

Aus dem  
CharitéCentrum für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin  
Medizinische Klinik für Kardiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Ulf Landmesser

## **HABILITATIONSSCHRIFT**

### **Optimierte Diagnostik durch molekulare Biomarker bei sekundären Kardiomyopathien**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin und Kardiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsklinik Berlin

Von

Dr. med. Bettina Heidecker  
aus Wels, Österreich

Eingereicht: August 2019

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Sedding

2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Westermann

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>PROLOG</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>4</b>
<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>2. EIGENE ARBEITEN</b>	<b>18</b>
<b>2.1. TRANSCRIPTOMIC BIOMARKERS FOR INDIVIDUAL RISK ASSESSMENT IN NEW-ONSET HEART FAILURE</b>	<b>18</b>
<b>2.2. THE GENE EXPRESSION PROFILE OF PATIENTS WITH NEW-ONSET HEART FAILURE REVEALS IMPORTANT GENDER-SPECIFIC DIFFERENCES</b>	<b>28</b>
<b>2.3. TRANSCRIPTOMIC BIOMARKERS FOR THE ACCURATE DIAGNOSIS OF MYOCARDITIS</b>	<b>38</b>
<b>2.4. CARDIAC MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN MYOCARDITIS REVEALS PERSISTENT DISEASE ACTIVITY <i>DESPITE</i> NORMALIZATION OF CARDIAC ENZYMES AND INFLAMMATORY PARAMETERS AT 3-MONTH FOLLOW-UP</b>	<b>50</b>
<b>2.5. TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS IDENTIFIES THE EFFECT OF BETA-BLOCKING AGENTS ON A MOLECULAR PATHWAY OF CONTRACTION IN THE HEART AND PREDICTS RESPONSE TO THERAPY</b>	<b>59</b>
<b>3. DISKUSSION</b>	<b>75</b>
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>85</b>
<b>5. REFERENZEN</b>	<b>89</b>
<b>6. DANKSAGUNG, ACKNOWLEDGEMENTS</b>	<b>95</b>
<b>7. ERKLÄRUNG</b>	<b>97</b>

## PROLOG

Sir Francis Peabody, Journal of the American Medical Association, 1927:

*“The good physician knows his patients through and through, and his knowledge is bought dearly. Time, sympathy and understanding must be lavishly dispensed, but the reward is to be found in that personal bond which forms the greatest satisfaction of the practice of medicine. One of the essential qualities of the clinician is interest in humanity, for the secret of the care of the patient is in caring for the patient.”<sup>1</sup>*

## ABKÜRZUNGEN

CRP	C-reactive protein ( <i>C-reaktives Protein</i> )
DNS	Desoxyribonukleinsäure
LGE	Late gadolinium enhancement
LVAD	Linksventrikulärer “assist device”
RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
MeSH	Medical subject heading
MINOCA	Myocardial infarction and non-obstructive coronary artery disease
MRT	Magnetresonanztomografie
NIH	National Institute of Health
NT-pro BNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide

## **EINLEITUNG**

Diese Habilitationsschrift soll einen Überblick über meine Untersuchungen auf dem Gebiet der Biomarker im Bereich der Kardiomyopathien und bei Herzinsuffizienz geben. Der Terminus Biomarker wurde zum ersten Mal als “Medical Subject Heading (MeSH)” im Jahre 1989 verwendet<sup>2</sup>. Im Jahre 2001 hat eine Arbeitsgruppe des National Institute of Health (NIH) eine standardisierte Definition für das Wort Biomarker entwickelt: “... *a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic response to a therapeutic intervention*”<sup>3</sup>.

Die Entwicklung von neuen Biomarkern steht im Zentrum der “Big Data”-Analysen. Mit “Big Data” bezeichnet man einen Bereich in der Forschung, in dem man Daten analysiert, welche zu groß oder zu komplex sind, um sie mit traditioneller Datenanalyse-Software in einem akzeptablen Zeitrahmen zu untersuchen. „High-Throughput“-Technologien sind ein wichtiger Bestandteil der „Big Data“-Analysen, mit welchen in kurzer Zeit eine umfangreiche Zahl an Variablen pro Probe in großen Kohorten gemessen werden können. Ein Beispiel für eine „High-Throughput“-Technologie sind Microarray Analysen.

### **Ein Überblick über die Vorteile der Anwendung von Biomarkern und über die möglichen Fehlerquellen im Bereich der “Big data”-Analysen**

In den letzten 30 Jahren wurde im Bereich der kardiovaskulären Medizin eine umfassende Anzahl an Biomarkern zum Screening im Rahmen der Primärprävention, zur Diagnose- und Prognosestellung, zur Therapieentscheidung, sowie zur Überwachung des Therapieerfolges entwickelt.

In der Ära der „High-Throughput“- Technologien traten Biomarker mehr und mehr in den Fokus der Forschung, da es zunehmend Möglichkeiten gab, eine breite Anzahl von Markern zu untersuchen, welche potentiell mit einer Erkrankung oder Prognose assoziiert sein könnten.

Nach einer großen Welle des Enthusiasmus‘ begann die Kritik an der Biomarkerforschung und es kam zu einer „Biomarker-Fatigue“ unter Wissenschaftlern, welche den Nutzen von neuen Biomarkern sehr kritisch hinterfragten, da ein beachtlicher Teil der Ergebnisse von „Big Data“- Analysen in der Validierungsphase in unabhängigen Proben nicht reproduzierbar war.

Die Analyse von großen Mengen an Variablen, welche potenziell mit einem spezifischen Phänotyp assoziiert sein könnten, trägt gewisse mögliche Fehlerquellen mit sich. Sehr spezifische statistische Regeln mussten hierzu sowohl für die Analyse von großen Daten-Sets als auch für „Multiple Comparison“-Analysen entwickelt werden.

Im Bereich der „Microarray“- Analyse wurde hierzu ein spezifischer statistischer Wert entwickelt - der Q-Wert. Dieser entspricht dem p-Wert, welcher für „Multiple Comparison“-Analysen entwickelt wurde. Außerdem wurde sein Analogon, die „False Discovery Rate“ von Benjamini and Hochberg<sup>4-7</sup> eingeführt.

Da die technischen Details einer „Big Data“-Analyse sehr komplex sind, liegt eine hohe Verantwortung bei den „Editorial Boards“ von wissenschaftlichen Magazinen, die sicher stellen müssen, dass entsprechend rigorose Methoden in den jeweiligen Studien angewendet worden sind, um den möglichen Fehlerquellen der „Big data“-Analyse entgegenzuwirken<sup>8</sup>.

Einer der Hauptvorteile der „High-Throughput“-Technologie ist, dass sie (die Technologie) die Entwicklung von neuen Biomarkern ermöglicht, ohne dabei durch Vorkenntnisse beeinflusst zu sein, was auch als „unbiased approach“ bezeichnet wird. Damit beschreibt man, dass die Analyse

ohne vorbestehende Hypothese durchgeführt wird, was die Chance für neue Erkenntnisse erhöht. Von Kritikern wird dies wiederum manchmal als ungezielt bezeichnet<sup>8</sup>.

Ein weiterer Vorteil der „High-Throughput“-Technologie ist, dass diese in kurzer Zeit enorm hohe Datensätze analysieren kann und dadurch Muster und Zusammenhänge erkennt, was durch bisherige „Low throughput“-Methoden nicht möglich war. Für einen Menschen wäre es unmöglich, so große Datenmengen unter dem gleichen Zeitaufwand zu evaluieren. „High-Throughput“-Technologie wird somit mit seinen „Machine Learning“-Algorithmen dem Gebiet der künstlichen Intelligenz untergeordnet<sup>8</sup>. Während bisherige „Low Throughput“-Methoden im Vergleich nur sehr kleine Datenmengen analysieren konnten, erzeugen diese allerdings mehr Information über den Pathomechanismus von Erkrankungen<sup>8</sup>.

Dementsprechend wurde oft kritisiert, dass viele der neueren Biomarker keinen Einblick in die Pathomechanismen einer Erkrankung vermitteln und möglicherweise nur eine Folge der Erkrankung und nicht ursächlich für die Erkrankung sind. Für die Anwendung eines Biomarkers ist es allerdings nicht relevant ob er Ursache oder Folge einer Erkrankung ist, solange er seinen Zweck als Biomarker erfüllt, nämlich z.B. zur Diagnose- oder Prognosestellung. So ist beispielsweise Troponin ein etablierter Biomarker zur Evaluation von Koronarsyndrom, obwohl dieser Biomarker nur eine Folge des Infarktes ist und dessen Ursachen in keiner Weise erklärt.

### **Laborchemische Biomarker von kardiovaskulären Erkrankungen**

In diesem Abschnitt wird ein Überblick über die unterschiedlichen Biomarker von kardiovaskulären Erkrankungen gegeben. Es muss hierbei darauf hingewiesen werden, dass es keinen perfekten Biomarker für eine Erkrankung gibt, welcher eine Diagnose mit 100-prozentiger Genauigkeit stellt. Biomarker sind üblicherweise ein Ergebnis aus einer Vielzahl an

Pathomechanismen, wodurch sich nicht nur eine spezifische Erkrankung in einem Biomarker widerspiegelt, sondern viele unterschiedliche Erkrankungen mit diesem Marker assoziiert sein können. Hier sei dies am Beispiel von Troponin erläutert. Troponinerhöhung findet sich nicht nur beim akuten Koronarsyndrom sondern auch bei akuter Myokarditis oder der Takotsubokardiomyopathie oder aber auch bei renaler Insuffizienz. Außerdem gibt es individuelle Unterschiede in den Serumspiegeln von Biomarkern, welche unter anderem durch genetische Veranlagung und Geschlecht (oder Nierenfunktionsstörungen bzw. Organdysfunktionen) beeinflusst werden<sup>9-11</sup>.

## **Marker zur Detektion von kardialer Ischämie**

### **Troponin**

Die Troponine sind drei regulatorische Proteine, die in Skelett- und Herzmuskeln vorkommen.

Troponine besitzen 3 Untereinheiten:

- 1) Troponin T, welches für die Bindung von Tropomyosin verantwortlich ist
- 2) Troponin I, welches für die Bindung von Aktin verantwortlich ist (I steht für „*inhibitory*“, hemmend)
- 3) Troponin C, welches für die Bindung von Calcium verantwortlich ist

Zusammen mit Myosin und Aktin stellen diese Proteine den kontraktile Apparat der Muskulatur dar.

Der obere Referenzwert für Troponin wird durch die neunundneunzigste Perzentile einer Referenzpopulation festgelegt.



