

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Autoantikörper bei nicht-
ischämischer Herzinsuffizienz

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maximilian Karschnia

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Teile der Daten dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Zweck E*, **Karschnia M***, Scheiber D, Heidecke H, Dechend R, Barthuber C, Kaufmann S, Kelm M, Roden M, Westenfeld R, Szendroedi J, Boege F:
Receptor autoantibodies: Associations with cardiac markers, histology, and function in human non-ischaemic heart failure.
ESC Heart Failure. April 2023 10(2):1258-1269. doi: 10.1002/ehf2.14293.
Impact Faktor (2023): 3,612

*Gleichwertiger Beitrag

Zusammenfassung

Etwa ein Drittel der Fälle von chronischer Herzinsuffizienz (HI) kann auf eine genetische Veranlagung, metabolischen Stress und kardiale Entzündung zurückgeführt werden. Frühere Studien legen nahe, dass in diesen Fällen herzreaktive Autoantikörper (AAk), darunter insbesondere solche gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), eine Rolle in der Pathogenese der HI spielen könnten. Eindeutige Beweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen der humoralen GPCR-Autoimmunität und nicht-ischämischer HI im Menschen liegen jedoch, bis auf bei der Chagas-Kardiomyopathie, nicht vor.

Es wurden die Fragestellungen überprüft, ob (1) GPCR-AAk mit einer manifesten HI assoziiert sind, (2) serologische Muster solcher HI-assoziiierter GPCR-AAk sich zwischen histologischen Untergruppen der HI unterscheiden, (3) Serumspiegel HI-assoziiierter GPCR-AAk mit etablierten serologischen, hämodynamischen, histologischen, radiologischen und biochemischen Parametern der Krankheitsaktivität korrelieren.

Hierfür wurde eine Kohorte von 95 Patienten mit einer neu diagnostizierten nicht-ischämischen HI prospektiv eingeschlossen. Die kardiale Charakterisierung umfasste eine transthorakale Echokardiographie, kardiale Magnetresonanztomographie, Koronarangiographie, sowie Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Endomyokardbiopsie. Mittels hochauflösender Respirometrie wurden die oxidative Phosphorylierungskapazität und die mitochondriale Kopplung der Gewebeproben gemessen. Ein Panel von GPCR-AAk wurde mithilfe von Immunoassays in Serumproben der HI-Patienten sowie bei 60 Kontrollpersonen ohne HI bestimmt.

AAk gegen β_1 -adrenerge (β_1 AR), M_5 -muskarinische (M_5 R) und Angiotensin-II-Typ-2-Rezeptoren (AT_2 R) waren bei HI erhöht (alle $p < 0,001$). AAk gegen α_1 -adrenerge (α_1 AR) und Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptoren (AT_1 R) waren bei HI verringert (beide $p < 0,001$). Es zeigten sich einige Korrelationen von Veränderungen der GPCR-AAk mit Markern der Krankheitsaktivität; jedoch waren diese Zusammenhänge schwach, auch nach Korrektur für das Gesamt-IgG. β_1 AR-AAk zeigten eine inverse Korrelation mit Markern der linksventrikulären Fibrose, die durch T1-Mapping ($r = -0,362$, $p < 0,05$) und den globaler longitudinaler *Strain* ($r = -0,323$, $p < 0,05$) angezeigt wurden. AT_2 R-AAk waren mit einer effizienteren myokardialen mitochondrialen Kopplung vergesellschaftet, die mittels hochauflösender Respirometrie in Myokardbiopsien gemessen wurde ($r = -0,352$, $p < 0,05$). Bei HI-Patienten korrelierte zudem eine erhöhte Insulinresistenz mit niedrigen Leveln an AT_2 R-AAk ($r = -0,240$, $p < 0,05$).

Die von uns erhobenen Daten legen nahe, dass GPCR-AAk bei HI deutlich verändert sind. Ihre Korrelationen mit Parametern kardialen Stoffwechsels und Struktur deuten nicht auf eine spezifische kardiopathogene Rolle hin, sondern stützen eher das Konzept protektiver Eigenschaften spezifischer AAk und ihrer Veränderungen bei HI. Dies legt nahe, dass weitere mechanistische Untersuchungen erforderlich sind, bevor spezifische, auf GPCR-Autoantikörper gerichtete Therapien bei nicht-ischämischer HF klinisch getestet werden können.

Summary

Roughly one third of cases of chronic heart failure (HF) can be attributed to genetic predisposition, metabolic stress, and cardiac inflammation. Previous studies suggest that in these cases cardiac reactive autoantibodies (AAb), including in particular those against G protein-coupled receptors (GPCR), may play a role in the pathogenesis of HF. However, the evidence regarding a causal relationship between humoral GPCR autoimmunity and non-ischaemic HF in humans remains controversial except in Chagas' cardiomyopathy.

We hypothesized that (1) circulating GPCR-AAb levels are associated with non-ischemic HF, (2) serological patterns of such HF-associated GPCR-AAb differ between histological sub-entities within HF patients, (3) serum levels of HF-associated GPCR-AAb relate to established serological, hemodynamic, histological, radiological, and biochemical parameters of disease activity.

For this purpose, a cohort of 95 patients with newly diagnosed non-ischemic HF was prospectively enrolled in this study. Cardiac characterization included transthoracic echocardiography, cardiac magnetic resonance imaging, coronary angiography, and right heart catheterization with endomyocardial biopsy. High-resolution respirometry was used to measure the oxidative phosphorylation capacity and mitochondrial coupling in endomyocardial biopsies. A panel of GPCR-AAb was determined with immunoassays in serum samples from the HF patients as well as 60 control subjects without HF.

AAb against β_1 -adrenergic (β_1 AR), M_5 -muscarinic (M_5 R) and angiotensin II type 2 receptors (AT_2 R) were increased in HF (all $p < 0.001$). AAb against α_1 -adrenergic (α_1 AR) and angiotensin II type 1 receptors (AT_1 R) were decreased in HF (both $p < 0.001$). Correlations of GPCR-AAb with markers of cardiac or systemic inflammation, cardiac damage, hemodynamics, myocardial histology or left ventricular inflammation (assessed by T2 mapping) were weak, even when corrected for total IgG. β_1 AR-AAb were inversely related to markers of left ventricular fibrosis as indicated by T1 mapping ($r = -0.362$, $p < 0.05$) and global longitudinal strain ($r = -0.323$, $p < 0.05$). AT_2 R-AAb were associated with higher myocardial mitochondrial coupling efficiency as measured by high-resolution respirometry in myocardial biopsies ($r = -0.352$, $p < 0.05$). In HF patients, increased insulin resistance related to lower AT_2 R-AAb levels ($r = -0.240$, $p < 0.05$).

Our data suggest that GPCR-AAb are significantly altered in HF. Their correlations with parameters of cardiac metabolism and structure do not suggest a specific cardiopathogenic role but rather support the concept of protective properties of specific AAb and their alterations in HF. This suggests that further mechanistic studies are needed before specific GPCR autoantibody-targeted therapies should be clinically tested in non-ischaemic HF.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	ms	Millisekunde
dl	Deziliter	ng	Nanogramm
h	Stunde	nm	Nanometer
l	Liter	nmol	Nanomol
m²	Quadratmeter	pg	Pikogramm
mg	Milligramm	pmol	Pikomol
min	Minute	s	Sekunde
ml	Milliliter	U	Units
mM	Millimol	μl	Mikroliter
mmHg	Millimeter- Quecksilbersäule		
AAk	Autoantikörper	CRP	Capsel-reaktives Protein
Abb.	Abbildung	DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>	DTT	Dithiothreitol
ACE-I	ACE-Inhibitor	EC	Extrazelluläre Schleife
ADP	Adenosindiphosphat	EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure
AHA	<i>American Heart Association</i>	EGTA	Ethylenglycol-bis- (aminoethylether)- N,N,N',N'- tetraessigsäure
Ak	Antikörper	ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
AR	Adrenerger Rezeptor	EMB	Endomyokardbiopsie
AT₁R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ I	ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
AT₂R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ II	ET_AR	Endothelin-Rezeptor A
ATP	Adenosintriphosphat	ET_BR	Endothelin-Rezeptor B
BSA	Bovines Serumalbumin	ETS	Elektronentransfer- system
C5aR	Komplementfaktor C5a- Rezeptor		
CI	<i>Cardiac Index</i>		
CM	Kardiomyopathie		

FCCP	Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon	LCR	<i>LEAK Control Ratio</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
GTP	Guanintriphosphat	M₅R	Muskarinernerger Acetylcholinrezeptor 5
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin	MES	4-Morpholin-Ethansulfonsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure	MRT	Magnetresonanztomographie
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittelgradig reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion	NADH	Nicotinamidadenin-dinucleotid
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion	NO	Stickstoffmonoxid
HFrfEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion	NYHA	<i>New York Heart Association</i>
HI	Herzinsuffizienz	oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
HOMA-IR	<i>Homoeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i>	OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
IC	Intrazelluläre Schleife	pBNP	pro-Brain Natriuretisches Peptid
iCM	inflammatorische Kardiomyopathie	PCWP	Lungenkapillaren-Verschlussdruck
IgG	Immunglobulin G	PVR	Pulmonalvenöser Widerstand
IL-6	Interleukin 6	RAP	Rechtsatrialer Druck
KHK	Koronare Herzkrankheit	RCR	<i>Respiratory Control Ratio</i>
KOH	Kaliumhydroxid	RVP	Rechtsventrikulärer Druck
		T. cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
		TpT	Troponin T
		α₁AR	α ₁ -adrenerger Rezeptor
		β₁AR	β ₁ -adrenerger Rezeptor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Klassifikation	2
1.1.3	Epidemiologie	5
1.1.4	Ätiologie	6
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	7
1.2.1	Aufbau und Funktion	7
1.2.2	GPCR-Autoimmunität bei chronischer Herzinsuffizienz	9
1.2.3	Therapeutische Ansätze	9
1.3	Kardialer Energiestoffwechsel	11
1.3.1	Herzarbeit und Substrate	11
1.3.2	Atmungskette und oxidative Phosphorylierung	12
1.3.3	Respiratorische Stadien	14
1.4	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Geräte	22
2.1.4	Software	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Studienprotokoll	23
2.2.2	Rekrutierung und Patientenkollektiv	23
2.2.3	Studienablauf	25
2.2.4	Herzkatheteruntersuchung	25
2.2.5	Endomyokardiale Biopsien	27
2.2.6	Hochauflösende Respirometrie	28
2.2.7	Serum- und Plasmaanalyse	31
2.2.8	GPCR-Autoantikörper Messung	32
2.2.9	Kardiale Magnetresonanztomographie	33

2.2.10	Statistische Tests und Software	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Patienten- und Kontrollencharakterisierung	36
3.2	Unterschiede in GPCR-AAk Serumspiegeln	38
3.3	GPCR-AAk und gestörte Hämodynamik	43
3.4	GPCR-AAk und kardiale Funktionalität	44
3.5	GPCR-AAk und Metabolismus	46
3.6	GPCR-AAk und myokardiale Mitochondrienfunktion	49
4	Diskussion	51
4.1	HI-assoziierte Erhöhung von GPCR-AAk	51
4.1.1	β_1 AR-AAk	51
4.1.2	AT ₂ R-AAk	52
4.1.3	M ₅ R-AAk	53
4.2	HI-assoziierte Verminderung von GPCR-AAk	54
4.2.1	AT ₁ R-AAk	54
4.2.2	α_1 AR-AAk	54
4.2.3	ET _B R-AAk	55
4.3	GPCR-AAk ohne HI-assoziierte Veränderungen	56
4.3.1	ET _A R-AAk	56
4.3.2	ACE-II-AAk	57
4.3.3	C5aR-AAk	57
4.3.4	Stabilin-AAk	58
4.4	GPCR-AAk, Krankheitsaktivität und Myokardschäden	58
4.5	GPCR-AAk und Metabolismus	60
4.6	GPCR-AAk und myokardiale Mitochondrienfunktion	62
4.7	Methodik	64
4.7.1	GPCR-Assays	64
4.7.2	HOMA-Index	65
4.8	Limitationen	66
5	Schlussfolgerungen	67
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	68
7	Anhang	91

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie

1.1.1 Definition

Die *European Society of Cardiology* (ESC) definiert in ihrer aktuell gültigen Leitlinie zur Diagnostik und Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz (HI) von 2021 die HI als ein klinisches Syndrom mit klassischen Kardinalsymptomen (z.B. Dyspnoe, Knöchelödeme und Erschöpfung), das von klinischen Zeichen (z.B. gestaute Halsvenen und Rasselgeräusche in der Lungenauskultation) begleitet werden kann [1]. Sie resultiert aus einer strukturellen oder funktionellen Beeinträchtigung des Herzens, die in erhöhten kardialen Drücken und einer unzureichenden Herzleistung in Ruhe oder bei Belastung mündet.

Um verschiedenste Herzerkrankungen zu beschreiben, die in einer HI resultieren können, wird im klinischen Umgang oftmals der Begriff der Kardiomyopathie (CM) verwendet [2, 3]. 1968 definierte die *World Health Organization* (WHO) erstmals CM als Erkrankungen unterschiedlicher, oft unbekannter Ätiologie, bei denen eine Kardiomegalie und eine HI vorliegen. Aus dieser Definition ausgeschlossen waren kardiale Dysfunktionen aufgrund von Herzklappenerkrankungen, Koronarischämie sowie systemischen oder pulmonalen Gefäßerkrankungen [4]. Seit 1980 bemüht sich die WHO zusammen mit der *International Society and Federation of Cardiology* (ISFC) mittels einer von ihr gegründeten Task Force, die Definition der CM an das aktuelle wissenschaftliche Verständnis der Ätiologien der HI anzupassen. In ihrer ersten Fassung von 1980 wurden die CM noch als Herzmuskelerkrankungen unbekanntes Ursprungs definiert, um sie von spezifischen Herzmuskelerkrankungen mit bekannter Ätiologie abzugrenzen [5]. Mit einem wachsenden Verständnis von Ätiologie und Pathogenese wurde diese Abgrenzung zunehmend unscharf, weshalb die gleiche Task Force 1995 die CM nun als Erkrankungen des Myokards, welche mit einer kardialen Dysfunktion einhergehen, definierte. In der gleichen Publikation wurde der Begriff der spezifischen CM vorgestellt, der Herzmuskelerkrankungen beschreibt, die mit spezifischen kardialen oder systemischen Störungen einhergehen. Zu diesen gehörte unter anderen die inflammatorische CM, eng. *inflammatory*

cardiomyopathy (iCM), welche sich durch eine Myokarditis mit gleichzeitiger kardialer Dysfunktion und ventrikulärem *Remodelling* definiert und oft zu einer dilatativen CM (DCM) führt. Formen der iCM können idiopathisch, autoimmun oder auch infektiös, wie bei der Chagas-CM, bedingt sein [6, 7]. 2006 präsentierte die AHA im Rahmen eines Expertengremiums eine aktualisierte Definition der CM. Sie beschreibt die CM als eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Herzmuskels, die mit mechanischen oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und in der Regel eine unangemessene ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation aufweisen und auf eine Vielzahl von Ursachen zurückzuführen sind, die häufig genetisch bedingt sind. CM beschränken sich entweder auf das Herz oder sind Teil allgemeiner systemischer Erkrankungen, die in den meisten Fällen zum Herztod oder zu einer fortschreitenden, durch eine HI bedingten Einschränkung führen [8]. 2007 veröffentlichte die Arbeitsgruppe für myokardiale und perikardiale Erkrankungen der ESC eine Stellungnahme, in der sie die CM als eine Myokarderkrankung definiert, bei der der Herzmuskel strukturell und funktionell abnormal ist, ohne dass eine koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck, eine Herzklappenerkrankung oder eine angeborene Herzerkrankung vorliegen, die ausreichen würden die beobachtete Myokardanomalie zu verursachen [9]. An dieser Definition wird aktuell (Stand: Januar 2024) festgehalten und man ist mittlerweile dazu übergegangen, die Unterarten der CM genauer zu definieren [1, 10-12].

1.1.2 Klassifikation

Zur Einteilung der HI bedient man sich verschiedener Systeme. Die gängigsten orientieren sich an der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), wie in Tabelle 1 dargestellt, oder an der Symptomschwere gemäß der *New York Heart Association* (NYHA). Hierbei werden die Stadien I bis IV unterschieden, die von einer kardialen Erkrankung ohne Einschränkung körperlicher Aktivität bis hin zu auch in Ruhe einschränkenden Beschwerden reichen [13].

Form der HI	Kriterien
HFrEF	- Symptome ± klinische Zeichen - LVEF ≤ 40 %
HFmrEF	- Symptome ± klinische Zeichen - LVEF 41 - 49 %
HFpEF	- Symptome ± klinische Zeichen - LVEF ≥ 50 % - Nachweis einer strukturellen Herzerkrankung oder diastolischen Dysfunktion

Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz nach LVEF gemäß Leitlinie der *European Society of Cardiology* [1]. Die klinischen Zeichen sind nicht obligat, da sie in frühen Krankheitsstadien oder bei kardial kompensierten Patienten nicht zwingen auftreten. Als strukturelle Herzerkrankung wird das Spektrum der nicht-koronaren Herzerkrankungen bezeichnet, das z.B. valvuläre Erkrankungen oder hypertrophe Kardiomyopathien umfasst [14]. HI Herzinsuffizienz; HFrEF *heart failure with reduced ejection fraction*; HFmrEF *heart failure with mildly reduced ejection fraction*; HFpEF *heart failure with preserved ejection fraction*.

Einen stärkeren Fokus auf den Krankheitsverlauf legt die Einteilung in akute und chronische HI [15]. Sie unterscheidet eine chronische Verlaufsform bei bestehender Diagnose und einem eher allmählichen Fortschreiten der Krankheit von der akuten Form, die sich durch einen abrupten Beginn sowie eine neu aufgetretene kardiale Dekompensation kennzeichnet.

Die Klassifikation der CM unterlag den letzten Jahren ebenfalls einer kontinuierlichen Weiterentwicklung, um neuen Erkenntnissen zur Ätiologie der verschiedenen Unterformen gerecht zu werden. In einer 2006 publizierten Stellungnahme der AHA wird die CM in abgrenzbare Erkrankungen des Myokards unterteilt [8]. In ihr unterscheidet die AHA zwischen primären und sekundären CM. Während primäre CM sich auf den Herzmuskel beschränken und mit einer mechanischen oder rhythmogenen Dysfunktion des Myokards assoziiert sind, zeichnen sich die sekundären CM durch eine zusätzliche Beteiligung weiterer Organsysteme aus (Tabelle 2).

Kardiomyopathie	Ursache	Beispiele
Primäre Kardiomyopathien	Genetisch	Familiäre hypertrophe CM Hypertrophie nicht-obstruktive CM Hypertrophe obstruktive CM

		Arrhythmogene rechtsventrikuläre CM Non-Compaction-CM Ionenkanalerkrankungen Mitochondrielle Myopathien
	Gemischt	Dilatative CM Restriktive CM
	Erworben	Inflammatorische CM (Myokarditis) Tako-Tsubo-CM Peripartale CM Tachykardie-induzierte CM
Sekundäre Kardiomyopathien	Infiltrativ	Amyloidose, Morbus Gaucher, Morbus Hunter
	Speichererkrankung	Hämochromatose, Morbus Fabry
	Toxisch	Drogen, Schwermetalle
	Endomyokardial	Endomyokardiale Fibrose, Hypereosinophiles Syndrom
	Endokrin	Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Akromegalie
	Inflammatorisch	Sarkoidose
	Neuromuskulär	Friedreich Ataxie, Myotone Dystrophie
	Autoimmun	SLE, Dermatomyositis, Sklerodermie, RA

Tabelle 2: Unterscheidung der primären und sekundären Kardiomyopathien nach AHA [8].
CM Kardiomyopathie; SLE Systemischer Lupus erythematoses; RA Rheumatoide Arthritis.

2007 schlug die ESC eine eigene, auf morphologischen und funktionellen Phänotypen basierende Klassifikation der CM vor [9]. Die CM werden in dieser Klassifikation wie in Abbildung 1 dargestellt in verschiedene Phänotypen eingeteilt, die sich wiederum in genetische und nicht-genetische Untergruppen ordnen.

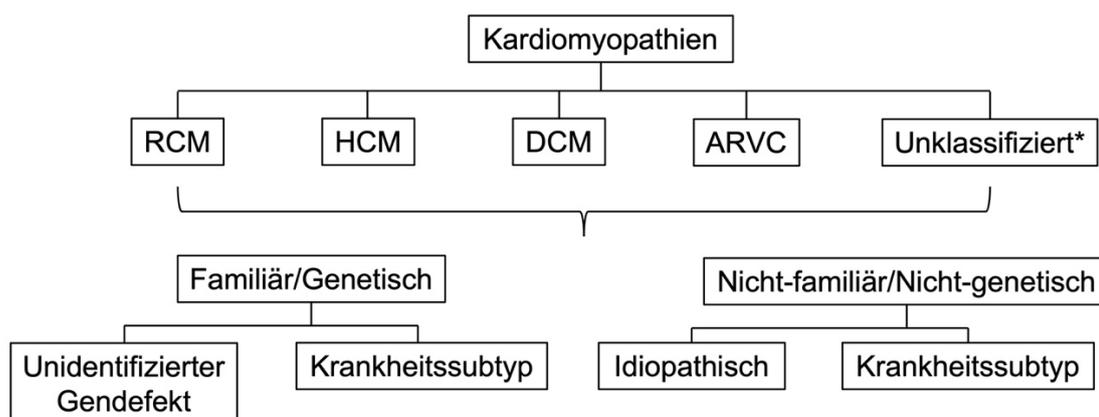


Abb. 1: Zusammenfassung der von der ESC vorgeschlagenen Klassifikation der Kardiomyopathien. ESC European Society of Cardiology; RCM Restriktive Kardiomyopathie;

HCM Hypertrophe Kardiomyopathie; DCM Dilatative Kardiomyopathie; ARVC Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie; *Unklassifizierte Kardiomyopathien enthalten die Linksventrikuläre *Non-Compaction*-Kardiomyopathie (LVNC) und die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie [9].

2013 wurde die MOGE(S) Klassifikation der *World Heart Federation* zur Beschreibung von CM vorgestellt. Diese setzt sich aus dem morphofunktionellem Phänotyp (M), der Organbeteiligung (O), dem genetischen Vererbungsmuster (G), einer ätiologischen Angabe (E) sowie dem funktionellen Status (S) zusammen. Der Vorteil dieses Systems liegt in der Flexibilität des Kategorisierens von überschneidenden genetischen und phänotypischen Syndromen [16].

1.1.3 Epidemiologie

Während die Alters-angepasste Inzidenz der HI in den westlichen Industrienationen zuletzt abnahm, stieg sie durch eine zunehmende Lebenserwartung und den dadurch bedingten demographischen Wandel der Bevölkerung insgesamt an [17]. Eine geschätzte globale Prävalenz von 32 bis 64 Millionen Betroffenen [18, 19], eine europäische Inzidenz von etwa 3/1000 Personenjahren [20] und jährlich schätzungsweise 500.000 Fälle neu diagnostizierter HI in Deutschland [21] demonstrieren die Relevanz dieser Erkrankung. Da Studien in der Regel nur diagnostizierte Fälle dokumentierten, liegt die wahre Prävalenz vermutlich deutlich über den oben genannten Zahlen [22].

Betrachtet man die Verteilung der Formen der HI, zeigten Daten aus im stationären Rahmen durchgeführten Studien, dass HFrEF und HFpEF jeweils etwa die Hälfte der Patienten ausmachten [23, 24]. Im ambulanten Bereich erhoben Zahlen nach machte die HFrEF etwa 60% der Patienten aus, gefolgt von der HFmrEF mit 24% und der HFpEF mit 16% [25]. Etwas mehr als die Hälfte der betroffenen Patientin waren Frauen [26], zudem stieg die Prävalenz mit dem Alter von etwa 1% der unter 55-jährigen auf mehr als 10% der über 70-jährigen an [26, 27].

1.1.4 Ätiologie

Risikofaktoren wie die koronare Herzkrankheit (KHK), Übergewicht, Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz, arterielle Hypertonie und ein höheres Lebensalter gehen mit einem erhöhten relativen Risiko der Entstehung einer HI einher [28, 29].

Unter den vielfältigen Ursachen der HI sind die KHK mit Myokardinfarkt, arterielle und pulmonale Hypertonien sowie valvuläre Erkrankungen die häufigsten [29]. Patienten können ebenfalls gemischte Ätiologien aufweisen, ebenso sind deutliche geographische Unterschiede in den Ätiologien erkennbar [30]. Während in den Industrienationen insbesondere die KHK und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) als Hauptursachen zu nennen sind, werden viele Fälle von HI in Entwicklungsländern durch die hypertensive Herzerkrankung, rheumatische Herzkrankheit, CM und Myokarditiden verursacht [31]. Weitere Ursachen beinhalten verschiedene Arrhythmien, infiltrative Erkrankungen, Speichererkrankungen, neuromuskuläre Erkrankungen, Substanzmissbrauch sowie Behandlung mit bestimmten Chemotherapeutika und anderen kardiotoxischen Medikamenten [29].

