

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

Intensivierte Risikostratifizierung von Patienten mit nicht-is-  
chämischer Kardiomyopathie – Prognostische Bedeutung  
von Kardio-MRT und kardialen Biomarkern in der Myokard-  
biopsie

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

Vorgelegt von  
Toskas, Ioannis  
Promotionsjahr  
2024

Dekan: Professor Dr. rer. nat. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Müller
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Michel

Tag der Disputation: 30.04.2024

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Strukturelle Myokarderkrankungen - eine Herausforderung für Klassifizierung, Diagnose und Therapie .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Definition der Kardiomyopathien nach der ESC-Klassifikation .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 <i>Dilatative Kardiomyopathie (DCM) .....</i>	11
1.2.2 <i>Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) .....</i>	12
1.2.3 <i>Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC).....</i>	13
1.2.4 <i>Restriktive Kardiomyopathie (RCM) .....</i>	14
1.2.5 <i>Nicht klassifizierte Kardiomyopathien .....</i>	15
<b>1.3 Prognostische Auswirkungen von Myokardentzündung und Fibrose bei strukturellen Myokarderkrankungen .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 <i>Proinflammatorische Zytokine .....</i>	16
1.3.2 <i>Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....</i>	16
1.3.3 <i>Oxidativer Stress .....</i>	17
<b>1.4 Bedeutung molekularer und immunhistochemischer Biomarker bei strukturellen Myokarderkrankungen für die Risikostratifizierung .....</b>	<b>18</b>
1.4.1 <i>Entzündungsmarker in der Standard-Histopathologie und der Immunohistochemie: Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II, CD 3 und CD 68</i>	18
<b>1.5 Auswirkungen von Gremlin-1 im erwachsenen Organismus und bei Fibrose .....</b>	<b>18</b>

1.5.1	<i>Interaktion von Gremlin-1, morphogenetischen Knochenproteinen und transformierendem Wachstumsfaktor beta: Charakterisierung der Signalübertragungswege</i>	19
1.5.2	<i>Gremlin-1 und Fibrose</i>	21
<b>1.6</b>	<b>Kernspintomographie des Herzens</b>	<b>22</b>
<b>1.7</b>	<b>Aktuell Risikostratifizierung nach Leitlinie</b>	<b>23</b>
<b>1.8</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>27</b>
2.1.1	<i>Antikörper</i>	27
2.1.2	<i>Kits</i>	27
2.1.3	<i>Software</i>	27
2.1.4	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	28
2.1.5	<i>Klinische und Laborausüstung</i>	30
<b>2.2</b>	<b>Studiendesign</b>	<b>30</b>
<b>2.3</b>	<b>Endomyokardiale Biopsien</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Endpunkt der Studie</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientenkollektiv bei Patienten mit und ohne Nachweis von Late Gadolinium Enhancement in der MRT</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Patientenkollektiv bei Patienten mit und ohne Nachweis von Gremlin 1 in der myokardialen Biopsie</b>	<b>34</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Gremlin-1 Expression ist assoziiert mit der Fibrose und dem LGE in der MRT</b>	<b>38</b>

<b>3.4 Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten häufiger ein LGE in der MRT .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5 Die myokardiale Fibrose korreliert mit der Gremlin-1 Expression .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Die Gremlin-1 Expression ist mit ausgeprägter Symptomatik assoziiert</b>	<b>41</b>
<b>3.7 Die Gremlin-1 Expression korreliert mit eingeschränkter linksventrikuläre Ejektionsfraktion .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8 Korrelation des linksventrikulären enddiastolischen Diameters und der Gremlin-1 Expression .....</b>	<b>43</b>
<b>3.9 Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten niedrigeren BNP-Wert ..</b>	<b>44</b>
<b>3.10 Die Patienten mit LGE Nachweis in der MRT zeigten häufiger die Gremlin-1 Expression in der Biopsie .....</b>	<b>44</b>
<b>3.11 Patientenkollektiv ohne Nachweis von Late-Gadolinium-Enhancement in der MRT .....</b>	<b>46</b>
3.11.1 <i>Die Gremlin-1 Expression korreliert mit ausgeprägter Symptomatik</i>	48
3.11.2 <i>Patienten mit Gremlin-1 Expression haben eine reduzierte LVEF</i>	49
3.11.3 <i>Der linksventrikuläre enddiastolische Diameter korreliert mit der Gremlin-1 Expression .....</i>	50
3.11.4 <i>Die Gremlin-1 Expression korreliert mit höhere BNP-Werten .....</i>	50
<b>3.12 Intensivierte Risikostratifizierung sinnvoll - „Non-Survivors“ hatten bei Diagnosestellung eine bessere linksventrikuläre LVEF trotz erhöhter Mortalität .....</b>	<b>51</b>
<b>3.13 Intensivierte Risikostratifizierung anhand von MRT in Kombination mit Befunden der Myokardbiopsie Erreichen des Endpunktes .....</b>	<b>52</b>

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Erklärungen zum Eigenanteil</b> .....	<b>67</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b>	Immunchistochemische Analyse der Myokardbiopsien (a-f) und Kernspintomographie des Herzens (g-j). (a) geringe Fibrose. (b) geringe Gremlin-1 Expression. (c) ausgeprägte Fibrose. (d) ausgeprägte Gremlin-1 Expression. (e) negatv Kontrolle (f) positiv Kontrolle, (g) und (h) MRT ohne LGE Nachweis. (i) und (j) MRT mit LGE Nachweis .....	39
<b>Abbildung 2:</b>	Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten signifikant häufiger ein LGE Nachweis in der MRT in Vergleich zu Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (65 % vs 46%, p=0.013). .....	40
<b>Abbildung 3:</b>	Patienten mit Gremlin-1 Expression in der immunhistologischen Analyse zeigten in der myokardialen Biopsie signifikant häufiger eine mittelschwere oder schwere Fibrose (p= <0.001). .....	41
<b>Abbildung 4:</b>	Patienten mit Gremlin-1 Nachweis zeigten häufiger Symptome der NYHA-Klasse III und IV in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (36 % vs 24 %, p=0.051). Symptome der NYHA II waren ähnlich vorhanden in beiden Gruppen (47 % vs 46 %, p=0.051). NYHA I Symptome hatten häufiger die Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (30 % vs 18 %, p=0.051).....	42
<b>Abbildung 5:</b>	Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten eine signifikant reduziertere LVEF in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (39 % vs 45 %, p=0.009).....	43
<b>Abbildung 6:</b>	Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten einen größeren LVEDD als Patienten ohne Nachweis von Gremlin-1 (54 mm vs 51 mm, p=0.023).....	43

<b>Abbildung 7:</b> Patienten ohne Gremlin-1 Expression zeigten einen höheren mittleren BNP-Wert in Vergleich zu der Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis (2597 ng/l vs 1366 ng/l, p=0.017).....	44
<b>Abbildung 8:</b> Patienten mit Gremlin-1 Expression und ohne LGE Nachweis waren symptomatischer in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis. (82% vs 66%, p=0.102). .....	49
<b>Abbildung 9:</b> Die LVEF war deutlich eingeschränkter bei den Patienten mit Gremlin-1 Expression in Vergleich zu den Patienten ohne Germlin-1 in der immunhistologischen Analyse (35% vs 50%, p=0.016).....	49
<b>Abbildung 10:</b> Der LVEDD war größer in der Patienten Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse (55 mm vs 48 mm, p=0.125). .....	50
<b>Abbildung 11:</b> Der BNP wert bei Patienten ohne LGE Nachweis, war signifikant höre bei Patienten mit Gremlin-1 Expression in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (1020ng/l vs 159ng/l, p=0.038).....	51
<b>Abbildung 12:</b> Kaplan-Meier Kurven des primären und sekundären Endpunktes .....	54

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Ausgangsmerkmale der LGE-positiven vs. LGE-negativen Patienten .....	34
<b>Tabelle 2.</b> Ausgangsmerkmale der Patienten mit und ohne Nachweis von Grem-1 in der durchgeführten myokardialen Biopsie .....	37
<b>Tabelle 3.</b> Ausgangsmerkmale der LGE-positiven und Gremlin-positiven vs. LGE-positiven und Gremlin-negativen Patienten .....	46
<b>Tabelle 4.</b> Ausgangsmerkmale der LGE-negativen und Gremlin-positiven vs. LGE-negativen und Gremlin-negativen Patienten .....	48
<b>Tabelle 5.</b> Ausgangsmerkmale von Überlebenden und Nicht-Überlebenden ..	52

## Abkürzungsverzeichnis

ACC            American College of Cardiology

AHA	American Heart Association
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
BNP	natriuretisches Peptid vom B-Typ
BMP	Morphogenetisches Knochenprotein
CD	Cluster Differentiation
CDK	Chronische Niereninsuffizienz
CM	Kardiomyopathie
CMR	Kardiale Magnetresonanztomographie
CRT	Kardiale Resynchronisationstherapie
CypA	Cyclophilin A
CVB3	Coxsackievirus B3
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ECM	Extrazelluläre Matrix
EKG	Elektrokardiogramm
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ESC	European Society of Cardiology
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HNCM	Hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie
HOCM	Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
HSC	Hepatische Stellatzellen
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
kDa	Kilo-Dalton
LGE	Spätes Gadolinium-Enhancement
LVEF	Linksventrikuläre Auswurffraktion

LV	Linker Ventrikel
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NYHA	New York Heart Association
NCCM	Linksventrikuläre nicht verdichtete Kardiomyopathie
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RV	Rechter Ventrikel
RVOT	Rechtsventrikulärer Ausflusstrakt
SCD	Plötzlicher Herztod
Smad	Small tail and mothers against decapentaplegic
TGF-1	Wachstumsfaktor beta1
TGF-b	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TIMP	Gewebshemmer für Metalloproteinasen
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
VF	Kammerflimmern
VT	Ventrikuläre Tachykardie

# 1 Einleitung

## 1.1 Strukturelle Myokarderkrankungen - eine Herausforderung für Klassifizierung, Diagnose und Therapie

Strukturelle Herzmuskelerkrankungen stellen eine große und heterogene Gruppe von Herzerkrankungen mit unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern dar, zu denen Herzrhythmusstörungen, Herzversagen und sogar der plötzliche Herztod gehören.

Die zugrundeliegenden Kardiomyopathien (CM) sind eine komplexe Gruppe von Herzmuskelerkrankungen mit vielfältigen Ursachen, was die Klassifizierung von CM besonders schwierig macht.

Nach der Klassifizierung der American Heart Association (AHA 2006) werden CM in zwei Hauptkategorien unterteilt: primäre und sekundäre CM. Primäre CM kann genetisch, gemischt oder erworben sein, während sekundäre CM Teil einer systemischen Störung ist. [1, 2] Bei primärer CM ist das Herz das hauptsächlich betroffene Organ, während bei sekundärer CM die myokardiale Dysfunktion durch die zugrunde liegende Erkrankung verursacht wird.

Das Fortschreiten der Kardiomyopathien kann irreversibel sein und zu Herzversagen führen. Der Befall des Herzmuskels, insbesondere das Ausmaß der kardialen Entzündung, der Fibrose und der anschließenden Dysfunktion des Herzmuskels und der Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion, ist ein limitierender Faktor für die Prognose der Patienten bei primärer und sekundärer CM.

Da die Herzinsuffizienz nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt die dritthäufigste Todesursache in Deutschland ist [3], ist es von großer Bedeutung, die CM in einem frühen Stadium der Erkrankung zu diagnostizieren und zu behandeln.

Die Diagnose von CM umfasst etablierte Untersuchungsmethoden wie Echokardiographie, kardiale Magnetresonanztomographie, Herzkatheteruntersuchung, Endomyokardbiopsie und elektrophysiologische Risikostratifizierung. Bei 50 % der Patienten bleibt die Ätiologie unbekannt. [4]

Patienten mit CM benötigen entweder eine langfristige pharmakologische Behandlung oder eine Therapie mit implantierbaren Geräten (kardiale Resynchronisationstherapie (CRT), Kardioverter-Defibrillatoren (ICDs) und/oder

ventrikulärem Hilfsgerät), und im Falle einer Erkrankung im Endstadium eine Herztransplantation. [1, 4] Trotz dieser therapeutischen Möglichkeiten ist die Prognose bisher schlecht.

Die individuelle Risikobewertung ist entscheidend für den klinischen Entscheidungsprozess. Es gibt klinische Faktoren, die mit einem ungünstigen klinischen Ergebnis assoziiert sind, wie New York Heart Association (NYHA) Klasse  $\geq$  III [5, 6] niedrige linksventrikuläre Auswurffraktion (LVEF) [7-10] oder erhöhtes natriuretisches Peptid vom B-Typ (BNP). [11]

Es gibt jedoch keine etablierten histologischen Kriterien oder Marker zur Klassifizierung des Schweregrads der CM oder zur Bewertung der Kurz- und Langzeitprognose. Solche Marker würden uns die Möglichkeit geben, den Ausgang der Krankheit vorherzusagen und somit individuelle und kausale Behandlungsansätze in einem frühen Stadium der Krankheit bereitzustellen.

## **1.2 Definition der Kardiomyopathien nach der ESC-Klassifikation**

Nach der ESC-Klassifikation ist CM eine Herzmuskelerkrankung, bei der der Herzmuskel strukturell und funktionell abnormal ist, ohne dass eine koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck, eine Herzklappenerkrankung oder eine angeborene Herzerkrankung vorliegen. [12] Sie werden nach funktionellen und morphologischen Kriterien als dilatative, hypertrophe, arrhythmogene rechtsventrikuläre, restriktive und unklassifizierte CM klassifiziert. Je nach Ätiologie kann CM genetisch oder nicht genetisch bedingt sein, wobei nicht genetisch bedingte CM in erworben oder idiopathisch unterteilt wird. [1]

### **1.2.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)**

Die DCM ist die weltweit häufigste CM, die durch das Vorhandensein einer linksventrikulären Dilatation und einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion definiert ist. [13] Der rechte Ventrikel kann dilatiert sein, und die rechtsventrikuläre Funktion ist häufig beeinträchtigt. Die DCM kann genetisch, idiopathisch oder erworben sein. Die Prävalenz der DCM wird auf 1:250 geschätzt. [14] Die erworbene DCM kann durch Myokarditis und toxische Faktoren (Toxine, Alkohol, Drogenmissbrauch und Anthrazykline) verursacht werden. [14] Systemische

Infektionen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten) und insbesondere Virusinfektionen (Parvovirus B19, Adenovirus, Coxsackievirus B) können nach einem Intervall von einigen Tagen zu einer Myokardinfektion führen. [14] Dies führt zu einer Herzmuskelentzündung und einer Herzmuskelfunktionsstörung. Die erworbene DCM wird auch durch systemische Grunderkrankungen verursacht. Bei Patienten mit autoimmunen Systemerkrankungen (Lupus erythematodes, Polymyositis, Sklerodermie, rheumatoide Arthritis, Churg-Strauss-Syndrom, Sarkoidose, Amyloidose), neuromuskulären (myotone Dystrophie, Morbus Friedrich), metabolischen (Morbus Gaucher, Hämochromatose) oder endokrinen Erkrankungen (Hyper-/Hypothyreose, Diabetes mellitus) wird häufig eine DCM diagnostiziert. Eine genetisch bedingte DCM findet sich bei 35 % der Patienten. Die Krankheit wird überwiegend autosomal-dominant vererbt. Sarkomerprotein-, Z-Band-, Zytoskelettgene und Kernmembranmutationen werden bei der Krankheit berichtet. Im Myokard von Patienten mit DCM ist die Struktur der Fasern anomal und es werden Bereiche mit interstitieller und perivaskulärer Fibrose festgestellt. Teile des Herzmuskels können nekrotisch sein und eine zelluläre Infiltration aufweisen. Dieser Prozess führt zu einem kardialen Remodeling eines oder beider Ventrikel. Patienten mit DCM entwickeln allmählich eine Herzinsuffizienz, ventrikuläre und supraventrikuläre Arrhythmien und benötigen je nach Risiko für einen plötzlichen Herztod (SCD) häufig eine ICD-Implantation. [1]

### **1.2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)**

HCM ist eine genetisch bedingte CM, die auf einer Störung des Sarkomers beruht. Sie ist durch einen hypertrophierten, aber anfangs nicht dilatierten linken Ventrikel (LV) gekennzeichnet. Die LV-Wanddicke ist erhöht (>13 mm). Dadurch wird der LV steif und führt zu einer diastolischen Füllungsstörung und einem erhöhten enddiastolischen Druck. Nach und nach dilatiert der LV und die Patienten entwickeln eine systolische Dysfunktion. Die Mehrzahl der Patienten weist ein asymmetrisches Hypertrophiemuster auf, das vor allem in der vorderen Herzscheidewand zu finden ist. [15] Die HCM wird je nach Vorhandensein einer LV-Ausflussbahnobstruktion in hypertrophe obstruktive CM (HOCM) und hypertrophe nicht-obstruktive CM (HNCM) unterteilt. Ein mit der kardialen

