

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

**Vorstand: Professor Dr. med. M. J. Lohse**

**Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie am Modell der Lewis-Ratte  
durch Antikörper gegen die zweite extrazelluläre Domäne  
des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

Sven Triebel

**aus Erfurt**

**Würzburg, April 2008**

**Referent:** Professor Dr. med. R. Jahns

**Koreferent:** Professor Dr. med. M. J. Lohse

**Dekan:** Professor Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 24.09.2008

**Der Promovend ist Arzt.**

**Meinen Eltern Christine und Wolfgang**

**Meiner Ehefrau Katharina  
und meiner Schwester Sabine**

# Inhaltsverzeichnis

<b>A.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Einteilung und Definition der Kardiomyopathien</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Dilatative Kardiomyopathie</b>	<b>3</b>
2.1.	Definition, Epidemiologie und Klinik	3
2.2.	Ätiologie	3
2.2.1.	<i>Familiäre Genese</i>	3
2.2.2.	<i>Toxische Genese</i>	4
2.2.3.	<i>Inflammatorische (infektiöse/autoimmune) Genese</i>	4
2.3.	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	5
2.4.	Therapie der dilatativen Kardiomyopathie	7
2.4.1.	<i>Allgemeine Maßnahmen</i>	7
2.4.2.	<i>Pharmakotherapie</i>	7
2.4.3.	<i>Operative Therapie</i>	9
2.4.4.	<i>Kausalspezifische Therapieansätze</i>	10
<b>3.</b>	<b>Der <math>\beta</math>-adrenerge Rezeptor</b>	<b>12</b>
3.1.	Bedeutung des $\beta$ -adrenergen Systems	12
3.2.	Struktur der $\beta$ -Rezeptoren	13
3.3.	Signaltransduktion der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren	14
3.4.	Regulation der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren	15
3.5.	Veränderung des $\beta$ -adrenergen Systems bei Herzinsuffizienz	16
3.6.	Der $\beta$ -adrenerge Rezeptor als Autoantigen	17
<b>4.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>19</b>
<b>B.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>1.</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
1.1.	Versuchstiere	21
1.2.	Geräte	21
1.3.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	22
1.4.	Software	22
<b>2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
2.1.	Immunisierung	24
2.2.	Echokardiographische Verlaufsuntersuchung	25
2.3.	Herzkatheteruntersuchung und Herzentnahme	28
2.4.	Herzscheibenpräparation	30
2.4.1.	<i>Virbratomschnittpräparation</i>	30
2.4.2.	<i>Herzscheibenselektion und Paraffineinbettung</i>	31
2.5.	Histologisch-morphometrische Auswertung	32
2.5.1.	<i>Entparaffinisierung</i>	32
2.5.2.	<i>Färbemethoden</i>	32
2.5.3.	<i>Makroskopisch-morphometrische Auswertung an HE-Schnitten</i>	33
2.5.4.	<i>Mikroskopisch-morphometrische Auswertung an PAS-Schnitten</i>	34
2.6.	Spektrophotometrische Kollagenbestimmung an Paraffinschnitten	36
2.7.	Radioligandenbindungs-Assay	38
2.7.1.	<i>Aufbereitung und Homogenisierung des Herzgewebes</i>	39

2.7.2.	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i> .....	40
2.7.3.	<i>Radioligandenverdrängungs-Assay</i> .....	41
2.8.	Statistik .....	42
<b>C.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Echokardiographie</b> .....	<b>43</b>
1.1.	Intra- und Interobservervariabilität.....	43
1.2.	M-Mode-Untersuchung .....	43
1.3.	Doppler-Untersuchung .....	45
<b>2.</b>	<b>Herzkatheteruntersuchung</b> .....	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>Herzgewicht</b> .....	<b>48</b>
<b>4.</b>	<b>Histologisch-morphometrische Beurteilung von Herzgewebe an Paraffinschnitten</b> .....	<b>49</b>
4.1.	Makroskopisch-morphometrische Auswertung an HE-Schnitten .....	49
4.2.	Mikroskopisch-morphometrische Auswertung an PAS-Schnitten.....	53
<b>5.</b>	<b>Spektrophotometrische Kollagenbestimmung an Paraffinschnitten</b> .....	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>Radioligandenbindungs-Assay</b> .....	<b>57</b>
<b>D.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>59</b>
<b>1.</b>	<b>Pathogenetisches Potential von <math>\beta_1</math>-Rezeptorantikörpern</b> .....	<b>59</b>
<b>2.</b>	<b>Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie in der Ratte durch Immunsierung mit <math>\beta_1</math>EC<sub>II</sub>-Antigen</b> .....	<b>61</b>
2.1.	Regulation kardialer $\beta$ -adrenerger Rezeptoren .....	61
2.2.	Histomorphologie der Rattenherzen.....	63
2.3.	Funktion der Rattenherzen .....	64
<b>3.</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>65</b>
<b>E.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>67</b>
<b>F.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>69</b>

## Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ACE	Angiotensin umwandelndes Enzym
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/-triphosphat
ANF/ANP	Atrialer natriuretischer Faktor bzw. atriales natriuretisches Peptid
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenerger Rezeptor
$\beta_1$ -EC <sub>II</sub>	Zweite extrazelluläre Domäne des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/-triphosphat
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein Rezeptorkinase
GST	Glutathion-S-Transferase
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	Hydroxy-ethyl-piperazin-ethan-sulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
<sup>125</sup> ICYP	Mit radioaktivem <sup>125</sup> Iod markiertes Cyanopindolol
ISFC	Internationale Gesellschaft für Kardiologie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NYHA	Klassifikation der New York Heart Association für die Herzinsuffizienz
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A: cAMP-abhängige Proteinkinase
PMSF	Phenylmethansulfonsäure
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA/mRNA	Ribonukleinsäure/mitochondriale Ribonukleinsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen

## A. EINLEITUNG

### 1. Einteilung und Definition der Kardiomyopathien

Die Einteilung der Kardiomyopathien erfolgt nach der Klassifikation der WHO/ISFC Task Force von 1995. Sie sind definiert als Erkrankungen des Herzmuskels verbunden mit einer reduzierten kardialen Funktion [47, 167].

So werden folgende fünf Gruppen der Kardiomyopathien nach pathophysiologischen Gesichtspunkten unterschieden:

- I. Die *dilatative Kardiomyopathie* (DCM) ist charakterisiert durch eine Erweiterung und verminderte Kontraktion der linken oder beider Herzkammern. Die Ätiologie kann idiopathischer, familiär-genetischer, viraler, autoimmuner oder toxischer Genese sein. Die Histologie stellt sich unspezifisch dar.
- II. Die *hypertrophische Kardiomyopathie* (HCM) wird definiert durch eine links- und/oder rechtsventrikuläre Hypertrophie, welche bevorzugt das Kammerseptum mit einbezieht. Die Herzhöhlen sind normal groß oder verkleinert. Histologisch zeigen sich hypertrophierte Kardiomyozyten bei reduziertem Bindegewebsgehalt. Klinisch stehen Herzrhythmusstörungen und der plötzliche Herztod im Vordergrund.
- III. Die *restriktive Kardiomyopathie* (RCM) ist gekennzeichnet durch ein reduziertes diastolisches Volumen und verringerte diastolische Dehnbarkeit von mindestens einer Herzkammer. Die systolische Funktion und die Herzwanddicke sind normal. Diese Form der Kardiomyopathie ist in Europa selten; sie wird u.a. auch als Endokarditis fibroplastica Löffler bezeichnet.
- IV. Die *arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie* (ARCM) ist charakterisiert durch eine progrediente Einlagerung von Binde- und Fettgewebe im rechtsventrikulären Herzmuskel bei Abnahme an Herzmuskelzellen. Dabei kommt es regional, später global, zu einer Abnahme der rechtsventrikulären Wanddicke; der linke Ventrikel kann mit betroffen sein, das Herzseptum wird meist ausgespart. Klinisch zeigen sich Herzrhythmusstörungen mit kardialer Dysfunktion.

V. Der *nichtklassifizierten Kardiomyopathie* (UCM) gehören diejenigen Erkrankungen an, die nicht den anderen vier Gruppen zugeordnet werden können. Dazu gehören die Fibroelastose, die systolische Dysfunktion ohne signifikante Ventrikeldilatation oder Herzmuskelerkrankungen auf der Basis von mitochondrialen Störungen.

Von den angeführten Kardiomyopathien sind die Formen abzugrenzen, die ätiologisch zugeordnet werden können. Sie werden als *spezifische Kardiomyopathien* bezeichnet. Sie sind direkt einer ischämischen, valvulären, hypertensiven, entzündlichen, metabolischen bzw. endokrinen oder neuromuskulären Genese zuzuordnen.

## 2. Dilatative Kardiomyopathie

### 2.1. Definition, Epidemiologie und Klinik

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist definiert als Erkrankung des Herzmuskels, die durch eine Dilatation zumindest des linken Ventrikels gekennzeichnet ist; sie ist verbunden mit einer eingeschränkten systolischen Pumpfunktion [167].

Die epidemiologischen Angaben in der westlichen Welt hinsichtlich der jährlichen Inzidenz schwanken zwischen 6 und 8 je 100000 Einwohner; die Prävalenz wird mit etwa 36 pro 100000 Einwohner angegeben [39, 44, 49, 165]. Afroamerikaner und Männer haben ein 2,5fach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Die Erstmanifestation der Erkrankungen zeigt sich bei den meisten Patienten im mittleren bis höheren Lebensalter, allerdings können auch Kinder davon betroffen sein [39, 66, 106].

Bei Manifestation der DCM zeigen 70 bis 85% der Patienten Symptome einer Herzinsuffizienz wie Ruhe- bzw. Belastungsdyspnoe, Abgeschlagenheit und Leistungsschwäche sowie Beinödeme; ca. 14% hatten zuvor eine Synkope gehabt [39, 49].

Als ursächlich ist die DCM bei 25% der Herzinsuffizienzpatienten anzusehen [9]. Allgemein treten bei der DCM Symptome erst relativ spät im Erkrankungsverlauf auf; nicht selten besteht seit Monaten bis Jahren eine linksventrikuläre Dilatation. Die 5-Jahres-Mortalität nach Auftreten einer klinischen Symptomatik wird mit 20% angegeben [93, 114, 179].

### 2.2. Ätiologie

Die Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie muss als insgesamt sehr inhomogen angesehen werden. Aufgrund der multifaktoriellen Genese müssen im Rahmen der differenzialdiagnostischen Abklärung mehrere Faktoren berücksichtigt werden [108].

#### 2.2.1. *Familiäre Genese*

Einen kleineren Anteil von etwa 20 bis 30% machen die familiären Formen der DCM aus [146]. Durch molekulargenetische Untersuchungen war es in den vergangenen Jahren möglich, dieser Subgruppe Defekte verschiedener Genloci zuzuordnen, die wiederum für unterschiedliche Muskelzellproteine kodieren. Bei den meisten betroffenen Familien ist ein autosomal dominanter Erbgang nachweisbar; als mögliche betroffene Muskel-

zellproteine konnten u.a. Laminin A und C sowie Actin und Myosin identifiziert werden [64, 145]. X-chromosomale Erbgänge sind eher selten und betreffen das Dystrophin; sie sind meist mit Skelettmuskeldystrophien vom Typ Duchenne und Becker verbunden [69, 183]. Auch autosomal-rezessive Erbgänge sind bekannt [152, 184].

### 2.2.2. *Toxische Genese*

Des Weiteren wurden auch exogen-toxische Formen der DCM beschrieben. Als häufigste Noxe in dieser Subgruppe ist der Alkohol anzuführen [63], ferner wurden DCM-Erkrankungen im Zusammenhang mit Anthrazyklinen und Kokain beschrieben [66].

### 2.2.3. *Inflammatorische (infektiöse/autoimmune) Genese*

Die Gruppe der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathien beinhaltet aufgrund ihres sehr ähnlichen Erscheinungsbildes sowohl die *infektiösen* als auch die viel diskutierten *autoimmunen* Formen.

In tierexperimentellen Untersuchungen der vergangenen Jahre konnte gezeigt werden, dass hierbei sowohl virustoxische Effekte als auch zelluläre und humorale Mechanismen zu einer Schädigung des Myokards beitragen [29]. So wiesen mehrere Herzinsuffizienzstudien signifikant erhöhte Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen nach [68, 141, 181]. Dabei wurden überwiegend Veränderungen hinsichtlich des Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF $\alpha$ ), des Interleukin-6 (Il-6) sowie von löslichem Interleukin-2-Rezeptor, Interleukin-1 $\alpha$  und - $\beta$ , löslichem TNF $\alpha$ - und Il-6-Rezeptor nachgewiesen. Auf unterschiedlichen Wegen können durch diese Immunregulatoren die Kontraktilität des Herzens sowie strukturelle Umbauvorgänge im Herzgewebes (sog. Remodeling) beeinflusst werden.

Bei der Gruppe der *infektiös bedingten DCM-Erkrankungen* steht ätiologisch eine Myokarditis im Vordergrund [91, 116, 155]; ein Teil der dilatativen Kardiomyopathien ist als Form einer chronisch-persistierenden Infektion des Herzmuskels einzustufen [105, 157]. Als häufigste virale Erreger wurden Enteroviren beschrieben, insbesondere Coxsackie-B-Viren [11, 110, 136]. Ferner konnten auch Adenoviren [79, 158] sowie Epstein-Barr- und Cytomegalie-Viren im Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten nachgewiesen werden [117].

Der Nachweis kardialer Antigene und korrespondierender Autoantikörper bei Herzinsuffizienzpatienten führte zum Postulat einer primär *autoimmunen Genese* bei einem Teil der DCM-Erkrankungen. Ausgangspunkt dieser Hypothese ist eine grundsätzlich gestörte humorale und zelluläre Immunität bei diesen Patienten; eine Assoziation mit bestimmten HLA-Typen wird diskutiert, insbesondere mit HLA-DR4 [33]. Darüber hinaus ließen sich im Blut von DCM-Patienten Autoantikörper u.a. gegen den ADP/ATP-Transporter [173], die Myosinschwerketten [31, 169] sowie gegen Laminin [191] nachweisen. Inwieweit diese Autoantikörper bei der Pathogenese der DCM eine Rolle spielen, ist derzeit noch offen [30].

Bereits 1984 wurden im Zusammenhang mit der durch den Parasiten *Trypanosoma cruzi* hervorgerufenen Chagaskrankheit und der Chagaskardiomyopathie erstmals im Serum betroffener Patienten Antikörper nachgewiesen, die mit dem  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor kreuzreagierten [19]. Zusätzlich zeigte die Arbeitsgruppe von Borda *et al.*, dass diese Antikörper in der Lage waren, den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor zu stimulieren. Limas *et al.* fanden in 30 bis 40% der Seren von DCM-Patienten  $\beta_1$ -Adrenozeptorantikörper [120], welche mit verschiedenen synthetischen Peptiden des  $\beta$ -Rezeptors reagierten. Neuere Untersuchungen legen eine Prävalenz von 30 bis 95% nahe, abhängig vom eingesetzten Untersuchungsverfahren [132, 134]. Jahns *et al.* konnten zeigen, dass nur bei ca. 26% der DCM-Patienten Autoantikörper gebildet werden, die auch den nativen  $\beta_1$ -Adrenozeptor erkennen und stimulieren. Diese stimulatorischen Antikörper sind vermutlich alle gegen die zweite extrazelluläre Domäne des  $\beta_1$ -Adrenozeptors gerichtet [98]. Der Nachweis solcher stimulatorischen  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper bei DCM-Patienten ist mit einer signifikant schlechteren Pumpfunktion assoziiert [98].

Weitere Ausführungen bezüglich der  $\beta_1$ -Adrenozeptorantikörper und der zweiten extrazellulären Domäne sind in Kapitel 3.6. dargelegt.

### 2.3. Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Das häufigste klinische Erscheinungsbild der DCM ist eine Herzinsuffizienz. Durch eine Reduzierung des Herzzeitvolumens droht den verschiedenen Organen eine Minderperfusion, woraufhin verschiedene Kompensationsmechanismen durch Aktivierung der Barorezeptoren eingeleitet werden.

Durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems werden Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark freigesetzt. Diese Botenstoffe stimulieren die kardialen  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, was an Kardiomyozyten einen positiv inotropen Effekt zur Folge hat. Dieser beruht auf einem intrazellulären cAMP-Anstieg mit Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Stimulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren am Sinusknoten hat einen positiv chronotropen Effekt. Ein chronisch gesteigerter Sympathikotonus mit dauerhaft erhöhten Plasmakonzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin führt dann aber zu einer deutlichen Verminderung des positiv inotropen Effektes. Dies ist wahrscheinlich auf eine Downregulation und Entkoppelung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren sowie die Zunahme inhibitorischer  $G_i$ -Proteine in der Membran der Herzmuskelzelle zurückzuführen [126]. Zusätzlich haben hohe lokale Konzentrationen von Katecholaminen und Kalzium auch direkte gewebetoxische Effekte [16, 42, 197]. Die Herzfrequenzsteigerung wird durch eine Verkürzung der Diastolendauer erreicht, was aber einen Anstieg der Wandspannung und des kardialen Sauerstoffbedarfs zur Folge hat.

Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist ein weiterer Kompensationsmechanismus des insuffizienten Herzens. Stimuli zur Freisetzung von Renin sind renale Minderperfusion und Hyponatriämie. Die aktive Form des Angiotensin II wirkt stark vasokonstriktorisch und setzt Aldosteron frei; die Rückresorption von Salz und Wasser wird gesteigert, das Plasmavolumen nimmt zu und damit wird die Vorlast gesteigert.

Die ebenfalls kompensatorisch freigesetzten Hormone Vasopressin und Endothelin bewirken durch Vasokonstriktion einen zusätzlichen Anstieg der Nachlast des Herzens. Eine der wichtigsten Gegenspieler des RAAS sind das atriale natriuretische Peptid (ANP) und der B-Typ des natriuretischen Peptids (BNP). ANP wird durch die Dehnung der Herzvorhöfe direkt aus den Kardiomyozyten freigesetzt. Beide wirken vasodilatatorisch und natriuretisch, zusätzlich werden das RAAS und das sympathikoadrenerge System gehemmt. Es kommt folglich zu einer Senkung der Vor- und Nachlast.

Das Stadium der chronischen Herzinsuffizienz lässt sich als „Circulus vitiosus“ beschreiben: Die initial eingeschränkte Herzleistung mit vermindertem Herzminutenvolumen wird durch das sympathikoadrenerge System und das RAAS kompensiert. Durch Verminderung regulierender Einflüsse des Sympathikus (Downregulation von  $\beta$ -

Rezeptoren, Desensibilisierung von Barorezeptoren) und des RAAS mündet dies aber letztlich in eine dauerhaft inadäquate Kompensation mit kontinuierlicher Steigerung von Vor- und Nachlast des Herzens. Die Folge ist ein weiterer Abfall des Herzminutenvolumens mit sukzessiver Schädigung der Herzmuskelzellen.

#### 2.4. Therapie der dilatativen Kardiomyopathie

Trotz der heterogenen Ursachen der DCM orientiert sich die Therapie der Erkrankung an den gültigen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zur Therapie der Herzinsuffizienz [88, 92]. Daran schließen sich Erläuterungen zu den kausalspezifischen Therapieansätzen an.

##### 2.4.1. *Allgemeine Maßnahmen*

Diese beinhalten eine Gewichtsnormalisierung, Kochsalzrestriktion, eine Begrenzung der Flüssigkeitsaufnahme (1,5 bis 2 Liter pro Tag) sowie eine moderate körperliche Aktivität mit Ausdauertraining bis NYHA-Stadium III. Ferner wird eine Nikotinkarenz sowie die Vermeidung von kardiotoxischen Substanzen wie Alkohol oder bestimmten Chemotherapeutika (z.B. Anthrazykline, Trastuzumab) empfohlen.

##### 2.4.2. *Pharmakotherapie*

Der *ACE-Hemmer* hat sich heute als Basistherapeutikum praktisch aller Stadien der Herzinsuffizienz etabliert. Durch ACE-Hemmer wird das RAAS beeinflusst und die Bildung von Angiotensin II gehemmt. Die Folge ist eine Vor- und Nachlastsenkung des Herzens, zusätzlich wird das Remodeling des Myokards günstig beeinflusst.

In mehreren Studien (u.a. CONSENSUS, SOLVD) konnte gezeigt werden, dass Patienten der NYHA-Stadien II bis IV hinsichtlich klinischer Symptomatik, physischer Belastbarkeit, Hospitalisierung und Mortalität davon profitieren [CONSENSUS-Studie (1), SOLVD-Studie (2)]. Auch asymptomatische Patienten profitieren von der Behandlung mit einem ACE-Hemmer [SOLVD-Präventionsstudie (3)].

Die  *$\beta$ -Adrenozeptor-Blocker* haben sich ebenfalls zu einem Standardmedikament in der Herzinsuffizienztherapie entwickelt.  $\beta$ -Rezeptorblocker greifen direkt in die inadäquate sympathische Stimulation bei der Herzinsuffizienz ein. Die Effekte erklärt man sich durch eine Verhinderung der Downregulation bzw. Entkoppelung der  $\beta$ -Adrenozeptoren

durch Absenken des intrazellulären cAMP-Spiegels sowie eine Abnahme von G<sub>i</sub>-Proteinen in der Kardiomyozytenmembran [16, 175, 197]. Ferner kommt es durch eine Verlängerung der Diastolendauer zu einer Verbesserung der kardialen Energiebilanz mit optimierter Sauerstoffutilisation sowie einem Schutz vor der direkten Katecholamin-toxizität [16, 42, 197]. Die indirekten Effekte der  $\beta$ -Rezeptorblockade sind auf eine Verminderung der RAAS-Aktivierung [17, 52, 182], eine verminderte Produktion freier Radikale [15] und/oder einer reduzierten Aktivierung von Proto-Onkogenen [107] sowie einer mittelfristigen Verbesserung der kardialen Hämodynamik zurückzuführen. Noch vor einigen Jahren galten die  $\beta$ -Blocker als kontraindiziert bei der Herzinsuffizienz [24]. Danach konnte in verschiedenen Studien mit Herzinsuffizienzpatienten im NYHA-Stadium II bis IV aber gezeigt werden, dass es durch die zusätzliche Einnahme eines  $\beta$ -Blockers zu einer Reduzierung der Morbidität und Gesamletalität kommt [CIBIS-II-Studie (6), MERIT-HF-Studie (7), (62), COPERNICUS-Studie (115), U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group (156)]. Diese Effekte gelten allerdings nur für  $\beta_1$ -selektive Rezeptorblocker wie Metoprolol oder Bisoprolol und einen nicht-selektiven  $\beta$ -Blocker mit hoher Rezeptoraffinität, dem Carvedilol.

Die Antagonisten des Angiotensin-II-Rezeptors (sog. *AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker*), auch als Sartane bezeichnet, wirken unmittelbar am Erfolgsorgan. Eine Überlegenheit gegenüber den ACE-Hemmern konnte in der ELITE-II- und der ValHeFT-Studie nicht nachgewiesen werden [102, 159, 162], allerdings konnte in der ValHeFT-Studie eine ähnlich signifikante Senkung von Morbidität und Sterblichkeit nachgewiesen werden [41, 130]. Die Kombination von ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker erscheint nur bei persistierender Klinik herzinsuffizienter Patienten sinnvoll, da es zu einer Reduzierung der Hospitalisation führt; die Gesamtsterblichkeit war davon nicht beeinflusst [41, 142]. Die Kombination von AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker, Betablocker und ACE-Hemmer bzw. die Kombination eines Sartans mit einem der beiden anderen Medikamentengruppen hat sich als nicht nachteilig für Herzinsuffizienzpatienten erwiesen [53, 142, 159], allerdings sind hierbei engmaschige Kontrollen der Retentionsparameter bei erhöhter Gefahr für eine Hyperkaliämie geboten.

*Diuretika* sind bei Patienten mit evidenter Flüssigkeitsretention unerlässlich, da sie sehr rasch zu einer objektiven und subjektiven Besserung der Symptomatik führen. So wer-

den Thiazide als auch Schleifendiuretika regelmäßig eingesetzt, bei therapieresistenten Ödemen kann unter Umständen auch die Kombination von beiden Substanzklassen mit dem Ziel einer sequenziellen Nephronblockade sinnvoll sein.

*Aldosteron-Antagonisten* sollten als Ergänzung der Basistherapie aus ACE-Hemmer,  $\beta$ -Rezeptorblocker und Diuretikum angesehen werden. In der RALES-Studie führte die zusätzliche Gabe von Spironolacton zu einer Basistherapie (ACE-Hemmer mit Schleifendiuretikum) bei NYHA-Stadium III- bis IV-Patienten zu einer Besserung der Symptomatik und Verringerung der Hospitalisation sowie des plötzlichen Herztodes [37, 166]. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte auch die EPHESUS-Studie bei Postinfarktpatienten mit Herzinsuffizienzzeichen [163].

Die *Herzglykoside* hemmen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und wirken positiv inotrop und negativ chronotrop. Ihre Wirksamkeit und Effektivität in der Therapie der Herzinsuffizienz beschränkt sich auf die Frequenzkontrolle bei gleichzeitig bestehender Arrhythmia absoluta sowie als ergänzende Medikation zu ACE-Hemmern,  $\beta$ -Rezeptor-Blocker und ggf. Diuretikum in niedriger Dosierung. Die Gabe eines Digitalisglykosids bei eingeschränkter linksventrikulärer Funktion zu einer Medikation aus ACE-Hemmer und Diuretikum verbesserte in der DIG-Studie nachweislich die klinische Symptomatik und verringerte die Notwendigkeit einer stationären Behandlung [Digitalis Investigation Group (5)].

Der längerfristige Einsatz von *positiv inotropen Pharmaka*, deren Mechanismus auf einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels beruht, wird im Zusammenhang mit der Behandlung der Herzinsuffizienz nicht empfohlen, da sie mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert sind; ihre Verwendung bleibt der akuten/dekompensierten Herzinsuffizienz vorbehalten. Zu den Vertretern dieser Gruppe zählen Phosphodiesterasehemmer (Amrinon, Milrinon, Pimobendan) wie auch  $\beta$ -adrenerge Agonisten (Dobutamin, Ibopamin).