Ein Sonderfall unter den Ätiologien ist die Chagas-CM. Die zu den iCM gehörende Erkrankung wird durch das Protozoon *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) verursacht und stellt die häufigste Ursache der nicht-ischämischen HI in Südamerika dar [32, 33]. In Europa nahm die Anzahl der Infektionen in den letzten zwei Jahrzehnten zu. Diese traten anfangs nur in Gemeinschaften von aus Südamerika emigrierten Personen, zunehmend aber auch außerhalb davon auf [34]. Nach der initialen Infektion durch den Parasiten führen zwei primäre Mechanismen der Pathogenese, die durch den Parasiten ausgelöste Immunreaktion und die durch die Infektion ausgelöste Autoimmunreaktivität zu einer akuten und schließlich chronischen Myokarditis. In diesem Zustand verursachen zwei sekundäre Mechanismen, neurogene Funktionsstörungen und mikrovaskuläre koronare Dysfunktionen, die mit der Krankheit assoziierten kardialen Beteiligungen wie DCM, ventrikuläre Arrhythmien und Reizweiterleitungsstörungen [35, 36]. Die

Herzschäden und Myokarditis der akuten Phase resultieren aus einer hochgradigen Parasitämie und einem direkten Parasitismus im Myokard [37]. Autopsiestudien sowie Endomyokardbiopsien (EMB) lebender Patienten zeigten eine enge Korrelation der *T. cruzi*-Gewebebelastung mit dem Ort und der Intensität des myokardialen Entzündungsprozesses [38]. Bei der sich langsam entwickelnden chronischen Phase wurden erstmals möglicherweise pathogene gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gerichtete Autoantikörper (GPCR-AAk) beschrieben [39]. Im Zuge weiterer Studien konnte gezeigt werden, dass Homologien zwischen GPCR der Kardiomyozytenmembran und viralen sowie bakteriellen Proteinen die Bildung endogener kreuzreaktiver AAK durch sogenanntes Antigen-Mimikry induzieren [40].

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.2.1 Aufbau und Funktion

GPCR sind in die Zell- und Endosomenmembran eingebettete Rezeptoren, die über die Aktivierung Guanintri-phosphat (GTP)-bindender Proteine (G-Proteine) für die Signaltransduktion in das Zellinnere zuständig sind [41]. Sie stellen mit mehreren hundert Rezeptoren die größte Proteinsuperfamilie im Menschen dar und werden von schätzungsweise 1000 der circa 21000 Protein-kodierenden Gene des menschlichen Genoms kodiert [42]. Mehr als 1200 verschiedene Rezeptoren sind bisher identifiziert worden, zu ihren Liganden gehören unter anderem biogene Amine, Peptide, Lipide, Nukleotide, Glykoproteine und Proteasen. Ebenfalls werden exogene Stimuli wie Geschmack, Geruch und Lichtreize durch diese Rezeptorfamilie vermittelt.

Alle GPCR besitzen eine ähnliche Struktur, schematisch dargestellt in Abbildung 2. Sieben transmembranöse α -Helices sind durch drei extrazelluläre ($EC_I - III$) und drei intrazelluläre ($IC_I - III$) Schleifen miteinander verbunden und bilden so eine hydrophobe Bindungsdomäne für Liganden [43, 44]. Extrazellulär findet sich ebenfalls das N-terminale Ende des Rezeptorproteins, das bei einigen GPCR als primäre Ligandenbindungsstelle dient. Intrazellulär liegt neben den intrazellulären

Schleifen ebenfalls das C-terminale Ende des Rezeptors. Die Zusammensetzung der Aminosäuren der oftmals größten EC_{II} Schleife ermöglicht in den meisten Fällen die Bildung einer β -Haarnadel-Struktur, welche teilweise in die Ligandenbindungsstelle eintaucht. So beeinflussen die Konformation und Stabilität von EC_{II} die basale Rezeptoraktivität und die GPCR-Liganden-Interaktion in gewissem Maße. Anhand von β_1 -adrenergen-Rezeptoren (AR) und β_2 AR wurde nachgewiesen, dass die korrekte Faltung von EC_{II} und/oder EC_I für die Bildung der Ligandenbindungsstelle essentiell ist [43]. Die Bindung und darüber gesteuerte Signaltransduktion nach intrazellulär erfolgt über ein G-Protein, an dessen Bindung IC_{II}, IC_{III} sowie das C-terminale Ende beteiligt sind.

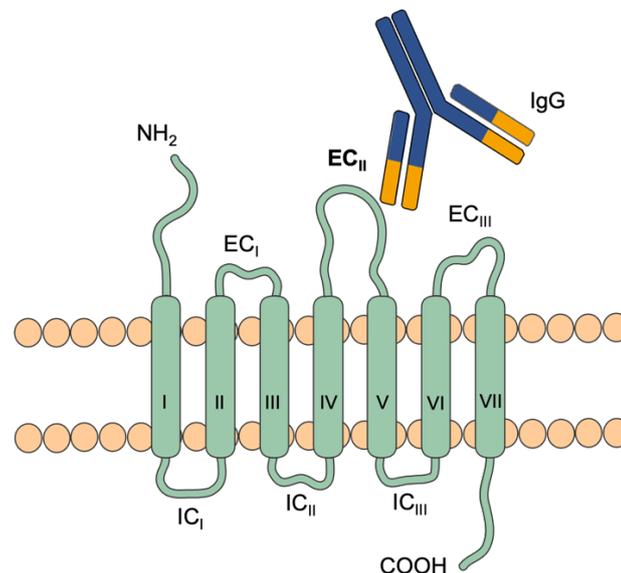


Abb. 2: Schematische Darstellung eines GPCR und GPCR-AAK Der GPCR-AAK, ein Immunglobulin der Klasse G (IgG), bindet an die zweite extrazelluläre Schleife. Die sieben Transmembrandomänen (TM) des Rezeptors sind in Grün dargestellt und nummeriert (I – VII). Die drei extrazellulären Schleifen (EC_{I-III}), die die TM miteinander verbinden sind abgebildet. Intrazellulär liegen die intrazellulären Schleifen (IC_{I-III}) sowie das C-terminale Ende des Rezeptors, an den ein GTP-bindendes Protein bindet (hier nicht dargestellt). Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung von *Servier Medical Art* erstellt, bereitgestellt von *Servier*, lizenziert unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 unported license*.

1.2.2 GPCR-Autoimmunität bei chronischer Herzinsuffizienz

Die Erstbeschreibung von GPCR-AAk bei kardiovaskulären Erkrankungen erfolgte 1976 durch Sterin-Borda et al., die eine agonistische Aktivität von Chagas-Seren nachweisen konnten [39]. 1984 gelang es Borda et al. aus dem Serum von an Chagas-CM erkrankten herzinsuffizienten Patienten Immunglobulin G (IgG) zu isolieren, welches *in vitro* über die Aktivierung von β AR des Myokards dessen Aktivität modulierte [45]. Im Kontext von CM berichteten Wallukat und Wollenberger 1987 erstmals über bei Patienten mit idiopathischer DCM vorhandene AAk gegen den β_1 AR, die sich gegen die EC_I oder EC_{II} des Rezeptors richten [46].

Aktuell wird davon ausgegangen, dass unter den Formen der nicht-ischämisch bedingten HI in etwa 30 % der Fälle klare Konzepte der Entstehung und des Fortschreitens der HI fehlen, sodass diese bisher unter dem Namen der „Kardiomyopathien unbekanntes Ursprungs“ klassifiziert wurden [8]. Man nimmt an, dass insbesondere die nicht-genetischen und erworbenen Formen aus einer anfänglich meist viralen Infektion entstehen, die zu einer akuten Myokarditis führt, welche abhängig von der allgemeinen Reaktivität des Immunsystems zu einer chronischen Autoimmunmyokarditis mit Symptomen der HI führen kann [11, 47]. So wurde ein Fortschreiten der HI gezeigt, wenn es zur Bildung von AAk kommt, die sich gegen bestimmte sarkolemmale GPCR der Myozytenmembran richten [48, 49]. Unter diesen tat sich eine Reihe an kreuzreaktiven Antikörpern (Ak) und/oder AAk gegen verschiedene kardiale Antigene vor, einschließlich mitochondrialer Proteine (z.B. ATP/ADP-Translokase, Lipoamid, Pyruvatdehydrogenase), sarkolemmaler Proteine (z.B. Aktin, Laminin, Myosin, Troponin) und am bedeutendsten GPCR der Myozytenmembran (z.B. β_1 -, β_2 -, β_3 -, α_1 -adrenerge Rezeptoren, muskarinerge Cholin-Rezeptor 2, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1, Endothelin-Rezeptor A) [50-55].

1.2.3 Therapeutische Ansätze

Wenngleich die Relevanz von GPCR-AAk bei chronischer HI nicht abschließend geklärt ist, zeigen klinische Daten, dass sich die Prognose herzinsuffizienter

Patienten durch das Vorhandensein funktionell relevanter GPCR-AAk verschlechtert [56, 57]. Folglich stellt sich die Frage nach spezifischen Therapieregimen, wie es sie für andere Autoimmunerkrankungen gibt [58, 59].

In diesem Zusammenhang konnten bereits erste Richtungen vorgegeben werden. *In vitro* wurde gezeigt, dass die durch β_1 AR-AAk induzierte Aktivierung des β_1 AR durch Inkubation mit β_1 EC_{II}-ähnlichen Peptiden antagonisiert werden konnte [60]. In Ratten- und Mausmodellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine Neutralisierung von β_1 AR-AAk durch spezifische zyklische Peptide, die von β_1 AR-AAk-induzierten Myokardschäden verhinderte und eine kardiale Dysfunktion rückgängig machte [61, 62]. Die neben den oben genannten Beispielen für neue Therapierichtungen momentane Standardmedikation der chronischen HI fußt laut aktuellen Leitlinien auf dem Einsatz von ACE-Inhibitoren (ACE-I), AT1R-Antagonisten, Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitoren (ARNI), Betablockern, Mineralcorticoidrezeptor-Antagonisten sowie Natrium-Glukose-Transporter-2-(SGLT2)-Inhibitoren [1, 29]. Darüber hinaus befinden sich weitere Therapien in verschiedenen Stadien der Entwicklung, die insbesondere für die GPCR-AAk-assoziierte HI relevant werden könnten und von denen einige in Tabelle 3 vorgestellt werden.

Therapie	Wirkung
β_1 EC _{II} -zyklisches Peptid	Neutralisierung zirkulierender β_1 AR-AAk und Verringerung der β_1 AR-AAk-spezifischen B-Gedächtniszellen [62, 63]
Immunoabsorption	Ähnlich der Dialyse; spezifisch mittels membrangebundener Peptide, die von β_1 EC _{II} stammen oder unspezifisch mittels Protein-A-Säulen [64-67]
Aptamere	Kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Sequenzen, die ein spezifisches Molekül (z.B. Antikörper) binden können [68, 69]

Tabelle 3: Neue Therapieansätze der GPCR-Autoantikörper-assoziierten Herzinsuffizienz.

β_1 AR-AAk β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper; EC_{II} Zweite extrazelluläre Schleife des β_1 AR; DNA Desoxyribonukleinsäure; RNA Ribonukleinsäure.

1.3 Kardialer Energiestoffwechsel

1.3.1 Herzarbeit und Substrate

Mit täglich ungefähr 100.000 Schlägen und einer Pumpleistung von 10.000 Litern Blut pro Tag hat das Herz bei der Generierung mechanischer Energie einen enormen Bedarf an chemischer Energie, oder anders formuliert, an Substraten [70, 71]. Diese Leistung wird durch eine effiziente, dem Bedarf angepasste Substratverwertung ermöglicht. Diese wird in der Literatur häufig in drei Schritte unterteilt [70, 72]:

- I. Substrataufnahme in die Kardiomyozyten
- II. Substratumwandlung in Energieträger, insbesondere ATP
- III. ATP-Nutzung zur Kontraktion myokardialer Myofibrillen

In Ruhe deckt das gesunde Herz seinen Energiebedarf zu 60 % durch langkettige Fettsäuren, zu 30 % durch Glukose und zu circa 10 % durch andere Substrate wie Laktat und Ketonkörper [73, 74]. Diese Verteilung kann bedarfsgerecht, beispielsweise bei körperlicher Anstrengung oder einer gesteigerten Herzarbeit durch dauerhafte β_1 AR-Erregung, angepasst werden. Hierbei steigt der Anteil an verstoffwechserter Glukose, die ein effizienteres Verhältnis von Sauerstoffbedarf zur Gewinnung von Adenosintri-phosphat (ATP) aufweist [75, 76]. In Gegensatz dazu benötigt die Verstoffwech-selung freier Fettsäuren zwischen 27 - 54 % mehr Sauerstoff [77, 78].

Während die Verschiebung der Substratverteilung in einer physiologischen Situation reversibel ist und sich nach Beendigung der körperlichen Belastung wieder einpendelt, liegt bei einer HI eine dauerhaft erhöhte Glukosenutzung vor [74]. Diese Anpassung dient initial der Deckung des vermehrten myokardialen Substratbedarfs, resultiert über die Zeit jedoch in einer unzureichenden Substratversorgung des Myokards [70, 78].

1.3.2 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Die Synthese des Energieträgers ATP ist die Hauptaufgabe der Mitochondrien. Diese bestehen aus einer für die meisten Stoffe permeablen äußeren Membran und einer inneren Membran, die für viele Moleküle undurchlässig ist und an deren Oberfläche sich die Atmungskette befindet. Die von der inneren Membran umschlossene Matrix ist Ort weiterer Stoffwechselfvorgänge [79].

Die Atmungskette wiederum besteht aus vier Proteinkomplexen (Abb. 3), an denen die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung in Form von ATP stattfindet: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) und Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase). Den Beginn der Redoxreaktionen stellen die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 aus dem Abbau der Fette, Kohlenhydrate und Proteine dar. Die von den Reduktionsäquivalenten bereitgestellten Elektronen werden über die Enzykomplexe der Atmungskette transportiert, wobei der Prozess entweder bei Komplex I mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ oder bei Komplex II mit FADH_2 startet. Zu Beginn übertragen diese beiden Komplexe Elektronen auf Ubichinon, wodurch Ubichinol entsteht. Komplex III transportiert diese von Ubichinol weiter auf Cytochrom c, das frei beweglich an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran liegt. Im letzten Schritt katalysiert Komplex IV eine Reaktion, bei der die beiden Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff übertragen werden, aus welchem durch die zusätzliche Aufnahme von Protonen zwei Moleküle Wasser entstehen. Durch die Weitergabe der Elektronen wird jeweils Energie frei, die genutzt wird, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu pumpen, was die Bildung eines Protonengradienten über der inneren mitochondrialen Membran zur Folge hat. Die manchmal auch als Komplex V bezeichnete ATP-Synthase lässt die Protonen kontrolliert zurück in die Matrix fließen, wodurch Energie freigesetzt wird, die zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt wird. Reguliert wird die Atmungskette u.a. durch die vorhandene ADP-Konzentration. Hohe Spiegel signalisieren einen Energiemangel, der die Atmungskette anregt, niedrige Spiegel haben einen gegenteiligen Effekt [79].

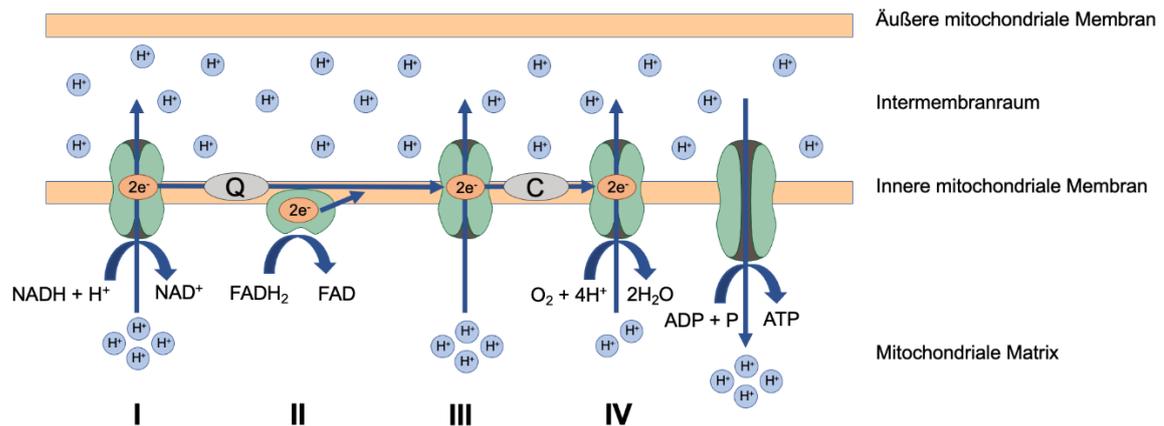


Abb. 3: Atmungskette und oxidative Phosphorylierung Die Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinucleotid (NADH + H⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) werden an Komplex I bzw. II der Atmungskette zu NAD⁺ bzw. FAD oxidiert. Dabei werden Elektronen auf Ubichinon (Q) übertragen, aus dem dabei Ubichinol entsteht. An Komplex III werden die Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c (C) übertragen, an Komplex IV auf O₂, sodass das O₂ mit vier Protonen (H⁺) zu zwei Molekülen Wasser reagiert. Durch die ablaufenden Redoxreaktionen wird Energie frei die an den Komplexen I, III und IV zur Erzeugung eines Protonengradienten genutzt wird, indem Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Durch die ATP-Synthase gelangen diese Protonen zurück in die Matrix, die dabei freiwerdende Energie wird zur Erzeugung von ATP aus ADP genutzt [79]. Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung von *Servier Medical Art* erstellt, bereitgestellt von *Servier*, lizenziert unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 unported license*.

Die an Komplex IV ablaufende Reaktion, bei der unter dem Verbrauch von Sauerstoff und Protonen Wasser entsteht, ist Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Respirometrie (siehe 2.2.6). Da der Sauerstoffverbrauch in direktem Zusammenhang zur Aktivität des Komplex IV steht und damit als Indikator für die oxidative Phosphorylierung dient, kann mit ihm die mitochondriale Aktivität quantifiziert werden [80]. Der Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit der Zeit wird hierbei als Sauerstofffluss (O₂-Fluss) oder Respiration bezeichnet [81]. Diese Respiration kann vom Gewicht der gewonnenen Myokardproben abhängig sein, da eine schwerere Probe zumeist mehr Mitochondrien enthält als eine leichte. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Normierung des O₂-Fluss auf das jeweilige Probengewicht vorgenommen.

Neben der ATP-Erzeugung ist die Atmungskette Produktionsort reaktiver Sauerstoffspezies, die in geringen Konzentrationen als regulatorische Mediatoren

bei verschiedenen Signalwegen der Zelle fungieren, in hohen Konzentrationen dagegen zellschädigend wirken [82, 83].

1.3.3 Respiratorische Stadien

Die verschiedenen Stadien der mitochondrialen Respiration werden nach dem Vorliegen bzw. der Abwesenheit der Substrate und Inhibitoren der Atmungskette und der daraus resultierenden, maximal erreichbaren Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung eingeteilt.

Erstmals 1955 von Chance und Williams definiert, wurden die klassischen fünf metabolischen Stadien der Mitochondrien in Versuchen mit isolierten Mitochondrien aus Ratten- und Meerschweinchenleberpräparaten unterschieden, dargestellt in Tabelle 4 [84, 85].

	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 4	Stadium 5
Charakteristika	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob	Anaerob
ADP-Level	Niedrig	Hoch	Hoch	Niedrig	Hoch
Substrat-Level	Niedrig	Nahezu null	-	Hoch	-
Begrenzender Faktor	Phosphat-Akzeptor	Substrat	Atmungskette	Phosphat-Akzeptor	O ₂
Geschwindigkeit der OXPHOS	Langsam	Langsam	Schnell	Langsam	Null

Tabelle 4: Die klassischen fünf Stadien der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien [84]. ADP Adenosindiphosphat; OXPHOS Oxidative Phosphorylierung; O₂ Sauerstoff.

Vereinfacht lassen sich die Stadien auch wie folgt beschreiben:

1. Mitochondrien allein (in Anwesenheit von Phosphat)
2. Zugabe von Substrat, geringe Respiration aufgrund von ADP-Mangel
3. Zugabe einer begrenzten Menge ADP, die eine schnelle Respiration ermöglicht
4. Alles ADP wird in ATP umgewandelt, die Respiration verlangsamt sich
5. Anoxie

Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf Versuchsaufbauten mit intakten oder permeabilisierten Zellen, wie in dieser Arbeit verwendet, ist nicht ohne Weiteres möglich. Während die Stadien 1 und 3 theoretisch auch in intakten und permeabilisierten Zellen durchlaufen werden können, enthalten diese im Gegensatz zu isolierten Mitochondrien größere Mengen an intrazellulär gespeicherten Substraten, was eine Abgrenzung der beiden ersten Stadien von Stadium 3 erschwert. Ebenso ist Stadium 4 praktisch nicht erreichbar, da endogenes ADP nicht komplett aufgebraucht werden kann. Anstelle dessen muss durch die Hinzugabe von Oligomycin A, eines Inhibitors der ATP-Synthase, in Stadium 3 ein dem Stadium 4 respiratorisch ähnliches Stadium 4_O („O“ für Oligomycin) erzeugt werden. Die Stadien 3 und 5 sind so auch in permeabilisierten Zellen erreichbar [80].

Die ursprünglichen Titrationsprotokolle von Chance und Williams begannen mit der Zugabe von Mitochondrien in ein luftgesättigtes isotones Medium mit anorganischem Phosphat, Ausgangspunkt war stets Stadium 1. So wurde von ihnen damit begonnen, dem Medium ADP hinzuzufügen, um noch vorhandene endogene Substrate abzubauen und einen *steady state* zu erreichen, bevor die weiteren Substrate hinzugegeben wurden [84]. Später entwickelten die beiden weitere Protokolle, in denen sie andere Substrate vor der Applikation des ADP hinzugaben, was eine konsequente Einteilung in die erstmals vorgeschlagenen Stadien verkompliziert [85].

In dem von Erich Gnaiger 2007 erstmals publizierten Lehrbuch „*Mitochondrial Pathways and Respiratory Control – an Introduction to OXPHOS Analysis*“ [80] wurde eine Neudefinition der respiratorischen Stadien vorgeschlagen. Diese sollten eine Anpassung an zeitgemäße Respirometrieprotokolle darstellen und ebenfalls in intakten sowie permeabilisierten Zellen Bestand haben. Die Stadien sind: Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS Kapazität), Kapazität des Elektronentransfersystems (ETS Kapazität) und *LEAK* Respiration (Tabelle 5).

	OXPHOS Kapazität	ETS Kapazität	LEAK Respiration
Definition	Maximale Respiration in ADP-Stimulation bei sättigenden Substratkonzentrationen	Maximale nicht-phosphorylierende, entkoppelte Respiration	Nicht-phosphorylierender Ruhezustand der un- oder partiell gekoppelten Respiration
Vergleichbares Stadium nach Chance und Williams	Stadium 3	Entkoppeltes Stadium 3	Stadium 4

Tabelle 5: Respirationsstadien nach Gnaiger [80]. OXPHOS Oxidative Phosphorylierung; ETS Elektronentransfersystem; ADP Adenosindiphosphat.

Mitochondrien, die mit OXPHOS Kapazität respirieren, erzeugen durch das Pumpen von Protonen über die Atmungskettenkomplexe I, III und IV eine chemiosmotische Kraft. Diese Kraft treibt die ATP-Synthase dazu an, die Phosphorylierung voranzutreiben (gekoppelte Atmung), erleichtert den Transport geladener Moleküle und wird dabei selbst teilweise wieder abgebaut (ungekoppelte Atmung). Bei der OXPHOS Kapazität spricht man deswegen von einer partiellen Kopplung, die im Grunde Stadium 3 nach Chance und Williams entspricht. In intakten Zellen gestaltet es sich schwierig, die maximale OXPHOS Kapazität zu erreichen, da ADP und anorganisches Phosphat über die Plasmamembranen nicht in ein Gleichgewicht gebracht werden können und somit keine sättigenden Substratkonzentrationen erreicht werden. Die Permeabilisierung der Zellen unter dem Erhalt intakter Mitochondrien begegnet diesem Problem [80, 86].

Die ETS Kapazität wird in einem geöffneten Zustand des transmembranösen Protonengradienten bestimmt. Dies bedeutet, dass zusätzlich zu optimalen Substratkonzentrationen zur Stimulierung des maximalen Flusses Entkoppler (z.B. Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxy-phenylhydrazon (FCCP)) der Atmungskette hinzutitriert werden. Diese Entkoppler, ionophore Moleküle, ermöglichen eine von der Phosphorylierung losgelöste Respiration, in der die maximale Elektronentransferkapazität der Atmungskettenkomplexe I – IV unabhängig von der ATP-Synthase und dem Vorhandensein von Phosphatakzeptoren bestimmt werden kann. So erzwingen sie einen maximalen Sauerstoffverbrauch ohne die Synthese von ATP. Darüber hinaus bauen sie den Protonengradienten (mitochondriales

Membranpotential) ab. Dieses Respiationsstadium nach Gnaiger entspricht einem entkoppelten Stadium 3 nach Chance und Williams [86].

In intakten und permeabilisierten Zellen entspricht die LEAK Respiration dem durch die Hinzugabe von Oligomycin induzierten Stadium 4_o. Der LEAK Zustand ist der nicht-phosphorylierende Ruhezustand der mitochondrialen Atmung, bei der entweder ADP fehlt oder bei der das phosphorylierende System (die ATP-Synthase) blockiert wurde. Die Respiration dient nun nicht mehr der Phosphorylierung des ADP sondern nur noch dem Erhalt des Membranpotenzials [80]. Der noch messbare Sauerstoffverbrauch resultiert aus sogenannten Protonen-Leckströmen, *proton slip* und *cation cycling*. Diese Vorgänge beschreiben verschiedene Prozesse, bei denen es auch ohne phosphorylierende Aktivität der ATP-Synthase zu Protonenverschiebungen zwischen Intermembranraum und Mitochondrienmatrix kommt, die dann von den Komplexen der Atmungskette zurückgeführt werden müssen [87, 88].

