

Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
in Kooperation mit dem Deutschen Herzzentrum München



## Bedeutung der klonalen Hämatopoese bei Koronarer Herzerkrankung

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Juliane Frey, geb. Kaiser

aus Saarlouis

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

**Erster Gutachter:** Prof. Dr. med. Matthias Graw

**Zweiter Gutachter:** Prof. Dr. med. Heribert Schunkert

**Dritter Gutachter:** Prof. Dr. med. Stefan Brunner

**Weitere Gutachter:**

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:** Dr. med. Moritz von Scheidt

**Dekan:** Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Tag der mündlichen Prüfung:** 19.04.2021

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Zusammenfassung.....	5
Abstract (English) .....	6
Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
1. Einleitung.....	11
2. Fragestellung und Zielsetzung.....	12
3. Grundlagen.....	13
3.1 Die klonale Hämatopoese .....	13
3.1.1 Definition und Ätiologie.....	13
3.1.2 Genetik der CHIP-Mutationen.....	14
3.2 Die Koronare Herzkrankheit.....	15
3.2.1 Definition und Ätiologie.....	15
3.2.2 Pathogenese der Koronaren Herzkrankheit .....	15
4. Material und Methoden .....	17
4.1 Materialien.....	17
4.1.1 Verwendete Schutzkleidung bei der Probenentnahme .....	17
4.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	18
4.1.3 Verwendete Geräte .....	19
4.1.4 Verwendete Puffer.....	19
4.1.5 Verwendete Chemikalien .....	20
4.1.6 Patientenkollektiv für die Probenentnahme .....	21
4.2 Methoden .....	22
4.2.1 Probenentnahme am Institut für Rechtsmedizin.....	22
4.2.2 Verarbeitung der Proben am Institut für Rechtsmedizin .....	28
4.2.3 Lagerung und Transfer der Proben.....	30
4.2.4 Histologische Aufbereitung der Formalin Proben .....	31
4.2.5 Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung .....	33
4.2.6 Elastica van Gieson (EvG) Färbung.....	34
4.2.7 DNA Extraktion aus Blut und Frischgewebe .....	35
4.2.8 Probenaufbereitung und DNA Extraktion.....	36
4.2.9 Sequenzierung.....	38
4.2.10 Statistische Auswertung.....	38
5. Ergebnisse.....	39

5.1 Charakteristiken der Gesamtkohorte.....	39
5.2 Ergebnisse der Sequenzierung.....	40
5.2.1 Mutationen im Gen DNMT3A .....	42
5.2.2. Mutationen im Gen ASXL1 .....	43
5.2.3 Mutationen im Gen SMC3 .....	44
5.3 Histologische Charakterisierung der Kohorte.....	45
6. Diskussion.....	47
7. Ausblick.....	51
Literaturverzeichnis .....	52
Danksagung .....	54
Affidavit.....	55

## Zusammenfassung

Bei der klonale Hämatopoese von unbekanntem Potential (CHIP) treten in den blutbildenden Stammzellen des Knochenmarks somatische (erworbene) Mutationen auf, welche anschließend in den Blutkreislauf gelangen. CHIP ist mit dem Alterungsprozess assoziiert. In der Gruppe der über 70-jährigen sind bereits bei mehr als 10% der Individuen CHIP-Mutationen nachweisbar (1). In großen klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Träger von CHIP-Mutationen ein deutlich höheres Risiko für das Auftreten von koronarer Herzkrankheit (KHK), Herzinfarkt, Schlaganfall und Tod haben (1, 2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung CHIP dabei auf die KHK hat. Hierfür wurden von insgesamt 217 Individuen in strukturierter Weise kardiovaskulär relevante Proben gewonnen (u.a. definierte Abschnitte aus Koronararterien, Herzmuskel sowie Blut und Plasma). Um festzustellen, ob bei ausgewählten Individuen (n=17) mit mittleren bis starken atherosklerotischen Gefäßveränderungen, CHIP mutierte Zellen im peripheren Blut vorliegen, wurde zunächst eine tiefe Sequenzierung auf DNA-Ebene durchgeführt. Als Referenz für die Sequenzierung stand ein bereits etabliertes, 56 Gene umfassendes Panel (Illumina TruSeq Custom Amplicon (3)) zur Verfügung.

Hierbei konnten bei vier Individuen insgesamt fünf CHIP-Mutationen im Blut nachgewiesen werden. Zudem konnten die korrespondierenden CHIP-Mutationen in den Genen DNMT3A, ASXL1 und SMC3 auch im proximalen Teils des atherosklerotisch veränderten *Ramus interventricularis anterior* auf DNA-Ebene nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CHIP mutierte, hämatopoetische Zellen im Menschen in der Lage sind aus dem Knochenmark über den Blutkreislauf in atherosklerotische Läsionen der Koronararterien, einzuwandern und die Atherogenese somit zu beeinflussen.

Weitere Studien sollen künftig die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die durch spezifische Mutationen zum Progress kardiovaskulärer Krankheiten beitragen, untersuchen und charakterisieren. Ebenso gilt es noch zu verstehen, welche spezifischen, für Herz-Kreislaufferkrankungen-relevante Signalwege für die Entwicklung von Medikamenten für CHIP-Mutationsträger mit KHK eine Rolle spielen (4).

## Abstract (English)

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is defined as an over-representation of somatic mutations in hematopoietic bone marrow stem cells, which get into the blood circulation. CHIP emerges during the ageing progress. In the group of people, older than 70 years, more than 10% of CHIP-mutations have been found (1). Large studies have already shown, that carriers of CHIP-mutation have a significantly higher risk of the appearance of CAD, heart attack, stroke and cardiovascular caused death.

In this study, the impact of CHIP on coronary artery disease (CAD) was analyzed. For this, cardiovascular relevant tissue from overall 217 individuals was collected (among others defined regions of the coronary artery tree, heart muscle as well as whole blood and plasma). In order to find out if the selected individuals (n=17) are carriers of CHIP-mutated cells in the peripheral blood, a deep targeted amplicon sequencing was carried out. As a reference for the sequencing, an already established panel (Illumina TruSeq Custom Amplicon (3)), covering 56 genes was used.

As a result, five CHIP-mutations in four individuals could be detected. Also, corresponding CHIP-mutations in the genes DNMT3A, ASXL1 and SMC3 have been found in the lesion of the proximal part of the left anterior descending artery.

This is the first study proving that human CHIP mutated hematopoietic cells have the ability to invade from the bone marrow via the peripheral blood into atherosclerotic lesions in coronary arteries and might locally stimulate atherosclerosis progression.

Further studies will be necessary to examine and characterize the underlying molecular pathways which contribute to cardiovascular diseases. It is also necessary to understand which cardiovascular relevant pathways are targetable for drug development to treat carriers of CHIP mutations with cardiovascular disease (4).

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung CHIP mutierter Zellen im Knochenmark .....	13
Abbildung 2: Atheroprogession in einer Herzkranzarterie .....	16
Abbildung 3: Entnahme-Dokument.....	23
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schnittführung an der A. carotis. ....	26
Abbildung 5: Mit Formalin und PBS/DMSO gefüllten Röhren in Karton-Box.....	28
Abbildung 6: Gewebeprobe in Formalin (4%).....	30
Abbildung 7: Plasma- und Vollblutproben.....	30
Abbildung 8: Gewebeprobe in PBS/DMSO (10%).....	30
Abbildung 9: Atherosklerotische Veränderungen im proximalen Bereich des RIVA.....	36
Abbildung 10: Histologie einer fortgeschrittenen Läsion der K6.....	45
Abbildung 11: Schematische Übersicht der Sequenzierungsergebnisse.....	47
Abbildung 12: Histologischer Schnitt im Bereich der Aortenwurzel bei TET2 WT und KO Mäusen .....	49
Abbildung 13: Wirkung von Canakinumab auf hsCRP (A) und LDL-Cholesterin (B) .....	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Schutzkleidung bei der Probenentnahme .....	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 4: Verwendete Puffer .....	19
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien .....	20
Tabelle 6: Beispielhafter Auszug aus der Excel-Datenbank .....	24
Tabelle 7: Abschnitte der entnommenen Koronararterienregion.....	25
Tabelle 8: Genpanel für die tiefe DNA-Sequenzierung .....	37
Tabelle 9: Alter der CHIP-Mutationsträger.....	40
Tabelle 10: Zusammenfassende Daten der vier CHIP-Mutationsträger .....	41
Tabelle 11: Mutationen in den Genen DNMT3A, ASXL1 und SMC3 .....	41
Tabelle 12: VAF (in %) der CHIP-Mutationen im Gen DNMT3A.....	42
Tabelle 13: VAF (in %) der CHIP-Mutation im Gen ASXL1.....	43
Tabelle 14: VAF (in %) der CHIP-Mutation im Gen SMC3.....	44



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
%	Prozent	<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
χ	Chi	<b>DNMT3A</b>	DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3A
μl	Mikroliter	<b>Dr.</b>	Doktor
μm	Mikrometer	<b>DZHK</b>	Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschungen e.V
<b>A.</b>	Arterie	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>ACS</b>	Akutes Koronarsyndrom	<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i> )
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome	<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>AML</b>	Akute myeloische Leukämie	<b>EvG</b>	Elastica-van-Gieson
<b>AP</b>	Angina Pectoris	<b>FFPE</b>	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
<b>ASXL1</b>	additional sex combs-like transcriptional regulator 1	<b>g</b>	Gramm
<b>BCL</b>	Binary Base Call	<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>BMI</b>	Body-Mass-Index	<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>HM</b>	Herzmuskel
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>HS</b>	High sensitivity
<b>ca.</b>	circa	<b>hsCRP</b>	High-sensitivity C-reactive protein
<b>CAD</b>	Coronary artery disease	<b>HTX</b>	Hämatoxylin
<b>CHIP</b>	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential	<b>K</b>	Koronararterie
<b>CL</b>	Linke Karotide	<b>KB</b>	Kühlbeginn
<b>cm</b>	Centimeter	<b>kg</b>	Kilogramm
<b>CMML</b>	Chronische Myelomonozytäre Leukämie	<b>KHK</b>	Koronare Herzerkrankung
<b>CR</b>	Rechte Karotide	<b>L</b>	Leber
<b>d.h.</b>	das heißt	<b>LAD</b>	Left anterior descending artery

<b>LCA</b>	Left coronary artery	<b>PMI</b>	Postmortales Intervall
<b>LCX</b>	Left circumflex artery	<b>Prof.</b>	Professor
<b>LMU</b>	Ludwig-Maximilians-Universität München	<b>RCA</b>	Right coronary artery
<b>LV</b>	Linker Ventrikel	<b>RIVA</b>	Ramus interventricularis anterior
<b>M.</b>	Musculus	<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>MDS</b>	Myelodysplastisches Syndrom	<b>SF</b>	Subkutanes Fettgewebe
<b>med.</b>	Medizin	<b>SM</b>	Skelettmuskel
<b>mm</b>	Millimeter	<b>SMC3</b>	Structural maintenance of chromosomes 3
<b>MLL</b>	Münchener Leukämielabor	<b>TET2</b>	Tet methylcytosine dioxygenase 2
<b>MPN</b>	Myeloproliferative Neoplasie	<b>Seq.</b>	Sequenzierung
<b>Nr.</b>	Nummer	<b>UMI</b>	Unique molecular identifier
<b>P</b>	Plasma	<b>VAF</b>	Variant allele frequency
<b>p</b>	Signifikanzwert	<b>VF</b>	Viszerales Fettgewebe
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung	<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>PhiX</b>	Enterobakteriophage PhiX	<b>z.B.</b>	zum Beispiel

# 1. Einleitung

Aktuelle Studien haben erstmals das unbestimmte Potential der klonalen Hämatopoese (CHIP – clonal hematopoiesis of indeterminate potential) im Hinblick auf die Atherogenese beschrieben. Vereinfacht kann CHIP als eine Frühform einer akuten myeloischen Leukämie (AML) betrachtet werden. Mit zunehmenden Alter steigt das Risiko von erworbenen (somatischen) Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, die im Weiteren eine klonale Dominanz bei der Blutbildung bedingen (1). Diese, im peripheren Blut nachgewiesenen CHIP-Mutationen konnten in Zusammenhang mit unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, thromboembolische Ereignisse und ischämisch bedingte Herzinsuffizienz gebracht werden (5). Darüber hinaus haben diese selektiv expandierten, CHIP-mutierten, aus dem Knochenmark migrierten Leukozyten einen deutlichen Einfluss auf die kardiovaskuläre Mortalität gezeigt (3).

Basierend auf den oben genannten Erkenntnissen, sollen in weiterführenden Studien betroffene Stoffwechselwege identifiziert werden, die von CHIP-Mutationen potentiell betroffen sind. Insbesondere epigenetisch regulierende Signalwege, die vor allem Veränderungen in der DNA- und Histon-Methylierung betreffen, sowie bisher unbekannt Mutationen spielen hier im Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine große Rolle (6).

CHIP-Mutationen in epigenetischen Regulatorgenen wie z.B. DNMT3A, ASXL1 und TET2 konnten bei Menschen mit kardiovaskulären Erkrankungen bislang lediglich im Knochenmark und Blut nachgewiesen werden, nicht jedoch in atherosklerotisch veränderten Koronararterien oder anderen Endorganen (2). Zu Grunde liegende Mechanismen der einzelnen CHIP-mutierten Gene und ihr Beitrag zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen sind bislang nur in Ansätzen verstanden (7). Im Gegensatz zu etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wird CHIP erst seit kurzem als eigenständiger Risikofaktor wahrgenommen und wird in der personalisierten Medizin der Zukunft von Bedeutung sein (8). Ein großes Ziel der personalisierten Medizin ist daher die Identifikation und weiterführende Charakterisierung der CHIP zugrundeliegenden Mechanismen. Diese sollen als Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien dienen (9).