Magnetresonanztomographie (CMR) nachgewiesenes spätes Gadolinium-Enhancement (LGE) ist bei 60 % der Patienten mit HCM und LV-Hypertrophie vorhanden, weshalb die CMR zur Risikostratifizierung bei HCM eingesetzt wird. [16] Die Krankheit wird durch eine Genmutation von Sarkomerproteinen verursacht, die autosomal dominant vererbt wird. Die Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung liegt bei etwa 1:500. Die histologische Analyse zeigt hypertrophierte Kardiomyozyten, die in desorganisierter Weise im LV verteilt sind und die normale LV-Architektur verändern. Die vermehrte Bildung von intimum und medialem Kollagen in der Wand der Herzkranzgefäße führt zu einer Erkrankung der kleinen Gefäße und zu einer Myokardischämie. Die abnorme Struktur des Myokardgewebes nach dem Absterben der Kardiomyozyten und die Bildung von Myokardnarben tragen schließlich zu lebensbedrohlichen Arrhythmien wie ventrikulären Tachykardien (VT), Kammerflimmern (VF) und in der Folge zu SCD bei. Die jährliche Inzidenz von SCD beträgt etwa 1 %. [1] Ein früherer Herzstillstand (aufgrund von VF, VT), eine spontane anhaltende VT und eine Synkope unbestimmten Ursprungs mit klinisch relevanter, hämodynamisch signifikanter anhaltender VT oder VF, die durch eine elektrophysiologische Untersuchung ausgelöst wurde, sind die Hauptrisikofaktoren für SCD und stellen nach den Richtlinien des American College of Cardiology (ACC) / AHA eine Klasse-I-Indikation für die ICD-Implantation dar. [17] Darüber hinaus erhöhen andere Risikofaktoren wie eine SCD in der Familienanamnese, ungeklärte Synkopen, nicht anhaltende VT (nsVT), abnormaler Blutdruck bei körperlicher Anstrengung und extreme linksventrikuläre Hypertrophie (maximale Größe  $\geq 3$  cm) das Risiko für SCD, weshalb Patienten mit einem oder mehreren dieser Faktoren eine Klasse-IIa-Indikation für die ICD-Implantation haben. [18]

### **1.2.3 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)**

ARVC ist eine seltene CM, die durch das Vorhandensein einer systolischen/diastolischen Dysfunktion des rechten Ventrikels und einer globalen oder regionalen abnormen Struktur des rechten Ventrikels (RV) (RV-Dilatation und RV-Aneurysmen) gekennzeichnet ist. Bei Patienten mit ARVC werden die Kardiomyozyten nach und nach durch Fett- und Fasergewebe ersetzt. Bei zwei Drittel der

Patienten kommt es auch zu einem fibrösen Ersatz des Herzmuskels des linken Ventrikels und einer Vergrößerung des linken Ventrikels. Weitere wichtige morphologische Muster der ARVC sind eine fokale Ausdünnung der freien Kammerwand, eine Wandhypertrophie, eine fokale Verdickung der RV-Wand in der Diastole und eine Vergrößerung des rechtsventrikulären Ausflusstrakts (RVOT). Die CMR ist ein wertvolles Instrument zur Beurteilung der Herzstruktur und -funktion bei ARVC. [19] Eine definitive Diagnose basiert jedoch auf dem histologischen Nachweis eines transmuralen fibrösen und/oder fibrös-fettigen Ersatzes des RV-Myokards bei einer Biopsie. Die Prävalenz wird auf 1:2000 bis 1:5000 geschätzt, und die Erkrankung tritt häufiger bei Männern auf. Sie wird bei jungen Menschen und Sportlern mit SCD in Verbindung gebracht. [20] Die ARVC wird überwiegend autosomal-dominant vererbt. Mutationen in Genen, die für Desmoplakin, Plakophilin-2, Plakoglobin, Desmoglein-2, den Ryanodinrezeptor RyR2 und den transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ ) kodieren, werden bei der Krankheit erkannt. Die abnorme Struktur des RV kann zu tödlichen VTs führen. Die Induktion einer schnellen instabilen VT/VF in einer elektrophysiologischen Untersuchung hat sich als unabhängiger Prädiktor für lebensbedrohliche Ereignisse erwiesen. [21] Diese Daten können wertvoll sein, um Risikopersonen in einem frühen Stadium zu identifizieren. Eine medikamentöse Antiarrhythmie-Therapie, Katheterablation und ICD-Implantation sind therapeutische Optionen.

#### **1.2.4 Restriktive Kardiomyopathie (RCM)**

Bei der RCM handelt es sich um eine seltene CM, die durch eine diastolische Dysfunktion aufgrund einer erhöhten Steifigkeit der linken Ventrikelwand gekennzeichnet ist. Der enddiastolische Druck ist in beiden Ventrikeln erhöht, wobei das Volumen nur geringfügig ansteigt. Die Wanddicke des linken Ventrikels und die atrioventrikulären Klappen bleiben normal, während die Vorhöfe deutlich erweitert sind. Die ventrikuläre Füllung ist gestört, aber die systolische Funktion ist erhalten. Ein breites Spektrum systematischer Erkrankungen wie Amyloidose, Sarkoidose, Hämochromatose, karzinoide Herzerkrankungen, Sklerodermie und Anthrazyklintoxizität kann zu einer erworbenen RCM führen. Die Loeffler-Endokarditis ist eine spezifische Form der restriktiven CM und in der Regel eine

Spätmanifestation des hypereosinophilen Syndroms. Bei Patienten mit HCM im Endstadium, DCM und endokardialer Fibrose und Fibroelastose wird ebenfalls sehr häufig eine RCM diagnostiziert. Die familiäre Form der Krankheit wird autosomal-dominant vererbt, mit Genmutation von Troponin I und Desmin. Es wird angenommen, dass die RCM von allen CM-Typen die geringste Prävalenz in der Bevölkerung hat. [12]

### **1.2.5 Nicht klassifizierte Kardiomyopathien**

Diese Kategorie umfasst CM, die nicht die typischen Merkmale einer der anderen 4 Gruppen aufweisen. Die linksventrikuläre nicht verdichtete CM (NCCM) ist eine seltene kongenitale CM (1:2000 echokardiographische Untersuchungen), die vermutlich durch eine Unterbrechung der normalen Embryogenese von Endokard und Myokard verursacht wird. Der LV erscheint schwammig und "nicht verdichtet" und besteht aus einem Geflecht zahlreicher Muskelbänder, den so genannten Trabekeln, mit tiefen intertrabekulären Vertiefungen. NCCM kann familiär bedingt sein (40 %) und sporadisch auftreten. Die klinischen Manifestationen reichen vom Fehlen von Symptomen bis hin zu Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und Embolien. [22] Die Takotsubo-CM ist eine nicht-ischämische CM, die durch einen endogenen oder iatrogenen Katecholamin-Überschuss ausgelöst wird. Sie wird auch als stressinduzierte CM oder transientes apikales Ballooning-Syndrom bezeichnet. Es ist durch eine vorübergehende und schwere linksventrikuläre apikale Ballonierung und basale Hyperkinesie gekennzeichnet. Die klinische Manifestation ist das plötzliche Auftreten einer Herzinsuffizienz. In der akuten Phase dieser CM haben die Patienten Symptome, die einem akuten Koronarsyndrom ähneln (Dyspnoe, Brustschmerzen), und die EKG-Veränderungen deuten auf einen Vorderwand-Myokardinfarkt hin. Häufiger tritt diese CM bei Frauen auf. Die LV-Funktion erholt sich in der Regel unter medikamentöser Herzinsuffizienztherapie. [23]

### **1.3 Prognostische Auswirkungen von Myokardentzündung und Fibrose bei strukturellen Myokardenerkrankungen**

Die Prognose von strukturellen Myokardenerkrankungen wurde mit dem Grad der Entzündung und dem Ausmaß der Fibrose im Myokard in Verbindung gebracht. Zu den Entzündungsmechanismen bei strukturellen Myokardenerkrankungen gehört die Rekrutierung von Entzündungszellen an den Stellen der Schädigung und Dysfunktion des Myokards. Spezifische humorale und zelluläre Faktoren wie proinflammatorische Zytokine, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und reaktive Sauerstoffspezies spielen eine entscheidende Rolle im Prozess des kardialen Remodelings und führen zu Myokardfibrose. [24]

#### **1.3.1 Proinflammatorische Zytokine**

Interleukin 1 (IL)-1 $\beta$ , Interleukin 6 (IL)-6 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  sind Zytokine, die eine wichtige Rolle bei den Entzündungsprozessen spielen, die am kardialen Remodeling aufgrund einer zugrunde liegenden strukturellen Myokardenerkrankung beteiligt sind. Bei Herzinsuffizienz werden die Zytokine aufgrund der hämodynamischen Überlastung vom Myokard produziert. Es wird auch angenommen, dass eine extramyokardiale periphere Produktion aufgrund von Hypoxie und Gewebehypoperfusion stattfindet. Die verstärkte Expression von Zytokinen führt zu einem Phänotypwechsel der Monozyten und zur Nekrose von Kardiomyozyten. Darüber hinaus aktivieren sie MMPs, eine Familie proteolytischer Enzyme, die die extrazelluläre Matrix (ECM) des Herzens abbauen und zu einer Veränderung der interstitiellen Matrix führen. Folglich führen proinflammatorische Zytokine zu einem ungünstigen LV-Remodeling und Fibroseprozess. [25]

#### **1.3.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)**

MMPs sind zinkabhängige Proteasen, die zur Metzincin-Superfamilie gehören. Sie bauen die ECM ab und spielen eine wichtige Rolle beim normalen Gewebeumbau. Gleichzeitig führt ein unkontrollierter Anstieg der MMP-Aktivität zu einem übermäßigen Abbau der ECM und einem pathologischen Gewebeumbau. Bei der Verdauung der ECM werden Matrikine freigesetzt. [26] Dabei handelt es sich um Peptide, die bei vielen Zelltypen zur Chemotaxis beitragen und die

Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren anregen. Folglich spielen sie eine Rolle bei der Neubildung von Bindegewebe. Darüber hinaus setzen MMPs durch den Verdau der ECM den aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor (PDGF), den aktiven transformierenden Wachstumsfaktor beta1 (TGF 1) und den insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF) frei. Sie sind aktive, mit der ECM assoziierte Faktoren, die die Zellaktivität (Proliferation, Differenzierung) steuern und eine Rolle bei der Bildung und Umgestaltung der ECM spielen. [27] Mit diesem Mechanismus führen MMPs zum Fortschreiten fibrotischer Prozesse im Myokard.

### **1.3.3 Oxidativer Stress**

Chronisch erhöhter oxidativer Stress im Herzmuskel spielt ebenfalls eine Rolle bei den Mechanismen des kardialen Remodelings. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind hochreaktive Moleküle, die beim normalen Stoffwechsel von Sauerstoff entstehen. Die ROS-Produktion ist ein normaler Bestandteil der oxidativen Phosphorylierung, eine Störung der ROS-Erzeugung kann jedoch eine Rolle bei der Zelldysfunktion spielen. Höhere, aber nicht zytotoxische ROS-Konzentrationen und die Signalübertragung durch 1-andrenerge Rezeptoren oder Angiotensin-Rezeptoren induzieren offenbar die mitochondrienabhängige Apoptose in Myozyten. Hohe mechanische Belastung, die eine starke ROS-Produktion verursacht, und der 1-andrenerge Rezeptor induzieren Apoptose, wahrscheinlich durch ROS-abhängige Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen. Bei geringer mechanischer Belastung werden weniger ROS produziert. Zusammen mit der Stimulation durch Angiotensin-, TNF-a-, Endothelin- oder a1-andrenerge Rezeptoren werden Kinase-Kaskaden aktiviert, die in einer Aktivierung der Genexpression für das Zellwachstum gipfeln und zu Myozytenhypertrophie. Außerdem stimuliert oxidativer Stress die Proliferation von Herzfibroblasten und aktiviert MMPs, was zu einem Umbau des Herzgewebes führt. [28]

## **1.4 Bedeutung molekularer und immunhistochemischer Biomarker bei strukturellen Myokardkrankungen für die Risikostratifizierung**

### **1.4.1 Entzündungsmarker in der Standard-Histopathologie und der Immunhistochemie: Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II, CD 3 und CD 68**

Moleküle der Klasse II des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) sind extrazelluläre Proteine, die sich auf Antigen-präsentierenden Zellen und Lymphozyten befinden. In CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert die Erkennung von Antigenen, die auf MHC-II präsentiert werden, T-Zellen, die die Immunantwort und die Entzündung regulieren können. Es wird angenommen, dass die MHCII-Expression durch diesen Mechanismus eine Rolle bei entzündlichen Herzerkrankungen spielt. [29] Es wurde festgestellt, dass die MHCII-Expression eng mit der Expression anderer myokardialer Entzündungsmarker wie CypA, CD68 und CD3 in Myozyten von Patienten mit CVB3-induzierter Myokarditis zusammenhängt. [30]

CD3 ist ein Transmembranrezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen. In der Immunhistochemie wird er als Marker für T-Zellen in Gewebeproben verwendet. Die CD3-Expression korreliert stark mit der Expression von CypA und EMMPRIN in myokardialen Gewebeschnitten von Patienten mit entzündlicher CM und gilt als Marker für myokardiale Entzündungen. [30]

CD68 ist ein intrazelluläres Glykoprotein, das auch auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen vorkommt. Es wird als Marker für Makrophagen in immunhistochemischen Färbungen verwendet. Die durch CD68-Färbung nachgewiesene Makrophageninfiltration spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen des Herzmuskels. Seine Expression in Gewebeschnitten von Endomyokardbiopsien von Patienten mit CVB3-induzierter Myokarditis ist signifikant mit der Expression von CypA, EMMPRIN, CD3 und MHCII korreliert. [30]

## **1.5 Auswirkungen von Gremlin-1 im erwachsenen Organismus und bei Fibrose**

Gremlin-1 ist ein Mitglied der DAN- und Cerberus-Proteinfamilie, einer Untergruppe der Cysteinknoten-Superfamilie, die Antagonisten der

morphogenetischen Knochenproteine (BMPs) sind. Gremlin-1 ist ein 184 Aminosäuren langes Protein mit einer Größe von 20,7 kDa. Es existiert in zwei Isoformen, einer sekretierten und einer zellassozierten Isoform. [31]

Zunächst wurde Gremlin-1 als ein neues Gen namens DRM identifiziert, das in v-mos-transformierten Fibroblasten von Rattenembryonen transkriptionell herunterreguliert war. [32] Im Jahr 1998 wurde dieses Gen in der Abteilung für Molekular- und Zellbiologie der Universität von Kalifornien, Berkeley, in Gremlin umbenannt und es wurde gezeigt, dass es in der Neuralleiste von Xenopus-Embryonen exprimiert wird und eine Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt. [33] Heutzutage ist die Rolle von Gremlin-1 in der Embryogenese gut beschrieben. Die Expression von Gremlin-1 trägt zur Entwicklung von Lunge, Niere und Gliedmaßen bei. [34] Seine Expression ist auch entscheidend für die Kardiogenese, die Angiogenese, die Ausbildung der anterior-posterioren Körperachse und die Links-Rechts-Symmetrie. [35, 36] Gremlin-1 hemmt die Chemotaxis von Monozyten, indem es mit den Proteinen Slit1 und Slit2 interagiert. [37] Darüber hinaus interagiert es direkt mit Endothelzellen und spielt eine wichtige Rolle als proangiogener Faktor bei der Angiogenese, was darauf hindeutet, dass Gremlin-1 ein mögliches Ziel bei der Krebsbehandlung ist. [38]

Interessanterweise hat sich gezeigt, dass die Gremlin-1-Expression bei Erwachsenen auch an chronischen Entzündungskrankheiten beteiligt ist, die zu einem fibrotischen Umbau von Organen wie Lunge, Niere und Leber führen. [34, 39-41]

### **1.5.1 Interaktion von Gremlin-1, morphogenetischen Knochenproteinen und transformierendem Wachstumsfaktor beta: Charakterisierung der Signalübertragungswege**

Der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ ) ist ein Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Regulierung vieler Zellfunktionen wie Zellproliferation und -differenzierung spielt. Es ist ein sekretiertes Protein, das in den drei Isoformen TGF- 1, TGF- 2 und TGF- 3 vorkommt. TGF- wirkt auf Epithelzellen und ist ein Protein, das von vielen Zelltypen sekretiert wird. Über den TGF- /Smad (Small tail and mothers against decapentaplegic)-Signalweg führt TGF- zur epithelialen mesenchymalen Transition (EMT), einem Prozess, der nachweislich zur

Fibrinogenese beiträgt. [39] Smads sind intrazelluläre Proteine, die die Signale von TGF- Liganden, die an der Zelloberfläche binden, an den Zellkern weiterleiten. Die Bindung des Rezeptors an den TGF-Liganden führt zur Aktivierung von Smad3, einem Rezeptor-assoziierten Smad (R-Smad). Der phosphorylierte R-Smad bindet an einen Smad4, einen gemeinsamen Smad (coSmad). Dieser Komplex wird dann in den Zellkern übertragen und führt zur Transkription verschiedener Gene. In Epithelzellen von Patienten mit Nierenfibrose wird festgestellt, dass der TGF- /Smad-Signalweg die EMT fördert. [40].