Das oben bereits genannte Oligomycin A ist ein Vertreter der Klasse der Atmungsketteninhibitoren. Diese greifen blockierend in die Atmungskette ein und verhindern so die Respiration [86]. Unterschieden werden Inhibitoren der Phosphorylierung und Inhibitoren des Elektronentransports, alternativ kann man sie auch nach ihren Zielstrukturen, den Komplexen der Atmungskette, differenzieren [89]. Diese spezifische Hemmung einzelner Komplexe macht man sich experimentell zu Nutze, um Komplex-spezifische Resultate zu erhalten. Tabelle 6 liefert einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Atmungsketteninhibitoren.

Komplex	Inhibitor
I NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase	Rotenon
II Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase	Malonat
III Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase	Antimycin A
IV Cytochrom-c-Oxidase	-
V ATP-Synthase	Oligomycin A

Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette. NADH Nicotinamidadenindinucleotid; ATP Adenosintriphosphat.

1.4 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung des Einflusses von GPCR-AAk auf die Herzfunktion im Menschen. Es wurde analysiert, ob Veränderungen der Serumspiegel der GPCR-AAk eine für die HI relevante Stellgröße sind und ob sich anhand einer veränderten Anzahl an GPCR-AAk im Patientenserum Hinweise für eine pathogenetische Rolle finden. Hierbei wurden die drei Hypothesen überprüft, dass:

1. GPCR-AAk mit einer manifesten HI assoziiert sind
2. Serologische Muster solcher HI-assoziiierter GPCR-AAk sich zwischen histologischen Untergruppen innerhalb der HI-Gruppe unterscheiden
3. Serumspiegel HI-assoziiierter GPCR-AAk mit etablierten serologischen, hämodynamischen, histologischen, radiologischen und biochemischen Parametern der Krankheitsaktivität korrelieren

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

ADP	A5285 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Octanoyl carnitine	0605 TOCRIS Bioscience, Bristol, UK
Glutamat	G1626 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Succinat	S2378 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Cytochrom C	C7752 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Oligomycin	O4876 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
FCCP	C2920 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Rotenon	R8875 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Antimycin A	A8674 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Malat	M1000 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Saponin	S2149 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Imidazol	56750 Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Taurin	T0625 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
MES	M8250 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
DTT	D0632 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
MgCl ₂ •6H ₂ O	MA0035 Scharlab, Sociedad de responsabilidad limitada, Barcelona, Spanien
Na ₂ ATP	A2383 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Na ₂ Phosphokreatin	P7936 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
EGTA	E4378 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
K-Lactobionat	153516 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
KH ₂ PO ₄	P5655 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
HEPES	H7523 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Saccharose	S7903 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
BSA fatty acid free	A6003 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
KOH	P1767 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
CaCO ₃	C4830 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<i>BIOPS</i> Aufbewahrungspuffer	2,77 mM CaK ₂ EGTA 7,23 mM K ₂ EGTA 20 mM Imidazol 20 mM Taurin 50 mM MES 0,5 mM DTT 6,56 mM MgCl ₂ •6H ₂ O

	5,77 mM Na ₂ ATP 15 mM Na ₂ Phosphokreatin
MiRO5 Oxygraph-Puffer	0,5 mM EGTA 3 mM MgCl ₂ •6H ₂ O 60 mM K-Lactobionat 20 mM Taurin 10 mM KH ₂ PO ₄ 20 mM HEPES 110 mM Saccharose 1 g/l BSA
RNAlater [®]	AM7021, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Saponin-Standardlösung	5 mg Saponin 1 ml BIOPS
Saponin-Lösung	25 µl Saponin-Standardlösung 2,5 ml BIOPS
CaK ₂ EGTA	2,002 g CaCO ₃ 100 mM EGTA 2,3 g KOH
K ₂ EGTA	100 mM EGTA 200 mM KOH 200 ml <i>Aqua dest.</i>

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Serum-Röhrchen 5 ml	BD Vacutainer [®] SST™II Advance Plus Blood Collection Tubes, REF 367955, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Serum-Röhrchen 5 ml	BD Vacutainer [®] SST™II Advance Plus Blood Collection Tubes, REF 367957, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
EDTA Blutbild-Röhrchen	BD Vacutainer [®] SST™ K2E 5.4 mg, Plus Blood Collection Tubes, REF 367957, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Citrat-Röhrchen	BD Vacutainer [®] 9NC 0.129M, REF 363079, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Blutentnahmeset mit Halter	BD Vacutainer [®] Safety-Lok™ 21G (0,8 x 19 mm), 305 mm Schlauch, Luer Adapter, REF 367286, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Einmalhalter aus Kunststoff	BD Vacutainer [®] Einmalhalter, REF 364815, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK

Probengefäß 1,3 ml mit Schraubverschluss, Fluorid-Heparin/Glukose	Sarstedt® Probengefäß 1,3 ml FH, Bestellnummer 41.1394.005, Nürnbrecht, Deutschland
Probengefäß 2 ml mit grünem Cap-Insert	BiozymCryovials® Außengewinde und Silikon-Dichtungsring, Art. Nr. 710533; Biozym Cap-Inserts für Cryovials®, Art.-Nr. 710533; Biozym Scientific GmbH, Wien, Österreich
Pflasterrolle	3M™ Transpore™, REF 1527-1; 2,5 cm x 9,1 m, 3M Deutschland GmbH Health Care Business, Neuss, Deutschland
Venenstauer	Roeser Standard Venenstauer, Art.-Nr. 40.718160, Roeser Medical GmbH, Essen, Deutschland
Hautantiseptikum	Kodan® Tinktur forte farblos, Art.-Nr. 204012, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Hände-Desinfektionsmittel	Sterillium® classic pure, REF 975512, Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Medizinische Untersuchungshandschuhe	Abena® Classic Nitrile Powder-Free, REF 290420, Abena GmbH, Zörbig, Deutschland
Zellstofftupfer	L&R Zelletten®, 5 x 4 cm, REF 13356, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co, KG, Rengsdorf, Deutschland
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.® Reloads 2 – 200 µl, LOT F1689590; epT.I.P.S.® Reloads 50 – 1000 µl, LOT F16884700; epT.I.P.S.® Standard/Bulk 100 – 5000 µl, LOT F16889300; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
6-Well-Zellkulturplatten	VWR® Tissue Culture Plates: 6 wells, sterile, REF 7342323, VWR International, LLC, Radnor, USA
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, LOT F169519P, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Konisches Röhrchen 15 ml	Falcon® 15 mL Polypropylene Conical Tube, REF 352096, Corning Science México, Reynosa, Tarnaulipas, Mexiko
Konisches Röhrchen 50 ml	Falcon® 50 mL Polypropylene Conical Tube, REF 352098, Corning Science México, Reynosa, Tarnaulipas, Mexiko
Substratspritzen	Hamilton® Mycosyringe 10/25/50 mm ³ , Hamilton Central Europe S.R.L., Ghiroda, Rumänien
Filterpapier	VWR® Qualitative filterpaper, 410, REF 516-0804, VWR International, Leuven, Belgien
Vernichtungsbeutel	oehmen® Vernichtungsbeutel 300x200x0,05 mm, Art.-Nr. VB20, Oehmen Labortechnik, Essen, Deutschland
Sterile Skalpellklinge	BAYHA® Klinge Nr. 11, Art.-Nr. 311, Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland

AT1R-IgG Antikörper ELISA	EIA zur quantitativen Bestimmung von anti-AT1-Ak, 1x96 Best., Art.-Nr. 12000, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland
AT2R-IgG Antikörper ELISA	EIA zur quantitativen Bestimmung von anti-AT1-Ak, 1x96 Best., CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Muskarinerge Cholin Rezeptor (M5) Auto-Antikörper ELISA	EIA zur quantitativen Bestimmung von anti-M5R-Ak, 1x96 Best. , Art.-Nr. 15500, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Endothelin-Rezeptor-A Auto-Antikörper ELISA	EIA zur quantitativen Bestimmung von anti-ETR-A-Ak, 1x96 Best. , Art.-Nr. 12100, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Endothelin-Rezeptor-B Auto-Antikörper ELISA	EIA zur quantitativen Bestimmung von anti-ETR-B-Ak, 1x96 Best. Art.-Nr. 13300, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Alpha-1 adrenerge Rezeptor Auto-Antikörper ELISA	EIA zur quantitativen Bestimmung von anti- α 1 AR AA, 1x96 Best. , Art.-Nr. 12400, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Beta-1 adrenerge Rezeptor Auto-Antikörper ELISA	EIA zur quantitativen Bestimmung von anti- β 1 AR AA, 1x96 Best. , Art.-Nr. 12600, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Anti-ACE-II-Antikörper ELISA	EIA Quantitative Determination of anti-ACEII-IgG-Antibodies, 1x96 Best., Art.-Nr. 16000, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland

2.1.3 Geräte

Oxygraph-2k	OROBOROS® Instruments, Innsbruck, Österreich
Zeitmesser	LGG® -Short period timer with alarm, Katalog-Nr. 38.2022.02, Wertheim, Deutschland
Schüttelmaschine	VWR® Standard Analog Shaker, STD 3500, SN: 100831001, Model-Nummer: 980302EU, VWR International, Leuven, Belgien
Pipetten 2,5/10/100/1000/5000 μ l	Eppendorf Research® plus, Einkanal, Katalog-Nr. 3120000011/ 3120000020/ 3120000046/ 3120000120/ 3120000070, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage	ME-T Analysenwaage XP205, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA

2.1.4 Software

DatLab® Version 6.1.0.7	OROBOROS Instruments Corp., Innsbruck, Österreich
IBM® SPSS® Version 25.0.0.2	International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA
GraphPadPrism® Version 9.1.2	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Medico® Version 26.00.17.10	CGM MEDICO – CGM Clinical Europe GmbH
Microsoft Office® 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Studienprotokoll

Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigte diese Studie am 21.12.2015 (Referenznummer 5263R) und verlängerte sie am 16.10.2018 für weitere fünf Jahre. Sie ist bei ClinicalTrials.gov mit der Identifikationsnummer NCT03386864 registriert. In dieser klinischen, analytischen Beobachtungsstudie wurden ursprünglich prospektiv Daten unterschiedlicher Patientenkollektive erhoben, um die Wechselwirkung von HI und kardialer mitochondrialer Funktion zu untersuchen. Des Weiteren wurden 60 systemisch gesunde Personen als Kontrollen am Universitätsklinikum Düsseldorf miteingeschlossen (IRB Zulassungsnummer 3786). Alle studienbezogenen Untersuchungen stehen in Einklang mit den Statuten der Deklaration von Helsinki der *World Medical Association*. Alle Patienten gaben nach Aufklärung durch einen Studienarzt ihre schriftliche Einwilligung.

2.2.2 Rekrutierung und Patientenkollektiv

Für die Untersuchung im Rahmen dieser Studie wurden 95 Patienten mit einer symptomatischen HI eingeschlossen, die im Rahmen der Ursachenabklärung eine Links- und Rechtsherzkatheteruntersuchung sowie eine EMB erhielten. Die Patientenrekrutierung sowie die studienbezogenen Untersuchungen fanden im

Zeitraum vom 01.10.2016 bis zum einschließlich 31.03.2020 statt. Eingeschlossen wurden Personen im Alter zwischen 20 und 85 Jahren, auf die folgende Ausschlusskriterien nicht zutrafen:

- Akute Infektionserkrankung innerhalb der letzten zwei Wochen vor Studieneintritt
- Schwangerschaft
- Alkohol- oder Drogenabhängigkeit (Suchterkrankung), psychiatrische Erkrankungen
- Risiko für oder manifeste Infektion mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis B oder C
- Aktive Krebserkrankung
- Lebererkrankungen, die nicht auf eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung zurückzuführen sind

In die Kontrollkohorte wurden 60 volljährige Personen ohne bekannte Herzinsuffizienz oder Herzinsuffizienz-Symptomatik eingeschlossen, auf die folgende Ausschlusskriterien nicht zutrafen:

- Systemische Antibiotikatherapie innerhalb der letzten sechs Monate vor Studieneintritt
- Vorbekannte Endokarditis
- Blutungsstörungen
- Organtransplantation
- Dialysepflichtige Niereninsuffizienz
- Schwangerschaft

Die Abwesenheit einer Herzinsuffizienz bei den Teilnehmern der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Blutabnahme wurde zusätzlich zum anamnestischen Nichtvorhandensein von Symptomen der Herzinsuffizienz durch die Bestimmung der Blutserumspiegel von N-terminalem pro-Brain Natriuretischem Peptid (pBNP) und Troponin T (TpT) mit Festlegung der Grenzwerte von pBNP < 125 ng/L und TpT < 4 ng/L bestätigt. Das Nichtvorhandensein einer systemischen Entzündung wurde durch die Bestimmung der Serumspiegel von C-reaktivem Protein (CRP) bei < 5 mg/L und Interleukin 6 (IL-6) bei < 7 ng/L festgestellt. Keiner der Studienteilnehmer (Probanden oder Kontrollen) hatte eine Chagas-Krankheit in der Vorgeschichte

und/oder hat in den letzten 20 Jahren in Gebieten gelebt, in denen die Chagas-Krankheit endemisch war.

2.2.3 Studienablauf

Die Dauer des stationären Aufenthalts der Probanden, die mit einer symptomatischen Herzinsuffizienz aufgenommen wurden, variierte je nach weiterem klinischem Verlauf stark. Eine Verlängerung der stationären Aufenthaltsdauer aus Studiengründen wurde vermieden. Die Untersuchungen der Studie fanden parallel zu oder im Anschluss an die klinisch notwendigen, gemäß der geltenden Leitlinien durchgeführten Untersuchungen statt. Die Reihenfolge der studienbezogenen Untersuchungen war abhängig von der Verfügbarkeit der Untersuchungsgeräte und -räumlichkeiten.

Im Rahmen ihres stationären Aufenthalts erhielten die Patienten folgende zusätzliche Untersuchungen im Zuge der Studie:

- Venöse Blutentnahme zur Serum- und Plasmaanalyse
- Kardiale Magnetresonanztomographie (MRT)

2.2.4 Herzkatheteruntersuchung

Bei allen Studienpatienten der HI-Gruppe wurde im Rahmen der klinischen Untersuchungen eine KHK durch eine Koronarangiographie ausgeschlossen. Am selben oder an einem der folgenden Tage wurde ebenfalls eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durch einen mit dem Verfahren vertrauten Facharzt für Kardiologie der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Die Linksherz- sowie die Rechtsherzkatheteruntersuchung erfolgten in Seldinger-Technik unter Punktion der vorzugsweise rechten *Arteria* bzw. *Vena*

femoralis. Unter röntgenologischer Kontrolle der Position des Führungsdrahtes sowie des Herzkatheters erfolgte eine Messung bzw. Berechnung folgender Parameter der Hämodynamik (Tabellen 7 und 8).

Parameter	Einheit
Herzminutenvolumen (HMV)	l/min
Pulmonalarterieller Druck (PAP)	mmHg
systolisch - sPAP	
diastolisch - dPAP	
gemittelt - mPAP	
Lungenkapillaren-Verschlussdruck (PCWP)	mmHg
Rechtsventrikulärer Druck (RVP)	mmHg
systolisch - sRVP	
diastolisch - dRVP	
gemittelt - mRVP	
Rechtsatrialer Druck (RAP)	mmHg
systolisch - sRAP	
diastolisch - dRAP	
gemittelt - mRAP	
Linksventrikulärer Druck (LVP)	mmHg
Aortaler Druck (AOA)	mmHg
Blutdruck	mmHg
systolisch - sBP	
diastolisch - dBP	

Tabelle 7: Gemessene Kenngrößen der Hämodynamik. l Liter; min Minute; mmHg Millimeter-Quecksilbersäule

Parameter	Berechnung	Einheit
Herzindex (CI)	HMV/Körpergröße	l/min/m ²
Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	$(2 \cdot \text{dBP} + \text{sBP})/3$	mmHg
Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR)	$80 \cdot (\text{mPAP} - \text{PCWP})/\text{HMV}$	dyn*s*cm ⁻⁵
Totaler peripherer Widerstand (TPR)	Systemischer Kreislauf: $(\text{MAP} - \text{RAP})/\text{HMV}$ Lungenkreislauf: $(\text{mPAP} - \text{PCWP})/\text{HMV}$	dyn*s*cm ⁻⁵ dyn*s*cm ⁻⁵

Tabelle 8: Berechnete Kenngrößen der Hämodynamik. Mithilfe der zuvor in der Rechts- und Linksherzkatheterisierung erhobenen Werte berechnete Größen. HMV Herzminutenvolumen; dBP diastolischer Blutdruck; sBP systolischer Blutdruck; mPAP mittlerer pulmonalarterieller Druck; PCWP Lungenkapillaren-Verschlussdruck; l Liter; min Minute; m² Quadratmeter; mmHg Millimeter-Quecksilbersäule; dyn Dyn; s Sekunde, cm Zentimeter.

2.2.5 Endomyokardiale Biopsien

Im Rahmen der Rechtsherzkatheteruntersuchung wurden EMB der rechtsventrikulären Seite des interventrikulären Septums von einem in diesem Verfahren erfahrenen kardiologischen Facharzt entnommen. Der Entnahme ging eine klinische Indikationsstellung voraus, bei welcher die Notwendigkeit der EMB für die weitere Therapie der Patienten mit HI festgestellt wurde. Mithilfe einer Biopsiezange (H. + H. Maslanka GmbH, REF EH1518.02-120, Tuttlingen, Deutschland) wurden zusätzlich zu den klinisch notwendigen 5-7 Gewebeproben 1-2 zusätzliche Proben mit einer Masse von 0,2 - 2 mg entnommen und mit einer sterilen Skalpellklinge in ein präpariertes Mikroreaktionsgefäß überführt. Größere Stücke wurden für die weitere histologische Aufarbeitung in vierprozentiger wässriger Formaldehyd-Lösung aufbewahrt, kleinere Stücke wurden für die immunhistochemische, virologische und molekularbiologische Analyse in RNA^{later}® konserviert.

Diese Proben wurden bei Raumtemperatur an ein durch das *College of American Pathologists* akkreditiertes klinisches Referenzlabor versandt. Hier wurden histologische Untersuchungen der Herzmuskelbiopsien zur Beurteilung und Quantifizierung morphologischer Veränderungen des Myokards, z.B. Myozytenhypertrophie und Fibrosenachweis durchgeführt. Die histopathologische Begutachtung mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie wurde an histologischen Standardfärbungen (Azan, Hämatoxylin-Eosin, Elastica-van-Gieson, PAS) vorgenommen. Diese war primär für den Nachweis einer aktiven Myokarditis entsprechend den Dallas Kriterien [90] gedacht, jedoch war auch eine Diagnosestellung anderer Myokarderkrankungen wie einer Riesenzell-Myokarditis, kardialen Sarkoidose, DCM oder kardialen Speichererkrankung möglich. Die Beurteilung der Proben fand im Regelfall innerhalb von drei Tagen statt.

Die zusätzlich zu den für die klinische Diagnostik notwendigen Biopsien entnommenen weiteren Biopsien wurden in ein Mikroreaktionsgefäß mit BIOPS-Pufferlösung überführt. Ununterbrochen eisgekühlt wurden diese Proben innerhalb einer Stunde dem weiteren Messvorgang zugeführt.

2.2.6 Hochauflösende Respirometrie

Die *ex vivo High-Resolution Respirometry* (HRR) ermöglichte es, anhand der Messung des O₂-Verbrauchs bzw. der O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit die mitochondriale Leistung in permeabilisierten Endomyokardproben zu bestimmen. Als Respirometer wurde ein Oxygraph-2k von OROBOROS Instruments (Innsbruck, Österreich) verwendet. Die Messkammer des Geräts hatte ein Fassungsvermögen von 2 mL und wurde während der Messung mittels eines Stopfens luftdicht verschlossen, um eine Sauerstoffkontamination aus der Umgebungsluft und eine Beeinflussung der Messung des Sauerstoffverbrauchs zu vermeiden. Durch eine Clark-Elektrode, ein polarographischer Sensor, erfolgte die Messung der O₂-Konzentration sowie des O₂-Flusses. Die Elektrode war durch eine O₂-durchlässige Membran von der Messkammer getrennt, sodass größere Moleküle ferngehalten wurden. Um die Lösung gleichmäßig in der Kammer zu verteilen, wurde die Lösung kontinuierlich mit einem Magnetrührer bei 750 Umdrehungen/min durchmischt.

Vor Beginn der Messungen musste der Oxygraph vorbereitet und kalibriert werden. Dazu wurde mit einem Absaugsystem der von dem vorherigen Waschprozess in den Messkammern verbliebene 70-prozentige Ethanol abgesaugt und diese dreimal mit *Aqua dest.* gespült. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit 2,3 ml Versuchsmedium (MiRO5) pro Kammer, der luftdichte Abschluss der Kammern erfolgte durch einen Stöpsel. Nun wurde dem Medium ca. 10 min Zeit gegeben sich zu homogenisieren und während der Stabilisierung des Sensorsignals wurde ein Test des Magnetrührers durchgeführt. Nach eingetretener Stabilisierung des O₂-Signals, sichtbar durch eine ausbleibende Veränderung des O₂-Flusses und ein Einpendeln bei Werten um +/- 1 pmol/s/ml wurde eine Luftkalibrierung durchgeführt. Hierfür wurde der O₂-Sensor auf die gegebene Luftsättigung eingestellt.

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme im Herzkatheterlabor unverzüglich in das Respirometrielabor gebracht, dort in BIOPS-Medium überführt und zuerst manuell mit zwei Pinzetten nach der *skinned-fiber*-Methode [91, 92] mechanisch in einzelne Fasern sezirt. Zur chemischen Permeabilisierung der

Herzmuskelfasern wurden die Proben in ein mit Saponin-Lösung befülltes *Well* gegeben und für 30 min auf einer Schüttelmaschine mit ca. 80 Umdrehungen/min inkubiert. Dies ermöglichte die Perforation der Cholesterol-reichen Zellmembran der Myokardzellen und damit die Aufnahme von Substraten und Inhibitoren während der später folgenden Messung [93]. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben in zwei Schritten in zwei mit MiRo5-Respirationsmedium gefüllten *Wells* für je 10 min auf der oben genannten Schüttelmaschine mit ca. 80 Umdrehungen/min gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeprobe bzw. einzelne Myokardfasern auf Filterpapier abgetupft, gewogen (Zielgewicht trocken: ca. 1 mg) und zusammen mit 2 ml MiRO5 bei 37°C in die Messkammern des Zweikammer-Respirometers überführt. Nachdem vor Beginn der Messung eine Kalibrierung durchgeführt wurde, erfolgte eine Hyperoxygenierung. Hierfür wurden 5 ml O₂ in jede Messkammer eingebracht, sodass in beiden Messkammern eine O₂-Konzentration von 400 - 450 nmol/l vorlag. Anschließend wurde für alle Myokardproben ein Protokoll der Substratzugabe durchgeführt, welches vergleichbar bereits in vorhergegangenen Versuchsaufbauten unserer Arbeitsgruppe etabliert und publiziert wurde [94, 95] (Tabelle 9):

Substrat	Konzentration im Oxygraph
Malat	2 mM
Octanoyl-Carnitin	1 mM
ADP	2,5 mM
Glutamat	10 mM
Succinat	10 mM
Cytochrom C	10 µM
Oligomycin	5 µM
FCCP	einmalig 0,25 µM, dann Titration in Schritten von 0,15 µM
Rotenon	2 µ
Antimycin A	5 µM

Tabelle 9: Respirometrieprotokoll, angelehnt an Scheiber et al. [94]. ADP Adenosindiphosphat; FCCP Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon; µl Mikroliter

Durch gesättigte Konzentrationen von Malat, Octanoyl-Carnitin und ADP wurde die Fettsäure-abhängige Respiration (MOct) [96] erreicht. Durch weitere

Zugabe von Glutamat wurde die durch Komplex I maximal unterstützte Respiration erreicht (GMOct). Nach Zugabe von Succinat, einem Substrat des Komplex II, und in Kombination mit den zuvor hinzugegebenen Substraten wurde die Respiration in die maximale partiell erreichbare OXPHOS Kapazität (GMSOct) überführt. Die Hinzugabe von Cytochrom C diente der Überprüfung der Intaktheit der inneren Mitochondrienmembran. So gilt ein Anstieg des O_2 -Flusses um mehr als 10 % nach Gabe von Cytochrom C als Nachweis für einen Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran und führte zu einem Verwerfen der Messung. Oligomycin inhibierte die ATP-Synthase und überführte die Respiration in den *LEAK State 4_o*. Um nun die maximale entkoppelte ETS Kapazität darzustellen fand eine schrittweise Titration von FCCP statt. Abschließend wurden Rotenon als Hemmstoff des Komplex I und Antimycin A als Hemmstoff des Komplex III hinzugegeben, wodurch eine Näherung des O_2 -Flux an 0 erwartet wurde. Die weitere Zugabe der Substrate erfolgte immer dann, wenn sich nach dem vorherigen Substrat ein konstanter O_2 -Fluss (Plateau) einstellte. Je nach Substrat betrug die Zeitdauer dieser Stabilisierung zwischen 5 – 20 min (siehe Abbildung 4).