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob CHIP-mutierte Zellen, ausschließlich einen systemischen Effekt bedingen, oder auch das Potential haben, lokal Einfluss auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zu nehmen. Es soll daher verstanden werden,

- 1.) ob CHIP-mutierte Zellen in der Lage sind aus dem Knochenmark über die Blutbahn in kardiovaskulär relevante Gewebe (Koronararterien, Herzmuskel, Skelettmuskel) einzuwandern.
- 2.) welche Gene von einer CHIP-Mutation betroffen sind (basierend auf einem vordefinierten Panel von 56 Genen) (3)
- 3.) wie groß die quantitativen Unterschiede der CHIP-Mutation zwischen peripherem Blut und betroffenen Geweben sind (gemessen an der Variant Allele Frequency (VAF)) und wie stark diese potentiell die Atherogenese lokal begünstigen.

Diese Ergebnisse sollen künftig helfen personalisierte Behandlungen zur spezifischen Reduktion der klonalen Last und relevanter inflammatorischer Pathways zu etablieren, die mit CHIP-bedingter Progression von kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang stehen.

Zudem sollen diese Erkenntnisse als Grundlage für prospektive Untersuchungen dienen. Diese werden sich dann spezifisch mit genetischen und epigenetischen Veränderungen in atherosklerotisch relevanten, epigenetisch regulierenden Stoffwechselwegen und mit detaillierten Charakterisierungen betroffener Gewebe u.a. mittels Histologie, Immunhistochemie und Single-Cell-Sequenzierung beschäftigen.

## 3. Grundlagen

### 3.1 Die klonale Hämatopoese

#### 3.1.1 Definition und Ätiologie

Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial (CHIP) ist definiert als die positive Selektion bestimmter somatischer Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark bei Personen ohne weitere hämatologische Anomalien (10), bei denen jedoch diese Mutationen in Genen, die mit hämatologischen Malignitäten in Verbindung gebracht werden, mit einer VAF von  $>2\%$  vorhanden sind (11). Diese klonal expandierten CHIP-mutierenden Zellen werden aus dem Knochenmark in die Blutbahn (Abb. 1) abgegeben.

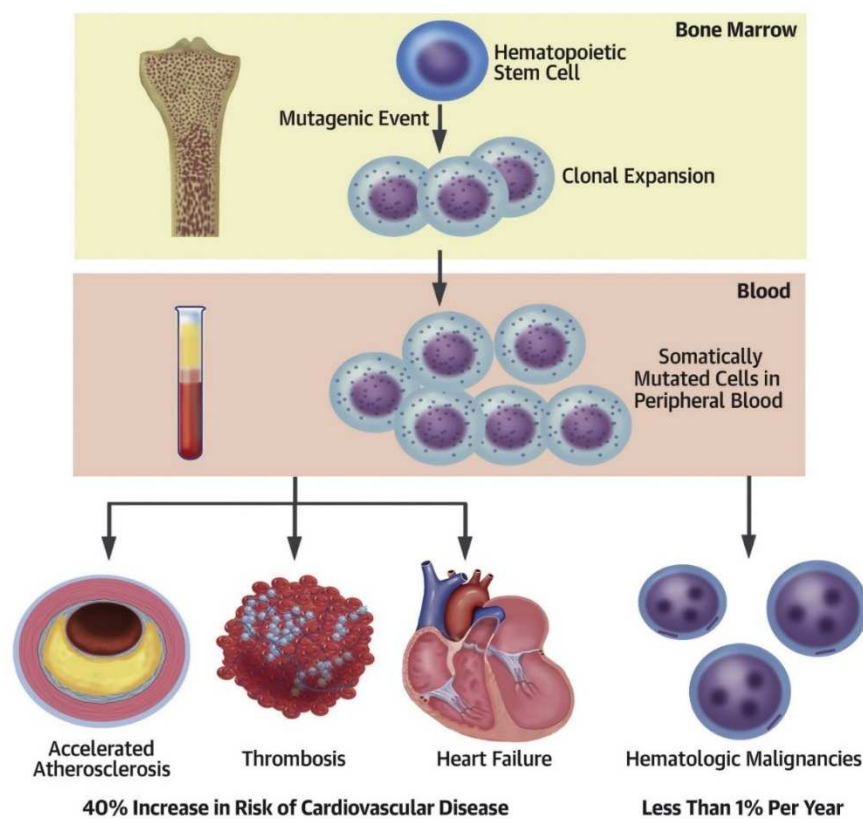


Abbildung 1: Entstehung CHIP mutierter Zellen im Knochenmark

In hämatopoetischen Vorläuferzellen (Stammzellen) im Knochenmark, kommt es zu einer somatischen Mutation in einem epigenetischen Regulatorgen (CHIP Mutation). Diese Mutation begünstigt in betroffenen Zellen eine klonale Expansion. CHIP mutierte Zellen werden anschließend in den Blutkreislauf abgegeben. Dies begünstigt die Entstehung und das Voranschreiten von Atherosklerose, Thrombosen, ischämisch bedingtes Herzversagen, sowie das Auftreten maligner Bluterkrankungen (z.B. Leukämie) (9).

Das Auftreten von CHIP ist stark mit dem Altern assoziiert (1). Dabei spielen zwei Phänomene eine potentielle Rolle. Während des Alterungsprozess durchlaufen hämatopoetische Stammzellen zunehmende Replikationszyklen. Bei jeder Replikation können potenziell somatische Mutationen auftreten, die nicht durch zell-eigene Reparaturmechanismen repariert werden können. Die dabei altersabhängig ansteigende Mutationsfrequenz konnte eindrücklich mittels DNA-Sequenzierung von hämatopoetischen Stammzellen gesunder Probanden gezeigt werden (12). Während hier bei Neugeborenen maximal eine Mutation pro Stammzelle nachweisbar war, zeigten sich vier bis sieben Mutationen bei 40- bis 50-Jährigen und acht bis zwölf Mutationen je Stammzelle in der Altersgruppe der 70- bis 80-Jährigen. Das Auftreten solcher Mutationen in den für die Hämatopoese wichtigen Genen, kann zu einer klonalen Expansion der betroffenen Stammzelle führen. Zudem kann eine Erschöpfung der Stammzellen, beispielsweise durch Telomerverlust und Apoptose, zu einer Verminderung der Diversität und Konkurrenz der verschiedenen Stammzellen führen, sodass sich im Alter Stammzellen mit auch nur geringem Wachstumsvorteil gegenüber anderen Stammzellen durchsetzen können (13).

### 3.1.2 Genetik der CHIP-Mutationen

Die Mehrheit der CHIP-Mutationen betrifft die epigenetischen Regulatoren DNMT3A und TET2, welche in der DNA-Methylierung verschiedener Gene eine wichtige Rolle spielen (14). Bei mehreren erworbenen Blutkrebsarten, vor allem aber bei Erwachsenen mit AML, wurden somatische Mutationen in DNMT3A nachgewiesen. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass DNMT3A-Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen zu einem präleukämischen Zustand führen und sich im Rahmen weiterer Mutationen, zur akuten Leukämie entwickeln. Das Zeitintervall vom ersten Auftreten der Mutation bis zur Krankheit ist jedoch variabel (15).

TET2 spielt eine Schlüsselrolle bei der DNA-Methylierung, wodurch es als Tumorsuppressor agiert und eine geregelte Hämatopoese ermöglicht. Insbesondere das TET-Genprodukt unterdrückt die Transkription inflammatorischer Moleküle, wie z.B. Interleukin-6 und Interleukin-8, welche als Atherogenese-Mediatoren bekannt sind (16). Dies erklärt, warum somatische Mutationen mit Funktionsverlust von TET2 mit einer erhöhten Entzündungsneigung verbunden sind. In ähnlicher Weise können auch die Mutationen der DNA Methytransferase DNMT3A beschrieben werden, die das Risiko der Entstehung von Atherosklerose und kardiovaskulären Krankheiten erhöhen (17). Auch Mutationen in dem epigenetische Regulatorgen ASXL1 erhöht dieses Risiko (18). ASXL1 ist ein Chromatinbindendes Protein, das ebenfalls als Tumorsuppressor gilt und an der Aufrechterhaltung einer geregelten Hämatopoese beteiligt ist. Somatische Mutationen dieses Gens werden bei einer Vielzahl der Patienten mit myeloischen Malignitäten, wie z.B. der akuten myeloischen Leukämie (AML), der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML), dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) und dem myeloproliferativem Neoplasma (MPN), gefunden (19).

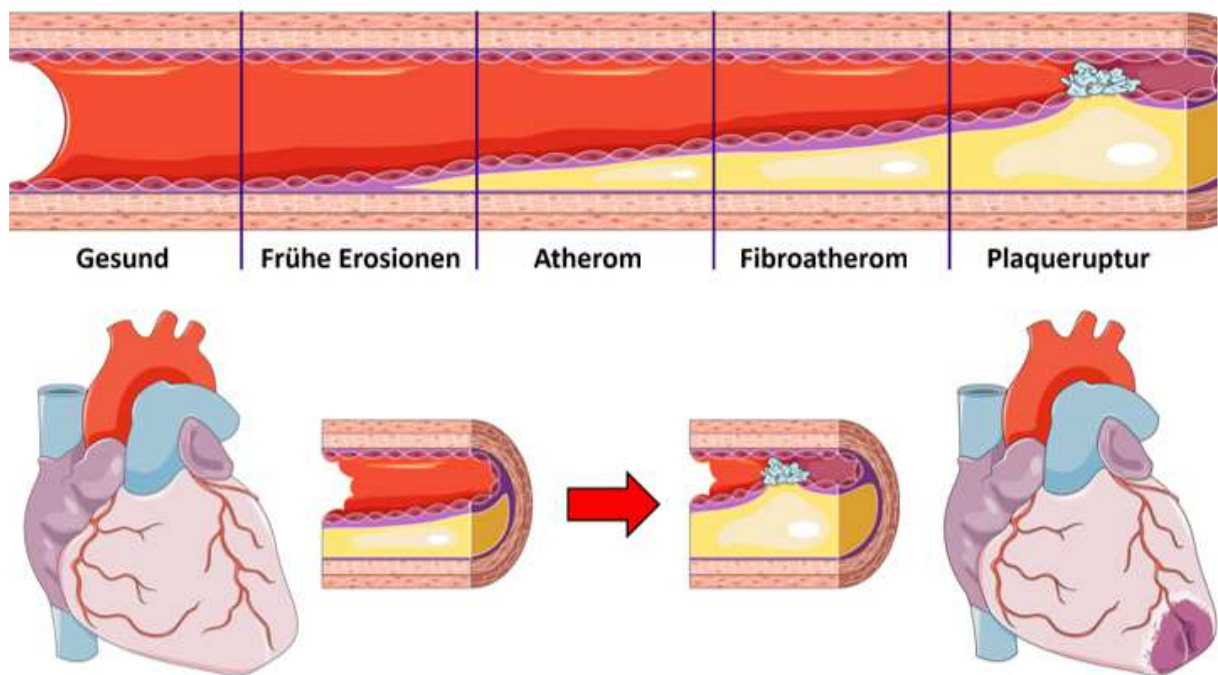
## 3.2 Die Koronare Herzkrankheit

### 3.2.1 Definition und Ätiologie

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) entspricht der Manifestation von Atherosklerose in den Koronararterien. Pathophysiologisch führt die Verengung des Lumens zu einer Minderperfusion des Myokards und damit zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf der Kardiomyozyten. Klinisch ist eine Einteilung in asymptomatische- und symptomatische KHK üblich. Zur letzteren zählen die stabile Angina Pectoris (AP) und das akute Koronarsyndrom (ACS). Das ACS wiederum wird unterteilt in die instabile AP ohne Anstieg des Herzmuskelenzyms Troponin, den Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) mit Troponinanstieg und den ST-Streckenhebungsinfarkt ebenfalls mit Troponinanstieg und persistierenden ST-Streckenhebungen im Elektrokardiogramm (EKG) (20).

### 3.2.2. Pathogenese der Koronaren Herzkrankheit

Die Pathogenese der KHK ist wesentlich definiert durch Entstehung und Voranschreiten einer atheromatösen Plaquebildung in den Herzkranzgefäßen (Abb. 2). Dies ist ein hochkomplexer, aktiver Prozess, der wesentlich auf einer inflammatorischen Reaktion der Gefäßwand beruht. In der Frühphase, dem Stadium der endothelialen Dysfunktion, kommt es, vermittelt durch Adhäsionsmoleküle, zum Anhaften von Blutmonozyten, die im Verlauf in den subintimalen Raum migrieren und in Monozyten/Makrophagen transformieren. Durch Lipidaufnahme entstehen die atheromatöse Läsionen charakterisierenden Schaumzellen. Durch lokale Wachstumsfaktoren wird die Myozytenproliferation gefördert. Bei geringem Fettgehalt dominieren fibrotische Anteile, sodass das Atherom einer stabilen Läsion entspricht. Der Fettanteil und die inflammatorische Potenz bestimmen die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung in Richtung eines instabilen Plaques. Fissuren und Rupturen kennzeichnen komplizierte Läsionen mit Risiko für Thrombogenese und Gefäßverschluss binnen kürzester Zeit. Ausdruck der inflammatorischen Reaktion ist die Präsenz spezifischer Biomarker, wie z.B. Interleukin-6, und klinisch etablierter Entzündungsmarker, wie z.B. CRP als Akute-Phase-Proteine (21).