BMPs sind eine Familie von 20 Zytokinen, die zur TGF-Superfamilie gehören. Sie spielen eine morphogenetische Rolle in der Embryonalentwicklung und bei der normalen Bildung vieler Gewebe. BMPs fördern die Osteoblastendifferenzierung und induzieren die Knochenbildung. Sie induzieren auch die Nieren- und Herzentwicklung und regulieren die hepatische Glukosehomöostase und die Fruchtbarkeit. [42] BMPs induzieren die Zellregeneration und vermitteln die Apoptose von Myofibroblasten. BMP-7 spielt nachweislich eine Rolle bei der Verringerung der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen in Epithelzellen des Nierengewebes und wirkt der TGF- /Smad-Signalübertragung in diesen Zellen entgegen. [39]

Gremlin-1 hemmt BMP-2, -4 und -7. Die Hemmungsmechanismen können entweder extra- oder intrazellulär sein. Durch extrazelluläre Bindung an sezernierte BMPs verhindert Gremlin-1 die Bindung des BMP-Liganden an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Durch intrazellulären Antagonismus bindet Gremlin-1 das BMP-Vorläuferprotein und verhindert die Sekretion des reifen Proteins. Darüber hinaus hat Gremlin-1 die Fähigkeit sich direkt mit Oberflächenproteinen (wie Slit-Proteinen) in Gefäßzellen zu binden. [34]

Die Überexpression von Gremlin-1 führt zu einer Verringerung der BMP-Signalisierung und zu einer Hochregulierung der profibrotischen TGF-Signalisierung. TGF- selbst induziert die Gremlin-1-Produktion (positive Rückkopplung). Durch die Förderung der TGF-induzierten EMT induziert Gremlin-1 die ECM-Akkumulation und trägt zur Fibrinogenese bei. [34]

### 1.5.2 Gremlin-1 und Fibrose

Die Expression von Gremlin-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Nierenembryogenese, aber seine Expression soll in der normalen erwachsenen Niere stumm sein. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) wird Gremlin-1 reaktiviert und induziert die EMT. EMT ist ein Mechanismus, mit dem das Epithel der erwachsenen Niere auf Verletzung reagiert. Während dieses Prozesses werden die Zellen des verletzten Epithels, die durch phänotypische Plastizität gekennzeichnet sind, ihre epithelialen Eigenschaften los und wandeln sich in mesenchymale Zellen um, wobei sie ihre Polarität und Zelladhäsion verlieren und an Beweglichkeit gewinnen. [43]

Die Epithelzellen vermeiden die Apoptose und wandern in das Tubulointerstitium ein, aufgrund ihres Fibroblasten-Phänotyps. Durch diesen Mechanismus wird die Fibrogenese im Tubulointerstitium gefördert. Es wird angenommen, dass die Gremlin-1-Expression zu einer Anhäufung von ECM im Interstitium und einer atrophierten Tubulusstruktur führen, was schließlich zur Nierenfibrose beiträgt. [39] Mit dem gleichen Mechanismus soll, die Grimm1 Expression in parietalen epithelialen glomerulären Zellen von Patienten mit pauciimmunne Glomerulonephritis, eine Rolle in dem pathogenetischen Profil der Erkrankung spielen. TGF- $\beta$  induziert die Gremlin-1-Expression. Die parietalen Epithelzellen durchlaufen eine EMT und wandeln sich in Fibroblasten um, die zur Narbenbildung der halbmondförmigen Glomerulonephritis beitragen. [40]

Es wird angenommen, dass Gremlin-1 durch die Hemmung von BMP-4-vermittelten Signalen eine wichtige Rolle bei der Lungenentwicklung spielt. Sowohl der Verlust als auch die Überexpression des Gens führen zu einer abnormen Lungenbildung. Eine erhöhte Expression von Gremlin-1 wird im Lungeninterstitium von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose (IPF) festgestellt. IPF ist eine Krankheit, die durch Fibroproliferation, Gewebeerstörung und übermäßige Ansammlung von ECM gekennzeichnet ist. Die Zellen des verletzten Lungenepithels durchlaufen eine EMT als Reaktion auf die TGF-Signalisierung. [44] BMPs induzieren normalerweise die Regeneration des Epithels und die Apoptose der Myofibroblasten. Gremlin-1 als BMP-Inhibitor hemmt diesen Prozess und führt zu einer ECM-Akkumulation. Dieser Mechanismus zeigt, dass Gremlin-1

eine wichtige Rolle bei IPF spielt. Darüber hinaus induziert die Überexpression von Gremlin-1 in pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen die Apoptose des Endothels und die unkontrollierte Proliferation der glatten Muskelzellen. Dies fördert die Gefäßentzündung und trägt vermutlich zur pulmonalen Hypertonie bei. [34]

Leberfibrose ist eine fortschreitende Erkrankung, die durch verschiedene Ursachen wie Virushepatitis, parasitäre Infektionen, Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen, angeborene Anomalien sowie Drogen- und Alkoholmissbrauch verursacht wird. All diese Erkrankungen führen zu einer chronischen Leberschädigung und tragen zu Leberfunktionsstörungen, Fibrose und schließlich Zirrhose bei. In den aktivierten hepatischen Stellatzellen (HSC) der fibrotischen Leber von Mäusen wird eine erhöhte Expression von Gremlin-1 festgestellt. Zytokine, TGF- $\beta$  und oxidativer Stress induzieren die Aktivierung der ruhenden hepatischen Stellatzellen. Durch die Aktivierung verlieren die Zellen einen Teil ihrer Retinoid-Speicherkapazität und verwandeln sich in Myofibroblasten. Die Zellproliferation wird exzessiv und es wird zunehmend ECM produziert. Gleichzeitig wird während der HSC-Transdifferenzierung die Expression von MMP-Inhibitoren wie den Gewebsinhibitoren für Metalloproteinasen (TIMP) TIMP-1 und -2 und dem Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 induziert. Folglich wird der Abbau der ECM verringert. Es wird angenommen, dass die Kombination aus erhöhter ECM-Produktion und verringertem Abbau aufgrund der Gremlin-1-Expression auf Leberzellen zu ECM-Akkumulation und Fibrose führt. Schließlich könnte Gremlin-1 als spezifischer Marker für die hepatische Fibrogenese verwendet werden, und die Hemmung seiner Expression könnte für Patienten, die an dieser Krankheit leiden, von Vorteil sein. [41]

## **1.6 Kernspintomographie des Herzens**

Die kardiale Kernspintomographie (MRT) ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, das in der Kardiologie vielfältige Anwendung findet. [45] Mit der kardialen MRT können verschiedene Aspekte des Herzens wie die Myokardstruktur, die Myokardfunktion, die Myokarddurchblutung und die Gewebecharakterisierung beurteilt werden. [46] In Bezug auf Patienten mit nicht ischämischer

Kardiomyopathie (NICM) kann die kardiale MRT wertvolle diagnostische und prognostische Informationen liefern. Zum Beispiel kann die kardiale MRT helfen den Entzündliche Prozess am Myokard zu identifizieren und zu charakterisieren bei einem Verdacht auf eine Myokarditis. [45] Studien haben gezeigt, dass die kardiale MRT im Vergleich zur endomyokardialen Biopsie eine hohe diagnostische Genauigkeit bei der Erkennung von Myokardentzündungen aufweist. [47] Darüber hinaus kann die kardiale MRT auch bei der Beurteilung der Funktion des Herzens und der Gewebecharakterisierung bei Patienten mit NICM hilfreich sein. Die Messung der Myokardvolumina und der Ejektionsfraktion mittels kardialer MRT kann dabei helfen die Myokardfunktion zu quantifizieren und Veränderungen im Laufe der Zeit zu verfolgen. [48] Die kardiale MRT kann auch zur Identifikation von nicht-ischämischen Myokardschäden, wie z.B. Fibrose oder entzündungsbedingten Gewebeveränderungen, beitragen. [49]

### **1.7 Aktuell Risikostratifizierung nach Leitlinie**

Die Risikostratifizierung von Patienten mit Nicht ischämischer Kardiomyopathie stellt weiterhin eine große klinische Herausforderung dar, da bestimmte gut etablierte Kriterien nur für eine Subgruppe von Patienten keine ausreichende prognostische Evaluation zulassen. Hierbei spielen die Durchführung von Bildgebungsverfahren wie dem MRT mittels Gadolinium Enhancement Verstärkung sowie die Bestimmung von verschiedenen Laborparametern eine wichtige Rolle. Wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, zeigen Patienten mit erhöhten Troponinwerten sowie erhöhten NT-proBNP Werten ein höheres Risiko im Verlauf ihrer Erkrankung an einem plötzlichen Herztod oder im Rahmen einer progredienten Herzinsuffizienz zu versterben. Die in der Leitlinie herangezogenen Kriterien beinhalten aktuell bestimmte EKG Kriterien, sowie die systolische LV-Funktion und die Symptomatik nach NYHA-Klassifikation. Kriterien wie elektrophysiologische Risikostratifizierung z.B. programmierte Kammerstimulation, Cardio-MRT und die Myokardbiopsie nur wenig Berücksichtigung bei der Bewertung des Risikos für den plötzlichen Herztodes. Die Indikation zur primärprophylaktischen ICD-Implantation wird ebenfalls anhand von diesen Kriterien in der Leitlinie festgelegt, hierbei spielt die hochgradig eingeschränkte Pumpfunktion mit einer

LVEF kleiner 35 % die Hauptrolle. Weitere Kriterien die ebenfalls mit dem Auftreten von ventrikulären Tachykardien, Kammerflimmern und dem plötzlichen Herztod assoziiert sind, wie bestimmte Verteilungsmuster von LGE im Kardio-MRT, finden zwar im Rahmen von klinischen Studien Berücksichtigung, sind jedoch weiterhin nicht in der aktuellen Leitlinie als Risikostratifizierende Maßnahmen etabliert. Insbesondere Patienten die bei der Risikostratifizierung durch das Raster der herkömmlichen klinischen Routine Diagnostik mit Echokardiografie, Laborparameter Bestimmung und Kardio-MRT fallen sind hier besonders gefährdet, dass sie obwohl sie unter einem erhöhten Risiko für den plötzlichen Herztod leiden keine intensivierten Risikostratifizierung und auch insbesondere keiner primärprophylaktischen ICD-Implantation zugeführt werden. Diese klinische Herausforderung, genau diese Risiko-Patienten zu identifizieren ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Aktuelle Studien zeigen, dass das Verteilungsmuster des LGE im Kardio-MRT ebenfalls mit dem Risiko für das Auftreten von ventrikulären Ereignissen und dem plötzlichen Herztod assoziiert werden kann [50] sodass bei betroffenen Patienten auch dieses Kriterium zur Entscheidung einer frühzeitigen ICD-Implantation herangezogen werden konnte. Insbesondere nach der DANISH-Studie [51] wird ebenfalls klar, dass die pauschale Versorgung mit einem primärprophylaktischen ICD bei dieser Patienten Kohorten mit nicht ischämischer Kardiomyopathie weitere Faktoren berücksichtigen müsste um eine für den Patienten prognostisch günstige risikoarme und nebenwirkungsarme Therapieentscheidung zu treffen. Hier finden insbesondere dann auch Begleiterkrankungen und Alter Einfluss in die Entscheidungsfindung, so z.B. empfiehlt die DANISH-Studie, dass Patienten über 68 Jahren mit nicht ischämischer Kardiomyopathie von einer primärprophylaktischen ICD-Implantation nicht mehr profitieren. Inwieweit dies als alleiniges Entscheidungsmerkmal das Kriterium Alter herangezogen werden sollte gilt es näher zu beleuchten. In diesem Zusammenhang spielt die Myokardbiopsie ebenfalls eine wichtige Rolle. Aktuell zeigten sich eine hohe inflammatorische Komponente sowie irreversible fibrotische Veränderungen, das sogenannte kardiale Remodelling, als prognostisch ungünstiger Faktor. Jedoch sind auch hier die Daten teilweise widersprüchlich bezüglich der prognostischen Bedeutung in der Myokardbiopsie bezüglich der Entscheidung einer

ICD-Implantation und Verhinderung des plötzlichen Herztodes. Aus diesem Grund sind die bereits etablierten Marker zur Bestimmung der kardialen Inflammation und Fibrose nur unzureichend welche in der klinischen Routine etabliert sind. Neue zusätzliche Bestimmungen von prognostischen Markern wie z.B. die myokardiale Expression des Fibrosemarker Gremlin-1 oder inflammatorischer Marker wie MHC-II, CD3 und CD68 könnten hier hilfreich sein. Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe in Vorarbeiten bereits zeigen, dass diese Marker bei einer Gruppe von Patienten mit nicht ischämischer Kardiomyopathie von prognostischer Bedeutung sind. Bislang ist die Bestimmung dieser zusätzlichen Marker in der Kardio-Pathologie noch nicht als Standard etabliert, sodass wir im Rahmen dieser Studie ebenfalls die Hypothese aufgestellt haben, dass die zusätzliche immunhistochemische Analyse bezüglich inflammatorischer und fibrotischer Marker von Zusatznutzen für unsere Risikopatienten die ein hohes Risiko für den plötzlichen Herztod haben jedoch ansonsten unauffällige klinische Parameter, wie unauffälliges Kardio-MRT, aufweisen günstig sein könnte. Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass eine erhöhte Gremlin-1 Expression in anderen Organerkrankungen ab einem bestimmten fortgeschrittenen Zeitpunkt der Erkrankung mit einer irreversiblen fibrotischen Veränderung assoziiert ist. Im Myokard kann die erhöhte Gremlin-1 Expression ebenfalls darauf hinweisen, dass ein kardiales Remodeling zum Zeitpunkt der Erkrankung nicht mehr möglich ist. Durch die zusätzliche Bestimmung der Gremlin-1 Expression wäre somit trotz einer eventuell besseren systolischen linksventrikulären Funktion, eine voranschreitende und im Verlauf irreversible Fibrose bei den Patienten zu detektieren. Somit kann gerade bei diesen Patienten mit nicht ischämischer Kardiomyopathie mit Einsatz zusätzlicher prognostischer Marker gewertet werden insbesondere wenn die eingeschränkte LV-Funktion und auch die Befunde im Kardio-MRT nicht wegweisend sind. Unser Ziel ist es daher durch eine ausführliche Diagnostik im Rahmen der Grunderkrankung ein intensiviertes Risikoassessments für Patienten mit nicht ischämischer Kardiomyopathie in die klinische Routine zu etablieren um eine frühzeitige prognostische Versorgung mit einem ICD zu ermöglichen, ein intensiviertes klinisches Monitoring zu etablieren und hierdurch langfristig nicht nur die Leitlinien für die für das Management von Patienten mit nicht ischämischer

Kardiomyopathie sondern auch die Leitlinien zur histopathologischen und immunhistochemischen Bestimmungen der Myokardbiopsien zu erweitern. Hierdurch können insbesondere Risikopatienten identifiziert werden die aufgrund der aktuellen Leitlinien Empfehlung mit eingeschränkter LV-Funktion und erhöhten kardialen Markern dennoch zu einer Risikogruppe gehören welche trotz einer erhaltenen LV-Funktion z.B. mit einem ICD versorgt werden.

### **1.8 Ziele der Arbeit**

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression von Gremlin 1 in Endomyokardbiopsien mit Myokardfibrose, linksventrikulärer Dysfunktion und einer ungünstigen Prognose bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz verbunden ist. Gremlin 1 ist ein Antagonist der morphogenetischen Knochenproteine (BMPs) im TGF-Beta-Signalweg. Bei Erwachsenen wurde festgestellt, dass Gremlin-1 bei entzündlichen Erkrankungen und chronisch-fibrotischem Umbau, insbesondere in der Lunge und der Niere, eine wichtige Rolle spielt. Über die Rolle von Gremlin-1 in Kardiomyozyten gibt es keine Erkenntnisse.

Unser Ziel bestand darin zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der Expression von Gremlin-1 im Myokard und der nicht-invasiven Visualisierung von Fibrose mittels kontrastverstärkter kardialer Magnetresonanztomographie (MRT) besteht.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Antikörper

##### Primäre Antikörper

Antigen	Wirt	Reaktivität	Manufaktur
CD3	Maus, monoklonal	menschlich	Novocastra Laboratories, Newcastle on Tyne, UK
CD68	Maus, monoklonal	menschlich	Dako, Hamburg, Deutschland
HLA-DR- $\alpha$	Maus, monoklonal	menschlich	Dako, Hamburg, Deutschland
Gremlin 1	Kaninchen, monoklonal	menschlich	Biozol/Abnova, Eching, Deutschland
Gremlin 1	Kaninchen, monoklonal	Maus	Abcam, Cambridge, UK
Actin	Kaninchen, monoklonal	Maus	Abcam, Cambridge, UK

##### Sekundäre Antikörper

Anti-maus	Kaninchen, polyklonal	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-kaninchen	Ziege, polyklonal	Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-kaninchen	Esel	Kaninchen	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

##### Isotyp-Kontrollen

Isotyp	Arten	Manufaktur
IgG1	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland
IgG, polyclonal	Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland

#### 2.1.2 Kits

iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, Munich, Deutschland
Biorad Protein Assay	Bio-Rad, Munich, Deutschland
RNEasy Mini kit for RNA Isolation	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kit	Vector, Burlingame, USA

#### 2.1.3 Software

ImageJ Software	National Institutes of Health, USA
SPSS Software version 19.0	IBM, USA

#### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Acid fuchsin	Sigma, St. Louis, USA
Citric acid	Sigma, St. Louis, USA
Eosin powder	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Giemsa-solution	Sigma, St. Louis, USA
Glacial acetic acid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hemalum stock solution	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydrogen peroxide	Merck, Darmstadt, Deutschland
Immobilon-FL PVDF Membrane	Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland
Light Green SF Yellowish	Sigma, St. Louis, USA
Orange G	Sigma, St. Louis, USA
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Protein block serum free	Dako, Hamburg, Deutschland
RNAlater Life	Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Roti Histol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti Histokitt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium phosphotungstate hydrate	Sigma, St. Louis, USA
Trisodium citrate dihydrate	Merck, Darmstadt Deutschland
Weigert's iron hematoxylin Solution A	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Weigert's iron hematoxylin Solution B	Roth, Karlsruhe, Deutschland

#### Flüssige Acitinsäure

200 ml destilliertes Wasser

15 Tropfen Eisessig-Saure

#### Citratpuffer, pH6:

41 ml 0,1M Trinatriumcitrat-Dehydrat (2,94 g gelöst in 100 ml destilliertes Wasser)

9 ml 0.1 M Zitronensäure (1.92 g aufgelöst in 100ml destilliertes Wasser)

450 ml dest. Wasser, pH-Wert vor der Verwendung auf 6,0 eingestellt

1%ige Eosin-Färbelösung:

200 ml destilliertes Wasser

2 g Eosin-Pulver

1 Tropfen Eisessig

Giemsa-Färbelösung:

80 ml destilliertes Wasser

20 ml Giemsa-Lösung (Sigma)

3-5 Tropfen Eisessig

Hämalum-Färbelösung:

160 ml destilliertes Wasser

40 ml Hämalum-Stammlösung

Filtriert durch gefaltetes Filterpapier

Hellgrüne SF Gelbliche Färbelösung:

0,6 g Hellgrün SF Gelblich

0,6 ml Eisessig

300 ml destilliertes Wasser

Wolframtophosphorsäure - Orange G Färbelösung:

12 g Natrium-Phosphorwolframat-Hydrat

6 g Orange G

300 ml destilliertes Wasser

Säurefuchsin-Ponceau

0,2 g Ponceau S

0,1 g Saures Fuchsin

0,6 ml Eisessig

300 ml destilliertes Wasser

### Eisenhämatoxylin Lösung nach Weigert:

100 ml Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung A

100 ml Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung B

### **2.1.5 Klinische und Laborausrüstung**

Biopsy forceps	Cordis Corporation, Waterloo, Belgium
iE33 Transthoracic echocardiography	Philips Medical Systems, Hamburg, Deutschland
Odyssey infrared imaging system	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
PerfectBlue Semi-dry Electro Blotter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
XCell Sure Lock Mini-Cell	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

### **2.2 Studiendesign**

In die Studie wurden 198 Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz eingeschlossen, zwischen 2007 und 2013, welche sich einer Endomyokardbiopsie mit Gremlin-1-Färbung und einer kontrastverstärkten kardialen MRT (1,5-Tesla-Scanner; Siemens Medical Systems, Deutschland) unterzogen haben. Die Gremlin-1-Färbung wurde als "negativ" (Score 1 oder 2) oder "positiv" (Score 3 oder 4) eingestuft. Die Werte für Gremlin-1 wurden von 2 Untersuchern verblindet aus 1-2 Schnitten pro Färbung ermittelt. Für die LGE-Bildgebung wurde eine zweidimensionale inversion-recovery segmented k-space gradient-echo MR sequence benutzt. Die MRT-Bilder wurden 10-15 Minuten nach intravenöser Injektion von 0,15 mmol pro Kilogramm Körpergewicht Gadobutrol (Gadovist, Bayer Healthcare, Deutschland) in kurz- und langachsigen Ansichten aufgenommen. Zur Bestimmung der linksventrikulären Auswurfraction wurden das enddiastolische und das endsystolische Volumen verwendet.