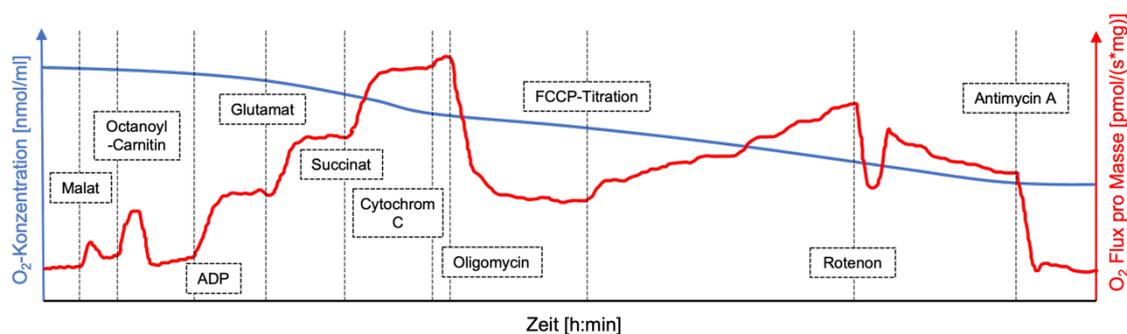


Abb. 4: Beispielhafte Darstellung einer Respirometrie-Messung. Abszisse: Zeitlicher Verlauf der Messung in [h:min]; Ordinate links/blau Kurve: O_2 -Konzentration innerhalb der Messkammer in [nmol/ml]; Ordinate rechts/rote Kurve: O_2 Flux pro Masse in [pmol/(s*mg)]. h Stunde; min Minute; s Sekunde; pmol Pikomol; nmol Nanomol; ml Milliliter; mg Milligramm

Um die Kopplung der Atmungskette sowie die mitochondriale Funktion unabhängig vom Probengewicht zu beurteilen, wurden *Flux Control Ratios* [97] herangezogen. Die *Respiratory Control Ratio* (RCR) diente als Maß für die Kopplungseffizienz. Sie wurde aus OXPHOS / LEAK Respiration, also *State 3 / State 4_o* gebildet. Eine hohe RCR bedeutet, dass verhältnismäßig mehr O_2 für die oxidative Phosphorylierung anstatt nur für die Aufrechterhaltung des

Membranpotenzials eingesetzt werden kann [98]. Definitionsgemäß ist sie immer ≥ 1 . Dagegen ist die *LEAK Control Ratio* (LCR) ein Maß für den Grad der Entkopplung der Atmungskette und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Sie wird aus LEAK Respiration / ETS Kapazität, also *State 4_o* / *State 3* entkoppelt gebildet. Ebenfalls kann noch das P/E Verhältnis genutzt werden, um zu beurteilen, zu welchem Grad die Aktivität der Atmungskettenkomplexe durch die Kapazität der ATP-Synthase limitiert wird. Das P/E Verhältnis wird aus OXPHOS Kapazität / ETS Kapazität gebildet.

Nach Abschluss der Messungen wurden die Gewebeproben wenn möglich aus der Messkammer intakt entfernt, erneut gewogen und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Für weitere Messungen wurden sie aus diesem geborgen und zur Langzeit-Aufbewahrung bei -80°C eingefroren.

2.2.7 Serum- und Plasmaanalyse

Im Rahmen der Arbeit wurde allen Studienteilnehmern zur Serum- und Plasmaanalyse Blut abgenommen. Bei den Probanden der HI-Gruppe geschah dies im Zuge der EMB aus einer Schleuse in der *Vena femoralis* oder wie bei den Probanden der Kontrollgruppe mittels einer separaten venösen Blutentnahme. Dabei wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Röhrchen entnommen, analysiert und Überschüsse bei -80°C verwahrt. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme nüchtern.

Gefäß	Bestimmte Parameter
13,5 ml Serum	Kreatinin, Cystatin C, Creatin-Kinase, Gesamt-Protein, hochsensitives C-reaktives Protein (CRP), Insulin, C-Peptid, Troponin, B-natriuretisches Peptid (pBNP), Interleukin-6 (IL-6), freie Fettsäuren (FFA), Immunglobulin G (IgG)
3,0 ml EDTA-Plasma	Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozytenzahl, Hämoglobin A1c
2,7 ml Citrat-Plasma	Quick, <i>International Normalized Ratio</i>

Tabelle 10: Bei der Blutentnahme verwendete Gefäße sowie bestimmte Parameter

Der präanalytische Umgang mit den Blutproben und die Bestimmung etablierter serologischer Parameter erfolgten nach diagnostischem Routineverfahren.

2.2.8 GPCR-Autoantikörper Messung

AAk gegen verschiedene GPCR wurden mit *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) (CellTrend GmbH, Luckenwalde, Deutschland) gemäß der Herstellanweisungen gemessen. Diese Assays stellen native Rezeptoren in ihrer physiologischen Membrenumgebung als immunogene Ziele für AAK dar und wurden mit polyklonalen Standardseren kalibriert. Die Assays ermitteln Autoantikörperspiegel quantitativ in der Einheit Units/ml. Die bestimmten AAK waren gegen folgende Strukturen gerichtet:

- Komplementfaktor C5a-Rezeptor (C5aR)
- Angiotensin-II-Rezeptor Typ I (AT₁R)
- Angiotensin-II-Rezeptor Typ II (AT₂R)
- Muskarinerges Cholin-Rezeptor 5 (M₅R)
- Endothelin-Rezeptor A (ET_AR)
- Endothelin-Rezeptor B (ET_BR)
- Alpha-1 adrenerger Rezeptor (α₁AR)
- Beta-1 adrenerger Rezeptor (β₁AR)
- Angiotensin-Converting Enzyme II (ACE-II)
- Stabilin

Die verwendeten AAK-Enzymimmunoassays sind AAK-Suchtests. Die oben aufgelisteten Strukturen sind bei diesen an einer Mikrotiterplatte gebunden. Während der Inkubation über 120 min bei 4 °C wurden die in den Proben vorhandenen AAK an der Platte immobilisiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Mikrotiterplatten das erste Mal gewaschen. Durch eine Inkubation mit einem Peroxidase-markierten anti-human-IgG-Sekundärantikörper über 60 min bei Raumtemperatur erfolgte der Nachweis der gebundenen AAK. Nun folgte ein erneutes Waschen der Platten, bevor eine Substratinkubation über 20 min bei

Raumtemperatur stattfand. Diese Inkubation und die nachfolgende enzymatische Substratreaktion wurden durch das Zusetzen einer Stopplösung beendet. Die Reaktion des Substrats mit den Peroxidase-markierten anti-human-IgG-Sekundärantikörpern bildete ein farbiges Produkt, dessen Farbintensität bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen wurde und proportional zu der Konzentration und/oder Avidität der AAK ist.

2.2.9 Kardiale Magnetresonanztomographie

Bei Probanden der HI-Gruppe wurde im Verlauf des stationären Aufenthalts eine kardiale MRT mit einem 1,5-Tesla-Scanner (Philipps Achieva 1.5T XR MRI System, Philipps, Best, Niederlande) durchgeführt. Neben den Standardsequenzen für die Beurteilung ventrikulärer Volumina und Funktion wurden *Strain*-Analysen durchgeführt sowie T1- und T2-Maps analysiert.

Bei der Analyse ventrikulärer Volumina und Funktion wurden folgende Parameter gemessen: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD), rechtsventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (RVEDD), linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser (LVESD), linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV), rechtsventrikuläres enddiastolisches Volumen (RVEDV), linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV), rechtsventrikuläres endsystolisches Volumen (RVESV), linksventrikuläres Schlagvolumen (LVSV), rechtsventrikuläres Schlagvolumen (RVSV), linksventrikuläres Herzzeitvolumen (LVCO), rechtsventrikuläres Herzzeitvolumen (RVCO), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion (RVEF), Dicke des interventrikulären Septums (IVS), Dicke der freien Wand des linken Ventrikels (LW), linksventrikuläre Masse, sowie die Durchmesser des Aortenbulbus, der Aorta ascendens, des Aortenbogens, der Aorta descendens, des Pulmonalarterienstamms und der rechten und linken Pulmonalarterie (RPA, LPA).

Strain-Analysen wurden in Bildserien der langen Achse (longitudinaler *Strain*) oder der kurzen Achse (diastolische *Strain*-Rate) bestimmt. Dazu wurde der von der

Firma TOMTEC (TOMTEC Imaging Systems GmbH, München, Deutschland) konzipierte Algorithmus zum *Feature Tracking* verwendet. Hierbei werden die Grenzen des Ventrikels manuell identifiziert und dann automatisch durch alle Phasen des Herzzyklus mit einer Bildrate von 25 ms pro Bild verfolgt. Die diastolische *Strain-Rate* wurde als frühe diastolische zirkumferentielle *Strain-Rate* in vier mittventrikulären Segmenten als $\Delta Strain / \text{temporale Auflösung}$ ermittelt. Die zirkumferentielle *Strain-Rate* wurde hierbei als Steigung von der End-Systole zur Mitt-Diastole definiert [99, 100].

T1 Maps wurden mit der *Modified Look-Locker Inversion recovery* (MOLLI) Sequenz erstellt und spiegeln als T1 Relaxationszeit eine diffuse Myokardfibrose wider [101, 102]. Die mithilfe der *gradient-spin-echo* (GraSE) Methode erstellten T2 Maps geben als T2 Relaxationszeit Auskunft über myokardiale Ödeme, die im Rahmen von Entzündungsprozessen entstehen [103, 104]. In der Nachbearbeitung wurden die Durchschnittswerte der apikalen, mittventrikulären und basalen Schichten berechnet, um die globalen linksventrikulären T1- und T2-Relaxationszeiten zu bestimmen.

Gründe, die eine kardiale MRT verhinderten waren u.a. vorliegende Kontraindikationen (z.B. Metall im Körper), starke Platzangst, eine zu umfangreiche Körperfülle der Probanden oder die ausdrückliche Weigerung, eine MRT zu durchlaufen.

2.2.10 Statistische Tests und Software

Daten zu Vorerkrankungen, Medikation und Laborwerten wurden aus dem klinikeigenen Patientendatensystem „Medico“ (CGM MEDICO – CGM Clinical Europe GmbH, Version 26.00.17.10) entnommen

Die von uns vorgenommene Normierung der AAK-auf die Gesamt-IgG-Konzentration, welche durch eine Division der AAK-Werte durch die Gesamt-IgG-Konzentration erfolgte, führte zu Werten im Bereich der zweiten Dezimalstelle. Da

diese Werte eine log-Normalverteilung aufwiesen, entschieden wir uns zur besseren Darstellbarkeit der Daten für eine anschließende (log+1)-Transformation der Daten. Die verfügbaren demografischen, klinischen und Labordaten sowie die GPCR-Antikörperspiegel wurden zwischen HI- und Kontrollpatienten verglichen. Für Sensitivitätsanalysen wurde der Mann-Whitney-U-Test auf nicht verarbeitete GPCR-Antikörperdaten angewendet. Der Einfluss von Störfaktoren wurde für jede Antikörperart in einem separaten linearen Modell getestet. In einer explorativen Analyse wurden zusätzliche Vergleiche durchgeführt, um die Heterogenität und den Zusammenhang zwischen GPCR-Antikörperspiegeln und klinischen Parametern innerhalb der Herzinsuffizienzkohorte zu testen. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine gewöhnliche einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Spearman-Rangkoeffizienten wurden für Korrelationsanalysen verwendet und in den Abbildungen mit univariaten linearen Regressionslinien dargestellt. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism® Version 9.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und SPSS Statistics 25.0.0.2 (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Abbildungen und Tabellen wurden mit GraphPad Prism® Version 9.1.2 erstellt.

Bei allen Tests wird ein Ergebnis von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet, Ergebnisse von $p < 0,1$ wurden als Tendenzen gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten- und Kontrollencharakterisierung

Beim Vergleich der Patienten der HI-Gruppe und der Kontrollgruppe wurden hinsichtlich laborchemischer Charakteristika deutliche Unterschiede festgestellt. Die Merkmale der beiden Gruppen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die fortgeschrittene HI bei Patienten der HI-Gruppe wurde zusätzlich zu den vorhandenen klinischen Symptomen anhand des CI ($2,17 \pm 0,62$ l/min/m²), der LVEF ($28,95 \pm 10,26$ %) sowie des erhöhten PCWP ($18,71 \pm 8,55$ mmHg) festgestellt. Bei den 60 Personen der Kontrollgruppe handelte es sich um systemisch gesunde Menschen, die in der Regel etwas älter (56,7 vs. 59,1 Jahre) waren und unter denen mehr Frauen waren (26 vs. 53 %).

In der HI-Gruppe lagen CRP- und IL-6-Serumspiegel außerhalb der Normwerte und deuten auf eine meist subklinische oder geringgradige systemische Entzündung hin. Auch in Bezug auf Parameter der Nierenfunktion wie Kreatinin und Cystatin C sowie der Schädigung des Herzens unterschieden sich die beiden Gruppen deutlich. Während die TpT- ($64,38 \pm 59,14$ ng/l) und pBNP-Werte (8075 ± 36169 pg/ml) der herzinsuffizienten Patienten weit außerhalb der Normbereiche von $<10 - 20$ ng/l bzw. <125 pg/ml lagen, schlossen die TpT- ($3,64 \pm 4,03$ ng/l) und pBNP-Werte ($44,54 \pm 34,01$ pg/ml) der Kontrollgruppe eine akute sowie chronische HI mit hoher Sicherheit aus.

Parameter	Einheit	HI	Kontrollen	p
n		95	60	
Demographie				
Geschlecht	Männlich	74 (%)	47 (%)	0,001
Alter	Jahre	$56,7 \pm 12,1$	$59,1 \pm 13,6$	0,069
Kardiale Funktion				
CI	l/min/m ²	$2,17 \pm 0,62$	-	-
LVEF	%	$28,95 \pm 10,26$	-	-
RAP (M)	mmHg	$7,87 \pm 5,64$	-	-
PAP (M)	mmHg	$27,64 \pm 10,68$	-	-

PAP (sys)	mmHg	42,10 ± 14,63	-	-
PAP (dia)	mmHg	17,93 ± 8,50	-	-
PCWP	mmHg	18,71 ± 8,55	-	-
Kardio-MRT				
T1 Relaxationszeit	ms	1058 ± 74,16	-	-
T2 Relaxationszeit	ms	58,80 ± 10,90	-	-
Laborwerte				
Kreatinin	mg/dl	1,22 ± 1,03	0,78 ± 0,15	< 0,001
CK	U/l	75,74 ± 58,17	84,85 ± 74,93	0,033
Gesamtprotein	g/dl	14,27 ± 75,87	7,39 ± 0,63	< 0,001
Gesamt-IgG	mg/dl	955,0 ± 306,3	1139 ± 230,2	< 0,001
TpT	ng/l	64,38 ± 59,14	3,64 ± 4,03	< 0,001
pBNP	pg/ml	8075 ± 36169	44,54 ± 34,01	< 0,001
IL-6	pg/ml	15,97 ± 44,89	1,71 ± 0,75	< 0,001
Cystatin C	mg/l	1,40 ± 0,81	0,80 ± 0,12	< 0,001
CRP	mg/dl	1,96 ± 5,94	0,19 ± 0,40	< 0,001
Medikation				
Betablocker	%	94	-	-
ARB	%	12	-	-
ARNI	%	24	-	-
Aldosteronantagonist	%	15	-	-
Calciumkanalblocker	%	9	-	-
Insulin	%	8	-	-
Metformin	%	11	-	-

Tabelle 11: Patientencharakteristika. CI *Cardiac Index*; LVEF Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; RAP Rechtsatrialer Druck; PAP Pulmonalarterieller Druck; PCWP Lungenkapillaren-Verschlussdruck; CK Creatin-Kinase; IgG Immunglobulin G; TpT Troponin T; pBNP n-terminales pro Brain natriuretisches Peptid; IL-6 Interleukin 6; CRP Capsel-reaktives Protein; ARB Angiotensin-II-Rezeptorblocker; ARNI Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitoren; pg Pikogramm. Daten angegeben als Anzahl (%) oder Median ± Standardabweichung. P-Werte sind für mittels ungepaartem t-Test or Mann-Whitney-U Test berechnet.

3.2 Unterschiede in GPCR-AAk Serumspiegeln

Bei der Mehrheit der untersuchten GPCR-AAk lagen deutliche Unterschiede zwischen der HI-Gruppe und der Kontrollgruppe vor. Wie in Abbildung 5 dargestellt, waren die Konzentrationen der AAK gegen den AT₂R, den M₅R und den β₁AR in der HI-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren mit $p < 0,001$ hoch signifikant. Die Befunde konnten in jedem Fall der Haupt- und der folgenden Sensitivitätsanalysen repliziert und verifiziert werden: a) in nicht-transformierten Rohdaten; b) in IgG-normalisierten Daten; c) in IgG-normalisierten und log-transformierten Daten; und d) in IgG-normalisierten und log-transformierten Daten, korrigiert für Alter und Geschlecht in linearen Regressionsmodellen.

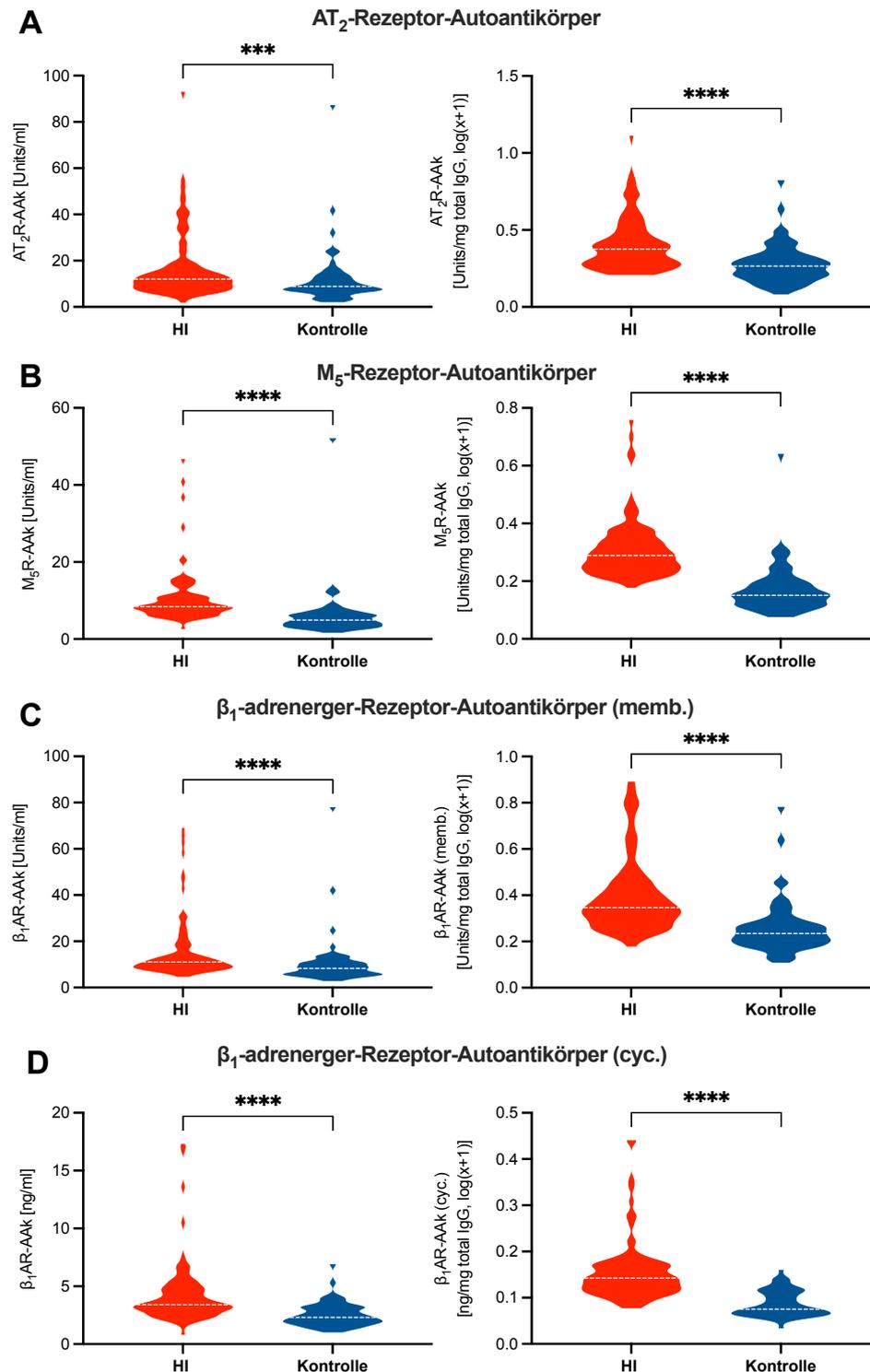


Abb. 5: Bei der HI-Gruppe erhöhte Serumspiegel der Autoantikörper. Mittelwerte mit Standardfehler. n = 95 vs. 60. Mann-Whitney Test. ns: nicht signifikant. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Linke Spalte: Nicht-transformierte Daten; Rechte Spalte: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. A: AT₂-Rezeptor-Autoantikörper, B: M₅-Rezeptor-Autoantikörper, C: β₁-adrenerger-Rezeptor-Autoantikörper, gemessen mittels Membran-ELISA; D: β₁-adrenerger-Rezeptor-Autoantikörper, gemessen mittels Cyclopeptid-ELISA.

Bei einigen der gemessenen AAK waren die in der HI-Gruppe gemessenen Konzentrationen niedriger als die der Kontrollgruppe, dargestellt in Abbildung 6. Dies waren die AAK gegen den AT₁R, den ET_BR, den α_1 AR und ACE-II. Diese Befunde wurden ebenso wie die zuvor gezeigten Erhöhungen in a) nicht-transformierten Rohdaten; b) IgG-normalisierten Daten; c) IgG-normalisierten und log-transformierten Daten; sowie d) in IgG-normalisierten und log-transformierten Daten, korrigiert für Alter und Geschlecht in linearen Regressionsmodellen, repliziert und verifiziert. Bei drei der vier in der Kontrollgruppe erhöhten AAK nahmen die Unterschiede nach IgG-Normierung deutlich ab, bei den AAK gegen ACE-II verschwand der signifikante Unterschied gänzlich.

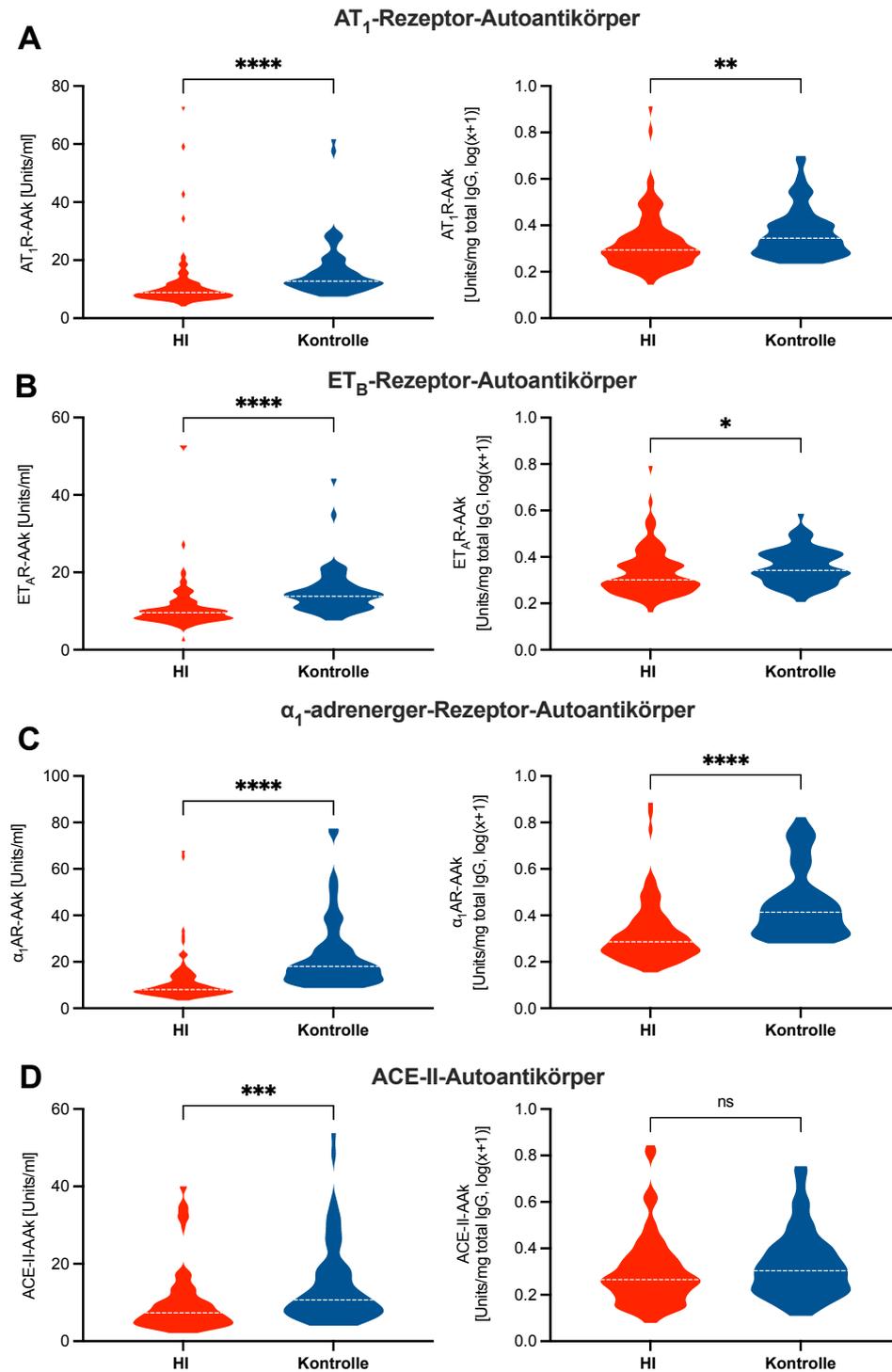


Abb. 6: Bei der HI-Gruppe verminderte Serumspiegel der Autoantikörper. Mittelwerte mit Standardfehler. n = 95 vs. 60. Mann-Whitney Test. ns: nicht signifikant. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****p≤0,0001. Linke Spalte: Nicht-transformierte Daten; Rechte Spalte: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. A: AT₁-Rezeptor-Autoantikörper, B: ET_B-Rezeptor-Autoantikörper, C: α₁-adrenerger-Rezeptor-Autoantikörper, D: ACE-II-Autoantikörper.