*Abbildung 2: Atheroprogression in einer Herzkranzarterie*

Die unterschiedlichen Stadien der Atherosklerose sind von einem gesunden Gefäß bis hin zur Plaqueruptur (türkis) von links nach rechts vereinfacht dargestellt (oben). Atherosklerosegrad 0 = Gesund, Grad I = Atherom, Grad II = Fibroatherom, Grad III = Plaqueruptur. Bei fortgeschrittenen Plaques ist die Durchblutung des Herzmuskels meist noch gewährleistet. Kommt es jedoch zur Plaqueruptur sind alle anschließenden Gefäßabschnitte verlegt und der Herzmuskel in diesem Areal stirbt ab. Der Patient erleidet einen akuten Herzinfarkt (unten) (22).



## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Verwendete Schutzkleidung bei der Probenentnahme

*Tabelle 1: Verwendete Schutzkleidung bei der Probenentnahme*

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
FFP2 Atemschutzmasken	DACH (Rastatt, Deutschland)
Handschuhe Nitril	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Hose und Kasack-Oberteil	
Plastik Schürze	

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Chirurgische Pinzette	GeVuMED (Rietheim, Deutschland)
Chirurgische Schere	GeVuMED (Rietheim, Deutschland)
Deckgläser	VWR (Darmstadt, Deutschland)
EDTA- und Serumröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Färbewannen (Glas) mit Einsatz	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Karton Boxen (10x10 Kompartimente)	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Laminiertes Entnahme-Dokument	Eigenherstellung
Mikrotom Klingen	Feather (Osaka, Japan)
Nunc Tubes	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Pasteurpipetten	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen 0,1 – 1000 µl	Brand (Wertheim, Deutschland)
Plastik Boxen (10x10 Kompartimente)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Skalpell	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Superfrost® Glasobjektträger 24x50mm	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Wasserfester Filzstift	STAEDTLER (Nürnberg, Deutschland)

### 4.1.3 Verwendete Geräte

Tabella 3: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Gewebeeinbettautomaten, Seriennummer 23418	ThermoScientific (Waltham, USA)
Kühlplatte	Medite (Burgdorf, Deutschland)
Lichtmikroskop Olympus BX41	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Maxwell RSC 48	Promega (Madison, USA)
Mikroliter-Pipetten	BRAND (Wertheim, Deutschland)
Mikrotom	MICROM International (Walldorf, Deutschland)
Paraffin Ausgießstation	MICROM International (Walldorf, Deutschland)
Qubit 3.0 Fluorometer	ThermoScientific (Waltham, USA)
Rotor	Kisker Biotech (Steinfurt, Deutschland)
Streckbad	Medite (Burgdorf, Deutschland)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Wärmeplatte 40°C	Medite (Burgdorf, Deutschland)
Mikrozentrifuge	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

### 4.1.4 Verwendete Puffer

Tabella 4: Verwendete Puffer

Name	Zusammensetzung
Phosphat Puffer (PBS)	2,6mM KCl; 138mM NaCl; 10mM HNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P x 2 H <sub>2</sub> O; 1,8mM H <sub>2</sub> KO <sub>4</sub> P; pH 7,4

#### 4.1.5 Verwendete Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
1-Thioglycerol	Promega (Madison, USA)
4% Formaldehyd	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
ddH <sub>2</sub> O (MilliQ)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Entkalker soft	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eosin 1% alkoholisch	Morphisto (Frankfurt am Main, Deutschland)
Ethanol 70% (vergällt)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol 96% (vergällt)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eukitt® Quick hardening mounting medium	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
HTX-Mayer (Hämalaunlösung sauer nach Mayer)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HTX Weigert Stammlösung A	Morphisto (Frankfurt am Main, Deutschland)
HTX Weigert Stammlösung B	Morphisto (Frankfurt am Main, Deutschland)
Isopropanol / 2-Propanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Maxwell Blood DNA Kit	Promega (Madison, USA)
Paraffin Typ 3	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Picrofuchsin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Resorcinfuchsin	Engelbrecht (Edermünde, Deutschland)
Shandon Xylene substitute	Thermo Scientific (Rockland, USA)

#### 4.1.6 Patientenkollektiv für die Probenentnahme

Am Institut für Rechtsmedizin der LMU München werden basierend auf Anordnung der Staatsanwaltschaft München Obduktionen bei verstorbenen Individuen durchgeführt. Bei erfolgter Freigabe durch die Staatsanwaltschaft wird überprüft, ob sich Verstorbene für eine Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung eignen. Diesbezüglich wurden folgende Ausschlusskriterien für eine potenzielle Probenentnahme festgelegt:

1. Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren.
2. Personen mit bekannten Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Hepatitis A/B/C, HIV/AIDS.
3. Verbrannte oder verkohlte Personen.

Das Postmortale Intervall (PMI), d.h. die Zeitspanne zwischen dem vermuteten Todeszeitpunkt, oder bei Unkenntnis des Todeszeitpunkts dem letzten Lebenszeichen, und der Probenentnahme darf maximal 72 Stunden betragen. Im Rahmen der Datenerfassung erfolgte eine Anonymisierung der Probanden.

Das Studienprotokoll wurde von der unabhängigen Ethikkommission der Technischen Universität München geprüft und genehmigt (Zeichen 325/18 S). Das Projekt wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und der internationalen Konferenz zur Harmonisierung GCP-konform durchgeführt.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Probenentnahme am Institut für Rechtsmedizin

Nach sorgfältiger Prüfung der Ausschlusskriterien und nach Freigabe der Leiche durch den Obduzenten, wurde mit der Dateneintragung auf dem laminierten Entnahme-Dokument (Abb. 3) begonnen. Zu Beginn wurde die Probandennummer für den jeweiligen Probandenfall festgelegt.

Im Anschluss wurden aus der Patientenakte Alter und Geschlecht übernommen. Ebenfalls wurde aus dieser Patientenakte der Kühlungsbeginn der Leiche, sofern bekannt, entnommen. Durch die Datenübertragung des letzten Lebenszeichens bzw. Todesdatums und der Uhrzeit des Beginns der Obduktion wurde das post-mortale Intervall (PMI) berechnet und ebenfalls auf dem laminierten Entnahme-Dokument festgehalten. Körpergröße (in cm) und Gewicht (in kg) des jeweiligen Probanden konnte von der Beschriftung auf dessen Oberschenkel übertragen werden. Auch die Angaben von Herzgewicht (in g) und vermuteter Todesursache wurden im Laufe der Obduktion erfasst.

Um Fehler zu minimieren, wurde die Gewebeentnahme nach Möglichkeit bei allen Obduktionen standardisiert in der gleichen Reihenfolge durchgeführt. Die Abfolge entsprach dabei dem Entnahme-Dokument. Die entnommenen Gewebe wurden, gemäß der jeweiligen Spalten, auf dem Dokument platziert (vgl. Abb. 3). In der für Kommentare angelegten Spalte wurden bereits während der Gewebeentnahme der makroskopische Grad der Kalzifizierung in Herzkranzgefäßen und Karotiden, sowie mögliche Probleme oder Anomalien im Prozess vermerkt.

Dabei wurde der Kalzifizierungsgrad der arteriellen Gefäße wie folgt eingestuft:

0 = keine sicht- bzw. tastbare Verkalkung der Gefäße

I = minimale sicht- bzw. tastbare Verkalkung der Gefäße

II = mittlere sicht- bzw. tastbare Verkalkung der Gefäße

III = hohe sicht- bzw. tastbare Verkalkung der Gefäße

Besonderheiten des Gewebes, wie das Vorhandensein von Stents, Bypässen oder eines Thrombus, wurden in der Spalte „Spezial“ auf dem Entnahme-Dokument beschrieben bzw. dokumentiert. Nach der Entnahme von Blut, welches bei der Obduktion, nach dem Herzschnitt ausläuft und anschließen aufgefangen wurde und Abzentrifugation des Plasmas (Model Nr. LC-6, Sarstedt), wurde dieser Vorgang durch einen Haken im jeweiligen Feld des Entnahme-Protokolls dokumentiert. Alle Beschriftungen des Entnahme-Dokuments erfolgten mit einem wasserfesten Filzstift (permanent lumocolor Art. Nr. 313-2, Staedtler). Die erhobenen Daten und Kommentare wurden im Anschluss, in anonymisierter Form, in eine verschlüsselte Excel-Tabelle (Tabelle 6) übernommen.

<b>Proband #</b> <input type="text"/>	<b>Geschlecht/Alter:</b>  <b>Herzgewicht:</b>  <input type="radio"/> LLZ / <input type="radio"/> Sterbezeit:	<b>TU:</b>  <b>Körpergröße/gewicht:</b>  <b>Kühlung ab:</b>	<b>PMI:</b>
Probe	Gewebe		Kommentar
K1	RCA prox		
K3	RCA dist		
K5	LCA		
K6	LAD prox		
K8	LAD dist		
K9	LCX prox		
K11	LCX dist		
CL	Carotide li.		(Entnahme in der Bifurkation: Anteil mit Interna/Externa in DMSO)
CR	Carotide re.		
L	Leber		(linker Lappen, Seg. II/III)
FH	Haut/subcut. FG		(periumbilical – nur DMSO)
F (V)	Viscerales FG		(nur DMSO)
HM	Herzmuskel		(mit Endocard)
SM	Skelettmuskel		(intercostal)
Spezial	Thrombus/Stent/ Bypass o.ä.		

Vollblut (2 Tubes)    Plasma (3 Tubes)

Abbildung 3: Entnahme-Dokument

Das laminierte Entnahme-Dokument dient der Dokumentation von Auffälligkeiten (Spalte 4) des Gewebes und zur Platzierung der Gewebeproben (Spalte 3) vor deren Überführung in DMSO- und Formalin-Röhrchen

Tabelle 6: Beispielhafter Auszug aus der Excel-Datenbank

Es werden, Probandenfall-Nr. (anonymisiert), Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Kühlungsbeginn, Entnahmezeitpunkt, Todesursache, Herzgewicht und der geschätzte makroskopische Atherosklerosegrad der Koronararterien und Karotiden angegeben. Zusätzlich (nicht gezeigt) wurden Spezialentnahmen und nicht entnommene Gefäßabschnitte dokumentiert.

Fall#	Geschlecht	Alter	Größe	Gewicht	Kühlungsbeginn nach	Entnahme nach	Todesursache	Herzgewicht (g)	Ungefähre Einschätzung Sklerosegrad
					max: Letztes Lebenszeichen				°0 keine Veränderungen
					ca: KB nicht exakt bekannt				°I gelbe, weiche Beetbildungen
					unbekannt: keine Infos zur				°II Verkalkungen, beginnende Lumeneinengung
					Kühlung verfügbar				°III aufgebrochene Atherombeete, Thrombosen, hochgradige Stenosen
1	M	66	170	108	unbekannt	52h	DD Herzhypertrophie, DD Intoxikation	648	K1 K8 K11 CR/CL I, K3 K9 II, K5 K6 III
2	M	68	170	99	5h	34h	DD Herzhypertrophie, DD Herzrythmusstörung	562	K5 K6 K9 II, K1 K3 K8 K11 CR/CL I
3	W	85	160	95	max 15h	max 41h	Unklar / DD Intoxikation	545	K1-K11 III, CR/CL II
4	W	75	170	92	5h	26h	Herzbeutelamponade	548	K1 K3 I, K5 K8 K11 II, K6 CR/CL III
5	M	79	182	79	unbekannt	28h	Unklar	507	K3 K5 K8 K9 K11 I, K1 K6 CR/CL II
6	W	67	161	82	unbekannt	23h	V.a cardiale TU / Unterkühlung	479	K1 K3 K6 K9 III, K5 K8 K11 CR/CL II
7	M	66	164	81	unbekannt (Krankenhaus)	16h	KHK	514	K3 K11 I, K1 K5 K8 II, K6 K9 CR/CL III
8	W	89	168	62	15h	36h	Schädelhirntrauma	523	K1-K11 0-I, CR/CL III
9	M	67	179	91	5h	18h	Myokardinfarkt	455	K1 K3 K5 K6 K9 III, K8 CR/CL II
10	W	76	168	74	2h	20h	DD Herzrythmusstörung	433	K1 K5 K6 II, K3 K8 K9 K11 CR/CL I
11	M	87	169	84	7h	24h	Herz-Lungen-Insuffizienz	584	K3 I, K1 K11 II, K5 K6 K8 K9 CR/CL III
12	M	65	181	87	max 26h	max 45h	Myokardinfarkt	632	K11 I, K3 K9 II, K1 K5 K6 K8 CR/CL III
13	M	71	185	141	6h	25h	unklar, V.a cardial	755	K5 K8 I, K1 K3 K6 K9 K11 II, CR/CL III
14	W	74	165	67	4h	60h	Schädelhirntrauma	415	Alles II
15	M	71	174	70	max 14h	max 72h	Schlaganfall	412	k1 K6 II, CR/CL III, Rest I
16	M	80	173	97	unbekannt (Krankenhaus)	57h	V.a cardial	650	K3 K8 K9 K11 II, K1 K5 K6 CR/CL III
17	M	69	173	95	max 16h	max 41h	V.a cardial	527	K8 K11 I, K1 K3 K5 CR/CL II, K6 K9 III



## Probenentnahme der Herzkranzgefäße

Nach Begutachtung und Sektion des Herzens durch den Obduzenten und vor der Gewebeatnahme für die Histologie, wurden sofern am Herzen erkenn- und darstellbar, folgenden Gewebeproben (Tabelle 7) mit einer Länge von ca. 8-10mm, wie auf dem Entnahme-Dokument (Abb. 3) vermerkt, entnommen:

Tabelle 7: Abschnitte der entnommenen Koronararterienregion

K1	RCA prox	Proximaler Teil der rechten Koronararterie
K3	RCA dist	Distaler Teil der rechten Koronararterie
K5	LCA	Hauptstamm der linken Koronararterie
K6	LAD prox	Proximaler Teil des <i>Ramus interventricularis anterior</i> (RIVA)
K8	LAD dist	Distaler Teil des <i>Ramus interventricularis anterior</i> (RIVA)
K9	LCX prox	Proximaler Teil des <i>Ramus circumflexus</i>
K11	LCX dist	Distaler Teil des <i>Ramus circumflexus</i>

## Probenentnahme der Karotiden

Die Entnahme der ca. 16-20mm langen Proben an der linken und rechten Halsschlagader (CL und CR) erfolgte jeweils auf Höhe der Bifurkation der *A. carotis communis* in *A. carotis interna* und *A. carotis externa*, wobei alle drei genannten Teile in der Entnahme enthalten und identifizierbar sein sollen (Abb. 4).