### **2.3 Endomyokardiale Biopsien**

Bei allen Patienten wurde aus diagnostischen Gründen eine Endomyokardbiopsie durchgeführt. Mindestens sechs Proben mit einem Durchmesser von 1-3 mm wurden mit einem speziellen Biopom (Biopsy Forceps; Cordis Corp) über 7-F-

Koronarführungskatheter hauptsächlich aus dem rechten Ventrikelseptum (84,1 %) entnommen. Die Biopsieproben wurden unter sterilen Bedingungen für die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE), Masson Trichrom und Giemsa aufbereitet. Vier µm dicke, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch analysiert. Andere Proben wurden tiefgefroren oder mit RNA-Later fixiert (Ambion, Foster City, Kalifornien), um virale Genome mittels Polymerase-Kettenreaktion nachzuweisen (Parvovirus B19, humane Herpesviren der Typen 6, 7 und 8, Herpes-simplex-Viren, Enterovirus-Spezies, Adenoviren, Influenza A und B, humanes Cytomegalovirus, Varizella-Zoster-Virus und Epstein-Barr-Virus).

Für den Nachweis der Gremlin1-Expression wurde Anti-Gremlin-1 (Biozol/Abnova, Eching, Deutschland) verwendet. Es wurden Isotyp-Kontrollantikörper nach Standardprotokoll (Dako) und entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper (Dako) verwendet. Zur Analyse der myokardialen Expression von Gremlin-1 wurde ein semiquantitatives Bewertungsschema verwendet, das von 1 (sehr geringe oder gar keine Expression) bis 4 (sehr starke Expression) reichte, wie zuvor beschrieben. Die Gremlin-1-Färbung wurde als "negativ" (Wert 1 oder 2) oder "positiv" (Wert 3 oder 4) eingestuft. Zwei Untersucher ermittelten die Werte für Gremlin-1 in verblindeter Weise aus 1-2 Schnitten.

Das Ausmaß der kardialen Fibrose wurde wie zuvor beschrieben quantitativ analysiert und als nicht/schwach, mäßig oder schwer eingestuft.

## **2.4 Endpunkt der Studie**

Der Endpunkt der Studie war eine Kombination aus allen Todesursachen innerhalb eines Nachbeobachtungszeitraums von 8 Jahren. Um das Auftreten eines Endpunkts zu bestimmen, wurden alle klinischen Ereignisse von einem unabhängigen Endpunktausschuss von Ärzten überprüft. Die Kliniker, die für die Entscheidung über eine Rehospitalisierung zuständig waren, waren gegenüber den Ergebnissen der myokardialen Gremlin-1-Expression verblindet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv bei Patienten mit und ohne Nachweis von Late Gadolinium Enhancement in der MRT

Insgesamt wurden 198 Patienten mit nicht ischämischer Kardiomyopathie untersucht. Die Patienten waren im Durchschnitt 53 Jahre alt, 75% waren Männer. In der durchgeführten MRT konnte bei 117 Patienten (59 %) ein Late-Gadolinium-Enhancement nachgewiesen werden in Vergleich zu den 81 Patienten (41 %), bei welchen kein LGE in der MRT nachweisen werden konnte. Insgesamt waren 75 % der Patienten (n=148) männlich, in der Gruppe mit LGE Nachweis waren es 78 % in Gegensatz zu der Gruppe ohne LGE Nachweis, in welcher nur 70 % der Patienten männlich waren (p=0.238). Der durchschnittliche Body-Mass-Index lag in beiden Gruppen bei 26 kg/m<sup>2</sup> (p=0.678). Die Symptome der Patienten wurden mittels der NYHA-Klassifizierung eingeteilt und es zeigte sich bei 80 % der Patienten mit LGE Nachweis eine Symptomatik der NYHA-Klasse  $\geq$  II, in Vergleich zu den Patienten ohne LGE Nachweis welche eine Symptomatik der NYHA-Klasse  $\geq$  II bei 75% aufwiesen (p=0.398). Weitere MRT Befunde zeigten bei 9 Patienten mit positivem LGE ein Ödem am Herzmuskel, in Gegensatz zu nur einem Patienten in der Gruppe ohne LGE Nachweis (p=0.042). Zudem lag der gemessene linksventrikuläre enddiastolische Diameter in der ersten Gruppe bei 55 (59-61) mm, in Vergleich zu den Patienten der zweiten Gruppe, welche einen LVEDD von 51 (46-58) mm hatten (p=0.029). Verschiedene Laborparameter wurden bestimmt, darunter das BNP welches einen durchschnittlichen Werte von 436 (102-1948) ng/l aufweisen konnte, die Gruppe mit LGE Nachweis zeigte einen BNP-Wert höher als die Vergleichsgruppe ohne LGE Nachweis, mit einem Wert von 521 (123-2475) ng/l im Gegensatz zu 331 (63-1838) (p=0.270). Das hochsensitive Troponin I lag in der LGE positiven Gruppe bei 0.04 (0.00-0.14)  $\mu$ g/l, wobei in der Gruppe ohne LGE Nachweis der Wert bei 0.00 (0.00-0.06)  $\mu$ g/l lag (p=0.031). Der durchschnittliche Wert der CK zeigte sich bei 97 U/l ohne dass signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden konnten (p=0.404), ebenso war der durchschnittliche CRP-Wert mit 0.44 mg/dl ähnlich in beiden Gruppen (p=0.561). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion war bei den Patienten mit Nachweis von LGE signifikant geringer, mit einem

durchschnittlichen Wert von 37 (28-52) % in Vergleich zu den Patienten ohne LGE in der MRT, welche eine LVEF von 45 (35-56) % hatten ( $p=0.014$ ). Zudem zeigte sich die LVEF auch im Follow-up weiterhin niedriger bei den Patienten der ersten Gruppe mit einem Wert von 45 (30-55) %, verglichen zu der zweiten Gruppe welche einen Wert von 50 (36-55) % zeigte ( $p=0.054$ ). Der systolische Pulmonalarteriendruck, lag bei 29 mmHg ohne signifikanten Unterschied in beiden Gruppen ( $p=0.721$ ). Durch die endomyokardialen Biopsien konnte bei 23 % der Patienten mit LGE Nachweis ein Virus nachgewiesen werden, in Gegensatz zu den Patienten der zweiten Gruppe, bei welchen in 33 % der Fälle ein Virus nachgewiesen werden konnte. Durch die Biopsie konnte die Fibrose in den gewonnenen Proben ermittelt werden. Bei insgesamt 13 % aller Patienten zeigte sich eine geringe Fibrose, davon waren 10 (9 %) Patienten von der Gruppe mit LGE Nachweis und 15 (19 %) ohne LGE Nachweis in der MRT ( $p=0.241$ ). Eine mäßige Fibrose konnte bei 57 Patienten (29 %) durch die Biopsie nachgewiesen werden, in der ersten Gruppe waren es 29 % der Patienten und in der zweiten 28 % ( $p=0.241$ ). eine ausgeprägte Fibrose konnte bei 42 Patienten insgesamt ermittelt werden, 24 Patienten (21 %) gehörten zu der Gruppe mit LGE Nachweis und 18 Patienten (22 %) zu der Gruppe ohne LGE Nachweis. Das Proteinkomplex MHCII und das CD68 Molekül konnten in 58 % und 59 % der Patienten nachgewiesen werden, ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vorhanden war ( $p=0.800$  und  $p=0.780$ ). Das CD3 Protein konnte in 40 % ( $n=79$ ) aller Proben nachgewiesen werden, in der ersten Gruppe bei 49 Patienten (42 %) und in der zweiten Gruppe bei 30 Patienten (37 %) ( $p=0.494$ ).

**Tabelle 1.** Ausgangsmerkmale der LGE-positiven vs. LGE-negativen Patienten

Parameter	Alle Patienten (n=198)	LGE positive (n=117, 59%)	LGE negative (n=81, 41%)	p*
<i>Klinische Merkmale</i>				
Durchschnittsalter (J)	53 (44-66)	54 (39-69)	53 (45-61)	0.467
Männlich	148 (75%)	91 (78%)	57 (70%)	0.238
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 (23-30)	26 (24-30)	26 (22-31)	0.678
NYHA ≥II	155 (78%)	94 (80%)	61 (75%)	0.398
<i>Ergebnisse der kardialen MRT.</i>				
Ödem	10 (5%)	9 (8%)	1 (1%)	<b>0.042</b>
LVEDD (mm)	54 (47-60)	55 (49-61)	51 (46-58)	<b>0.029</b>
<i>Laborparameter</i>				
BNP (ng/l)	436 (102-1948)	521 (123-2475)	331 (63-1838)	0.270
hsTnl (µg/l)	0.03 (0.00-0.11)	0.04 (0.00-0.14)	0.00 (0.00-0.06)	<b>0.031</b>
CK (U/l)	97 (63-153)	100 (66-178)	92 (54-143)	0.404
CRP (mg/dl)	0.44 (0.11-1.64)	0.39 (0.10-1.46)	0.53 (0.11-1.95)	0.561
<i>Andere Parameter</i>				
Virusbiopsie pos.	54 (27%)	27 (23%)	27 (33%)	0.111
PAP <sub>sys</sub> (mmHg)	29 (24-37)	29 (24-37)	30 (24-37)	0.721
LVEF (%)	43 (30-53)	37 (28-52)	45 (35-56)	<b>0.014</b>
LVEF FU (%)	50 (35-55)	45 (30-55)	50 (36-55)	<b>0.054</b>
Fibrose				0.241
- (milde)	25 (13%)	10 (9%)	15 (19%)	
- (mittlere)	57 (29%)	34 (29%)	23 (28%)	
- (schwere)	42 (21%)	24 (21%)	18 (22%)	
CD68 positiv	115 (58%)	67 (57%)	48 (59%)	0.780
CD3 positiv	79 (40%)	49 (42%)	30 (37%)	0.494
MHCII positiv	117 (59%)	70 (60%)	47 (58%)	0.800

Die Werte sind n (%) oder Median (Interquartilbereich). BMI - Body-Mass-Index, BNP - Brain Natriuretic Peptide, CRP - C-reaktives Protein, CK - Kreatinkinase, LGE - späte Gadolinium-Verstärkung, LVEDD - linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion NYHA - New York Heart Association, PAP<sub>sys</sub> - systolischer pulmonaler Druck geschätzt durch Echokardiographie, Pos. - positiv, hsTnl – hochsensitives Troponin I, J - Jahre.

### 3.2 Patientenkollektiv bei Patienten mit und ohne Nachweis von Gremlin 1 in der myokardialen Biopsie

Es wurde bei allen Patienten (n=198) eine myokardiale Biopsie durchgeführt um die Gremlin-1 Expression zu ermitteln. In den myokardialen Proben von 139 Patienten (70%) konnte das Gremlin-1 nachgewiesen werden, in Gegensatz zu den Proben der weiteren 59 Patienten (30%) welche das Gremlin-1 nicht nachweisen

konnten. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 53 Jahre (44-66). Insgesamt waren 75% der Patienten (n=145) Männer, in der Gruppe der Gremlin-1 positiven Patienten waren 73% der Patienten (n=101) männlich, in Vergleich zu der Patientengruppe ohne Gremlin-1 Nachweis wo der männliche Anteil bei 80% (n=47) lag (p=0.300). Der durchschnittliche Body-Mass-Index lag in beiden Gruppen bei 26 kg/m<sup>2</sup> (p=0.603). Die Symptomatik der Herzinsuffizienz wurde mittels der NYHA-Klassifizierung eingeteilt und bei 114 Patienten (82%) mit Gremlin-1 Nachweis zeigte sich eine Symptomatik der der NYHA-Klasse  $\geq$  II, wobei in der Gruppe ohne Gremlin-1 Nachweis 41 Patienten (70%) eine Symptomatik der der NYHA-Klasse  $\geq$  II vorlag (p=0.051). Zudem wurde weitere Parameter in der durchgeführten MRT ermittelt. Durch die MRT konnten wir bei 65% der Patienten (n=90) mit Gremlin-1 Nachweis in der Biopsie Late-Gadolinium-Enhancement nachweisen, in Gegensatz zu der Gruppe ohne Gremlin-1 Nachweis, bei welchen wir nur bei 49% der Patienten (n=27) Late-Gadolinium-Enhancement nachweisen konnten (p=0.013). Die durchgeführte kardiale Magnetresonanztomographie zeigte ein myokardiales Ödem bei 7 Patienten (5%) der ersten Gruppe und bei 3 Patienten (5%) der zweiten Gruppe (p=0.977). Der linksventrikuläre enddiastolische Diameter zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die Patienten mit Gremlin-1 Nachweis hatten einen LVEDD von 55 (49-61) mm, verglichen zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis in der Biopsie, welche einen LVEDD von 50 (44-57) mm (p=0.013). Verschiedene Laborparameter wurden bestimmt und untersucht. Das BNP zeigte einen durchschnittlichen Wert von 436 (102-1948) ng/l, die Patienten mit Gremlin-1 Nachweis zeigten einen BNP-Wert von 289 (90-812) ng/l, welcher deutlich niedriger war in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis, welche einen Werte von 1790 (326-3407) ng/l aufweisen konnten (p=0.001). Das hochsensitive Troponin I zeigte einen durchschnittlichen Wert von 0.03 (0.00-0.19)  $\mu$ g/l, ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p=0.977). Der Kreatinkinase-Wert (CK) lag im Schnitt bei 97 (63-153) U/l, ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p=0.867), ebenso zeigte sich das CRP mit einen Wert von 0.44 (0.11-1.64) mg/dl ohne relevante Unterschiede (p=0.347). Die myokardiale Proben wurden auch auf Viruslast untersucht, bei 39 Patienten (28%) mit Gremlin-1

Nachweis konnte eine Viruslast in der Biopsie nachgewiesen werden, in Vergleich zu 15 Patienten (25%) in der Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis welche eine Viruslast in deren Biopsien nachwiesen werden konnte ( $p=0.703$ ). Durch die myokardiale Biopsien wurde auch die Fibrose des Myokards ermittelt, eine milde Fibrose zeigte sich bei 12% aller Patienten ( $n=24$ ), nur 4% der Patienten ( $n=5$ ) mit Gremlin-1 Nachweis zeigten eine milde Fibrose des Myokards, in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis, welche bei 34% ( $n=20$ ) milde fibrotische Veränderungen zeigten ( $p<0.001$ ). Eine mittlere Fibrose wurde bei insgesamt 29% aller Patienten ( $n=57$ ) nachgewiesen, in der ersten Gruppe ergab sich eine mittlere Fibrose bei 35% der Patienten ( $n=48$ ), in Gegensatz zu der zweiten Gruppe bei welcher eine mittlere Fibrose bei nur 15% der Patienten ( $n=9$ ) gezeigt werden konnte ( $p<0.001$ ). Eine schwere fibrotische Veränderung des Myokards zeigte sich bei 21% aller Patienten ( $n=42$ ), in den Proben der Patienten mit Gremlin-1 Nachweis konnte eine Fibrose in 28% der Fälle ( $n=39$ ) ermittelt werden, wobei die Proben der Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis nur bei 5% aller Fälle ( $n=3$ ) eine schwere Fibrose zeigten ( $p<0.001$ ). Des weiteren wurde der systolische pulmonal Druck bestimmt, dieser lag durchschnittlich bei 29 (24-37) mmHg, ohne signifikanten Unterschied in beiden Gruppen ( $p=0.996$ ). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) im gesamten Patientenkollektiv zeigte sich mit einen durchschnittlichen Wert von 43 (30-53) %, die Patienten mit Gremlin-1 Nachweis in der Biopsie hatte eine LVEF von 35 (30-50) %, welche deutlich eingeschränkter war in Gegensatz zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis, welche eine LVEF von 50 (35-55) % nachweisen konnten ( $p=0.008$ ). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigte sich auch im Follow-up reduzierter bei den Patienten der ersten Gruppe in Vergleich zu der zweiten Gruppe (45% vs 52%) ( $p=0.009$ ).