Troponin I und T sind die am besten etablierten Biomarker zum Nachweis von Ischämie im Herzen. Ihre Überlegenheit gegenüber anderen Biomarkern wurde in großen multizentrischen Studien deutlich demonstriert<sup>12, 13</sup> und erklärt sich durch ihre Gewebsspezifität und hohe Sensitivität<sup>14, 15</sup>. Dabei scheinen Troponin I und T eine ähnliche diagnostische Genauigkeit zu haben<sup>16</sup>.

Troponin hat nicht nur diagnostischen Wert, sondern kann auch als prognostischer Parameter verwendet werden<sup>12,13</sup>. Unter anderem wurde bei akutem Herzinfarkt („ST Elevation Myocardial Infarction (STEMI)“) nachgewiesen, dass Patienten mit höheren Troponinwerte eine höhere Mortalität haben<sup>16</sup>. Bei „Non-ST-Elevation-Myocardial Infarction (NSTEMI)“ zeigte sich ein 4-fach erhöhtes Risiko für das Rezidiv eines Myokardinfarktes und auch der Mortalität<sup>17,18</sup>.

### **Kreatinkinase-Muscle Brain (MB) und Myoglobin**

Die Kreatinkinase-MB ist ein Isoenzym beziehungsweise eine Untereinheit der Kreatinkinase. MB steht für „Muscle“ und „Brain“, wo Kreatinkinase-MB produziert wird.

Kreatinkinase-MB ist in der Diagnose des akuten Koronarsyndroms in Bezug auf diagnostische Genauigkeit zweitrangig im Vergleich zu Troponin, da es auch vom Skelettmuskel freigesetzt wird und dadurch im Rahmen einer Muskelverletzung die Spezifität in Hinblick auf ein kardiales Geschehen beeinträchtigt ist. Serielle Messungen können allerdings dabei helfen, das Ansprechen auf eine Therapie zu überwachen.

Ähnlich der Kreatinkinase-MB ist auch Myoglobin in höheren Mengen im Skelettmuskel vorhanden und kann somit bei Muskelverletzungen unspezifisch im Serum erhöht sein. Es macht etwa 2% von Herz- als auch Skelettmuskelmasse aus. Myoglobin ist ein sehr kleines Molekül und wird daher im Rahmen von akutem Koronarsyndrom aber auch Verletzung der Skelettmuskulatur

sehr früh freigesetzt (innerhalb von 1-4 Stunden). Die Spitzenwerte werden nach etwa 6-12 Stunden erreicht. Myoglobin normalisiert sich üblicherweise innerhalb von 24-36 Stunden. Die frühe Nachweisbarkeit von Myoglobin kann beim frühen Koronarsyndrom genutzt und die Spezifität durch Kombination mit anderen Biomarkern gesteigert werden<sup>19, 20</sup>. Eine Studie bei akutem Myokardinfarkt berichtete über 100% Sensitivität von Myoglobin in Hinblick auf einen Infarktnachweis, wenn es innerhalb von 2 Stunden nach Eintreffen des Patienten in die Notaufnahme bestimmt wurde<sup>21</sup>. Kreatinkinase und seine Isoform Kreatinkinase-MB werden auf Grund ihrer etwas größeren Beschaffenheit erst etwas später im Rahmen des akuten Koronarsyndroms freigesetzt (nach etwa 2 Stunden). Der Spitzenwert wird nach etwa 6-9 Stunden erreicht.

### **Ischämie-modifiziertes Albumin**

Ein weiterer Biomarker der aktuell evaluiert wird, ist das „ischämie-modifizierte Albumin“<sup>22, 23</sup>. Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass eine Affinität von Albumin auf Kobalt besteht, welche innerhalb von Minuten nach Beginn des akuten Koronarsyndroms abnimmt<sup>22,23</sup>. Es kommt damit zu einer strukturellen Modifikation des N-Terminus von Albumin, welche sich durch eine verminderte Bindung mit Kobalt und Nickel charakterisiert. Diese Eigenschaft kann man sich durch einen laborchemischen Test zu Nutze machen und damit „ischämie-modifiziertes Albumin“ quantifizieren.

Die Sensitivität von Ischämie-modifiziertem Albumin und damit auch sein negativ prädiktiver Wert sind sehr hoch<sup>22</sup>.

## **Marker zur Detektion von Inflammation**

### **C-reaktives Protein (CRP)**

CRP ist ein Protein das im Rahmen einer Entzündung sowohl in Serum als auch Plasma in erhöhten Konzentrationen nachweisbar ist. Im Rahmen einer akuten oder chronischen Entzündung aber auch Infektion kann CRP bis zu 100-fach über den Normwert erhöht sein.

Zusätzlich zum diagnostischen Wert haben erhöhte CRP-Werte auch relevante prognostische Bedeutung. In mehr als 15 prospektiven klinischen Studien wurde gezeigt, dass erhöhte CRP-Werte mit kardiovaskulären Komplikationen korrelieren – sowohl kurzzeitig als auch in Bezug auf die Langzeit-Prognose<sup>24</sup>. Die Entwicklung von „high-sensitivity CRP“-Labortests (hs-CRP) hat zu einer Senkung der Nachweisgrenze von 10-1000mg/L bei CRP Messung auf 0.5-10mg/L geführt. Dadurch kam es zu einem Anstieg der diagnostischen Sensitivität, während „hs-CRP“ weiterhin sehr gut mit akutem Koronarsyndrom und dem Risiko für Stent-Restenose korreliert<sup>25</sup>.

Während ein Großteil der kardiovaskulären Forschung auf die Prädiktion von kardiovaskulären Ereignissen durch „hs-CRP“ fokussierte, wurde auch im Bereich Myokarditis gezeigt, dass CRP bei Patienten mit myokardialer Inflammation erhöht ist<sup>26,27</sup>. Während „hs-CRP“ in der Akutphase der Myokarditis erhöht ist, erreicht es beim Großteil der Patienten nach 3 Monaten Normwerte<sup>26</sup>.

### **Weitere inflammatorische Marker**

Myeloperoxidasen und Matrix-Metalloproteinasen sind weitere Biomarker, welche durch Inflammation im kardiovaskulären System freigesetzt werden und bisher primär in der Atheroskleroseforschung Relevanz aufwiesen. Myeloperoxidase wird als Enzym von neutrophilen Granulozyten freigesetzt und spielt durch seine pro-inflammatorische und pro-oxidative Funktion eine Rolle in der Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques. Hierzu

wurde unter anderem gezeigt, dass die Aktivität von Myeloperoxidase in den Leukozyten von Patienten mit koronarer Gefäßerkrankung im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht ist<sup>28</sup>.

Matrix-Metalloproteinasen sind ebenso Enzyme, welche bei kardiovaskulären Ereignissen eine relevante Rolle zu spielen scheinen. Sie sind in den meisten Geweben vorhanden und haben regulatorische Funktion in der extrazellulären Matrix. Sie sind ähnlich wie die Myeloperoxidase im Rahmen des akuten Koronarsyndroms erhöht<sup>29</sup>. Außerdem wurde auch bei Myokarditis im Tiermodell mittels Infektion durch Coxsackie Virus B<sub>3</sub> gezeigt, dass neun Tage nach Infektion mit dem Virus die Matrix-Metalloproteinasen 2, 9 und 12 ansteigen<sup>30</sup>.

## **Marker zur Detektion von hämodynamischem Stress**

### **Natriuretisches Peptid**

„Brain natriuretic peptide“ und „N-terminal brain natriuretic peptide“ (NT-proBNP) werden primär im Rahmen von Dehnung des Herzens und dadurch resultierende Zunahme der Wandspannung freigesetzt<sup>31</sup>. Das Prohormon BNP wird durch eine Endoprotease (Corin) im Blut in zwei Polypeptide, das inaktive NT-proBNP und das bioaktive BNP, gespalten. BNP wirkt im Körper auf mehreren Ebenen kardioprotektiv. Es führt zur Dilatation der Arterien, zur Natriuresis und Diuresis und reduziert die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems und die adrenerge Reaktion im Rahmen der Herzinsuffizienz.

Es wurde außerdem gezeigt, dass Ischämie im Rahmen des akuten Koronarsyndroms zu einer Freisetzung von NT-proBNP führt. So konnte eine Studie zeigen, dass die Transkription von BNP-Genen im infarzierten und ischämischen Gewebe gesteigert ist. Im umliegenden vitalen Gewebe war die Transkription unverändert<sup>32</sup>. Marumoto und Kollegen zeigten, dass BNP bei Patienten mit bekannter koronarer Gefäßerkrankung nach Belastung ansteigt und mit der Größe der

Ischämie korreliert<sup>33</sup>. Plasmakonzentrationen von BNP steigen rasch nach einem Herzinfarkt an, entsprechen der Größe des Infarktes<sup>34</sup> und haben somit auch prognostischen Wert<sup>31</sup>.

Im Bereich der Herzinsuffizienz wurde NT-proBNP zu einem der wichtigsten prognostischen Marker. BNP war der erste Biomarker, für welchen klinischer Nutzen für das Screening bei Herzinsuffizienz, aber auch für die Diagnose und Prognose bei Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion gezeigt wurde<sup>35</sup>. Zudem wurde berichtet, dass BNP ein unabhängiger Risikofaktor für Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern, Schlaganfall und Tod ist<sup>36</sup>.

Neben dem medizinischen Nutzen von BNP wurde außerdem beschrieben, dass es ein kosteneffektiver Marker ist. In diesem Sinne wurde in der REDHOT-Studie gezeigt, dass die Berücksichtigung von BNP bei der Entscheidung einen Patienten stationär aufzunehmen, unnötige Hospitalisierungen um 10% reduziert hätte<sup>37</sup>. BNP hat hohe Sensitivität beim Screening auf Herzinsuffizienz und damit hohen negativ prädiktiven Wert. Bei der Prädiktion von Re-Hospitalisierungen zeigte sich NT-pro-BNP besser geeignet als BNP, am ehesten auf Grund der längeren Halbwertszeit von NT-pro-BNP im Serum<sup>38</sup>.

Erhöhte BNP Werte finden sich auch bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie, diastolischer Dysfunktion und linksventrikulärer Pumpfunktion und korrelieren direkt mit der NYHA-Stadium Klasse beziehungsweise mit abnehmenden Herzzeitvolumen<sup>39</sup>.

Auch im Rahmen der Myokarditis zeigen sich erhöhte BNP-Werte sowohl bei Patienten als auch im Tiermodell<sup>40-42</sup>.