#### 2.4.3. Operative Therapie

Die Herztransplantation ist noch immer als ultima ratio bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz anzusehen. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen derzeit zwischen 70 und 80% [89]. Die ventrikulären Assist-Systeme (Unterstützungssysteme) oder eine

Kunstherzimplantation können derzeit nur als überbrückende Maßnahme bis zur geplanten Herztransplantation angesehen werden; sie sind in 88 bis 96% erfolgreich.

Die konventionelle rechtsventrikuläre Implantation eines Herzschrittmachers wird nur bei kritischen Bradykardien empfohlen. Eine biventrikuläre Stimulation durch kardiale Resynchronisationstherapie wird bei Patienten im NYHA-Stadium III und IV mit breitem QRS-Komplex ( $> 130$  ms) und systolischer Dysfunktion empfohlen. Die Care-HF-Studie zeigte diesbezüglich eine Reduzierung der Gesamtsterblichkeit und der Hospitalisierungsrate [22, 38].

Die ICD-Therapie (implantierbarer Kardioverter) wird derzeit nach überlebtem plötzlichem Herztod mit anhaltenden ventrikulären Tachykardien empfohlen. In der SCD-HeFT-Studie konnte durch die Behandlung mit einem ICD eine Überlebensverbesserung für Patienten mit eingeschränkter systolischer Funktion basierend auf einer ischämischen oder nichtischämischen Kardiomyopathie gezeigt werden [13]. Eine ICD-Therapie zur Primärprävention bei nicht-ischämischer systolischer Herzinsuffizienz wird derzeit nicht empfohlen; in verschiedenen Studien konnte keine signifikante Senkung der Gesamtsterblichkeit bei DCM-Patienten nachgewiesen werden [12, 103, 178].

Weitere Verfahren wie die Stammzelltherapie oder kardiales Unterstützungsnetz (Corcap) befinden sich noch im experimentellen Stadium; andere wie die partielle Ventrikulektomie (Batista-Operation) oder die dynamische Kardiomyoplastie konnten sich als operative Maßnahme bei der Herzinsuffizienz nicht durchsetzen.

#### 2.4.4. *Kausalspezifische Therapieansätze*

Durch intensive Bemühungen im Bereich der Grundlagenforschung ist es in den vergangenen Jahren gelungen, die Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie besser zu verstehen. Einen sehr vielversprechenden Angriffspunkt scheint demnach das Immunsystem darzustellen sowie die unterschiedlichen Ansätze, es zu beeinflussen.

So war in einer Pilotstudie zur unspezifischen Immunadsorption mittels Sepharose-Matrix und Anti-human-IgG vom Schaf bei DCM-Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz gezeigt worden, dass es bei  $\beta_1$ -Rezeptor-Antikörper positiven Patienten zu einem leichten Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion sowie zu einer Verbesserung der Herzinsuffizienzzeichen kommt [57]. Auch die nach drei Jahren im

Follow-Up erhobenen Daten sprechen für eine Stabilisierung der DCM bei  $\beta_1$ -Rezeptor-Antikörper positiven Patienten durch den Einsatz der Immunadsorption [58].

Mit dem Ziel die körpereigene Immunglobulinproduktion zu reduzieren ist auch der Effekt einer intravenösen Immunglobulingabe in kleineren Studien untersucht worden. Behandelte Patienten zeigten eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion [21, 144]. In einer darauf folgenden multizentrischen Studie (IMAC) ließen sich diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen [143]. Der therapeutische Stellenwert einer intravenösen Immunglobulingabe ist derzeit unklar.

Aufgrund der vermuteten autoimmunen Genese wurde auch der Effekt einer immunsuppressiven Therapie bei chronischen und autoreaktiven Myokarditisformen untersucht. Der Einfluss verschiedener Immunsuppressiva (Azathioprin, Prednisolon, Cyclosporin-A) auf die Hämodynamik und die Klinik der Patienten zeigte in kleineren Studien einen positiven Trend, allerdings konnte dies weder in Metaanalysen noch in einer größeren randomisierten Multicenter-Studie bestätigt werden [135, 137]. Ein Grund hierfür liegt sicher in dem inhomogenen Patientenkollektiv; andererseits ist die genaue Ursache der Erkrankung in den meisten dieser Studien nur selten ausreichend differenzialdiagnostisch abgeklärt worden. In Tierexperimenten kam es durch Einsatz von Immunsuppressiva bei aktiver Myokarditis und viraler Genese sogar zu einer Erhöhung der Mortalität [86].

### 3. Der $\beta$ -adrenerge Rezeptor

#### 3.1. Bedeutung des $\beta$ -adrenergen Systems

Als Teil des sympathischen Nervensystems dient das adrenerge System der Regulierung wichtiger Organfunktionen im menschlichen Körper. Die wesentliche Überträger-substanz dieses Systems sind Katecholamine, die ihre physiologischen Effekte über Empfänger-moleküle, sog. Rezeptoren, in der Zellmembran der Zielzellen von extranach intrazellulär vermitteln. Die Rezeptoren des adrenergen Systems finden sich sowohl im zentralen Nervensystem als auch im nichtneuronalen Gewebe.

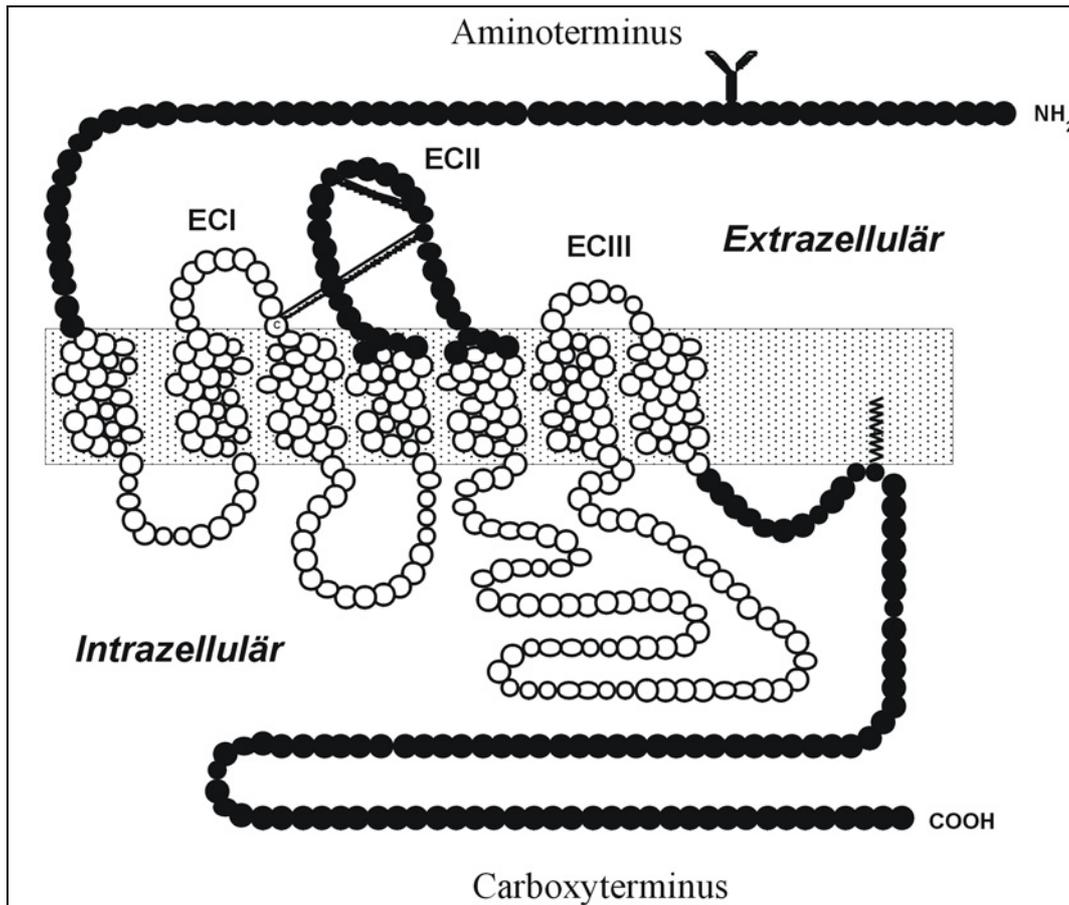
Aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften können drei verschiedene Typen adrenerger Rezeptoren differenziert werden:  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren [10, 118]. Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand werden wiederum drei Subtypen von  $\beta$ -Adrenozeptoren differenziert [122]. Der  $\beta_1$ -Rezeptor dient u.a. der Steigerung der Kontraktilität sowie der Schlagfrequenz des Herzens [72],  $\beta_2$ -Rezeptoren vermitteln u.a. die Relaxation der glatten Muskulatur in Blutgefäßen und Bronchien [112], und der  $\beta_3$ -Subtyp dient der Vermittlung der Lipolyse in braunem Fettgewebe [59, 60].

Auf physischen (Kälte, Hitze, Sauerstoffmangel, Hypoglykämie, körperliche Arbeit) oder psychischen Stress (Angst, Schmerz) reagiert der Körper mit einer Steigerung des Sympathikotonus. Dieser führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark sowie zu einer erhöhten lokalen Freisetzung von Noradrenalin in verschiedenen Geweben [118]. So resultiert aus der Bindung von Adrenalin und Noradrenalin an  $\beta_1$ -Rezeptoren am Herzen eine Steigerung von Herzfrequenz und Kontraktilität sowie eine Erweiterung der Herzkranzgefäße [27, 50]; renal wird die Sekretion von Renin und die Salzreabsorption gesteigert [17, 51]. Über die  $\beta_2$ -Rezeptoren wird die Dilatation der Bronchien vermittelt [77]. Einen wesentlichen Beitrag zu Feinregulierung dieses Systems leistet die lokal unterschiedliche und gewebe-spezifische Verteilung der  $\beta$ -Rezeptoren. So finden sich  $\beta_1$ -Rezeptoren überwiegend im menschlichen Myokard mit einem Anteil von 75 bis 85%,  $\beta_2$ -Rezeptoren sind dort mit 20 bis 25% vertreten und der  $\beta_3$ -Subtyp wird dort nur in sehr geringem Maße ex-primiert [27, 50, 75]. Im Gegensatz dazu finden sich in der Lunge sowie den peripheren Gefäßen überwiegend  $\beta_2$ -Rezeptoren [32, 101, 118].

### 3.2. Struktur der $\beta$ -Rezeptoren

Die adrenergen Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. G-Proteine sind heterotrimer und bestehen aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Diese Untereinheiten binden GTP und fungieren als Bindeglied zwischen membran-gebundenem Rezeptor und zelleigenen Effektormolekülen [76, 151]. In Abhängigkeit vom Rezeptortyp werden unterschiedliche Signalübertragungsketten aktiviert. So vermitteln  $\alpha_1$ -Rezeptoren über eine Aktivierung der Phospholipase C eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels,  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermitteln über die Hemmung der Adenylatzyklase ein Absinken des cAMP-Spiegels und damit der intrazellulären Kalziumkonzentration, wohingegen  $\beta$ -Rezeptoren durch Aktivierung dieses Enzyms zu einer Anhebung des cAMP-Spiegels führen [123].

Aus einer Reihe von Untersuchungen konnte ein Strukturmodell für die G-Protein-Rezeptoren entwickelt werden. Als Mitglied der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehen die  $\beta$ -adrenergen Rezeptorproteine aus sieben hydrophoben transmembranösen  $\alpha$ -Helices sowie drei intra- und drei extrazellulären hydrophilen Abschnitten (Abb. 1) [84, 171]; das carboxyterminale Ende befindet sich auf der Innenseite der Zellmembran. Die Ligandenbindungsstelle liegt im inneren Kern der kreisförmig angeordneten transmembranen Abschnitte des Rezeptormoleküls [84]. In diesem Zusammenhang wurde auch die Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife, die die IV. und V. transmembrane Domäne miteinander verbindet und stabilisiert untersucht. Es zeigte sich, dass eine Reduktion oder Mutation von Cystein-Residuen in dieser Domäne zu einer erheblichen Reduktion der Affinität von Rezeptoragonisten und auch –antagonisten führt, vermutlich durch Konformationsänderung der Ligandenbindungsstelle [55, 186]. Daraus lässt sich schließen, dass eine korrekte dreidimensionale Anordnung der extrazellulären Domänen für die Ausbildung der Ligandenbindungstasche essenziell ist [56, 149, 154].



**Abbildung 1:** Struktur des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors entsprechend den publizierten Aminosäuresequenzen von Frielle *et al.* [72]. Die dreidimensionale zirkuläre Anordnung der sieben intrazellulären Domänen wurde in der Abbildung nicht berücksichtigt. Entnommen der Publikation von Jahns *et al.* [99].

### 3.3. Signaltransduktion der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

Die jeweiligen  $\beta$ -Adrenozeptorsubtypen können die nachgeschaltete Signaltransduktion in den Zielzellen unterschiedlich beeinflussen. Die resultierende Reaktion einer Zielzelle ist somit vom dominierenden  $\beta$ -Rezeptorsubtyp abhängig [109, 147].

Beim klassischen Weg der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion kommt es durch die Bindung von Katecholaminen bzw. eines synthetischen  $\beta$ -Rezeptoragonisten zu einer Konformationsänderung des gebildeten Ligand-Rezeptorkomplexes [48, 70, 111].

Dieser Komplex ist an stimulierende, GTP-bindende Proteine ( $G_s$ ) gekoppelt, die in der aktiven Konformation die membranständige Adenylatzyklase aktivieren [14, 78]. In der Folge kommt es zu einer Bildung von cAMP aus ATP [90], was wiederum eine Vielzahl weiterer Enzyme und Effektorproteine aktivieren kann. So führt dies u.a. zu einer

Aktivierung der Proteinkinase A, die wiederum eine Untereinheit des L-Typ-Kalziumkanals phosphoryliert [74]. Die Folge ist ein erhöhter Kalziueinstrom und dadurch die Aktivierung zellspezifischer Funktionen [123]. So kommt es in Kardiomyozyten zu einer Steigerung der Myokardkontraktilität sowie der Herzfrequenz [27]. Das zelluläre cAMP wird durch Phosphodiesterasen abgebaut [90].

Die relaxierende Wirkung der  $\beta_2$ -Rezeptoren wird durch die Aktivierung zusätzlicher Wege der Signaltransduktion erklärt [195]. So führt die Aktivierung von  $\beta_2$ -Rezeptoren zwar zu einem cAMP-Anstieg, allerdings koppelt der Rezeptor auch an inhibitorische G-Proteine ( $G_i$ ) [45, 109, 194], was über eine Aktivierung von Phosphodiesterasen letztlich zu einer verminderten Phosphorylierung von leichten Myosinketten und somit zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen führt.

Das bessere Verstehen von zusätzlichen bzw. alternativen Wegen der Signaltransduktion  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren ist Schwerpunkt aktueller Forschungsbemühungen. Hierdurch könnten sich neue Möglichkeiten der medikamentösen „Beeinflussung“ und Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen ergeben.

### 3.4. Regulation der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

Eine weitere Eigenschaft der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ist die Möglichkeit, sich den Reizen und den Erfordernissen des Körpers dynamisch anzupassen [123]. Ein Mechanismus hierbei ist die Anpassung auf Rezeptorebene, die rasch (sog. Desensibilisierung) [83, 124] oder längerfristig (sog. Rezeptor-Downregulation) erfolgen kann [20, 26, 122].

Die Konformationsänderung des aktivierten Rezeptors führt, wie oben beschrieben, zu einer Aktivierung rezeptorspezifischer Kinasen mit Phosphorylierung intrazellulärer und membranständiger Proteine. Die Folge ist die Entkoppelung des Rezeptors vom zugehörigen G-Protein. Dieser Mechanismus ist eine schnelle, reversible Form der Adaptation und wird als Desensibilisierung bezeichnet; das Rezeptorsignal kann dadurch um ca. 75% vermindert werden [122]. Man unterscheidet hierbei eine homologe Desensibilisierung durch spezifische G-Protein-Rezeptor-Kinasen (sog. GRK's) und  $\beta$ -Arrestine [82, 124] von einer heterologen Form, die durch die cAMP-abhängige und Agonist-unabhängige Proteinkinase A vermittelt wird [124].

Ein weiterer regulatorischer Mechanismus ist die Rezeptorsequestration. Durch langanhaltende Agoniststimulation kommt es zu einer Abnahme der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren an der Zelloberfläche [67, 73, 104]. Die entkoppelten Ligand-Rezeptor- $\beta$ -Arrestin-Komplexe werden vermutlich in Clathrin-beschichtete pinozytische Vesikel im Zellinneren aufgenommen [199]. Nach Dephosphorylierung und einem variablen zeitlichen Intervall können die Rezeptoren dann wieder in die Zellmembran integriert werden (sog. „recycling pathway“, entsprechend einer Resensibilisierung) [161, 198], oder aber es kommt zu einem Abbau der Rezeptoren in Lysosomen des zytoplasmatischen Reticulums (sog. „degradation pathway“) [67, 187]. Neben der Rezeptordegradation führen auch Regulationsmechanismen der mRNA-Replikation zu einem intrazellulären Verlust an  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren [20, 81]; beide Regulationswege sind als langfristige Anpassung der zellulären Rezeptorexpression an eine chronische Überstimulation zu verstehen.

### 3.5. Veränderung des $\beta$ -adrenergen Systems bei Herzinsuffizienz

Im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz kommt es aufgrund der linksventrikulären Pumpschwäche zu einer Aktivierung des adrenergen Systems [25]. So korreliert der Katecholaminspiegel im Blut mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz [40]. In Folge der adrenergen Überstimulation kommt es zu einer isolierten Downregulation der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren am Herzmuskel [27, 61]; Rezeptoraffinität und Aktivierbarkeit der Adenylatzyklase bleiben aber unverändert [25]. Das Expressionsverhältnis von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren verschiebt sich dabei von 80:20 beim Gesunden zu 60:40 beim insuffizienten Herzen [27, 28]. Bei den  $\beta_2$ -Rezeptoren kommt es zu einer Desensibilisierung und somit zu einer Verminderung der Wirkung von selektiven Agonisten um ca. 35% [25]. Es konnte gezeigt werden, dass beim insuffizienten Herzen die Restkontraktilität im wesentlichen durch eine Stimulation der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren aufrecht erhalten wird [193, 200]. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die  $\beta_2$ -adrenerge Stimulation eine Apoptose von Kardiomyozyten verhindert [34, 43], wohingegen über  $\beta_1$ -Rezeptoren eine Apoptose induziert werden kann [42]. Die  $\beta_3$ -Rezeptoren vermitteln vermutlich negativ inotrope Effekte am Herzen, nachdem sie überwiegend an inhibitorische  $G_i$ -Proteine gekoppelt zu sein scheinen [18, 75, 164].

Im Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es darüber hinaus zu einer deutlichen Überexpression der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen [113, 160, 185]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Überexpression von GRK2 und/oder GRK5 zu einer Reduzierung der Herzleistung führt [113, 168]. Die spezifische Inhibition von GRKs bietet möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt in der Behandlung der Herzinsuffizienz [8, 71, 113, 125].

### 3.6. Der $\beta$ -adrenerge Rezeptor als Autoantigen

Bereits im Kapitel über die Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie wurde die auto-immune Genese der DCM angesprochen (siehe Kapitel 2.2.3.).

In Anlehnung an die von Witebsky aufgestellten Postulate (die im deutschen Sprachraum den Koch'schen Postulaten entsprechen) wurden von Rose und Bona die Postulate für die Pathogenese einer Autoimmunerkrankung neu definiert [170]:

- (1) Das Autoantigen muss immunogen sein, das Epitop muss in vitro T- und B-Zellen aktivieren können.
- (2) Als Antwort des Immunsystems muss es zur Bildung von spezifischen Antikörpern kommen.
- (3) Die Immunreaktion muss zur Ausbildung eines krankheitsspezifischen Symptomkomplexes führen, der passiv durch die Übertragung der humoralen (B-Zellen) oder zellulären (T-Zellen) Immunantwort induzierbar ist.

Erstmals wurde 1984 über die Bildung von Antikörpern gegen  $\beta_1$ -Adrenozeptoren im Zusammenhang mit der Chagas-Krankheit berichtet. Erst zu einem späteren Zeitpunkt konnte gezeigt werden, dass diese Antikörper primär gegen Proteinstrukturen des parasitären Erregers der Grunderkrankung gerichtet waren und mit dem  $\beta_1$ -Rezeptor kreuzreagierten [19]. Wenige Jahre danach wiesen andere Arbeitsgruppen im Serum von DCM-Patienten Antikörper gegen synthetische Peptide von  $\beta$ -Adrenozeptoren nach [120, 132, 134]. Ferner konnte gezeigt werden, dass diese Antikörper rezeptorvermittelte Funktionen beeinflussen konnten [121, 189].

Die Angaben zur Prävalenz der  $\beta$ -Rezeptorantikörper bei der DCM schwanken, abhängig vom verwendeten Nachweisverfahren, zwischen 30 und 95%; hingegen konnten

sie nur bei bis 1 bis max. 16% der Herzgesunden nachgewiesen werden [98, 134, 189]. Weiterführende immunologische Untersuchungen identifizierten die zweite extrazelluläre Domäne des  $\beta_1$ -Rezeptors ( $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>) als immunogenes Antigen; es ist in der Lage, sowohl T- als auch B-Zellen zu aktivieren [131, 148, 180]. Nach Untersuchungen von Jahns *et al.* scheinen  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper bei etwa einem Drittel der Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie vorzukommen; bei 26% der DCM-Patienten ließen sich  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper nachweisen, die den nativen humanen  $\beta_1$ -Rezeptor erkennen und aktivieren konnten [98].

Die Frage, ob Rezeptorantikörper einen hemmenden bzw. blockierenden Effekt haben wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert [121, 134, 189]. Ebenso ist unklar, ob die Bildung von  $\beta_1$ -Antikörpern kausal an der Entstehung einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie beteiligt ist, oder ob die Antikörperbildung als Epiphänomen dieser Erkrankung zu verstehen ist.

Von der japanischen Arbeitsgruppe um Matsui wurde daher versucht, ein Tiermodell zu etablieren [140]. Dabei wurden 10 Kaninchen für ein Jahr mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Peptidhomologen des humanen Rezeptors immunisiert. Bei 6 Tieren führte dies zur Bildung von  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörpern und zu mikro- und makroskopischen Veränderungen des Herzmuskels, die der Kardiomyopathie beim Menschen sehr ähnlich waren. Ein Übertragungsversuch im Sinne des 3. Witebsky-Postulats mit Transfer der induzierten Antikörper in gesunde Kaninchen wurde allerdings nicht durchgeführt.

Die japanische Arbeitsgruppe um Iwata verwendete bei gleichem Versuchsansatz ebenfalls das Kaninchenmodell. Hierbei zeigten die  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-antikörperpositive Tiere nach sechs Monaten eine Hypertrophie des Myokards ohne linksventrikuläre Dilatation [95]. Da die Primärsequenz des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors bei Kaninchen bislang noch nicht identifiziert wurde bleibt es fraglich, ob dieses Tiermodell zur Klärung der Fragestellung als geeignet angesehen werden kann.

### 3. Aufgabenstellung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie am Tiermodell durch Immunisierung von Ratten gegen den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. Als Versuchstiere für diese Arbeit wurden Ratten ausgewählt, da die Sequenz der zweiten extrazellulären Domäne bei Mensch und Ratte 100% homolog ist [72, 129]. Der Schwerpunkt der Arbeit lag einerseits auf der morphometrischen Beurteilung der Rattenherzen im Verlauf der Immunisierungsphase durch regelmäßige echokardiographische Untersuchungen sowie einer histologischen Auswertung der Herzen nach Ablauf von 15 Immunisierungs-Monaten. Ferner erfolgte eine invasive Beurteilung der Herzfunktion im 15. Monat durch eine abschließende Herzkatheteruntersuchung der Tiere.

Die Immunisierung der Ratten erfolgte durch Applikation eines Fusionsproteins, bestehend aus bakterieller Glutathion-S-Transferase und dem zweiten extrazellulären Abschnitt des humanen  $\beta_1$ -Rezeptors. Diese Methode war von Jahns *et al.* bereits am Kaninchen- und Mausmodell zur Gewinnung spezifischer  $\beta$ -Rezeptorantikörper erfolgreich etabliert worden [97, 99].

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojekts der Arbeitsgruppe Jahns durchgeführt. Das Ziel dieses Projektes war die Etablierung eines Tiermodells gemäß den von Witelsky (bzw. Koch im deutschen Sprachraum) formulierten Postulaten für autoimmune Erkrankungen; die potentielle autoimmune Genese einer iDCM sollte auf dem Boden der Antikörperbildung gegen den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor untersucht werden [170]. Die vorgelegte Arbeit bildet den Kern des Immunisierungsversuchs (2. Postulat) und stellte damit zugleich die Basis für den Transferversuch (3. Postulat) dar. Im Transferversuch sollte gesunden Tieren das gewonnene und aufbereitete, Antikörper-haltige Serum von Tieren des zuvor durchgeführten Immunisierungsversuchs regelmäßig appliziert werden.



## **B. MATERIAL UND METHODEN**

### **1. Material**

#### 1.1. Versuchstiere

35 männliche 3 Monate alte Lewis-Inzuchtratten vom Stamm LEW/CrlBR wurden von der Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie in Würzburg entsprechend den gesetzlichen Tierschutzaufgaben untergebracht und versorgt. Je 4 bis 5 Versuchstiere wurden in erhöhten Typ3-Käfigen gehalten.

#### 1.2. Geräte

Zur echokardiographischen Untersuchung wurde das Vivid Five (GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norwegen) mit einer 10 MHz-Schallkopfsonde verwendet.

Die Herzkatheteruntersuchung erfolgte mit einem 1.8 F High-fidelity-Tip-Katheter (Millar Instruments, Houston, Texas, USA).

Die histologische Aufarbeitung wurde in der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg mit dem Vibratome 1000 Classic (TPI Vibratome, St. Louis, Missouri, USA) durchgeführt.