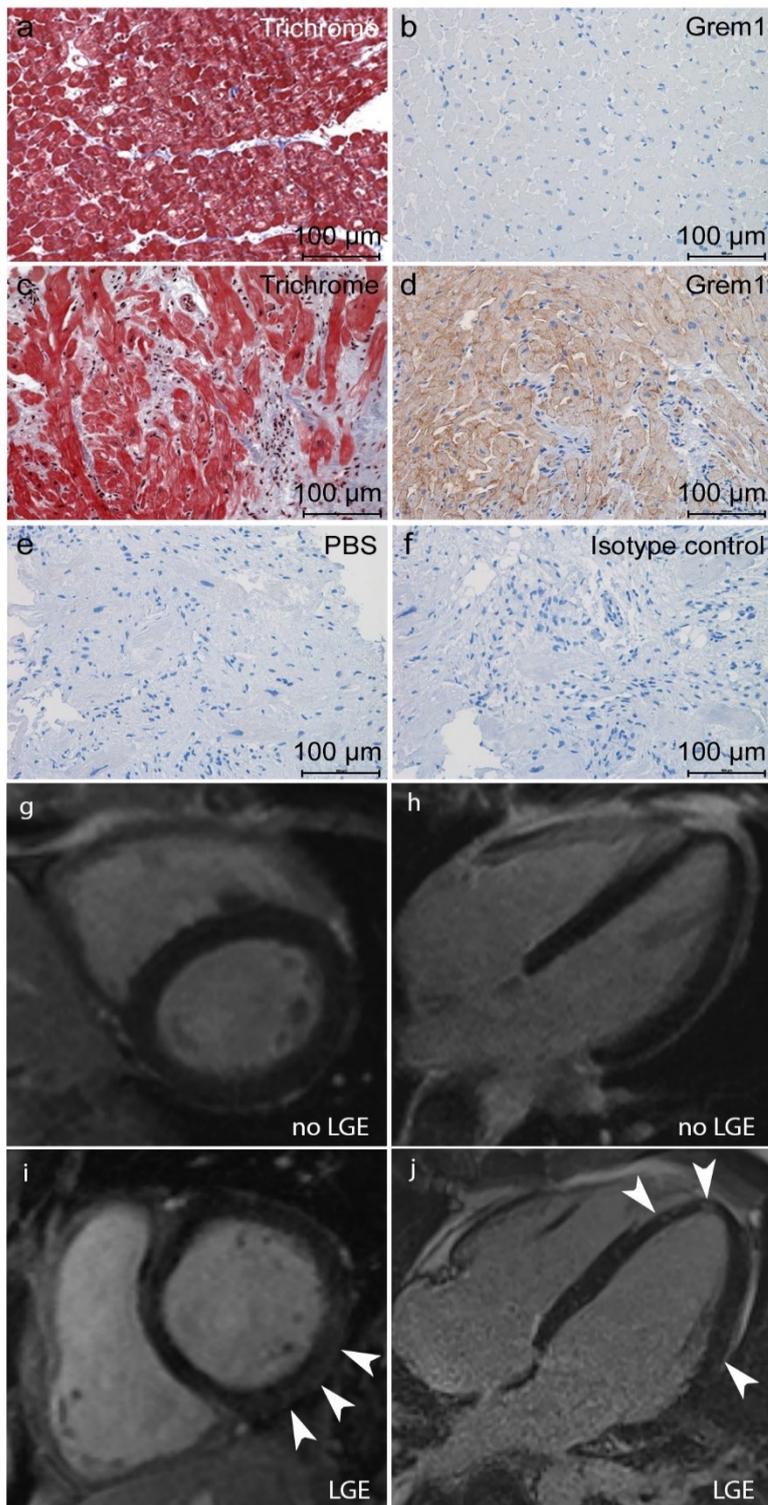
**Tabelle 2.** Ausgangsmerkmale der Patienten mit und ohne Nachweis von Grem-1 in der durchgeführten myokardialen Biopsie

Parameter	Alle Patienten (n=198)	Grem-1 positiv (n=139 , 70%)	Grem-1 negativ (n=59, 30%)	p*
<i>Klinische Merkmale</i>				
Durchschnittsalter (J)	53 (44-66)	52 (40-66)	54 (47-67)	0.392
Männlich	148 (75%)	101 (73%)	47 (80%)	0.300
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 (23-30)	26 (23-30)	26 (24-29)	0.603
NYHA ≥II	155 (78%)	114 (82%)	41 (70%)	<b>0.051</b>
<i>Ergebnisse der kardialen MRT</i>				
LGE	117 (59%)	90 (65%)	27 (49%)	<b>0.013</b>
Ödem	10 (5%)	7 (5%)	3 (5%)	0.977
LVEDD (mm)	54 (47-60)	55 (49-61)	50 (44-57)	<b>0.013</b>
<i>Laborparameter</i>				
BNP (ng/l)	436 (102-1948)	289 (90-812)	1790 (326-3407)	0.001
hsTnI (µg/l)	0.03 (0.00-0.11)	0.03 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.19)	0.802
CK (U/l)	97 (63-153)	96 (62-155)	101 (69-150)	0.867
CRP (mg/dl)	0.44 (0.11-1.64)	0.49 (0.12-1.47)	0.33 (0.07-2.29)	0.347
<i>Andere Parameter</i>				
Virusbiopsie pos.	54 (27%)	39 (28%)	15 (25%)	0.703
Fibrose				< 0.001
- (milde)	24 (12%)	5 (4%)	20 (34%)	
- (mittlere)	57 (29%)	48 (35%)	9 (15%)	
- (schwere)	42 (21%)	39 (28%)	3 (5%)	
PAP <sub>sys</sub> (mmHg)	29 (24-37)	29 (23-30)	30 (23-37)	0.996
LVEF (%)	43 (30-53)	35 (30-50)	50 (35-55)	<b>0.008</b>
LVEF FU (%)	50 (35-55)	45 (30-55)	52 (43-56)	<b>0.009</b>

Die Werte sind n (%) oder Median (Interquartilbereich). BMI - Body-Mass-Index, BNP - Brain Natriuretic Peptide, CRP - C-reaktives Protein, CK - Kreatinkinase, LGE - späte Gadolinium-Verstärkung, LVEDD - linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NYHA - New York Heart Association, PAP<sub>sys</sub> - systolischer pulmonaler Druck geschätzt durch Echokardiographie, Pos. - positiv, hsTnI - hochsensitives Troponin I, J - Jahre.

### **3.3 Die Gremlin-1 Expression ist assoziiert mit der Fibrose und dem LGE in der MRT**

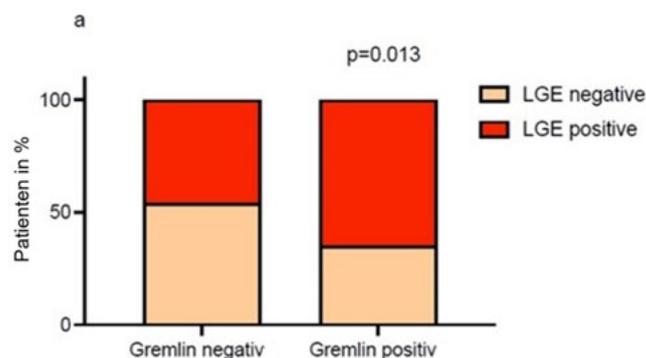
Alle Patienten erhielten neben der MRT auch eine endomyokardiale Biopsie, sodass die Korrelation zwischen LGE, Fibrose und Gremlin-1 Expression ermittelt werden konnte. In Abbildung 1 werden die histologische, immunhistologische und die MRT-Bilder dargestellt. In der Abbildung 1a zeigt sich eine geringe Fibrose in der histologischen Analyse, in Vergleich zu einer ausgeprägten Fibrose, welche in der Abbildung 1c dargestellt wird. Im Panel 1b zeigt sich in der immunhistologischen Analyse eine geringe Gremlin-1 Expression, in Gegensatz zu Panel 1d welches eine ausgeprägte Gremlin-1 Expression nachweist. In den Abbildungen 1e und 1f werden die negativen und positiv Kontrollen dargestellt. Panel 1g und Panel 1h zeigten ein MRT von einem Patienten ohne Nachweis von Late-Gadolinium-Enhancement, wobei in den Panels 1i und 1j die MRT eines Herzens mit LGE Nachweis inferior und apikoseptal darstellt wird.



**Abbildung 1:** Immunhistochemische Analyse der Myokardbiopsien (a-f) und Kernspintomographie des Herzens (g-j). (a) geringe Fibrose. (b) geringe Gremlin-1 Expression. (c) ausgeprägte Fibrose. (d) ausgeprägte Gremlin-1 Expression. (e) negativ Kontrolle (f) positiv Kontrolle, (g) und (h) MRT ohne LGE Nachweis. (i) und (j) MRT mit LGE Nachweis

### 3.4 Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten häufiger ein LGE in der MRT

Alle Patienten erhielten eine myokardiale Biopsie zur Detektion des Gremlin-1, in 70 % der Fälle (n=139) konnte dies mittels der immunhistologischen Analyse nachgewiesen werden. Bei 96 Patienten (65 %) mit Gremlin-1 Nachweis, zeigte sich in der MRT ein LGE, welches signifikant häufiger war als in der Gruppe ohne Gremlin-1, bei welchen nur bei 27 Patienten (46 %,  $p=0.013$ , Abbildung 2) die MRT ein Late-Gadolinium-Enhancement nachweisen konnte. Die Patienten die kein Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse aufweisen konnten, waren insgesamt 59 (30 %) und ein Late-Gadolinium-Enhancement konnte bei 27 Patienten (45 %) in Gegensatz zu 32 Patienten bei denen in der MRT das LGE nachgewiesen werden konnte.

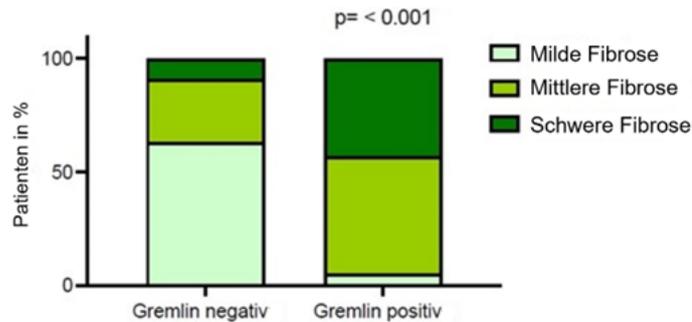


**Abbildung 2:** Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten signifikant häufiger ein LGE Nachweis in der MRT in Vergleich zu Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (65 % vs 46%,  $p=0.013$ ).

### 3.5 Die myokardiale Fibrose korreliert mit der Gremlin-1 Expression

Die endomyokardiale Biopsie erlaubte uns die Bestimmung und Einteilung der bestehenden Fibrose des Myokards bei allen Patienten. Die Patienten mit nachgewiesenen Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse zeigten häufiger einen schwere Fibrose in der Biopsie, in Vergleich zu den Patienten ohne Nachweis von Gremlin-1 (2 % vs 20 %,  $p= < 0.001$ ). Eine mittlere Fibrose zeigte sich insgesamt in 5 % der Patienten der Gruppe ohne Nachweis von Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse, in Vergleich zu 24 % in der Gruppe mit Gremlin-1

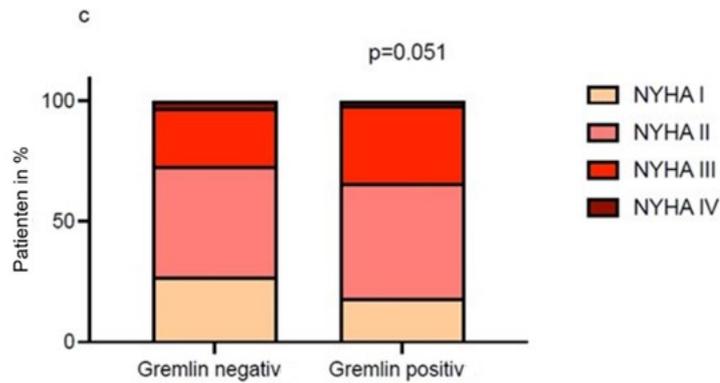
Nachweis ( $p < 0.001$ ). Eine milde Fibrose konnte signifikant häufiger bei den Patienten ohne Gremlin-1 Expression durch die Biopsie nachgewiesen werden (10 % vs 3 %,  $p < 0.001$ , Abbildung 3)



**Abbildung 3:** Patienten mit Gremlin-1 Expression in der immunhistologischen Analyse zeigten in der myokardialen Biopsie signifikant häufiger eine mittel-schwere oder schwere Fibrose ( $p < 0.001$ ).

### 3.6 Die Gremlin-1 Expression ist mit ausgeprägter Symptomatik assoziiert

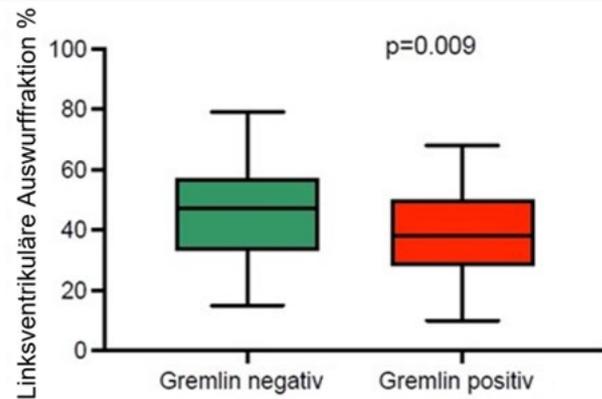
Die Symptomatik aller Patienten wurde nach NYHA-Klassifizierung eingeteilt. In der Gruppe ohne Gremlin-1 Nachweis, zeigten 30 % der Patienten Symptome der NYHA-Klasse I, in Vergleich zu 18 % in der Gruppe mit Gremlin-1 Expression. Symptome der NYHA II hatten 46 % der Patienten der ersten Gruppe und 47 % der Patienten in der zweiten Gruppe. Die Symptomatik konnte bei 24 % der Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis der NYHA III zugeteilt werden, in Vergleich zu 32 % der Vergleichsgruppe. Interessanterweise zeigten keine Patienten der ersten Gruppe Symptome der NYHA IV, in Gegensatz zu 4 % in der Gruppe mit Nachweis von Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse ( $p = 0.051$ , Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Patienten mit Gremlin-1 Nachweis zeigten häufiger Symptome der NYHA-Klasse III und IV in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (36 % vs 24 %,  $p=0.051$ ). Symptome der NYHA II waren ähnlich vorhanden in beiden Gruppen (47 % vs 46 %,  $p=0.051$ ). NYHA I Symptome hatten häufiger die Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (30 % vs 18 %,  $p=0.051$ ).

### 3.7 Die Gremlin-1 Expression korreliert mit eingeschränkter linksventrikuläre Ejektionsfraktion

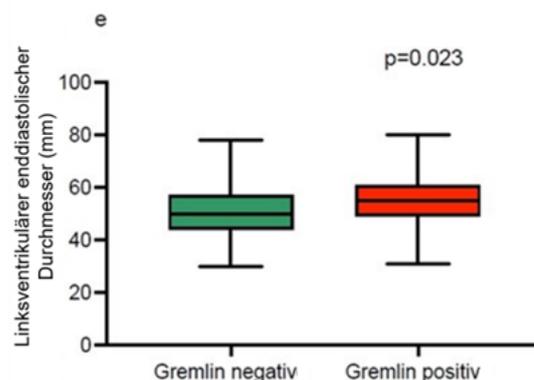
Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion wurde echokardiographisch bestimmt. Es zeigte sich, dass die LVEF der Patienten mit Nachweis von Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse, eine signifikant eingeschränktere LVEF hatten, in Vergleich zu den Patienten ohne Nachweis von Gremlin-1 in der durchgeführten Biopsie (39 % vs 45 %,  $p=0.009$ ), unabhängig von Late-Gadolinium-Enhancement in der MRT (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten eine signifikant reduzierte LVEF in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (39 % vs 45 %,  $p=0.009$ ).

### 3.8 Korrelation des linksventrikulären enddiastolischen Diameters und der Gremlin-1 Expression

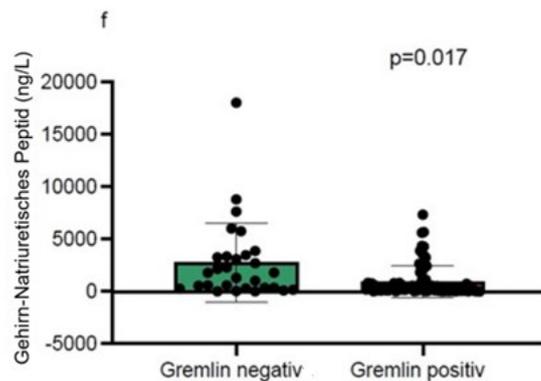
Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser ist mit der Gremlin-1 Expression assoziiert. Patienten mit Gremlin-1 Nachweis in der durchgeführten Biopsie, zeigten einen mittleren LVEDD-Wert von 54 mm, in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis, welchen einen Mittelwert von 51 mm aufwiesen ( $p=0.023$ , Abbildung 6)



**Abbildung 6:** Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten einen größeren LVEDD als Patienten ohne Nachweis von Gremlin-1 (54 mm vs 51 mm,  $p=0.023$ ).