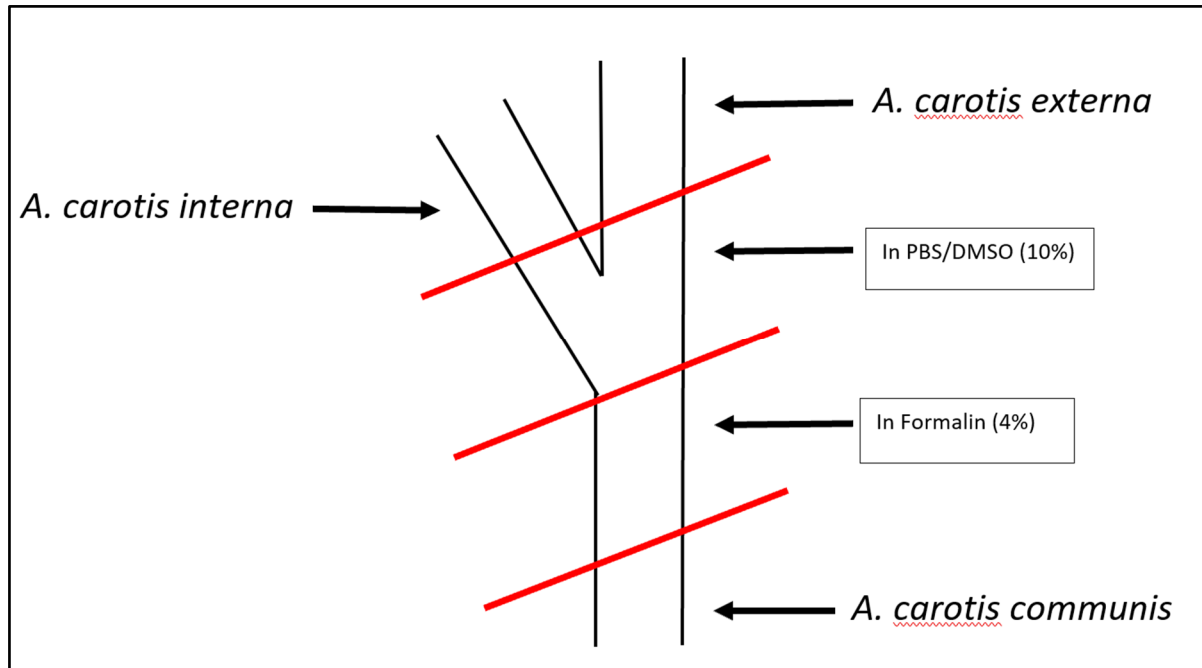


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schnittführung an der *A. carotis*.

An der Bifurkation wird die *A. carotis* in zwei Teile geteilt. Die Schnittebenen sind durch die roten Linien dargestellt. Die Übergänge dienen der Orientierung. Der obere Abschnitt (*A. carotis interna* und *A. carotis externa*) wird in PBS/DMSO (10%) und der untere Abschnitt (*A. carotis communis*) in Formalin (4%) gelagert.

## Probenentnahme der Leber

Hier erfolgte standardmäßig, eine im Durchschnitt ca. 8-10mm große Gewebeerntnahme vom linken Leberlappen (L) im Segment II/III.

## Probenentnahme von Fettgewebe

Bei der Entnahme von viszeralem Fettgewebe (VF) wurde von der linken Herzhälfte ein im Durchmesser ca. 8-10mm großes Gewebestück epikardiales Fett entnommen. Für die Entnahme von subkutanem Fettgewebe (SF) wurde periumbilical ein ca. 8-10mm großes Gewebestück entnommen.

## Probenentnahme von Herz- und Skelettmuskel

Aus der linken Herzhälfte unterhalb der proximalen LAD wurde endokardnah ein ca. 10mm großes Stück Herzmuskel (HM) entnommen. Für die Entnahme des Skelettmuskels (SM) wurde aufgrund der guten Zugänglichkeit während der Obduktion ein ca. 10mm Durchmesser großes Stück des Mm. *intercostales* festgelegt.

## Probenentnahme von additiven kardiovaskulären Proben

Sofern ein Thrombus, Stents oder Bypässe vorhanden waren und von den Obduzenten nicht für die Histologie benötigt wurden, erfolgte die Entnahme des entsprechenden Gewebes. Dies wurde auf dem Entnahmedokument in der Spalte „Spezial“ hinterlegt.

## Die Blutentnahme

Sofern möglich, erfolgte eine Entnahme von Blut, welches bei der Obduktion, nach dem Herzschnitt ausläuft und anschließen aufgefangen wurde. Dieses Blut wurde in ein, mit der Nummer des Probanden beschriftetes, EDTA- bzw. Serumröhrchen gefüllt.

#### 4.2.2 Verarbeitung der Proben am Institut für Rechtsmedizin

Im ersten Schritt wurde ein Teil des EDTA-Bluts für ca. 15 Minuten bei 3380 rpm zentrifugiert. Für einen effizienten Ablauf, wurde zunächst EDTA-Blut zur Plasmagewinnung in die Zentrifuge (Zentrifuge Model Nr. LC-6, Sarstedt) eingebracht. Abschließend erfolgte die Überführung von Vollblut und Plasma mittels Pipette in vorbereitete Röhren mit Druckverschluss (Eppendorf) ohne Stabilisationsmedium. Insgesamt wurden zwei Röhren Vollblut und drei Röhren Plasma bei jedem Probanden gesammelt.

Vor der weiteren Verarbeitung der Gewebeproben, wurden die in Karton Boxen (Abb. 5) einsortierten Röhren, mit je 1ml befüllten Formalin- und PBS/DMSO-Röhren neben dem, mit Gewebeproben belegten Entnahme-Dokument, platziert. Die in den Formalin-Röhren enthaltene 4%-ige Formaldehydlösung stoppt die Autolyse der Gewebeproben und macht diese dauerhaft haltbar. Die mit 1ml PBS/DMSO (10%) befüllten Röhren, verhindern während des Gefriervorgangs die Bildung von Eiskristallen im Gewebe. Diese können das Gewebe potenziell zerstören und zum Zellertergang führen. Um Verwechslungen bei der Befüllung der Röhren zu vermeiden, wurden für Formalin Röhren mit Druckverschluss (Eppendorf) und für PBS/DMSO Röhren mit Drehverschluss (Nunc Tubes) verwendet.

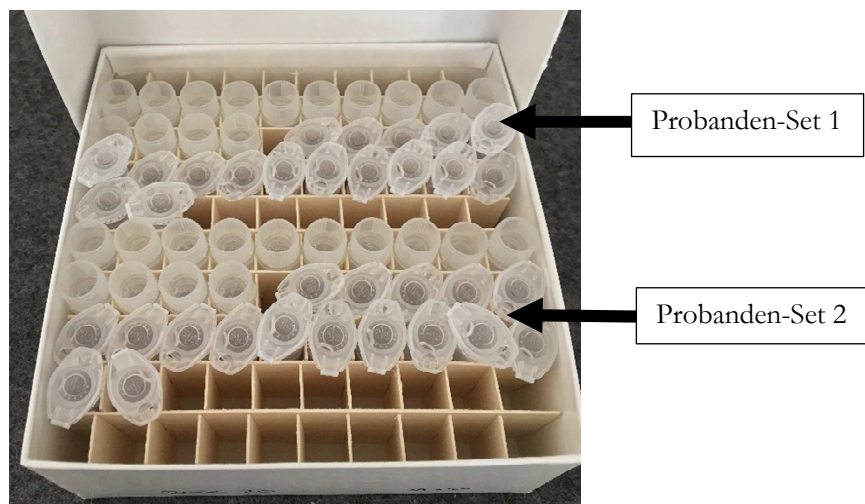


Abbildung 5: Mit Formalin und PBS/DMSO gefüllten Röhren in Karton-Box

Jede Karton Box mit je 10x10 Kompartimenten war mit jeweils zwei Probanden-Sets befüllt. Dabei enthielt jedes der Probanden-Sets:

- 14 beschriftete Röhren mit je 1ml PBS/DMSO 10%
- 2 beschriftete leere Röhren für je 500µl Vollblut
- 3 beschriftete leere Röhren für je 500µl Plasma
- 12 beschriftete Röhren mit je 1ml Formalin 4%

Im zweiten Schritt wurden die Gewebeproben der Herzkranzgefäße und Karotiden horizontal zum Gefäßverlauf mittig geteilt. Bei vorliegenden atherosklerotischen Plaques wurden diese nach Möglichkeit ebenfalls

mittig geteilt, um ähnliche Läsionsstadien zu erhalten. Eine Ausnahme bei diesem Prozess waren die Karotiden, welche auf der Höhe der Bifurkation entnommen wurden. Bei der horizontal zum Gefäßverlauf vorzunehmenden Zweiteilung entfiel auf einen Anteil die *A. Carotis communis* und auf den anderen Anteil die Carotis-Bifurkation. Die Bifurkation mit *A. Carotis interna* und *A. Carotis externa*, wurde in PBS/DMSO überführt, die *A. Carotis communis* wurde in Formalin konserviert (Abb. 4). Die Zweiteilung von Leber, Herz- und Skelettmuskel erfolgte in der Mitte der jeweiligen Gewebeprobe.

Viszerales- und subkutanes Fettgewebe wurde lediglich in PBS/DMSO konserviert, da hier eine Konservierung mittels Formalin biologisch nicht möglich ist.

Die geteilten Gewebeproben wurden in der entsprechenden Spalte auf dem Entnahme-Dokument platziert und anschließend in Formalin oder PBS/DMSO überführt. Jede einzelne Gewebeprobe wurde in das jeweils beschriftete Röhrchen mittels Pinzette überführt.

Die zusätzlich gewonnenen Proben (Stent, Thrombus, Bypass) wurden ausschließlich in Formalin gesammelt und mit den Daten der Probandennummer, Bezeichnung der Probe und Lokalität der Entnahme händisch beschriftet. Sofern bei einzelnen Probanden die Entnahme bestimmter Gewebeproben nicht möglich war, wurde dies auf dem Entnahme-Dokument als Kommentar vermerkt und die dazugehörigen Formalin und PBS/DMSO Röhrchen ohne Gewebeprobe wieder in die jeweilige Box eingefügt, um mögliche Fehlerquellen bei der weiteren Verarbeitung der Proben zu vermeiden.

### 4.2.3 Lagerung und Transfer der Proben

Die mit Gewebeproben gefüllten PBS/DMSO Röhrchen (Abb. 6), sowie Blut- und Plasma Röhrchen (Abb. 7) wurden nach deren Einsortierung in den vom Deutschen Herzzentrum eigens dafür zur Verfügung gestellten Plastik-Boxen bei  $-36^{\circ}\text{C}$  bis zum Probentransfer, im Institut für Rechtsmedizin der LMU München, gelagert. Die Langzeitlagerung im Deutschen Herzzentrum erfolgte anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die befüllten Formalin Röhrchen (Abb. 8) wurden lichtgeschützt in eine Karton-Box einsortiert und bei Raumtemperatur bis zu deren Abholung gelagert.

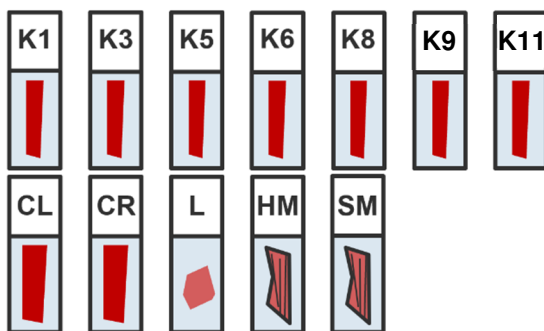


Abbildung 6: Gewebeproben in Formalin (4%)

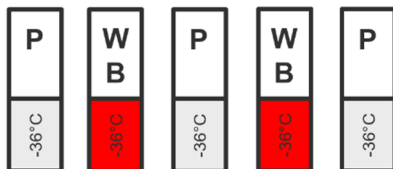


Abbildung 7: Plasma- und Vollblutproben

- K1:** RCA proximal
- K3:** RCA distal
- K5:** LCA
- K6:** LAD proximal
- K8:** LAD distal
- K9:** LCX proximal
- K11:** LCX distal
- CL:** Linke Karotide
- CR:** Rechte Karotide
- L:** Leber (Segment II/III)
- SF:** Subkutanes Fettgewebe (umbilical)
- VF:** Viszerales Fettgewebe (epicardial)
- HM:** Herzmuskel (LV unterhalb K6)
- SM:** Skelettmuskelgewebe (intracostal)
- WB:** Vollblut (2x 500 $\mu\text{l}$ )
- P:** Plasma (3x 500 $\mu\text{l}$ )

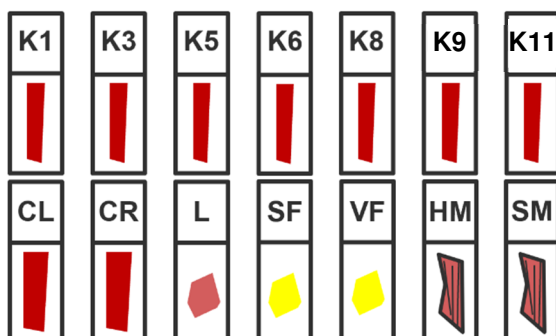


Abbildung 8: Gewebeproben in PBS/DMSO (10%)

#### 4.2.4 Histologische Aufbereitung der Formalin Proben

##### Entkalkung

Im Falle der Halsschlagadern und Koronararterien wurde das Formalin im ersten Schritt durch Soft-Entkalcker (Carl Roth) zur Dekalzifizierung der Proben ersetzt. Bei Muskel- und Lebergewebe wurde anstatt des Entkalkungsmediums Ethanol 70% (vergällt) hinzugegeben. Die Röhrrchen wurden anschließend wieder verschlossen und die Proben für drei bis fünf Tage bei Raumtemperatur dekalzifiziert bzw. inkubiert.