Die Entwässerung und Überführung der Herzscheiben in Paraffin erfolgte in einem vollautomatisierten Micro-Infiltrationssystem sowie im Shandon Histocentre (Thermo Electron Corp., Woburn, Massachusetts, USA) im Institut für Pathologie der Universität Würzburg. Paraffinschnitte wurden am Schlittenmicrotom SM 2000 R (Leica Microsystem GmbH, Bensheim, Deutschland) angefertigt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung kam das Mikroskop Axiovert 135 von Zeiss, Jena, Deutschland zum Einsatz. Computergestützte Aufnahmen am Mikroskop erfolgten mit der Spot-Insight-Color-Kamera (Visitron-Systems GmbH, Puckheim, Deutschland).

Im Rahmen der Kollagenbestimmung wurde das Spectrophotometersystem SpectraMAX 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verwendet.

Die histologisch-morphometrische Auswertung erfolgte an einem Apple-Macintosh G3 mit angeschlossenem Scanner Epson Expression 1600.

Für die Radioligandenbindungsversuche wurde der Gammacounter Wallac Wizard 1480 (Perkin Elmer Inc., Boston, Massachusetts, USA) eingesetzt.

### 1.3. Chemikalien und Materialien

Die Induktion der Fusionsproteine erfolgte wie von Jahns *et al.* beschrieben.

*E. coli* XL-1blue-Zellen kamen von Stratagene, Heidelberg, Deutschland. Die Zytolyse von *E. coli* XL-1blue-Zellen erfolgte mittels French Press (SLM Instruments, Rochester, NY, USA).

10%iges gepuffertes Formalin wurde von der Firma Otto Fischar GmbH & Co. (Saarbrücken, Deutschland) bezogen. Rotilabo<sup>®</sup>-Einbettkassetten (Firma Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden im Rahmen der Herzscheibenaufarbeitung verwendet. Perjodsäure-Lösung, Schiff'sches Reagenz und Hämatoxylin-Lösung für die PAS-Färbungen, Hämatoxylin-Lösung und Eosin-Lösung für die HE-Färbungen sowie die Farbstoffe Sirius-Rot F3BA und Fast-Green-FCF für die spektrophotometrische Kollagenbestimmung stammten von Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland). Ebenfalls für die Kollagenbestimmung wurden NUNC-Maxisorb 96-Napf-Mikrotiterplatten eingesetzt (NUNC GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Die für den Radioligandenbindungsversuch nötigen Proteaseinhibitoren Leupeptin, Benzamidin, Aprotinin und Pepstatin A sowie die Betarezeptorenblocker L-Propranolol und CGP20712A stammten von Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland. Radioaktives <sup>125</sup>Jod-Cyanopindolol (2200Ci/mM) kam von NEN, Zaventem, Belgien. Als Membranfilter für der Vakuumabsaugvorrichtung wurden Glasmikrofaserplättchen (Whatman GF/C) der Firma Whatman (Brentford, Grossbritannien) verwendet. Alle weiteren verwendeten Reagenzien waren von der höchsten kommerziell erhältlichen Qualität.

### 1.4. Software

Zur computergestützten graphischen Auswertung der Echokardiographiebilder, der eingescannten HE-Schnitte der Rattenherzen sowie der mikroskopischen Aufnahmen an PAS-Schnitten wurde Adobe Photoshop 6 (Adobe Systems Inc., USA) verwendet. Für das Anfertigen der mikroskopischen Bilder im Zusammenhang mit der entsprechenden Kamera diente Spot V3.2.1 von Diagnostic Instruments, USA.

Zur digitalen Aufzeichnung und Auswertung der Druckkurven im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung wurde PowerLab von A.D. Instruments, Castle Hill, Australien verwendet.

Die statistische Bearbeitung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

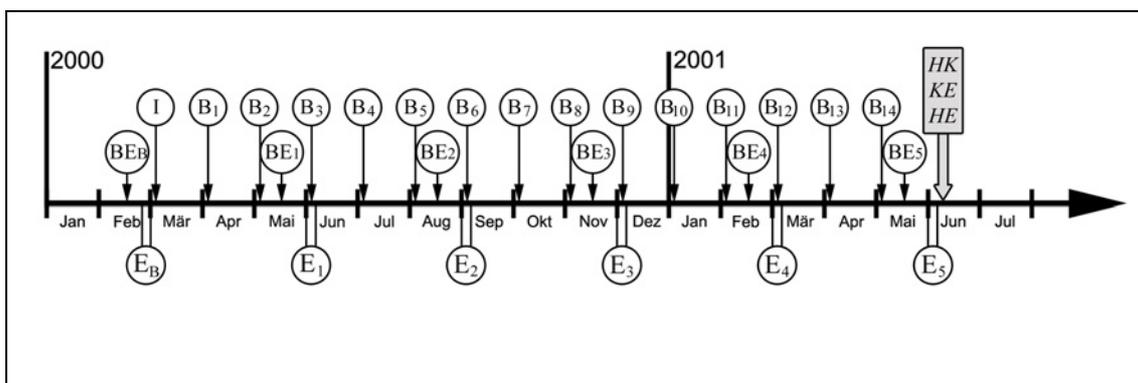
## 2. Methoden

### 2.1. Immunisierung

Die Herstellung des Fusionsproteins aus bakterieller Glutathion-S-Transferase (GST) und der zweiten extrazellulären Domäne des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>) erfolgte wie bereits von Jahns *et al.* beschrieben in *Escherichia coli* XL-1blue-Zellen.

Die Immunisierung und die anschließende monatliche Boosterung wurde für alle 35 Lewis/CrlBR-Inzuchtratten ab der 13. Lebenswoche zu Monatsanfang über 15 Monate durchgeführt (s. Abb. 2). 15 Versuchstiere wurden jeden Monat mit jeweils 50  $\mu$ g des aufgereinigten Fusionsproteins  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>/GST in 500  $\mu$ l PBS, 50  $\mu$ l komplettem und 450  $\mu$ l inkompletem Freund'schem Adjuvans immunisiert (sog.  $\beta$ -Ratten). Den beiden Kontrolltiergruppen wurde monatlich 50  $\mu$ g GST (n=10, sog. GST-Ratten) bzw. 50  $\mu$ l 0,9%-NaCl-Lösung (n=10, sog. NaCl-Ratten) in 500  $\mu$ l PBS, 50  $\mu$ l komplettem und 450  $\mu$ l inkompletem Freund'schem Adjuvans (s. Abb. 2). Die Immunisierungen erfolgten subkutan, wobei das Injektionsvolumen hierbei auf mindestens vier anatomische Lokalisationen (Nacken und Rücken) verteilt wurde.

Alle 3 Monate erfolgte eine Entnahme von ca. 500 $\mu$ l Blut aus der Schwanzvene eines jeden Tieres zur Bestimmung der Antikörpertiter im Blut und zur weiteren funktionellen Charakterisierung dieser Antikörper. Eine Sedierung der Versuchstiere war hierzu nicht erforderlich gewesen.



**Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs von Februar 2000 bis Juni 2001.** I, B1 bis B14 - erste Immunisierung und anschließende monatliche Boosts mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>/GST, GST oder 0,9% NaCl-Lösung; BE<sub>B</sub>, BE<sub>1</sub> bis BE<sub>5</sub> - Blutentnahme vor Immunisierungsbeginn bzw. danach in 3-monatigen Abständen; E<sub>B</sub>, E<sub>1</sub> bis E<sub>5</sub> - Echokardiographie-Untersuchungen vor Immunisierung bzw. danach in 3-monatigen Abständen; HK – abschließende Herzkateteruntersuchung, KE – kontrollierte Entblutung, HE – Herzentnahme nach 15 Monaten.

## 2.2. Echokardiographische Verlaufsuntersuchung

Die echokardiographische Untersuchung der Versuchstiere erfolgte einmalig vor Immunisierung (Basalwerte) und anschließend alle 3 Monate (also insgesamt 6 Untersuchungen im Versuchszeitraum) zur Verlaufskontrolle. Nach der letzten Echokardiographie-Untersuchung (15. Immunisierungsmonat) folgte in einem Abstand von 3 bis 4 Tagen die abschließende Herzkatheteruntersuchung mit kontrollierter Entblutung der narkotisierten Tiere über einen Katheter in der Halsschlagader und die anschließende Herzentnahme (s. Abb. 2). Das gewonnene Blut der jeweiligen Versuchstiergruppe wurde aufgereinigt (Serum), gepoolt und für den geplanten Transferversuch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Bei jeder der Ultraschalluntersuchungen wurden die Herzen sowohl im B-Mode als auch im M-Mode dokumentiert; die funktionelle Beurteilung der Herzen erfolgte im 5-Kammer-Blick mittels Pulsed-Wave-(PW)-Doppler-Verfahren.

Durch die PW-Doppler-Untersuchung können u.a. die Strömungsprofile an der Aortenklappe dargestellt werden. Mit Hilfe des Aortendurchmessers (M-Mode) und der Strömungsgeschwindigkeiten (PW-Doppler) lassen sich die Durchflussvolumina berechnen.

Die Auswertung erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen:

1. *Offline-Auswertung*: Die Aufnahmen wurden digital gespeichert und computer-gestützt ausgewertet.
2. *Online-Auswertung*: Alle Bilder wurden direkt beim Untersuchungsvorgang mit Hilfe des Echogeräts auf dem Bildschirm ausgewertet.

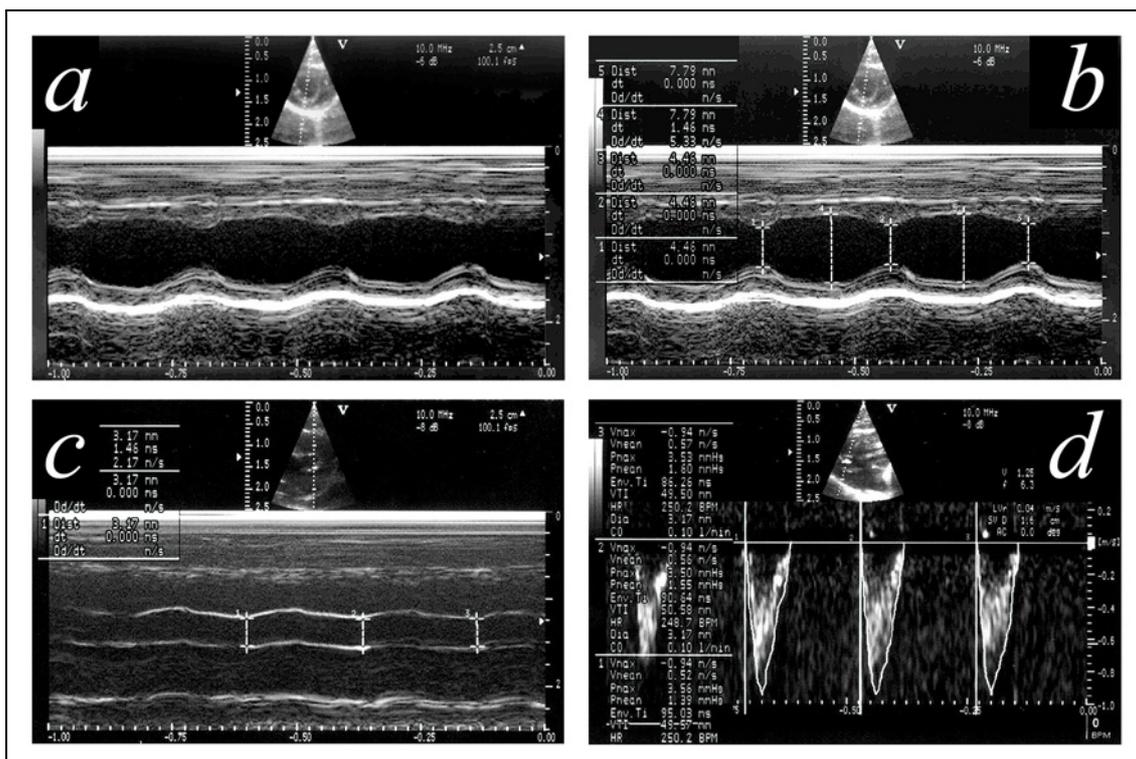
Die Ziel dieses Vorgehens war das größt mögliche Maß an Objektivität zu gewährleisten. Die Zugehörigkeit der Tiere zu den jeweiligen Versuchsgruppen war erst nach erfolgter Untersuchung und Auswertung für den Untersuchenden erkennbar.

Vor jeder Ultraschalluntersuchung wurden die Tiere zunächst mit entsprechenden Transportkäfigen in den dafür vorgesehenen und entsprechend beheizten Raum überführt. Die Untersuchung folgte nach weiteren 24 Stunden Aklimatisierung der Tiere. Jede Ratte wurde vor der jeweiligen Untersuchung mit 40 mg Ketamin-HCl und 7,5 mg Xylazin jeweils pro Kilogramm Körpergewicht anästhesiert. Die Applikation erfolgte mit entsprechend kleinvolumigen Spritzen intraperitoneal. Nach durchschnittlich 6 bis 7

Minuten war bei den Tieren eine ausreichend tiefe Sedierung und Relaxation erreicht; die Spontanatmung war zu keinem Zeitpunkt eingeschränkt.

Dem sedierten Tier wurden mit einer veterinären Langhaarschneidemaschine links-thorakal die Haare des Fells entfernt. Anschließend folgte das Auftragen des Ultraschallgels auf den Thorax und auf den Ultraschallkopf. Das Versuchstier wurde auf eine speziell vorgefertigte Platte mit dem Bauch nach unten aufgelegt und an den Extremitäten locker mit einem Klebeband fixiert, wobei der Thorax in einer halbrunden Öffnung von 3,5 x 5 cm zu liegen kam. Dadurch entstanden bei der Ultraschalluntersuchung des Herzens die geringst möglichen Artefakte; das Herz lag ventral direkt dem Thorax an.

Zunächst erfolgte die Darstellung des Herzens im linksparasternalen Längs- und Querschnitt in Höhe der atrioventrikulären Klappenebene. Im M-Mode wurde der Durch-



**Abbildung 3: Echokardiographie der Rattenherzen im M-Mode und PW-Doppler.** Sämtliche Parameterbestimmungen wurden sowohl computergestützt („offline“) als auch am Echokardiographiegerät durchgeführt („online“). (a) Digitalisierte Aufnahme der M-Mode-Untersuchung des linken Ventrikels zur „offline“-Auswertung. Im Vergleich hierzu (b) die gleiche Aufnahme des selben Tieres bei „online“-Auswertung mit Bestimmung des LVES und LVED. Des weiteren konnten „online“ (c) der Aortendurchmesser (DiaAo) im M-Mode und (d) das Geschwindigkeitszeitintegral (VTI) der Aortenklappenflusskurve im PW-Doppler-Verfahren bestimmt werden.

messer des linksventrikulären Ausflusstraktes (DiaAo; in mm) enddiastolisch in Höhe der Basis der Aortenklappe bestimmt.

Des Weiteren wurden im M-Mode in Höhe der Papillarmuskeln enddiastolisch die Dicke des interventrikulären Septums (IVS), die linksventrikuläre Hinterwand (LVPW) und der Innendurchmesser des linken Ventrikels enddiastolisch und endsystolisch (LVED, LVES; in mm) bestimmt. Ferner ließ sich aus den M-Mode-Untersuchungen des linken Ventrikels die regionale Verkürzungsfraction (FS, in Prozent; Abb. 4a)

bestimmen. Die Berechnung des linksventrikulären Gewichts ( $LV_{\text{mass}}$ ; in g) erfolgte nach der modifizierten Standard-Cube-Methode (Abb. 4c).

Ausgehend vom Bereich der Herzspitze erfolgte die zweidimensionale Darstellung des Herzens im Vier- und Fünfkammerblick. Mit dem PW-Doppler wurden die Flusskurven während der Herzaktionen an der Mitral- und Aortenklappe aufgezeichnet. Das Sample-Volume wurde kleinst möglich gewählt und in den Bereich der maximalen Flussgeschwindigkeit gelegt. Die Aufzeichnung von mindestens 20 Herzaktionen der jeweiligen Flusskurven erfolgte digital.

<b>(a)</b>	$FS = \frac{LVED - LVES}{LVED} * 100$	[in %]
-----		
<b>(b)</b>	$SV = \pi * \frac{DiaAo^2}{4} * VTI$	[in ml]
-----		
<b>(c)</b>	$LV_{\text{mass}} = 1,04 * [(LVED + LVPW + IVS)^3 - IVS^3]$	[in g]

**Abbildung 4: Formeln der zu berechnenden Parameter in der echokardiographischen Verlaufsuntersuchung.** (a) Berechnung der regionalen Verkürzungsfraction (FS) aus systolischem und diastolischem Durchmesser des linken Ventrikels (LVES, LVED). (b) Berechnung des Schlagvolumens (SV) des linken Ventrikels aus dem im M-Mode ermittelten Aortendurchmesser (DiaAo) und dem Geschwindigkeitszeitintegral (VTI) aus der Doppleruntersuchung. (c) Modifizierte Standard-Cube-Formel zur Kalkulation der linksventrikulären Masse aus diastolischem linksventrikulärem Durchmesser (LVED), Dicke der linksventrikulären Hinterwand (LVPW) und der Dicke des Herzseptums (IVS).

Dopplersonographisch wurden die maximale Flussgeschwindigkeit des linksventrikulären Ausflusstraktes  $V_{\max}Ao$  und das Geschwindigkeitszeitintegral (VTI, in mm) gemessen. Ferner ließ sich mit diesen Parametern das Schlagvolumen (SV, in ml; Abb. 4b) sowie unter Einbeziehung der Herzfrequenz das Herzzeitvolumen (HZV, in ml/min) und der gewichtsbezogene Herzindex (CI, in ml/min/g) bestimmen.

Aus den transmitralen Flusskurven wurden die maximalen Flussgeschwindigkeiten für passiven (E, in m/s) und aktiven Einstrom (A, in m/s) in den linken Ventrikel sowie deren Relation, die E/A-Ratio, bestimmt. Die E/A-Ratio gilt als relevanter Parameter bei der Beurteilung der diastolischen Funktion des linken Ventrikels sowie der damit verbundenen linksventrikulären Compliance.

### 2.3. Herzkatheteruntersuchung und Herzentnahme

Nach der abschließenden Echokardiographieuntersuchung (15 Monate nach Immunisierungsbeginn) erfolgte im Abstand von 3 bis 4 Tagen die Herzkatheteruntersuchung mit anschließender Entblutung und Herzentnahme.

Die Narkose der Tiere erfolgte mit 40 mg/kg KG Ketamin-HCl und 7,5 mg/kg KG Xylazin intraperitoneal (i.p.); ca. 6 bis 7 Minuten nach Injektion der Substanzen wurde die Ratte auf den mit 37°C vorgewärmten Präpariertisch mit Rücken nach unten aufgelegt. Es folgte eine Fixierung des Tieres an Armen und Beinen.

Nach submandibulärem medianem Längs- und Querschnitt wurde die rechte Arteria carotis interna freipräpariert und mit insgesamt drei Fäden angeschlungen. Durch das Anschlingen ist die kontrollierte Unterbindung des Blutflusses im Gefäß im weiteren Verlauf gewährleistet. Nach einem ca. 0,5 mm großen Querschnitt der Gefäßwand konnte der Tip-Katheter eingeführt werden. Über die rechte Arteria carotis interna wurde der Katheter über die Aorta ascendens bis in den linken Ventrikel unter ständiger Kontrolle der Druckkurve vorgeschoben. Die Druckkurve des linken Ventrikels wurde für 15 Minuten digital aufgezeichnet (PowerLab, A.D. Instruments). Die Auswertung der Kurven wurde anonymisiert und offline durchgeführt, wobei die Herzfrequenz (HF, in bpm), der linksventrikuläre systolische und enddiastolische Druck (LVSP, LVEDP, in mmHg) sowie die Kontraktilität ( $+dP/dt_{\max}$ , in mmHg/s) und die Relaxation ( $-dP/dt_{\max}$ , in mmHg/s) bestimmt wurden.

Im Anschluss an die Herzkatheteruntersuchung wurde der Tip-Katheter zurückgezogen und über die gleiche Gefäßöffnung ein ca. 2 cm langer und 0,8 mm dicker Kunststoffkatheter eingeführt und 1ml Blut zur Serum-Katecholaminbestimmung entnommen. Die folgende Gabe von 70 mg/kg KG Pentobarbital i.p. diente der Vertiefung der Narkose. Daran schloss sich die kontrollierte Entblutung der Tiere über den liegenden Carotiskatheter in heparinisierte Spritzen an. Im Mittel wurden jedem Tier zwischen 14 und 16ml Blut entnommen, welches für den anschließenden Transferversuch weiter aufgearbeitet wurde.

Der Zeitbedarf für die sich anschließende Herzentnahme betrug maximal zwei Minuten. Zunächst wurde die Bauchhöhle mit einer Präparationsschere in der Medianlinie vom Mittelbauch bis zum unteren Sternumende mit einem Längsschnitt sowie zwei Einschnitte entlang des unteren Rippenbogenrandes eröffnet. Der Thorax wurde durch Inzision des Zwerchfells eröffnet und durch beidseitige parasternale Längsschnitte der knöchernen Thorax bis in Höhe des Schlüsselbeins beidseitig gespalten. Die obere und untere Hohlvene wurden jeweils an der Mündung in den rechten Vorhof abgeklemmt; die Abklemmung der Pulmonalarterienstämme und der Aorta ascendens erfolgte jeweils nahe der Wurzel. Die Durchtrennung wurde ebenfalls in der angegebenen Reihenfolge mit einer Präparationsschere durchgeführt. Das noch schlagende Herz wurde sofort in eisgekühlten Relaxationspuffer (5% Dextrose, 25 mmol/L KCl in PBS) überführt. Die Entfernung sämtlicher Blutrückstände in den Ventrikeln und Vorhöfen erfolgte durch ante- bzw. retrogrades Einspritzen des Puffers in die jeweiligen Gefäß- und Vorhoföffnungen. Die Gewebereste anderer Organe wie des Thymus oder der Lunge wurden entfernt. Das sog. feuchte Herzgewicht (HG, in g) wurde nach kurzem Abtropfen ermittelt.

Zur Gewinnung und Beurteilung von nicht konserviertem Herzgewebe wurden mit einer Histoschere die apikalen 2 bis 3 mm der Herzspitze abgetrennt, sofort in Isopentan bei ca.  $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und weiterhin bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dieses Gewebe sollte zu einem späteren Zeitpunkt im Radioligandenbindungs-Assay untersucht werden.

Der Herzrumpf wurde in 10% PBS-gepuffertes Formalin für mindestens weitere 48 bis 72 Stunden überführt. Dieses Material wurde in der Folge für die morphometrische und histologische Beurteilung verwendet.

## 2.4. Herzscheibenpräparation

### 2.4.1. *Vibratomschnittpräparation*

Durch die mindestens 48 Stunden dauernde Einwirkzeit von 10% PBS-gepuffertem Formalin wurde dem Herzgewebe Wasser entzogen. Dadurch war der Herzrumpf deutlich geschrumpft und hatte an Festigkeit zugenommen, was für die weitere Aufarbeitung im Vibratom notwendig war. Das Gewebe ließ sich dadurch wesentlich besser schneiden.

Zunächst wurden sämtliche Herzen bis zur Atrioventrikulärebene (AV-Ebene) präpariert, d.h. rechter und linker Vorhof sowie Reste der Arteria pulmonalis und der Aorta ascendens wurden bis zur Klappenebene entfernt.

Agar-Agar (4,5% in PBS) wurde aufgekocht und in runde Multischalen gegossen. Anschließend folgte das Einbringen der Herzen in den auf ca. 50 bis 55°C bei Raumtemperatur abgekühlten, noch flüssigen Agar-Agar. Die Herzen sind dabei rundherum und intraventrikulär von Agar-Agar umgeben bzw. ausgefüllt. Alle Herzen wurden mit einer dünnen Metallsonde manuell so fixiert, dass das Herz mit seiner linksventrikulären Ausflussbahn senkrecht zur Horizontalen lag. Nach ca. 10 Minuten Abkühlen des Agar-Agars bei Raumtemperatur mit zunehmender Lagefixierung im Agar-Agar konnten die Sonden entfernt werden. Die weitere Abkühlung mit Verfestigung des Agar-Agar erfolgte bei 4°C über 2 Stunden.

Anschließend wurden der ausgehärtete Agar-Agar aus den Formen mit einem stumpfen Spatel herausgelöst und mit einer Rasierklinge auf Würfelform zugeschnitten. Die Herzen lagen dabei mittig im Block und der Mindestabstand vom Herzen zur Würfelaußenseite betrug nicht weniger als 0,3 cm. Dieses Mindestmaß ist notwendig um eine ausreichende Fixierung des Herzens in der umgebenden Agar-Agar-Masse während der folgenden Schnittpräparation zu gewährleisten.

Je ein Agar-Agar-Würfel mit darin enthaltenem Herzen wurde mit Hilfe eines Cyanoacrylat-Klebers auf einem Präparationsblock mit der Herzspitze unten liegend fixiert. Nach ausreichender Antrocknungszeit (ca. 2 Minuten) erfolgte das Einspannen des Blocks in das mit 4 °C kalter PBS-Lösung gefüllte Schnittbecken des Vibratoms.

Die Rattenherzen wurden, beginnend in der AV-Ebene, mit dem Vibratom in 800 µm dicke Scheiben geschnitten. Der Agar-Agar wurde von jeder Scheibe anschließend entfernt, die Scheiben einzeln in Einbettkassetten zwischen zwei Schaumstoffplättchen

gelegt und wieder in 10 %-gepuffertes Formalin für weitere 24 Stunden überführt. Die durchschnittliche Bearbeitungszeit im Vibratom betrug je Herz ca. 30 Minuten.

Um die Schnitttemperatur und die damit verbundene feste Konsistenz des Agar-Agars konstant zu halten (4-8 °C) wurde die PBS-Lösung im Schneidebecken im Laufe der Schnittvorgangs regelmäßig ausgetauscht.