## **Transkriptom-Biomarker**

Mit dem Terminus Transkriptom sind die gesamten „messenger Ribonukleinsäure (RNS) Moleküle“, auch „Transcripts“ genannt, zusammengefasst, welche in einer gewissen Zelle oder Zellpopulation beziehungsweise in einem Gewebe vorhanden sind. Während „Transcripts“ geschätzt von weniger als 5% des Genoms des Menschen exprimiert werden, kann jedes Gen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) eine Vielzahl an „messenger-RNS-Molekülen“ erzeugen. Dies wird durch „alternative splicing“ ermöglicht und das Produkt der „messenger-RNS“ kann durch posttranslationale Verarbeitung noch weiter verändert werden<sup>43</sup>.

Durch die sogenannte „Highthroughput-Technologie“ wurde es möglich, die gesamte RNS eines Patienten gleichzeitig zu quantifizieren und mit spezifisch dafür entwickelten statistischen Programmen zu analysieren. Während die Technologie ursprünglich zur Detektion von pathophysiologischen Veränderungen angewandt wurde, um Krankheitsbilder besser zu verstehen, folgte sehr schnell die Anwendung von Transkriptomanalysen im Bereich der Biomarkerforschung. Die Pionierarbeit hierzu präsentierte man in der Krebsforschung, wo ein Transkriptom-Biomarker die Prognose von Patienten mit Brustkrebs mit höherer Genauigkeit bestimmen konnte, als klinische oder histologische Kriterien<sup>44</sup>. Ebenso erfolgreich zeigte sich ein prognostischer Transkriptom-Biomarker bei Lymphompatienten<sup>45</sup>.

Eine der wichtigsten Arbeiten im Bereich Transkriptom-Biomarker in der Kardiologie war sicherlich die Entwicklung des „Allomap Risk Scores“ im Rahmen der „CARGO-Studie“<sup>46</sup>. Der „Allomap-Test“ dient der Verlaufskontrolle von Patienten, welche ein Herztransplantat erhalten haben, in dem er eine Abstoßung eines Herztransplantates durch Transkriptomanalyse von peripheren Blutzellen detektieren kann. Von den 20 Genen, welche in der Transkriptomanalyse

gemessen werden, enthalten 11 Gene diagnostische Informationen. Neun Gene dienen der Normalisierung und Qualitätskontrolle. Der Test besteht aus einer Routineblutabnahme und die Ergebnisse sind innerhalb von 2 Tagen erhältlich. Wird eine Überexpression bestimmter Gene mit dem „Allomap-Test“ nachgewiesen, wird empfohlen, eine Verlaufs-Myokardbiopsie beim Patienten durchzuführen, um den Patienten auf eine mögliche Abstoßung zu evaluieren. Durch die Einführung des „Allomap-Tests“ und somit der nicht-invasiven Überwachung auf mögliche Transplantatabstoßung, konnten die Intervalle der Verlaufs-Myokardbiopsien um mehrere Monate ausgedehnt werden<sup>46</sup>. Der Test wurde innerhalb von wenigen Jahren durch die „Food and Drug Administration“ (FDA) bewilligt und die Kosten dafür werden mittlerweile in Amerika von den meisten Versicherungen übernommen. In Europa wird dieser Test bisher noch nicht routinemäßig angewandt.

Nach dem Erfolg des „Allomap-Tests“ haben wir uns diese Technologie zum Vorbild genommen und ähnliche Algorithmen im Bereich der sekundären Kardiomyopathien angewandt, welche in der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift näher präsentiert werden.

### **Biomarker in der Bildgebung**

Wie oben bereits beschrieben, gibt es keine perfekten Biomarker in der Medizin und die Diagnose stellt sich immer aus der Gesamterhebung aller vorhandenen Daten. Eine wichtige Ergänzung zu laborchemischen Biomarkern und Transkriptom-Biomarkern sind im Bereich der Kardiomyopathien auch die Biomarker in der Bildgebung, insbesondere in der Magnetresonanztomografie (MRT). Während die MRT-Untersuchung aktuell den nicht-invasiven Goldstandard zur Diagnose der Myokarditis darstellt<sup>47</sup>, wurde mittlerweile auch ein hoher prognostischer Wert dieser Bildgebungstechnik beschrieben. So haben Gräni und Kollegen

gezeigt, dass die Verteilung des „Late Gadolinium Enhancements“ (LGE) im MRT insbesondere im Bereich des midventrikulären Septums des linken Ventrikels ein früher Prädiktor für kardiovaskuläre Komplikationen bei Myokarditis ist<sup>48</sup>. Ähnliches haben wir in unserem Projekt beobachtet, welches im Rahmen dieser kumulativen Habilitationsschrift unter anderem näher präsentiert wird.

In der vorgelegten kumulativen Habilitationsschrift werden anhand von fünf meiner ausgewählten Publikationen die Anwendungsbereiche von Transkriptombiomarkern, als auch Routinebiomarkern und Marker in der Bildgebung im Bereich sekundärer Kardiomyopathien beschrieben:

- 1) Ein Transkriptombiomarker zur Prognoseerhebung bei neu diagnostizierter Herzinsuffizienz (*Heidecker et al, Circulation, 2008*)
- 2) Geschlechtsspezifische Unterschiede im Transkriptom bei neu diagnostizierter Herzinsuffizienz (*Heidecker et al, European Heart Journal, 2010*)
- 3) Ein Transkriptombiomarker zur Diagnose von Myokarditis (*Heidecker et al, Circulation 2011*)
- 4) MRT Diagnostik und Korrelation der Bildgebung mit Routinelabors bei Myokarditis (*Berg,..., and Heidecker, Circulation Heart Failure, 2017*)
- 5) Ein Transkriptombiomarker zur Evaluation der molekularen Wirkung von Beta-Blockern und zum Nachweis des Therapieerfolges (*Heidecker, JACC Basic Translational Science, 2016*)

Das langfristige Ziel meiner Forschung ist durch personalisierte Medizin die Therapie und Prognose der Patienten mit sekundären Kardiomyopathien, insbesondere Myokarditis zu verbessern. Hierzu habe ich in meinen Forschungsprojekten zu Beginn auf eine Verbesserung



der Diagnostik und Prognoseerhebung fokussiert, aber auch Wege gesucht, um den Therapieerfolg zu monitorisieren. Durch Microarrayanalysen haben wir in kürzester Zeit einen großen Umfang an Daten und auch Hypothesen generiert, welchen ich mit meiner Arbeitsgruppe in den nächsten Jahren in umfassenderen Studien mit größeren Kohorten nachgehen werde. Unter anderem werden wir den prognostischen und diagnostischen Marker in einer größeren multizentrischen Studie testen. Außerdem plane ich mit meiner Arbeitsgruppe die Funktion von Rad50 genauer zu studieren, da dieses Gen bei Patienten mit Herzinsuffizienz und guter Prognose vermehrt aktiv war und möglicherweise für besseres Regenerationspotential dieser Patienten verantwortlich ist. Rad50 ist ein Gen, dass in die Telomeraseaktivität von Zellen und Stammzellenaktivität involviert ist<sup>49, 50</sup>. Insbesondere werden wir evaluieren, ob bei Patienten mit Myokarditis Rad50 eine Rolle in der Prognose spielt.

Da Microarrayanalysen sehr kostspielig sind, habe ich in den letzten Jahren auch zusätzliche klinische Risikofaktoren evaluiert, welche breiter in der Klinik anwendbar sind als Microarrays. So haben wir gezeigt, dass MRT Ergebnisse wichtige Information über die Prognose von Patienten<sup>26</sup> und den Krankheitsverlauf<sup>51</sup> aufzeigen. Zusätzlich habe ich mit meiner Arbeitsgruppe durch MRT Studien gezeigt, dass leichtere Fälle einer Myokarditis immer noch stark unterdiagnostiziert werden und die Inzidenz damit stark unterschätzt wird<sup>52, 53</sup>. Eine Limitation dieser Studie war, dass aus beim Großteil dieser Patienten keine definitive Gewebdiagnose mittels Histologie vorhanden war. Da dies eine sehr umfassende Studie war, welche auch Patienten einschloss, die nur eine leicht Form der Myokarditis hatten, wäre es ethisch nicht vertretbar gewesen, dies Patienten zu biopsieren.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1. Transcriptomic Biomarkers for Individual Risk Assessment in New-Onset Heart Failure

**Bettina Heidecker**, Edward K. Kasper, Ilan S. Wittstein, Hunter C. Champion, Elayne Breton, Stuart Dr. Russell, Michelle M. Kittleson, Kenneth L. Baughman, and Joshua M. Hare. *Circulation* 2008. 118: 238-246

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.756544>

In dieser Arbeit haben wir einen Transkriptombiomarker für die Prognoseerstellung von neu diagnostizierter Herzinsuffizienz entwickelt. Hierzu wurden Myokardbiopsien verwendet, welche über einen Zeitraum von etwa 10 Jahren gesammelt wurden. Somit war uns die Langzeitprognose dieser Patienten bekannt. Aus insgesamt 350 Myokardbiopsien wurden 180 mit idiopathischer dilatierter Kardiomyopathie identifiziert. Daraus wurden 25 Myokardbiopsieproben von Patienten mit guter Prognose und 18 von Patienten mit schlechter Prognose ausgewählt. Durch Transkriptomanalysen haben wir einen prognostischen Biomarker bestehend aus 45 Genen entwickelt, welcher die Prognose von Patienten mit neudiagnostizierter Herzinsuffizienz mit hoher Genauigkeit voraussagte (Sensitivität 74%, Spezifität 90%).





















## 2.2. The Gene Expression Profile of Patients with New-Onset Heart Failure Reveals Important Gender-Specific Differences

**Bettina Heidecker**, Guillaume Lamirault, Edward K. Kasper, Ilan S. Wittstein, Hunter C. Champion, Elayne Breton, Stuart D. Russell, Jennifer Hall, Michelle M. Kittleson, Kenneth L. Baughman, and Joshua M. Hare. *European Heart Journal* 2010, 31:1188-1196

<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp549>

In dieser Arbeit haben wir geschlechtsspezifische Unterschiede im Transkriptom von Patienten mit neu diagnostizierter Herzinsuffizienz untersucht.

Wir haben dabei das Transkriptom von 29 Myokardbiopsien von Männern und 14 Myokardbiopsien von Frauen analysiert. Es zeigten sich 35 Gene bei Männern gegenüber Frauen überexprimiert, während 16 Gene bei Männern weniger aktiv waren ( $q < 5\%$ , fold change  $> 1.2$ ). Neben Y-Chromosom spezifischen Genen, wie zum Beispiel USP9Y, DDX3Y, RPS4Y1 und EIF1AY welche bei Männern überexprimiert waren, zeigten sich außerdem die autosomalen Gene CD24 und KCNK1 bei Männern stärker aktiv. Bei Frauen wiederum waren X-chromosomal spezifische Gene wie XIST und autosomale Gene wie GATAD1, SLC2A12 und PDE6B überexprimiert. Wichtig war dabei die Beobachtung, dass das Genprodukt einiger der unterschiedlich exprimierten Gene, wie zum Beispiel KCNK1 und PDE6B, therapeutische Angriffspunkte von Medikamenten sind. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Genexpression sollten im Zeitalter der Präzisionsmedizin bei der Entwicklung von neuen Medikamenten berücksichtigt werden, da sich die Wirkung von Medikamenten dadurch möglicherweise bei Männern und Frauen unterscheidet.





