Wie in Abbildung 7 dargestellt ließen sich für AAK gegen den C5aR, den ET_AR und Stabilin zwischen den beiden Gruppen sowohl in den nicht-transformierten wie in den IgG-normalisierten und log-transformierten Daten jedoch keine Unterschiede der Serumlevel feststellen. Der bei den AAK gegen ACE-II initial feststellbare Unterschied verschwand nach der IgG-Normalisierung und wurde daher ebenfalls nicht weiter verwertet (siehe Abbildung 6).

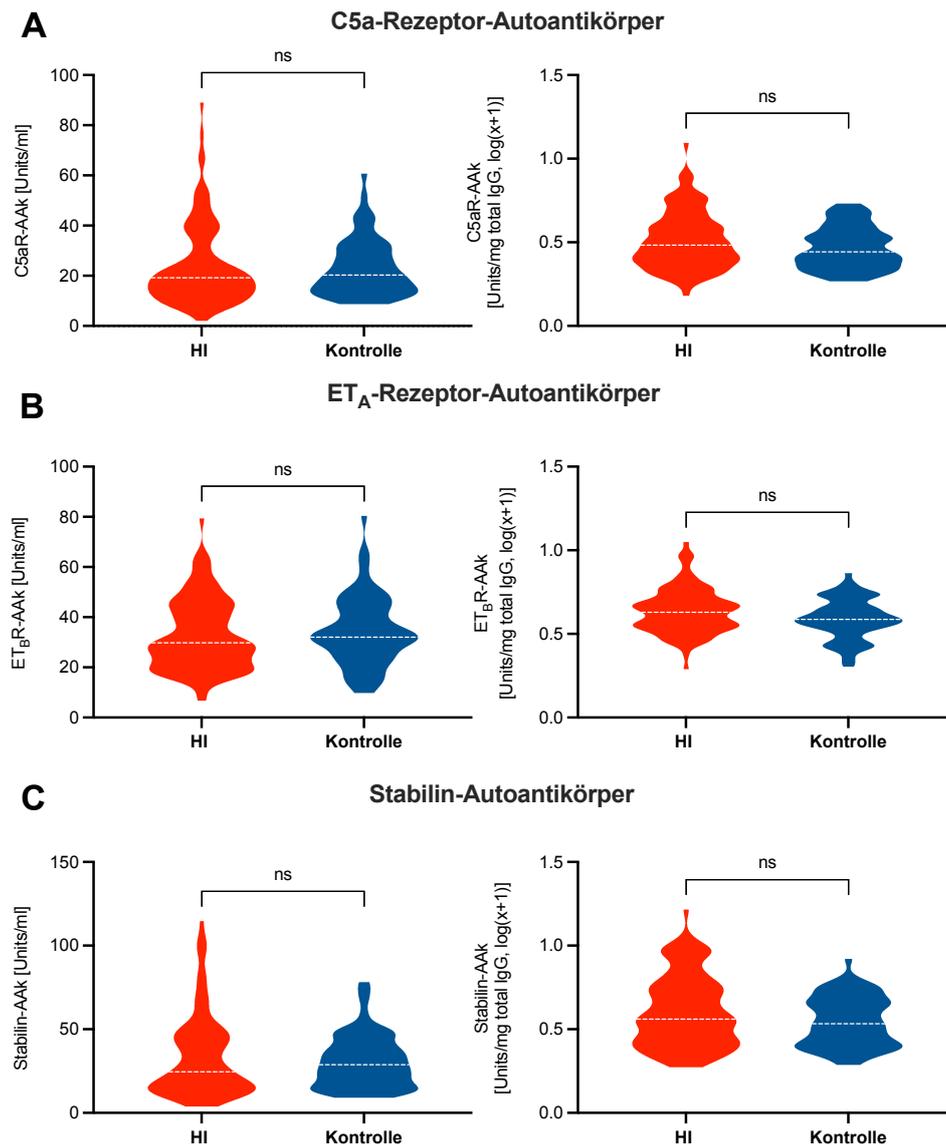


Abb. 7: Unveränderte Serumspiegel der Autoantikörper gegen den C5a- und ET_A-Rezeptor sowie gegen Stabilin. Mittelwerte mit Standardfehler. n = 95 vs. 60. Mann-Whitney Test. ns: nicht signifikant. Linke Spalte: Nicht-transformierte Daten; Rechte Spalte: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. A: C5a-Rezeptor-Autoantikörper, B: ET_A-Rezeptor-Autoantikörper, C: Stabilin-Autoantikörper.

Anschließend wurde die HI-Kohorte nach der wie in 2.2.5 beschrieben durchgeführten Histopathologie in die Untergruppen iCM (inkl. Myokarditis) (n=30), DCM (n=25), andere CM (n=11) und kein Hinweis auf Pathologie (n=29) eingeteilt, um die AAK-Spiegel auf ätiologisch bedingte Unterschiede hin zu untersuchen. Weder die Erhöhungen der β_1 AR-, M_5 R- und AT_2 R-AAk noch die Verminderungen der α_1 AR-, ET_B R- und AT_1 R-AAk waren mit einer dieser histopathologischen Kategorien verbunden, zwischen den Gruppen bestanden keine Unterschiede in den Serumspiegeln der AAK.

3.3 GPCR-AAk und gestörte Hämodynamik

In der HI-Gruppe wurde eine inverse Korrelation zwischen dem PVR und den C5a-R-, AT_1 R-, ET_A R-, α_1 AR- sowie den β_1 AR-AAk beobachtet, von denen nach Normalisierung der AAK auf das Gesamt-IgG jedoch keine Korrelation des PVR und der GPCR-AAk erhalten blieb. Ähnlich waren Korrelationen zwischen dem HMV und den ET_A R-, α_1 AR- und den β_1 AR-AAk nachweisbar, die einer Gesamt-IgG-Normalisierung nicht standhielten.

Abgesehen davon waren keine belastbaren Assoziationen von GPCR-AAk (native oder IgG-normalisierte und log-transformierte Serumspiegel) mit den gemessenen hämodynamischen Parametern der Patienten nachweisbar, wie in Tabelle 12 gezeigt.

	HMV	CI	LVEF	PCWP	PVR	TPR
A						
C5a-R-AAk	0,074	0,066	-0,025	0,039	-0,257*	-0,120
AT_1 R-AAk	0,150	0,090	-0,155	-0,004	-0,281*	-0,083
AT_2 R-AAk	-0,028	-0,035	-0,095	0,093	-0,178	0,025
M_5 R-AAk	0,140	0,167	-0,040	0,016	-0,209	-0,088
ET_A R-AAk	0,256*	0,201	-0,087	-0,024	-0,294*	-0,134
ET_B R-AAk	0,058	0,062	-0,078	0,116	-0,071	-0,087
α_1 AR-AAk	0,253*	0,169	-0,075	0,048	-0,240*	-0,153
β_1 AR-AAk (memb.)	0,220	0,179	-0,093	-0,001	-0,322	-0,114
β_1 AR-AAk (cyc.)	0,225*	0,170	0,023	-0,046	-0,118	-0,131

ACE-II-AAk	0,136	0,183	0,089	-0,183	-0,117	-0,132
Stabilin-AAk	0,129	0,145	-0,065	-0,061	-0,073	0,026
B						
C5a-R-AAk	-0,071	-0,034	-0,021	0,062	-0,204	0,066
AT ₁ R-AAk	-0,014	0,001	-0,081	0,046	-0,165	0,132
AT ₂ R-AAk	-0,149	-0,099	-0,110	0,133	-0,137	0,216
M ₅ R-AAk	-0,059	0,047	0,034	0,080	-0,114	0,221
ET _A R-AAk	0,035	0,033	-0,019	0,035	-0,179	0,113
ET _B R-AAk	-0,056	-0,023	-0,040	0,137	0,013	0,098
α ₁ AR-AAk	0,112	0,096	-0,020	0,117	-0,146	0,021
β ₁ AR-AAk (memb.)	0,131	0,138	-0,048	0,031	-0,230	0,006
β ₁ AR-AAk (cyc.)	0,026	0,014	0,085	0,001	-0,030	0,197
ACE-II-AAk	0,087	0,132	0,109	-0,116	-0,063	-0,027
Stabilin-AAk	0,099	0,096	-0,002	0,115	0,004	-0,064

Tabelle 12: Korrelationen hämodynamischer Parameter und GPCR-AAk. n = 54 – 86.

Angaben in Spearman r. *p≤0,05. A: Nicht-transformierte Daten; B: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. HMV Herzminutenvolumen; CI Herzindex; LVEF Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; PCWP Lungenkapillaren-Verschchlussdruck; PVR Pulmonalvaskulärer Widerstand; TPR Totaler peripherer Widerstand.

3.4 GPCR-AAk und kardiale Funktionalität

Die Serumspiegel der GPCR-Autoantikörper in der Gruppe der HI-Patienten wurden mit dem myokardialen T2-*Mapping*, das myokardiale Ödeme und Entzündungen widerspiegelt, sowie mit dem myokardialen T1-*Mapping* verglichen, das als Marker für Gewebsfibrose sowie Lipid- und Eisenanreicherung verwendet wird. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Die globalen linksventrikulären T1-Relaxationszeiten korrelierten signifikant mit den Serumspiegeln von M₅R- und β₁AR-AAk. Die inverse Korrelation der T1-*Mapping*-Daten mit β₁AR-AAk zeigte sich auch nach der Normalisierung auf das Gesamt-IgG, wohingegen die Korrelation mit den M₅R-AAk nach der Normalisierung auf das Gesamt-IgG verschwand. Zwischen den verschiedenen GPCR-AAk und den T2-*Mapping*-Daten der Patienten konnten keine Korrelationen beobachtet werden. MRT-basierte Analysen der linksventrikulären Dehnung zeigten eine schwache Assoziation zwischen erhöhten β₁AR-AAk sowie ACE-II-AAk und einer beeinträchtigten systolischen GLS als Marker der Myokarddeformation. Diese

Assoziationen waren vor sowie nach der Normalisierung auf das Gesamt-IgG stabil. Im Gegensatz dazu stand die diastolische Dehnungsrate in keinem Zusammenhang mit zirkulierenden AAK.

	T1	T2	peak GLS	diastolic SR
A				
C5a-R-AAk	0,020	-0,094	-0,149	0,092
AT ₁ R-AAk	-0,045	-0,044	-0,102	-0,007
AT ₂ R-AAk	0,079	-0,182	-0,048	0,069
M ₅ R-AAk	0,345*	0,024	-0,080	-0,039
ET _A R-AAk	-0,042	-0,165	0,010	0,154
ET _B R-AAk	0,142	-0,166	-0,137	0,102
α ₁ AR-AAk	0,045	0,058	-0,199	-0,067
β ₁ AR-AAk (memb.)	0,074	-0,109	-0,058	0,190
β ₁ AR-AAk (cyc.)	0,118	0,035	-0,363*	0,183
ACE-II-AAk	-0,124	0,042	-0,466*	0,059
Stabilin-AAk	0,197	0,057	-0,133	-0,656
B				
C5a-R-AAk	-0,200	-0,159	-0,117	0,021
AT ₁ R-AAk	-0,311	0,012	0,000	-0,183
AT ₂ R-AAk	-0,159	-0,227	-0,009	-0,069
M ₅ R-AAk	-0,132	-0,015	-0,086	-0,042
ET _A R-AAk	-0,284	-0,155	0,055	-0,153
ET _B R-AAk	-0,053	-0,179	-0,059	-0,011
α ₁ AR-AAk	-0,278	0,065	-0,156	-0,059
β ₁ AR-AAk (memb.)	-0,234	-0,061	-0,012	-0,200
β ₁ AR-AAk (cyc.)	-0,362*	-0,005	-0,323*	0,029
ACE-II-AAk	-0,247	0,194	-0,355*	0,019
Stabilin-AAk	0,042	0,033	-0,081	-0,025

Tabelle 13: Korrelationen im CMR erhobener Parameter mit GPCR-AAk. n = 37 – 43. Angaben in Spearman r. *p≤0,05. A: Nicht-transformierte Daten; B: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. peak GLS *left ventricular global peak systolic longitudinal strain*; Diastolic SR *diastolic strain rate*

Beim Vergleich der kardialen Volumina und Funktion ließen sich Zusammenhänge zwischen dem rechts- und linksventrikulären Schlagvolumen sowie dem rechtsventrikulären enddiastolischen Durchmesser mit den gemessenen AAK finden (Tabelle 14). Das linksventrikuläre Schlagvolumen korrelierte signifikant mit β₁AR-AAk, das rechtsventrikuläre Schlagvolumen dagegen invers mit ACE-II-AAk. Diese Assoziationen zeigten nach einer Normalisierung auf das Gesamt-IgG jedoch keine Beständigkeit. Erst nach der Normalisierung zeigten sich der

Zusammenhang des rechtsventrikulären enddiastolischen Volumens mit Autoantikörpern gegen den α_1 AR sowie gegen Stabilin.

	LV SV	RV SV	RVEDD	LV SV	RV SV	RVEDD
	A			B		
C5a-R-AAk	0,086	-0,049	-0,165	-0,071	-0,020	-0,121
AT ₁ R-AAk	0,149	-0,103	0,210	-0,013	-0,182	0,273
AT ₂ R-AAk	-0,011	0,009	-0,046	-0,121	-0,046	-0,044
M ₅ R-AAk	0,140	0,030	0,085	-0,030	-0,056	0,151
ET _A R-AAk	0,236	-0,146	0,115	0,045	-0,210	0,169
ET _B R-AAk	0,047	-0,100	-0,049	-0,084	-0,057	0,071
α_1 AR-AAk	0,283	0,093	0,228	0,164	-0,095	0,303*
β_1 AR-AAk (memb.)	0,308*	0,097	0,111	0,167	-0,016	0,226
β_1 AR-AAk (cyc.)	0,179	0,064	0,231	-0,018	-0,105	0,239
ACE-II-AAk	0,171	-0,395*	-0,066	0,034	-0,200	0,042
Stabilin-AAk	0,138	0,105	0,247	0,078	0,106	0,332*

Tabelle 14: Korrelationen kardialer Volumina und GPCR-AAk. n = 25 – 45. Angaben in Spearman r. *p \leq 0,05. A: Nicht-transformierte Daten; B: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. LV SV linksventrikuläres Schlagvolumen; RV SV rechtsventrikuläres Schlagvolumen; RVEDD rechtsventrikulärer enddiastolischer Durchmesser.

3.5 GPCR-AAk und Metabolismus

Innerhalb der HI-Gruppe waren 26 Teilnehmer glukosetolerant, 47 Teilnehmer hatten einen Prädiabetes und 22 Teilnehmer hatten einen manifesten Typ-2-Diabetes. Gemäß der aktuell gültigen Leitlinie der *American Diabetes Association* [105] wurden Probanden als normoglykämisch eingeordnet, wenn ihr HbA1c <5,7 % und Nüchternblutzucker \leq 100 mg/dl oder ihr 2h-oGTT-Wert \leq 140 mg/dl lag. Diabetisch waren die Probanden bei einem HbA1c \geq 6,5 % und einem Nüchternblutzucker >126 mg/dl oder einem 2h-oGTT-Wert von \geq 200 mg/dl. Alle Teilnehmer, die zwischen diesen Werten lagen, wurden als prädiabetisch eingeordnet.

Unter den HI-assoziierten GPCR-AAk wiesen C5a-R-, AT₂R- und β_1 AR-AAk, wie in Tabelle 15 gezeigt, Assoziationen mit Markern des Glukosestoffwechsels auf. Die C5a-R- und AT₂R-AAk standen in inverser Beziehung zur Insulinresistenz, die

nach dem Homöostasemodell (HOMA-IR) ermittelt wurde. Der HOMA-Index wird wie folgt berechnet [106]:

$$\text{HOMA-Index} = (\text{Nüchterninsulin } [\mu\text{u/ml}] * \text{Nüchternblutzucker } [\text{mg/dl}]) / 405$$

bzw.

$$\text{HOMA-Index} = (\text{Nüchterninsulin } [\mu\text{u/ml}] * \text{Nüchternblutzucker } [\text{mmol/l}]) / 22,5$$

Ein HOMA-Index <2 macht eine vorliegende periphere Insulinresistenz (IR) unwahrscheinlich, ein Wert von 2 – 2,5 kann als Hinweis auf eine IR gewertet werden. Werte von 2,5 – 5 machen eine IR wahrscheinlich, bei Werten >5 ist eine IR vorhanden.

Diese Zusammenhänge waren insofern robust, als dass sie nach der Normalisierung auf das Gesamt-IgG fortbestanden. Nach der Normalisierung zeigte sich hinzukommend eine inverse Korrelation der β_1 AR-AAk mit dem Insulinspiegel.

	BZ	Insulin	HOMA-IR	HbA1c	C-Peptid
A					
C5a-R-AAk	-0,131	-0.164	-0.236*	-0.008	-0.146
AT ₁ R-AAk	-0.060	-0.136	-0.169	-0.029	-0.136
AT ₂ R-AAk	-0.098	-0.163	-0.228*	0.066	-0.137
M ₅ R-AAk	-0.072	-0.112	-0.175	-0.025	-0.142
ET _A R-AAk	-0.046	-0.063	-0.104	0.052	-0.139
ET _B R-AAk	-0.041	-0.032	-0.080	0.029	-0.043
α_1 AR-AAk	-0.013	-0.078	-0.081	-0.041	-0.073
β_1 AR-AAk (memb.)	-0.090	-0.158	-0.189	-0.031	-0.202
β_1 AR-AAk (cyc.)	0.058	-0.071	-0.077	0.024	-0.029
ACE-II-AAk	-0.077	-0.110	-0.120	-0.055	-0.124
Stabilin-AAk	0.040	-0.004	-0.009	0.029	0,039
B					
C5a-R-AAk	-0.093	-0.177	-0.233*	0.040	-0.109
AT ₁ R-AAk	0.018	-0.198	-0.174	0.021	-0.084
AT ₂ R-AAk	-0.081	-0.180	-0.240*	0.090	-0.106
M ₅ R-AAk	-0.010	-0.147	-0.187	0.063	-0.070
ET _A R-AAk	0.039	-0.107	-0.079	0.073	-0.036
ET _B R-AAk	0.022	-0.040	-0.047	0.068	-0.014
α_1 AR-AAk	0.072	-0.147	-0.094	0.014	-0.032
β_1 AR-AAk (memb.)	-0.019	-0,219*	-0.199	-0.002	-0.132
β_1 AR-AAk (cyc.)	0.113	-0.084	-0.044	0.105	0.068
ACE-II-AAk	-0.045	-0.206	-0.173	-0.025	-0.115
Stabilin-AAk	0.085	-0.003	0.021	0.039	0.083

Tabelle 15: Assoziation der GPCR-AAk und Markern des Glukosestoffwechsels. n = 95 – 88. Angaben in Spearman r. *p≤0,05. A: Nicht-transformierte Daten; B: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. BZ Nüchternblutzucker; HOMA-IR *Homoeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; HbA1c Glykiertes Hämoglobin; C-Peptid *connecting*-Peptid.

Darüber hinaus konnten wir Zusammenhänge zwischen C5aR-, AT₁R-, AT₂R- sowie ET_BR-AAk mit mehreren Markern des Lipidstoffwechsels nachweisen, wie in Tabelle 16 gezeigt. Die genannten AAK standen in einem inversen Verhältnis zu den Serumspiegeln von Triacylglycerin, Cholesterin und LDL. Zu den zirkulierenden freien Fettsäuren zeigte sich ein positiv gerichtetes Verhältnis mit AAK gegen den C5a-R sowie den AT₁R. Diese Zusammenhänge waren insofern robust, als dass sie auch nach der Normalisierung auf das Gesamt-IgG nachzuweisen waren.

	TAG	Cholesterin	LDL	HDL	FFS
A					
C5a-R-AAk	-0,191	-0,248*	-0,254*	0,014	0,278*
AT ₁ R-AAk	-0,099	-0,218*	-0,243*	-0,058	0,263*
AT ₂ R-AAk	-0,171	-0,223*	-0,229*	0,056	0,122
M ₅ R-AAk	0,113	-0,080	-0,172	0,024	-0,036
ET _A R-AAk	-0,032	-0,096	-0,083	-0,071	0,169
ET _B R-AAk	0,010	-0,175	-0,224*	-0,141	0,014
α ₁ AR-AAk	0,109	-0,063	-0,123	-0,075	0,105
β ₁ AR-AAk (memb.)	-0,003	-0,074	-0,120	-0,032	0,068
β ₁ AR-AAk (cyc.)	0,145	-0,073	-0,164	-0,052	0,119
ACE-II-AAk	0,054	0,077	0,024	0,106	0,055
Stabilin-AAk	0,176	0,003	-0,074	-0,116	-0,019
B					
C5a-R-AAk	-0,295*	-0,318*	-0,310*	0,015	0,295*
AT ₁ R-AAk	-0,123	-0,187	-0,185	-0,023	0,211*
AT ₂ R-AAk	-0,242*	-0,299*	-0,298*	0,029	0,158
M ₅ R-AAk	0,019	-0,105	-0,171	0,029	-0,006
ET _A R-AAk	-0,087	-0,122	-0,092	-0,058	0,119
ET _B R-AAk	-0,076	-0,187	-0,224*	-0,109	0,035
α ₁ AR-AAk	0,058	-0,076	-0,108	-0,063	0,084
β ₁ AR-AAk (memb.)	-0,040	-0,051	-0,079	-0,013	0,066
β ₁ AR-AAk (cyc.)	0,019	-0,137	-0,183	-0,079	0,177
ACE-II-AAk	0,094	0,136	0,105	0,149	0,019
Stabilin-AAk	0,123	0,015	-0,058	-0,104	-0,020

Tabelle 16: Zusammenhang der GPCR-AAk mit Markern des Lipidstoffwechsels. n = 95 – 88. Angaben in Spearman r. *p≤0,05. A: Nicht-transformierte Daten; B: IgG-normalisierte und log-

transformierte Daten. TAG Triacylglycerin; LDL *Low Density Lipoprotein*; HDL *High Density Lipoprotein*; FFS Freie Fettsäuren.

3.6 GPCR-AAk und myokardiale Mitochondrienfunktion

Um mögliche Zusammenhänge zwischen einer GPCR-Autoimmunität und der Funktion myokardialer Mitochondrien zu untersuchen, wurden die Serumspiegel HI-assoziiierter GPCR-AAk mit den Daten aus der Respirometrie verglichen, die in entsprechenden Myokardproben durchgeführt wurde. Hierbei gelang es nicht, einen direkten Zusammenhang zwischen der GPCR-Autoimmunität und der OXPHOS oder der ETS Kapazität zu finden.

Die LCR jedoch stand in inverser Beziehung zu den IgG-normalisierten AAK gegen den C5a-R, AT₂R, M₅R, ET_BR, β_1 AR und Stabilin. Ohne IgG-Normalisierung verschwanden die Assoziationen mit M₅R- und β_1 AR-AAk, wohingegen die Assoziation mit AT₂R-AAk stabil blieb (Tabellen 17 und 18).