Die Vorschubgeschwindigkeit der Schnittklinge beim Schneidevorgang betrug 0,6 mm/sec, die Schnittamplitude war maximal eingestellt bei 1,25 mm. Als Klinge wurde für die Scheibenpräparation der Herzen doppelseitige Rasierklingen verwendet. Diese wurden im Laufe der Schnittpräparation der Herzen regelmäßig gewechselt.

#### 2.4.2. *Herzscheibenselektion und Paraffineinbettung*

Sämtliche Herzscheiben wurden einzeln auf einen Objektträger gelegt, mit einem Scannersystem (Epson an Apple-Macintosh) bei einer Auflösung von 400 Punkten/Zoll (Pixel/Inch) eingescannt und die auszuwertende Scheibe digital-optisch ermittelt.

Anschließend wurden die Herzscheiben wieder in Präparationscaps eingebettet und in Formalin überführt. Der gesamte Scanvorgang musste möglichst schnell durchgeführt werden, da die Scheiben der Umgebungsluft ausgesetzt waren und rasch austrocknen konnten. Der Zeitbedarf für das Umbetten und Scannen der Scheiben eines Herzens betrug weniger als 10 Minuten.

Die Kriterien für die Auswahl der Scheibe eines Herzens sahen vor, dass diese deutliche Papillarmuskelquerschnitte sowie die größten Ventrikeldimensionen aufzuweisen hatte. Für jedes Herz wurde eine 800 µm-Scheibe bestimmt, wobei diese anatomisch einem Bereich ca. 2-3 mm unterhalb der AV-Ebene entspricht. Diese Lokalisation wurde, wie bereits dargelegt, auch im Rahmen der echokardiographischen Verlaufsuntersuchung des linken Ventrikels wiederholt kontrolliert.

Weitere 24 Stunden nach dem Scanvorgang wurden die auszuwertenden Herzscheiben (je eine pro Herz) im Rahmen der automatisierten Routinepräparation im Institut für Pathologie der Universität Würzburg in flüssiges, 60 °C heißes Paraffin überführt.

Dabei wurden die Präparate durch aufsteigende Ethanollösungen sowie Ethanol-Xylenlösungen nochmals entwässert, was zu einer weiteren Schrumpfung des Gewebes führte. Die Präparate wurden in Paraffinblöcke gegossen und auf einer Kälteplatte ausgekühlt.

Die ca. 0-4 °C kalten Blöcke wurden in ein Mikrotom eingespannt. Von jeder der eingebetteten Herzscheiben wurden mindestens 10 Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von jeweils von 1 µm angefertigt. Ein Paraffinschnitt wurde jeweils auf einen Super-Frost-Objekträger aufgebracht und bei Raumluft getrocknet.

Jeweils 2 Paraffinschnitte einer Herzscheibe wurden für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und die Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS) verwendet. Weitere 3 Paraffinschnitte wurden für die Kollagenbestimmung benötigt.

## 2.5. Histologisch-morphometrische Auswertung

Zur makroskopisch-morphometrischen Beurteilung der Paraffinschnitte mussten Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) angefertigt werden. Diese Methode gilt als Standardfärbung zur histologischen Begutachtung. Ferner lassen sich durch die gute Kontrastierung des Gewebes die relevanten links- und rechtsventrikulären Diameter suffizient beurteilen.

Die mikroskopisch-morphometrische Auswertung erfolgte an Perjodsäure-Schiff-gefärbten Paraffinschnitten (PAS). Durch diese Methode ist eine gute Abgrenzung der Zellmembran zum angrenzenden Interstitium (rot) sowie der Zellkerne (blau) zum entsprechenden Intrazellularraum gewährleistet. Dies war für die vergleichende Beurteilung der Myozytenquerschnittsfläche und der Zellkerngröße unbedingt notwendig.

Die jeweiligen Auswertungen wurden computergestützt durchgeführt.

### 2.5.1. *Entparaffinisierung*

Zunächst wurden die nötigen Paraffinschnitte über Xylol und absteigende Ethanol-lösungen (Ethanol 96%, 70% und 50%) entparaffinisiert und in destilliertes Wasser überführt.

### 2.5.2. *Färbemethoden*

Das Ansetzen der Färbelösungen für die HE- und PAS-Färbung sowie deren Durchführung erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers (Sigma Diagnostics, Tabelle 1). Im Anschluß wurden die Schnitte im Eindeckautomaten eingedeckt.

### 2.5.3. Makroskopisch-morphometrische Auswertung an HE-Schnitten

Die HE-Schnitte wurden mit einer Auflösung von 600 Punkten/Zoll (Pixel/Inch) eingescannt (Epson Expression 1600 an Apple-Macintosh G3) und computergestützt ausgewertet (Adobe Photoshop, Apple-Macintosh).

Es wurde zunächst die linksventrikuläre Querschnitts- und Cavumfläche (LVA, LVCA; in mm<sup>2</sup>) bestimmt. Aus der Differenz konnte die linksventrikuläre Muskelquerschnittsfläche (LVWA) berechnet werden. Ferner ließ sich die rechtsventrikuläre Cavumfläche bestimmen (RVCA).

<b>Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)</b>		<b>Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS)</b>	
- Xylol (100%)		10 min.	
- Ethanol-Lösung (96%)		2 min.	
- Ethanol-Lösung (70%)		2 min.	
- Ethanol-Lösung (50%)		2 min.	
- Aqua dest.		10 min.	
- Hämatoxylin-Lösung	15 min.	- Perjodsäure-Lösung	5 min.
- Leitungswasser (fließend)	15 min.	- Aqua dest.	spülen
- Eosin-Lösung	5 min.	- Schiff's Reagenz	10 min.
- Leitungswasser (fließend)	spülen	- Leitungswasser (fließend)	10 min.
- Aqua dest.	5 min.	- Hämatoxylin-Lösung	5 min.
		- Leitungswasser (fließend)	10 min.
		- Aqua dest.	spülen
- Ethanol-Lösung (50%)		2 min.	
- Ethanol-Lösung (70%)		2 min.	
- Ethanol-Lösung (96%)		2 min.	
- Xylol (100%)		5 min.	
- Eindecken			

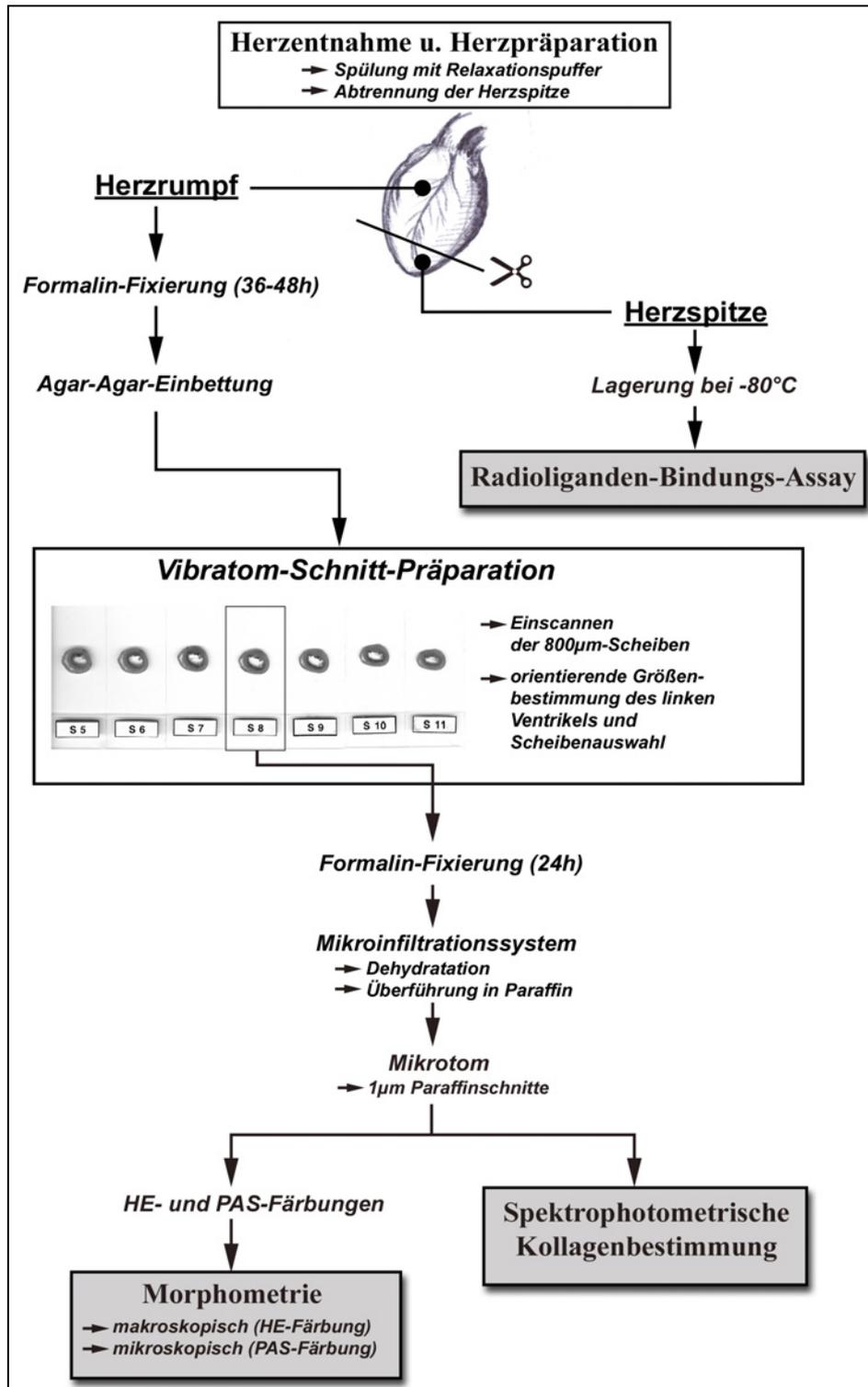
**Tabelle 1: Färbeprotokolle der HE- und PAS-Färbung** – Die Paraffinschnitte wurden zunächst über Xylol und Ethanolösungen entparaffinisiert und in Aqua dest. überführt. Es folgte der weitere Ablauf entsprechend dem jeweiligen Protokoll für HE- bzw. PAS-Färbung. Alle Schnitte wurden schließlich nach aufsteigender Ethanol-Reihe und Xylol-Bad vollautomatisch eingedeckt.

Des Weiteren erfolgte analog zur echokardiographischen Verlaufsuntersuchung die Bestimmung des linksventrikulären Cavumdurchmessers (LVD), die Dicke der linksventrikulären Hinterwand (PW) und der Vorderwand bzw. des Septums (IVS). Der LVD wurde als Mittelwert von 4, PW und IVS wurden als Mittelwert von 3 Messungen (in mm) bestimmt.

#### *2.5.4. Mikroskopisch-morphometrische Auswertung an PAS-Schnitten*

Unter dem Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss) wurde das PAS-gefärbte Muskelgewebe beurteilt. Mit der angeschlossenen Kamera Spot-Insight-Color wurden digitale Aufnahmen bei 120facher Vergrößerung an verschiedenen Lokalisationen des linksventrikulären Muskelgewebes erstellt. Bei der anschließenden computergestützten Auswertung wurden für jedes Herz 40 quergeschnittene Muskelzellen mit mittig liegendem Zellkern vermessen (Adobe Photoshop, Apple-Macintosh). Hierbei wurden die Querschnittsflächen und die Durchmesser der Herzmuskelzellen sowie die dazugehörigen Zellkerne in  $\mu\text{m}^2$  bzw.  $\mu\text{m}$  bestimmt. Für jedes Herz wurde für den entsprechenden Parameter der Mittelwert errechnet.

Die Auswertung erfolgte auch hier verblindet für den Untersucher.



**Abbildung 5: Flussdiagramm mit Darstellung des Ablaufs der Herzaufarbeitung.** – Die Herzen wurden nach der Entnahme mit Relaxationspuffer gespült. Das apikale Viertel des Herzens wird abgetrennt, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und schließlich das Gewebe im Radioliganden-Bindungsversuch ausgewertet. Der Herzrumpf wurde zunächst in Formalin fixiert, in Agar-Agar eingebettet und mit einem Vibratom in 800 µm-Scheiben geschnitten. Von den ausgewählten Herzscheiben wurden nach verschiedenen Fixierungsstufen Paraffinschnitte angefertigt, welche einerseits zur spektrophotometrischen Kollagenbestimmung andererseits für die morphometrische Auswertung mit Hilfe verschiedener Färbemethoden verwendet wurden.

## 2.6. Spektrophotometrische Kollagenbestimmung an Paraffinschnitten

Die Bestimmung des Kollagens erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lopez-De Leon *et al.* an 1  $\mu\text{m}$  dicken Paraffinschnitten [127]. Da die Anfertigung von Paraffinschnitten auch im Rahmen der morphometrischen Auswertung notwendig war ist diese Methode als sehr sinnvolle Ergänzung anzusehen.

Durch Messung der Extinktion der ausgewaschenen Farbstoffe Sirius-Rot und Fast-Green-FCF lässt sich der Anteil von Kollagen I-III am Gesamtproteingehalt ermitteln und die Frage eines veränderten Kollagenanteils im Gewebe beurteilen.

Sirius-Rot bindet spezifisch an die verschiedenen Arten von Kollagen und hat seine maximale Absorption bei  $\lambda = 540 \text{ nm}$ . Die gemessene Extinktion bei dieser Wellenlänge verhält sich proportional der vorhandenen Menge an Kollagen im Gewebe.

Fast-Green-FCF hat eine maximale Absorption bei  $\lambda = 605 \text{ nm}$ , zeigt allerdings bei 540 nm im Absorptionsspektrum eine sog. Schulter. Die Absorption bei 540 nm verhält sich mit 29,1% proportional der Absorption bei 605 nm. Folglich muß dieser Anteil bei der Bestimmung der reinen Extinktion von Kollagen entsprechend berücksichtigt werden.

Der verwendete Farbstoff Sirius-Rot bindet spezifisch an Kollagen I-III wohingegen Fast-Green-FCF unspezifische Gewebsproteine farblich markiert. Schließlich kann aus der Relation der im Gewebe gebundenen Farbstoffe die Konzentration von Gesamtprotein und Kollagen bestimmt werden.

Für jedes Herz wurden 3 Paraffinschnitte vergleichbarer Herzscheiben (1 Schnitt pro Objektträger) entparaffinisiert und zunächst in destilliertes Wasser überführt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurden diese in Objektträgerinkubationsschalen überführt und jeweils mit 2 ml Farbstofflösung (0,1% Fast-Green-FCF und 0,1% Sirius-Rot in gesättigter Pikrinsäure) für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Es folgte ausführliches Spülen mit destilliertem Wasser zum Entfernen ungebundener Farbstoffrückstände aus den Gewebsschnitten. Die Objektträger wurden wieder für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Durch die Farbstoffe Sirius-Rot und Fast-Green-FCF war es zu einer deutlich sichtbaren Anfärbung der Herzschnitte gekommen.

Durch die Inkubation mit 1 ml der Entfärbungslösung (1:1-Lösung von 0,1N NaOH und 100% Methanol) je Schnitt für ca. 3 Minuten auf dem Rüttler wurden die Farbstoffe wieder aus dem Gewebe eluiert. Von den Farbstofflösungen der jeweiligen Objektträger

$(a) \quad E_{[\text{Kollagen}]} = E_{[540\text{nm}]} - 0,291 \cdot E_{[605\text{nm}]}$ $E_{[\text{unsp. Protein}]} = E_{[605\text{nm}]}$
$(b) \quad M_{[\text{Kollagen}]} = \frac{E_{[\text{Kollagen}]}}{38,4} \cdot 1000 \quad [\mu\text{g/Schnitt}]$ $M_{[\text{unsp. Protein}]} = \frac{E_{[\text{unsp. Protein}]}}{2,08} \cdot 1000 \quad [\mu\text{g/Schnitt}]$
$(c) \quad K_{[\text{Kollagen}]} = \frac{M_{[\text{Kollagen}]}}{M_{[\text{Kollagen}]} + M_{[\text{unsp. Protein}]}} \quad [\mu\text{g/mg}]$

**Abbildung 6:** Berechnung der reinen Kollagenextinktion aus den spektrophotometrisch gemessenen Extinktionen bei 605 und 540nm sowie der daraus ermittelten Menge an Kollagen und unspezifischem Protein und der Kollagenkonzentration nach Lopez-de Leon und Rojkind [127].

(a) Sirius-Rot bindet spezifisch an Kollagen I-III und besitzt eine maximale Absorption bei 540nm, Fast-Green-FCF bindet an unspezifisches Protein und besitzt eine maximale Absorption bei 605nm ( $E_{[\text{unsp. Protein}]}$ ). Da Fast-Green-FCF zusätzlich eine signifikante „Absorptionsschulter“ bei 540nm besitzt und diese in fixer Relation (29,1%) zur Extinktion bei 605nm steht muß dies bei der Ermittlung der reinen Extinktion für Kollagen berücksichtigt werden ( $E_{[\text{Kollagen}]}$ ). (b) und (c) Mit Hilfe der von Lopez-De Leon und Rojkind ermittelten Farbkoeffizienten für Kollagen (38,4) und unspezifisches Protein (2,08) ist es möglich die Menge an Kollagen ( $M_{[\text{Kollagen}]}$ ) und unspezifischem Protein ( $M_{[\text{unsp. Protein}]}$ ) je Schnitt zu bestimmen. Des Weiteren lässt sich daraus die Kollagenkonzentration bezogen auf die Gesamtproteinmenge bestimmen ( $K_{[\text{Kollagen}]}$ ). Die Farbkoeffizienten sind als optische Dichte pro mg Kollagen (korrigiert) bzw. unspezifisches Protein bei 540 bzw. 605nm zu verstehen.

wurden anschließend jeweils 200 µl in Mikrotiterplatten (NUNC-Maxisorb) pipettiert.

Die Bestimmung der Extinktion erfolgte in einem Spektrophotometersystem für ELISA-Platten (SpectraMAX) bei einer Wellenlänge von 540 und 605 nm. Aus dem dreifachen Ansatz wurde schließlich je Herz der Mittelwert bestimmt.

## 2.7. Radioligandenbindungs-Assay

Das eingefrorene Gewebe der Herzspitze wurde für die Radioligandenbindungsversuche verwendet. Hierbei sollte mit dem nichtselektiven, radioaktiv markierten  $\beta$ -Rezeptor-antagonisten  $^{125}$ Iod-Cyanopindolol ( $^{125}$ ICYP) sowie den nicht markierten  $\beta_1$ -selektiven und -nichtselektiven Antagonisten (CGP20712A bzw. L-Propranolol) nachgewiesen werden, ob es im Rahmen des Immunisierungsversuchs zu einer quantitativ wie Subtyp-spezifisch relativ veränderten Expression von  $\beta$ -Rezeptoren in der Zellmembran der Kardiomyozyten gekommen war. Durch die jeweils gebundene bzw. nicht gebundene Menge  $^{125}$ ICYP konnte die Konzentration von  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Adrenozeptoren in der kardialen Membranpräparation errechnet werden.

L-Propranolol ist ein hochaffiner aber nichtselektiver Rezeptorantagonist für  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren ( $K_d$ -Wert 1,8 bzw. 0,8). Er wurde zur Bestimmung der unspezifischen Bindung von  $^{125}$ ICYP verwendet. Die Affinität von L-Propranolol für  $\beta$ -Adrenozeptoren ist höher als die von  $^{125}$ ICYP.

CGP20712A ist ein hochselektiver  $\beta_1$ -Rezeptorantagonist. Bei niedrigen Konzentrationen bindet die Substanz zunächst nur an den  $\beta_1$ -Rezeptor-Subtyp, mit zunehmender Konzentration werden auch  $\beta_2$ -Rezeptoren blockiert. Ausgehend von einem „two-site binding model“ zeigt CGP20712A mit seinen unterschiedlichen Affinitäten zu  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren ( $K_d$ -Wert 4,7 bzw. 4046) in der nichtlinearen Regressionsanalyse bei Bindungsassays mit  $^{125}$ ICYP ein biphasisches Bindungsverhalten. Durch diese Eigenschaft ist auch eine quantitative Differenzierung von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren im untersuchten Gewebe möglich.

Ferner lässt sich aus dem Ergebnis indirekt ein Nachweis für die Effekte von (induzierten)  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörpern auf die Expression von  $\beta_1$ -Rezeptoren in vivo führen.

Die Zusammensetzung der angesetzten Pufferlösungen ist in Tabelle 2 dargestellt.

<u>Homogenisierungspuffer:</u>	10 mM HEPES (pH 7,5) 10 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM EDTA 0,4 M KCl 0,2 mM PMSF 5 µg/ml Leupeptin 1,5 mM Benzamidin 200 U/ml Aprotinin 2 µg/ml Pepstatin A
<u>Resuspensionspuffer:</u>	32 mM HEPES (pH 7,5) 80 mM NaCl 4 mM EGTA 4 mM EDTA 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> 5 µg/ml Leupeptin 1,5 mM Benzamidin 200 U/ml Aprotinin 2 µg/ml Pepstatin A
<u>Bindungspuffer:</u>	50 mM TRIS-Puffer (pH 7,4) 10 mM MgCl <sub>2</sub>

**Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen beim Radioligandenbindungsassay.**

### 2.7.1. *Aufbereitung und Homogenisierung des Herzgewebes*

Das Herzspitzengewebe (-80 °C) wurde auf Eis (4 °C) aufgetaut und für jedes Herz etwa 50 mg Herzgewebe auf Eis (4 °C) präpariert; daraus resultierten letztlich ca. 1,5-3 mg Membranprotein.

Die mechanische Zerkleinerung des Gewebes erfolgte zunächst mit Hilfe einer feinen Schere in Homogenisierungspuffer. Mit einem Ultra-Turrax wurde das Gewebe 3 bis 4 mal kurz (d.h. je 7-10 Sek.) in 500 µl Homogenisierungspuffer weiter zerkleinert. Im Anschluss ruhte die Lösung für 10 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde die Membranlösung für 10 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert; hierbei sedimentieren im wesentlichen Zellkernbestandteile. Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen pipettiert und in einer Ultrazentrifuge für 30 Minuten bei 4 °C und 50000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der dem Zytosol entspricht, wurde abpipettiert. Das Sediment, die Zellmembranbestandteile, wurden mit 100 µl Resuspensionspuffer resuspendiert, die Röhrchen ebenfalls mit 100 µl der gleichen Lösung gespült. Eine er-

neute Homogenisierung der Membranen erfolgte in einem Douncer unter Zusatz von 100  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer.

### 2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in der Membranpräparation wurde mittels der Amido-Schwarz-Methode von Dieckmann-Schuppert *et al.* bestimmt, da hierzu nur geringe Mengen der Membranproteinlösung nötig waren [54].

Auf 1 x 1 cm großen Zelluloseacetat-Plättchen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung pipettiert. Nach 15 Minuten Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Plättchen in die Färbelösung (0,5% Amido Schwarz 10B, 45% Methanol, 45% destilliertes Wasser, 10% Essigsäure) für weitere 10 Minuten überführt. Es folgte dreimaliges Waschen in der Waschlösung (47,5% Methanol, 47,5% destilliertes Wasser, 5% Essigsäure) für jeweils 5 Minuten. Die Plättchen wurden bei Raumtemperatur für weitere 5 Minuten getrocknet. Jedes Plättchen wurde in 2 ml-Reaktionsbehälter überführt und jeweils mit 1 ml Entfärbelösung (80% Ameisensäure, 10% Essigsäure, 10% Trichloressigsäure) bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der jeweiligen Lösungen bei 620 nm im Spektrophotometer ermittelt. Mit Hilfe der Extinktionswerte einer BSA-Standardlösung mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0;1;3;5;7;8;10;15;20  $\mu\text{g}$  pro 10  $\mu\text{l}$ ) wurde aus den gemessenen Extinktionswerten der Herzmembran-Proteinlösungen die einzelne Konzentration berechnet und danach mit Homogenisierungspuffer auf die im weiteren Verlauf verwendete einheitliche Membranproteinkonzentration von 0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt. Die Konzentration der verschiedenen Membranproteinlösungen lagen vor der Verdünnung zwischen 4 und 13  $\mu\text{g}$  Protein pro  $\mu\text{l}$  Lösung.

Bindungs-einteilung	Konzentration <sup>125</sup> Iod-Cyanopindolol ( <sup>125</sup> ICYP)	Konzentration $\beta$ -Rezeptor-antagonist	Volumina/Pipettierablauf
Maximale Bindung (TB)	70 pM 200 pM	-	100 $\mu$ l TRIS-Puffer (pH 7,8) 50 $\mu$ l Membranprotein 50 $\mu$ l <sup>125</sup> ICYP
Unspezifische Bindung (UB)	70 pM 200 pM	L-Propranolol 5 mM	50 $\mu$ l TRIS-Puffer (pH 7,8) 50 $\mu$ l Membranprotein 50 $\mu$ l L-Propranolol 50 $\mu$ l <sup>125</sup> ICYP
Bindung bei unterschiedlichen Konzentrationen von CGP20712A	70 pM	CGP20712A 1 nM 5 nM 30 nM 0,3 $\mu$ M 0,5 $\mu$ M 1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 16 $\mu$ M	50 $\mu$ l TRIS-Puffer (pH 7,8) 50 $\mu$ l Membranprotein 50 $\mu$ l CGP20712A (in jew. Konzentration) 50 $\mu$ l <sup>125</sup> ICYP

**Tabelle 3: Pipettierschema des Radioligandenbindungsassays an Rattenherzmembranen.** – 35  $\mu$ g Membranprotein der Herzspitze wurden mit 200 pmol/l <sup>125</sup>ICYP zur Bestimmung der absoluten  $\beta$ -Adrenorezeptorenzahl inkubiert; die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von 5 mmol/l L-Propranolol bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptorsubtypen wurden 35  $\mu$ g Membranprotein mit 70 pmol/l <sup>125</sup>ICYP bei unterschiedlichen Konzentrationen des  $\beta_1$ -selektiven Rezeptorblockers CGP20712A inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Endvolumen von 200  $\mu$ l je Probe.