### 2.3. Transcriptomic Biomarkers for the Accurate Diagnosis of Myocarditis

**Bettina Heidecker**, Michelle M. Kittleson, Edward K. Kasper, Ilan S. Wittstein, Hunter C. Champion, Stuart Dr. Russell, Ralph H. Hruban, E. Rene Rodriguez, Kenneth L. Baughman, and Joshua M. Hare. *Circulation* 2011, 123: 1174-1184

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.002857>

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines diagnostischen Transkriptombiomarkers für lymphozytäre Myokarditis. Auch dieser wurde anhand der beschriebenen Analysen aus Myokardbiopsien entwickelt. Hierzu wurden Biopsien von 16 Patienten mit Myokarditis und 32 Patienten mit dilatierter idiopathischer Kardiomyopathie verwendet. Zunächst wurden 9878 Gene identifiziert, welche bei Patienten mit lymphozytärer Myokarditis im Vergleich zu idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie unterschiedlich exprimiert wurden (fold change > 1.2, false discovery rate <5%). Danach reduzierten wir dieses Set an Genen durch statistische Klassifikationsalgorithmen zu einem diagnostischen Transkriptombiomarker, bestehend aus einem Set von 62 Genen, welcher Patienten mit Myokarditis mit hoher Genauigkeit diagnostizierte (Sensitivität: 100%; 95% CI: 46 - 100, Spezifität: 100%; 95% CI: 66 - 100). Dieser wurde in mehreren Kohorten erfolgreich validiert, in welchen er weiterhin eine hohe Genauigkeit erreichte (83%).



























## 2.4. Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Myocarditis Reveals Persistent Disease Activity *Despite* Normalization of Cardiac Enzymes and Inflammatory Parameters at 3-Month Follow- Up

Jan Berg, Jan Kottwitz, Nora Baltensperger, Christine K. Kissel, Marina Lovrinovic, Tarun Mehra, Frank Scherff, Christian Schmied, Christian Templin, Thomas F. Lüscher, **Bettina Heidecker\***, Robert Manka\* (**\*authors contributed equally**) *Circulation Heart Failure* 2017, 10(11). pii: e004262

<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004262>

In dieser Studie haben wir evaluiert, ob Routinelaborparameter, einschließlich Herzmarker (High sensitivity Troponin T, CK-MB, Myoglobin, NT-proBNP) und inflammatorische Marker (hsCRP, Leukozyten) das Fortschreiten einer Myokarditis, gemessen an Zunahme von LGE ausreichend voraussagen, da Abnahme entzündlicher Marker im Blut oft als Besserung interpretiert wird. Zunahme von LGE ist ein Zeichen für eine Verschlechterung und ein Prädiktor für kardiovaskuläre Komplikationen. Es wurden alle Patienten eingeschlossen, welche sich von 2015 bis 2017 mit Myokarditis präsentiert hatten. Patienten erhielten zu Beginn zur Diagnostik und nach 3 Monaten zur Verlaufskontrolle ein MRT des Herzens. Die Ausdehnung von LGE im Herzmuskel wurde mittels der Software GT Volume gemessen und eine LGE-Zunahme von > 20% galt als signifikant. Es wurden 24 Patienten eingeschlossen, wovon 18 (75%) Männer waren. Das mittlere Alter war 36±16 Jahre. In dieser Studie haben wir gezeigt, dass Herzmarker und inflammatorische Parameter das Fortschreiten der Ausdehnung von LGE nach 3 Monaten nicht ausreichend vorhersagen und empfehlen, dass bei Hochrisikopatienten eine Verlaufskontrolle nach 3 Monaten mittels Magnetresonanztomografie durchgeführt wird. Herzmarker und inflammatorische Parameter hatten sich nämlich zu diesem Zeitpunkt bei 21 Patienten (88%) komplett normalisiert, während bei 17 davon (71%) weiterhin LGE vorhanden war.



















## 2.5. Transcriptomic Analysis Identifies the Effect of Beta-Blocking Agents on a Molecular Pathway of Contraction in the Heart and Predicts Response to Therapy

*Bettina Heidecker, Michelle M. Kittleson, Edward K. Kasper, Ilan S. Wittstein, Hunter C. Champion, Stuart D. Russell, Kenneth L. Baughman, Joshua M. Hare. JACC: Basic to Translational Science 2016, 1(3):107-121*

<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.02.001>

In dieser Arbeit haben wir die molekularen Mechanismen der Therapie mit Beta-Blockern im Detail evaluiert. Es wurden hierzu 43 Myokardbiopsien von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie analysiert. Davon haben 30 Patienten Beta-Blocker im Rahmen der Standardherzinsuffizienztherapie erhalten, während 13 Patienten mit Standardherzinsuffizienztherapie ohne Beta-Blocker behandelt wurden, da bei ihnen Kontraindikationen oder Unverträglichkeiten vorlagen. In dieser Studie haben wir durch Mikroarrayanalysen des Transkriptoms unter anderem festgestellt, dass proapoptische Gene durch Beta-Blocker Therapie positiv beeinflusst werden. Es ist denkbar, dass Beta-Blocker durch eine mögliche Reduktion von Nekrose und Inflammation als Folge dem „Remodeling“ entgegenwirken und damit die linksventrikuläre Pumpfunktion stabilisieren. Außerdem zeigte sich eine Gruppe an Genen bei gutem Therapieerfolg überexprimiert. Diese könnten als Marker für Therapieerfolg dienen, müssen aber noch in einer größeren Studie validiert werden.



































### 3. DISKUSSION

Das Ziel meiner Forschungsarbeiten war die Diagnostik und Therapie der sekundären Kardiomyopathien, insbesondere der Myokarditis, durch personalisierte Medizin zu verbessern. Ich habe hierzu mit meiner Arbeitsgruppe sowohl Routinelaborwerte, Transkriptombiomarker, Proteombiomarker und MRT Bildgebung verwendet. Durch diese Methodik haben wir die Genauigkeit der Diagnostik von Patienten mit Herzinsuffizienz, aber auch die prognostische Einschätzung verbessert. Außerdem war es uns möglich, den Therapieerfolg bei Herzinsuffizienz und Myokarditis mittels MRT und Transkriptomanalyse nachzuweisen.

Biomarker begleiten uns im täglichen klinischen Alltag und helfen uns bei diagnostischem Screening, Diagnostik, prognostischer Evaluation und beim Nachweis von Therapieerfolg. Im Zeitalter der Präzisionsmedizin rücken individuelle Biomarker immer mehr in den Vordergrund<sup>4-6</sup>. Es wird zunehmend erkannt, dass die genetische Prädisposition, aber auch Transkription, Translation und posttranslationale Prozesse bei der Ausprägung eines Phänotyps eine relevante Rolle spielen<sup>4,43</sup>. Im Bereich der Biomarkerforschung mittels Transkriptomanalysen zeigten sich die ersten Erfolge in der Onkologie, wodurch auch in der kardiovaskulären Forschung das Interesse an dieser Analysemethode stieg. In der Kardiologie entwickelte sich der Bereich der Transkriptomanalysen durch eine Pionierarbeit im Bereich der Herztransplantmedizin<sup>46</sup>. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Analyse des Transkriptoms der peripheren Blutzellen eine Abstoßung des Herzens detektiert werden konnte<sup>46</sup>. Wir haben uns diese Technologie in unseren Untersuchungen im Bereich der Diagnostik von Myokarditis, aber auch

zur prognostischen Evaluation und Detektion von Therapieerfolgen bei dieser Erkrankung zu Nutzen gemacht.

Nachdem der Terminus Biomarker im Jahre 1989 zum ersten Mal eingeführt wurde, gewannen Biomarker in Hinblick auf „Big data“- beziehungsweise High-Throughput-Analysen zunehmend an Bedeutung. Durch diese neuen Analysemöglichkeiten konnte eine Vielzahl an Variablen gleichzeitig analysiert und mit einem spezifischen Phänotyp assoziiert werden. Anspruchsvolle Algorithmen im Bereich der Bioinformatik wurden entwickelt, um mögliche Fehlerquellen bei „High-Throughput“-Analysen zu adressieren. Unter anderem ist es von immenser Bedeutung, immer eine Validierung des neu entwickelten Biomarkers in einer unabhängigen Datengruppe durchzuführen, da sonst ein Risiko für „Overfitting“ besteht<sup>4-6</sup>. „Overfitting“ beschreibt, dass bei einer sehr großen Anzahl von Variablen, die getestet werden, allein durch Zufall gewisse Parameter mit einem Phänotyp assoziiert sein könnten. Wenn man „overfitted“-Biomarker dann in einem neuen Set an unabhängigen Daten testet, welche in der Entwicklung des Biomarkers nicht involviert waren, sind die Ergebnisse in Bezug auf Genauigkeit des Biomarkers oft nicht mehr reproduzierbar<sup>4-6</sup>. Dieses Problem stellte sich zu Beginn der „Big-data“-Analysen und wurde mittlerweile von den meisten Experten ausreichend adressiert, indem man den Biomarker in 2/3 der Daten entwickelt und in 1/3 der Daten testet und validiert. Nur bei akzeptabler Genauigkeit des Biomarkers im unabhängigen Datenset (1/3 der Daten), wird die Weiterentwicklung des Biomarkers üblicherweise verfolgt. Es gibt allerdings immer noch gelegentlich Studien in der Literatur, bei denen eine unabhängige Validierung nicht stattgefunden hat – umso wichtiger ist es, dass der Leser diese Analysen kritisch betrachtet und den Hintergrund der Statistik versteht.

Während Transkriptombiomarker im Bereich der sekundären Kardiomyopathien den Hauptbestandteil dieser Arbeit darstellen, ist es wichtig auch andere diagnostische Methoden zu

berücksichtigen, insbesondere die kardiale Magnetresonanztomografie, welche bei der Diagnose der Myokarditis der nichtinvasive diagnostische Goldstandard ist<sup>11, 26, 47, 53, 54</sup>. Mittlerweile wurden mit der Magnetresonanztomografie auch prognostische Marker bei Myokarditis entwickelt, auf welche weiter unten noch näher eingegangen wird. Wie oben erwähnt, gibt es keinen perfekten Biomarker, da Biomarker immer aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Pathomechanismen resultieren und somit meistens nicht für eine Erkrankung spezifisch sind. Eine Interpretation aller vorliegenden Befunde ist somit auch bei sekundären Kardiomyopathien besonders wichtig.