##### Proben trimmen

Im Folgenden wurden die entkalkten Gewebeproben aus den Röhrrchen entnommen und überflüssiges Fett- und Bindegewebe mittels Skalpell entfernt. Anschließend wurde die Laufrichtung des Gefäßes festgestellt und eine saubere Schnittkante nach je ca. 5mm im Querschnitt zum Gefäß gesetzt. Als nächstes wurden die Gewebeproben aufrecht in Einbettkassetten gestellt und diese verschlossen. Bis zur weiteren Verarbeitung, maximal jedoch zwei Tage, wurden die Proben dann in 70% Ethanol (vergällt) gelagert.

##### Entwässerung

Die Entwässerung der Proben erfolgte mittels Gewebereinbettautomaten (Seriennummer 23418, MICROM International). Der Korb wurde automatisiert von einem Reagenz-Gefäß ins nächste überführt, wobei die Gewebeproben, beginnend in 70% Ethanol eine Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration (bis zu 100% EtOH) durchliefen und abschließend mit Xylolersatz (Xylene Substitute, Thermo Scientific) infiltriert wurden. Die Proben lagerten dann bis zur Entnahme in 65°C warmen Paraffin (Typ 3, ThermoFisher Scientific). Dieser Prozess dauerte ca. 17 Stunden.

##### Einbettung in Paraffin

Die Gewebeproben wurden mittels flüssigem Paraffin Typ 3 (ca. 65°C) in Paraffin-Blöcke gebettet. Dabei wurden auch Gewebehohlräume mit Paraffin aufgefüllt. Die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Blöcke konnten, nach Aushärten auf einer Kühlplatte (-16°C), nun lichtverschlossen, bei Raumtemperatur gelagert werden.

## Mikrotom

Mittels Mikrotom (MICROM International) wurden im Anschluss ca. 2-3  $\mu\text{m}$  dünne Gewebeschnitte von den FFPE-Blöcken geschnitten und in ein Streckbad (Medit) (40°C) überführt. Anschließend wurden die Schnitte für die Hämatoxilin-Eosin (HE) und Elastica van Gieson (EvG) Färbungen auf Superfrost® Glasobjektträger (VWR) aufgezogen und schließend über Nacht im Ofen bei ca. 40-50°C getrocknet.



#### 4.2.5 Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung

Die Schnitte wurden zunächst für 20 bis 60 Minuten bei 56°C fixiert und anschließend durch eine 15-minütige Inkubation in Xylol entparaffiniert. Die Rehydrierung der Proben erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe (4 Minuten Isopropanol, 2x4 Minuten EtOH 96%, 4 Minuten EtOH 70%). Es folgte eine einminütige Inkubation in destilliertem Wasser.

Im Anschluss erfolgte die Kernfärbung mit HTX-Mayer (Saures Hämalaun nach Mayer) für 10 Minuten. Die Farbenentwicklung wurde im Wasserbad durch einen leichten, kühlen Leitungswasserstrahl für 3 Minuten herbeigeführt. Nach der Kontrastfärbung der Gewebeschnitte mit Eosin (1% alkoholisch) für 2 Minuten wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (30 Sekunden EtOH 96%, 2x30 Sekunden Isopropanol) und 2x2 Minuten in Xylol inkubiert. Die Einbettung erfolgte schließlich mit Eukitt® Quick hardening mounting medium (Sigma-Aldrich).

Die morphologische Charakterisierung des Gewebes erfolgte anschließend unter dem Lichtmikroskop (Olympus). Die Kerne erscheinen hier blau-lila, während die umliegenden Gewebestrukturen (Zytoplasma) rötlich dargestellt werden. Bei der histologischen Beurteilung der Gewebeproben wurden diese letztlich im Hinblick auf Zellularität, Infiltrationen, Verkalkungsgrad, Stabilität, Ruptur und Neovaskularisierung charakterisiert.

#### 4.2.6 Elastica van Gieson (EvG) Färbung

Die Schnitte wurden zunächst für 20-60 Minuten in einem Ofen bei 56°C fixiert und daraufhin durch Xylol entparaffiniert. Die Rehydrierung der Proben erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe (4 Minuten Isopropanol, 2x4 Minuten EtOH 96%, 4 Minuten EtOH 70%). Es folgte eine einminütige Inkubation in destilliertem Wasser (MilliQ).

Im Anschluss erfolgte die Färbung der elastischen Fasern mit Resorcinfuchsin für 20 Minuten. Die Proben wurden anschließend im Wasserbad für 3 Minuten gespült, bis kein Farbabgang mehr zu beobachten war. Die Kernfärbung erfolgte durch 15-minütige Färbung im Eisenhämatoxilin (HTX-Weigert A+B 1:1). Die Proben wurden dann im Wasserbad für 3 Minuten gebläut. Durch 2 Minuten Inkubation in Picrofuchsin wurden dann Kollagene, sowie Muskeln, Nerven und umliegende Gewebestrukturen gefärbt. Die Farbreaktion wurde in destilliertem Wasser für 10 bis 20 Sekunden gestoppt. Zuletzt erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 Minuten und 30 Sekunden EtOH 96%, 30 Sekunden Isopropanol) sowie die Infiltration mit Xylol für 2x2 Minuten.

Das Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte mit Eukitt® Quick hardening mounting medium (Sigma-Aldrich).

Die Auswertung der Färbung erfolgte im Hellfeld unter dem Lichtmikroskop (Olympus). Dabei wurden die Zellkerne braun-schwarz, elastische Fasern violett und kollagene Fasern rötlich gefärbt. Muskeln, Nerven sowie Zytoplasma wurde gelb-orange dargestellt. Die Proben konnten hierbei bezüglich ihrer extrazellulären Matrix (Elastin/Kollagen) charakterisiert werden.

#### 4.2.7 DNA Extraktion aus Blut und Frischgewebe

Für die Extraktion von DNA aus Vollblut wurde das Maxwell DNA Blood Kit (Promega) verwendet. Hierfür wurde Vollblut für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden 300µl Vollblut mit 300µl Lysepuffer, sowie 30µl Proteinase K vermischt. Der Ansatz wurde dann für 30 Minuten bei 65°C und 600rpm im Wärmeblock inkubiert. Alle 10 Minuten erfolgte die Inkubation für ca. 1 Minute bei 1500rpm. Abschließend wurde der Ansatz in das erste Well der im Kit enthaltenen Kartusche überführt. Nach Zugabe des Plungers wurde die Kartusche in das Maxwell RSC 48 System eingesetzt. Die mitgelieferten Elutions-Gefäße (0,5ml) wurden mit 65µl Elutionspuffer befüllt und ebenfalls ins Gerät eingesetzt. Abschließend wurde in der Software das Maxwell DNA Blood Protokoll ausgewählt und das Gerät gestartet. Nach 37 Minuten wurde die isolierte DNA im Qubit 3.0 (ThermoScientific) fluorometrisch vermessen.

Für die Extraktion von DNA aus Frischgewebeproben (K6) wurden je 25mg-50mg Gewebe verwendet. Hierfür wurde zuvor perivaskuläres Gewebe entfernt. Die Isolation erfolgte nach einem, in unserem Labor etablierten, modifizierten Protokoll ebenfalls mit dem Maxwell DNA Blood kit (Promega). Nach der Mechanischen Homogenisierung der Gewebe in 300µl Inkubationspuffer erfolgte die Zugabe von 1-Thioglycerol und Proteinase K. Die Inkubation erfolgte gemäß der Isolation aus Vollblut bei 65°C und 600rpm. Die Inkubationszeit betrug 2-20h. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300µl Lysepuffer und eine erneute Inkubation für 10 Minuten und 600rpm. Im Folgenden wurde der Ansatz das erste Well der Blut DNA Kartusche überführt und die Plunger eingesetzt. Die DNA-Elution erfolgte wieder in 65µl Elutionspuffer. Als Protokoll wurde das Maxwell DNA Blood Protokoll ausgewählt und die DNA abschließend im Qubit 3.0 Fluorometer (ThermoScientific) vermessen.

#### 4.2.8 Probenaufbereitung und DNA Extraktion

In dieser Arbeit wurden peripheres Blut, sowie kardiovaskulär relevante Gewebe (K6, HM, SM) mittels tiefer Sequenzierung analysiert, um von hämatopoetischen Stammzellen abstammende mononukleare Zellen mit CHIP Mutation, in kardiovaskulär relevanten Geweben nachweisen zu können. Es wurden ausschließlich Probanden mit vorhandener KHK (Grad I-II) (Abb. 9) im proximalen Abschnitt des RIVA (K6) anhand des Illumina TruSeq Custom Sequenzierungs-Panels (3) im Münchner Leukämielabor (MLL) genotypisiert.

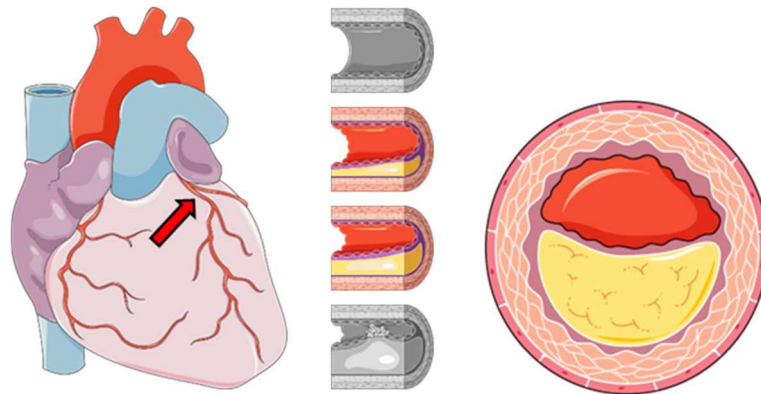


Abbildung 9: Atherosklerotische Veränderungen im proximalen Bereich des RIVA

Der proximale Teil des *Ramus interventricularis anterior* (K6) ist mit einem Pfeil markiert (links). Die verschiedenen Atherosklerosegrade 0-III sind als Längsschnitt dargestellt, wobei Grad 0 und Grad III in grau und Grad I-II farbiger dargestellt sind. Der Querschnitt stellt den Grad II dar (rechts) (22).

Für die Sequenzierung wurde eine Tiefe von mehr als 2000 Nachweisen pro Gen angestrebt, um CHIP-mutierte hämatopoetische Zellen im peripheren Blut, endokardnahem Herzmuskel, interkostalem Skelettmuskel und in atherosklerotisch veränderten Herzkranzgefäßen (im proximalen Teils des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA)) zuverlässig nachzuweisen.

Die DNA wurde wie oben beschrieben mit einer modifizierten Methode mittels „Maxwell Blood DNA Kits (Promega)“ aus peripherem Vollblut und den korrespondierenden Geweben (K6, HM, SM) isoliert. Die Konzentration der extrahierten genomischen DNA wurde unter Verwendung des Qubit dsDNA HS-Assay-Kits (Life Technologies) auf einem Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies) bestimmt und anschließend auf 25ng/μl in 30μl mit Nuklease freiem Wasser verdünnt.

Die tiefen DNA Sequenzierungen wurden am MLL unter Leitung von Herrn Prof. Haferlach durchgeführt. Dafür wurde ein bereits etabliertes Panel genutzt, das auf dem Illumina TruSeq Custom Amplicon Low Input-Assay basiert (3). Das Panel enthält insgesamt 594 Amplicons in 56 Genen, die mittels Amplifikation vervielfältigt werden sollen (s. Tabelle 8). Diese Gene konnten bereits mit CHIP und myeloischen Malignitäten in Verbindung gebracht werden (23). Um eine verbesserte Identifizierung von Varianten mit niedriger Allelfrequenz zu ermöglichen, wurde im Doppelstrangansatz sequenziert. Zusätzlich wurden 6-bp-eindeutige molekulare Identifikatoren (UMIs) in die zielspezifischen Primer aufgenommen (3).

Tabelle 8: Genpanel für die tiefe DNA-Sequenzierung

Diese Tabelle listet die 56 Gene auf, die mittels Amplifikation durch den Illumina TruSeq Custom Amplicon sequenziert wurden (3).