### 2.7.3. Radioligandenverdrängungs-Assay

Für jede Probe wurden 35  $\mu$ g Membranprotein in 50  $\mu$ l verwendet bei dreifachem Probenansatz. Die Pipettierung in die Messröhrchen erfolgte auf Eis. Die Rezeptor-antagonisten-Lösungen wurden 4fach konzentriert angesetzt bei einem Probenendvolumen von 200  $\mu$ l. Die Zugabe des <sup>125</sup>ICYP zu den Proben erfolgte in den entsprechend ausgewiesenen Radioaktiv-Räumen.

Die maximale Bindung von <sup>125</sup>Iod-Cyanopindolol (2200 Ci/mmol; NEN) wurde bei 200 und 70 pM bestimmt. Die unspezifische Bindung von <sup>125</sup>ICYP an die Membranproteine wurde durch Inkubation mit 5 mM L-Propranolol ermittelt (Tabelle 3).

Zur Bestimmung der Expression von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren im Herzgewebe wurde die Bindung von 70 pM <sup>125</sup>ICYP bei unterschiedlichen Konzentrationen von CGP20712A (1 nM, 5 nM, 30 nM, 0,3  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 16  $\mu$ M und 4 mM) bestimmt (Tabelle 3).

Die Lösungen in den Reagenzröhrchen wurden kurz durchmischt und für 90 Minuten bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 4 °C kaltem, 0,05 M TRIS-HCl-Puffer (pH 7,5) in die Röhrchen wurde die Reaktion gestoppt. Es folgte rasches Filtrieren (Whatman GF/C) des Röhrcheninhalts über eine Vakuumabsaugvorrichtung sowie mehrmaliges Spülen der Röhrchen mit 0,05 M TRIS-Puffer zur Entfernung des ungebundenen <sup>125</sup>ICYP. Die filtergebundene Radioaktivität wurde im Gammacounter gemessen.

Aufgrund des jeweils gebundenen bzw. nicht gebundenen <sup>125</sup>ICYP-Anteils bei den unterschiedlichen Antagonistenkonzentrationen konnte die Konzentration von  $\beta$ -Adrenozeptoren im kardialen Membranprotein errechnet werden. Mittels computergestützter nichtlinearer Regressionsanalyse wurde aus dem biphasischen Verlauf der Bindungskurve von CGP20712A zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren differenziert und die relativen Anteile berechnet.

## 2.8. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

Die Ergebnisse der echokardiographischen Verlaufsuntersuchungen der drei Versuchstiergruppen wurde mittels „repeated-measures“-Varianzanalyse (ANOVA) getestet, gefolgt von einem Bonferroni-post-hoc-Test auf Gruppenunterschiede im Verlauf.

Die Parameter der Herzkatheteruntersuchung sowie der histologisch-morphometrischen Untersuchungen wurden mittels ungepaartem Student-t-Test auf signifikante Unterschiede getestet.

## C. ERGEBNISSE

### 1. Echokardiographie

Im Verlauf der 15 Monate des Immunisierungsversuchs erfolgten insgesamt 6 echokardiographische Untersuchungen der Lewisratten (Abb. 2).

Ein Tier der NaCl-Gruppe (Ratte 30) starb am Tag der 2. Ultraschallkontrolle aufgrund der Verletzung eines größeren peritonealen Blutgefäßes durch die Narkoseinjektion.

Die statistische Beurteilung der über den Verlauf von 15 Monaten gewonnenen Parameter aller drei Versuchstiergruppen wurde nach „repeated-measures“-Varianzanalyse (ANOVA) mittels Bonferroni-post-hoc-Analyse durchgeführt.

#### 1.1. Intra- und Interobserver-Variabilität

Die Auswertung der digitalisierten Bilder wurde wie beschrieben „online“, also am Echogerät während der Untersuchung sowie „offline“ durchgeführt.

Die Intraobserver-Variabilität im Rahmen der „online“- und „offline“-Auswertung lag für den M-Mode bei 1,7%, für die Doppleruntersuchung bei 2,1%.

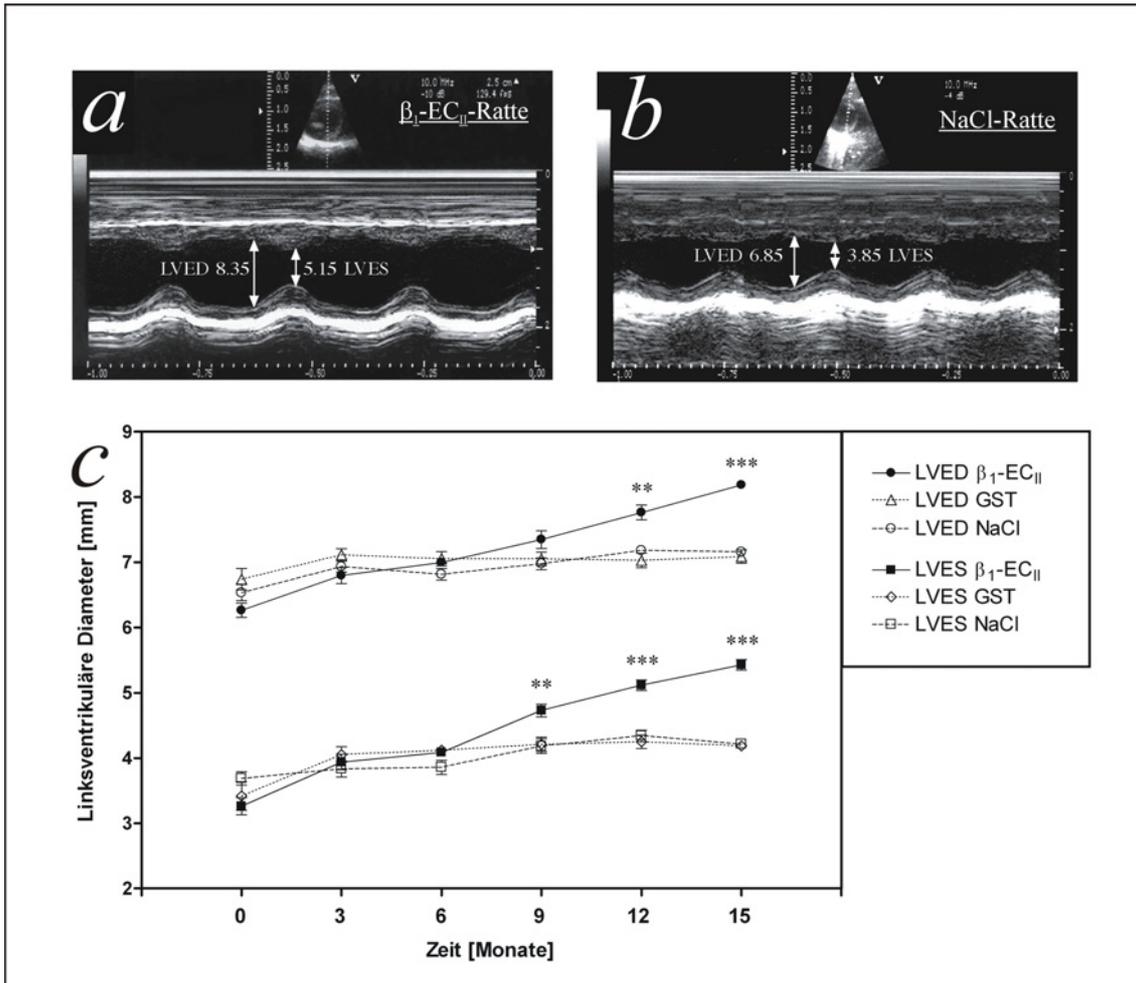
Die Interobserver-Variabilität wurde ausschließlich für die „offline“-Auswertung erhoben. Sie ergab für den M-Mode 3,2% und für den Doppler 4,5%.

Da sich die Intra- als auch die Interobserver-Variabilität nicht signifikant unterschieden, wurde im Weiteren auf eine entsprechende Differenzierung der Parameter verzichtet.

#### 1.2. M-Mode-Untersuchung

Echokardiographisch war nach 9 Monaten Immunisierung mit dem  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen eine signifikante Erweiterung des linken Ventrikels der immunisierten Tiere nachzuweisen. Im weiteren Verlauf trat diese Differenz immer deutlicher hervor, wieder spiegelt in einem signifikanten Anstieg des LVES und des LVED (Abb. 6). Damit einhergehend war bei den  $\beta_1$ -Tieren eine deutliche Zunahme der errechneten linksventrikulären Masse ab der 5. Echokontrolle nachweisbar ( $p < 0,0001$ ). Im Mittel wurde die  $LV_{\text{mass}}$  in der letzten Untersuchung für die  $\beta_1$ -Gruppe auf  $1,48 \pm 0,07$  g und für beide Kontrollgruppen auf  $1,23 \pm 0,09$  g bestimmt. Bezüglich der Dimensionen der Herzhinterwand (LVPW) sowie des interventrikulären Septums (IVS) waren im Verlauf keine signifikanten Differenzen zwischen den Versuchstiergruppen nachzuweisen.

Als Ausdruck einer beginnenden systolischen Kontraktionsstörung war die Verkürzungsfraction (FS) nach 12 Monaten bei den  $\beta_1$ -Ratten ebenfalls signifikant reduziert ( $\beta_1$ -Ratten in Relation zu den jeweiligen Kontrolltiergruppen  $p < 0,05$  nach 12 Monaten; Abb. 7a).



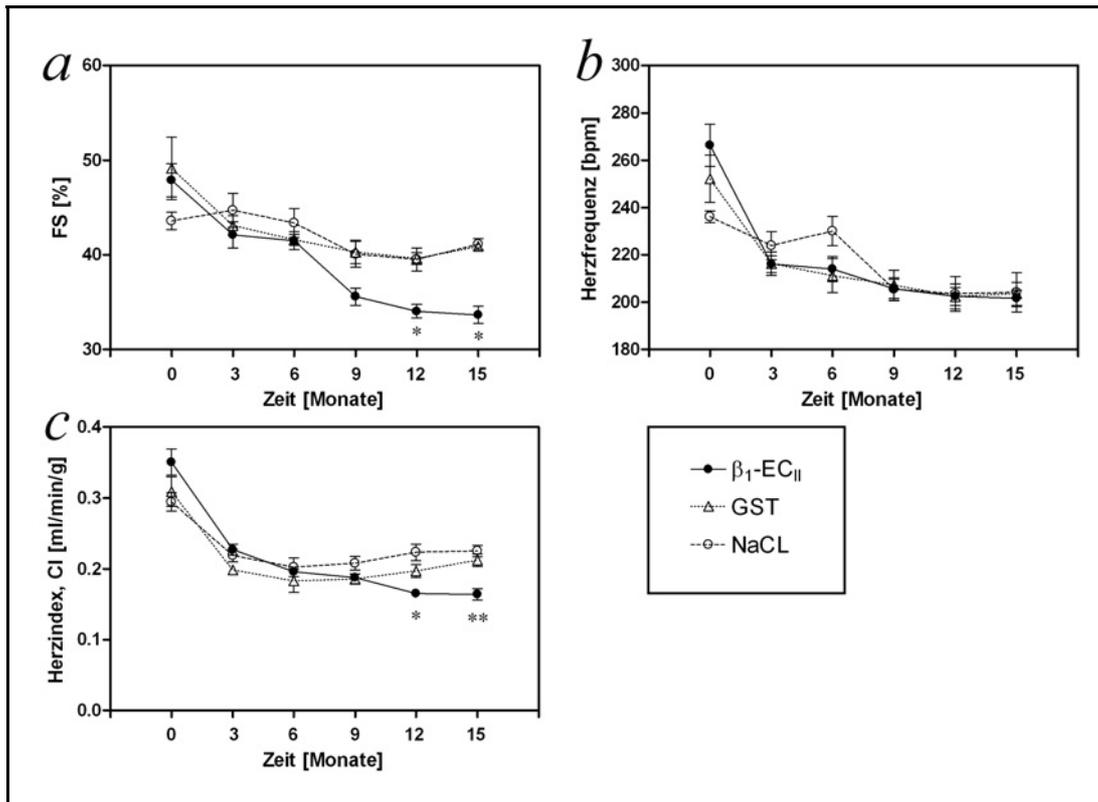
**Abbildung 6: M-Mode-Auswertung der echokardiographischen Verlaufskontrolle.** – Darstellung der „offline“-Auswertung an digitalisiert gespeicherten Bildern mit Bestimmung des LVED und LVES nach 15 Monaten Immunisierung bei mit (a)  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Lewis-Ratten und mit (b) Kochsalz behandelten Tieren. (c) Bereits nach 9 Monaten zeigte sich eine signifikante Erweiterung der linksventrikulären Durchmesser (LVES, LVED) bei den  $\beta_1$ -Ratten, was im weiteren Verlauf noch deutlicher sichtbar wurde. Die statistische Auswertung wurde mittels ANOVA- und Bonferroni-post-hoc-Analyse durchgeführt (Mittelwert $\pm$ SEM; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 1.2. Doppler-Untersuchung

Die Dopplerkontrollen zeigten über den Versuchszeitraum von 15 Monaten ab der 5. Untersuchung einen signifikanten Abfall der Herzleistung bei den Ratten der  $\beta_1$ -Gruppe. Dies spiegelt sich entsprechend im körpergewichtsbezogenen Herzindex (CI) wieder ( $p < 0,05$  nach 12 Monaten Immunisierung,  $p < 0,01$  nach 15 Monaten; Abb. 7c).

Das Herzzeitvolumen (HZV) der  $\beta_1$ -Tiere war bei vergleichbar hoher Herzfrequenz (HF) in den letzten zwei Dopplerkontrollen reduziert; der Unterschied war statistisch signifikant ( $p < 0,05$  nach 12 Monaten,  $p < 0,01$  nach 15 Monaten; Abb. 7b und c).

Die maximalen Flussgeschwindigkeiten im linksventrikulären Ausflusstrakt ( $V_{\max Ao}$ ) zeigte im Verlauf keine signifikanten Veränderungen in allen Versuchstiergruppen. Sie lag im Mittel bei 0,76 m/s bei den  $\beta_1$ -Ratten, für die GST- bzw. NaCl-Tiere bei 0,78 bzw. 0,80 m/s.



**Abbildung 7: Auswertung der M-Mode- und Doppleruntersuchungen** – (a) Die regionale Verkürzungsfraktion (FS), bestimmt aus dem LVED und dem LVES im M-Mode, war bei den  $\beta_1$ -Tieren nach 9 Monaten Immunisierung reduziert, stellte sich aber im Vergleich zu den Kontrollgruppen (GST und NaCl) erst in der 5. und 6. Untersuchung als statistisch signifikant dar. (b) Die mit zunehmendem Alter auftretende Reduktion der Herzfrequenz (HF) im Verlauf zeigte sich bei allen Versuchsgruppen, signifikante Differenzen zwischen den Gruppen waren nicht nachweisbar. (c) Als Ausdruck einer abnehmenden Herzleistung war der körpergewichtsassoziierte Herzindex (CI) 12 und 15 Monate nach Immunierungsbeginn bei den  $\beta_1$ -Tieren deutlich reduziert.

Statistische Auswertung durch „repeated-measure“-ANOVA und Bonferroni-post-hoc-Analyse (Mittelwert $\pm$ SEM; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01).

## 2. Herzkatheteruntersuchung

Nach 15 Immunisierungsmonaten erfolgte 3 Tage nach der Abschluss-Echokardiographie die Linksherzkatheteruntersuchung der 34 Lewis-Ratten jeweils in Kurznarkose. Im Anschluß daran wurde über den Katheter die Blutentnahme und die kontrollierte Entblutung durchgeführt; anschließend wurden die Herzen entnommen. Da die GST- und NaCl-Versuchstiergruppen in der Auswertung der aufgezeichneten Parameter keine signifikante Differenz aufwiesen wurden sie als Kontrolltiergruppe statistisch zusammengefasst.

Die Auswertung der digital aufgezeichneten Parameter ergab eine signifikante Reduktion der linksventrikulären Funktion bei  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-immunisierten Tieren. Bei gleicher Herzfrequenz war der linksventrikuläre Druck (LVSP) bei den  $\beta_1$ -Ratten signifikant reduziert. Dies zeigte sich auch in den Parametern für die Kontraktilität und die Relaxation des linken Ventrikels; im Mittel waren diese Parameter im Vergleich zu den Kontrolltieren um den nahezu identischen Absolutwert vermindert ( $p < 0,001$ ; Tabelle 4).

Der enddiastolische linksventrikuläre Füllungsdruck (LVEDP) war bei dieser Versuchstiergruppe tendenziell erhöht; der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

	Kontrollen (N=19)	$\beta_1$ -EC <sub>II</sub> (N=15)	P-Wert
Herzfrequenz, HF [S/min]	209 ± 5	205 ± 3	n.s.
LVSP [mmHg]	127,2 ± 2,3	119,0 ± 0,9	< 0,05
LVEDP [mmHg]	11,9 ± 1,9	14,9 ± 1,4	n.s.
Kontraktilität, +dP/dt <sub>max</sub> [mmHg/s]	5025 ± 145	4057 ± 104	< 0,001
Relaxation, -dP/dt <sub>max</sub> [mmHg/s]	4685 ± 173	3617 ± 142	< 0,001

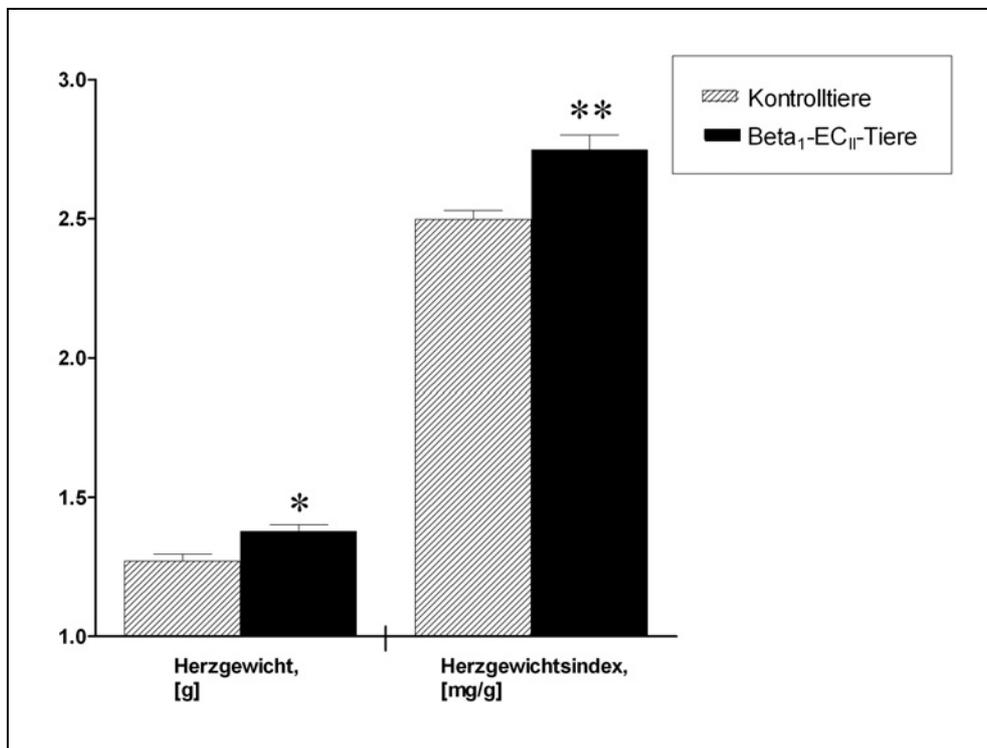
**Tabelle 4: Ergebnisse der Linksherzkatheteruntersuchung** von Lewisratten nach 15 Monaten Immunisierung mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen ( $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Ratten, N=15) bzw. GST-Antigen bzw. Kochsalz (=Kontrolltiergruppen, zusammen N=19).

LVSP= linksventrikulärer systolischer Druck; LVEDP= enddiastolischer linksventrikulärer Füllungsdruck (Mittelwert±SEM)

### 3. Herzgewicht

Hinsichtlich des Körpergewichts zeigten die Versuchstiergruppen keine statistisch signifikanten Differenzen ( $\beta_1$ -Tiere  $502,2 \pm 6,8$  g, Kontrolltiere  $513,1 \pm 6,8$  g).

Das Herzgewicht (Nassgewicht, HG) der mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Tiere lag nach 15 Immunierungsmonaten mit  $1377 \pm 25$  mg jedoch deutlich höher als bei den Kontrollratten ( $1285 \pm 21$  mg;  $p < 0,01$ ). Noch deutlicher wurde dieser Unterschied bei Bestimmung des relativen körperlsgewichtskorrigierten Herzgewichts ( $p < 0,001$ ; Abb. 8).



**Abbildung 8: Absolutes und relatives Herzgewicht (Herzgewichtsindex) nach 15 Monaten Immunisierung** – Das absolute Herzgewicht lag nach 15 Immunierungsmonaten bei den mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Tieren (N=15) signifikant höher als bei der Kontrolltiergruppe (N=19); noch deutlicher kam dies beim relativen Herzgewicht zum Tragen (\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; Mittelwert $\pm$ SEM).

#### 4. Histologisch-morphometrische Beurteilung von Herzgewebe an Paraffinschnitten

Die Herzen der 34 Lewis-Ratten wurden im Anschluss an die Herzkatheteruntersuchung entnommen und zunächst in 10%-PBS-gepuffertem Formalin für mindestens 48 Stunden fixiert. Es folgte die Präparation der Herzen am Vibratom mit Anfertigung von 800 µm dicken Gewebescheiben und die erneute Inkubation in gepuffertem Formalin. Zur morphometrischen Auswertung wurden die 800 µm-Scheiben computergestützt ausgewählt, die einer anatomischen Region 2-3mm unterhalb der Mitralklappe entsprachen. Diese Scheiben wurden anschließend in Paraffin überführt und hiervon mittels Microtom 1 µm-Schnitte angefertigt.

Durch dieses Präparationsverfahren war es möglich, die gleiche anatomische Region der Rattenherzen miteinander zu vergleichen.

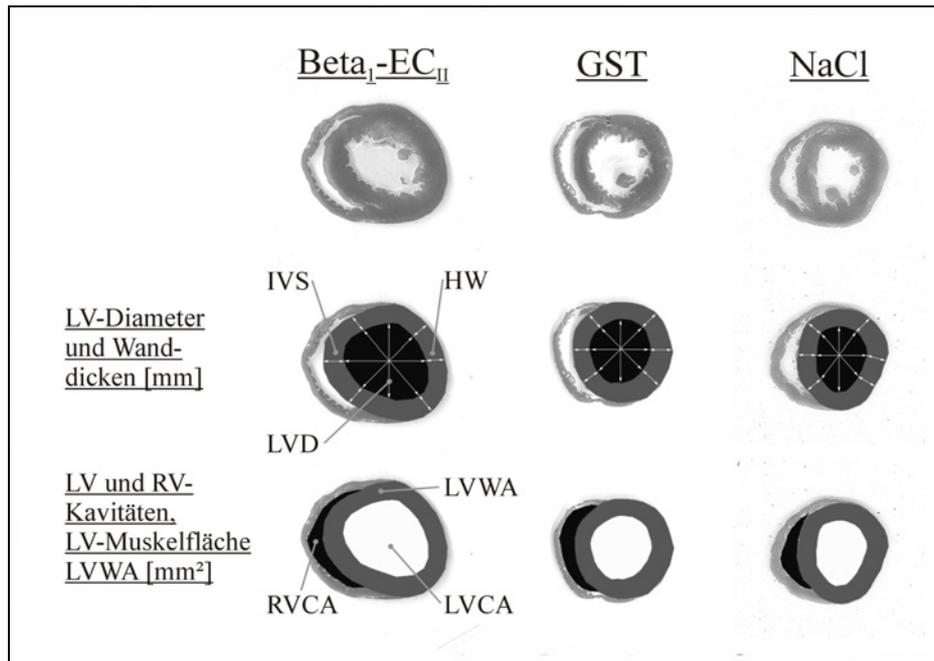
Da die ermittelten Parameter zwischen den Kontrolltiergruppen (GST- und NaCl-Gruppe) keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, wurden diese Gruppen als Kontrollgruppe zusammengefasst (N=19).

##### 4.1. Makroskopisch-morphometrische Auswertung an HE-Schnitten

Diese Untersuchung wurde an HE-gefärbten Paraffinschnitten der jeweils ausgewählten Herzscheibe vorgenommen. Die HE-Schnitte wurden anschließend eingescannt und digital ausgewertet (Adobe Photoshop auf Apple Macintosh G3; Abb. 9).

Zur Bestimmung der kardialen Wand- und Cavumflächen wurde zunächst die linksventrikuläre Muskelfläche (LVWA) aus der Differenz von linksventrikulärer Querschnitts- und Cavumfläche (LVA, LVCA) sowie die rechtsventrikuläre Kavumfläche (RVA) ermittelt.

In Anlehnung an die echokardiographische M-Mode-Bildgebung erfolgte die computergestützte Beurteilung der Diameter und Wanddicken des linken Ventrikels. Der Mittelwert des LVD ergab sich hierbei aus den beiden senkrechten und schrägen Durchmessern des linken Ventrikels; für die mittlere Dicke der linksventrikulären Hinter- und Vorderwand sowie die Septumdicke wurden je drei Messungen durchgeführt (Abb. 9). Bereits in der exemplarischen Übersichtsdarstellung ist eine deutliche Vergrößerung des linken Ventrikels der mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten gegenüber den Kontrolltieren (GST- und NaCl-Gruppe) zu erkennen (Abb. 9).