In dieser kumulativen Habilitationsschrift wird zuerst ein prognostischer Transkriptombiomarker beschrieben, welcher bei Patienten mit neu diagnostizierter Herzinsuffizienz angewandt wurde.

Die Prognoseeinschätzung bei neu diagnostizierter Herzinsuffizienz stellt immer noch ein Problem dar. Insbesondere ist diese wichtig bei der Entscheidung, ob ein Patient für Herztransplantat gelistet werden soll, da es eine Knappheit an Spenderherzen gibt und diese optimal verteilt werden müssen.

Es wurden als Folge in der Literatur bereits viele Risikomodelle und –marker präsentiert, um die Prognose von Herzinsuffizienzpatienten besser einzuschätzen, unter anderem das etablierte Seattle Heart Failure Model: <https://depts.washington.edu/shfm/?width=1440&height=900>.

Wir haben dieses Modell an klinischen Daten unserer Kohorte, welche für die erste Arbeit dieser kumulativen Habilitationsschrift verwendet wurde, getestet. Die klinischen Daten wurden vom Zeitpunkt der neudiagnostizierten Herzinsuffizienz über einen Zeitraum von 10 Jahren gesammelt. Somit war die Langzeitprognose aller Patienten bekannt. Patienten wurden in solche mit schlechter und guter Prognose eingeteilt. Patienten mit schlechter Prognose waren innerhalb von 2 Jahren verstorben oder benötigten ein Herztransplantat oder einen linksventrikulären

„Assist Device“. Patienten mit guter Prognose überlebten mindestens 5 Jahre ohne diese Eingriffe. Während das „Seattle Heart Failure Model“ aktuell eines der am meist etablierten Modelle ist, hatte es bei Anwendung an den klinischen Daten unserer Patienten keinen der Hochrisikopatienten mit schlechter Prognose korrekt identifiziert und nur 71% der Patienten mit guter Prognose korrekt klassifiziert.

Unsere Hypothese war es, dass die prognostische Evaluation durch einen Transkriptombiomarker verbessert werden kann, da dieser auch biologische Prozesse auf molekularer Ebene widerspiegelt. Wir haben hierzu Myokardbiopsien verwendet, welche über einen Zeitraum von 10 Jahren gesammelt und in Flüssigstickstoff gelagert wurden. Nach Isolation der RNS führten wir eine Transkriptomanalyse durch und entwickelten einen prognostischen Transkriptombiomarker, welcher zu genaueren Prädiktionen unserer Patienten führte als das „Seattle Heart Failure Model“ ( $p < 0.011$ ).

Eine weitere Stärke dieser Studie war, dass wir zum ersten Mal RNS mit Microarrays analysiert hatten, ohne einen Amplifizierungsschritt vorzuschalten. Ein Amplifizierungsschritt kann zu Bias führen, da Primer mancher Gene während der Amplifikation besser binden als andere und es somit zu einer Überrepräsentation gewisser Gene kommen kann die nicht die wirkliche Aktivität in der Zelle widerspiegelt.<sup>55</sup>

Zusätzlich wurden alle Patienten in einem frühen Stadium der Herzinsuffizienz diagnostiziert und reflektieren damit am besten die Zielpopulation für welche die Prognostik üblicherweise durchgeführt wird.

In unserer Studie haben wir einen Transkriptombiomarker entwickelt, bestehend aus 45 Genen, welcher den Phänotyp der untersuchten unabhängigen Proben in der Validierungskohorte (1/3 der Daten) mit 90-prozentiger Spezifität voraussagte. Dies macht den Biomarker insbesondere als

Ausschlusstest von Risikopatienten bei neu diagnostizierter Herzinsuffizienz wertvoll, welcher bei der aktuellen Standardevaluation mitberücksichtigt werden könnte. Hierzu sind aber noch größere klinische Validierungsstudien notwendig.

Unter den 45 Genen befanden sich solche, welche das bessere Regenerationspotential der Patienten mit guter Prognose erklären könnten und damit biologisch plausibel sind. Bei Patienten mit guter Prognose waren unter anderem Gene stärker aktiviert, welche im Zellzyklus und in der Apoptose eine Rolle spielen. Dazu gehört auch Hypoxia Inducible Factor (HIF) 3 A, welches Funktionen in der Bildung von Blutgefäßen, Erythropoetin und Glukosetransportern hat, ähnlich HIF1A und HIF2A<sup>56,57</sup>.

Zusätzlich fanden sich unter den 45 Genen Rad50 und SMG6, welche ebenso eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Zellen tragen, da sie eine wichtige regulatorische Funktion bei der DNS Reparatur und Telomerase Aktivität haben<sup>49</sup>. Rad50 ist an einem Mechanismus beteiligt, welcher der Verkürzung von Telomeren entgegenwirkt und führt dadurch unter anderem zu besserer DNS Stabilität und verlangsamer Zellalterung. Rad50 ist außerdem für das Überleben von Stammzellen notwendig<sup>50</sup>.

Zusammenfassend war der prognostische Biomarker in der Vorhersage des klinischen Verlaufs über die folgenden 5 Jahre eines Patienten mit neu diagnostizierter Herzinsuffizienz sehr genau. Zusätzlich waren die Gene, aus welchen sich dieser Biomarker zusammensetzt, biologisch plausibel und bilden somit neue Forschungshypothesen.

Im Zeitalter der Präzisionsmedizin sollten aber auch individuelle Unterschiede zwischen Patienten bei der Entwicklung von Biomarkern berücksichtigt werden, um die Genauigkeit der Tests noch weiter zu optimieren.

Insbesondere sollte die Berücksichtigung von geschlechtsspezifischen Unterschieden die Basis für personalisierte Medizin darstellen, da diese Unterschiede sowohl in der Präsentation des Krankheitsbildes als auch im klinischen Verlauf sehr einschlägig sein können, wie bereits viele klinische Studien gezeigt haben<sup>58-67</sup>.

In diesem Sinne hatten wir uns die Evaluation von geschlechtsspezifischen Unterschieden bei Patienten mit idiopathischer dilatierter Kardiomyopathie und neu diagnostizierter Herzinsuffizienz zum Ziel gesetzt. Die genauen Ergebnisse hierzu finden sich in der zweiten Arbeit dieser kumulativen Habilitationsschrift.

Wir haben hierzu Myokardbiospien von Patienten mit neu diagnostizierter Herzinsuffizienz mittels Transkriptomanalysen auf geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht und anschließend mit Daten einer Kohorte mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz verglichen.

Wie erwartet, zeigte sich eine beachtliche Anzahl geschlechtsspezifischer Unterschiede im Transkriptom von Patienten mit neudiagnostizierter Herzinsuffizienz – viele davon waren Geschlechtschromosom-spezifisch<sup>68</sup>.

Besonders interessant waren geschlechtsspezifische Unterschiede in der Aktivität von Genen, deren Genprodukt Angriffspunkt medikamentöser Therapien sind. So zeigte sich zum Beispiel in unserer Arbeit, dass KCNK1 bei Männern stärker exprimiert wird als bei Frauen. Dieses Gen wird durch Ibutilide und Typ Ia Antiarrythmika Quinidine und Quinine direkt inhibiert. Außerdem wurde gezeigt, dass Bupivacaine KCNK1 negativ reguliert. Berücksichtigung dieser Information könnte für die weitere Entwicklung von Therapien nützlich sein.

Das Genprodukt eines weiteren Gens, welches bei Männern weniger exprimiert wurde als bei Frauen war PDE6B. PDE6B wird direkt durch Sildenafil und Tadalafil inhibiert<sup>69</sup>.



Eine interessante Beobachtung war außerdem, dass viele der geschlechtsspezifisch exprimierten Gene im fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz nicht mehr nachweisbar waren. Auch dieses Ergebnis ist biologisch plausibel, da es bei Fortschreiten der Erkrankung zunehmend zu Umbau und Fibrosebildung kommt, was unter der Berücksichtigung unserer Ergebnisse einen gemeinsamen „Pathway“ im Endstadium der Herzinsuffizienz vermuten lässt.

Es muss allerdings auch kritisch berücksichtigt werden, dass die Kohorte mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz aus nur 15 Patienten bestand, womit möglicherweise nur sehr robuste Unterschiede in der Genexpression nachgewiesen wurden.

Unsere Ergebnisse bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz werden allerdings bestärkt durch Daten von Fermin und Kollegen, welche in ihrer Arbeit sehr ähnliche Resultate publiziert hatten (85% Übereinstimmung aller Ergebnisse)<sup>70</sup>.

Als nächste Arbeit hatten wir versucht, einen diagnostischen Transkriptombiomarker zur Diagnose von Myokarditis zu entwickeln. Die Diagnosestellung der Myokarditis bereitet klinisch immer noch Schwierigkeiten, da sich Patienten mit Myokarditis meist ähnlich wie Patienten mit akutem Koronarsyndrom präsentieren. Selbst nach invasiver Testung und Myokardbiopsie ist die Myokarditis auf Grund der niedrigen Sensitivität der Histologie immer noch schwer nachzuweisen.

Wir testeten daher die Hypothese, dass eine Transkriptomanalyse von Myokardbiopsien zu höherer diagnostischer Genauigkeit führt, da hierbei ein breites Spektrum an Genen analysiert wird und somit auch frühe Prozesse der Inflammation nachgewiesen werden können, während für die histologische Diagnose bereits rekrutierte inflammatorische Zellen notwendig sind. In unserer Transkriptomanalyse haben wir 9,878 Gene identifiziert, welche bei lymphozytärer Myokarditis

gegenüber idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie unterschiedlich exprimiert waren. Im Anschluss wurde eine etablierte Klassifikationssoftware angewandt, um die relevantesten Gene nachzuweisen, welche zur Diagnose von Myokarditis notwendig sind. Damit wurde das Set von Genen von 9,878 auf 62 reduziert, welche ebenso als biologisch plausibel erschienen. Unter anderem zeigte sich bei Patienten mit Myokarditis eine stärkere Genaktivität des Toll Like Receptor Signaling Pathways und von CD14, welche auch in der Literatur bereits im Rahmen der Myokarditis als überexprimiert beschrieben worden waren<sup>71, 72</sup>. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass HLA-DQ1+ bei Patienten mit Myokarditis verstärkt vertreten war (60%), während die Prävalenz bei Patienten mit idiopathischer dilatierter Kardiomyopathie nur 20% betrug. Realtime-RT PCR Analyse bestätigte dieses Ergebnis, was eine Prädisposition zu Myokarditis beim HLA-DQ1+Phänotyp vermuten lässt. Eine höhere Prävalenz an HLA-DQ1+ wurde später außerdem bei schwereren Formen der Checkpoint Inhibitor Induzierten Myokarditis nachgewiesen<sup>73</sup>.