	Oct	ADP	Glu	Suc	Cyt	Omy
A						
C5a-R-AAk	0,100	0,108	0,089	0,093	0,049	-0,027
AT ₁ R-AAk	0,036	-0,001	-0,029	-0,003	-0,029	-0,027
AT ₂ R-AAk	-0,097	-0,041	-0,035	-0,003	-0,003	-0,068
M ₅ R-AAk	-0,075	-0,010	0,021	0,080	0,058	0,017
ET _A R-AAk	0,009	0,012	-0,018	-0,004	-0,024	0,028
ET _B R-AAk	-0,069	0,001	0,015	0,066	0,039	-0,036
α_1 AR-AAk	0,046	0,026	-0,002	0,050	0,011	0,040
β_1 AR-AAk (memb.)	0,010	0,023	-0,036	0,014	-0,012	-0,044
β_1 AR-AAk (cyc.)	0,037	0,050	0,034	0,070	0,043	0,044
ACE-II-AAk	0,054	0,094	0,122	0,183	0,176	0,199
Stabilin-AAk	-0,096	-0,093	-0,052	0,013	-0,002	-0,023
B						
C5a-R-AAk	0,043	0,067	0,048	0,002	-0,022	-0,116
AT ₁ R-AAk	-0,041	-0,064	-0,086	-0,092	-0,092	-0,095
AT ₂ R-AAk	-0,096	-0,077	-0,064	-0,067	-0,058	-0,163
M ₅ R-AAk	-0,060	-0,024	0,005	-0,026	-0,025	-0,117
ET _A R-AAk	-0,038	-0,016	-0,028	-0,060	-0,059	-0,070
ET _B R-AAk	-0,133	-0,024	-0,030	-0,048	-0,062	-0,180
α_1 AR-AAk	-0,014	-0,019	-0,041	-0,039	-0,055	-0,055
β_1 AR-AAk (memb.)	-0,007	0,006	-0,042	-0,046	-0,057	-0,101

β_1 AR-AAk (cyc.)	0,028	0,056	0,030	-0,030	-0,036	-0,102
ACE-II-AAk	0,004	0,072	0,102	0,139	0,140	0,144
Stabilin-AAk	-0,124	-0,075	-0,032	-0,019	-0,023	-0,121
	FCCP	Rot	Ama	LCR	RCR S	RCR A
A						
C5a-R-AAk	0,095	0,188	-0,082	-0,145	0,172	0,208
AT ₁ R-AAk	0,034	0,123	0,039	-0,116	0,031	0,050
AT ₂ R-AAk	0,139	0,186	-0,065	-0,280*	0,061	0,002
M ₅ R-AAk	0,079	0,234	0,044	-0,163	0,086	-0,044
ET _A R-AAk	0,082	0,081	0,018	-0,137	-0,019	-0,002
ET _B R-AAk	0,121	0,207	-0,054	-0,201	0,116	0,045
α_1 AR-AAk	-0,006	0,147	0,091	-0,045	0,031	-0,004
β_1 AR-AAk (memb.)	-0,007	0,136	0,126	-0,083	0,046	0,038
β_1 AR-AAk (cyc.)	0,076	0,370*	0,107	-0,091	0,052	0,029
ACE-II-AAk	0,186	0,164	0,090	-0,005	0,059	-0,138
Stabilin-AAk	0,008	0,083	0,002	-0,117	0,022	-0,097
B						
C5a-R-AAk	0,134	0,049	-0,043	-0,271*	0,177	0,263*
AT ₁ R-AAk	0,022	-0,063	0,187	-0,121	-0,021	0,029
AT ₂ R-AAk	0,133	-0,030	-0,011	-0,352*	0,105	0,059
M ₅ R-AAk	0,124	0,024	0,175	-0,338*	0,095	0,067
ET _A R-AAk	0,105	-0,097	0,156	-0,228	0,011	0,057
ET _B R-AAk	0,134	0,108	0,029	-0,371*	0,109	0,165
α_1 AR-AAk	0,012	0,005	0,238	-0,100	-0,007	0,033
β_1 AR-AAk (memb.)	0,027	0,052	0,232	-0,139	0,014	0,071
β_1 AR-AAk (cyc.)	0,098	0,171	0,208	-0,249*	0,075	0,174
ACE-II-AAk	0,239	0,101	0,109	-0,082	0,041	-0,117
Stabilin-AAk	0,034	0,050	0,045	-0,249*	0,071	0,011

Tabellen 17 und 18: Zusammenhang der GPCR-AAk mit Markern der mitochondrialen Funktion. Angaben in Spearman r. * $p \leq 0,05$. A: Nicht-transformierte Daten; B: IgG-normalisierte und log-transformierte Daten. Oct Octanoyl-Carnitin; ADP Adenosindiphosphat; Glu Glutamat; Suc Succinat; Cyt Cytochrom C; Omy Oligomycin; FCCP Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon; Rot Rotenon; Ama Antimycin A; LCR *Leak Control Ratio*; RCR S *Respiratory Control Ratio Succinat*; RCR A *Respiratory Control Ratio ADP*.

4 Diskussion

In dieser Arbeit erfolgte eine ausführliche Bewertung einer Gruppe von GPCR-AAk, bei denen derzeit von einer kardiopathogenen Wirkung ausgegangen wird [107]. Anhand der in Abschnitt 1.4 formulierten Fragestellungen und der in dieser Arbeit erhobenen Daten konnten folgende Kernaussagen getroffen werden:

1. Patienten mit einer HI unterscheiden sich von herzgesunden Patienten in den Serumspiegeln der AAK gegen AT₁R, AT₂R, M₅R, α₁AR, β₁AR und ET_BR.
2. Bei Patienten mit nicht-ischämischer HI stehen Veränderungen dieser AAK in keinem Zusammenhang mit der zugrundeliegenden histologischen Unterteilung, kardialen Hämodynamik, ungünstigen prognostischen Parametern oder kardialen Struktureigenschaften.
3. Bei Patienten mit nicht-ischämischer HI stehen AT₂R- und C5aR-AAk in umgekehrter Beziehung zur systemischen Insulinresistenz (HOMA-IR) und zur myokardialen mitochondrialen Entkopplung. M₅R-AAk stehen ebenfalls im Zusammenhang mit der myokardialen mitochondrialen Entkopplung, nicht aber mit der Insulinresistenz.

4.1 HI-assoziierte Erhöhung von GPCR-AAk

4.1.1 β₁AR-AAk

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei herzinsuffizienten Patienten nicht-ischämischer Genese β₁AR-AAk in erhöhtem Maße gegenüber herzgesunden Kontrollen vorliegen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Vielzahl an veröffentlichten Daten, die auf eine spezifische Assoziation dieser AAK-Spezies mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen hinweisen, allen voran mit der idiopathischen DCM [107]. Die Prävalenz von β₁AR-AAk liegt hier je nach verwendeter Nachweismethode zwischen 30 – 80 %. Darüber hinaus sind β₁AR-AAk auch mit peripartaler CM, Myokarditis, Chagas-CM, ventrikulärer Tachykardie

sowie Arrhythmien assoziiert [55]. Wurde früher die Stimulation der β_1 -adrenergen Signalübertragung [56, 119, 120] sowie eine nachfolgende Desensibilisierung und Runterregulation des β_1 AR als hauptsächliche Auswirkung der β_1 AR-AAk vermutet, werden mittlerweile weitere mögliche Pathomechanismen diskutiert [121, 122]. Eine Kreuzreaktivität in Verbindung mit anderen adrenergen und muskarinergen Rezeptor-AAk [123-125], direkte Kardiomyozytentoxizität durch Veränderungen der kardialen L-Typ-Kalziumkanälen sowie durch β_1 AR-AAk ausgelöste Apoptose [122, 126, 127] [51, 128], eine Homodimerisierung von β_1 AR mit Beeinträchtigung der kardialen Signalwege und Kontraktilität sowie eine Einflussnahme der β_1 AR-AAk auf kardiale Fibroblasten [121] sind Gegenstand aktueller Forschung und zeichnen ein facettenreiches Bild der Auswirkungen von β_1 AR-AAk. Wenngleich die vorliegende Arbeit nur das Vorliegen von aktivierenden, gegen die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors gerichtete β_1 AR-AAk nachweisen konnte, reihen sich die Ergebnisse in eine lange Reihe beobachteter Veränderungen der GPCR-Autoimmunität bei HI.

4.1.2 AT₂R-AAk

Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete erhöhte Spiegel von AT₂R-AAk in der HI-Gruppe muss im Hinblick auf seine mögliche Relevanz für die nicht-ischämische HI bewertet werden. Unseres Wissens wurde bisher keine vergleichbare humorale Veränderung der AT₂R-AAk im Menschen beobachtet. Die Rolle des AT₂R selbst bei HI wurde in jüngster Zeit eingehend untersucht, dabei wird der AT₂R zunehmend als integrativer Bestandteil des schützenden Arms des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) anerkannt. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass eine AT₂R-Aktivierung bei HI eine schützende Rolle spielt und darüber hinaus an der Regeneration des Herzens beteiligt ist [129, 130]. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine AT₂R-Aktivierung zu einer signifikant verringerten Narbenbildung in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt sowie zu einer Verringerung der linksventrikulären Dilatation und Dysfunktion führt [131]. Ebenso hatte eine Überexpression des AT₂R bei genetisch modifizierten Mäusen schützende Auswirkungen auf das *Remodelling* des linken Ventrikels und die Herzleistung in der Spätphase nach einem Myokardinfarkt [132, 133]. Diese

Wirkungen könnten durch die positiven zellulären Mechanismen der AT₂R-Aktivierung erklärt werden, so zum Beispiel Entzündungshemmung, Anti-Apoptose, Aktivierung des Bradykinin/NO/cGMP-Systems sowie eine Förderung des Geweberegenerationsprozesses und Verhinderung des Abbaus der extrazellulären Matrix in der postinfarktionalen Phase [131, 134]. Inwieweit diese Wirkungen auf die nicht-ischämische HI übertragbar sind bedarf weiterer Abklärungen, jedoch ist ein protektiver Effekt im Sinne einer Hochregulierung des AT₂R bei HI denkbar, da aktuelle pathogenetische Konzepte eine regulatorische Rolle der GPCR-AAk bekräftigen [113]. Voraussetzung hierfür wäre, dass die gemessenen AAK eine stimulierende Wirkung auf den AT₂R ausüben, was noch nachgewiesen werden muss.

4.1.3 M₅R-AAk

Der in dieser Arbeit beobachteten, erhöhten Serumspiegel der M₅R-AAk erinnert an eine ähnliche Beobachtung, die vor kurzem bei einer Gruppe von Probanden fortgeschrittenen Alters beobachtet wurde, die sich einer invasiven Parodontaltherapie unterzogen. Hier zeigten sich ebenfalls erhöhte Spiegel an M₅R-AAk gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe, die M₅R-AAk korrelierten dabei mit der Intensität und dem zeitlichen Verlauf der Parodontaltherapie, nicht aber mit ebenfalls erhobenen kardialen Markern [135]. Die Autoren dieser Studie konzentrierten sich dabei auf den M₅-Subtyp, da dieser eine starke Assoziation mit einer Verschlechterung der Herzfunktion in einer Kohorte von Patienten nach Myokarditis aufwies [136]. Die muskarinergen Rezeptoren und korrespondierende AAK sind in einer Reihe von Erkrankungen vertreten. AAK gegen den M₂-Subtyp sind dabei mit verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert [125, 137-141], AAK gegen den M₃-Subtyp spielen eine Rolle bei der Entstehung des Sjögren-Syndroms [142]. AAK gegen die M₃- und M₄-Subtypen sind an der Pathogenese des chronische Erschöpfungssyndrom (eng. *chronic fatigue syndrome*) beteiligt [143, 144]. AAK gegen den M₅R wurden bisher nur im Zusammenhang mit dem posturalen orthostatischen Tachykardiesyndrom (POTS) beschrieben. Die im Zusammenhang mit dem POTS von Gunning et al. untersuchten Patientinnen wiesen interessanterweise auch eine erhöhte Anzahl von AAK gegen andere Subtypen der

muskarinergen Rezeptoren sowie verschiedenen adrenergen Rezeptoren auf [145]. Die aktuell noch nicht abschließend veröffentlichte *Etiology, Titer-Course and effect on Survival of cardiac autoantibodies-study* (ETiCS-Studie), die eine prospektive Kohortenstudie zum Titerverlauf kardialer AAK und deren Auswirkung auf das Patientenüberleben ist, umfasst eine Analyse der AAK gegen alle MR-Subtypen [136]. Sollten die Autoren ein ähnliches Verhalten der M₅R-AAk beobachten, ließe sich hieraus womöglich eine bisher unbeschriebene Präsentation von M₅R-AAk bei HI ableiten.

4.2 HI-assoziierte Verminderung von GPCR-AAk

4.2.1 AT₁R-AAk

Bei herzinsuffizienten Patienten nicht-ischämischer Genese bestanden niedrigere Serumlevel von AT₁R-AAk gegenüber herzgesunden Kontrollen. AT₁R-AAk wurden in diese Arbeit mit aufgenommen, da bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte, dass sie bei Krankheitsbildern wie der malignen Hypertonie, der Präeklampsie sowie bei vaskulären Nierentransplantatabstoßungen maßgeblich beteiligt sind [55]. Wichtig für die in dieser Arbeit gemachten Beobachtung ist die Tatsache, dass AT₁R und AT₂R sich denselben endogenen Liganden, Angiotensin II, teilen und dabei verschiedene und oft gegensätzliche Wirkungen entfalten. Die beschriebene Verminderung an AT₁R-AAk und gleichzeitige Zunahme von AT₂R-AAk spiegeln dabei die bekannten Auswirkungen der entsprechenden Rezeptoraktivierungen auf die kardiovaskuläre Regulierung wider [146] und könnten daher aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Blutdruckregulation für HI relevant sein.

4.2.2 α₁AR-AAk

Gegenüber den herzgesunden Probanden bestanden bei herzinsuffizienten Patienten niedrigere Serumlevel an α₁AR-AAk. Erhöhte Serumlevel an α₁AR-AAk

sind mit einer malignen Hypertonie sowie der pulmonalen Hypertonie assoziiert, ebenso ist ein Zusammenhang mit der Demenz vom Alzheimer-Typ beschrieben [53, 55]. Im Tiermodell führte die Immunisierung von Ratten mit α_1 AR-AAk-positiven Seren von Alzheimer-Patienten zu einer Schwellung der Endothelzellen von Hirngefäßen und bewirkte so eine Verringerung des cerebralen Blutflusses [147]. In einem anderen Tiermodell entwickelten immunisierte Ratten keine Hypertonie, dafür jedoch eine kardiale Hypertrophie und weitere Anzeichen für kardiales *Remodelling* [148]. *In vitro* konnte anhand neonataler Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die agonistische Wirkung von α_1 AR-AAk eine Erhöhung des intrazellulären Calciums und einen hypertrophen Umbau der Kardiomyozyten bewirkt [149, 150]. Die Autoren der Studie argumentieren, dass eine α_1 AR-Immunisierung eine mögliche Ursache für hypertensive Blutdruckwerte darstellen könnte. Die in dieser Arbeit beobachteten niedrigeren Serumlevel von α_1 AR-AAk könnten im Sinne einer Gegenregulation bei einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz gedeutet werden, wobei aufgrund des Querschnittsaufbaus der Studie keine abschließenden Aussagen zu zeitlichen Verläufen der Serumlevel gemacht werden können.

4.2.3 ET_BR-AAk

Erhöhte Serumlevel des Vasokonstriktors Endothelin sind mit einer Vorhofsdilatation, einer kardialen Fibrose und der HI assoziiert [151]. Seine vaskulären Wirkungen werden durch die Endothelin-Rezeptoren Typ A (ET_AR) und Typ B (ET_BR) vermittelt [152, 153]. ET_BR spielen möglicherweise eine Rolle bei Erkrankungen, die mit Gefäßentzündungen und Atherosklerose einhergehen. Kompetitive Bindungsstudien *in vitro* zeigten, dass ET_BR in den Koronararterien von Patienten mit Atherosklerose hochreguliert sind [154]. Unter physiologischen Bedingungen stehen die gefäßerweiternden Wirkungen des endothelialen ET_BR den gefäßverengenden und mitogenen Wirkungen von ET_AR in den glatten Muskelzellen der Gefäße gegenüber, wodurch ein Gleichgewicht zwischen ET_AR- und ET_BR-vermittelten Wirkungen im Kreislauf entsteht. Unter pathologischen Bedingungen könnte es zu einer Herunterregulierung von endothelialetem ET_BR und

seiner gefäßerweiternden Wirkung kommen. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen passen zu den Erkenntnissen aus Studien mit transgenen ET_BR-Tieren und *Knockout*-Mäusen sowie einigen klinischen Studien, die Einblicke in die gefäßschützende Rolle von ET_BR gegeben und darauf hinweisen, dass eine Dysregulation von ET_BR mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der Hypertonie, KHK, zerebraler Ischämie und Atherosklerose in Verbindung gebracht werden könnte [155].

4.3 GPCR-AAk ohne HI-assoziierte Veränderungen

4.3.1 ET_AR-AAk

Den Endothelin-Rezeptor Typ A (ET_AR) aktivierende ET_AR-AAk ließen sich im Plasma von Patienten mit einer pulmonalen Hypertonie nachweisen [156, 157]. Für eine pathogenetische Rolle der ET_AR-AAk spricht, dass ihre Entfernung mittels Immunaphrese zu einer Verbesserung der klinischen Symptome führte sowie eine Regredienz der Vorhofs- und Ventrikeldilatation verursachte [156]. Ähnlich wie bei den β₁AR-AAk scheint die zweite extrazelluläre Schleife des ET_AR das primäre Ziel der ET_AR-AAk zu sein [158]. Die Effekte der ET_AR-AAk auf das Herz sind trotz der Expression von ET_AR auf menschlichen Kardiomyozyten weiterhin nicht vollständig geklärt, eine protektive Rolle bei der HI aber auch ein Beitrag zur Pathogenese der HI sind denkbar [159]. Unter experimentellen Bedingungen zeigten Endotheline direkte positiv inotrope und positiv chronotrope Wirkungen auf das Herz, auch ein tonischer, durch den ET_AR vermittelter Beitrag zur Ventrikelkontraktilität wurde beobachtet [160]. In Anbetracht der nicht abschließend geklärten Auswirkungen von ET_AR-AAk ließen sich in dieser Arbeit keine HI-assoziierten erhöhten oder erniedrigten Serumlevel an ET_AR-AAk beobachten.

4.3.2 ACE-II-AAk

Angiotensin II wird vom ACE 2, einem Homolog des ACE, in Angiotensin (1-7) umgewandelt, welches vasoprotektive Effekte aufweist. ACE-II-AAk stehen unter Verdacht, das Gleichgewicht zwischen dem stark vasokonstriktorischem Angiotensin II und Angiotensin (1-7) zu stören und so für verschiedene Vaskulopathien zu prädisponieren. Erhöhte Werte an ACE-II-AAk wurden bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie und bei Patienten mit systemischer Sklerose nachgewiesen [161, 162]. Chappell et al. propagierten erhöhte Spiegel an ACE-II-AAk als Kompensationsmechanismus der das Gleichgewicht des Renin-Angiotensin-Systems zugunsten von Angiotensin (1-7) verändert, antifibrotische und entzündungshemmende Wirkungen ausübt und die vasokonstriktiven Wirkungen von Angiotensin II abschwächt [163]. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen ACE-II-AAk und endothelialer Dysfunktion bei Patienten mit COVID-19 gezeigt werden [164], dezidierte Wirkungen im Bereich der Herzinsuffizienz sind jedoch bisher nicht beschrieben. Wir sahen keine messbaren Differenzen in den Serumspiegeln der ACE-II-AAk bei den HI-Patienten sowie der Kontrollkohorte.

4.3.3 C5aR-AAk

Der C5a-Rezeptor des gleichnamigen Komplementfaktors C5 ist für seine Rolle als beidseitiger Schalter des Komplementsystems bekannt, in der er situativ pro- oder antiinflammatorisch wirken kann [165]. Dieser GPCR-AAk wurde mit in unsere Studie einbezogen, da Hinweise vorliegen, dass eine C5aR-vermittelte Abschwächung der Wirkung von β_1 AR im Herzen besteht [166]. Nicht bekannt ist bisher, ob es sich um einen direkten oder indirekten Zusammenhang handelt, ebenso konnte in dieser Arbeit keine HI-assoziierte Erhöhung oder Verminderung an C5aR-AAk gesehen werden.

4.3.4 Stabilin-AAk

Stabilin-1 ist ein bewährter Marker für aktivierte Makrophagen, von dem eine immunsuppressive Rolle angenommen wird, die die Schädigung des Myokards während einer Myokarditis begrenzt [167-169]. Die Bestimmung der Stabilin-AAk erfolgte, da von Lund et al. gezeigt werden konnte, dass Ak gegen Stabilin-1 bei Patienten mit erhöhtem CRP mit einer höheren NYHA-Klasse und bei Patienten mit hohen Leveln an TpT mit einem niedrigeren linksventrikulären enddiastolischen Druck assoziiert waren. Die Autoren der Studie interpretieren ihre Ergebnisse so, dass es sich bei Stabilin-1-Ak um physiologische Ak handelt, die mit homöostatischen Funktionen zusammenhängen [170]. Zwischen den herzgesunden Probanden und der HI-Gruppe war keine Veränderung der Serumlevel an Stabilin-AAk feststellbar, ebenso lag keine Assoziationen mit den oben genannten Biomarkern homöostatischer Funktionen vor.

4.4 GPCR-AAk, Krankheitsaktivität und Myokardschäden

Es wurde ein umfangreiches Screening nach Korrelationen zwischen HI-assoziierten Veränderungen von GPCR-AAk und klinischen sowie experimentellen Parametern von Krankheitsaktivität, Prognose und Myokardschäden durchgeführt. Jedoch war kein Zusammenhang mit den bestimmten Markern oder hämodynamischen Parametern, die für eine beeinträchtigte systolische Funktion sprechen würden, festzustellen. Auch ließ sich kein Zusammenhang mit Myokardödemen sowie kardialen Entzündungsprozessen, von uns beurteilt durch *T-2 Mapping* [171], erkennen. Ebenso waren keine Assoziationen der GPCR-AAk mit histologischen Nachweisen oder Serummarkern für Myokardschäden erkennbar.

Diese Negativbefunde stehen im Widerspruch zu einigen vorangegangenen Studien, was auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein könnte. Zum einen basieren die meisten anderen Studien auf einer quantitativen Bestimmung

zirkulierender GPCR-AAk durch IgG-Bindung an sogenannte lineare Peptide. Diese Messungen reflektieren jedoch nicht unbedingt die Auswirkungen der Antikörperbindung auf die Rezeptorfunktion [116, 118, 172, 173]. Andere Studien wiederum stützen sich ausschließlich auf Funktionsmessungen, die nur in geringem Maße mit den zirkulierenden Antikörperspiegeln in Verbindung stehen [117, 174]. In dieser Arbeit verwendeten wir daher eine Methode, die beide Ansätze kombiniert, indem sie die IgG-Bindung an den nativen Rezeptor oder an ein zirkuläres Peptid misst, welches das mit der aktiven Rezeptorkonformation verbundene Autoepitop exakt widerspiegelt [175, 176]. Eine genauere Diskussion der von uns verwendeten Assays findet sich in 4.7.1.

Eine weitere Ursache für die Diskrepanz dieser Arbeit zu anderen Studien könnte in einer abweichenden Repräsentation von Rezeptor-Polymorphismen innerhalb der Studienpopulation liegen. Für β_1 AR beispielsweise wurde bereits nachgewiesen, dass bestimmte Polymorphismen einen signifikanten Einfluss auf die Ligandenbindung sowie die funktionellen Auswirkungen von GPCR-AAk haben [177]. Darüber hinaus erfolgte unseres Wissens in keiner der bisherigen Studien eine Normierung der gemessenen GPCR-AAk auf das Gesamt-IgG. Folglich sind diese Ansätze anfällig für störende Auswirkungen systemischer Entzündungsphänomene auf die Konzentrationen einzelner zirkulierender GPCR-AAk. Solche Effekte wurden bisher bereits bei Parodontitis-Patienten nachgewiesen [135] und konnten auch in dieser Arbeit bei HI-Patienten beobachtet werden. Und schließlich wiesen alle Patienten der HI-Gruppe dieser Studie ein fortgeschrittenes Stadium der HI auf, das eine EMB rechtfertigte. Im Unterschied zu den meisten früheren Studien wurden also nicht alle vorkommenden Phänotypen inklusive früherer Stadien der nicht-ischämischen HI in unsere Studiengruppe aufgenommen.

Die einzigen bedeutsamen Assoziationen zwischen GPCR-AAk und Indikatoren der Krankheitsaktivität der HI, die in dieser Kohorte gefunden wurden, waren eine inverse Korrelation zwischen β_1 AR-AAk und der globalen linksventrikulären T1-Relaxationszeit sowie der linksventrikulären GLS. Diese sind Marker für eine Myokardfibrose, Lipid- und Eisenakkumulation im Myokard beziehungsweise der kardialen Kontraktilität [102]. Beide Korrelationen blieben auch nach der Normierung auf das Gesamt-IgG stabil erhalten. Dass beide

Korrelationen invers gerichtet waren, was eine Zunahme an β_1 AR-AAk verbunden mit einer Abnahme der T1-Relaxationszeit und der GLS bedeutet, steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die im Tiermodell durch Immunisierung gewonnen wurden und darauf hindeuten, dass β_1 AR-AAk eine myokardiale Fibrosierung stimulieren und die kardiale Kontraktilität beeinträchtigen [121, 137, 178, 179]. Es ist durchaus denkbar, dass die humorale β_1 AR-Autoimmunität wieder nachlässt, sobald sich eine Myokardfibrose etabliert hat, was im fortgeschrittenen Krankheitsstadium der HI-Patienten dieser Studie der Fall sein dürfte. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen kompensatorischen Anstieg der β_1 AR-AAk bei Myokarditiden pädiatrischer Patienten [180]. Da in dieser Arbeit nur Aussagen zu Querschnittskorrelationen ohne kausale Zusammenhänge gemacht werden konnten, sind weitere Studien zum zeitlichen Zusammenhang zwischen kardialer Fibrose und Funktionseinschränkung mit humoraler β_1 AR-Autoimmunität erforderlich, um einen möglichen mehrphasischen Zeitverlauf der β_1 AR-AAk zu untersuchen.

4.5 GPCR-AAk und Metabolismus

Die erhobenen Daten zeigten eine inverse Korrelation von AT_2 R- sowie $C5a$ R-AAk zur systemischen Insulinresistenz, während ein Anstieg der zirkulierenden freien Fettsäuren, wie er bei einer Insulinresistenz häufig zu beobachten ist [181], ebenfalls mit erhöhten Titern von $C5a$ R- und AT_1 R-AAk verbunden war. Bereits bekannt ist, dass eine Stimulation des AT_2 R eine protektive Wirkung bei HI und Diabetes-assoziiertes Atherosklerose hat [129, 182]. Darüber hinaus steigert eine AT_2 R-Aktivierung durch Angiotensin II den kapillären Blutfluss und unterstützt den Insulin-vermittelten Glukoseverbrauch. Gegensätzlich dazu führt eine AT_1 R-Aktivierung zu einer reduzierten Verfügbarkeit von NO und einer Vasokonstriktion sowie zu einer gestörten Signalübertragung von Insulin und einer Insulinresistenz [183].

Einerseits könnten die Daten darauf hindeuten, dass niedrige Spiegel von AT_2 R-AAk die Insulinresistenz fördern, die wiederum maßgeblich für die

Entwicklung eines Typ-2-Diabetes ist [184-186]. Andererseits kann eine mögliche Einflussnahme der Insulinresistenz auf die AT₂R-Aktivität und deren kardioprotektive Wirkung über zirkulierende AT₂R-AAk nicht ausgeschlossen werden [187]. Daher ist es naheliegend zu spekulieren, dass der beobachtete Zusammenhang zwischen AT₂R-AAk und Insulinresistenz an der diabetesbedingten Herzerkrankung oder an den schlechteren Ergebnissen von HI-Patienten mit Typ-2-Diabetes beteiligt sein könnte [187-191]. Dennoch kann eine mögliche Beteiligung der AT₂R-AAk an der Insulinresistenz aufgrund der retrospektiv erhobenen Daten nicht von einer reinen Assoziation abgegrenzt werden.