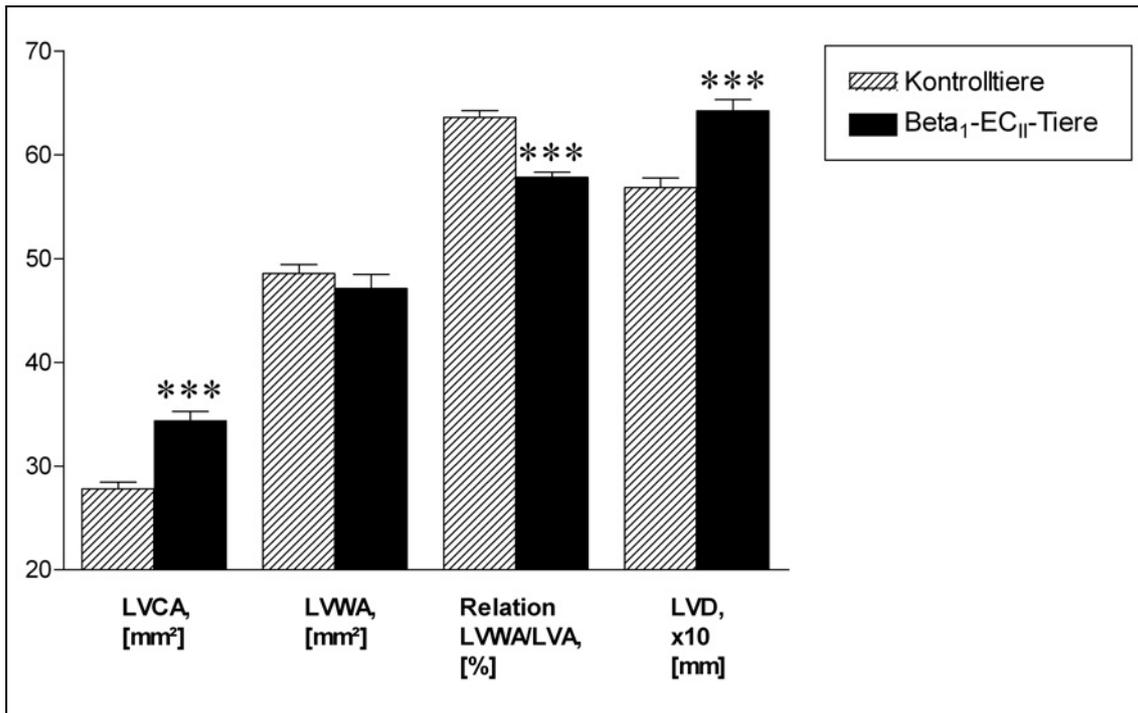


**Abbildung 9: Makroskopisch-morphometrische Auswertung von HE-gefärbten Paraffinschnitten** der mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Tiere und der Kontrolltiere (1,5fache Vergrößerung) – Computergestützte Messung des interventrikulären Septums (IVS), der linksventrikulären Hinterwand (HW) und des linksventrikulären Kavumdurchmessers (LVD). Zusätzlich wurden linksventrikuläre Querschnitts- und Cavumfläche (LVA, LVCA) ermittelt; aus der Differenz wurde die linksventrikuläre Muskelquerschnittsfläche bestimmt (LVWA). Des Weiteren wurde die rechtsventrikuläre Cavumfläche bestimmt zur Beurteilung einer möglichen Beteiligung des rechten Ventrikels.

LVA und die LVCA waren bei den  $\beta_1$ -Ratten signifikant größer, bezüglich der absoluten LVWA zeigte sich zwischen den Versuchstiergruppen jedoch kein signifikanter Unterschied. Entsprechend war dann das Verhältnis von LVWA zu LVA bei den  $\beta_1$ -Tieren deutlich reduziert ( $p < 0,001$ ). Bezüglich der RVCA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 10, Tabelle 5).

Die Auswertung der linksventrikulären Diameter und Wanddicken unterstreicht die Ergebnisse der Flächenauswertung.

Wie die linksventrikuläre Cavumfläche war auch der linksventrikuläre Cavumdurchmesser (LVD) bei den  $\beta_1$ -Tieren signifikant größer ( $p < 0,0001$ ). Die absoluten Messwerte von linksventrikulärer Hinterwand (HW) und interventrikulärem Septum (IVS) waren bei den mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Versuchstieren deutlich kleiner als bei den Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ; Tabelle 5).



**Abbildung 10: Graphische Darstellung der makroskopisch-morphometrischen Untersuchung an HE-Schnitten.** – Der linke Ventrikel zeigt sich bei den  $\beta_1$ -Ratten nach 15 Monaten Immunisierung signifikant vergrößert mit Erweiterung des linksventrikulären Cavums (LVCA bzw. LVD) bei nahezu gleichbleibender Muskelquerschnittsfläche (LVWA). Daraus erklärt sich die signifikante Verringerung der Relation von linksventrikulärem Muskelquerschnitt (LVWA) zur linksventrikulären Gesamtfläche. (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; Mittelwert $\pm$ SEM)

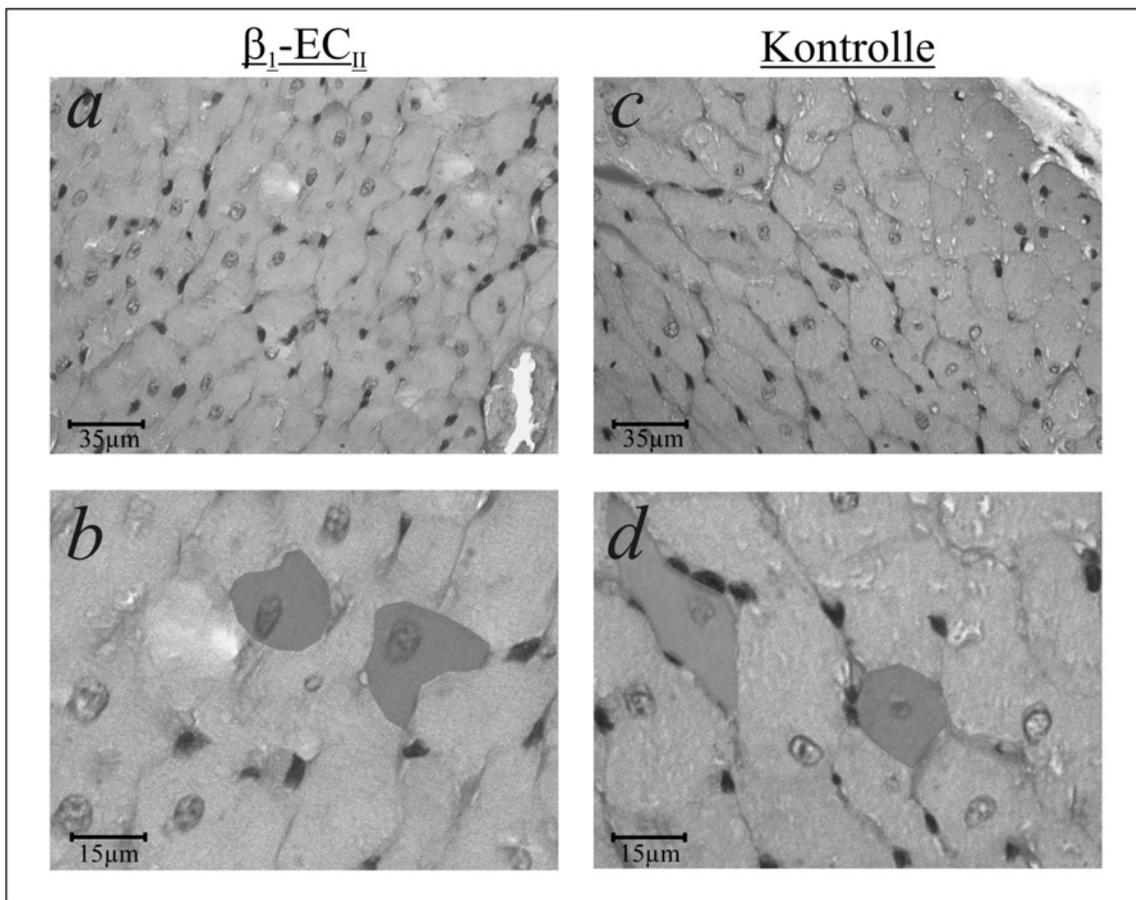
Zusammenfassend stellt sich bei den  $\beta_1$ -Tieren eine deutliche Dilatation des linken Ventrikels dar, bedingt durch eine Zunahme der Innenfläche des linksventrikulären Cavums bei gleichzeitiger Abnahme der relativen und absoluten linksventrikulären Wanddicken. Hinsichtlich des rechten Ventrikels ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen (Tabelle 5).

	Kontrollen (N=19)	$\beta_1$ -EC <sub>II</sub> (N=15)	P-Wert
LVA [mm <sup>2</sup> ]	76,3 ± 1,1	81,5 ± 2,1	< 0,05
LVCA [mm <sup>2</sup> ]	27,8 ± 0,7	34,4 ± 0,9	< 0,0001
LVWA [mm <sup>2</sup> ]	48,5 ± 0,9	47,1 ± 1,3	n.s.
Relation LVWA/LVA [%]	63,6 ± 0,63	57,8 ± 0,5	< 0,0001
RVCA [mm <sup>2</sup> ]	8,52 ± 0,51	9,67 ± 0,61	n.s.
LVD [mm]	5,68 ± 0,09	6,42 ± 0,11	< 0,0001
HW [mm]	1,91 ± 0,03	1,77 ± 0,03	< 0,05
IVS [mm]	1,81 ± 0,02	1,70 ± 0,02	< 0,05

**Tabelle 5: Ergebnisse der makroskopisch-morphometrischen Auswertung** an HE-gefärbten 1  $\mu$ m-Paraffinschnitten – Die entsprechenden Abkürzungen der bestimmten Parameter sind in Abbildung 9 dargestellt. (Mittelwerte $\pm$ SEM)

#### 4.2. Mikroskopisch-morphometrische Auswertung an PAS-Schnitten

Für die Auswertung wurden PAS-gefärbte Paraffinschnitte des Herzens verwendet. Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop (Zeiss Axiovert 135) mit angeschlossener Spot-Insight-Color-Kamera (Visitron-Systems) bei 120-facher Vergrößerung untersucht. Beurteilt wurde die Querschnittsfläche der Herzmuskelzellen und des entsprechenden Zellkerns (in  $\mu\text{m}^2$ ) jeweils im Bereich der Herzvorder- und -hinterwand, des Septums sowie des rechten Ventrikels (Abb. 11). Pro Paraffinschnitt und Bereich wurden computergestützt die Mittelwerte von jeweils 20 Muskelzellen bzw. Zellkernen bestimmt.



**Abbildung 11: Histologisch-morphometrische Auswertung an PAS-gefärbten 1 $\mu\text{m}$ -Paraffinschnitten.** - Je Versuchstierherz wurden am Mikroskop Übersichtsaufnahmen bei 50facher Vergrößerung (a und c) aus den anatomischen Bereichen der Vorder- und Hinterwand, des Septums und des rechten Ventrikels angefertigt.

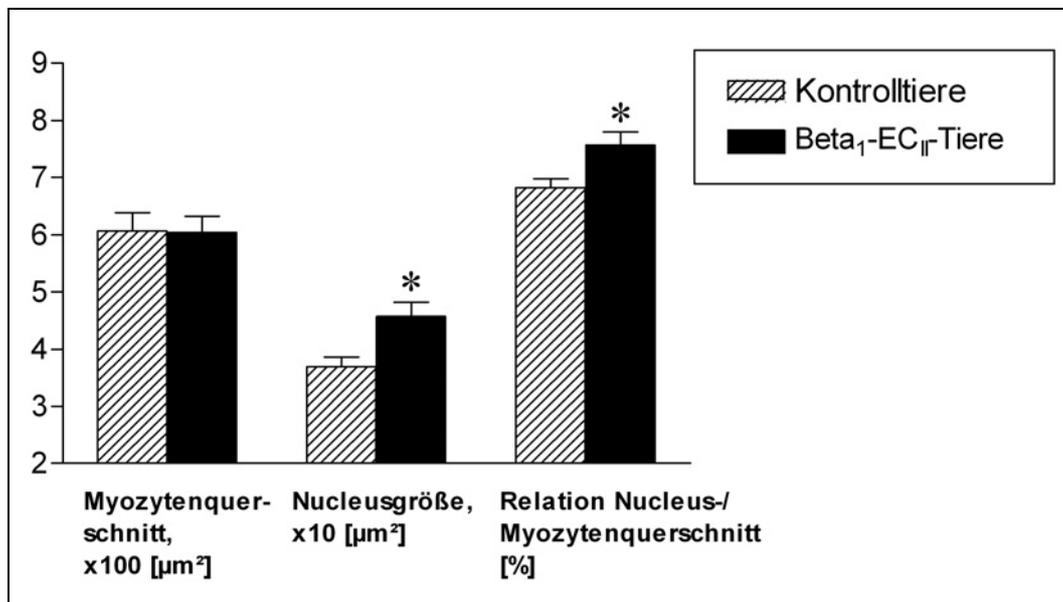
Die Größe der Myozyten und der entsprechenden Nuclei erfolgte computergestützt bei 120-facher Vergrößerung (in  $\mu\text{m}^2$ ) von 20 querschnittenen Myozyten je Paraffinschnitt (b und d, ausgewertete Zellen sind grau unterlegt).

Im Vergleich zwischen  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-immunisierten Tieren und Kontrollen (GST u. NaCl-Gruppe) zeigte sich die Querschnittsfläche der Muskelzellen nicht signifikant unterschiedlich. Bezüglich Zellkerngröße und Relation von Nucleus- zu Myozytengröße (in Prozent, %) ergaben sich in der  $\beta_1$ -Gruppe deutlich erhöhte Messwerte (jeweils  $p < 0,05$ ; Tabelle 6, Abb. 12).

Bei keinem Versuchstier fanden sich im Myokard Hinweise auf ein entzündliches Geschehen oder deutliche fokale Infiltrate.

	Kontrollen (N=18)	$\beta_1$ -EC <sub>II</sub> (N=15)	P-Wert
Myozytengröße [ $\mu\text{m}^2$ ]	606,5 ± 31,8	603,7 ± 28,2	n.s.
Nucleusgröße [ $\mu\text{m}^2$ ]	36,90 ± 1,73	45,70 ± 2,52	< 0,05
Nucleus/Myozyten-Relation [%]	6,82 ± 0,16	7,56 ± 0,23	< 0,05

**Tabelle 6: Ergebnisse der computergestützten histologisch-morphometrischen Auswertung an PAS-gefärbten 1  $\mu\text{m}$ -Paraffinschnitten (Mittelwerte $\pm$ SEM).**



**Abbildung 12: Histologisch-morphometrische Auswertung der Myozyten.** – Der Myozytenquerschnitt zeigte sich beim Vergleich der Versuchstiergruppen nicht signifikant different (Balken links). Allerdings erwiesen sich sowohl die Nuclei als auch das Verhältnis von Nucleus- zu Myozytenquerschnitt bei  $\beta_1$ -Tieren gegenüber den beiden Kontrolltiergruppen (GST- und NaCl-Tiere) als deutlich vergrößert (\* $p < 0,05$ ; Balken mitte und rechts). (Mittelwerte $\pm$ SEM)

## 5. Spektrophotometrische Kollagenbestimmung an Paraffinschnitten

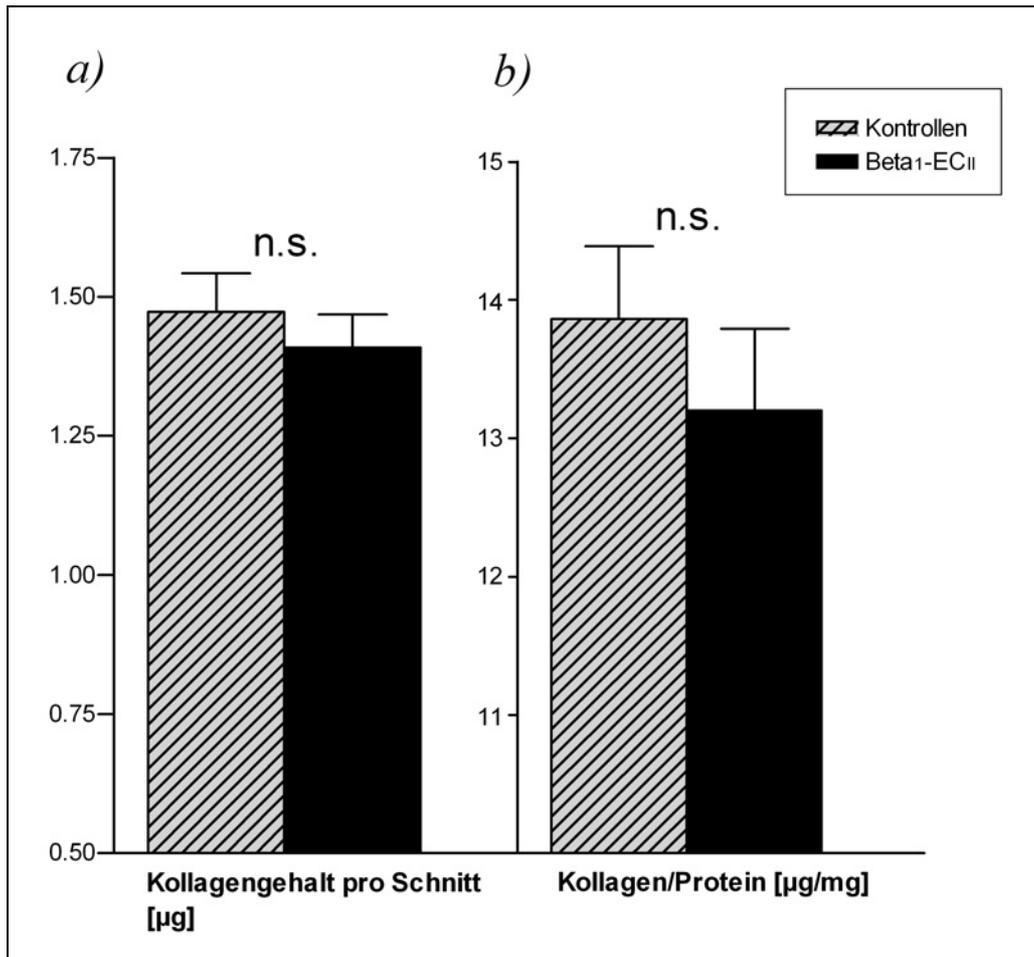
Die Beurteilung des Kollagengehaltes der Herzgewebe erfolgte an Paraffinschnitten wie von Lopez-De Leon *et al.* beschrieben [127]. Die Schnitte wurden nacheinander mit zwei verschiedenen Pikrinsäure-Farbstofflösungen (Sirius-Rot und Fast-Green-FCF) inkubiert. Die im Gewebe gebundenen Farbstoffe wurden eluiert und die Menge spektrophotometrisch bestimmt.

Mit Hilfe der von Lopez-De Leon *et al.* ermittelten Koeffizienten im Rattenherzgewebe für Kollagen (38,4) und unspezifisches Gewebsprotein (2,08) wurden die Extinktionen für Kollagen bzw. Gewebsprotein in  $\mu\text{g}$  pro Schnitt bzw. die Kollagenkonzentration in Abhängigkeit vom Gesamtproteingehalt bestimmt.

	Kontrollen (N=19)	$\beta_1$ -EC <sub>II</sub> (N=15)
Extinktion Kollagen	0,057 $\pm$ 0,003	0,054 $\pm$ 0,002
Extinktion Gewebsprotein	0,219 $\pm$ 0,008	0,226 $\pm$ 0,005
Kollagengehalt [ $\mu\text{g}$ /Schnitt]	1,47 $\pm$ 0,07	1,41 $\pm$ 0,06
Gewebsproteingehalt [ $\mu\text{g}$ /Schnitt]	106,92 $\pm$ 3,68	107,89 $\pm$ 2,47
Kollagen/Gewebsprotein [ $\mu\text{g}$ /g]	13,86 $\pm$ 0,53	13,20 $\pm$ 0,59

**Tabelle 7: Spektrophotometrischen Kollagenbestimmung** an 1  $\mu\text{m}$ -Paraffinschnitten von Rattenherzen nach Lopez-De Leon *et al.* – Entsprechend der Farbkoeffizienten für Fast-Green-FCF und Sirius-Rot erfolgte die Berechnung des Kollagen- und Gewebeproteingehalts pro Schnitt. Hieraus wurde die relative Kollagenkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt im Herzgewebe ermittelt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen (GST und NaCl) und mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Ratten. (Mittelwert $\pm$ SEM)

Beim Kollagengehalt ergaben sich nach 15 Monaten zwischen  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-immunisierten Tieren und den Kontrolltiergruppen (GST und NaCl) keine statistisch signifikanten Unterschiede. Entsprechend waren die daraus ermittelten Konzentrationen für Kollagen und Gesamtprotein sowie die Kollagenkonzentration in beiden Gruppen nahezu gleich hoch (Abb. 13 und Tabelle 7).



**Abbildung 13: Spektrophotometrische Bestimmung von Kollagengehalt und Kollagenkonzentration an Paraffinschnitten** von Lewis-Ratten nach 15monatiger Immunisierung mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen (N=15) oder GST bzw. physiologischer Kochsalzlösung (N=10 bzw. 8, Kontrollgruppen). – 1 µm-dicke Paraffinschnitte der Rattenherzen wurden mit Sirius-Rot- und Fast-Green-FCF-Pikrinsäurelösung inkubiert und die jeweilige Extinktion der eluierten Farbstoffe bei  $\lambda=540$  und 605 nm spektrophotometrisch bestimmt. Der Kollagengehalt im Rattenmyokard zeigte sich zwischen den Versuchstiergruppen nicht signifikant (n.s.) different. (Mittelwert $\pm$ SEM)

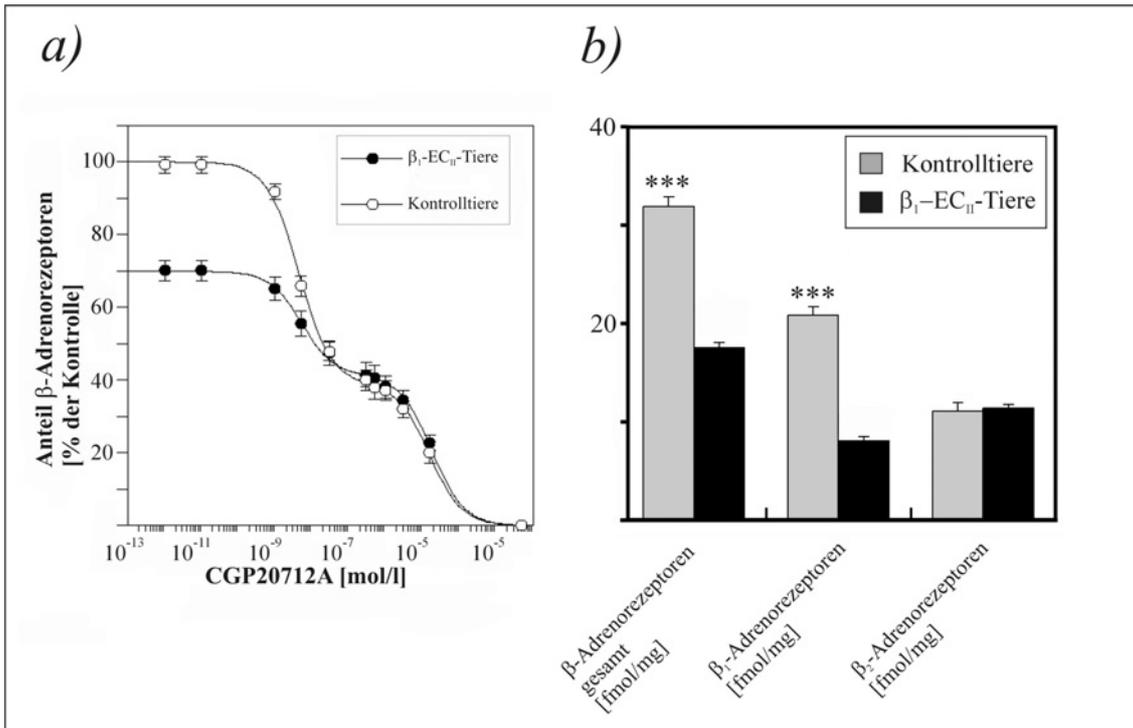
## 6. Radioligandenbindungs-Assay

Die Radioligandenbindungsversuche wurden an aufgearbeitetem Membranprotein der Rattenherzspitze durchgeführt. Jeder Messpunkt wurde aus drei verschiedenen Proben pro Membranpräparation ermittelt; je Probe wurden 35 µg Membranprotein verwendet. Hierbei zeigte sich eine deutlich reduzierte Bindung von  $^{125}\text{ICYP}$  (70 bzw. 200 pM) an Herzmembranen von  $\beta_1\text{-EC}_{\text{II}}$ -immunisierten Tieren. Hieraus ergab sich eine Reduktion der Gesamtzahl myokardialer  $\beta$ -Adrenozeptoren von ca. 30% in immunisierten gegenüber Kontrolltieren (Tabelle 8 und Abb. 14).

	Kontrollen (N=19)	$\beta_1\text{-EC}_{\text{II}}$ (N=15)	P-Wert
$\beta$ -Adrenozeptoren-Konzentration gesamt [fmol/mg]	$32,5 \pm 2,3$	$17,4 \pm 0,5$	$< 0,0001$
$\beta_1$ -Adrenozeptoranteil [%]	$67,3 \pm 1,8$	$46,7 \pm 1,8$	$< 0,0001$

**Tabelle 8: Radioligandenbindungsassay mit  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol ( $^{125}\text{ICYP}$ )** – 35 µg kardiales Membranprotein wurden mit 200 bzw. 70 pM  $^{125}\text{ICYP}$  inkubiert. Bestimmung der  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Relation durch Reihenverdünnung des  $\beta_1$ -selektiven Rezeptorantagonisten CGP20712A und anschließender nichtlinearer Regressionsanalyse. Ermitteln der unspezifischen Bindung mittels Propranolol (5 mmol/l). (Mittelwert $\pm$ SEM)

Das Verhältnis von  $\beta_1$ - zu  $\beta_2$ -Rezeptoren wurde durch Reihenverdünnung des  $\beta_1$ -selektiven Rezeptorantagonisten CGP20712A bei 70 pM  $^{125}\text{ICYP}$  ermittelt. Durch steigende Konzentrationen von CGP20712A lässt sich hierbei aufgrund der Verdrängung von  $^{125}\text{ICYP}$  die spezifische Konzentration von  $\beta_1$ -Rezeptoren im kardialen Membranprotein bestimmen. Mittels nichtlinearer Regressionsanalyse ergibt sich, unter Annahme von zwei Bindungsstellen, ein typischer biphasischer Kurvenverlauf von CGP20712A an myokardialen Membranpräparationen mit hoher Affinität am  $\beta_1$ -Rezeptor und mehrerer Log-Stufen geringerer Affinität am  $\beta_2$ -Rezeptor. Dabei ergab sich eine signifikante Reduktion von  $\beta_1$ -Rezeptoren in Herzpräparationen  $\beta_1\text{-EC}_{\text{II}}$ -immunisierter Tiere während die absolute Konzentration von  $\beta_2$ -Rezeptoren nahezu unverändert in den Versuchstiergruppen war (Tabelle 8 und Abb. 14).



**Abbildung 14: Radioligandenverdrängungs-Assay an myokardialen Membranpräparationen** – Durch nichtlineare Regressionsanalyse in der **(a)** Ligandenbindungskurve Nachweis einer Reduktion des Anteils der  $\beta_1$ -Rezeptoren um etwa 30% bei den  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-immunisierten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen. **(b)** Signifikant reduzierte  $\beta$ -Adrenorezeptorgesamtzahl (fmol/mg Membranprotein; \*\*\*p < 0,0001) bei konstanter relativer  $\beta_2$ -Rezeptordichte. (Mittelwerte $\pm$ SEM)

## D. DISKUSSION

### 1. Pathogenetisches Potenzial von $\beta_1$ -Rezeptorantikörpern

Die Pathogenese der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie ist derzeit noch ungeklärt; ihr Anteil an primären Herzmuskelerkrankungen wird zwischen 46 und 50% angegeben [66, 106, 167]. Als mögliche exogene Ursache werden im wesentlichen zwei Hypothesen diskutiert: bei einem Teil der Patienten wird eine klinisch inapparente oder chronifizierte Virusinfektion angenommen, zum anderen könnten primäre Störungen des Immunsystems in Verbindung mit Zytokin- und Antikörper-vermittelten Effekten eine ursächliche Rolle spielen [128]. Beiden Hypothesen gemeinsam ist das Auftreten körpereigener Autoantikörper gegen kardiale Antigene [30, 138, 174]. Das pathogenetische Potenzial eines Autoantikörpers ist vermutlich in erster Linie abhängig von der Zugänglichkeit des korrespondierenden Antigens und der funktionellen Bedeutung des Target-Antigens.

Klinische und wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Antikörpern gegen den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor, insbesondere gegen dessen zweite extrazelluläre Domäne ( $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>), eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der iDCM zukommen könnte. So zeigten Antikörper aus dem Blut von iDCM-Patienten in vitro eine agonistische „sympathomimetische“ Aktivität [97, 98, 134]. Klinisch konnte das Vorkommen solcher Antikörper bei betroffenen Patienten mit einer signifikant schlechteren linksventrikulären Funktion, einer höheren Prävalenz für ventrikuläre Arrhythmien, einer erhöhten Inzidenz für den plötzlichen Herztod und kürzlich sogar mit einem etwa dreifach erhöhten Risiko für kardiovaskulär bedingten Tod assoziiert werden [95, 98, 177].

In vitro-Experimente von Magnusson *et al.* sowie Jahns *et al.* zeigten ferner, dass die stimulatorischen Effekte von  $\beta_1$ -Rezeptorantikörpern durch  $\beta_1$ -Rezeptorblocker aufgehoben werden können [97, 98, 134]. Diese Beobachtung könnte auch zu dem günstigen Effekt von kardioselektiven  $\beta_1$ -Rezeptorblockern in klinischen Studien (CIBIS und MERIT-HF) hinsichtlich des Verlaufs einer Herzinsuffizienz – auch bei Patienten mit iDCM – beigetragen haben [4, 7]. Auch die Effekte einer direkten Elimination von  $\beta_1$ -Rezeptorantikörpern aus dem Blut von Herzinsuffizienz-Patienten durch spezifische

und nicht-spezifische Immunadsorption wurde in verschiedenen Pilotstudien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei einem Teil der iDCM-Patienten sowohl die Herzfunktion als auch klinische Symptomatik nach Immunadsorption tendenziell verbesserten [65, 150, 188].

Bislang war es allerdings nicht gelungen, einen direkten Nachweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen  $\beta_1$ -Rezeptorautoantikörpern und der Induktion bzw. Progression einer dilatativen Kardiomyopathie zu führen.

## 2. Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie in der Ratte durch Immunisierung mit $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen

Auf der Grundlage der von Witebsky (bzw. Koch im deutschen Sprachraum) formulierten Postulate für Autoimmunerkrankungen wurde ein Tiermodell etabliert, das die Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie durch Immunisierung von Ratten mit der zweiten extrazellulären Domäne des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors nachweisen sollte. Vorausgegangene, ähnliche Versuche von Matsui *et al.* sowie Iwata *et al.* waren am Kaninchenmodell durchgeführt worden mit allerdings in Teilen widersprüchlichen Resultaten [95, 140]. Wir entschieden uns für das Modell der Ratte, da die Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Domäne des  $\beta_1$ -Rezeptors bei Mensch und Ratte zu 100% identisch ist [72, 129].

Der zweite extrazelluläre Loop des  $\beta_1$ -Rezeptors war bereits Jahre zuvor als potentes Antigen identifiziert worden, da es sowohl B- als auch T-Zell-Epitope besitzt [100, 131]. Hoebeke *et al.* konnten zudem nachweisen, dass nur dieser Abschnitt des  $\beta_1$ -Rezeptors diese Antigen-Eigenschaften besitzt [87].

Darüber hinaus konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass synthetisch hergestellte  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Peptide und auch  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen-enthaltende Fusionsproteine in Immunisierungsversuchen mit Kaninchen und Mäusen zur Induktion von funktionell aktiven  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörpern führten [95, 97, 140].

### 2.1. Regulation kardialer $\beta$ -adrenerger Rezeptoren

Der Anteil der  $\beta_1$ -Rezeptoren an den kardialen Adrenozeptoren wird mit 70 bis 80% angegeben [72]. Eine „allosterische“ Blockade des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors durch spezifische  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper könnte einerseits zu einer gesteigerten Expression von  $\beta_1$ -Rezeptoren führen, wohingegen bei agonistähnlichen Antikörpern theoretisch eine Downregulation und Degradation von  $\beta_1$ -Rezeptoren erwartet würde [97]. Bei unserem Immunisierungsversuch wurden durch Radioligandenkompetitions-Experimente absolute und relative Veränderungen der Expression von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren in der Kardiomyozytenmembran erfasst. Die Immunisierung mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen induzierte bei allen 15 Tieren eine Downregulation des  $\beta_1$ -Rezeptors um

ca. 30% mit Verschiebung der  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Rezeptorrelation von 68:32 (Kontrolltiere) zu 47:53 ( $\beta_1$ -Ratten). Indirekt wird dadurch der agonistähnliche Effekt der induzierten  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper an den  $\beta_1$ -Rezeptoren des Rattenherzens unterstrichen.

Die beiden Kaninchenmodelle zeigten sich hinsichtlich der Rezeptorexpression differenz: so führten die induzierten  $\beta_1$ -Antikörper bei Matsui *et al.* zu einer vermehrten Expression des  $\beta_1$ -Rezeptors im Herzgewebe [140], hingegen konnten Iwata *et al.*, im Einklang mit unseren Befunden, eine  $\beta_1$ -Downregulation nachweisen [95]. Dieser offensichtliche Widerspruch könnte auf Unterschiede im tier(stamm)-spezifischen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und/oder auf den spezifischen epitop-abhängigen sowie funktionellen Eigenschaften der jeweils induzierten  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper beruhen [119].

Die Aktivierung des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors durch Agonisten (Adrenalin, Noradrenalin) führt über die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade ( $G_s$ -Protein, Adenylatzyklase) zur Bildung von zyklischem AMP (cAMP); die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) erhöht durch Phosphorylierung weiterer Effektorproteine den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel, was zur einer Zunahme der Inotropie in den Kardiomyozyten führt [71, 126]. Die in unserem Tiermodell induzierten  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper erkannten zu 100% den nativen humanen  $\beta_1$ -Rezeptor [96]. In der funktionellen Analyse an transfizierten Zellsystemen induzierten diese „allosterischen“ konformationserkennenden  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und zeigten somit agonistähnliche Eigenschaften [96]. Diese Beobachtung geht konform mit den Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen der vergangenen Jahre; hierbei konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Antikörper, die gegen die zweite extrazelluläre Schleife des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors gerichtet sind, bestimmte Konformere des  $\beta_1$ -Rezeptors erkennen können [87, 97]. Eine wichtige funktionelle Eigenschaft dieser konformationellen Antikörper ist vermutlich die Induktion oder Stabilisierung einer aktiven Rezeptorkonformation, was wiederum zu einer Wirkungsverstärkung der physiologischen Agonisten (Adrenalin, Noradrenalin) am  $\beta_1$ -Rezeptor führen kann [97, 133, 148]. So wäre denkbar, dass es in unserem Modell infolge der  $\beta_1$ -adrenergen Überstimulation zu einer Downregulation und Degradation der  $\beta_1$ -Rezeptoren mit Ver-

schiebung der  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Relation am Herzen kam, was wiederum die Progression der Herzinsuffizienz bzw. Kardiomyopathie erklären könnte [23, 126].

## 2.2. Histomorphologie der Rattenherzen

Die morphometrische Auswertung der Herzen der mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Ratten zeigte das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie mit Erweiterung des linken Ventrikels und gleichzeitiger Abnahme der linksventrikulären Wanddicke. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gehalts von Kollagen I-III im Myokard.

Die vorangegangenen Immunisierungsmodelle am Kaninchen wiesen in diesen Punkten differente Ergebnisse auf: Matsui *et al.* sahen nach 12 Monaten Immunisierung eine leichte aber signifikante Erweiterung beider Herzhöhlen mit einer tendenziellen Abnahme der linksventrikulären Wanddicke ohne interstitielle Fibrose [140]; hingegen wiesen Iwata *et al.* eine signifikante linksventrikuläre Hypertrophie sowie eine Zunahme der interstitiellen Fibrose nach 6 Monaten Immunisierung nach, die allerdings nach insgesamt 12 Monaten nicht mehr nachzuweisen war [95]. Die differenten Resultate der Kaninchenmodelle sind möglicherweise durch unterschiedliche funktionelle Eigenschaften der jeweils induzierten Antikörper erklärbar.

Unsere im Modell der Ratte erzielten Ergebnisse lassen sich am ehesten durch den chronischen, jedoch milden agonist-ähnlichen Effekt der induzierten Antikörper am  $\beta_1$ -Rezeptor erklären. So wäre denkbar, dass die  $\beta_1$ -Antikörper durch geringe aber kontinuierliche sympathomimetische Stimulation am Herzen einen Circulus vitiosus initiieren und/oder verstärken, der letztlich zu einer progredienten Herzinsuffizienz geführt hat. Diese Beobachtung deckt sich weitgehend mit dem Herzinsuffizienzmodell von Woodiwiss *et al.*: Durch niedrig dosierte Gabe von Isoproterenol über 7 Monate konnte in Ratten eine dilatative Kardiomyopathie induziert werden. In diesem Modell fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Kollagengehaltes im Myokard [192]; interessanter Weise zeigte sich in diesem Modell jedoch eine signifikant reduzierte Quervernetzung des myokardialen Kollagens. Inwieweit dieser Mechanismus in unserem Modell zu einer linksventrikulären Dilatation beigetragen haben könnte, war im Rahmen der durchgeführten Analysen nicht zu beantworten. Die Beobachtungen von Woodiwiss *et al.* decken sich mit Untersuchungen von Gunja-

Smith *et al.* an Herzen von iDCM-Patienten; auch hier zeigte sich eine reduzierte Kollagenquervernetzung im Myokard [80, 192].

Die mikromorphometrische Analyse der Herzen unserer mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen immunisierten Tiere ergab eine signifikante Vergrößerung der Kardiomyozytenkerne ohne signifikante Zunahme der Myozytengröße. Ähnliche Beobachtungen hatten auch Scholz *et al.* 1994 und Yan *et al.* 1999 an Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten gemacht [172, 196]. Als Grund hierfür wird eine Steigerung der Genexpression vermutet, wie dies u.a. für das ANF-Gen nachgewiesen werden konnte [36]. Diese könnte als ein Kompensationsmechanismus der sympathischen Überstimulation sowie der mechanischen Wandbelastung im Rahmen der eingeschränkten Pumpfunktion des dilatierten Herzens aufgefasst werden. Das Ausmaß der Zellkernvergrößerung scheint dabei nach bisherigen Ergebnissen sogar mit der Ausprägung der linksventrikulären Dilatation zu korrelieren [36, 46].

### 2.3. Funktion der Rattenherzen

Im Gegensatz zu bisher vorliegenden Immunisierungsexperimenten war es bei unserem Versuch möglich, durch echokardiographische Verlaufsuntersuchungen *in vivo* funktionelle wie auch morphologische Veränderungen nach Induktion von Anti- $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörpern am Rattenherzen zu beurteilen. So war es durch diese nicht-invasive Form der Verlaufsbeurteilung u.a. möglich zu zeigen, dass bei  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper-positiven Tieren etwa 9 Monate nach Beginn der Immunisierung eine linksventrikuläre Dilatation auftrat, einhergehend mit einer Dysfunktion des linken Ventrikels. Diese Dilatation und Dysfunktion des linken Herzens verliefen im Weiteren dann langsam aber stetig progredient. Aufgrund der vorgesehenen Herzkatheteruntersuchungen sowie des anstehenden Transferversuchs wurde der Immunisierungsversuch nach 15 Monaten beendet, bevor die Ratten das Endstadium einer schweren Herzinsuffizienzkrankung erreichten; eine Fortsetzung der monatlichen Antigen-Boosts hätte vermutlich zu einem nicht erwünschten Anstieg der Mortalität geführt.

Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse nahe, dass die durch  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper induzierte Kardiomyopathie eine langsame, sich aber progredient entwickelnde Erkrankung darstellt. Es ist davon auszugehen, dass sich solch ein Verlauf beim Menschen über mehrere Jahre bis Jahrzehnte erstrecken kann.

### 3. Ausblick

Mit Hilfe des hier beschriebenen Modells konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung gegen das  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen in der Ratte zur Induktion einer dilatativen Kardiomyopathie führen kann. Diese ist durch eine progrediente linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion mit relativer Abnahme der linksventrikulären Wanddicke sowie einer selektiven Downregulation der  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren im Myokard gekennzeichnet. Die selektive Downregulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren im Zusammenhang mit der DCM wurde auch beim Menschen wiederholt beschrieben [126].

Eine signifikante Zunahme der interstitiellen Fibrosierung konnten wir in unserem Modell nicht nachweisen. Dies deckt sich mit den Befunden von Staudt *et al.*; im Frühstadium der DCM hatte die Arbeitsgruppe ebenfalls keinen Anhalt für eine Zunahme der Fibrosierung im Herzmuskelgewebe von Patienten [176]. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass in unserem Modell eine reduzierte Kollagenquervernetzung im Herzmuskelgewebe zu der beobachteten linksventrikulären Dilatation und Dysfunktion beigetragen haben könnte [192]. Es liegt dennoch nahe, dass der Phänotyp unseres Kardiomyopathiemodells überwiegend auf dem agonist-ähnlichen Effekt der induzierten  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper beruht. Dies wird durch den Nachweis der selektiven  $\beta_1$ -Downregulation in der Myozytenmembran immunisierter Tiere zusätzlich unterstrichen. Dieses, von uns gemäß der Witebsky'schen Postulate (bzw. Koch'schen Postulate im deutschen Sprachraum) in der Ratte etablierte Modell, legt eine pathogenetische Relevanz von aktivierenden  $\beta_1$ -Antikörpern bei der dilatativen Kardiomyopathie nahe [170]. Zunächst wurde durch die Induktion der Antikörper und des kardiomyopathischen Phänotyps (=indirekter Nachweis) das zweite Postulat erfüllt. In dem anschließend durchgeführten Transferversuch (=direkter Nachweis) wurden die aus dem Induktionsversuch gewonnenen Antikörper genetisch identischen Ratten appliziert, was dann bei diesen zur Induktion eines kardiomyopathischen Phänotyps führte, was somit das 3. Postulat für eine Autoimmunkardiomyopathie erfüllte [96, 170]. Folglich sollte die durch Anti- $\beta_1$ -Rezeptorantikörper induzierte dilatative Kardiomyopathie nunmehr als eigenständige pathogenetische Entität unter den bereits etablierten, durch Rezeptorautoantikörper vermittelten Autoimmunerkrankungen (z.B. Myasthenia gravis, M. Basedow), berücksichtigt werden [71, 85].

Das im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit entwickelte Tiermodell liefert zudem eine gute Basis für weitere grundlagenwissenschaftliche Untersuchungen und die Entwicklung potenziell neuer Therapieansätze für  $\beta_1$ -Antikörper-positive DCM-Patienten. Möglich wäre hierbei das Austesten unterschiedlicher kardioselektiver  $\beta_1$ -Rezeptorblocker, mit dem Ziel einer „optimierten“ Verminderung oder gar Aufhebung der sympathomimetischen Effekte der  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper [71, 97, 139].

Neuere experimentelle Ansätze streben eine Elimination von aktivierenden  $\beta_1$ -Rezeptorantikörpern durch nicht-selektive oder selektive Immunadsorption an [150, 188]. Die Verfahren erscheinen materiell und personell sehr aufwändig; zudem konnte ihre mittel- und langfristige Effektivität bisher nicht durch randomisierte kontrollierte Studien gesichert werden [85].

Bislang ungeklärt sind auch die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Induktion von Anti- $\beta_1$ -Autoantikörpern beim Menschen führen können, sowie deren letztliche klinische Relevanz. Aufgrund unterschiedlicher Nachweismethoden schwanken die Angaben zur Inzidenz von  $\beta_1$ -Antikörpern bei DCM-Patienten bisher zwischen 30 und 95% [98, 134, 189]. Eine Vereinheitlichung der Nachweismethoden hätte nicht zuletzt auch eine einheitliche Definition funktionell aktiver  $\beta_1$ -Antikörper beim Menschen zur Folge. In dieser Hinsicht konnten Nikolaev *et al.* kürzlich unter Verwendung eines fluoreszierenden cAMP-Sensors an intakten humanen Zellen eine Methode (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer; FRET) zur schnelleren und zuverlässigen Detektion funktionell aktiver  $\beta_1$ -Antikörper entwickeln, die nun aber noch an größeren Patientenpopulationen evaluiert werden muss [153].

## E. ZUSAMMENFASSUNG

Vor etwas mehr als 20 Jahren wurden erstmals an das Myokard bindende  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper im Zusammenhang mit der Chagas-Krankheit beschrieben [19]. Die Arbeiten der beiden folgenden Jahrzehnte konnten zeigen, dass solche  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper mit einer Prävalenz von ca. 30 bis 95% (in Abhängigkeit vom verwendeten Nachweisverfahren) v.a. auch bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachgewiesen werden können [94, 98, 134, 190]. Insbesondere Antikörper gegen die zweite extrazelluläre Domäne des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>) scheinen dabei in der Lage zu sein, den Rezeptor funktionell zu beeinflussen und zu aktivieren [98].  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> wurde in der Folge als potentes Autoantigen mit T- und B-Zell-Epitopen identifiziert [131, 148, 180]. Erste klinische Untersuchungen an Patienten mit DCM haben gezeigt, dass das Vorhandensein zirkulierender  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper mit einer schlechteren linksventrikulären Funktion [98], dem Auftreten ventrikulärer Arrhythmien [35] sowie mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität verbunden ist [177]. Der Verdacht, dass  $\beta_1$ -Antikörper bei der DCM nicht nur ein Epiphänomen, sondern bei einem Teil der betroffenen Patienten auch mögliche Krankheitsursache darstellen könnten, verstärkten dann in jüngster Zeit die Bestrebungen, ein Tiermodell für die Antikörper-induzierte Genese einer Kardiomyopathie zu generieren.

So fanden 1997 Matsui *et al.* im Kaninchenmodell nach Immunisierung mit einem  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-homologen Peptid über 12 Monate eine biventrikuläre Dilatation und kompensatorische Hochregulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren im Myokard [140]. Im Gegensatz dazu fanden Iwata *et al.* wenige Jahre später im gleichen Tiermodell nach 6-monatiger Immunisierung eine linksventrikuläre Hypertrophie bei  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antikörper-positiven Tieren und eine Downregulation der  $\beta$ -Rezeptoren [95]. Diese Diskrepanzen ließen das Kaninchenmodell daher als fraglich geeignet erscheinen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurde die Lewis-Ratte zur Generierung eines Kardiomyopathiemodells gewählt, da die  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Sequenz bei Ratte und Mensch 100% homolog ist [72, 129]. Zur Immunisierung verwendeten wir ein Fusionsprotein aus GST und der humanen  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Sequenz.

Der Schwerpunkt des Vorhabens lag auf der Charakterisierung der durch die Immunisierung induzierten morphologischen und funktionellen Veränderungen am Herzen der

Versuchstiere. Echokardiographisch konnte bei immunisierten Tieren bereits nach 9 Monaten eine linksventrikuläre Erweiterung nachgewiesen werden, die sich nach 12 bzw. 15 Immunisierungsmonaten durch das Auftreten einer progredienten linksventrikulären Dysfunktion (Echokardiographie/Herzkatheteruntersuchung) auch funktionell manifestierte. Makroskopisch-morphometrisch ließ sich an Paraffinschnitten eine Erweiterung des linken Ventrikels bei relativer Abnahme der Wanddicke nachweisen und bestätigte somit histologisch die echokardiographischen Messungen. Die mikroskopische Analyse zeigte eine relative Vergrößerung der Kardiomyozytenkerne ohne signifikante Zellhypertrophie. Durch Radioligandenbindungsversuche konnte zudem in  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-immunisierten Tieren eine Downregulation der kardialen  $\beta_1$ -Rezeptoren nachgewiesen werden.

Durch die Immunisierung mit  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>-Antigen konnte der Phänotyp einer DCM somit erstmals in der Ratte induziert werden. Dieser Phänotyp ist vermutlich überwiegend auf die agonist-ähnliche funktionelle Aktivität der durch spezifische Immunisierung induzierten  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper zurückzuführen. Das vorgestellte Tiermodell erfüllt dabei einerseits die immunologischen Kriterien des 1. Koch'schen Postulats für den „indirekten“ Nachweis einer Kardiomyopathieinduktion durch Antikörper, die gegen die zweite extrazelluläre Domäne des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors gerichtet sind. Andererseits lieferte es im Anschluss auch die direkte Evidenz für eine kausale Rolle solcher Antikörper bei der Induktion einer Autoimmunkardiomyopathie durch den Transfer induzierter Antikörper auf genetisch identische, herzgesunde Ratten (Nachahmen von Rezeptor-Autoantikörpern).

Zukünftig könnte dieses Tiermodell auch dazu dienen, weitere immunologische Faktoren, die an der Entwicklung einer Autoimmunkardiomyopathie durch  $\beta_1$ -Rezeptorantikörper beteiligt sind, zu untersuchen. Ferner können mit diesem Modell neue therapeutische Ansätze für die Behandlung der Rezeptorantikörper-positiven Kardiomyopathie entwickelt werden, mit dem Ziel einer späteren Anwendung im Tiermodell erprobter Strategien auch bei Antikörper-positiven Patienten.

**F. LITERATURVERZEICHNIS**

1. 1987. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med* 316 (23): 1429-35.
2. 1991. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fraction and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 325 (5): 293-302.
3. 1992. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fraction. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 327 (10): 685-91.
4. 1994. A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). CIBIS Investigators and Committees. *Circulation* 90 (4): 1765-73.
5. 1997. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. The Digitalis Investigation Group. *N Engl J Med* 336 (8): 525-33.
6. 1999. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 353 (9146): 9-13.
7. 1999. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353 (9169): 2001-7.
8. Akhter S.A., Skaer C.A., Kypson A.P., *et al.* 1997. Restoration of beta-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (22): 12100-5.
9. Andersson B., Caidahl K., Waagstein F. 1995. Idiopathic dilated cardiomyopathy among Swedish patients with congestive heart failure. *Eur Heart J* 16 (1): 53-60.
10. Ariens E.J., Simonis A.M. 1983. Physiological and pharmacological aspects of adrenergic receptor classification. *Biochem Pharmacol* 32 (10): 1539-45.
11. Baboonian C., Davies M.J., Booth J.C., *et al.* 1997. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 223: 31-52.
12. Bansch D., Antz M., Boczor S., *et al.* 2002. Primary prevention of sudden cardiac death in idiopathic dilated cardiomyopathy: the Cardiomyopathy Trial (CAT). *Circulation* 105 (12): 1453-8.
13. Bardy G.H., Lee K.L., Mark D.B., *et al.* 2005. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med* 352 (3): 225-37.

14. Barr A.J., Brass L.F., Manning D.R. 1997. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem* 272 (4): 2223-9.
15. Belch J.J., Bridges A.B., Scott N., *et al.* 1991. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 65 (5): 245-8.
16. Benjamin I.J., Jalil J.E., Tan L.B., *et al.* 1989. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 65 (3): 657-70.
17. Boivin V., Jahns R., Gambaryan S., *et al.* 2001. Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* 59 (2): 515-31.
18. Bond R.A., Lefkowitz R.J. 1996. The third beta is not the charm. *J Clin Invest* 98 (2): 241.
19. Borda E., Pascual J., Cossio P., *et al.* 1984. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol* 57 (3): 679-86.
20. Bouvier M., Collins S., O'Dowd B.F., *et al.* 1989. 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* 264 (28): 16786-92.
21. Bozkurt B., Villaneuva F.S., Holubkov R., *et al.* 1999. Intravenous immune globulin in the therapy of peripartum cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 34 (1): 177-80.
22. Bradley D.J., Bradley E.A., Baughman K.L., *et al.* 2003. Cardiac resynchronization and death from progressive heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 289 (6): 730-40.
23. Bristow M.R. 1993. Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 22 (4 Suppl A): 61A-71A.
24. Bristow M.R. 2000. Beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101 (5): 558-69.
25. Bristow M.R., Feldman A.M. 1992. Changes in the receptor-G protein-adenylyl cyclase system in heart failure from various types of heart muscle disease. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 1: 15-35.
26. Bristow M.R., Ginsburg R., Minobe W., *et al.* 1982. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307 (4): 205-11.

27. Bristow M.R., Ginsburg R., Umans V., *et al.* 1986. 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* 59 (3): 297-309.
28. Brodde O.E. 1991. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43 (2): 203-42.
29. Caforio A.L., Baboonian C., McKenna W.J. 1997. Postviral autoimmune heart disease - fact or fiction? *Eur Heart J* 18 (7): 1051-5.
30. Caforio A.L., Goldman J.H., Baig M.K., *et al.* 1995. Organ-specific cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy--an update. *Eur Heart J* 16 Suppl O: 68-70.
31. Caforio A.L., Grazzini M., Mann J.M., *et al.* 1992. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85 (5): 1734-42.
32. Carstairs J.R., Nimmo A.J., Barnes P.J. 1985. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. *Am Rev Respir Dis* 132 (3): 541-7.
33. Cetta F., Michels V.V. 1995. The autoimmune basis of dilated cardiomyopathy. *Ann Med* 27 (2): 169-73.
34. Chesley A., Lundberg M.S., Asai T., *et al.* 2000. The beta 2-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 87 (12): 1172-9.
35. Chiale P.A., Ferrari I., Mahler E., *et al.* 2001. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 103 (13): 1765-71.
36. Chien K.R., Knowlton K.U., Zhu H., *et al.* 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *Faseb J* 5 (15): 3037-46.
37. Cicoira M., Zanolla L., Rossi A., *et al.* 2002. Long-term, dose-dependent effects of spironolactone on left ventricular function and exercise tolerance in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 40 (2): 304-10.
38. Cleland J.G., Daubert J.C., Erdmann E., *et al.* 2005. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 352 (15): 1539-49.

39. Codd M.B., Sugrue D.D., Gersh B.J., *et al.* 1989. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 80 (3): 564-72.
40. Cohn J.N., Levine T.B., Olivari M.T., *et al.* 1984. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311 (13): 819-23.
41. Cohn J.N., Tognoni G. 2001. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 345 (23): 1667-75.
42. Communal C., Singh K., Pimentel D.R., *et al.* 1998. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 98 (13): 1329-34.
43. Communal C., Singh K., Sawyer D.B., *et al.* 1999. Opposing effects of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100 (22): 2210-2.
44. Cowie M.R., Mosterd A., Wood D.A., *et al.* 1997. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 18 (2): 208-25.
45. Daaka Y., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390 (6655): 88-91.
46. Davies C.H., Harding S.E., Poole-Wilson P.A. 1996. Cellular mechanisms of contractile dysfunction in human heart failure. *Eur Heart J* 17 (2): 189-98.
47. Davies M.J. 2000. The cardiomyopathies: an overview. *Heart* 83 (4): 469-74.
48. De Lean A., Stadel J.M., Lefkowitz R.J. 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255 (15): 7108-17.
49. Dec G.W., Fuster V. 1994. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 331 (23): 1564-75.
50. del Monte F., Kaumann A.J., Poole-Wilson P.A., *et al.* 1993. Coexistence of functioning beta 1- and beta 2-adrenoceptors in single myocytes from human ventricle. *Circulation* 88 (3): 854-63.
51. DiBona G.F., Kopp U.C. 1997. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77 (1): 75-197.
52. DiBona G.F., Sawin L.L. 1999. Effect of metoprolol administration on renal sodium handling in experimental congestive heart failure. *Circulation* 100 (1): 82-6.

53. Dickstein K., Kjekshtus J. 2002. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet* 360 (9335): 752-60.
54. Dieckmann-Schuppert A., Schnittler H.J. 1997. A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res* 288 (1): 119-26.
55. Dohlman H.G., Caron M.G., DeBlasi A., *et al.* 1990. Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* 29 (9): 2335-42.
56. Dohlman H.G., Thorner J., Caron M.G., *et al.* 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60: 653-88.
57. Dörffel W.V., Felix S.B., Wallukat G., *et al.* 1997. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95 (8): 1994-7.
58. Dörffel W.V., Wallukat G., Dörffel Y., *et al.* 2004. Immunoadsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J Cardiol* 97 (3): 529-34.
59. Emorine L., Blin N., Strosberg A.D. 1994. The human beta 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 15 (1): 3-7.
60. Emorine L.J., Marullo S., Briand-Sutren M.M., *et al.* 1989. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245 (4922): 1118-21.
61. Engelhardt S., Böhm M., Erdmann E., *et al.* 1996. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 27 (1): 146-54.
62. Erdmann E., Lechat P., Verkenne P., *et al.* 2001. Results from post-hoc analyses of the CIBIS II trial: effect of bisoprolol in high-risk patient groups with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 3 (4): 469-79.
63. Fabrizio L., Regan T.J. 1994. Alcoholic cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 8 (1): 89-94.
64. Fatkin D., Graham R.M. 2002. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 82 (4): 945-80.
65. Felix S.B., Staudt A., Dörffel W.V., *et al.* 2000. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated

- cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35 (6): 1590-8.
66. Felker G.M., Thompson R.E., Hare J.M., *et al.* 2000. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 342 (15): 1077-84.
  67. Ferguson S.S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53 (1): 1-24.
  68. Ferrari R., Bachetti T., Confortini R., *et al.* 1995. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 92 (6): 1479-86.
  69. Franz W.M., Muller M., Muller O.J., *et al.* 2000. Association of nonsense mutation of dystrophin gene with disruption of sarcoglycan complex in X-linked dilated cardiomyopathy. *Lancet* 355 (9217): 1781-5.
  70. Fraser I.D., Cong M., Kim J., *et al.* 2000. Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta 2-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Curr Biol* 10 (7): 409-12.
  71. Freedman N.J., Lefkowitz R.J. 2004. Anti-beta 1-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest* 113 (10): 1379-82.
  72. Frielle T., Collins S., Daniel K.W., *et al.* 1987. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (22): 7920-4.
  73. Gabilondo A.M., Hegler J., Krasel C., *et al.* 1997. A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (23): 12285-90.
  74. Gao T., Yatani A., Dell'Acqua M.L., *et al.* 1997. cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* 19 (1): 185-96.
  75. Gauthier C., Tavernier G., Charpentier F., *et al.* 1996. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98 (2): 556-62.
  76. Gilman A.G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-49.
  77. Goldie R.G., Paterson J.W., Wale J.L. 1982. Pharmacological responses of human and porcine lung parenchyma, bronchus and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 76 (4): 515-21.

78. Green S.A., Holt B.D., Liggett S.B. 1992. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptors display subtype-selective coupling to Gs. *Mol Pharmacol* 41 (5): 889-93.
79. Grumbach I.M., Heim A., Pring-Akerblom P., *et al.* 1999. Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol* 54 (2): 83-8.
80. Gunja-Smith Z., Morales A.R., Romanelli R., *et al.* 1996. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 148 (5): 1639-48.
81. Hadcock J.R., Malbon C.C. 1993. Agonist regulation of gene expression of adrenergic receptors and G proteins. *J Neurochem* 60 (1): 1-9.
82. Haga T., Haga K., Kameyama K. 1994. G protein--coupled receptor kinases. *J Neurochem* 63 (2): 400-12.
83. Hausdorff W.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. 1990. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* 4 (11): 2881-9.
84. Hein L., Kobilka B.K. 1995. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* 34 (4): 357-66.
85. Hershko A.Y., Naparstek Y. 2005. Removal of pathogenic autoantibodies by immunoadsorption. *Ann N Y Acad Sci* 1051: 635-46.
86. Herzum M., Ruppert V., Kuytz B., *et al.* 1994. Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26 (7): 907-13.
87. Hoebcke J. 1996. Structural basis of autoimmunity against G protein coupled membrane receptors. *Int J Cardiol* 54 (2): 103-11.
88. Hoppe U.C., Böhm M., Dietz R., *et al.* 2005. Guidelines for therapy of chronic heart failure. *Z Kardiol* 94 (8): 488-509.
89. Hosenpud J.D., Bennett L.E., Keck B.M., *et al.* 2001. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Eighteenth Official Report 2001. *J Heart Lung Transplant* 20 (8): 805-15.
90. Houslay M.D., Milligan G. 1997. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22 (6): 217-24.
91. Hufnagel G., Pankuweit S., Richter A., *et al.* 2000. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* 25 (3): 279-85.
92. Hunt S.A., Baker D.W., Chin M.H., *et al.* 2001. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive

Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* 104 (24): 2996-3007.

93. Ikram H., Williamson H.G., Won M., *et al.* 1987. The course of idiopathic dilated cardiomyopathy in New Zealand. *Br Heart J* 57 (6): 521-7.
94. Iwata M., Yoshikawa T., Baba A., *et al.* 2001. Autoantibodies against the second extracellular loop of beta 1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 37 (2): 418-24.
95. Iwata M., Yoshikawa T., Baba A., *et al.* 2001. Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces beta-adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* 88 (6): 578-86.
96. Jahns R., Boivin V., Hein L., *et al.* 2004. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 113 (10): 1419-29.
97. Jahns R., Boivin V., Krapf T., *et al.* 2000. Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *J Am Coll Cardiol* 36 (4): 1280-7.
98. Jahns R., Boivin V., Siegmund C., *et al.* 1999. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation* 99 (5): 649-54.
99. Jahns R., Siegmund C., Jahns V., *et al.* 1996. Probing human beta 1- and beta 2-adrenoceptors with domain-specific fusion protein antibodies. *Eur J Pharmacol* 316 (1): 111-21.
100. Jockers R., Strosberg A.D. 2000. Expression of beta-adrenergic receptors in *E. coli*. *Methods Mol Biol* 126: 215-20.
101. Johnson M. 1998. The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 158 (5 Pt 3): S146-53.
102. Jong P., Demers C., McKelvie R.S., *et al.* 2002. Angiotensin receptor blockers in heart failure: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* 39 (3): 463-70.
103. Kadish A., Dyer A., Daubert J.P., *et al.* 2004. Prophylactic defibrillator implantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 350 (21): 2151-8.

104. Kallal L., Gagnon A.W., Penn R.B., *et al.* 1998. Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273 (1): 322-8.
105. Kandolf R., Sauter M., Aepinus C., *et al.* 1999. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res* 62 (2): 149-58.
106. Kasper E.K., Agema W.R., Hutchins G.M., *et al.* 1994. The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 673 consecutive patients. *J Am Coll Cardiol* 23 (3): 586-90.
107. Katz A.M. 1994. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med* 121 (5): 363-71.
108. Keren A., Popp R.L. 1992. Assignment of patients into the classification of cardiomyopathies. *Circulation* 86 (5): 1622-33.
109. Kilts J.D., Gerhardt M.A., Richardson M.D., *et al.* 2000. Beta 2-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circ Res* 87 (8): 705-9.
110. Klingel K., Hohenadl C., Canu A., *et al.* 1992. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1): 314-8.
111. Kobilka B., Gether U., Seifert R., *et al.* 1998. Examination of ligand-induced conformational changes in the beta2 adrenergic receptor. *Life Sci* 62 (17-18): 1509-12.
112. Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle T., *et al.* 1987. 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* 84 (1): 46-50.
113. Koch W.J., Rockman H.A., Samama P., *et al.* 1995. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta BARK inhibitor. *Science* 268 (5215): 1350-3.
114. Komajda M., Jais J.P., Reeves F., *et al.* 1990. Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 11 (9): 824-31.
115. Krum H., Roecker E.B., Mohacsi P., *et al.* 2003. Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study. *JAMA* 289 (6): 712-8.

116. Kuhl U., Noutsias M., Seeberg B., *et al.* 1996. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 75 (3): 295-300.
117. Kuhl U., Pauschinger M., Noutsias M., *et al.* 2005. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 111 (7): 887-93.
118. Lands A.M., Arnold A., McAuliff J.P., *et al.* 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214 (5088): 597-8.
119. Limas C.J. 1996. Autoimmunity in dilated cardiomyopathy and the major histocompatibility complex. *Int J Cardiol* 54 (2): 113-6.
120. Limas C.J., Goldenberg I.F., Limas C. 1989. Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 64 (1): 97-103.
121. Limas C.J., Goldenberg I.F., Limas C. 1990. Influence of anti-beta-receptor antibodies on cardiac adenylate cyclase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 119 (6): 1322-8.
122. Lohse M.J. 1993. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179 (2): 171-88.
123. Lohse M.J. 1996. [Mechanisms of the regulation of adrenergic beta-receptors]. *Z Kardiol* 85 Suppl 7: 1-3.
124. Lohse M.J., Benovic J.L., Caron M.G., *et al.* 1990. Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265 (6): 3202-11.
125. Lohse M.J., Engelhardt S., Danner S., *et al.* 1996. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure. *Basic Res Cardiol* 91 Suppl 2: 29-34.
126. Lohse M.J., Engelhardt S., Eschenhagen T. 2003. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93 (10): 896-906.
127. Lopez-De Leon A., Rojkind M. 1985. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 33 (8): 737-43.
128. Luppi P., Rudert W.A., Zanone M.M., *et al.* 1998. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen-driven autoimmune disease. *Circulation* 98 (8): 777-85.

129. Machida C.A., Bunzow J.R., Searles R.P., *et al.* 1990. Molecular cloning and expression of the rat beta 1-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 265 (22): 12960-5.
130. Maggioni A.P., Anand I., Gottlieb S.O., *et al.* 2002. Effects of valsartan on morbidity and mortality in patients with heart failure not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 40 (8): 1414-21.
131. Magnusson Y., Hoyer S., Lengagne R., *et al.* 1989. Antigenic analysis of the second extra-cellular loop of the human beta-adrenergic receptors. *Clin Exp Immunol* 78 (1): 42-8.
132. Magnusson Y., Marullo S., Hoyer S., *et al.* 1990. Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 86 (5): 1658-63.
133. Magnusson Y., Wallukat G., Guillet J.G., *et al.* 1991. Functional analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 4 (6): 893-905.
134. Magnusson Y., Wallukat G., Waagstein F., *et al.* 1994. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 89 (6): 2760-7.
135. Maisch B., Herzum M., Hufnagel G., *et al.* 1995. Immunosuppressive treatment for myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 16 Suppl O: 153-61.
136. Martino T.A., Liu P., Sole M.J. 1994. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 74 (2): 182-8.
137. Mason J.W., O'Connell J.B., Herskowitz A., *et al.* 1995. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 333 (5): 269-75.
138. Matsui S., Fu M. 1996. Characteristic distribution of circulating autoantibodies against G-protein coupled cardiovascular receptors in patients with idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 54 (2): 143-7.
139. Matsui S., Fu M.L. 2001. Prevention of experimental autoimmune cardiomyopathy in rabbits by receptor blockers. *Autoimmunity* 34 (3): 217-20.
140. Matsui S., Fu M.L., Katsuda S., *et al.* 1997. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 29 (2): 641-55.
141. Matsumori A. 1996. Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 11 (3): 302-9.

142. McMurray J.J., Ostergren J., Swedberg K., *et al.* 2003. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet* 362 (9386): 767-71.
143. McNamara D.M., Holubkov R., Starling R.C., *et al.* 2001. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 103 (18): 2254-9.
144. McNamara D.M., Rosenblum W.D., Janosko K.M., *et al.* 1997. Intravenous immune globulin in the therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. *Circulation* 95 (11): 2476-8.
145. Mestroni L., Rocco C., Gregori D., *et al.* 1999. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol* 34 (1): 181-90.
146. Michels V.V., Moll P.P., Miller F.A., *et al.* 1992. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326 (2): 77-82.
147. Milligan G., Svoboda P., Brown C.M. 1994. Why are there so many adrenoceptor subtypes? *Biochem Pharmacol* 48 (6): 1059-71.
148. Mobini R., Magnusson Y., Wallukat G., *et al.* 1999. Probing the immunological properties of the extracellular domains of the human beta 1-adrenoceptor. *J Autoimmun* 13 (2): 179-86.
149. Moxham C.P., Ross E.M., George S.T., *et al.* 1988. Beta-adrenergic receptors display intramolecular disulfide bridges in situ: analysis by immunoblotting and functional reconstitution. *Mol Pharmacol* 33 (5): 486-92.
150. Müller J., Wallukat G., Dandel M., *et al.* 2000. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 101 (4): 385-91.
151. Neer E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80 (2): 249-57.
152. Nigro V., de Sa Moreira E., Piluso G., *et al.* 1996. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 14 (2): 195-8.
153. Nikolaev V.O., Bünemann M., Hein L., *et al.* 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279 (36): 37215-8.
154. Noda K., Saad Y., Graham R.M., *et al.* 1994. The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J Biol Chem* 269 (9): 6743-52.

155. Noutsias M., Seeberg B., Schultheiss H.P., *et al.* 1999. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 99 (16): 2124-31.
156. Packer M., Bristow M.R., Cohn J.N., *et al.* 1996. 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* 334 (21): 1349-55.
157. Pankuweit S., Hufnagel G., Eckhardt H., *et al.* 1998. [Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation]. *Med Klin (Munich)* 93 (4): 223-8.
158. Pauschinger M., Bowles N.E., Fuentes-Garcia F.J., *et al.* 1999. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 99 (10): 1348-54.
159. Pfeffer M.A., McMurray J.J., Velazquez E.J., *et al.* 2003. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 349 (20): 1893-906.
160. Ping P., Anzai T., Gao M., *et al.* 1997. Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *Am J Physiol* 273 (2 Pt 2): H707-17.
161. Pippig S., Andexinger S., Lohse M.J. 1995. Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* 47 (4): 666-76.
162. Pitt B., Poole-Wilson P.A., Segal R., *et al.* 2000. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial-the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 355 (9215): 1582-7.
163. Pitt B., Remme W., Zannad F., *et al.* 2003. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348 (14): 1309-21.
164. Post S.R., Hammond H.K., Insel P.A. 1999. Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 343-60.
165. Rakar S., Sinagra G., Di Lenarda A., *et al.* 1997. Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The Heart Muscle Disease Study Group. *Eur Heart J* 18 (1): 117-23.
166. Ramires F.J., Mansur A., Coelho O., *et al.* 2000. Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 85 (10): 1207-11.

167. Richardson P., McKenna W., Bristow M., *et al.* 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93 (5): 841-2.
168. Rockman H.A., Choi D.J., Rahman N.U., *et al.* 1996. Receptor-specific in vivo desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (18): 9954-9.
169. Rose N.R., Beisel K.W., Hershkowitz A., *et al.* 1987. Cardiac myosin and autoimmune myocarditis. *Ciba Found Symp* 129: 3-24.
170. Rose N.R., Bona C. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14 (9): 426-30.
171. Savarese T.M., Fraser C.M. 1992. In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 283 ( Pt 1): 1-19.
172. Scholz D., Diener W., Schaper J. 1994. Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy. *Cardioscience* 5 (2): 127-38.
173. Schultheiss H.P. 1989. The significance of autoantibodies against the ADP/ATP carrier for the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy--clinical and experimental data. *Springer Semin Immunopathol* 11 (1): 15-30.
174. Schulze K., Becker B.F., Schauer R., *et al.* 1990. Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function. *Circulation* 81 (3): 959-69.
175. Sigmund M., Jakob H., Becker H., *et al.* 1996. Effects of metoprolol on myocardial beta-adrenoceptors and Gi alpha-proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 51 (2): 127-32.
176. Staudt A., Schaper F., Stangl V., *et al.* 2001. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 103 (22): 2681-6.
177. Störk S., Boivin V., Horf R., *et al.* 2006. Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J* 152 (4): 697-704.
178. Strickberger S.A., Hummel J.D., Bartlett T.G., *et al.* 2003. Amiodarone versus implantable cardioverter-defibrillator: randomized trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy and asymptomatic nonsustained ventricular tachycardia - AMIOVIRT. *J Am Coll Cardiol* 41 (10): 1707-12.

179. Sugrue D.D., Rodeheffer R.J., Codd M.B., *et al.* 1992. The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study. *Ann Intern Med* 117 (2): 117-23.
180. Tate K., Magnusson Y., Viguier M., *et al.* 1994. Epitope analysis of T- and B-cell response against the human beta 1-adrenoceptor. *Biochimie* 76 (2): 159-64.
181. Torre-Amione G., Kapadia S., Benedict C., *et al.* 1996. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 27 (5): 1201-6.
182. Torretti J. 1982. Sympathetic control of renin release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22: 167-92.
183. Towbin J.A., Hejtmancik J.F., Brink P., *et al.* 1993. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 87 (6): 1854-65.
184. Tsubata S., Bowles K.R., Vatta M., *et al.* 2000. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 106 (5): 655-62.
185. Ungerer M., Parruti G., Bohm M., *et al.* 1994. Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 74 (2): 206-13.
186. Vauquelin G., Bottari S., Kanarek L., *et al.* 1979. Evidence for essential disulfide bonds in beta1-adrenergic receptors of turkey erythrocyte membranes. Inactivation by dithiothreitol. *J Biol Chem* 254 (11): 4462-9.
187. von Zastrow M., Kobilka B.K. 1992. Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* 267 (5): 3530-8.
188. Wallukat G., Muller J., Hetzer R. 2002. Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 347 (22): 1806.
189. Wallukat G., Wollenberger A. 1987. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta* 46 (8-9): S634-9.
190. Wallukat G., Wollenberger A., Morwinski R., *et al.* 1995. 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* 27 (1): 397-406.

191. Wolff P.G., Kuhl U., Schultheiss H.P. 1989. Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Am Heart J* 117 (6): 1303-9.
192. Woodiwiss A.J., Tsoetsi O.J., Sprott S., *et al.* 2001. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 103 (1): 155-60.
193. Xiao R.P., Cheng H., Zhou Y.Y., *et al.* 1999. Recent advances in cardiac beta 2-adrenergic signal transduction. *Circ Res* 85 (11): 1092-100.
194. Xiao R.P., Ji X., Lakatta E.G. 1995. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47 (2): 322-9.
195. Xiao R.P., Lakatta E.G. 1993. Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> current in single rat ventricular cells. *Circ Res* 73 (2): 286-300.
196. Yan S.M., Finato N., Di Loreto C., *et al.* 1999. Nuclear size of myocardial cells in end-stage cardiomyopathies. *Anal Quant Cytol Histol* 21 (2): 174-80.
197. Yates J.C., Beamish R.E., Dhalla N.S. 1981. Ventricular dysfunction and necrosis produced by adrenochrome metabolite of epinephrine: relation to pathogenesis of catecholamine cardiomyopathy. *Am Heart J* 102 (2): 210-21.
198. Yu S.S., Lefkowitz R.J., Hausdorff W.P. 1993. Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem* 268 (1): 337-41.
199. Zhang J., Barak L.S., Anborgh P.H., *et al.* 1999. Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 274 (16): 10999-1006.
200. Zhou Y.Y., Cheng H., Bogdanov K.Y., *et al.* 1997. Localized cAMP-dependent signaling mediates beta 2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Am J Physiol* 273 (3 Pt 2): H1611-8.

## LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten**

Name	Sven Triebel
Geburtsdatum	27.12.1975
Geburtsort	Erfurt
Eltern:	Christine Triebel, geb. Kaul; Beruf: Lehrerin Wolfgang Triebel; Beruf: Dipl.-Ing. für Maschinenbau
Konfession	evangelisch
Familienstand	verheiratet
Ehefrau	Katharina Triebel, geb. Zirker; Beruf: Lehrerin

### **Schul Ausbildung**

1982-1984	Grundschule Untergruppenbach
1984-1986	Grundschule Langenbrettach
1986-1992	Realschule Öhringen Abschluss: Mittlere Reife
1992-1995	Technisches Gymnasium Öhringen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst**

7/1995-7/1996	Pflegedienst in der Inneren Abteilung des Krankenhauses Öhringen
---------------	---------------------------------------------------------------------

### **Hochschulausbildung**

10/1996-7/1998	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
10/1998-7/2002	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
9/1998	Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
3/2000	Ablegen des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
seit 2000	Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg
9/2002	Ablegen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
10/2002-9/2003	Praktisches Jahr mit Innere Medizin und Wahlfach Frauenheilkunde an der Uniklinik der Universität Würzburg, Tertial Chirurgie im Kontonsspital Winterthur, Schweiz.
11/2003	Ablegen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

## **Berufliche Entwicklung**

- 2/2004 -11/2004      Arzt im Praktikum bzw. seit 10/2004 Assistenzarzt in der  
Abteilung für Innere Medizin des Diakoniekrankenhauses  
Schwäbisch Hall
- 12/2004 - 3/2008      Assistenzarzt in der Frauenklinik des Diakoniekrankenhauses  
Schwäbisch Hall
- seit 4/2008              Assistenzarzt in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe  
des Klinikums am Plattenwald in Bad Friedrichshall

## DANKSAGUNGEN

Mein tief verbundener Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Roland Jahns für die Überlassung des Themas. Ohne seine konstruktive Kritik und seine Beständigkeit auf dem nicht immer ganz einfachen Weg wäre die vorliegende Arbeit nicht zu realisieren gewesen. Ferner verdanke ich ihm eines der wesentlichen Elemente der täglichen ärztlichen Tätigkeit: den klinischen Blick!

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meiner labortechnischen Mentorin Frau Dr. Valerie Jahns. Durch ihre Geduld und Unterstützung wurde die praktische Umsetzung wissenschaftlichen Denkens erst möglich.

Bei Professor Dr. Lohse und den gesamten Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie bedanke ich mich für die stete Unterstützung bei der Lösung der vielfältigsten fachlichen Fragestellungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Biopsielabors des Pathologischen Instituts für die stets freundliche und fachkundige Hilfe auf dem Gebiet der histologischen Färbetechniken.

Für die Bereitstellung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vibratoms bedanke mich bei Professor Dr. R. Martini und seinem Team der Neurologischen Klinik.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern als auch meiner Ehefrau Katharina für ihre kontinuierliche mentale Unterstützung als auch ihren mutig-geduldig langen „Atem“ auf dem Weg zur Promotion. Dieser wäre ohne Euer unersetzliches Vertrauen nicht zu bewältigen gewesen.

Ich danke Herrn Professor Dr. M. J. Lohse für die Übernahme des Koreferats.