Unter den überexprimierten Genen bei Myokarditis befand sich auch ein Gen, welches für den TSH Rezeptor codiert. Diese Beobachtung lässt auf einen möglichen Zusammenhang der lymphozytären Myokarditis mit der Pathophysiologie von Autoimmunthyreoditis schließen, wie er auch für Riesenzellmyokarditis beschrieben wurde<sup>74</sup>.

Der resultierende Transkriptombiomarker bestehend aus 62 Genen wurde schließlich auf mehrere Weisen in unabhängigen Kohorten validiert. Zuerst wurde der Biomarker in einer Kohorte mit ähnlichen klinischen Parametern getestet und diagnostizierte hierbei alle Proben korrekt.

Danach wurde der Transkriptombiomarker bei Proben von Patienten mit sekundären Kardiomyopathien angewandt, welche mit inflammatorischen Infiltraten einhergehen können.

Diese umfassten unter anderem systemischen Lupus Erythematosus, Sarkoidose, Peripartum Kardiomyopathie. Auch in diesen Proben diagnostizierte der Biomarker Myokarditis mit hoher Genauigkeit (Sensitivität 100%, Spezifität 95%). Alle Patienten mit Riesenzellenmyokarditis wurden korrekt identifiziert. Dabei handelt es sich um eine Patientengruppe mit besonders schlechter Prognose bei verzögerter Diagnose und Therapie<sup>75</sup>. Eine weitere Validierung des Biomarkers erfolgte in einer Kohorte mit unterschiedlichen klinischen Parametern im Vergleich zur ursprünglichen Kohorte, in welcher der Biomarker entwickelt wurde. Damit testeten wir die breite Anwendbarkeit, da abweichende klinische Parameter und Komorbiditäten das Genexpressionsprofil beeinflussen können. Insbesondere war die linksventrikuläre Pumpfunktion höher (65% gegenüber 30%). Es wurden hierbei weiterhin 83% der Proben korrekt diagnostiziert. Auch bei Gewebe von normalem Herzen zeigte sich sehr hohe diagnostische Genauigkeit. Um auf Intra-Plattform Reproduzierbarkeit zu testen, haben wir den Biomarker außerdem an den Daten einer weiteren Kohorte getestet, welche durch eine Prototyp Microarray entstanden sind. Auch hier zeigte sich nochmals eine hohe Genauigkeit des Biomarkers.

In einer weiteren Arbeit haben wir evaluiert, ob es bei Myokarditis auch eine kostengünstigere Variante an Biomarkern gibt, welche durch Routinelabors im klinischen Alltag analysiert werden können, um Risikopatienten zu identifizieren. Insbesondere waren wir daran interessiert zu evaluieren, ob eine mögliche Verschlechterung des Patienten, gemessen als Zunahme von LGE, durch Routinelabors zum Zeitpunkt der Diagnose Myokarditis vorausgesagt werden kann. LGE beziehungsweise Zunahme von LGE ist ein wichtiger Prädiktor für kardiovaskuläre Komplikationen<sup>48</sup>. Überraschenderweise hatten sich Routinelabors und inflammatorische Blutparameter bereits innerhalb von Tagen bei den meisten Patienten normalisiert und bei fast

allen Patienten nach 3 Monaten. Sie korrelierten somit nicht mit der Zu- oder Abnahme von LGE und konnten den Verlauf nicht ausreichend voraussagen. Noch unerwarteter war die Beobachtung, dass sich auch bei Patienten mit Zunahme von LGE die Routineparameter normalisiert hatten. Eine Patientin mit Zunahme von LGE präsentierte sich 6 Monate nach Diagnose in der Notaufnahme mit polymorphen ventrikulären Tachykardien. Ihre inflammatorischen Marker als auch Herzenzyme hatten sich zum Zeitpunkt der 3-Monats-Nachkontrolle normalisiert, während LGE zu diesem Zeitpunkt > 20% zunahm. Unsere Beobachtungen zeigen, dass das Monitoring von Blutparametern bei Hochrisikopatienten zur Einschätzung des entzündlichen Infiltrats im Myokard und des kardiovaskulären Risikos nicht ausreichend ist. Bei Hochrisikopatienten sollte eine Nachkontrolle mittels MRT in Erwägung gezogen und gegebenenfalls bei Zunahme von LGE für mehrere Monate eine Lifevest getragen werden.

Zuletzt haben wir einen Transkriptombiomarker vorgestellt, welcher molekulare Veränderungen und möglichen Therapieerfolg während der Therapie mit Beta-Blockern detektierte. In dieser „Proof-of-Concept“ Studie hatten wir die gleichen Software-Algorithmen angewandt, wie für den prognostischen Marker bei Herzinsuffizienz und den diagnostischen Marker bei Myokarditis. Wir beschrieben 94 Gene, welche bei Patienten unter Standardherzinsuffizienztherapie einschließlich Beta-Blocker-Therapie im Vergleich zu Patienten mit Standardherzinsuffizienztherapie ohne Beta-Blocker auf Grund von Kontraindikationen unterschiedlich exprimiert waren. Auch die Ergebnisse dieser Studie erschienen biologisch plausible und zeigten während der Beta-Blocker Therapie eine erhöhte Aktivität von Genen welche in den Prozessen der Apoptose involviert sind. Wir hatten daraus geschlussfolgert, dass die Aktivierung des programmierten Zelltodes zu einer Reduktion von Nekrose, Inflammation und Gewebszerstörung führt. Dies kann weiter die

Reduktion negativer Umstrukturierung des Myokards in nicht funktionelles Gewebe („Remodeling“) erklären, welche einen wichtigen Wirkmechanismus der Beta-Blocker-Therapie darstellt. Außerdem wurde ein Gen aktiviert, welches im Rahmen von oxidativem Stress freigesetzt wird und dadurch möglicherweise protektive Funktion hat (OXR-1).

Während die erste Analyse mögliche Hypothesen zum molekularen Wirkmechanismus von Beta-Blockern bei Patienten mit Herzinsuffizienz generiert hatte, folgte im nächsten Schritt die Entwicklung eines Transkriptombiomarkers, welcher Patienten mit gutem Ansprechen auf Therapie mit Beta-Blockern identifizierte. Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor, ein Gen welches in der Interaktion von Aktin-Myosin im Myokard eine Rolle spielt zeigte sich bei Patienten mit gutem Ansprechen auf die Therapie als überexprimiert.

Nach der erfolgreichen Entwicklung und Anwendung von Transkriptommarker aus Myokardbiopsien ist unser zukünftiges Ziel, periphere Leukozyten als mögliche Surrogat-Marker zu untersuchen. In der Literatur wurde gezeigt, dass erhebliche Korrelation zwischen dem Genexpressionsprofil von peripheren Leukozyten und erkrankten Organen besteht<sup>76</sup>.

#### **4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK**

Mein Forschungsbereich war bisher auf die Entwicklung von Biomarkern im Bereich Herzinsuffizienz und sekundäre Kardiomyopathien fokussiert. Zusammen mit meiner Arbeitsgruppe haben wir einen Transkriptombiomarker für die Diagnose und Prognose bei Patienten mit neu diagnostizierter Herzinsuffizienz entwickelt, als auch einen Marker zum Monitoring des Ansprechens auf Beta-Blocker Therapie. Hierbei haben wir wichtige individuelle Unterschiede im Genexpressionsprofil von Patienten mit Herzinsuffizienz beschrieben, welche im

Zeitalter der Präzisionsmedizin berücksichtigt werden sollten, insbesondere geschlechtsspezifische Unterschiede, aber auch Unterschiede basierend auf Krankheitsstadium und funktionelle Parameter.

Robuste statistische Analysen sind notwendig, wenn Big-Data-Analysen angewandt werden, um Fehlerquellen wie „Overfitting“ und zufällige Assoziation von Parametern mit einem Phänotyp auf Grund sehr hoher Anzahl von Variablen im Experiment zu vermeiden. Entsprechende statistische Algorithmen wurden bereits entwickelt. Das „editorial board“ von wissenschaftlichen Journalen aber auch der Leser von Big-Data-Analysen sollte diese immer kritisch betrachten und prüfen, ob entsprechende statistische Tests angewandt wurden und die Daten in einer unabhängigen Kohorte getestet wurden.

Unsere Forschung im Bereich der Magnetresonanztomografie bei Myokarditis bestätigt nochmals, dass eine genaue Diagnose und prognostische Evaluation nicht durch einen einzelnen Biomarker möglich ist, da wie bereits erwähnt kein Biomarker perfekt ist.<sup>26, 47</sup> Zusätzlich zeigt sie auf, dass die Bildgebung in der Myokarditis auch im Rahmen der Verlaufskontrolle eine relevante Rolle spielt und dass die Magnetresonanztomografie eine wichtige Funktion bei der Identifikation von Patienten mit Myokarditis bei “Myocardial infarction and non-obstructive coronary artery disease” hat<sup>52, 53</sup>. Außerdem hat uns Magnetresonanztomografie ermöglicht, die Sicherheit von nicht-steroidalen Antirheumatika bei akuter Myoperikarditis zu monitorisieren und zeigte sogar einen möglichen therapeutischen Vorteil bei dieser Patientengruppe<sup>51</sup>.

Wir planen die Evaluation dieses Effektes zukünftig in einer großen randomisierten Studie.

Im Bereich der stabilen koronaren Gefäßerkrankung haben wir mit Hilfe von Proteomanalysen das kardiovaskuläre Risiko von individuellen Patienten mit hoher Genauigkeit berechnet<sup>9, 10</sup>.

Hierzu wurde ein Proteommarker in einer Kohorte von 938 Patienten entwickelt und bei weiteren 971 Patienten erfolgreich validiert.

Zusammenfassend steht uns aktuell eine Vielzahl an diagnostischen Methoden im Bereich der kardiovaskulären Medizin zur Verfügung von Genetik, über Transkriptom- und Proteombiomarker und modernste Bildgebungstechniken.

Im Zeitalter der Präzisionsmedizin sollten wir alle vorhandenen Daten eines Patienten auf integrative Weise berücksichtigen, um eine individualisierte und optimierte Therapie zu ermöglichen (Figure 1).