ABL1	DNMT3A	JAK3	PTPN11
ASXL1	ETV6/TEL	KDM6A	RAS21
ATRX	EZH2	KIT	RUNX1
BCOR	FBXW7	KRAS	SETBP1
BCORL1	FLT3	MLL	SF3B1
BRAF	GATA1	MPL	SMC1A
CALR	GATA2	MYD88	SMC3
CBL	GNAS	NOTCH1	SRSF2
CBLB	GNB1	NPM1	STAG2
CBLC	HRAS	NRAS	TET2
CDKN2A	IDH1	PDGFRA	TP53
CEBPA	IDH2	PHF6	U2AF1
CSF3R	IKZF1	PPM1D	WT1
CUX1	JAK2	PTEN	ZRSR2

Es wurden insgesamt 750ng genomische DNA (25ng/μl in 30μl) pro Probe gemäß Protokoll des Truseq Custom Amplicon Low Input Kits (Illumina) verwendet. Die Hybridisierung des Oligo-Pools mit den Zielregionen, die Verlängerung von stromaufwärts gelegenen Oligos und die Folgeligation bis zum 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligos wurde an einem T100-Thermocycler (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Die Amplifikation der Ligationsprodukte und die Zugabe der Illumina i7- und i5-Adaptersequenzen wurde auf einem T100-Thermocycler (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde die Bibliotheksqualität und die Fragmentierung der DNA auf dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) unter Verwendung des DNA 1000 Kits analysiert. Es wurde eine PERL basierte Bibliotheksnormalisierung durchgeführt bevor die einzelnen Bibliotheken zusammengefasst wurden (3).

#### 4.2.9 Sequenzierung

Vor der Sequenzierung wurden die gepoolten Bibliotheken gemäß dem NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (Illumina) verdünnt und denaturiert. Es wurde 1% PhiX-DNA hinzugegeben. Die gepoolten Bibliotheken wurden mit dem NextSeq 500-Sequenzer (Illumina) unter Verwendung des NextSeq 500/550 Mid Output, Version 2-Kits (300 Zyklen) gemäß den Anweisungen des Herstellers sequenziert. Der Sequenzer wurde in einem Paired-End-Sequenzierungsmodus mit einer Leselänge von 2x150bp und einer Leselänge des Index von 2x8bp betrieben. Die BCL-Dateien wurden demultiplext und mit dem Tool FASTQ Generation auf BaseSpace (Illumina) in FASTQ-Dateien konvertiert. Die durchschnittliche Coverage der Proben lag bei 4282 pro Gen (3).

#### 4.2.10 Statistische Auswertung

Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die Analyse der Varianztests wurde zum Vergleich kontinuierlicher Variablen zwischen Gruppen verwendet. Kategoriale Variablen wurden mit dem  $\chi^2$ -Test oder dem Fisher-Exact-Test verglichen. Die statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen. Alle angegebenen p-Werte sind 2-seitig. Die statistische Analyse wurde mit Graphpad PRISM Version 8.0 durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Charakteristiken der Gesamtkohorte

Es konnten insgesamt 217 Probensets mit Gewebeproben, Blut und Plasma gewonnen werden. Aus diesen 217 Probensets, bei denen das durchschnittliche Alter bei  $64,7 \pm 17,5$  Jahren lag, konnten durch die Finanzierung im Rahmen eines DZHK-Projekts (DZHK-81X2600520) 17 Individuen ( $n=17$ ) mit makroskopischer Stenose im proximalen Teil des *Ramus interventricularis anterior* (K6) zur Sequenzierung ausgewählt werden. Die Auswahl erfolgte entsprechend des makroskopischen Kalzifizierungsgrades im proximalen Teil des RIVA und anhand des Alters. Da CHIP-Mutationen altersassoziiert sind (1), wurden zur Sequenzierung Probanden im Alter zwischen 65 und 89 Jahren ausgewählt. Alle auserwählten Probensets wiesen makroskopisch eine mittlere bis hohe sicht- bzw. tastbare Verkalkung der K6 auf.

Das durchschnittliche Alter der sequenzierten Kohorte ( $n=17$ ) betrug  $73,8 \pm 7,8$  Jahre. Zwei Drittel der Probanden waren männlich (64,7%). Der durchschnittliche BMI-Wert der Kohorte lag bei  $30,1 \pm 5,4$ , wobei das Herzgewicht im Durchschnitt  $540,5 \pm 92,7$  Gramm betrug.

Der Kühlungsbeginn, der sich bei einem unbekanntem Todeszeitpunkt am letzten Lebenszeichen orientiert, konnte bei fünf Patienten nicht ermittelt werden, da im jeweiligen Krankenhaus nicht festgehalten wurde, wann die Verstorbenen in die Kühlkammer gebracht wurden. Bei den restlichen zwölf Patienten erfolgte der Kühlungsbeginn im Durchschnitt nach maximal  $10 \pm 7,1$  Stunden. Es handelt sich hierbei um einen Maximalwert, da der genaue Todeszeitpunkt bei vier Patienten nicht bekannt ist und dieser, bei diesen Probanden, dem Zeitpunkt des letzten Lebenszeichens entspricht.

Die Entnahme der Proben erfolgte im Durchschnitt  $36,5 \pm 16,4$  Stunden nach Todeseintritt. Bei diesem Wert wird nicht berücksichtigt, dass bei vier Patienten von  $n=17$  ein Maximalwert bei der Probenentnahme angenommen wurde. Dieser Maximalwert weist darauf hin, dass bei diesen vier Patienten der genaue Todeszeitpunkt nicht ermittelt werden konnte und sich das PMI am letzten Lebenszeichen orientiert.

## 5.2 Ergebnisse der Sequenzierung

Die Sequenzierung erbrachte, dass vier von 17 Probanden Träger von CHIP-Mutationen waren. Von diesen vier Probanden waren jeweils zwei männlich und zwei weiblich. Das durchschnittliche Alter der Träger der CHIP-Mutationen ( $n=4$ ) betrug  $73,5 \pm 6,2$  Jahre. Das durchschnittliche Alter der sequenzierten Probanden ohne CHIP-Mutationen ( $n=13$ ) lag bei  $73,9 \pm 8,4$  Jahren (Tabelle 9).

*Tabelle 9: Alter der CHIP-Mutationsträger*

Proband #	Alter	CHIP-Mutationsträger	Kein CHIP-Mutationsträger
1	66		X
2	68		X
3	85		X
4	75	X	
5	79		X
6	67		X
7	66		X
8	89		X
9	67		X
10	76		
11	87		X
12	65	X	
13	71		X
14	74	X	
15	71		X
16	80	X	
17	69		X



Basierend auf den Daten der erstellten Datenbank (Tabelle 10) ergab sich ein durchschnittlicher BMI-Wert der CHIP-Mutationsträger von  $28,9 \pm 3,9$ . Das Herzgewicht lag im Durchschnitt bei  $561,3 \pm 107,2$  Gramm.

Die Probenentnahme bei CHIP-Mutations-Trägern erfolgte inklusive Kühlzeiten im Durchschnitt nach  $47 \pm 15,4$  Stunden. Bei diesem Wert wird nicht berücksichtigt, dass bei einem Patienten (Fall #12) ein Maximalwert bei der Probenentnahme angenommen wurde. Tabelle 10 zeigt im Folgenden zusammenfassend die Daten für Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Kühlungsbeginn, Entnahmezeitpunkt, Todesursache und Herzgewicht der Probanden bei denen CHIP-Mutationen gefunden wurden.

Tabelle 10: Zusammenfassende Daten der vier CHIP-Mutationsträger

Fall#	Geschlecht	Alter	Größe	Gewicht	Kühlungsbeginn nach max: Letztes Lebenszeichen ca: KB nicht exakt bekannt unbekannt: keine Infos zur Kühlung verfügbar	Entnahme nach	Todesursache	Herzgewicht (g)
4	W	75	170	92	5h	26h	Herzbeutelamponade	548
12	M	65	181	87	max 26h	max 45h	Myokardinfarkt	632
14	W	74	165	67	4h	60h	Schädelhirntrauma	415
16	M	80	173	97	unbekannt (Krankenhaus)	57h	V.a cardial	650

Wie oben bereits erwähnt, wurden bei vier Probanden insgesamt fünf Mutationen mit einer VAF von mindestens 2% im peripheren Blut nachgewiesen. Die somatischen Mutationen befanden sich in den Genen DNMT3A, ASXL1 und SMC3 (Tabelle 11).

Tabelle 11: Mutationen in den Genen DNMT3A, ASXL1 und SMC3

Die Tabelle beschreibt in welchen Genen eine Mutation mit einer VAF von mindestens 2% im peripheren Blut bei den jeweiligen Probanden festgestellt wurde.

Proband #	Gen DNMT3A	Gen ASXL1	Gen SMC3
4	<b>Mutation</b>	Keine Mutation	Keine Mutation
12	<b>Mutation</b>	Keine Mutation	Keine Mutation
14	Keine Mutation	<b>Mutation</b>	Keine Mutation
16	<b>Mutation</b>	Keine Mutation	<b>Mutation</b>

### 5.2.1 Mutationen im Gen DNMT3A

Bei drei Probanden wurden Mutationen im DNMT3A Gen nachgewiesen. Dies lässt sich folgendermaßen spezifizieren und ist in Tabelle 12 zusammengefasst:

Bei Proband #4 wurde in diesem Gen die Mutation p.Phe414Leufs\*7 im peripheren Blut mit einer VAF von 2,7% nachgewiesen. In den korrespondierenden Gewebeproben (Atherosklerotischer Plaque K6, Herz- und Skelettmuskel) konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden.

Bei Proband #12 wurde im DNMT3A Gen die Mutation p.Val778Gly im peripheren Blut mit einer VAF von 6,5% nachgewiesen und in der atherosklerotischen Läsion des proximalen Teils des *Ramus interventricularis anterior* (K6) mit einer VAF von 2,5% nachgewiesen.

Bei Proband #16 wurde die Mutation p.Arg749Cys nachgewiesen. Im peripheren Blut mit einer VAF von 5,6%, im atherosklerotischen Plaque und im Herzmuskel jeweils mit einer VAF von 1,5% und im Skelettmuskel mit einer VAF von 1,4%.

Tabelle 12: VAF (in %) der CHIP-Mutationen im Gen DNMT3A

Die Tabelle beschreibt mit welcher VAF eine Mutation im Gen DNMT3A, bei den jeweiligen Probanden, in peripherem Blut, dem proximalen Teil des *Ramus interventricularis anterior*, Herzmuskelgewebe und Skelettmuskelgewebe gefunden wurde. WB: Vollblut; K6=Plaque proximaler Anteil des *Ramus interventricularis anterior*; HM: Herzmuskel und SM: Skelettmuskel.

Proband #	WB	K6	HM	SM
4	<b>VAF 2,7%</b>	—	—	—
12	<b>VAF 6,5%</b>	<b>VAF 2,5%</b>	—	—
14	—	—	—	—
16	<b>VAF 5,6%</b>	<b>VAF 1,5%</b>	<b>VAF 1,5%</b>	<b>VAF 1,4%</b>

### 5.2.2. Mutationen im Gen ASXL1

Bei Proband #14 wurde im ASXL1 Gen die Mutation p.Tyr591\* im peripheren Blut mit einer VAF von 5,2% und in der atherosklerotischen Läsion des proximalen Teils des *Ramus interventricularis anterior* mit einer VAF von 1,2% gefunden (Tabelle 13).

Tabelle 13: VAF (in %) der CHIP-Mutation im Gen ASXL1

Die Tabelle beschreibt mit welcher VAF eine Mutation im Gen ASXL1, bei den jeweiligen Probanden, in peripherem Blut (WB), dem proximalen Teil des *Ramus interventricularis anterior* (K6), Herzmuskelgewebe (HM) und Skelettmuskelgewebe (SM) gefunden wurde.

Proband #	WB	K6	HM	SM
4	—	—	—	—
12	—	—	—	—
14	<b>VAF 5,2%</b>	<b>VAF 1,2%</b>	—	—
16	—	—	—	—

### 5.2.3 Mutationen im Gen SMC3

Bei Proband #16 wurde im SMC3 Gen die Mutation p.Val1200Met im peripheren Blut mit einer VAF von 6,0% nachgewiesen. In atherosklerotischem Plaque wurde eine VAF von 1,0% und in Skelettmuskelgewebe mit einer VAF von 1,5% nachgewiesen (Tabelle 14).

*Tabelle 14: VAF (in %) der CHIP-Mutation im Gen SMC3*

Die Tabelle beschreibt mit welcher VAF eine Mutation im Gen ASXL1, bei den jeweiligen Probanden, in peripherem Blut (WB), dem proximalen Teil des *Ramus interventricularis anterior* (K6), Herzmuskelgewebe (HM) und Skelettmuskelgewebe (SM) gefunden wurde.

Proband #	WB	K6	HM	SM
4	—	—	—	—
12	—	—	—	—
14	—	—	—	—
16	<b>VAF 6,0%</b>	<b>VAF 1,0%</b>	—	<b>VAF 1,5%</b>

### 5.3 Histologische Charakterisierung der Kohorte

Die histologische Charakterisierung der FFPE-Gewebe (K1-K11, CL, CR) erfolgte mittels HE- und EvG-Färbung. Hierbei wurde vor allem das Stadium der Läsion nach AHA, die Stabilität der Plaques, sowie eine vorliegende Ruptur ermittelt. Des Weiteren wurde die Zellularität, die Anzahl der Immuninfiltrate sowie das Vorhandensein von Collagenen und Elastinen Fasern charakterisiert. Die vollständige histologische Charakterisierung der postmortem Kohorte war nicht Bestandteil dieser Arbeit, weshalb im Folgenden nur beispielhaft die Charakterisierung zweier Läsionen der K6 beschrieben ist.