### 3.9 Patienten mit Gremlin-1 Expression zeigten niedrigeren BNP-Wert

Bei allen Patienten wurde laborchemisch das Brain natriuretic Peptid (BNP) bestimmt. Dieser Wert ist erhöht bei Dehnung und Überlastung des Myokards. Die Patienten mit Gremlin-1 Nachweis zeigten einen niedrigeren Wert in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Expression in der Biopsie (2597 ng/l vs 1366 ng/l,  $p=0.017$ , Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Patienten ohne Gremlin-1 Expression zeigten einen höheren mittleren BNP-Wert in Vergleich zu der Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis (2597 ng/l vs 1366 ng/l,  $p=0.017$ ).

### 3.10 Die Patienten mit LGE Nachweis in der MRT zeigten häufiger die Gremlin-1 Expression in der Biopsie

In 117 von insgesamt 198 Patienten (59 %) konnte in der durchgeführten MRT ein Late-Gadolinium-Enhancement nachgewiesen werden und in 90 (77 %) von diesen Patienten konnte in der immunhistologischen Untersuchung das Gremlin-1 nachgewiesen werden, in Vergleich zu 27 Patienten, bei welchen das Gremlin-1 nicht zum Ausdruck kam (Tabelle 2). Das mittlere Alter der Patienten mit LGE Nachweis betrug 54 (39-69) Jahre, welches ähnlich bei den Patienten mit zusätzlichem Gremlin-1 Nachweis war, aber etwas geringer zu den Patienten mit einer immunhistologischen Analyse ohne Gremlin-1 Expression, welches ein mittleres Alter von 61 (47-69) Jahren aufwies ( $p=0.232$ ). Die Mehrheit der Patienten waren männlich in beiden Gruppen (76 % vs 85 %,  $p=0.291$ ). Zudem gab es keine relevanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis und der

ohne, bezüglich des Body-Mass-Index und der Symptomatik nach NYHA-Klassifizierung. Unter den bestimmten laborchemischen Parametern zeigte das hochsensitive Troponin I, die CK und das CRP keine signifikanten Unterschiede in den zwei Gruppen, im Gegensatz zu dem BNP welches in der Gruppe ohne Gremlin-1 Nachweis in der immunhistologischen Analyse mit einem mittleren Wert von 3173 ng/l (479-5832 ng/l) signifikant höher war als in der Vergleichsgruppe welche einen mittleren Wert von 422 ng/l (103-820 ng/l) aufweisen konnte ( $p=0.004$ ). Zusätzlich zeigte sich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion in der Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis bei 35 % (30-50 %), im Gegensatz zur zweiten Gruppe welche eine bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion aufweisen konnte mit einem mittleren Wert von 50 % (30-55 %,  $p=0.051$ ). Der systolische Pulmonalarterien- druck war in beiden Gruppen ähnlich (28 mmHg vs 33 mmHg,  $p=0.168$ ). In 22 (24 %) Patienten der Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis, konnte in der Biopsie auch ein Virus nachgewiesen werden, im Vergleich zu 5 Patienten (19 %) der Gruppe ohne Gremlin-1 Nachweis bei denen kein Virus in der Biopsie ermittelt werden konnte.

**Tabelle 3.** Ausgangsmerkmale der LGE-positiven und Gremlin-positiven vs. LGE-positiven und Gremlin-negativen Patienten

Parameter	Alle Patienten (n=117)	LGE positive Gremlin positive (n=90, 77%)	LGE positive Gremlin nega- tive (n=27, 23%)	p*
<i>Klinische Merkmale</i>				
Durchschnittsalter (J)	54 (39-69)	53 (39-68)	61 (47-69)	0.232
Männlich	91 (77,8%)	68 (76%)	23 (85%)	0.291
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 (24-30)	26 (23-30)	27 (25-29)	0.710
NYHA ≥II	94 (80%)	74 (82%)	20 (74%)	0.350
<i>Ergebnisse der kardialen MRT</i>				
Ödem	9 (8%)	6 (7%)	3 (11%)	0.457
LVEDD (mm)	55 (49-61)	55 (50-61)	53 (45-59)	0.137
<i>Laborparameter</i>				
BNP (ng/l)	521 (123-2475)	422 (103-820)	3173 (479-5832)	<b>0.004</b>
hsTnI (µg/l)	0.04 (0.00-0.14)	0.04 (0.00-0.11)	0.04 (0.00-0.21)	0.929
CK (U/l)	100 (66-178)	98 (64-180)	107 (73-129)	0.967
CRP (mg/dl)	0.39 (0.10-1.46)	0.49 (0.12-1.37)	0.31 (0.07-2.13)	0.417
<i>Andere Parameter</i>				
Virusbiopsie pos.	27 (23%)	22 (24%)	5 (19%)	0.522
PAP <sub>sys</sub> (mmHg)	29 (24-37)	28 (24-37)	33 (25-39)	0.168
LVEF (%)	40 (30-50)	35 (30-50)	50 (30-55)	<b>0.051</b>
LVEF FU (%)	45 (30-55)	45 (30-55)	51 (36-55)	0.149

Die Werte sind n (%) oder Median (Interquartilbereich). BMI - Body-Mass-Index, BNP - Brain Natriuretic Peptide, CRP - C-reaktives Protein, CK - Kreatinkinase, LGE - späte Gadolinium-Verstärkung, LVEDD - linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NYHA - New York Heart Association, PAP<sub>sys</sub> - systolischer pulmonaler Druck geschätzt durch Echokardiographie, Pos. - positiv, hsTnI – hochsensitives Troponin I, J - Jahre.

### 3.11 Patientenkollektiv ohne Nachweis von Late-Gadolinium-Enhancement in der MRT

Von 198 Patienten zeigte sich in der durchgeführten MRT ein Late-Gadolinium-Enhancement bei insgesamt 81 (41 %). In 60 % (n=49) dieser Fälle konnte auch das Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse nachgewiesen werden, in Gegensatz zu der zweiten Gruppe in welchen nur in 40 % (n=32) das Gremlin-1 nachgewiesen werden konnte (Tabelle 3). Die Patienten der beiden Gruppen hatten ein durchschnittliches Alter von 53 Jahren (45-61, p=0.992) und die Mehrheit war männlichen Geschlechts (70 %). Der durchschnittliche Body-Mass-Index lag bei 26 kg/m<sup>2</sup> (22-31 kg/m<sup>2</sup>, p=0.320). Die Symptomatik wurde nach NYHA-Klassifizierung eingestuft und lag bei den Patienten ohne LGE Nachweis in 82 %

(n=40) bei NYHA  $\geq$ II, in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis welche in 66 % (n=21) Symptome der NYHA $\geq$ II zeigten (p=0.102). Der linksventrikuläre enddiastolische Diameter war bei den Patienten der ersten Gruppe 55 mm (47-59mm) und in der zweiten 48 mm (44-57mm, p=0.125). Laborchemische Parameter wurden bei beiden Gruppen bestimmt und das hochsensitive Troponin I und die CK zeigten keine signifikanten Unterschiede. Das BNP war in der Gruppe der Patienten ohne Gremlin-1 Expression deutlich höher als bei den Patienten der Vergleichsgruppe, mit einem Wert von 1020 ng/l (272-2283 ng/l), verglichen zu 159 ng/l (47-518 ng/l, p=0.038). Der systolische Pulmonalarteriendruck wurde durchschnittlich bei 30 mmHg gemessen, ohne signifikante Unterschiede in beiden Gruppen (p=0.174). Die durchgeführte Biopsie konnte in 33 % aller Patienten ohne LGE-Nachweis einen Virus nachweisen, ohne eine signifikante Korrelation mit der Gremlin-1 Expression nachgewiesen werden konnte (p=0.748). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich bei der linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die Gruppe mit Gremlin-1 Expression zeigte eine deutlich eingeschränkere LVEF mit einen durchschnittlichen Wert von 35 % (30-50 %), in Gegensatz zu den Patienten ohne Gremlin-1 Expression in der immunhistologischen Analyse, welche eine LVEF von 50 % (38-57 %, p=0.016) aufweisen konnten.

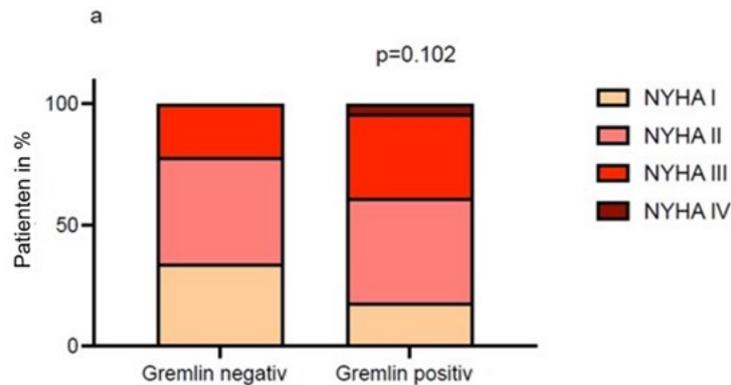
**Tabelle 4.** Ausgangsmerkmale der LGE-negativen und Gremlin-positiven vs. LGE-negativen und Gremlin-negativen Patienten

Parameter	Alle Patienten (n=81)	LGE negative Gremlin positive (n=49, 60%)	LGE negative Gremlin negative (n=32, 40%)	p*
<i>Klinische Merkmale</i>				
Durchschnitts- alter (J)	53 (45-61)	52 (45-64)	53 (45-58)	0.992
Männlich	57 (70%)	33 (67%)	24 (75%)	0.461
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 (22-31)	26 (23-33)	25 (22-29)	0.320
NYHA ≥II	61 (75%)	40 (82%)	21 (66%)	0.102
<i>Ergebnisse der kardialen MRT</i>				
Ödem	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	0.423
LVEDD (mm)	51 (46-58)	55 (47-59)	48 (44-57)	0.125
<i>Laborparameter</i>				
BNP (ng/l)	331 (63-1838)	159 (47-518)	1020 (272-2283)	<b>0.038</b>
hsTnI (µg/l)	0.00 (0.00-0.06)	0.00 (0.00-0.05)	0.00 (0.00-0.18)	0.451
CK (U/l)	92 (54-143)	92 (54-137)	89 (52-169)	0.609
CRP (mg/dl)	0.53 (0.11-1.95)	0.54 (0.14-1.69)	0.51 (0.05-3.51)	0.561
<i>Andere Parameter</i>				
Virusbiopsie pos.	27 (33%)	17 (35%)	10 (31%)	0.748
PAP <sub>sys</sub> (mmHg)	30 (24-37)	30 (27-42)	28 (21-37)	0.174
LVEF (%)	44 (30-55)	35 (30-50)	50 (38-57)	<b>0.016</b>
LVEF FU (%)	50 (36-55)	46 (35-55)	55 (45-60)	0.073

Die Werte sind n (%) oder Median (Interquartilbereich). BMI - Body-Mass-Index, BNP - Brain Natriuretic Peptide, CRP - C-reaktives Protein, CK - Kreatinkinase, LGE - späte Gadolinium-Verstärkung, LVEDD - linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NYHA - New York Heart Association, PAP<sub>sys</sub> - systolischer pulmonaler Druck geschätzt durch Echokardiographie, Pos. - positiv, hsTnI - hochsensitives Troponin I, J - Jahre.

### 3.11.1 Die Gremlin-1 Expression korreliert mit ausgeprägter Symptomatik

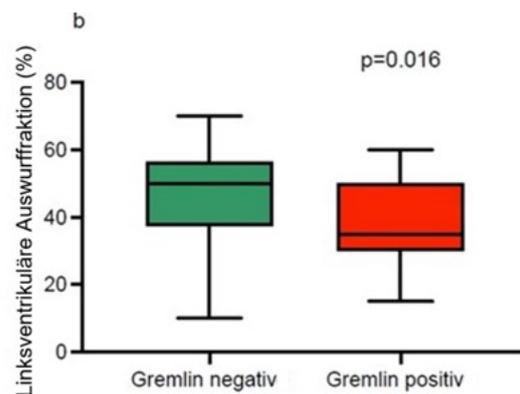
Insgesamt konnte bei 81 Patienten kein Late-Gadolinium-Enhancement nachgewiesen werden. Bei 49 (60 %) dieser Patienten zeigte sich in der immunhistologischen Analyse das Gremlin-1. Die Symptome der Patienten wurden nach NYHA Klassifizierung eingeteilt. In 82 % der Patienten mit Gremlin-1 Expression wurden die Symptome der NYHA-Klasse ≥II eingeteilt, in Vergleich zu nur 66 % in der Vergleichsgruppe (p=0.102). Zudem zeigte sich interessanterweise in der Gruppe ohne Gremlin-1 Expression keine Patienten mit Symptomen der NYHA-Klasse IV (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Patienten mit Gremlin-1 Expression und ohne LGE Nachweis waren symptomatischer in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis. (82% vs 66%,  $p=0.102$ ).

### 3.11.2 Patienten mit Gremlin-1 Expression haben eine reduzierte LVEF

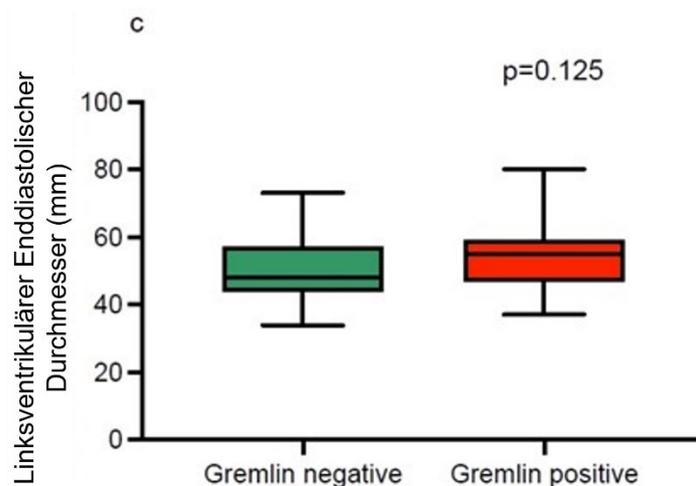
Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigte sich in der Patientengruppe mit Gremlin-1 Expression in der immunhistologischen Analyse deutlich eingeschränkter, mit einem durchschnittlichen Wert von 35 % (30-50 %) in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis, welche einen durchschnittlichen Wert von 50 % (38-57 %,  $p=0.016$ ) hatten (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Die LVEF war deutlich eingeschränkter bei den Patienten mit Gremlin-1 Expression in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse (35% vs 50%,  $p=0.016$ ).

### 3.11.3 Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser korreliert mit der Gremlin-1 Expression

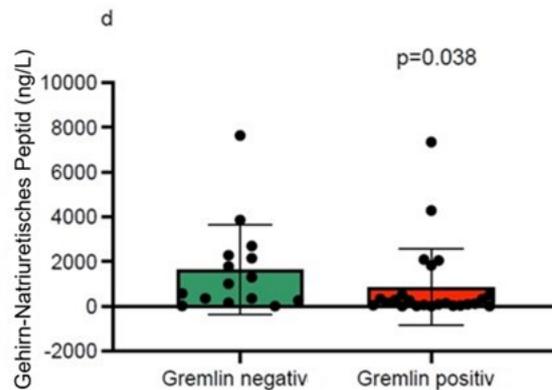
Die Patienten mit Gremlin-1 Expression und ohne LGE Nachweis in der MRT zeigte einen linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser von 55 mm (47-59 mm), welcher größer war in Vergleich zu der zweiten Gruppe, welche einen durchschnittlichen Wert von 48 mm (44-57,  $p=0.125$ ) aufweisen konnte (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Der LVEDD war größer in der Patienten Gruppe mit Gremlin-1 Nachweis in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 in der immunhistologischen Analyse (55 mm vs 48 mm,  $p=0.125$ ).

### 3.11.4 Die Gremlin-1 Expression korreliert mit höheren BNP-Werten

Es wurden mehrere laborchemische Parameter bei allen Patienten bestimmt. Ein deutlicher Unterschied bestand bei den BNP Werten, welche bei den Patienten mit Gremlin-1 Expression mit einem Wert von 1020 ng/l (272-2283 ng/l) deutlich höher waren als bei den Patienten ohne Gremlin-1 Expression die einen Mittelwert von 159 ng/l (47-518 ng/l,  $p=0.038$ ) (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Der BNP wert bei Patienten ohne LGE Nachweis, war signifikant höher bei Patienten mit Gremlin-1 Expression in Vergleich zu den Patienten ohne Gremlin-1 Nachweis (1020ng/l vs 159ng/l,  $p=0.038$ ).

### 3.12 Intensivierte Risikostratifizierung sinnvoll - „Non-Survivors“ hatten bei Diagnosestellung eine bessere linksventrikuläre LVEF trotz erhöhter Mortalität

Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie, welche den Endpunkt Tod jeglicher Ursache innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums von 8 Jahren erreicht haben, bilden die Hochrisikokohorte, welche von einer intensivierten Risikostratifizierung profitieren könnten. In unserer Kohorte verstarben 17 Patienten (9 %). Das durchschnittliche Alter dieser Patienten war 59 Jahre (49-69 Jahre), also nicht signifikant höher als das mittlere Alter der Patienten die überlebt haben (53 Jahre,  $p=0.347$ ). Die Mehrheit der Patienten waren Männer in beiden Gruppen. Die Patienten welche den Endpunkt erreichten, unterscheiden sich nicht zu den restlichen Patienten hinsichtlich der Symptomatik nach NYHA-Klassifizierung, der laborchemischen Parametern BNP und CRP. Das hochsensitive Troponin I war in der Patientengruppe mit erreichten Endpunkt signifikant höher als bei der überlebenden Patientengruppe (0.16  $\mu\text{g/l}$  vs 0.03  $\mu\text{g/l}$ ,  $p=0.01$ ), so auch das CRP (0.37 mg/dl vs 1.50 mg/dl,  $p<0.001$ ). Der systolische Pulmonalarterien- druck war bei den überlebenden Patienten signifikant niedriger (29 mmHg vs 36 mmHg,  $p=0.046$ ), in Gegensatz zu dem LVEDD, welcher signifikant größer war bei den Patienten die nicht den Endpunkt erreicht haben (55 mm vs 46 mm,  $p=0.001$ ). Am interessantesten war, dass die Patienten mit erreichtem Endpunkt

eine signifikant bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion hatten (52 % vs 40 %, p=0.009) und dass beide Patientengruppen keinen signifikanten Unterschied bezüglich des LGE-Nachweises aufweisen konnten (61 % vs 41 %, p=0.116).

**Tabelle 5.** Ausgangsmerkmale von Überlebenden und Nicht-Überlebenden

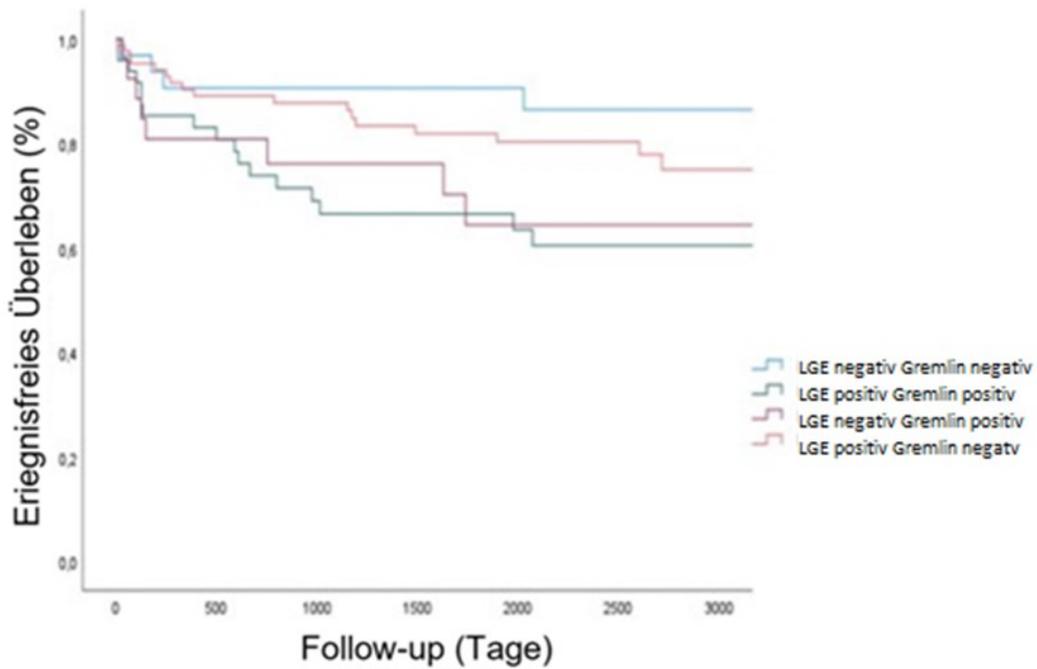
Parameter	Alle Patienten (n=198)	Überlebende (n=181, 91%)	Nicht-Überlebende (n=17, 9%)	p*
<i>Klinische Merkmale</i>				
Durchschnittsalter (J)	53 (44-66)	53 (44-66)	59 (49-69)	0.347
Männlich	148 (75%)	135 (75%)	13 (77%)	0.864
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 (23-30)	26 (24-30)	24 (21-27)	<b>0.042</b>
NYHA ≥II	155 (78%)	144 (80%)	11 (65%)	0.156
<i>Ergebnisse der kardialen MRT.</i>				
Ödem	10 (5%)	10 (6%)	0 (0%)	0.317
LGE	117 (60%)	110 (61%)	7 (41%)	0.116
LVEDD (mm)	54 (47-60)	55 (48-60)	46 (40-50)	<b>0.001</b>
<i>Laborparameter</i>				
BNP (ng/l)	436 (102-1948)	493 (102-2003)	271 (108-3828)	0.628
hsTnI (µg/l)	0.03 (0.00-0.11)	0.03 (0.00-0.10)	0.16 (0.03-0.62)	<b>0.010</b>
CK (U/l)	97 (63-153)	97 (64-152)	98 (37-262)	0.735
CRP (mg/dl)	0.44 (0.11-1.64)	0.37 (0.10-1.31)	1.50 (0.78-4.03)	<b>&lt;0.001</b>
<i>Andere Parameter</i>				
Virusbiopsie pos.	54 (27%)	50 (28%)	4 (24%)	0.717
PAP <sub>sys</sub> (mmHg)	29 (24-37)	29 (24-37)	36 (28-47)	<b>0.046</b>
LVEF (%)	43 (30-53)	40 (30-53)	52 (44-59)	<b>0.009</b>
LVEF FU (%)	50 (35-55)	50 (35-55)	55 (30-60)	0.428

Die Werte sind n (%) oder Median (Interquartilbereich). BMI - Body-Mass-Index, BNP - Brain Natriuretic Peptide, CRP - C-reaktives Protein, CK - Kreatinkinase, LGE - späte Gadolinium-Verstärkung, LVEDD - linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NYHA - New York Heart Association, PAP<sub>sys</sub> - systolischer pulmonaler Druck geschätzt durch Echokardiographie, Pos. - positiv, hsTnI – hochsensitives Troponin I, J - Jahre.

### 3.13 Intensivierte Risikostratifizierung anhand von MRT in Kombination mit Befunden der Myokardbiopsie Erreichen des Endpunktes

Um die Hochrisikokohorte, die im Nachverfolgungszeitraum verstorben ist, nun weiter zu charakterisieren, wurden alle Patienten anhand ihrer MRT- und Biopsiekriterien in 4 Gruppen eingeteilt. Die Gruppen wurden definiert durch den Nachweis von LGE oder dessen Abwesenheit in der MRT und in Abhängigkeit der Gremlin-1 Expression in der immunhistologischen Analyse. In dieser Gruppe war der kombinierte Endpunkt festgelegt als Kombination aus kardiovaskulärem

Tod (n=17) und überlebten plötzlichen Herztod (n= 27), definiert als adäquate ICD Schockabgabe bei hämodynamisch relevanter ventrikulärer Tachykardie oder Kammerflimmern. Diese Subgruppe von Patienten wurde ebenfalls nachverfolgt. In der Kaplan-Meier Kurve in Abbildung 12 werden die Ereignisse kardiovaskulärer Tod und einer adäquaten ICD-Auslösung als Äquivalent für den überlebten plötzlichen Herztod als kombinierter Endpunkt in allen Patientengruppen über den Zeitraum des Follow-ups dargestellt. Interessanterweise, zeigten sich die meisten Ereignisse und somit schlechteste Prognose in der Patientengruppe mit positivem LGE und erhöhter Gremlin-1 Expression. Darüberhinaus, konnten wir hier jedoch auch eine deutlich schlechtere Prognose von Patienten aufzeigen, welchen kein Late-Gadolinium-Enhancement in der MRT aufwies, jedoch signifikant erhöhte Gremlin-1 Expression in der durchgeführten Biopsie zeigten, diese Patienten werden bisher in der Standarddiagnostik bezüglich ihres Mortalitätsrisikos unterschätzt, da sie in der MRT keine klassischen Risikokonstellationen aufweisen und die in der klinischen Routine etablierte histologische und immunohistochemische Analyse den prognostisch relevanten Fibrosemarker Gremlin-1 bisher nicht berücksichtigen. Somit kann der Hochrisikopatientenkohorte mit Erreichen des Endpunktes ein weiteres Charakteristikum zur frühzeitigen Erkennung im Rahmen eines intensivierten Risikoassessments zugeordnet werden.



Follow-up Tage	0	500	1000	1500	2000	2500	3000
Patientenanzahl mit LGE(-) und Grem-1 (-)	32	29	29	29	29	28	28
Patientenanzahl mit LGE (-) und Grem-1 (+)	49	41	36	35	34	33	33
Patientenanzahl mit LGE (+) und Grem-1 (-)	27	22	21	21	19	19	19
Patientenanzahl mit LGE (+) und Grem-1 (+)	89	80	79	75	74	74	72

**Abbildung 12:** Kaplan-Meier Kurven des primären und sekundären Endpunktes

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die prognostische und diagnostische Bedeutung der Gremlin-1 Expression in Zusammenhang mit dem Nachweis von Late-Gadolinium-Enhancement in der Magnetresonanztomographie bei 198 Patienten mit nicht ischämischer Kardiomyopathie untersucht, um Hochrisikopatienten für den plötzlichen Herztod und insgesamt erhöhter Mortalität besser charakterisieren und somit frühzeitig identifizieren zu können. Hierzu wurden bei allen Patienten eine endomyokardiale Biopsie und eine MRT durchgeführt, welche auch Teil eines intensivierten Risikomanagements sein sollten. Die Analysen unserer Befunde brachten folgende Ergebnisse:

- i) Patienten mit erhöhter Gremlin-1 Expression in der myokardialen Biopsie zeigten auch eine schwerere Fibrose in der MRT, welche durch ausgeprägten LGE visualisiert werden konnte
- ii) Patienten mit erhöhtem Gremlin-1 Nachweis zeigten eine schwerere Herzinsuffizienz Symptomatik
- iii) Das ereignisfreie Überleben ist bei LGE-positiven und Gremlin1-positiven Patienten am schlechtesten, aber auch bei LGE-negativen und Gremlin1-positiven Patienten, bei denen etablierte Prädiktoren für die Vorhersage eines kardiovaskuläres Ereignis versagt haben, ist die Prognose signifikant eingeschränkt.

Die sorgfältige Risikostratifizierung bei Patienten, die von nicht-ischämischer Herzinsuffizienz betroffen sind, nimmt einen maßgeblichen Stellenwert ein, der weitreichende Implikationen für die klinische Entscheidungsfindung, die individuelle Behandlung sowie die optimale Nutzung von medizinischen Ressourcen im Gesundheitswesen mit sich bringt. In diesem facettenreichen Forschungsfeld der Kardiologie wird die besondere Bedeutung der präzisen Risikoeinschätzung deutlich, da sie eine fundierte Grundlage für die Behandlungsstrategien schafft, die Implantation von Defibrillatoren steuert und den effektiven Einsatz von knappen Ressourcen im Gesundheitssystem ermöglicht.

Myokardfibrose ist ein häufiger Befund bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium. Das fibrotische Herz ist durch die Ablagerung von extrazellulärer Matrix, den Verlust von Kardiomyozyten und Versteifung gekennzeichnet, was zu einer Beeinträchtigung der Herzkammerfunktion, Leitfähigkeitsstörungen und potenziell tödlichen Arrhythmien führt. Myokardnarben oder Fibrose prädisponieren Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz für den plötzlichen Herztod, da sie die ventrikuläre Funktion und die elektrische Leitfähigkeit beeinträchtigen und daher Substrate für Arrhythmien sind.

Die kardiale MRT hat sich als nicht-invasives Instrument zum Nachweis von Myokardfibrose und -narben bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz als vielversprechender Prädiktor für unerwünschte Ereignisse und schlechte Ergebnisse erwiesen. Es gibt jedoch keine standardisierten Leitlinien für die Quantifizierung und den Schwellenwert der Fibrose, ab dem das Arrhythmiepotenzial ansteigt. Die Endomyokardbiopsie kann zum Nachweis von Fibrose bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz herangezogen werden. Gremlin-1 hat sich in den letzten Jahren zu einem interessanten Fibrosemarker entwickelt. Gremlin-1 gehört zur DAN/Cerberus-Proteinfamilie und ist ein hoch konserviertes Glykoprotein, das zur Superfamilie der Cysteinknoten gehört. Im TGF-Beta-Signalweg fungiert Gremlin-1 als Antagonist des knochenmorphogenetischen Proteins (BMP) und ist an der Regulation einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt, einschließlich der Bildung von Gliedmaßen und Nieren. Darüber hinaus spielt Gremlin-1 eine wichtige onkogene Rolle in verschiedenen menschlichen Tumoren.

Die Gremlin-1-Expression wurde als nützlicher Biomarker bei verschiedenen chronisch fibrotischen Erkrankungen von Niere, Lunge und Leber identifiziert. Über die Rolle von Gremlin-1 bei Herzinsuffizienz, wo Fibrose ein wichtiger Schritt beim Umbau ist, der zu einer Beeinträchtigung der Auswurfraction und Arrhythmien führt, ist jedoch wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass die erhöhte Gremlin-1 Expression mit einer verstärkten Fibrose und einer Beeinträchtigung der Herzfunktion einhergeht. [52]

Das Gremlin-1 zeigt eine signifikante Expression bei Patienten, die unter nicht-ischämischen Herzerkrankungen leiden. Diese Expression von Gremlin-1 zeigt

eine bemerkenswerte Korrelation mit der Intensität der Myokardfibrose sowie der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Als bedeutsamer Indikator nimmt Gremlin-1 Einfluss auf die Prognose des klinischen Verlaufs, der bei diesen Patienten zu erwarten ist. Diese Arbeit legt eine mögliche Schlüsselrolle von Gremlin-1 im Kontext der kardialen Fibrose bei der nicht-ischämischen Herzinsuffizienz nahe. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass die Expression von Gremlin-1 bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz in direktem Zusammenhang mit dem Ausmaß der Fibrose steht, welches durch etablierte Methoden wie die kardiale Magnetresonanztomographie (MRT) nachgewiesen wurde.

Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Patienten, bei denen Gremlin-1 in den durchgeführten Myokardbiopsien nachgewiesen werden konnte, eine schwerere Symptomatik der Herzinsuffizienz aufweisen. Diese Symptomatik wurde gemäß der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) bewertet, wobei 82 % der Patienten mit Gremlin-1-Nachweis Symptome der NYHA-Klasse II oder höher aufwiesen. Die Erkenntnisse heben somit die prognostische Bedeutung von Gremlin-1 in Bezug auf die Schwere der Herzinsuffizienzsymptome hervor.

Die Betonung der Magnetresonanztomographie (MRT) in dieser Arbeit stellt einen wesentlichen Aspekt dar, der dazu beiträgt, das Verständnis der Krankheitsprogression bei nicht-ischämischer Herzinsuffizienz zu vertiefen.

Insbesondere die Detektion von Late Gadolinium Enhancement mittels MRT bietet einen bedeutsamen Beitrag zur Vorhersage eines ungünstigen klinischen Ausgangs. Dieser Befund basiert auf der Tatsache, dass LGE im MRT als Indikator für fibrotisches Gewebe und Myokardnarben fungiert, welche strukturelle Veränderungen im Herzmuskel widerspiegeln und mit einem erhöhten Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse in Verbindung gebracht werden.

Allerdings zeigte diese Arbeit noch folgendes, dass durch die zusätzliche Einbeziehung der Gremlin-1-Färbung in den myokardialen Biopsien, die Möglichkeit besteht eine spezifische Patientenkohorte zu identifizieren, die trotz fehlender LGE-Muster im MRT eine nachteilige Prognose aufweist. In unserer Patientenkohorte zeigen wir, dass die Patientengruppe mit positivem LGE und erhöhter Gremlin-1 Expression die höchste Mortalität und somit schlechteste Prognose

aufweist. Darüber hinaus, konnten wir hier jedoch auch eine deutlich schlechtere Prognose von Patienten aufzeigen, welchen ohne Nachweis von Late-Gadolinium-Enhancement in der MRT blieben, jedoch signifikant erhöhte Gremlin-1 Expression in der durchgeführten Biopsie zeigten. Diese Patienten werden bisher in der Standarddiagnostik bezüglich ihres Mortalitätsrisikos unterschätzt, da sie in der MRT keine klassischen Risikokonstellationen aufweisen und die in der klinischen Routine etablierte histologische und immunohistochemische Analyse den prognostisch relevanten Fibrosemarker Gremlin-1 bisher nicht berücksichtigen. Somit kann der Hochrisikopatientenkohorte mit Erreichen des Endpunktes ein weiteres Charakteristikum zur frühzeitigen Erkennung im Rahmen eines intensivierten Risikoassessments zugeordnet werden. Dieser Befund hebt die herausragende Rolle von Gremlin-1 als prädiktiven Faktor hervor, der in der Lage ist, subtile Veränderungen im kardialen Gewebe zu erfassen, die möglicherweise nicht durch LGE-Muster erfasst werden. Keine anderen bisher bekannten Biomarker konnten diese besondere Patientenuntergruppe ohne LGE deutlich differenzieren. Diese einzigartige Fähigkeit von Gremlin-1, eine spezifische und klinisch relevante Kohorte von Patienten zu identifizieren, die ansonsten möglicherweise übersehen worden wäre, markiert einen bedeutenden Fortschritt im Bereich der Risikoeinschätzung und des Prognosemanagements bei nicht-ischämischen Herzinsuffizienzen. Die Einbindung von Gremlin-1 in die klinische Bewertung dieser Patientengruppe erweitert somit das Spektrum der diagnostischen Möglichkeiten. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Gremlin-1 nicht nur als prognostischer Indikator fungiert, sondern auch potenzielle Zielstrukturen für zukünftige therapeutische Interventionen repräsentiert. Die immunohistochemische Analyse von Gremlin-1 sollte aufgrund der vorhergehenden Studien [53] und der aktuellen Ergebnisse in der klinischen Routine der immunohistochemischen Analysen von Myokardproben Einlass finden, um die Risikostratifizierung dieser Hochrisikogruppe zu verbessern und ggf. ein intensiviertes Monitoring oder eine frühzeitige Versorgung mittels ICD zur Prognoseverbesserung zu gewährleisten. Unsere begrenzte Stichprobengröße und die heterogene Gruppe müssen jedoch als einschränkende Faktoren berücksichtigt werden. Es ist unklar, ob die Gremlin-1-Expression bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz einen

prognostischen Wert für Fibrose im Allgemeinen hat oder ob bestimmte Herzerkrankungen höhere Gremlin1-Werte aufweisen. Auch die LGE muss im Zusammenhang mit der zugrunde liegenden Ätiologie der nicht-ischämischen Kardiomyopathie interpretiert werden.

Es wird notwendig sein, die Reproduzierbarkeit in Studien mit mehreren Zentren und größeren Kohorten zu bewerten, um verschiedene Ätiologien der nicht ischämischen Herzinsuffizienz vergleichen zu können. Darüber hinaus ist eine Untersuchung der zugrunde liegenden Pathomechanismen dringend erforderlich. Auch die Quantifizierung von Gremlin-1 muss standardisiert werden, damit sie bei routinemäßig durchgeführten Myokardbiopsien eingesetzt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Ergebnisse die Hypothese unterstützen, dass Gremlin-1 als prognostischer Biomarker bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz dienen kann und seine Bestimmung im Myokard einen Zusatznutzen bringt bei Patienten mit auffälligem LGE-Befund im MRT, aber eben auch für Patienten, welche in der Kardio-MRT keine Risikokonstellation aufweisen. Somit sollte im Rahmen einer intensivierten Risikostratifizierung die Bestimmung der kardialen Gremlin-1 Expression erfolgen.

## 5 Zusammenfassung

Patienten mit nichtischämischer Kardiomyopathie unterziehen sich einer umfassenden klinischen Risikostratifizierung, die Laborparameter, Echokardiographie, Myokardbiopsie, Überwachung von Arrhythmien und kontrastverstärkte kardiale Magnetresonanztomographie (CMRT) umfasst, um ihr Risiko für plötzlichen Herztod zu bewerten. Allerdings identifizieren etablierte Risikoparameter wie stark reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) oder pathologische Befunde in der CMRT, die auf kardiale Remodellierung hinweisen, nur eine Untergruppe von Patienten mit hohem Risiko. Daher bleibt die Risikobewertung dieser Patienten in der klinischen Routine trotz aller diagnostischen und therapeutischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte eine Herausforderung. Wir konnten zuvor zeigen, dass die zusätzliche immunohistochemische Analyse der Myokard-Gremlin-1-Expression als etablierter Biomarker für fortschreitende und irreversible Myokardfibrose mit linksventrikulärer Dysfunktion, kardialer Remodellierung und ungünstiger Prognose bei Patienten mit nichtischämischem Herzversagen assoziiert ist. In dieser Studie wollten wir untersuchen, ob die endomyokardiale Gremlin-1-Expression mit der nicht-invasiven Visualisierung von Fibrose durch kontrastverstärkte CMRT korreliert und ob die Analyse der Gremlin-1-Expression einen zusätzlichen Wert bietet, um Patienten mit erhöhtem Risiko für plötzlichen Herztod zu identifizieren.

Insgesamt 198 Patienten mit nichtischämischem Herzversagen unterzogen sich einer endomyokardialen Biopsie mit zusätzlicher Gremlin-1-Färbung und kontrastverstärkter CMRT (1,5 Tesla-Scanner; Siemens Medical Systems, Deutschland). Die Gremlin-1-Färbung wurde als "negativ" (Score 1 oder 2) oder "positiv" (Score 3 oder 4) klassifiziert. Die Scores für Gremlin-1 wurden von zwei unabhängigen Untersuchern blind aus drei Abschnitten pro Färbung erhalten. Für die Bildgebung von spätem Gadolinium-Enhancement (LGE) wurde eine zweidimensionale Inversion-Recovery-segmentierte k-Raum-Gradienten-Echo-MR-Sequenz durchgeführt. Die CMRT-Bilder wurden in kurzen und langen Achsenansichten 10–15 Minuten nach intravenöser Injektion von 0,15 mmol pro Kilogramm Körpergewicht Gadobutrol (Gadovist, Bayer Healthcare, Deutschland) aufgenommen. Enddiastolische Volumina und Endsystolische Volumina wurden

verwendet, um die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zu bestimmen. Der Follow-up-Zeitraum der Patienten erstreckte sich über 8 Jahre nach der ersten Diagnose eines nichtischämischen Herzversagens. Das primäre Studienendpunkt war die Gesamtmortalität, der sekundäre klinische Endpunkt wurde als Kombination aus Gesamtmortalität und überlebtem plötzlichem Herztod definiert, der als adäquater ICD-Schock aufgrund hämodynamisch relevanter anhaltender ventrikulärer Tachykardie oder Kammerflimmern festgelegt wurde.

Von 198 Patienten zeigten 117 (59%) positive LGE-Muster in der CMRT. Gremlin-1-positive Patienten wiesen eine signifikant höhere Rate positiver LGE-Detektion in der CMRT auf (65% in der Gremlin-1-positiven Gruppe gegenüber 46% in Gremlin-1-negativen Patienten,  $p = 0,013$ ) und einen höheren Grad der Myokardfibrose, die durch Trichromfärbung des Myokardgewebes nachgewiesen wurde ( $p < 0,0001$ ). Die Gremlin-1-positive Färbung war mit einer höheren NYHA-Klasse ( $p = 0,051$ ), einer beeinträchtigten LVEF (35 (30-50)% vs. 50 (35-55)%,  $p = 0,009$ ) und LVEDD (55 (49-61) mm vs. 50 (44-57) mm,  $p = 0,023$ ) assoziiert. Interessanterweise zeigten von den 81 Patienten ohne pathologisches LGE in der CMRT 49 Patienten eine hohe Gremlin-1-Expression im Immunohistochemie. Diese Patienten wiesen ebenfalls eine signifikant niedrigere LVEF auf (35 (30-50)% vs. 50 (38-57)%,  $p = 0,016$ ) und waren auch durch niedrigere Serumspiegel von BNP (159 (47-518) ng/L vs. 1020 (272-2283) ng/L),  $p = 0,038$ ) gekennzeichnet. Während des Follow-up-Zeitraums von acht Jahren starben 17 Patienten (primärer Endpunkt), während 45 Patienten den kombinierten sekundären Endpunkt erreichten. Um die Untergruppe der Patienten ohne Hinweise auf LGE in der CMRT und daher nicht als Patienten mit plötzlichem Herztod oder Auftreten von ventrikulären Arrhythmien durch kardiale MRT identifiziert zu können, führten wir Cox-Regression und Kaplan-Meier-Analyse durch. Bemerkenswerterweise zeigen Kaplan-Meier-Kurven die schlechtesten Überlebensraten bei LGE-positiven und Gremlin-1-positiven Patienten (Log-Rang 5,58,  $p = 0,018$ ). LGE-negative, aber Gremlin-1-positive Patienten zeigten jedoch auch während des Follow-ups eine signifikant höhere Rate von Ereignissen, die als sekundärer Endpunkt definiert sind (Log-Rang 7,6;  $p = 0,049$ ), was darauf hindeutet, dass die zusätzliche immunohistochemische Analyse der Gremlin-1-Expression in dieser

Patientenuntergruppe vorteilhaft ist, die allein durch CMRT nicht als Hochrisikogruppe identifiziert wird. Die Cox-Regression-Analyse ergab, dass BNP-Spiegel ( $p = 0,017$ ), LVEF ( $p = 0,020$ ) und positive Gremlin-1-Expression ( $p = 0,049$ ) unabhängige Prädiktoren für den primären Endpunkt bei Vorhandensein von LGE und positiver Gremlin-1-Expression waren, neben anderen getesteten Parametern wie Alter, Geschlecht und RV-Funktion. Interessanterweise zeigte die Cox-Regression-Analyse der Untergruppe ohne LGE in der CMRT, dass BNP-Spiegel ( $p < 0,001$ ), LVEF ( $p = 0,018$ ) und positive Gremlin-1-Expression ( $p = 0,040$ ) auch unabhängige Prädiktoren für das Auftreten des sekundären Endpunkts waren.

Zusammenfassend ist die Risikostratifizierung von Patienten mit nichtischämischem Herzversagen, die CMRT und Standardfärbungen der endomyokardialen Biopsie umfasst, nicht ausreichend, um alle Patienten mit erhöhtem Risiko für plötzlichen Herztod zu identifizieren. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass insbesondere Patienten ohne pathologische LGE-Muster in der CMRT von einer zusätzlichen immunohistochemischen Analyse des Myokardgewebes profitieren können, um fortschreitende und/oder irreversible kardiale Remodellierung mit ungünstiger Prognose zu erkennen. Daher kann die zusätzliche Gremlin-1-Färbung dazu beitragen, Patienten mit erhöhtem Risiko für plötzlichen Herztod zu identifizieren und sollte daher in die klinische Routine der histologischen und immunohistochemischen Färbungen des Myokardgewebes aufgenommen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Maron, B.J., et al., *Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention*. *Circulation*, 2006. **113**(14): p. 1807-16.
2. Arbustini, E., et al., *Ten-year experience with endomyocardial biopsy in myocarditis presenting with congestive heart failure: frequency, pathologic characteristics, treatment and follow-up*. *G Ital Cardiol*, 1997. **27**(3): p. 209-23.
3. Statistisches Bundesamt, b. *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen*. 2022; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
4. Felker, G.M., et al., *Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(15): p. 1077-84.
5. Massie, B.M. and M. Conway, *Survival of patients with congestive heart failure: past, present, and future prospects*. *Circulation*, 1987. **75**(5 Pt 2): p. IV11-9.
6. Wilson, J.R., et al., *Prognosis in severe heart failure: relation to hemodynamic measurements and ventricular ectopic activity*. *J Am Coll Cardiol*, 1983. **2**(3): p. 403-10.
7. Schwarz, F., et al., *Determinants of survival in patients with congestive cardiomyopathy: quantitative morphologic findings and left ventricular hemodynamics*. *Circulation*, 1984. **70**(6): p. 923-8.
8. Cohn, J.N., et al., *Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(24): p. 1547-52.
9. Unverferth, D.V., et al., *Factors influencing the one-year mortality of dilated cardiomyopathy*. *Am J Cardiol*, 1984. **54**(1): p. 147-52.
10. Polak, J.F., et al., *Right ventricular ejection fraction: an indicator of increased mortality in patients with congestive heart failure associated with coronary artery disease*. *J Am Coll Cardiol*, 1983. **2**(2): p. 217-24.
11. Cheng, S. and R.S. Vasan, *Advances in the epidemiology of heart failure and left ventricular remodeling*. *Circulation*, 2011. **124**(20): p. e516-9.
12. Elliott, P., et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(2): p. 270-6.
13. Jefferies, J.L. and J.A. Towbin, *Dilated cardiomyopathy*. *Lancet*, 2010. **375**(9716): p. 752-62.
14. McKenna, W.J., B.J. Maron, and G. Thiene, *Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies*. *Circ Res*, 2017. **121**(7): p. 722-730.

15. Maron, B.J., *Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review*. JAMA, 2002. **287**(10): p. 1308-20.
16. Noureldin, R.A., et al., *The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy by cardiovascular magnetic resonance*. J Cardiovasc Magn Reson, 2012. **14**(1): p. 17.
17. Gregoratos, G., et al., *ACC/AHA Guidelines for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices: Executive Summary--a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Pacemaker Implantation)*. Circulation, 1998. **97**(13): p. 1325-35.
18. Priori, S.G., et al., *Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2001. **22**(16): p. 1374-450.
19. Jain, A., et al., *Role of cardiovascular magnetic resonance imaging in arrhythmogenic right ventricular dysplasia*. J Cardiovasc Magn Reson, 2008. **10**(1): p. 32.
20. Corrado, D. and G. Thiene, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1634-7.
21. Fontaine, G. and C. Prost-Squarcioni, *Implantable cardioverter defibrillator in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies*. Circulation, 2004. **109**(12): p. 1445-7.
22. Weiford, B.C., V.D. Subbarao, and K.M. Mulhern, *Noncompaction of the ventricular myocardium*. Circulation, 2004. **109**(24): p. 2965-71.
23. Nef, H.M., H. Mollmann, and A. Elsasser, *Tako-tsubo cardiomyopathy (apical ballooning)*. Heart, 2007. **93**(10): p. 1309-15.
24. Paulus, W.J., *Cytokines and heart failure*. Heart Fail Monit, 2000. **1**(2): p. 50-6.
25. Satoh, M., et al., *Immune modulation: role of the inflammatory cytokine cascade in the failing human heart*. Curr Heart Fail Rep, 2008. **5**(2): p. 69-74.
26. Li, Y.Y., C.F. McTiernan, and A.M. Feldman, *Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 214-24.
27. Taipale, J. and J. Keski-Oja, *Growth factors in the extracellular matrix*. FASEB J, 1997. **11**(1): p. 51-9.
28. Sawyer, D.B., et al., *Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(4): p. 379-88.
29. Hengstenberg, C., et al., *De novo expression of MHC class I and class II antigens on endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart disease and rejection following heart transplantation*. Eur Heart J, 1993. **14**(6): p. 758-63.
30. Seizer, P., et al., *Cyclophilin A affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(1): p. 6-14.
31. Topol, L.Z., et al., *Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of Drm/Gremlin*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8785-93.

32. Topol, L.Z., et al., *Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(8): p. 4801-10.
33. Hsu, D.R., et al., *The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities*. *Mol Cell*, 1998. **1**(5): p. 673-83.
34. Costello, C.M., et al., *Role of gremlin in the lung: development and disease*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **42**(5): p. 517-23.
35. Kami, D., et al., *Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis*. *PLoS One*, 2008. **3**(6): p. e2407.
36. Mitola, S., et al., *Angiopoietin-1 mediates the proangiogenic activity of the bone morphogenetic protein antagonist *Drm**. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1154-7.
37. Chen, B., et al., *Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists *Drm*/*Gremlin* and *Dan* interact with *Slits* and act as negative regulators of monocyte chemotaxis*. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 5914-7.
38. Stabile, H., et al., *Bone morphogenetic protein antagonist *Drm*/*gremlin* is a novel proangiogenic factor*. *Blood*, 2007. **109**(5): p. 1834-40.
39. Roxburgh, S.A., et al., *Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes*. *Nephron Physiol*, 2006. **103**(3): p. p139-48.
40. Mezzano, S., et al., *Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in glomerular crescents of pauci-immune glomerulonephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. **22**(7): p. 1882-90.
41. Boers, W., et al., *Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(24): p. 16289-95.
42. Rider, C.C. and B. Mulloy, *Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists*. *Biochem J*, 2010. **429**(1): p. 1-12.
43. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
44. Koli, K., et al., *Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(1): p. 61-71.
45. Ferreira, V.M., et al., *Cardiovascular Magnetic Resonance in Nonischemic Myocardial Inflammation: Expert Recommendations*. *J Am Coll Cardiol*, 2018. **72**(24): p. 3158-3176.
46. Kim, R.J., et al., *Relationship of MRT delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function*. *Circulation*, 1999. **100**(19): p. 1992-2002.
47. Grun, S., et al., *Long-term follow-up of biopsy-proven viral myocarditis: predictors of mortality and incomplete recovery*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **59**(18): p. 1604-15.
48. Bellenger, N.G., et al., *Reduction in sample size for studies of remodeling in heart failure by the use of cardiovascular magnetic resonance*. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2000. **2**(4): p. 271-8.

49. Assomull, R.G., et al., *Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(10): p. 1977-85.
50. Di Marco, A., et al., *Late gadolinium enhancement and the risk of ventricular arrhythmias and sudden death in NYHA class I patients with non-ischaemic cardiomyopathy*. Eur J Heart Fail, 2023. **25**(5): p. 740-750.
51. Yafasova, A., et al., *Long-Term Follow-Up of DANISH (The Danish Study to Assess the Efficacy of ICDs in Patients With Nonischemic Systolic Heart Failure on Mortality)*. Circulation, 2022. **145**(6): p. 427-436.
52. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 952-61.
53. Mueller, K.A., et al., *Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy*. J Card Fail, 2013. **19**(10): p. 678-84.

## 7 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Konzeption der wissenschaftlichen Arbeit erfolgte durch Priv.-Doz. Dr. med. Karin Müller und mich.

Erhebung der klinischen Parameter sowie Durchführung der Echokardiographien und Endomyokardbiopsien erfolgten durch die Abteilung Innere Medizin III, Kardiologie und Angiologie, der Universitätsklinik Tübingen.

Die Nested-PCR sowie die histopathologische Analyse der Myokardbiopsien erfolgten durch das Institut für Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Die immunhistochemische Färbung der Myokardbiopsien wurde durchgeführt von Frau Hanna Schnell und Frau Sarah Gekeler.

Die Kardio-Magnetresonanztomographien wurden durchgeführt von der Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Mein Beitrag zu der wissenschaftlichen Arbeit lag in der immunhistochemischen Auswertung einschließlich der semiquantitativen Einteilung der mit Gremlin-1 gefärbten Myokardgewebeschnitte in die unterschiedlichen Expressionsmustern und die Bestimmung der Fibroseareale in den Trichromfärbungen. Zudem habe ich die klinischen Parameter eingetragen und habe das Follow-Up der Patienten organisiert, Endpunkte erfragt und die Eintragungen in die Datenbank gemacht. Ich habe die Nachverfolgung aller 198 Patienten des Patientenkollektivs selbstständig durchgeführt und die für die Studie relevanten klinischen Parameter in einer Excel-Tabelle selbstständig zusammengetragen. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch Priv.-Doz. Dr. med. Karin Müller, Dr. med. Livia Baas und mich.

Ich habe die Literaturrecherche zu dieser Dissertation selbstständig durchgeführt und die Dissertation selbstständig verfasst.

Priv.-Doz. Dr. med. Karin Müller war verantwortlich für das Korrekturlesen und die Validierung der Inhalte der Dissertation.