*“The popular conception of a scientist as a man who works in a laboratory and who uses instruments of precision is as inaccurate as it is superficial, for a scientist is known, not by his technical processes, but by his intellectual processes; and the essence of the scientific method of thought is that it proceeds in an orderly manner toward the establishment of a truth. “<sup>1</sup> Sir Francis Peabody, 1927*

# Integrative Diagnostische Abklärung bei sekundären Kardiomyopathien



**Bild 1: Überblick: Weg zur Präzisionsmedizin:** Während aktuell die Evaluation eines Patienten mit sekundärer Kardiomyopathie aus einer allgemeinen Evaluation der Vitalwerte, Laborparameter, Elektrokardiogramm und Bildgebung besteht, wird sich die diagnostische Abklärung in Zukunft Richtung individualisierter Methoden entwickeln. Dabei werden Alter, Geschlecht, Herkunft und –Omicdaten sehr wahrscheinlich zunehmend berücksichtigt werden. Diese Schritte bahnen den Weg Richtung Präzisionsmedizin mit welcher wir zukünftig Therapien zu optimieren versuchen, um diese durch individualisierte Anwendung effektiver einzusetzen und damit Nebenwirkungen zu reduzieren.



## 5. REFERENZEN

1. Peabody FW. Landmark article March 19, 1927: The care of the patient. By Francis W. Peabody. *Jama*. 1984;252:813-8.
2. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113:2335-62.
3. Puntmann VO. How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgraduate medical journal*. 2009;85:538-45.
4. Kittleson M. M. IR, Heidecker B., Joshua M. Hare. Transcriptomics: Translation of Global Expression Analysis to Genomic Medicine. In: W. a. Ginsburg, ed. *Genomic and Personalized Medicine*: Elsevier; 2009.
5. Heidecker B and Hare JM. The use of transcriptomic biomarkers for personalized medicine. *Heart failure reviews*. 2007;12:1-11.
6. Heidecker B and Hare JM. Cardiovascular genetic medicine: genomic assessment of prognosis and diagnosis in patients with cardiomyopathy and heart failure. *Journal of cardiovascular translational research*. 2008;1:225-31.
7. Benjamini YHY. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995;57:289-300.
8. B. H. When High Throughput Meets Mechanistic Studies: A State-of-the-Art Approach in Brugada Syndrome. *Circulation research*. 2017;121:483-485.
9. Ganz P, Heidecker B, Hveem K, Jonasson C, Kato S, Segal MR, Sterling DG and Williams SA. Development and Validation of a Protein-Based Risk Score for Cardiovascular Outcomes Among Patients With Stable Coronary Heart Disease. *Jama*. 2016;315:2532-41.
10. Olson KA, Beatty AL, Heidecker B, Regan MC, Brody EN, Foreman T, Kato S, Mehler RE, Singer BS, Hveem K, Dalen H, Sterling DG, Lawn RM, Schiller NB, Williams SA, Whooley MA and Ganz P. Association of growth differentiation factor 11/8, putative anti-ageing factor, with cardiovascular outcomes and overall mortality in humans: analysis of the Heart and Soul and HUNT3 cohorts. *European heart journal*. 2015;36:3426-34.
11. Patriki D, Kottwitz J, Berg J, Landmesser U, Luscher TF and Heidecker B. Clinical Presentation and Laboratory Findings in Men Versus Women with Myocarditis. *J Womens Health (Larchmt)*. 2019.
12. Adams JE, 3rd, Sicard GA, Allen BT, Bridwell KH, Lenke LG, Davila-Roman VG, Bodor GS, Ladenson JH and Jaffe AS. Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin I. *The New England journal of medicine*. 1994;330:670-4.
13. Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G, Noe A, Matern G and Kuebler W. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1991;83:902-12.
14. Reichlin T, Twerenbold R, Reiter M, Steuer S, Bassetti S, Balmelli C, Winkler K, Kurz S, Stelzig C, Freese M, Drexler B, Haaf P, Zellweger C, Osswald S and Mueller C. Introduction of high-sensitivity troponin assays: impact on myocardial infarction incidence and prognosis. *The American journal of medicine*. 2012;125:1205-1213 e1.

15. Shah AS, Griffiths M, Lee KK, McAllister DA, Hunter AL, Ferry AV, Cruikshank A, Reid A, Stoddart M, Strachan F, Walker S, Collinson PO, Apple FS, Gray AJ, Fox KA, Newby DE and Mills NL. High sensitivity cardiac troponin and the under-diagnosis of myocardial infarction in women: prospective cohort study. *BMJ*. 2015;350:g7873.
16. Ohman EM, Armstrong PW, White HD, Granger CB, Wilcox RG, Weaver WD, Gibler WB, Stebbins AL, Cianciolo C, Califf RM and Topol EJ. Risk stratification with a point-of-care cardiac troponin T test in acute myocardial infarction. GUSTO III Investigators. Global Use of Strategies To Open Occluded Coronary Arteries. *The American journal of cardiology*. 1999;84:1281-6.
17. Heidenreich PA, Alloggiamento T, Melsop K, McDonald KM, Go AS and Hlatky MA. The prognostic value of troponin in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes: a meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;38:478-85.
18. James SK, Armstrong P, Barnathan E, Califf R, Lindahl B, Siegbahn A, Simoons ML, Topol EJ, Venge P, Wallentin L and Investigators G-I-A. Troponin and C-reactive protein have different relations to subsequent mortality and myocardial infarction after acute coronary syndrome: a GUSTO-IV substudy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41:916-24.
19. Brogan GX, Jr., Friedman S, McCuskey C, Cooling DS, Berrutti L, Thode HC, Jr. and Bock JL. Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. *Ann Emerg Med*. 1994;24:665-71.
20. Newby LK, Storrow AB, Gibler WB, Garvey JL, Tucker JF, Kaplan AL, Schreiber DH, Tuttle RH, McNulty SE and Ohman EM. Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units: The chest pain evaluation by creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I (CHECKMATE) study. *Circulation*. 2001;103:1832-7.
21. Montague C and Kircher T. Myoglobin in the early evaluation of acute chest pain. *American journal of clinical pathology*. 1995;104:472-6.
22. Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, Wu AH, Holtman V, Painter P, Branham E, Apple FS, Murakami M and Morris DL. Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem*. 2001;47:464-70.
23. Roy D, Quiles J, Aldama G, Sinha M, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Gaze D, Collinson P and Carlos Kaski J. Ischemia Modified Albumin for the assessment of patients presenting to the emergency department with acute chest pain but normal or non-diagnostic 12-lead electrocardiograms and negative cardiac troponin T. *International journal of cardiology*. 2004;97:297-301.
24. Scirica BM, Morrow DA, Cannon CP, de Lemos JA, Murphy S, Sabatine MS, Wiviott SD, Rifai N, McCabe CH, Braunwald E and Thrombolysis in Myocardial Infarction Study G. Clinical application of C-reactive protein across the spectrum of acute coronary syndromes. *Clin Chem*. 2007;53:1800-7.
25. Heeschen C, Hamm CW, Bruemmer J and Simoons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 Anti Platelet Therapy in Unstable angina REfractory to standard treatment trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35:1535-42.
26. Berg J, Kottwitz J, Baltensperger N, Kissel CK, Lovrinovic M, Mehra T, Scherff F, Schmied C, Templin C, Luscher TF, Heidecker B and Manka R. Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Myocarditis Reveals Persistent Disease Activity Despite Normalization of Cardiac Enzymes and Inflammatory Parameters at 3-Month Follow-Up. *Circulation Heart failure*. 2017;10.

27. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT and Bohm M. Update on myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59:779-92.
28. Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL and Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama*. 2001;286:2136-42.
29. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K and Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;32:368-72.
30. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, Leong HS, Samarasekera D, Lai JC, Suarez A, Zhang J and McManus BM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2006;15:63-74.
31. de Lemos JA, McGuire DK and Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet*. 2003;362:316-22.
32. Hama N, Itoh H, Shirakami G, Nakagawa O, Suga S, Ogawa Y, Masuda I, Nakanishi K, Yoshimasa T, Hashimoto Y and et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995;92:1558-64.
33. Marumoto K, Hamada M and Hiwada K. Increased secretion of atrial and brain natriuretic peptides during acute myocardial ischaemia induced by dynamic exercise in patients with angina pectoris. *Clin Sci (Lond)*. 1995;88:551-6.
34. Arakawa N, Nakamura M, Aoki H and Hiramori K. Relationship between plasma level of brain natriuretic peptide and myocardial infarct size. *Cardiology*. 1994;85:334-40.
35. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA and Breathing Not Properly Multinational Study I. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *The New England journal of medicine*. 2002;347:161-7.
36. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, Wolf PA and Vasan RS. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *The New England journal of medicine*. 2004;350:655-63.
37. Maisel A, Hollander JE, Guss D, McCullough P, Nowak R, Green G, Saltzberg M, Ellison SR, Bhalla MA, Bhalla V, Clopton P, Jesse R and Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial i. Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT). A multicenter study of B-type natriuretic peptide levels, emergency department decision making, and outcomes in patients presenting with shortness of breath. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44:1328-33.
38. Omland T, Sabatine MS, Jablonski KA, Rice MM, Hsia J, Wergeland R, Landaas S, Rouleau JL, Domanski MJ, Hall C, Pfeffer MA, Braunwald E and Investigators P. Prognostic value of B-Type natriuretic peptides in patients with stable coronary artery disease: the PEACE Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50:205-14.
39. Silver MA, Maisel A, Yancy CW, McCullough PA, Burnett JC, Jr., Francis GS, Mehra MR, Peacock WFT, Fonarow G, Gibler WB, Morrow DA, Hollander J and Panel BNPC. BNP Consensus Panel 2004: A clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring,

and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Congest Heart Fail.* 2004;10:1-30.

40. Grabowski M, Karpinski G, K JF, Rdzanek A, Pietrasik A, Wretowski D, Rudowski R and Opolski G. Diagnostic value of BNP in suspected perimyocarditis--a preliminary report. *Kardiol Pol.* 2004;61:451-8; discussion 459-60.

41. Ogawa T, Veinot JP, Kuroski de Bold ML, Georgalis T and de Bold AJ. Angiotensin II receptor antagonism reverts the selective cardiac BNP upregulation and secretion observed in myocarditis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H2596-603.

42. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL and Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 2004;38:943-50.