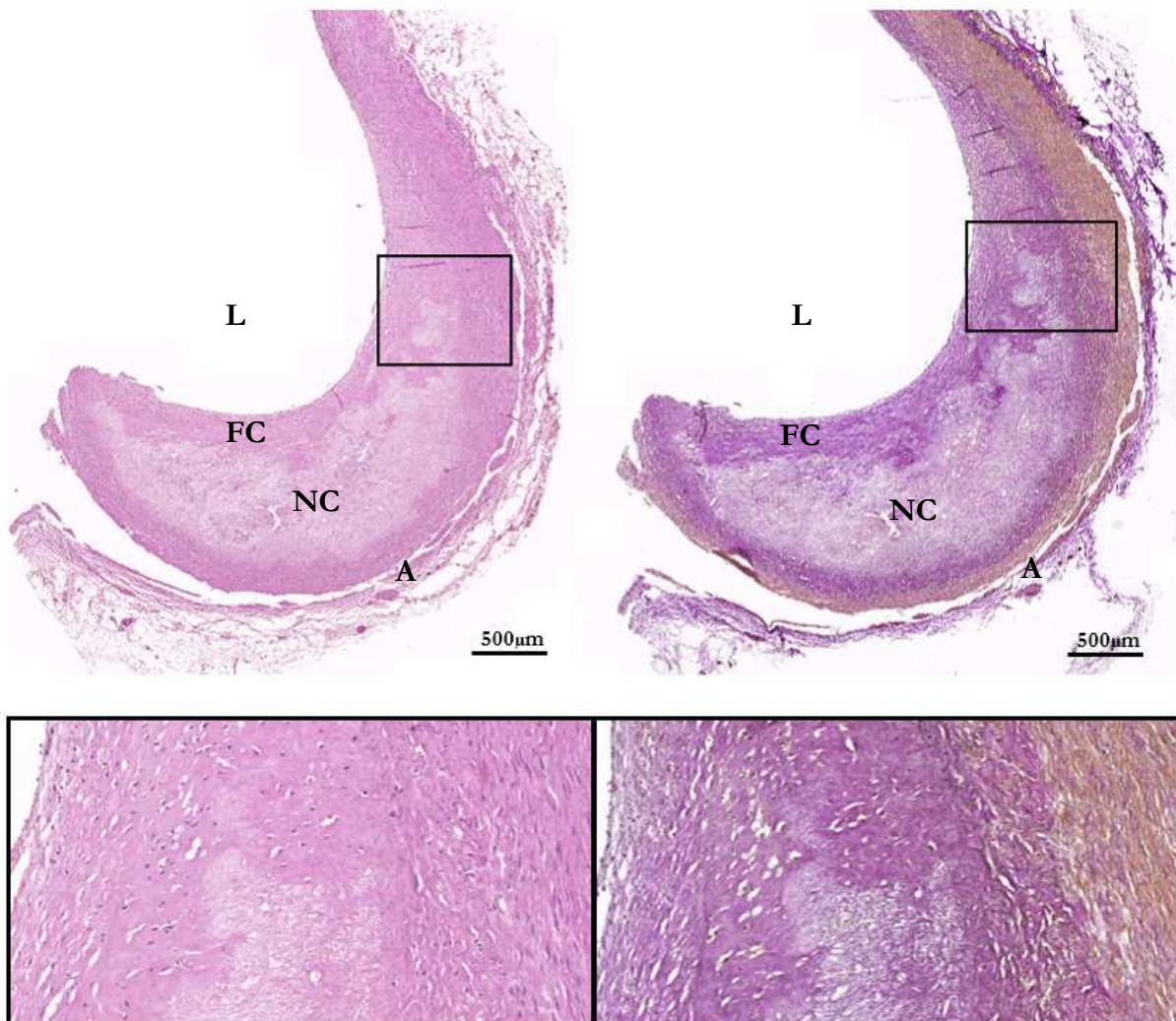


Abbildung 10: Histologie einer fortgeschrittenen Läsion der K6

Die HE-Färbung (links) zeigt in blauviolett die Zellkerne und in rot Zytoplasma, Kollagenfasern, sowie Erythrozyten. Die EvG-Färbung (rechts) zeigt die Zellkerne in schwarzbraun, sowie elastische Fasern in dunkel violett. Kollagene Fasern sind rot angefärbt während Zytoplasma und Muskelgewebe in orange-rot dargestellt wird. Erythrozyten erscheinen ebenfalls orange-rot. A=Adventitia; L=Lumen; FC= Fibröse Kappe (Fibrous Cap) NC = Nekrotischer Kern (Necrotic Core).

Abbildung 10 zeigt beispielhaft eine fortgeschrittene Läsion des *Ramus interventricularis anterior*. Durch das basische Hämalaun der HE-Färbung (links) wurden die aciden Strukturen der Läsion (DNA, Zellkerne) blauviolett gefärbt, während alle acidophilen Strukturen (Proteine, Zytoplasma, Kollagen) durch Eosin rot gefärbt

wurden. Die Elastika-van-Gieson färbung (rechts) zeigt die Färbung von Bindegewebe durch eine Dreifachfärbung. Hierbei wurden durch das saure Hämalaun nach Weigert Zellkerne in schwarzbraun dargestellt, während durch Resorcin-Fuchsin und Picrofuchsin elastische Fasern schwarzviolett und Collagene Fasern in rot angefärbt wurden. Muskulatur und Zytoplasma, sowie rote Blutzellen werden in dieser Färbung orange-rot angezeigt.

An Hand der oben beschriebenen Charakteristiken wurde die in Abbildung 10 gezeigte Läsion als stabile Läsion des Stadium V eingestuft. Dies entspricht der Dicke einer Fibrösen Kappe (FC) über dem Nekrotischen Kern (NC) von  $>200\mu\text{m}$  (gemäß AHA-Klassifizierung). Die Zellularität des Plaques wurde als mittel eingestuft. Es konnte eine leichte Kalzifizierung detektiert werden, die jedoch von starken kollagenen und elastinen Strukturen stabilisiert wird. Des Weiteren konnten vereinzelt Neovaskularisation und einige Immuninfiltrate detektiert werden.

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CHIP-mutationstragende Zellen in der Lage sind in humanes, kardiovaskulär relevantes Gewebe einzudringen (Abb. 11). So konnte mittels DNA-Sequenzierung detektiert werden, dass aus dem Knochenmark stammende, im peripheren Blut identifizierte CHIP-Mutationen in den Genen DNMT3A, ASXL1 und SMC3, in den entsprechenden atherosklerotischen Läsionen des proximalen Teils des *Ramus interventricularis anterior* (K6), nachweisbar sind. Darüber hinaus konnte eine CHIP-Mutation im DNMT3A Gen im Herzmuskelgewebe und jeweils eine DNMT3A und SMC3 Mutation auch im Skelettmuskelgewebe nachgewiesen werden (4). Limitierend bei gut durchbluteten Geweben (z.B. Muskel) ist, dass potentiell auch Leukozyten aus dem zirkulierenden System in den Proben enthalten sind. Dies kann mittels Histologie in den einzelnen Muskelschnitten visualisiert werden (z.B. muskelversorgende Blutgefäße).

Es ist von großer, klinischen Bedeutung, dass Mutationen in diesen CHIP-regulierenden Genen potentielle Auswirkungen auf systemische- und entzündungsfördernde Krankheitsbilder haben (4). Abbildung 11 fasst die oben genannten Ergebnisse noch einmal schematisch zusammen und zeigt, dass hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark mit einer somatischen Mutation in den Blutkreislauf gelangen. Diese CHIP-mutierten Zellen sind in der Lage, aus dem peripheren Blut, in Gewebe und die Wand der Herzkranzgefäße einzuwandern und dort die Atherogenese und kardiovaskuläre Events zu fördern.

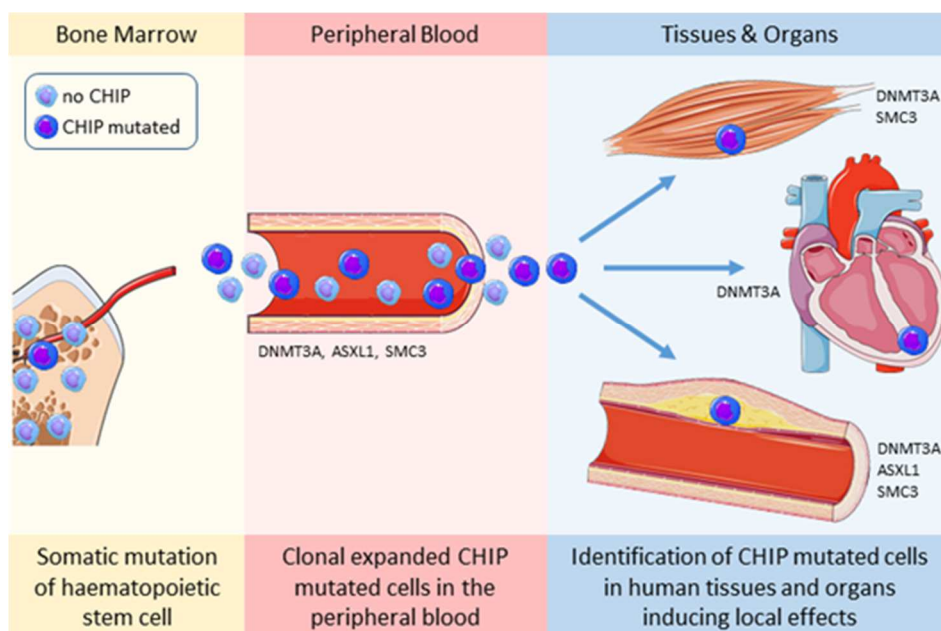


Abbildung 11: Schematische Übersicht der Sequenzierungsergebnisse

Im Knochenmark kommt es in einer hämatopoetischen Stammzelle zu einer somatischen CHIP Mutation (links). Nach klonaler Expansion werden CHIP mutierte Zellen in die systemische Zirkulation abgegeben (mitte). CHIP-mutierte Zellen sind in der Lage aus dem Blutkreislauf in die arterielle Gefäßwand, Herz- und Skelettmuskel einzudringen (rechts). Von CHIP Mutationen betroffene Gene im peripheren Blut und im korrespondierenden Gewebe sind jeweils angegeben (22).

CHIP-Mutationen scheinen Auswirkungen auf Immuneffektorzellen wie Monozyten, Makrophagen und Neutrophile, zu haben. Dies könnte durch Etablierung eines proatherosklerotischen, lokalen Milieus für ein erhöhtes Risiko von Koronarer Herzkrankheit, thromboembolische Ereignisse und ischämische Herzinsuffizienz verantwortlich sein (3, 24). Der festgesetzte Grenzwert der VAF von 2% für den Nachweis einer relevanten CHIP ist historisch bedingt und aus heutiger Sicht aufgrund der verbesserten Analysemethoden, mit Möglichkeiten der tiefen Sequenzierung, in Diskussion und muss künftig möglicherweise angepasst werden. Bei Menschen mittleren und hohen Alters können CHIP-Mutationen mit einer VAF bereits weit unter 2% nachgewiesen werden (25). Welche Rolle die somatischen Mutationen in diesen CHIP-regulierenden Genen bei der Entwicklung von Herz-Kreislaufkrankungen spielen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (4).

Für TET2 gibt es bereits überzeugende Daten. Im genetisch modifizierten Mausmodell konnte unter hochkalorischer, fettreicher Kost gezeigt werden, dass aus CHIP-mutierten Monozyten entwickelte Makrophagen im Vergleich zu nicht CHIP-mutierten Makrophagen signifikant mehr Entzündungsprozesse zeigten und diese Herz-Kreislaufkrankungen wie KHK und ischämische Herzinsuffizienz fördern. Atherosklerotische Läsionen in Tet2<sup>-/-</sup> Mäusen mit Ldlr<sup>-/-</sup> Hintergrund waren signifikant größer, zeigten eine Anhäufung von Makrophagen und wiesen eine erhöhte Ansammlung von entzündungsfördernden Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen auf (Abb. 12). Interessanterweise konnten diese entzündungsbasierten, atherosklerosefördernden Effekte durch die Blockade des NLRP3 Inflammasoms (IL-1 $\beta$  vermittelt) rückgängig gemacht werden (26). Dies stimmt auch mit der Erkenntnis überein, dass die Zunahme von IL-1 $\beta$  und Inflammasom-Aktivierung die kardiale Dysfunktion im Tet2<sup>-/-</sup> Mausmodell für Herzinsuffizienz fördern (3, 24). Abbildung 12 zeigt die histologische Schnitte im Bereich der Aortenwurzel von Wild Type (WT) Mäusen (ohne jegliche Behandlung) und Knock-out Mäusen (bei denen TET2 auf beiden Allelen funktionsunfähig gemacht wurde), nachdem diese Mäuse 5 und 9 Wochen lang cholesterinhaltige Kost erhalten hatten.