Darüber hinaus konnten Zusammenhänge zwischen C5aR-, AT₁R-, AT₂R- sowie ET_BR-AAk mit mehreren Markern des Lipidstoffwechsels nachgewiesen werden. C5aR-AAk standen in einem inversen Verhältnis zu Cholesterin, LDL sowie freien Fettsäuren. AT₂R-AAk korrelierten ebenfalls invers mit Cholesterin und LDL. Die AT₁R-AAk waren positiv mit den freien Fettsäuren korreliert. Schließlich zeigten ET_BR-AAk eine inverse Korrelation zum LDL. Diese Zusammenhänge waren insofern robust, als dass sie auch nach der Normalisierung auf das Gesamt-IgG nachzuweisen waren.

Roy et al. zeigten, dass C5aR-defiziente Mäuse ernährungsunabhängig einen reduzierten Körperfettanteil, niedrigere Plasmalipide sowie eine geringere Fettspeicherung aufweisen [192]. Eine Verabreichung von C5aR-selektiven Antagonisten führte zu einem Gewichtsverlust und einer Verbesserung der Insulinresistenz und der Fettgewebsentzündung [193]. Die in dieser Arbeit beobachteten Assoziationen sind vereinbar mit der kürzlich identifizierten Rolle von C5a und dem C5aR bei metabolischen Störungen wie Adipositas [194, 195], wengleich die genaue Art der Zusammenhänge sowie die Richtung einer möglichen Kausalität nicht abschließend geklärt bleiben.

Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Fettgewebe mit fortfolgender Steigerung der Expression von AT₂R durch Palmitinsäure, einer freien Fettsäure, sowie durch Pharmaka, verhindert nachweislich eine Dyslipidämie, ernährungsbedingte Adipositas und eine Insulinresistenz [196, 197]. Auch

anderweitig konnte gezeigt werden, dass ein AT_2R -Agonismus für diese positiven Auswirkungen verantwortlich ist, wohingegen eine Aktivierung des AT_1R eher gegenteilige Effekte hat [198]. Diese Erkenntnisse decken sich mit dem in dieser Arbeit beobachteten Zusammenhang von $AT_{1/2}R$ -AAk und Markern des Lipidstoffwechsels.

Wie in 4.2.3 beschrieben spielen $ET_B R$ eine Rolle bei Erkrankungen, die mit Gefäßentzündungen und Atherosklerose einhergehen. Bei der Suche nach Verbindungen zwischen $ET_B R$, dem Endothelin-System und einer beeinträchtigten Gefäßfunktion stellten Kuczmarski et al. eine signifikante inverse Korrelation zwischen $ET_B R$ und LDL-Cholesterin fest, was im Einklang mit den hier erhobenen Daten steht [199]. Man geht von einer athero- bzw. vasoprotektiven Funktion der $ET_B R$ aus, so werden endotheliale $ET_B R$ als Reaktion auf eine LDL-Behandlung hochreguliert und zeigen eine deutliche NO-freisetzende Kapazität [200]. Ebenso bekannt ist die agonistische Wirkung der $ET_B R$ -AAk auf den $ET_B R$, wie von Speck et al. zusammenfassend beschrieben [201].

4.6 GPCR-AAk und myokardiale Mitochondrienfunktion

Es existieren verschiedene Ansätze, den fortschreitenden Funktionsverlust der Kardiomyozyten bei der Entwicklung der HI zu erklären. Dazu gehören unter anderem eine gestörte Kalzium-Signalweiterleitung, oxidativer Stress und eine gestörte Mitochondrienfunktion, die teilweise durch eine eingeschränkte oxidative Kapazität erklärt wird [202, 203]. Im Tiermodell ließ sich belegen, dass insulinresistente Mäuse aufgrund einer ektopen Lipidakkumulation eine myokardiale Steatose und damit einhergehend eine myokardiale Dysfunktion entwickelten. Myokardiale Mitochondrien reagierten auf diese Lipidakkumulation, indem sie ihre Respiration verstärkten, was eine vermehrte Bildung an reaktiven Sauerstoffspezies und eine ineffizientere Energiegewinnung zur Folge hatte [204]. Auch wurde bereits gezeigt, dass eine Exposition gegenüber Typ-2-Diabetes die mitochondriale oxidative Kapazität einschränkt, was eng mit einer Insulinresistenz und einer Hyperglykämie einhergeht [188]. Parallele Beobachtungen wurden bereits

ausführlich in Lebergewebe und Skelettmuskel von Patienten mit Typ-2-Diabetes beschrieben [185]. Eine Einschränkung der mitochondrialen Atmung ließ sich auch schon kurz nach einer Herztransplantation im myokardialen Gewebe eines Patientenkollektivs von Transplantationsempfängern mit Typ-2-Diabetes, die Spenderherzen von nicht-diabetischen Spendern erhielten, zeigen. Diese Veränderungen im Myokard konnten sowohl bei Prädiabetes sowie bei Typ-2-Diabetes gezeigt werden, gingen phänotypischen Merkmalen einer Kardiomyopathie voraus und unterstreichen die Relevanz einer metabolischen Dysbalance für das Myokard [188, 205]. Wie in 4.5 beschrieben, konnten in dieser Arbeit Korrelationen zwischen GPCR-AAk und einer Insulinresistenz, Cholesterin, LDL sowie freien Fettsäuren beobachtet werden. Eine funktionelle Verknüpfung von GPCR-AAk, metabolischer Dysbalance und einer reduzierten Mitochondrienfunktion als Einflussfaktoren auf die Herzgesundheit erscheint daher plausibel.

In dieser Arbeit konnte auch festgestellt werden, dass erhöhte Konzentrationen von AT_2R -AAk mit einer besseren mitochondrialen Effizienz assoziiert waren. Diese wird anhand der LCR beurteilt, wie ausführlich in 2.2.6 beschrieben [97, 206]. Abadir et al. konnten mithilfe der Immunelektromikroskopie das Vorhandensein von AT_2R auf der inneren Mitochondrienmembran nachweisen und zeigten, dass deren Aktivierung an die mitochondriale NO-Produktion gekoppelt ist und die mitochondriale Respiration moduliert [207]. Bei der Steigerung der NO-Produktion wird von einer direkten Stimulation der NO-Synthase und/oder einer indirekten Vermittlung durch Bradykinin-abhängige Mechanismen ausgegangen [208, 209]. Die in dieser Arbeit beobachtete gesteigerte Effizienz der mitochondrialen Kopplung stützt die Hypothese einer physiologischen Regulierungsfunktion des AT_2R -AAk [210]. In diesem Fall würde die Rolle von AT_2R -AAk bei der Anpassung des mitochondrialen Stoffwechsels das Konzept der protektiven Wirkung von AT_2R auf das Myokard bei HI weiter untermauern. Die beobachtete Korrelation von AT_2R -AAk mit einer besseren mitochondrialen Effizienz sowie einer geringeren Insulinresistenz lässt die Vermutung zu, dass es bei einer vorliegenden Insulinresistenz zu einer kompensatorischen Steigerung der AT_2R -AAk kommen könnte, die wiederum eine protektive Wirkung auf die

Mitochondrien entfalten. Gegen ein abschließendes Urteil in diesem Zusammenhang spricht, dass die beobachteten Assoziationen nur moderat waren und die von uns erhobenen Daten keine Aussagen zu Kausalitäten zulassen.

4.7 Methodik

4.7.1 GPCR-Assays

Der in 1.2.1 beschriebene Aufbau der GPCR weist insbesondere bei den β_1 AR eine Vielzahl von kurzlebigen Konformationsepitopen auf, die Zielstruktur der β_1 AR-AAk sind. Als Konsequenz reagieren die AAk kaum mit linearen Repräsentationen oder denaturierten Versionen der Rezeptordomänen. β_1 AR-AAk waren nicht in der Lage, an denaturierte humane β_1 AR zu binden, die so auf Western-Blots verwendet werden. Auch korreliert der Nachweis von β_1 AR-AAk durch ihre Bindung an immobilisierte Peptidhomologe der Rezeptordomäne schlecht mit den Ergebnissen von Immunoassays, die auf nativem β_1 AR basieren, das auf intakten Zellen präsentiert wird [52]. Darüber hinaus ist das bloße Vorhandensein von β_1 AR-AAk nicht maßgebend für die Differenzierung von HI-Patienten und herzgesunden Probanden. Ausschlaggebend ist das Vorhandensein von agonistischen β_1 AR-AAk, die im Falle der DCM mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität korreliert sind [56]. Um dieser Problematik zu begegnen, wurden in dieser Arbeit AAk gegen β_1 AR zusätzlich durch IgG-Bindung an ein zyklisches Peptid bestimmt. Dieses stellt eine Nachbildung des Konformationsepitops der EC_{II} des Rezeptors dar, das mit der aktiven Rezeptorkonformation assoziiert ist. In immunisierten Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vorab-Absorption mittels dieses Peptids die kardiopathogene Wirkung der stimulierenden Rezeptor-AAk neutralisiert [108]. Das zyklische Peptid wurde auf Mikrotiterplatten aufgetragen, die in ähnlicher Weise wie die oben genannten kommerziellen Immunoassays bearbeitet wurden. Das Assay wurde mit einem murinen humanisierten monoklonalen Ak gegen das Autoepitop (AdvanceCor, München, Deutschland) kalibriert um eine Angabe der Autoantikörperwerte in IgG/ml zu ermöglichen. Die beiden Assays für β_1 AR-AAk zeigten eine in Abbildung 8 dargestellte, angemessene Korrelation mit einigen

Ausreißern, die sich durch das Vorhandensein von β_1 AR-AAk erklären lassen, die nicht gegen die EC_{II} des Rezeptors gerichtet sind.

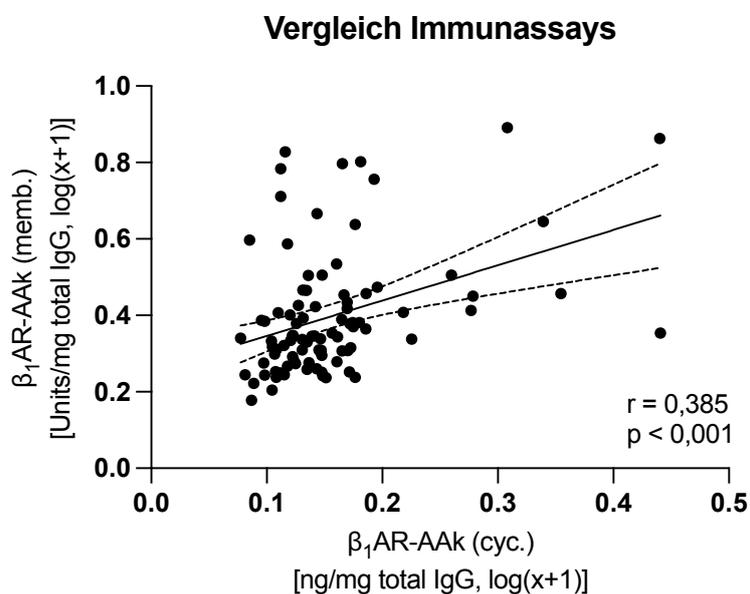


Abb. 8: Korrelation der in der HI-Gruppe mittels Membran- bzw. Cyclopeptid-Immunassay gemessenen β_1 AR-AAk. n = 91. Spearman r. ng Nanogramm; mg Milligramm.

4.7.2 HOMA-Index

Der von uns in Abschnitt 3.5 zur Abschätzung der endogenen Insulinresistenz verwendete HOMA-Index ist ein etabliertes und validiertes Modell der Glukose-Insulin-Homöostase [211, 212]. Der Index ist maßgeblich abhängig von der Qualität der eingespeisten Daten und besitzt einige Limitationen. So wurde bereits gezeigt, dass der HOMA-Index bei Personen mit ein niedrigeren BMI, einer geringen Betazellfunktion und hohen Nüchternglukosespiegeln, beispielsweise bei schlanken Patienten mit Typ-2-Diabetes mit Insulinsekretionsdefekten, nur eingeschränkt aussagekräftig ist [213]. Darüber hinaus ist der HOMA-Index bei insulinpflichtigen Patienten mit Typ-2-Diabetes und Patienten, die Sulfonylharnstoffe für ihre Diabeteserkrankung einnehmen, nur eingeschränkt verwertbar [214]. In dieser Arbeit wurde der Index für eine Einschätzung der metabolischen Lage unserer HI-Probanden und der Korrelationen mit den von uns gemessenen GPCR-AAk verwendet.

4.8 Limitationen

Die wichtigste Limitation dieser Arbeit stellt der Beobachtung- und Querschnittsaufbau der Studie dar. Dieser lässt anhand der in der Studie gezeigten Korrelationen keine Rückschlüsse auf Kausalität oder den zeitlichen Ablauf von Ereignissen zu und sollte daher generell als hypothesengenerierend betrachtet werden.

Eine weitere Limitation ergab sich daraus, dass es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, die Kontrollgruppe in gleichem Umfang wie die Probanden mit HI zu untersuchen. Invasive Diagnostik wie die Messung intrakardialer Drücke und Volumina per kathetergestütztem Verfahren oder die Entnahme endomyokardialer Biopsien wurden aufgrund des verfahrensassoziierten Risikos nicht durchgeführt. Den Differenzen der beiden Gruppen in der Alters- als auch in der Geschlechtsverteilung wurde begegnet, indem bei den Hauptgruppenvergleichen der GPCR-AAk eine Korrektur für diese Parameter in der linearen Regressionsanalyse vorgenommen wurde.

Eine Stärke der Arbeit lag im Umfang der durchgeführten Untersuchungen, sodass eine möglichst aussagekräftige Gesamtbewertung der Relevanz von GPCR-AAk in herzinsuffizienten Patienten angestrebt wurde. Es erfolgte die Beurteilung von hämodynamischen, strukturellen, histologischen, metabolischen und mitochondriellen Parametern. Wir verwendeten bereits etablierte Verfahren und griffen wo nötig auf zertifizierte Produkte und Partner zurück.

Abschließend ist zu nennen, dass diese Studie monozentrisch durchgeführt wurde, weshalb die Größe der Patientenkohorte limitierter war, als es bei einer groß angelegten multizentrischen Studie möglich gewesen wäre. Eine größere Kohorte könnte weitere wichtige Aufschlüsse liefern, um die teils widersprüchliche Literatur besser einordnen zu können. Dahingegen kann ein Vorteil des monozentrischen Ansatzes in einer potenziell höheren internen Validität der Labormessungen liegen. Weitere Studien, die sich auf einzelne Aspekte der in dieser Arbeit angeschnittenen

pathogenetischen Vorgänge konzentrieren und diese genauer ausleuchten, könnten von Interesse sein.

5 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten einen Zusammenhang zwischen nicht-ischämischer HI und Veränderungen der GPCR-Autoimmunität.

Allerdings können die in dieser Arbeit nachgewiesenen Assoziationen allein keine Kausalitäten beweisen oder ausschließen. Die Beständigkeit dieser Veränderungen bei verschiedenen Ursachen der nicht-ischämischen HI deutet nicht auf eine direkte kardiopathogene Wirkung von GPCR-AAk hin, wie sie für andere gegen das Herz gerichtete AAK gezeigt werden konnte [215, 216]. Im Gegenteil, Korrelationen von GPCR-AAk mit Parametern des kardialen Stoffwechsels und der Struktur stützen eher das Konzept protektiver Eigenschaften spezifischer AAK und ihrer Veränderungen bei HI. Daher scheint es zuerst nicht schlüssig, dass die Entfernung oder Neutralisierung von HI-assoziierten GPCR die HI in gleicher Weise verbessern sollte, wie dies in bestimmten Tiermodellen gezeigt wurde [217].

Insgesamt unterstreicht diese Arbeit, wie wichtig es ist, die Auswirkungen von GPCR-AAk innerhalb ihrer Klasse weiter zu differenzieren, bevor GPCR-AAk-regulierende Therapien entwickelt werden können.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. McDonagh, T.A., et al., *2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *European Heart Journal*, 2021. **42**(36): p. 3599-3726.
2. Lindenfeld, J., et al., *HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline*. *J Card Fail*, 2010. **16**(6): p. e1-194.
3. Yancy, C.W., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(16): p. e147-239.
4. Abelmann, W.H., *Classification and natural history of primary myocardial disease*. *Prog Cardiovasc Dis*, 1984. **27**(2): p. 73-94.
5. *Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies*. *Br Heart J*, 1980. **44**(6): p. 672-3.
6. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. *Circulation*, 1996. **93**(5): p. 841-2.
7. Munoz-Saravia, S.G., et al., *Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine*. *Heart Fail Rev*, 2012. **17**(1): p. 45-64.
8. 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.*
9. 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.*
 10. Rapezzi, C., et al., *Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. European Heart Journal, 2012. 34(19): p. 1448-1458.*
 11. Caforio, A.L.P., et al., *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(33): p. 2636-2648.*
 12. Seferovic, P.M., et al., *Heart failure in cardiomyopathies: a position paper from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. Eur J Heart Fail, 2019. 21(5): p. 553-576.*
 13. Dolgin, M. *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 1994. Little Brown and Company.*
 14. Steinberg, D.H., et al., *Defining structural heart disease in the adult patient: current scope, inherent challenges and future directions. European Heart Journal Supplements, 2010. 12(suppl_E): p. E2-E9.*
 15. Roger, V.L., *Epidemiology of heart failure. Circ Res, 2013. 113(6): p. 646-59.*
 16. Arbustini, E., et al., *The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. J Am Coll Cardiol, 2014. 64(3): p. 304-18.*

17. Conrad, N., et al., *Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals*. Lancet, 2018. **391**(10120): p. 572-580.
18. Ziaeeian, B. and G.C. Fonarow, *Epidemiology and aetiology of heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(6): p. 368-78.
19. Mosterd, A. and A.W. Hoes, *Clinical epidemiology of heart failure*. Heart, 2007. **93**(9): p. 1137-46.
20. Brouwers, F.P., et al., *Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND*. Eur Heart J, 2013. **34**(19): p. 1424-31.
21. Stork, S., et al., *Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study*. Clin Res Cardiol, 2017. **106**(11): p. 913-922.
22. van Riet, E.E., et al., *Prevalence of unrecognized heart failure in older persons with shortness of breath on exertion*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(7): p. 772-7.
23. Ceia, F., et al., *Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study*. Eur J Heart Fail, 2002. **4**(4): p. 531-9.
24. Bleumink, G.S., et al., *Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study*. Eur Heart J, 2004. **25**(18): p. 1614-9.
25. Chioncel, O., et al., *Epidemiology and one-year outcomes in patients with chronic heart failure and preserved, mid-range and reduced ejection fraction: an analysis of the ESC Heart Failure Long-Term Registry*. Eur J Heart Fail, 2017. **19**(12): p. 1574-1585.
26. Meyer, S., et al., *Sex differences in new-onset heart failure*. Clin Res Cardiol, 2015. **104**(4): p. 342-50.

27. van Riet, E.E., et al., *Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(3): p. 242-52.
28. Nair, N., *Epidemiology and pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction*. Rev Cardiovasc Med, 2020. **21**(4): p. 531-540.
29. Heidenreich, P.A., et al., *2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines*. Circulation, 2022. **145**(18): p. e895-e1032.
30. Savarese, G., et al., *Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology*. Cardiovascular Research, 2022.
31. Vos, T., et al., *Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2163-96.
32. Stanaway, J.D. and G. Roth, *The burden of Chagas disease: estimates and challenges*. Glob Heart, 2015. **10**(3): p. 139-44.
33. Bern, C. and S.P. Montgomery, *An estimate of the burden of Chagas disease in the United States*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(5): p. e52-4.
34. Jackson, Y., M. Varcher Herrera, and J. Gascon, *Economic crisis and increased immigrant mobility: new challenges in managing Chagas disease in Europe*. Bull World Health Organ, 2014. **92**(10): p. 771-2.
35. Marin-Neto, J.A., et al., *Pathogenesis of chronic Chagas heart disease*. Circulation, 2007. **115**(9): p. 1109-23.
36. Factor, S.M., et al., *Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease*. Am J Trop Med Hyg, 1985. **34**(2): p. 246-53.
37. Köberle, F., *Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis*. Adv Parasitol, 1968. **6**: p. 63-116.

38. Zhang, L. and R.L. Tarleton, *Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 480-6.
39. Sterin-Borda, L., et al., *Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects*. Cardiovasc Res, 1976. **10**(6): p. 613-22.
40. Mobini, R., H. Maschke, and F. Waagstein, *New insights into the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: possible underlying autoimmune mechanisms and therapy*. Autoimmun Rev, 2004. **3**(4): p. 277-84.
41. Steve Watson, S.A., *The G-Protein Linked Receptor Facts Book*. Academic Press, San Diego, CA 1994: p. 1-294.
42. Schooltink, H., *Tausendsassa unter den Rezeptoren*. Pharmazeutische Zeitung, 2014. **09**.
43. Bywater, R.P., *Location and nature of the residues important for ligand recognition in G-protein coupled receptors*. J Mol Recognit, 2005. **18**(1): p. 60-72.
44. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-50.
45. Borda, E., et al., *A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity*. Clin Exp Immunol, 1984. **57**(3): p. 679-86.
46. Wallukat, G. and A. Wollenberger, *Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes*. Biomed Biochim Acta, 1987. **46**(8-9): p. S634-9.
47. Heymans, S., et al., *Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the*

- Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. Eur J Heart Fail, 2009. 11(2): p. 119-29.*
48. Freedman, N.J. and R.J. Lefkowitz, *Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. J Clin Invest, 2004. 113(10): p. 1379-82.*
 49. Jahns, R., V. Boivin, and M.J. Lohse, *beta(1)-Adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. Trends Cardiovasc Med, 2006. 16(1): p. 20-4.*
 50. Magnusson, Y., et al., *Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. Circulation, 1994. 89(6): p. 2760-7.*
 51. Christ, T., et al., *Interaction between autoantibodies against the beta1-adrenoceptor and isoprenaline in enhancing L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol, 2006. 41(4): p. 716-23.*
 52. Jahns, R., et al., *Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. Circulation, 1999. 99(5): p. 649-54.*
 53. Fu, M.L., et al., *Functional autoimmune epitope on alpha 1-adrenergic receptors in patients with malignant hypertension. Lancet, 1994. 344(8938): p. 1660-3.*
 54. Fu, L.X., et al., *Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest, 1993. 91(5): p. 1964-8.*
 55. Wallukat, G. and I. Schimke, *Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. Semin Immunopathol, 2014. 36(3): p. 351-63.*

56. Stork, S., et al., *Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy*. Am Heart J, 2006. **152**(4): p. 697-704.
57. Miettinen, K.H., et al., *Clinical significance of troponin I efflux and troponin autoantibodies in patients with dilated cardiomyopathy*. J Card Fail, 2008. **14**(6): p. 481-8.
58. Warren, K.G., et al., *Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment*. Eur J Neurol, 2006. **13**(8): p. 887-95.
59. Tzartos, S.J., et al., *Antigen-specific apheresis of pathogenic autoantibodies from myasthenia gravis sera*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1132**: p. 291-9.
60. Nikolaev, V.O., et al., *A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(5): p. 423-31.
61. Münch, G., et al., *Administration of the cyclic peptide COR-1 in humans (phase I study): ex vivo measurements of anti-β1-adrenergic receptor antibody neutralization and of immune parameters*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(11): p. 1230-9.
62. Boivin, V., et al., *Novel receptor-derived cyclopeptides to treat heart failure caused by anti-β1-adrenoceptor antibodies in a human-analogous rat model*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117589.
63. Stoerk, S. and A. Plotnikov, *Effects of JNJ-54452840, an Anti-β1 Receptor Antibody Cyclopeptide in Heart Failure Patients: A Randomized, Double-blind, Parallel-group, Phase-2 Pilot Study*. Cardiovascular Pharmacology: Open Access, 2016. **5**.

64. Dandel, M., et al., *Immunoabsorption can improve cardiac function in transplant candidates with non-ischemic dilated cardiomyopathy associated with diabetes mellitus*. *Atheroscler Suppl*, 2015. **18**: p. 124-33.
65. Becker, N.P., et al., *Functional autoantibody diseases: Basics and treatment related to cardiomyopathies*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019. **24**(1): p. 48-95.
66. Weinmann, K., et al., *Add-on Immunoabsorption Shortly-after Optimal Medical Treatment Further Significantly and Persistently Improves Cardiac Function and Symptoms in Recent-Onset Heart Failure-A Single Center Experience*. *Biomolecules*, 2018. **8**(4).
67. Yoshikawa, T., et al., *Immunoabsorption therapy for dilated cardiomyopathy using tryptophan column-A prospective, multicenter, randomized, within-patient and parallel-group comparative study to evaluate efficacy and safety*. *J Clin Apher*, 2016. **31**(6): p. 535-544.
68. Haberland, A., et al., *Aptamer neutralization of beta1-adrenoceptor autoantibodies isolated from patients with cardiomyopathies*. *Circ Res*, 2011. **109**(9): p. 986-92.
69. Haberland, A., et al., *Aptamer BC 007 - A broad spectrum neutralizer of pathogenic autoantibodies against G-protein-coupled receptors*. *Eur J Pharmacol*, 2016. **789**: p. 37-45.
70. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
71. Taegtmeyer, H., *Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications*. *Curr Probl Cardiol*, 1994. **19**(2): p. 59-113.
72. Taegtmeyer, H., *Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure*. *Circulation*, 2004. **110**(8): p. 894-6.
73. Ardehali, H., et al., *Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(2): p. 120-9.