43. van Heesch S, Witte F, Schneider-Lunitz V, Schulz JF, Adami E, Faber AB, Kirchner M, Maatz H, Blachut S, Sandmann CL, Kanda M, Worth CL, Schafer S, Calviello L, Merriott R, Patone G, Hummel O, Wyler E, Obermayer B, Mucke MB, Lindberg EL, Trnka F, Memczak S, Schilling M, Felkin LE, Barton PJR, Quaife NM, Vanezis K, Diecke S, Mukai M, Mah N, Oh SJ, Kurtz A, Schramm C, Schwinge D, Sebode M, Harakalova M, Asselbergs FW, Vink A, de Weger RA, Viswanathan S, Widjaja AA, Gartner-Rommel A, Milting H, Dos Remedios C, Knosalla C, Mertins P, Landthaler M, Vingron M, Linke WA, Seidman JG, Seidman CE, Rajewsky N, Ohler U, Cook SA and Hubner N. The Translational Landscape of the Human Heart. *Cell.* 2019;178:242-260 e29.

44. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernards R and Friend SH. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003;5:57-8.

45. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC and Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nature medicine.* 2002;8:68-74.

46. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Baron H, Wohlgemuth JG, Woodward RN, Klingler TM, Walther D, Lal PG, Rosenberg S, Hunt S and Investigators C. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2006;6:150-60.

47. Heidecker BCL. Acute Fulminant Myocarditis. In: D. L. Brown, ed. *Cardiac Intensive Care.* 3 ed.: Elsevier; 2019: 199-204.

48. Grani C, Eichhorn C, Biere L, Murthy VL, Agarwal V, Kaneko K, Cuddy S, Aghayev A, Steigner M, Blankstein R, Jerosch-Herold M and Kwong RY. Prognostic Value of Cardiac Magnetic Resonance Tissue Characterization in Risk Stratifying Patients With Suspected Myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology.* 2017;70:1964-1976.

49. Chai W, Sfeir AJ, Hoshiyama H, Shay JW and Wright WE. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO reports.* 2006;7:225-30.

50. Luo G, Yao MS, Bender CF, Mills M, Bladl AR, Bradley A and Petrini JH. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96:7376-81.

51. Berg J, Lovrinovic M, Baltensperger N, Kissel CK, Kottwitz J, Manka R, Patriki D, Scherff F, Schmied C, Landmesser U, Luscher TF and Heidecker B. Non-steroidal anti-inflammatory drug use in acute myopericarditis: 12-month clinical follow-up. *Open heart*. 2019;6:e000990.
52. Heidecker B, Ruedi G, Baltensperger N, Gresser E, Kottwitz J, Berg J, Manka R, Landmesser U, Luscher TF and Patriki D. Systematic use of cardiac magnetic resonance imaging in MINOCA led to a five-fold increase in the detection rate of myocarditis: a retrospective study. *Swiss medical weekly*. 2019;149:w20098.
53. Patriki D, Gresser E, Manka R, Emmert MY, Luscher TF and Heidecker B. Approximation of the Incidence of Myocarditis by Systematic Screening With Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *JACC Heart failure*. 2018.
54. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, Fu M, Helio T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto YM, Ristic A, Schultheiss HP, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott PM, European Society of Cardiology Working Group on M and Pericardial D. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European heart journal*. 2013;34:2636-48, 2648a-2648d.
55. van Haften RI, Schroen B, Janssen BJ, van Erk A, Debets JJ, Smeets HJ, Smits JF, van den Wijngaard A, Pinto YM and Evelo CT. Biologically relevant effects of mRNA amplification on gene expression profiles. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:200.
56. Heidbreder M, Frohlich F, Johren O, Dendorfer A, Qadri F and Dominiak P. Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17:1541-3.
57. Semenza GL. Pulmonary vascular responses to chronic hypoxia mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2:68-70.
58. Adams KF, Jr., Sueta CA, Gheorghide M, O'Connor CM, Schwartz TA, Koch GG, Uretsky B, Swedberg K, McKenna W, Soler-Soler J and Califf RM. Gender differences in survival in advanced heart failure. Insights from the FIRST study. *Circulation*. 1999;99:1816-21.
59. Cocker MS, Abdel-Aty H, Strohm O and Friedrich MG. Age and gender effects on the extent of myocardial involvement in acute myocarditis: a cardiovascular magnetic resonance study. *Heart*. 2009;95:1925-30.
60. de Simone G, Devereux RB, Daniels SR and Meyer RA. Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension*. 1995;26:979-83.
61. Fairweather D, Cooper LT, Jr. and Blauwet LA. Sex and gender differences in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Current problems in cardiology*. 2013;38:7-46.
62. Milcent C, Dormont B, Durand-Zaleski I and Steg PG. Gender differences in hospital mortality and use of percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: microsimulation analysis of the 1999 nationwide French hospitals database. *Circulation*. 2007;115:833-9.
63. Neal RC, Ferdinand KC, Ycas J and Miller E. Relationship of ethnic origin, gender, and age to blood creatine kinase levels. *The American journal of medicine*. 2009;122:73-8.
64. Taylor AL, Lindenfeld J, Ziesche S, Walsh MN, Mitchell JE, Adams K, Tam SW, Ofili E, Sabolinski ML, Worcel M, Cohn JN and Investigators AH. Outcomes by gender in the African-American Heart Failure Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48:2263-7.

65. Wong ET, Cobb C, Umehara MK, Wolff GA, Haywood LJ, Greenberg T and Shaw ST, Jr. Heterogeneity of serum creatine kinase activity among racial and gender groups of the population. *American journal of clinical pathology*. 1983;79:582-6.
66. Yen CH, Wang KT, Lee PY, Liu CC, Hsieh YC, Kuo JY, Bulwer BE, Hung CL, Chang SC, Shih SC, Hu KC, Yeh HI and Lam CSP. Gender-differences in the associations between circulating creatine kinase, blood pressure, body mass and non-alcoholic fatty liver disease in asymptomatic asians. *PloS one*. 2017;12:e0179898.
67. Merz CN. The Yentl syndrome is alive and well. *European heart journal*. 2011;32:1313-5.
68. Heidecker B, Lamirault G, Kasper EK, Wittstein IS, Champion HC, Breton E, Russell SD, Hall J, Kittleson MM, Baughman KL and Hare JM. The gene expression profile of patients with new-onset heart failure reveals important gender-specific differences. *European heart journal*. 2010;31:1188-96.
69. Boyle CD, Xu R, Asberom T, Chackalamannil S, Clader JW, Greenlee WJ, Guzik H, Hu Y, Hu Z, Lankin CM, Pissarnitski DA, Stamford AW, Wang Y, Skell J, Kurowski S, Vemulapalli S, Palamanda J, Chintala M, Wu P, Myers J and Wang P. Optimization of purine based PDE1/PDE5 inhibitors to a potent and selective PDE5 inhibitor for the treatment of male ED. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2005;15:2365-9.
70. Fermin DR, Barac A, Lee S, Polster SP, Hannenhalli S, Bergemann TL, Grindle S, Dyke DB, Pagani F, Miller LW, Tan S, Dos Remedios C, Cappola TP, Margulies KB and Hall JL. Sex and age dimorphism of myocardial gene expression in nonischemic human heart failure. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2008;1:117-25.
71. Fallach R, Shainberg A, Avlas O, Fainblut M, Chepurko Y, Porat E and Hochhauser E. Cardiomyocyte Toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48:1236-44.
72. Ruppert V, Meyer T, Pankuweit S, Moller E, Funck RC, Grimm W, Maisch B and German Heart Failure N. Gene expression profiling from endomyocardial biopsy tissue allows distinction between subentities of dilated cardiomyopathy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;136:360-369 e1.
73. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, Chalkias S, Gorham J, Xu Y, Hicks M, Puzanov I, Alexander MR, Bloomer TL, Becker JR, Slosky DA, Phillips EJ, Pilkinton MA, Craig-Owens L, Kola N, Plautz G, Reshef DS, Deutsch JS, Deering RP, Olenchock BA, Lichtman AH, Roden DM, Seidman CE, Koralnik IJ, Seidman JG, Hoffman RD, Taube JM, Diaz LA, Jr., Anders RA, Sosman JA and Moslehi JJ. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine*. 2016;375:1749-1755.
74. Limas CJ, Goldenberg IF and Limas C. Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation research*. 1989;64:97-103.
75. Cooper LT, Jr., Berry GJ and Shabetai R. Idiopathic giant-cell myocarditis--natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis Study Group Investigators. *The New England journal of medicine*. 1997;336:1860-6.
76. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R and Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2006;147:126-32.

## 6. DANKSAGUNG, ACKNOWLEDGEMENTS

It has been a long journey since my graduation from Medical School in Innsbruck, Austria in 2006. During my professional career, I have been lucky to get generous support from mentors, colleagues, friends, and family - too many to name them individually. I would like to thank my family for their support, for always keeping me grounded, and for reminding me sometimes of the things that count the most in life, at times when my mind was too occupied to see them myself.

I would like to thank Prof. Dr. Georg Wick, who was my thesis mentor and who introduced me to the fascinating field of cardiovascular research. I would like to thank Prof. Dr. Noel Rose and Prof. Dr. Gary Pasternack, who provided me with the first opportunity to work as a scientist at Johns Hopkins. Their support and the support of Prof. Dr. Georg Wick was fundamental for my career.

For their mentorship at Johns Hopkins and after, I would like to thank in particular Prof. Dr. Joshua Hare, Prof. Dr. Joao Lima, and Sidney McGaughey. Major sources of support at the University of Miami were Prof. Dr. Gervasio Lamas and Dr. Remberto Rodrigues. I would like to thank the Myocarditis Foundation and its founders Prof. Dr. Leslie Cooper and Candace Moose for providing me with my first research grant and for keeping me motivated over the years to try to find a cure for myocarditis. At the University of California San Francisco, I would like to thank in particular my mentors Prof. Dr. Peter Ganz, Prof. Dr. Joel Karliner and Prof. Dr. Michael Crawford for teaching me so much about cardiology and for always believing in me. I will always be thankful to Prof. Dr. Kendrick Shunk for guiding me through my first cardiac catheterization procedure in such a calm manner. It was probably nerve wracking to watch a fellow puncture the femoral artery for the very first time. Prof. Dr. Thomas Lüscher offered me my first position as a cardiology attending at the University of Zurich. I will always be thankful for his trust in me and for teaching me how to conduct relevant research in an efficient way. He liked to cite Mario Andretti: "If everything is under control, you are not moving fast enough." Most of all, I would like to thank Prof. Dr. Ulf Landmesser for giving me the opportunity to grow as a physician in the field that I have always been passionate about in my research by offering me to lead the clinic for secondary cardiomyopathies and heart failure at the Charité University Hospital Berlin. He could not have been more supportive in introducing me into this new step of my career both on the

clinical as well as the research level. Finally I would like to thank my patients, who make this profession the most rewarding I can imagine for myself.



## 7. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift