die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit des Herzmuskels lagen nach zwölf Zylopeptidapplikationen fast wieder im Bereich der herzgesunden Kontrolltiere.

Diese im Tiermodell erzielten Ergebnisse mit weitgehender Rückbildung der kardiomyopathischen Veränderungen bei zuvor manifest erkrankten Tieren lassen einen therapeutischen Effekt der Zylopeptide vermuten. Der Ansatz einer spezifisch gegen Antikörper gerichteten Therapie zur Behandlung einer Antikörperinduzierten dilatativen Kardiomyopathie erscheint nach den erzielten Ergebnissen vielversprechend. Die weitere präklinische Entwicklung von Rezeptor-homologen Zylopeptiden ist momentan im Gange mit dem Ziel, solche Zylopeptide in naher Zukunft auch bei Patienten mit Rezeptor-Antikörper-positiver Herzinsuffizienz einzusetzen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353(9146): 9-13.
2. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999; 353(9169): 2001-2007.
3. Abraham W.T., Fisher W.G., Smith A.L., et al., Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2002; 346(24): 1845-1853.
4. Anderton S.M., Peptide-based immunotherapy of autoimmunity: a path of puzzles, paradoxes and possibilities. *Immunology* 2001; 104(4): 367-376.
5. Angers S., Salahpour A., Joly E., et al., Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7): 3684-3689.
6. Ariens E.J. and Simonis A.M., Physiological and pharmacological aspects of adrenergic receptor classification. *Biochem Pharmacol* 1983; 32(10): 1539-1545.
7. Badenhorst D., Maseko M., Tsoetsi O.J., et al., Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 2003; 57(3): 632-641.
8. Borda E., Pascual J., Cossio P., et al., A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol* 1984; 57(3): 679-686.
9. Bouvier M., Collins S., O'Dowd B.F., et al., Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J Biol Chem* 1989; 264(28): 16786-16792.
10. Bristow M.R., Ginsburg R., Minobe W., et al., Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307(4): 205-211.
11. Bristow M.R., Ginsburg R., Umans V., et al., Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 1986; 59(3): 297-309.

12. Burkett E.L. and Hershberger R.E., Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(7): 969-981.
13. Burnier M. and Brunner H.R., Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet* 2000; 355(9204): 637-645.
14. Buvall L., Bollano E., Chen J., et al., Phenotype of early cardiomyopathic changes induced by active immunization of rats with a synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human beta-adrenergic receptor. *Clin Exp Immunol* 2006; 143(2): 209-215.
15. Buvall L., Tang M.S., Isic A., et al., Antibodies against the beta1-adrenergic receptor induce progressive development of cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(5): 1001-1007.
16. Bywater R.P., Location and nature of the residues important for ligand recognition in G-protein coupled receptors. *J Mol Recognit* 2005; 18(1): 60-72.
17. Caforio A.L., Mahon N.J., Tona F., et al., Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002; 4(4): 411-417.
18. Carstairs J.R., Nimmo A.J., and Barnes P.J., Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132(3): 541-547.
19. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., et al., High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007; 318(5854): 1258-1265.
20. Chiale P.A., Ferrari I., Mahler E., et al., Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001; 103(13): 1765-1771.
21. Codd M.B., Sugrue D.D., Gersh B.J., et al., Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 1989; 80(3): 564-572.
22. Danner S., Frank M., and Lohse M.J., Agonist regulation of human beta2-adrenergic receptor mRNA stability occurs via a specific AU-rich element. *J Biol Chem* 1998; 273(6): 3223-3229.
23. Dec G.W. and Fuster V., Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994; 331(23): 1564-1575.

24. del Monte F., Kaumann A.J., Poole-Wilson P.A., et al., Coexistence of functioning beta 1- and beta 2-adrenoceptors in single myocytes from human ventricle. *Circulation* 1993; 88(3): 854-863.
25. Dickstein K., Cohen-Solal A., Filippatos G., et al., ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 2008; 10(10): 933-989.
26. Dohlman H.G., Caron M.G., DeBlasi A., et al., Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* 1990; 29(9): 2335-2342.
27. Dörffel W.V., Felix S.B., Wallukat G., et al., Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 95(8): 1994-1997.
28. Dörffel W.V., Wallukat G., Dorffel Y., et al., Immunoadsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J Cardiol* 2004; 97(3): 529-534.
29. Elies R., Ferrari I., Wallukat G., et al., Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 1996; 157(9): 4203-4211.
30. Elliott P., Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 2000; 84(1): 106-112.
31. Elliott P., Andersson B., Arbustini E., et al., Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29(2): 270-276.
32. Emorine L., Blin N., and Strosberg A.D., The human beta 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15(1): 3-7.
33. Emorine L.J., Marullo S., Briend-Sutren M.M., et al., Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 1989; 245(4922): 1118-1121.
34. Engelhardt S., Hein L., Dyachenkow V., et al., Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 2004; 109(9): 1154-1160.

35. Engelhardt S., Hein L., Wiesmann F., et al., Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12): 7059-7064.
36. Eriksson U., Ricci R., Hunziker L., et al., Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med* 2003; 9(12): 1484-1490.
37. Fabrizio L. and Regan T.J., Alcoholic cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994; 8(1): 89-94.
38. Feldman M.D., Copelas L., Gwathmey J.K., et al., Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 1987; 75(2): 331-339.
39. Felix S.B. and Staudt A., Non-specific immunoadsorption in patients with dilated cardiomyopathy: mechanisms and clinical effects. *Int J Cardiol* 2006; 112(1): 30-33.
40. Felix S.B. and Staudt A., Immunoadsorption as treatment option in dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008; 41(6): 484-489.
41. Felix S.B., Staudt A., Dorffel W.V., et al., Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6): 1590-1598.
42. Felix S.B., Staudt A., Landsberger M., et al., Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(4): 646-652.
43. Felker G.M., Thompson R.E., Hare J.M., et al., Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000; 342(15): 1077-1084.
44. Ferguson S.S., Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001; 53(1): 1-24.
45. Ferrari I., Levin M.J., Wallukat G., et al., Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J Exp Med* 1995; 182(1): 59-65.
46. Flather M.D., Shibata M.C., Coats A.J., et al., Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in

- elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J* 2005; 26(3): 215-225.
47. Fowler M.B., Laser J.A., Hopkins G.L., et al., Assessment of the beta-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation* 1986; 74(6): 1290-1302.
 48. Franz W.M., Muller M., Muller O.J., et al., Association of nonsense mutation of dystrophin gene with disruption of sarcoglycan complex in X-linked dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2000; 355(9217): 1781-1785.
 49. Fraser C.M., Site-directed mutagenesis of beta-adrenergic receptors. Identification of conserved cysteine residues that independently affect ligand binding and receptor activation. *J Biol Chem* 1989; 264(16): 9266-9270.
 50. Freedman N.J. and Lefkowitz R.J., Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest* 2004; 113(10): 1379-1382.
 51. Frielle T., Collins S., Daniel K.W., et al., Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(22): 7920-7924.
 52. Frustaci A., Russo M.A., and Chimenti C., Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J* 2009; 30(16): 1995-2002.
 53. Fu M., Autoimmunity and idiopathic dilated cardiomyopathy: where we stand? *Autoimmunity* 2008; 41(6): 415-418.
 54. Fu M.L., Schulze W., Wallukat G., et al., A synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human M2 acetylcholine receptor induces pharmacological and morphological changes in cardiomyocytes by active immunization after 6 months in rabbits. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 78(2): 203-207.
 55. Gabilondo A.M., Hegler J., Krasel C., et al., A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(23): 12285-12290.
 56. Gether U., Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 2000; 21(1): 90-113.
 57. Gianni M., Dentali F., Grandi A.M., et al., Apical ballooning syndrome or takotsubo cardiomyopathy: a systematic review. *Eur Heart J* 2006; 27(13): 1523-1529.

58. Gilman A.G., G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 615-649.
59. Goldie R.G., Paterson J.W., and Wale J.L., Pharmacological responses of human and porcine lung parenchyma, bronchus and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1982; 76(4): 515-521.
60. Gullestad L., Aass H., Fjeld J.G., et al., Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2001; 103(2): 220-225.
61. Gunja-Smith Z., Morales A.R., Romanelli R., et al., Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 1996; 148(5): 1639-1648.
62. Hadcock J.R. and Malbon C.C., Regulation of beta-adrenergic receptors by "permissive" hormones: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(22): 8415-8419.
63. Hausdorff W.P., Caron M.G., and Lefkowitz R.J., Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 1990; 4(11): 2881-2889.
64. Hein L. and Kobilka B.K., Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* 1995; 34(4): 357-366.
65. Herpel E., Pritsch M., Koch A., et al., Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy. *Histopathology* 2006; 48(6): 736-747.
66. Herpel E., Singer S., Flechtenmacher C., et al., Extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases differ between various right and left ventricular sites in end-stage cardiomyopathies. *Virchows Arch* 2005; 446(4): 369-378.
67. Hershko A.Y. and Naparstek Y., Removal of pathogenic autoantibodies by immunoabsorption. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 635-646.
68. Heymans S., Hirsch E., Anker S.D., et al., 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(2): 119-129.

69. Hilfiker-Kleiner D., Kaminski K., Podewski E., et al., A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 2007; 128(3): 589-600.
70. Hirsch A.T., Dzau V.J., and Creager M.A., Baroreceptor function in congestive heart failure: effect on neurohumoral activation and regional vascular resistance. *Circulation* 1987; 75(5 Pt 2): IV36-48.
71. Hoebeke J., Structural basis of autoimmunity against G protein coupled membrane receptors. *Int J Cardiol* 1996; 54(2): 103-111.
72. Houslay M.D. and Milligan G., Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(6): 217-224.
73. Iwata M., Yoshikawa T., Baba A., et al., Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(2): 418-424.
74. Iwata M., Yoshikawa T., Baba A., et al., Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces beta-adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* 2001; 88(6): 578-586.
75. Jahns R., Boivin V., Hein L., et al., Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2004; 113(10): 1419-1429.
76. Jahns R., Boivin V., Krapf T., et al., Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(4): 1280-1287.
77. Jahns R., Boivin V., and Lohse M.J., Beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats. *Int J Cardiol* 2006; 112(1): 7-14.
78. Jahns R., Boivin V., and Lohse M.J., beta(1)-Adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16(1): 20-24.
79. Jahns R., Boivin V., Schwarzbach V., et al., Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008; 41(6): 454-461.
80. Jahns R., Boivin V., Siegmund C., et al., Activating beta-1-adrenoceptor antibodies are not associated with cardiomyopathies secondary to valvular or hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(5): 1545-1551.

81. Jahns R., Boivin V., Siegmund C., et al., Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation* 1999; 99(5): 649-654.
82. Jahns R., Jahns V., Lohse M.J., et al., *Mutant double cyclized receptor peptides inhibiting functional beta1-adrenoceptor antibodies*: PCT-patent application WO 2009/027063 A2 (22.08.2008). Filed by Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
83. Jahns R., Jahns V., Lohse M.J., et al., *Novel peptide-homologues for inhibiting beta1-adrenoceptor antibodies*: PCT-patent application WO 2010/61/2006.091 (27.01.2010). Filed by Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
84. Jahns R., Schlipp A., Boivin V., et al., Targeting receptor antibodies in immune cardiomyopathy. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36(2): 212-218.
85. Jahns R., Siegmund C., Jahns V., et al., Probing human beta 1- and beta 2-adrenoceptors with domain-specific fusion protein antibodies. *Eur J Pharmacol* 1996; 316(1): 111-121.
86. Jane-wit D., Altuntas C.Z., Johnson J.M., et al., Beta 1-adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 2007; 116(4): 399-410.
87. Ji T.H., Grossmann M., and Ji I., G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 1998; 273(28): 17299-17302.
88. Johnson M., The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5 Pt 3): S146-153.
89. Kallal L., Gagnon A.W., Penn R.B., et al., Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1998; 273(1): 322-328.
90. Kandolf R., Sauter M., Aepinus C., et al., Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res* 1999; 62(2): 149-158.
91. Kasper E.K., Agema W.R., Hutchins G.M., et al., The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 673 consecutive patients. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23(3): 586-590.
92. Kato S., Spinale F.G., Tanaka R., et al., Inhibition of collagen cross-linking: effects on fibrillar collagen and ventricular diastolic function. *Am J Physiol* 1995; 269(3 Pt 2): H863-868.

93. Kawai C., From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999; 99(8): 1091-1100.
94. Kazatchkine M.D. and Kaveri S.V., Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001; 345(10): 747-755.
95. Kim H.E., Dalal S.S., Young E., et al., Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest* 2000; 106(7): 857-866.
96. Klingel K., Sauter M., Bock C.T., et al., Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193(2-3): 101-107.
97. Klotz S., Foronjy R.F., Dickstein M.L., et al., Mechanical unloading during left ventricular assist device support increases left ventricular collagen cross-linking and myocardial stiffness. *Circulation* 2005; 112(3): 364-374.
98. Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle T., et al., cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(1): 46-50.
99. Komajda M., Jais J.P., Reeves F., et al., Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1990; 11(9): 824-831.
100. Kuhl U., Pauschinger M., Noutsias M., et al., High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; 111(7): 887-893.
101. Kushwaha S.S., Fallon J.T., and Fuster V., Restrictive cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1997; 336(4): 267-276.
102. Lands A.M., Arnold A., McAuliff J.P., et al., Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967; 214(5088): 597-598.
103. Lee V.C., Rhew D.C., Dylan M., et al., Meta-analysis: angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 2004; 141(9): 693-704.
104. Li Y.Y., McTiernan C.F., and Feldman A.M., Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000; 46(2): 214-224.

105. Limas C.J., Goldenberg I.F., and Limas C., Assessment of immune modulation of beta-adrenergic pathways in human dilated cardiomyopathy: influence of methodologic factors. *Am Heart J* 1992; 123(4 Pt 1): 967-970.
106. Litwin S.E., Katz S.E., Morgan J.P., et al., Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994; 89(1): 345-354.
107. Lohse M.J., Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1179(2): 171-188.
108. Lohse M.J., Benovic J.L., Caron M.G., et al., Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 1990; 265(6): 3202-3211.
109. Lohse M.J., Engelhardt S., and Eschenhagen T., What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003; 93(10): 896-906.
110. Luppi P., Rudert W.A., Zanone M.M., et al., Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen-driven autoimmune disease. *Circulation* 1998; 98(8): 777-785.
111. Machida C.A., Bunzow J.R., Searles R.P., et al., Molecular cloning and expression of the rat beta 1-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 1990; 265(22): 12960-12965.
112. MacLellan W.R. and Lysis A.J., Dilated cardiomyopathy: learning to live with yourself. *Nat Med* 2003; 9(12): 1455-1456.
113. Magnusson Y., Hjalmarson A., and Hoebcke J., Beta 1-adrenoceptor autoimmunity in cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996; 54(2): 137-141.
114. Magnusson Y., Marullo S., Hoyer S., et al., Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1990; 86(5): 1658-1663.
115. Magnusson Y., Wallukat G., Waagstein F., et al., Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89(6): 2760-2767.
116. Malliaras K.G., Terrovitis J.V., Drakos S.G., et al., Reverse cardiac remodeling enabled by mechanical unloading of the left ventricle. *J Cardiovasc Transl Res* 2009; 2(1): 114-125.
117. Maron B.J., Towbin J.A., 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(14): 1807-1816.

118. Martino T.A., Liu P., and Sole M.J., Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1994; 74(2): 182-188.
119. Mason J.W., O'Connell J.B., Herskowitz A., et al., A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 1995; 333(5): 269-275.
120. Matsui S. and Fu M.L., Prevention of experimental autoimmune cardiomyopathy in rabbits by receptor blockers. *Autoimmunity* 2001; 34(3): 217-220.
121. Matsui S., Fu M.L., Katsuda S., et al., Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(2): 641-655.
122. Matsui S., Larsson L., Hayase M., et al., Specific removal of beta1-adrenoceptor autoantibodies by immunoabsorption in rabbits with autoimmune cardiomyopathy improved cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41(1): 78-85.
123. McAlister F.A., Ezekowitz J., Hooton N., et al., Cardiac resynchronization therapy for patients with left ventricular systolic dysfunction: a systematic review. *JAMA* 2007; 297(22): 2502-2514.
124. McKelvie R.S., Yusuf S., Pericak D., et al., Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation* 1999; 100(10): 1056-1064.
125. McKenna W.J., Thiene G., Nava A., et al., Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J* 1994; 71(3): 215-218.
126. McNamara D.M., Holubkov R., Starling R.C., et al., Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103(18): 2254-2259.

127. Merkl M., Immunologische Effekte der Therapie mit rezeptor-homologen Peptiden im Rattenmodell der antikörper-induzierten dilatativen Immunkardiomyopathie. *Med. Dissertation* 2013; Universität Würzburg.
128. Mestroni L., Maisch B., McKenna W.J., et al., Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1999; 20(2): 93-102.
129. Mizia-Stec K., Gasior Z., Wojnicz R., et al., Severe dilated cardiomyopathy as a consequence of Ecstasy intake. *Cardiovasc Pathol* 2008; 17(4): 250-253.
130. Mobini R., Maschke H., and Waagstein F., New insights into the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: possible underlying autoimmune mechanisms and therapy. *Autoimmun Rev* 2004; 3(4): 277-284.
131. Mobini R., Staudt A., Felix S.B., et al., Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta1-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 2003; 20(4): 345-350.
132. Morita H., Seidman J., and Seidman C.E., Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115(3): 518-526.
133. Müller J., Wallukat G., Dandel M., et al., Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101(4): 385-391.
134. Murphy R.T., Mogensen J., Shaw A., et al., Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2004; 363(9406): 371-372.
135. Neer E.J., Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995; 80(2): 249-257.
136. Neumann D.A., Burek C.L., Baughman K.L., et al., Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16(6): 839-846.
137. Nikolaev V.O., Boivin V., Störk S., et al., A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(5): 423-431.
138. Noda K., Saad Y., Graham R.M., et al., The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J Biol Chem* 1994; 269(9): 6743-6752.

139. Noutsias M., Seeberg B., Schultheiss H.P., et al., Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99(16): 2124-2131.
140. Okada H., Kawaguchi H., Kudo T., et al., Alteration of extracellular matrix in dilated cardiomyopathic hamster heart. *Mol Cell Biochem* 1996; 156(1): 9-15.
141. Okazaki T., Tanaka Y., Nishio R., et al., Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 2003; 9(12): 1477-1483.
142. Packer M., Bristow M.R., Cohn J.N., et al., The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334(21): 1349-1355.
143. Pankuweit S., Hufnagel G., Eckhardt H., et al., [Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation]. *Med Klin (Munich)* 1998; 93(4): 223-228.
144. Pauschinger M., Knopf D., Petschauer S., et al., Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99(21): 2750-2756.
145. Picard F., Brehm M., Fassbach M., et al., Increased cardiac mRNA expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and its inhibitor (TIMP-1) in DCM patients. *Clin Res Cardiol* 2006; 95(5): 261-269.
146. Pippig S., Andexinger S., and Lohse M.J., Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* 1995; 47(4): 666-676.
147. Pitt B., Remme W., Zannad F., et al., Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348(14): 1309-1321.
148. Pitt B., Zannad F., Remme W.J., et al., The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341(10): 709-717.
149. Post S.R., Hammond H.K., and Insel P.A., Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 343-360.

150. Remme W.J. and Swedberg K., Comprehensive guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. Task force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 2002; 4(1): 11-22.
151. Richardson P., McKenna W., Bristow M., et al., Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93(5): 841-842.
152. Roger V.L., Go A.S., Lloyd-Jones D.M., et al., Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123(4): e18-e209.
153. Rose E.A., Gelijns A.C., Moskowitz A.J., et al., Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345(20): 1435-1443.
154. Rose N.R., Infection, mimics, and autoimmune disease. *J Clin Invest* 2001; 107(8): 943-944.
155. Rose N.R. and Bona C., Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993; 14(9): 426-430.
156. Scholz D., Diener W., and Schaper J., Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy. *Cardioscience* 1994; 5(2): 127-138.
157. Schulze K., Becker B.F., Schauer R., et al., Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function. *Circulation* 1990; 81(3): 959-969.
158. Seeland U., Selejan S., Engelhardt S., et al., Interstitial remodeling in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Basic Res Cardiol* 2007; 102(2): 183-193.
159. Shaw S.M., Shah M.K., Williams S.G., et al., Immunological mechanisms of pentoxifylline in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11(2): 113-118.
160. Sigmund M., Jakob H., Becker H., et al., Effects of metoprolol on myocardial beta-adrenoceptors and Gi alpha-proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 51(2): 127-132.
161. Smulski C., Labovsky V., Levy G., et al., Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2beta protein and the human beta1 adrenergic receptor. *FASEB J* 2006; 20(9): 1396-1406.

162. Staudt A, Eichler P, Trimpert C, et al., Fc(gamma) receptors IIa on cardiomyocytes and their potential functional relevance in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(16): 1684-1692.
163. Staudt A, Schaper F, Stangl V, et al., Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoabsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 2001; 103(22): 2681-2686.
164. Störk S, Boivin V, Horf R, et al., Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2006; 152(4): 697-704.
165. Thiene G, Nava A, Corrado D, et al., Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* 1988; 318(3): 129-133.
166. Tsubata S, Bowles K.R, Vatta M, et al., Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000; 106(5): 655-662.
167. Tzartos S.J, Bitzopoulou K, Gavra I, et al., Antigen-specific apheresis of pathogenic autoantibodies from myasthenia gravis sera. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132: 291-299.
168. Vilardaga J.P, Steinmeyer R, Harms G.S, et al., Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* 2005; 1(1): 25-28.
169. von Zastrow M and Kobilka B.K, Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* 1992; 267(5): 3530-3538.
170. Wallukat G, Wollenberger A, Morwinski R, et al., Anti-beta 1-adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1): 397-406.
171. Warne T, Serrano-Vega M.J, Baker J.G, et al., Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2008; 454(7203): 486-491.
172. Weber K.T, Sun Y, Tyagi S.C, et al., Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26(3): 279-292.
173. Wigle E.D, Sasson Z, Henderson M.A, et al., Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. *Prog Cardiovasc Dis* 1985; 28(1): 1-83.

174. Wojnicz R., Nowalany-Kozielska E., Wojciechowska C., et al., Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation* 2001; 104(1): 39-45.
175. Woodiwiss A.J., Tsotetsi O.J., Sprott S., et al., Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 2001; 103(1): 155-160.
176. Yan S.M., Finato N., Di Loreto C., et al., Nuclear size of myocardial cells in end-stage cardiomyopathies. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21(2): 174-180.
177. Zannad F., McMurray J.J., Krum H., et al., Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011; 364(1): 11-21.
178. Zhang J., Barak L.S., Anborgh P.H., et al., Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 1999; 274(16): 10999-11006.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Primäre Kardiomyopathien.....	5
Abbildung 2: Extrazelluläre Domänen des β_2 -adrenergen Rezeptors.....	10
Abbildung 3: Struktur der Cystein/Serin Zyklopeptide	22
Tabelle 1: Protokoll der HE-Färbung	26
Tabelle 2: Protokoll für die Färbung mit WGA und Hoechst.....	27
Abbildung 4: Makroskopisch-morphometrische Auswertung der Paraffinschnitte	28
Abbildung 5: Mikroskopisch-morphometrische Auswertung	28
Tabelle 3: Primer für die quantitative real-time PCR	31
Abbildung 6: Verlauf des Antikörpertiters im Behandlungszeitraum	33
Abbildung 7: Echokardiographischer Verlauf der LV-Durchmesser	35
Abbildung 8: Verkürzungsfraction und Herzindex im Vergleich	36
Tabelle 4: Ergebnisse der Linksherzkatheteruntersuchung	38
Abbildung 9: Herzgewichtsindex.....	38
Tabelle 5: Ergebnisse der makroskopisch-morphometrischen Analyse	40
Tabelle 6: Ergebnisse der mikroskopisch-morphometrischen Analyse	42
Abbildung 10: Relation von Zellkerngröße zu Myozytengröße.....	42
Abbildung 11: Immunhistochemische Kollagenquantifizierung	45
Abbildung 12: Kollagenexpression in der quantitative real-time PCR	45
Abbildung 13: Immunhistochemische Kollagenfärbung von Kryoschnitten.....	46

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Roland Jahns für die Überlassung des Themas sowie die kontinuierliche Betreuung und Förderung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit. Sie wurde erst durch seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung der erzielten Ergebnisse und ein stets offenes Ohr für meine Fragen realisierbar. Ich danke Herrn Professor Jahns zudem herzlich für die Möglichkeit, an internationalen Kongressen aktiv teilnehmen und auf diese Weise sowohl meine fachlichen Kenntnisse wie auch meinen persönlichen Erfahrungsschatz erweitern zu können.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Valérie Jahns für das Erlernen experimenteller Methoden und labortechnischer Verfahren. Durch ihre konstruktive Kritik und stetige Unterstützung konnte ich mir viel Wissen über die Konzeption und Durchführung wissenschaftlichen Arbeitens aneignen.

Ich danke Herrn Professor Dr. Martin J. Lohse für die Übernahme des Korreferats.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, insbesondere bei Frau Christina Zechmeister, bedanke ich mich für die unkomplizierte Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge bei der Lösung technischer und fachlicher Fragestellungen. Besonderer Dank ergeht auch an Frau Marianne Babl für die Einführung in histologische Schneide- und Färbetechniken sowie ihre praktischen Tipps bei unerwartet aufgetretenen Problemen.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Biopsielabors des Pathologischen Instituts für die Vorbearbeitung der Organe und die Nutzung der entsprechenden Geräte zum Erstellen der Paraffinblöcke.

Meinen Promotionskollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe und die vielen anregenden Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern für ihren andauernden Zuspruch und die finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.