74. Glatz, J.F., et al., *Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006. **20**(6): p. 471-6.
75. Goodwin, G.W., C.S. Taylor, and H. Taegtmeyer, *Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(45): p. 29530-9.
76. Lohse, M.J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen, *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* *Circ Res*, 2003. **93**(10): p. 896-906.
77. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
78. Ashrafian, H., M.P. Frenneaux, and L.H. Opie, *Metabolic mechanisms in heart failure*. *Circulation*, 2007. **116**(4): p. 434-48.
79. Rassow, J., et al., *Duale Reihe Biochemie*. Thieme Verlag, 2016. **4. Auflage**: p. 879.
80. Gnaiger, E., *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis*. Mitochondr Physiol Network 17.18 2014.
81. Lemieux, H., et al., *Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011. **43**(12): p. 1729-38.
82. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
83. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biochem J*, 2009. **417**(1): p. 1-13.
84. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state*. *J Biol Chem*, 1955. **217**(1): p. 409-27.

85. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra*. J Biol Chem, 1955. **217**(1): p. 395-407.
86. Gnaiger, E., *Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(10): p. 1837-45.
87. Gnaiger, E., *Mitochondrial physiology. Bioenergetics Communications*. 2020.
88. Cheng, J., et al., *Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases*. Adv Exp Med Biol, 2017. **982**: p. 359-370.
89. Peter C. Heinrich, M.M., Lutz Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014. **9**.
90. Aretz, H.T., *Myocarditis: the Dallas criteria*. Hum Pathol, 1987. **18**(6): p. 619-24.
91. Veksler, V.I., et al., *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers*. Biochim Biophys Acta, 1987. **892**(2): p. 191-6.
92. Kunz, W.S., et al., *Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1144**(1): p. 46-53.
93. Kuznetsov, A.V., et al., *Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 965-76.
94. Scheiber, D., et al., *Human myocardial mitochondrial oxidative capacity is impaired in mild acute heart transplant rejection*. ESC Heart Fail, 2021. **8**(6): p. 4674-4684.

95. Scheiber, D., et al., *Reduced Myocardial Mitochondrial ROS Production in Mechanically Unloaded Hearts*. J Cardiovasc Transl Res, 2019. **12**(2): p. 107-115.
96. Salabei, J.K., A.A. Gibb, and B.G. Hill, *Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis*. Nat Protoc, 2014. **9**(2): p. 421-38.
97. Pesta, D. and E. Gnaiger, *High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle*. Methods Mol Biol, 2012. **810**: p. 25-58.
98. Salin, K., et al., *The RCR and ATP/O Indices Can Give Contradictory Messages about Mitochondrial Efficiency*. Integr Comp Biol, 2018. **58**(3): p. 486-494.
99. Bonner, F., et al., *Myocardial T2 mapping reveals age- and sex-related differences in volunteers*. J Cardiovasc Magn Reson, 2015. **17**(1): p. 9.
100. Gastl, M., et al., *Cardiac magnetic resonance T2 mapping and feature tracking in athlete's heart and HCM*. Eur Radiol, 2021. **31**(5): p. 2768-2777.
101. Messroghli, D.R., et al., *Modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) for high-resolution T1 mapping of the heart*. Magn Reson Med, 2004. **52**(1): p. 141-6.
102. Puntmann, V.O., et al., *T1 Mapping in Characterizing Myocardial Disease: A Comprehensive Review*. Circ Res, 2016. **119**(2): p. 277-99.
103. Fernandez-Jimenez, R., et al., *Fast T2 gradient-spin-echo (T2-GraSE) mapping for myocardial edema quantification: first in vivo validation in a porcine model of ischemia/reperfusion*. J Cardiovasc Magn Reson, 2015. **17**: p. 92.
104. Spieker, M., et al., *T2 mapping cardiovascular magnetic resonance identifies the presence of myocardial inflammation in patients with dilated*

- cardiomyopathy as compared to endomyocardial biopsy. Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2018. **19**(5): p. 574-582.
105. ElSayed, N.A., et al., 2. *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. Diabetes Care*, 2023. **46**(Suppl 1): p. S19-s40.
106. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-9.
107. Boivin-Jahns, V. and R. Jahns, *GPCR-autoantibodies in chronic heart failure. Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018. **23**(11): p. 2065-2081.
108. Wolfel, A., et al., *Unmasking features of the auto-epitope essential for beta1-adrenoceptor activation by autoantibodies in chronic heart failure. ESC Heart Fail*, 2020. **7**(4): p. 1830-1841.
109. Fu, M.L., *Anti-M2 muscarinic receptor autoantibodies and idiopathic dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol*, 1996. **54**(2): p. 127-35.
110. Limas, C.J., I.F. Goldenberg, and C. Limas, *Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. Circ Res*, 1989. **64**(1): p. 97-103.
111. Fraser, C.M. and J.C. Venter, *Anti-receptor antibodies in human disease. J Allergy Clin Immunol*, 1984. **74**(5): p. 661-73.
112. Boivin-Jahns, V., R. Jahns, and F. Boege, *Relevant effects of beta1-adrenoceptor autoantibodies in chronic heart failure. Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018. **23**(11): p. 2146-2156.
113. Skiba, M.A. and A.C. Kruse, *Autoantibodies as Endogenous Modulators of GPCR Signaling. Trends Pharmacol Sci*, 2021. **42**(3): p. 135-150.
114. Bornholz, B., et al., *Detection of DCM-associated β 1-adrenergic receptor autoantibodies requires functional readouts or native human β 1-receptors as targets. Int J Cardiol*, 2016. **202**: p. 728-30.

115. Jahns, R. and F. Boege, *Questionable Validity of Peptide-Based ELISA Strategies in the Diagnostics of Cardiopathogenic Autoantibodies That Activate G-Protein-Coupled Receptors*. *Cardiology*, 2015. **131**(3): p. 149-50.
116. Boege, F., R. Westenfeld, and R. Jahns, *beta1AAb Determined by Peptide ELISA: A Signal in the Noise?* *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(6): p. 807-808.
117. Wallukat, G., K. Wenzel, and I. Schimke, *Analytics of Functional Autoantibodies in Patients with Chagas Disease*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1955**: p. 247-261.
118. Bornholz, B., et al., *A standardised FACS assay based on native, receptor transfected cells for the clinical diagnosis and monitoring of beta1-adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease*. *Clin Chem Lab Med*, 2016. **54**(4): p. 683-91.
119. Jahns, R., et al., *Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1419-29.
120. Li, H., et al., *Atrial tachyarrhythmias induced by the combined effects of β 1/2-adrenergic autoantibodies and thyroid hormone in the rabbit*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2014. **7**(6): p. 581-9.
121. Lv, T., et al., *Proliferation in cardiac fibroblasts induced by beta1-adrenoceptor autoantibody and the underlying mechanisms*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 32430.
122. Liu, J., et al., *Adoptive passive transfer of rabbit beta1-adrenoceptor peptide immune cardiomyopathy into the Rag2^{-/-} mouse: participation of the ER stress*. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. **44**(2): p. 304-14.
123. Yu, X., et al., *Development of cardiomyopathy and atrial tachyarrhythmias associated with activating autoantibodies to beta-adrenergic and muscarinic receptors*. *J Am Soc Hypertens*, 2009. **3**(2): p. 133-40.

124. Yalcin, M.U., et al., *Elevated M2-muscarinic and β 1-adrenergic receptor autoantibody levels are associated with paroxysmal atrial fibrillation*. Clin Res Cardiol, 2015. **104**(3): p. 226-33.
125. Baba, A., et al., *Autoantibodies against M2-muscarinic acetylcholine receptors: new upstream targets in atrial fibrillation in patients with dilated cardiomyopathy*. Eur Heart J, 2004. **25**(13): p. 1108-15.
126. Jane-wit, D., et al., *Beta 1-adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis*. Circulation, 2007. **116**(4): p. 399-410.
127. Jahns, R., et al., *Pathological autoantibodies in cardiomyopathy*. Autoimmunity, 2008. **41**(6): p. 454-61.
128. Del Corso, C., et al., *Sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy decrease I_{Ca} in cardiomyocytes isolated from rabbits*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(5): p. H1928-36.
129. Kaschina, E., P. Namsolleck, and T. Unger, *AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Res, 2017. **125**(Pt A): p. 39-47.
130. Altarche-Xifró, W., et al., *Cardiac c-kit+AT2+ cell population is increased in response to ischemic injury and supports cardiomyocyte performance*. Stem Cells, 2009. **27**(10): p. 2488-97.
131. Kaschina, E., et al., *Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction?* Circulation, 2008. **118**(24): p. 2523-32.
132. Yang, Z., et al., *Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction*. Circulation, 2002. **106**(1): p. 106-11.
133. Oishi, Y., et al., *Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling*. Hypertension, 2003. **41**(3 Pt 2): p. 814-8.

134. Namsolleck, P., et al., *AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications*. *Curr Hypertens Rep*, 2014. **16**(2): p. 416.
135. Scherbaum, I., et al., *Autoantibodies against M5-muscarinic and beta1-adrenergic receptors in periodontitis patients*. *Aging (Albany NY)*, 2020. **12**(16): p. 16609-16620.
136. Deubner, N., et al., *Cardiac beta1-adrenoceptor autoantibodies in human heart disease: rationale and design of the Etiology, Titre-Course, and Survival (ETiCS) Study*. *Eur J Heart Fail*, 2010. **12**(7): p. 753-62.
137. Gurses, K.M., et al., *M2-muscarinic acetylcholine receptor autoantibody levels predict left atrial fibrosis severity in paroxysmal lone atrial fibrillation patients undergoing cryoablation*. *Europace*, 2015. **17**(2): p. 239-46.
138. Yoshizawa, A., et al., *Autoimmunity against M₂muscarinic acetylcholine receptor induces myocarditis and leads to a dilated cardiomyopathy-like phenotype*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(5): p. 1152-63.
139. Pei, J., et al., *The predictive values of beta1-adrenergic and M2 muscarinic receptor autoantibodies for sudden cardiac death in patients with chronic heart failure*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(8): p. 887-94.
140. Stavrakis, S., et al., *Opposing cardiac effects of autoantibody activation of β -adrenergic and M2 muscarinic receptors in cardiac-related diseases*. *Int J Cardiol*, 2011. **148**(3): p. 331-6.
141. Matsui, S., et al., *Beneficial effect of muscarinic-2 antagonist on dilated cardiomyopathy induced by autoimmune mechanism against muscarinic-2 receptor*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001. **38 Suppl 1**: p. S43-9.
142. Yu, X., G. Riemekasten, and F. Petersen, *Autoantibodies against muscarinic acetylcholine receptor M(3) in Sjogren's syndrome and corresponding mouse models*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018. **23**(11): p. 2053-2064.

143. Loebel, M., et al., *Antibodies to β adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome*. *Brain Behav Immun*, 2016. **52**: p. 32-39.
144. Scheibenbogen, C., et al., *Immunoabsorption to remove β 2 adrenergic receptor antibodies in Chronic Fatigue Syndrome CFS/ME*. *PLoS One*, 2018. **13**(3): p. e0193672.
145. Gunning, W.T., 3rd, et al., *Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome Is Associated With Elevated G-Protein Coupled Receptor Autoantibodies*. *J Am Heart Assoc*, 2019. **8**(18): p. e013602.
146. Kawai, T., et al., *AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system*. *Pharmacol Res*, 2017. **125**(Pt A): p. 4-13.
147. Karczewski, P., et al., *Antibodies to the α 1-adrenergic receptor cause vascular impairments in rat brain as demonstrated by magnetic resonance angiography*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41602.
148. Zhou, Z., et al., *Cardiac remodeling after long-term stimulation by antibodies against the alpha1-adrenergic receptor in rats*. *Clin Immunol*, 2005. **114**(2): p. 164-73.
149. Karczewski, P., et al., *Agonistic antibody to the alpha1-adrenergic receptor mobilizes intracellular calcium and induces phosphorylation of a cardiac 15-kDa protein*. *Mol Cell Biochem*, 2010. **333**(1-2): p. 233-42.
150. Wenzel, K., et al., *Potential relevance of alpha(1)-adrenergic receptor autoantibodies in refractory hypertension*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3742.
151. Mayyas, F., et al., *Association of left atrial endothelin-1 with atrial rhythm, size, and fibrosis in patients with structural heart disease*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010. **3**(4): p. 369-79.
152. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. *Nature*, 1988. **332**(6163): p. 411-5.

153. Sakurai, T., et al., *Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor*. *Nature*, 1990. **348**(6303): p. 732-5.
154. Dagassan, P.H., et al., *Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996. **27**(1): p. 147-53.
155. Mazzuca, M.Q. and R.A. Khalil, *Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease*. *Biochem Pharmacol*, 2012. **84**(2): p. 147-62.
156. Dandel, M., et al., *Immunoabsorption therapy for dilated cardiomyopathy and pulmonary arterial hypertension*. *Atheroscler Suppl*, 2013. **14**(1): p. 203-11.
157. Wallukat, G., et al., *Abstract 2301: Agonistic Autoantibodies Against the Endothelin 1 ETA - and α 1-Adrenergic- Receptor in the Sera of Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension*. *Circulation*, 2007. **116**(suppl_16): p. II_503-II_503.
158. Dai, Y., et al., *Immunotherapy of Endothelin-1 Receptor Type A for Pulmonary Arterial Hypertension*. *J Am Coll Cardiol*, 2019. **73**(20): p. 2567-2580.
159. Russell, F.D. and P. Molenaar, *The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect*. *Trends Pharmacol Sci*, 2000. **21**(9): p. 353-9.
160. Schneider, M.P., E.I. Boesen, and D.M. Pollock, *Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007. **47**: p. 731-59.
161. Takahashi, Y., et al., *Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases*. *Arthritis Res Ther*, 2010. **12**(3): p. R85.

162. Miziołek, B., et al., *The prevalence and role of functional autoantibodies to angiotensin-converting-enzyme-2 in patients with systemic sclerosis*. *Autoimmunity*, 2021. **54**(4): p. 181-186.
163. Chappell, M.C., *Angiotensin-converting enzyme 2 autoantibodies: further evidence for a role of the renin-angiotensin system in inflammation*. *Arthritis Res Ther*, 2010. **12**(3): p. 128.
164. Casciola-Rosen, L., et al., *IgM anti-ACE2 autoantibodies in severe COVID-19 activate complement and perturb vascular endothelial function*. *JCI Insight*, 2022. **7**(9).
165. Zhang, T., M.A. Garstka, and K. Li, *The Controversial C5a Receptor C5aR2: Its Role in Health and Disease*. *J Immunol Res*, 2017. **2017**: p. 8193932.
166. Khor, K.H., et al., *A Potential Link between the C5a Receptor 1 and the β 1-Adrenoreceptor in the Mouse Heart*. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0146022.
167. Kzhyshkowska, J., et al., *Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC*. *J Immunol*, 2006. **176**(10): p. 5825-32.
168. Ryabov, V., et al., *Cardiac CD68+ and stabilin-1+ macrophages in wound healing following myocardial infarction: From experiment to clinic*. *Immunobiology*, 2018. **223**(4-5): p. 413-421.
169. Carai, P., et al., *Stabilin-1 mediates beneficial monocyte recruitment and tolerogenic macrophage programming during CVB3-induced viral myocarditis*. *J Mol Cell Cardiol*, 2022. **165**: p. 31-39.
170. Lund, A., et al., *Antibodies to receptors are associated with biomarkers of inflammation and myocardial damage in heart failure*. *Int J Cardiol*, 2018. **250**: p. 253-259.
171. Spieker, M., et al., *T2 mapping cardiovascular magnetic resonance identifies the presence of myocardial inflammation in patients with dilated*

- cardiomyopathy as compared to endomyocardial biopsy. Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2018. **19**(5): p. 574-582.
172. Bornholz, B., et al., *Detection of DCM-associated beta1-adrenergic receptor autoantibodies requires functional readouts or native human beta1-receptors as targets. Int J Cardiol*, 2016. **202**: p. 728-30.
173. Jahns, R. and F. Boege, *Questionable validity of peptide-based ELISA strategies in the diagnostics of cardriopathogenic autoantibodies that activate G-protein-coupled receptors. Cardiology*, 2015. **131**: p. 149-150.
174. Becker, N.P., et al., *Functional autoantibody diseases: Basics and treatment related to cardiomyopathies. Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019. **24**: p. 48-95.
175. Wolfel, A., et al., *Unmasking features of the auto-epitope essential for beta1-adrenoceptor activation by autoantibodies in chronic heart failure. ESC Heart Fail*, 2020.
176. Bornholz, B., et al., *Impact of human autoantibodies on beta1-adrenergic receptor conformation, activity, and internalization. Cardiovasc Res*, 2013. **97**(3): p. 472-80.
177. Bornholz, B., et al., *Impact of common beta-adrenergic receptor polymorphisms on the interaction with agonistic autoantibodies in dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol*, 2016. **214**: p. 83-85.
178. Omerovic, E., et al., *Induction of cardiomyopathy in severe combined immunodeficiency mice by transfer of lymphocytes from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Autoimmunity*, 2000. **32**(4): p. 271-80.
179. Matsui, S., et al., *Active immunization of combined beta1-adrenoceptor and M2-muscarinic receptor peptides induces cardiac hypertrophy in rabbits. J Card Fail*, 1999. **5**(3): p. 246-54.

180. Seidel, F., et al., *Compensatory Upregulation of Anti-Beta-Adrenergic Receptor Antibody Levels Might Prevent Heart Failure Presentation in Pediatric Myocarditis*. *Front Pediatr*, 2022. **10**: p. 881208.
181. Boden, G., *Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999. **111**(3): p. 241-8.
182. Chow, B.S., et al., *The angiotensin II type 2 receptor agonist Compound 21 is protective in experimental diabetes-associated atherosclerosis*. *Diabetologia*, 2016. **59**(8): p. 1778-90.
183. Muniyappa, R. and S. Yavuz, *Metabolic actions of angiotensin II and insulin: a microvascular endothelial balancing act*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **378**(1-2): p. 59-69.
184. Lebovitz, H.E., *Insulin resistance: definition and consequences*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001. **109 Suppl 2**: p. S135-48.
185. Roden, M. and G.I. Shulman, *The integrative biology of type 2 diabetes*. *Nature*, 2019. **576**(7785): p. 51-60.
186. Ohshima, K., et al., *Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation ameliorates insulin resistance in type 2 diabetes mice with PPARgamma activation*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e48387.
187. Bernardi, S., et al., *Update on RAAS Modulation for the Treatment of Diabetic Cardiovascular Disease*. *J Diabetes Res*, 2016. **2016**: p. 8917578.
188. Zweck, E., et al., *Exposure to Type 2 Diabetes Provokes Mitochondrial Impairment in Apparently Healthy Human Hearts*. *Diabetes Care*, 2021. **44**(5): p. e82-e84.
189. Jia, G., M.A. Hill, and J.R. Sowers, *Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity*. *Circ Res*, 2018. **122**(4): p. 624-638.
190. Rawshani, A., et al., *Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(15): p. 1407-1418.

191. McMurray, J.J.V., et al., *Heart failure: a cardiovascular outcome in diabetes that can no longer be ignored*. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2014. **2**(10): p. 843-851.
192. Roy, C., et al., *C5a receptor deficiency alters energy utilization and fat storage*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e62531.
193. Lim, J., et al., *C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling*. *Faseb j*, 2013. **27**(2): p. 822-31.
194. Monk, P.N., et al., *Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors*. *Br J Pharmacol*, 2007. **152**(4): p. 429-48.
195. Proctor, L.M., et al., *Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury*. *Br J Pharmacol*, 2004. **142**(4): p. 756-64.
196. Luo, J., J. Sun, and D. Cai, *[Effect of activating Toll-like receptor 4 on renin-angiotensin system in 3T3-L1 adipose cells]*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2014. **34**(6): p. 787-91.
197. Sun, J., et al., *Free Fatty Acids Activate Renin-Angiotensin System in 3T3-L1 Adipocytes through Nuclear Factor-kappa B Pathway*. *J Diabetes Res*, 2016. **2016**: p. 1587594.
198. Nag, S., et al., *Role of angiotensin type 2 receptor in improving lipid metabolism and preventing adiposity*. *Mol Cell Biochem*, 2019. **461**(1-2): p. 195-204.
199. Kuczmarski, A.V., et al., *Altered endothelial ET(B) receptor expression in postmenopausal women*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020. **319**(1): p. H242-h247.
200. Muller, G., et al., *Upregulation of endothelin receptor B in human endothelial cells by low-density lipoproteins*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. **231**(6): p. 766-71.

201. Speck, D., et al., *Angiotensin and Endothelin Receptor Structures With Implications for Signaling Regulation and Pharmacological Targeting*. Front Endocrinol (Lausanne), 2022. **13**: p. 880002.
202. Wu, J.D., D.L. Liang, and Y. Xie, *Prediabetes and risk of heart failure: the link grows stronger*. Cardiovasc Diabetol, 2021. **20**(1): p. 112.
203. Nunes, S., et al., *Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker*. Cardiovasc Diabetol, 2013. **12**: p. 44.
204. Jelenik, T., et al., *Insulin Resistance and Vulnerability to Cardiac Ischemia*. Diabetes, 2018. **67**(12): p. 2695-2702.
205. Zweck, E., et al., *Impaired Myocardial Mitochondrial Respiration in Humans With Prediabetes: A Footprint of Prediabetic Cardiomyopathy*. Circulation, 2022. **146**(15): p. 1189-1191.
206. Scheiber, D., et al., *High-resolution respirometry in human endomyocardial biopsies shows reduced ventricular oxidative capacity related to heart failure*. Exp Mol Med, 2019. **51**(2): p. 16.
207. Abadir, P.M., et al., *Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(36): p. 14849-54.
208. Abadir, P.M., R.M. Carey, and H.M. Siragy, *Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice*. Hypertension, 2003. **42**(4): p. 600-4.
209. Ratliff, B.B., et al., *Angiotensin II regulates NOS expression in afferent arterioles of the developing porcine kidney*. Pediatr Res, 2010. **68**(1): p. 29-34.
210. Cabral-Marques, O., et al., *GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5224.

211. Keskin, M., et al., *Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents.* Pediatrics, 2005. **115**(4): p. e500-3.
212. Wallace, T.M., J.C. Levy, and D.R. Matthews, *Use and abuse of HOMA modeling.* Diabetes Care, 2004. **27**(6): p. 1487-95.
213. Kang, E.S., et al., *Limitation of the validity of the homeostasis model assessment as an index of insulin resistance in Korea.* Metabolism, 2005. **54**(2): p. 206-11.
214. Pfützner, A., et al., *Limitations of the HOMA-B score for assessment of beta-cell functionality in interventional trials-results from the PIOglim study.* Diabetes Technol Ther, 2010. **12**(8): p. 599-604.
215. Caforio, A.L., et al., *Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy.* Autoimmunity, 2008. **41**(1): p. 35-45.
216. Caforio, A.L., et al., *Autoimmune myocarditis and dilated cardiomyopathy: focus on cardiac autoantibodies.* Lupus, 2005. **14**(9): p. 652-5.
217. Werner, S., et al., *The aptamer BC 007 for treatment of dilated cardiomyopathy: evaluation in Doberman Pinschers of efficacy and outcomes.* ESC Heart Fail, 2020. **7**(3): p. 844-855.

7 Anhang

Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich mich bei all denjenigen herzlich bedanken, die zu der Erstellung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Ralf Westenfeld und Julia Szendrödi für die Überlassung des faszinierenden Themas und die konzeptionelle Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit. Daniel Scheiber möchte ich für die Einführung in das Projekt danken, ebenso Elric Zweck für die anhaltende Betreuung dieser Arbeit, seine unbedingte Hilfsbereitschaft und seinen Enthusiasmus für die Wissenschaft. Auch möchte ich mich bei Fritz Boege für seine herausragende Kompetenz und seine Offenheit gegenüber den Ideen junger Kollegen bedanken. Michael Roden und Malte Kelm gilt mein Dank für die Möglichkeit, die Thematik dieser Arbeit an ihren Instituten bearbeiten zu dürfen. Mein Dank gilt auch den Doktoranden, deren Vorarbeit an diesem Projekt mir manchen Weg erleichtert hat: Elric Zweck, Sophie Albermann, Julius Borger, Martin Leung und Constanze Moos. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Amin Polzin und Christian Buchbender für die Übernahme der Betreuung und den gemeinsamen Abschluss dieser Arbeit bedanken.

Im Deutschen Diabetes Zentrum bin ich vielen Mitarbeitenden zu Dank verpflichtet, von denen ich an dieser Stelle einige nennen möchte: Dominik Pesta für die Einführung in die Laborarbeit. Fariba Zivehe, Myrko Eßer und Michele Reina do Fundo für die moralische und kulinarische Unterstützung während langen Labortagen und für das Einspringen, wenn ich an mehreren Orten zur gleichen Zeit sein musste.

Am Universitätsklinikum Düsseldorf möchte ich mich bei allen Mitarbeitenden des Herzkatheterlabors und der kardiologischen Stationen für ihre Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima bedanken. Ebenso gilt mein Dank Artur Lichtenberg und Udo Boeken aus der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf für ihre Unterstützung des Projekts.

Schließlich möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken, für ihre Geduld, ihre Motivation während schwerer Phasen und für das Privileg, mich

während dieser intensiven Zeit ganz der Promotion widmen zu können: bei meinen Eltern Adalbert und Katharina, meinem Bruder Philipp, bei Milena sowie bei Hannah, Lisa, Hannah, Nele, Niklas, Titus und Tobias.