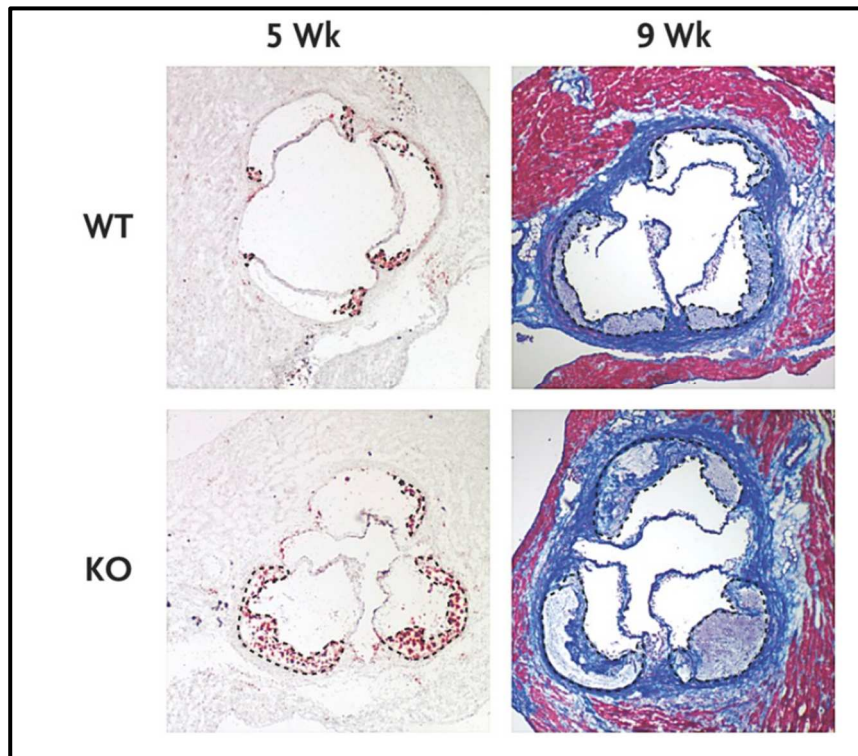


Abbildung 12: Histologischer Schnitt im Bereich der Aortenwurzel bei TET2 WT und KO Mäusen

Oil-Red Färbung nach 5 Wochen (links) und Massons Trichrome Färbung bei 9 Wochen (rechts). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die vorliegenden Läsionsbereiche (2).

Die prospektive CANTOS Studie umfasste 10.061 Patienten mit bereits abgelaufenen Herzinfarkt und einem erhöhten High-Sensitivity C-Reactive Protein (hsCRP)-Wert, bei denen die Wirkung des monoklonalen, humanen Antikörpers Canakinumab über einen Zeitraum von 4 Jahren erforscht wurde. Die Patienten wurden in 4 Gruppen unterteilt und erhielten entweder: Placebo, Canakinumab 50mg, Canakinumab 150mg, Canakinumab 300mg (27).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Canakinumab besonders in einer Dosierung von 150mg und 300mg den hsCRP-Wert, herzinsuffizienzbedingte Krankenhausaufenthalte und wiederkehrenden Herz-Kreislaufprobleme deutlich reduzieren konnte. In einer Substudie an 3.925 Patienten der CANTOS Studie, wurden bei 344 Patienten somatische CHIP Mutationen identifiziert. Bei Patienten mit erworbenen TET2 Mutationen, verringerte die Behandlung mit Canakinumab das relative Risiko eines schweren kardiovaskulären Ereignisses (Tod, Schlaganfall oder Herzinfarkt) um 64% (28). In Abbildung 13 wird die durchschnittliche prozentuale Veränderung vom hsCRP Ausgangswert je nach Behandlungsgruppe über die Zeit dargestellt (27). Abbildung 13A beschreibt die Entwicklung des hsCRP Levels nach der Verabreichung von Placebo, Canakinumab 50mg, Canakinumab 150mg und Canakinumab 300mg über eine Zeitspanne von 48 Monaten. Dabei zeigt sich, dass besonders die Einnahme von Canakinumab 150mg und Canakinumab 300mg zu einer deutlichen Senkung des hsCRP Levels führte, während die Einnahme von Canakinumab 50mg einen geringeren Effekt hatte. In der Placebo-Gruppe kam es ebenfalls zu einem Absinken des hsCRP Levels. Dies war

im Vergleich zu den Canakinumab Gruppen jedoch deutlich geringer. Abbildung 13B beschreibt die Entwicklung des LDL Cholesterinlevels entsprechend des Behandlungsregimens mit Placebo, Canakinumab 50mg, Canakinumab 150mg und Canakinumab 300mg über eine Zeitspanne von 48 Monaten. Dabei zeigte sich kein Unterschied mit Blick auf die LDL Cholesterinwert nach Gabe von Canakinumab im Vergleich zu Placebo. Dies macht deutlich, dass CHIP eine inflammatorische und keine metabolische Erkrankung ist.

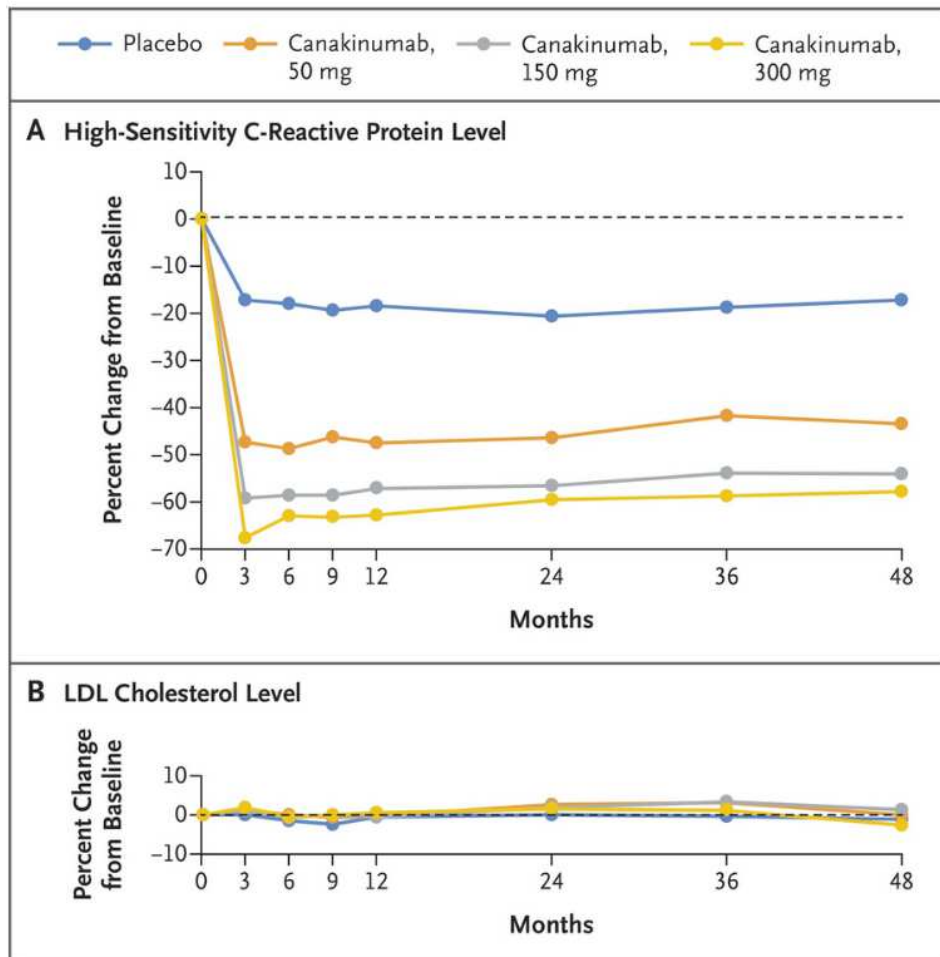


Abbildung 13: Wirkung von Canakinumab auf hsCRP (A) und LDL-Cholesterin (B)

Der CANTOS Trial untersuchte die Wirkung von Canakinumab in unterschiedlichen Dosierungen im Vergleich zu Placebo bei Patienten mit vorausgegangenem Herzinfarkt und erhöhten hsCRP Werten über einen Zeitraum von 48 Monaten. Panel A zeigt die prozentuale Veränderung der hsCRP Werte je nach Behandlungsgruppe. Panel B zeigt die prozentuale Veränderung der LDL-Cholesterin Werte (27).

## 7. Ausblick

Es scheint von großer Relevanz zu sein, dass je höher die Last an CHIP Mutationen im peripheren Blut – gemessen an der VAF – desto größer ist das Risiko der Entwicklung einer Koronaren Herzkrankheit und eines schweren kardiovaskulären Events (1).

Wir postulieren entsprechend, dass auch der Verlauf von Herz-Kreislaufkrankungen einen direkten Zusammenhang mit der VAF sowohl im peripheren Blut als auch in kardiovaskulär relevantem Gewebe wie Herzkranzgefäßen und Herzmuskel widerspiegelt. Dies ist von maßgeblicher Relevanz für die Etablierung CHIP-spezifischer Therapieansätze.

## Literaturverzeichnis

1. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(26):2488-98.
2. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(2):111-21.
3. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Ecke A, Abou-El-Ardat K, et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*. 2019;4(1):25-33.
4. von Scheidt M, Bauer S, Kaiser J, Bongiovanni D, Feig J, Joner M, et al. Invasion of CHIP mutated hematopoietic cells into atherosclerotic coronary lesions and heart muscle. under review. 2020.
5. Khetarpal SA, Qamar A, Bick AG, Fuster JJ, Kathiresan S, Jaiswal S, et al. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential Reshapes Age-Related CVD: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(4):578-86.
6. Sano S, Wang Y, Walsh K. Clonal Hematopoiesis and Its Impact on Cardiovascular Disease. *Circ J*. 2018;83(1):2-11.
7. Haybar H, Shahrabi S, Ghanavat M, Khodadi E. Clonal hematopoiesis: Genes and underlying mechanisms in cardiovascular disease development. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(6):8396-401.
8. Libby P, Ebert BL. CHIP (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential): Potent and Newly Recognized Contributor to Cardiovascular Risk. *Circulation*. 2018;138(7):666-8.
9. Libby P, Sidlow R, Lin AE, Gupta D, Jones LW, Moslehi J, et al. Clonal Hematopoiesis: Crossroads of Aging, Cardiovascular Disease, and Cancer: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(4):567-77.
10. Jaiswal S, Natarajan P, Ebert BL. Clonal Hematopoiesis and Atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1401-2.
11. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018;2018(1):264-9.
12. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-78.
13. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2015;373(1):35-47.
14. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Abou-El-Ardat K, Kiefer KC, et al. Hematopoietic alterations in chronic heart failure patients by somatic mutations leading to clonal hematopoiesis. *haematologica*. 2020;105(7):e328.
15. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(3):152-65.
16. Kaasinen E, Kuismin O, Rajamäki K, Ristolainen H, Aavikko M, Kondelin J, et al. Impact of constitutional TET2 haploinsufficiency on molecular and clinical phenotype in humans. *Nature communications*. 2019;10(1):1-17.
17. Veninga A, De Simone I, Heemskerk JW, Ten Cate H, van der Meijden PE. Clonal hematopoietic mutations linked to platelet traits and the risk of thrombosis or bleeding. *haematologica*. 2020;105(8).

18. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, van de Vorst M, Vermeulen SH, Kiemeny LA, et al. Ultra-sensitive sequencing identifies high prevalence of clonal hematopoiesis-associated mutations throughout adult life. *The American Journal of Human Genetics*. 2017;101(1):50-64.
19. Nagase R, Inoue D, Pastore A, Fujino T, Hou H-A, Yamasaki N, et al. Expression of mutant *Asxl1* perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(6):1729-47.
20. Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Fagard R, Funck-Brentano C, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(16):1581-98.
21. Stierle U, Weil J. *Klinikleitfaden Kardiologie*: Elsevier Health Sciences; 2020.
22. Servier Medical Art (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License) [cited 2020. Available from: <https://smart.servier.com/>].
23. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(26):2477-87.
24. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, et al. Tet2-mediated clonal hematopoiesis accelerates heart failure through a mechanism involving the IL-1 $\beta$ /NLRP3 inflammasome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;71(8):875-86.
25. Young AL, Challen GA, Birman B, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nature communications*. 2016;7(1):1-7.
26. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science*. 2017;355(6327):842-7.
27. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *New England journal of medicine*. 2017;377(12):1119-31.
28. Svensson EC, Madar A, Campbell CD, He Y, Sultan M, Healey ML, et al. TET2-driven clonal hematopoiesis predicts enhanced response to canakinumab in the CANTOS trial: an exploratory analysis. *Circulation*. 2018;138(Suppl\_1):A15111-A.

## Danksagung

Ich bedanke mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. Matthias Graw, dem Leiter des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München, für die Überlassung des Themas und professionellen Begleitung dieser Arbeit. Seine herzliche Annahme am Institut und seine jahrelange Erfahrung mit Dissertationen waren von unschätzbarem Wert.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Heribert Schunkert, dem Klinikdirektor der Erwachsenenkardiologie am Deutschen Herzzentrum München, für die Annahme des Themas und der Möglichkeit in Kollaboration mit dem Deutschen Herzzentrum die Forschungsarbeit durchführen zu dürfen.

Bei Frau Prof. Dr. med. Elisabeth Mützel, der Leiterin der Kinderschutzambulanz am Institut für Rechtsmedizin der Universität München, möchte ich mich ebenfalls für die Annahme des Themas, für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ich danke besonders Herrn Dr. med. Moritz von Scheidt für eine professionelle Strukturierung und Koordination des Forschungsprogramms. Ohne seine stete Hilfsbereitschaft, sein großes Engagement und seine allzeit freundliche und Ruhe vermittelnde Art wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein Dank geht ebenfalls an Frau Sabine Bauer, die mit ihrer fachlichen Unterstützung und zahlreichen Anregungen, maßgeblich an der Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön zudem an Herrn Dr. med. Christian Braun für seine Geduld und Führung bei der Probenentnahme, sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen. Bei ihm und dem gesamten Obduktionsteam möchte ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Oliver Frey, der durch seine vielseitige Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht hat. Seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und sein unerschütterlicher Glauben an mich und an die Fertigstellung der Dissertation waren von unschätzbarem Wert. Ihm widme ich diese Arbeit.

# Affidavit



## Eidesstattliche Versicherung

Frey, Juliane

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

### Bedeutung der klonalen Hämatopoese bei Koronarer Herzerkrankung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.04.2021

Juliane Frey

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin