

Aus der Klinik und Poliklinik für innere Medizin B
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Stephan B. Felix)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) als
prognostischer Marker für die Gesamtmortalität bei
Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Wissenschaften in der Medizin

(Dr. rer. med.)

der Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von

Andreas Kümmel

Geb. am 11.10.1987

in: Teterow

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Stephan B. Felix
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Philipp Wild
Ort, Raum: Wolgast (Chausseestr. 46), Konferenzraum
Prof. Gollasch
Tag der Disputation: 09.10.2023

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

16.10.2022

Unterschrift

A. K. Q

Vorwort

Diese kumulative Dissertation basiert auf der folgenden Publikation:

Kümmel, A., et al., High-Mobility Group Box Protein 1 Is an Independent Prognostic Marker for All-Cause Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology*, 2022. 178: p. 119-123.

Der Artikel ist als Anhang dieser Arbeit beigefügt.

Hinweis

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit auf eine geschlechterspezifische Differenzierung wie beispielsweise Patient / -in verzichtet.

Entsprechende Begriffe gelten im Sinne der Gleichbehandlung für beide Geschlechter.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Vorwort	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM).....	1
1.2 Das angeborene Immunsystem und DCM.....	2
1.3 Das “ <i>High mobility group box protein 1</i> ” (HMGB1).....	3
1.4 Beteiligung von HMGB1 in kardiovaskulären Krankheiten	5
1.5 Zielsetzung	7
2 Material und Methoden	8
3 Ergebnisse	9
4 Diskussion	11
4.1 HMGB1 ist mit erhöhter Sterblichkeit in DCM Patienten assoziiert	11
4.2 Limitationen und Ausblick	12
5 Zusammenfassung	14
6 Summary	15
7 Literaturverzeichnis	16
8 Anhang	19
8.1 High-Mobility Group Box Protein 1 Is an Independent Prognostic Marker for All-Cause Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy.....	19
8.2 Veröffentlichungen.....	30

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Body surface area
CD	Cluster of differentiation
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HF	Heart failure
HFrEF	heart failure with reduced ejection fraction
HMGB1	High mobility group box protein 1
HR	Hazard ratio
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL	Interleukin
LAV	Left atrial volume
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LVEF	Left ventricular ejection fraction
LVEDD	Left ventricular end diastolic diameter
LVM	Left ventricular mass
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MD-2	Myeloid differentiation factor-2
NT-proBNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

1 Einleitung

1.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Myokarderkrankungen, welche im Zusammenhang mit mechanischen oder elektrischen Funktionsstörungen stehen und in der Regel gekennzeichnet sind durch ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation [1]. Die Klassifikation der verschiedenen Kardiomyopathieformen ist bisher weltweit nicht einheitlich definiert. Die *American Heart Association* unterteilt die Kardiomyopathien nach deren Ursache, wohingegen innerhalb der *Europäischen Gesellschaft für Kardiologie* eine Kombination aus Morphologie und funktionellen Phänotypen als Grundlage für die Klassifikation herangezogen wird [2], [3]. Letztere Klassifikation wurde für die Charakterisierung der Patienten in der vorliegenden Arbeit verwendet. Eine häufige Unterform der Kardiomyopathien stellt die sogenannte dilatative Kardiomyopathie (dilatative cardiomyopathy: DCM) dar. Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch eine links- oder biventrikuläre Dilatation bei gleichzeitiger systolischer Dysfunktion, nach Ausschluss eines Bluthochdrucks, primären Herzklappendefekten und koronarer Herzkrankheit als Ursachen [4]. Mit einer Prävalenz von etwa 40 Fällen pro 100.000 Individuen ist die DCM eine häufige Ursache für Herzinsuffizienz (HI) und mit einer geschätzten jährlichen Inzidenz von 7 Fällen auf 100.000 Individuen der weltweit häufigste Grund für eine Herztransplantation [1]. Bezüglich des Schweregrads können verschiedene Symptome wie Müdigkeit, Leistungsminderung und Atemnot bei körperlicher Belastung (Belastungsdyspnoe) oder im Ruhezustand (Ruhedyspnoe) auftreten. Bei fortschreitender Erkrankung unter Beeinträchtigung der rechten Herzkammer können zusätzlich Ödeme vor allem in den Beinen auftreten.

Grundsätzlich gibt es derzeit keine kausale spezifische Therapie der DCM. Jedoch können durch pharmakologische Interventionen Symptome gelindert und ein Voranschreiten der Erkrankung gehemmt werden.

Die Ursachen einer DCM sind sehr vielfältig, können aber prinzipiell eingeteilt werden in genetisch bedingte und nicht-genetisch bedingte Faktoren [4]. Das angeborene Immunsystem kann zur Entwicklung und zum Fortschreiten einer DCM beitragen [5].

1.2 Das angeborene Immunsystem und DCM

Die Krankheitsursachen wie genetische Prädisposition, Inflammation, Stress/Belastung, Myozytenschädigung, Umbau der extrazellulären Matrix, oxidativer Stress und die Beteiligung von Neurohormonen können unter anderem zum Auftreten einer DCM beitragen. Die Erforschung der an der DCM beteiligten Biomarker ist notwendig um die verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen zu verstehen.

Ein vielversprechender Ansatz in diese Richtung ist die Betrachtung der Interaktion der Krankheitsursachen mit dem angeborenen Immunsystem. Eine schematische Darstellung dieser Interaktion ist in Abbildung 1.1 gezeigt [5]. Genetisch oder nicht genetisch bedingte Auslöser führen zur Schädigung des kardialen Gewebes, zur Veränderung der extrazellulären Matrix oder zur Freisetzung sogenannter „*damage-associated molekulare patterns*“ (DAMPs) wie beispielsweise dem *high mobility group box protein 1* (HMGB1). Diese DAMPs führen zur Aktivierung einer Gruppe von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems, den sogenannten *toll-like* Rezeptoren (z.B. toll-like Rezeptor 4 [TLR4]). Durch deren Aktivierung werden verschiedene inflammatorische Prozesse ausgelöst. Unter anderem werden verschiedene pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin 6 und 8 (IL-6, IL-8) ausgeschüttet. Es kommt zur Freisetzung von Chemokinen und zur Aktivierung des Endothels. Letztlich kann dies zur Adhäsion und anschließender Infiltration von Immunzellen in das Myokard und somit zu dessen Schädigung führen.

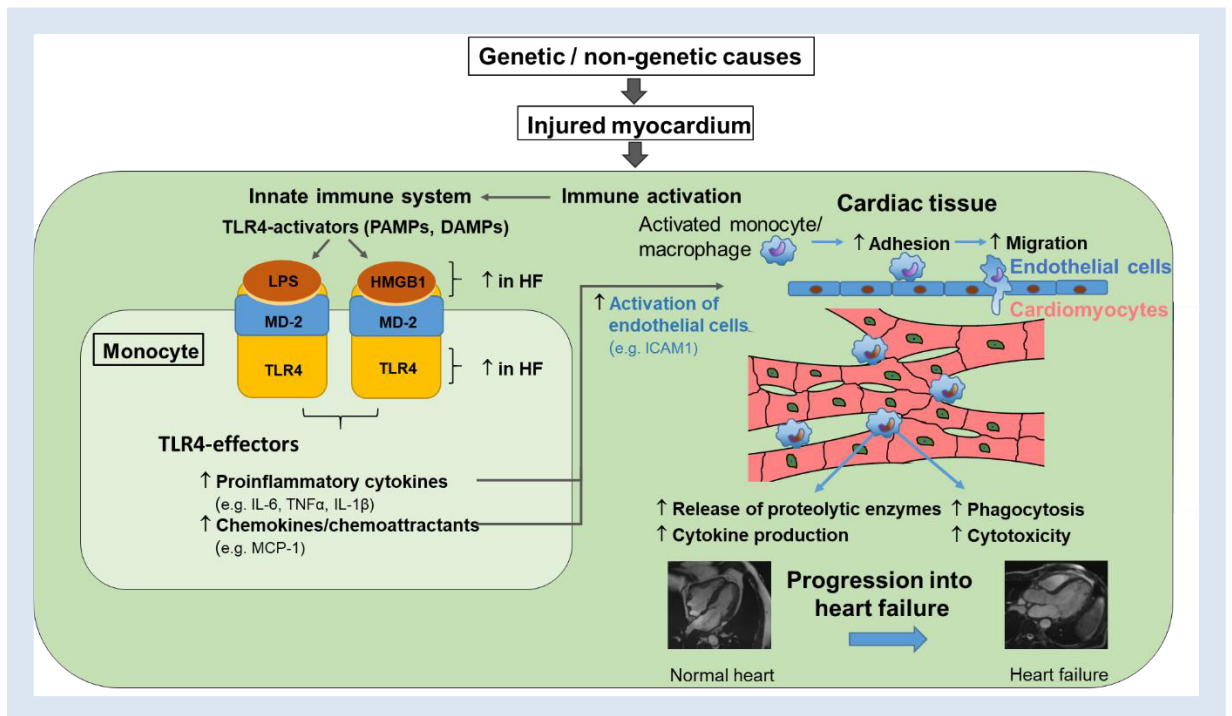


Abbildung 1.1 Interaktion zwischen Immunsystem und kardialem Gewebe

Die Abbildung zeigt die Interaktion des angeborenen Immunsystems mit dem kardialen Gewebe (modifiziert nach Frantz et al.) [5]. DAMP, damage associated molecular pattern; PAMP, pathogen associated molecular pattern; LPS, Lipopolysaccharid; MD-2, myeloid differentiation factor-2; HMGB1, high mobility group box protein 1; TLR4, Toll-like receptor 4; HF, heart failure; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IL-6, interleukin-6; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-1 β , interleukin 1 beta; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1.

1.3 Das “*High mobility group box protein 1*” (HMGB1)

HMGB1 ist ein typisches DAMP, welches im Körper bei Gefahr bzw. Schaden freigesetzt wird und gehört zur Klasse der HMG Proteine. Erstmals wurde dieses Protein 1973 von Goodwin et al., aus der nukleären Fraktion von Kälberthymuszellen isoliert [6]. Der Name rührt von der hohen Mobilität in Polyacrylamidgelen her [7]. HMGB1 wird in fast allen eukaryotischen Zellen exprimiert und ist, evolutionsbiologisch betrachtet, hoch konserviert. Beispielsweise ist die Aminosäuresequenz zwischen Nagetieren und Menschen zu 99% identisch [8], [9], [10], [11]. Humanes HMGB1 wird vom gleichnamigen Gen kodiert und bildet ein Polypeptid bestehend aus 215 Aminosäuren, welches in drei Bereiche unterteilt werden kann. Dies ist zum einen die negativ geladene C-terminale Region, welche die Bindung von HMGB1 an die DNS reguliert und den proteolytischen Abbau von HMGB1 verhindert. Zum anderen sind dies die positiv geladenen A Box und B Box Bereiche. Beide Areale sind aufgrund ihrer molekularen Struktur fähig an DNS Moleküle zu binden, wobei diese Bindung sequenzunabhängig aber konformationsabhängig erfolgt

[12]. Des Weiteren sind auf der B Box die Bindungsstellen für den „receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) und für MD-2 lokalisiert [7], [13].

Der Bindungsprozess von HMGB1 an den TLR4/MD-2 Komplex ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Dieser Prozess wurde von He et al. vorgeschlagen, nachdem diese Arbeitsgruppe die Bindungsaffinitäten der A und B Box des HMGB1 mit TLR4 und MD-2 mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie untersucht hat [13]. Die Bindung erfolgt dabei in zwei Schritten. Zunächst bindet die A Box des HMGB1 mit hoher Affinität an den TLR4. Durch die Verankerung des HMGB1 über die A Box an den TLR4, wird die B Box in räumliche Nähe des MD-2 geführt. Im weiteren Verlauf bindet die B Box an das TLR4 assoziierte MD-2. Anschließend kommt es zur Dimerisierung zweier HMGB1/TLR4/MD-2 Komplexe und zur nachgeschalteten Signaltransduktion.

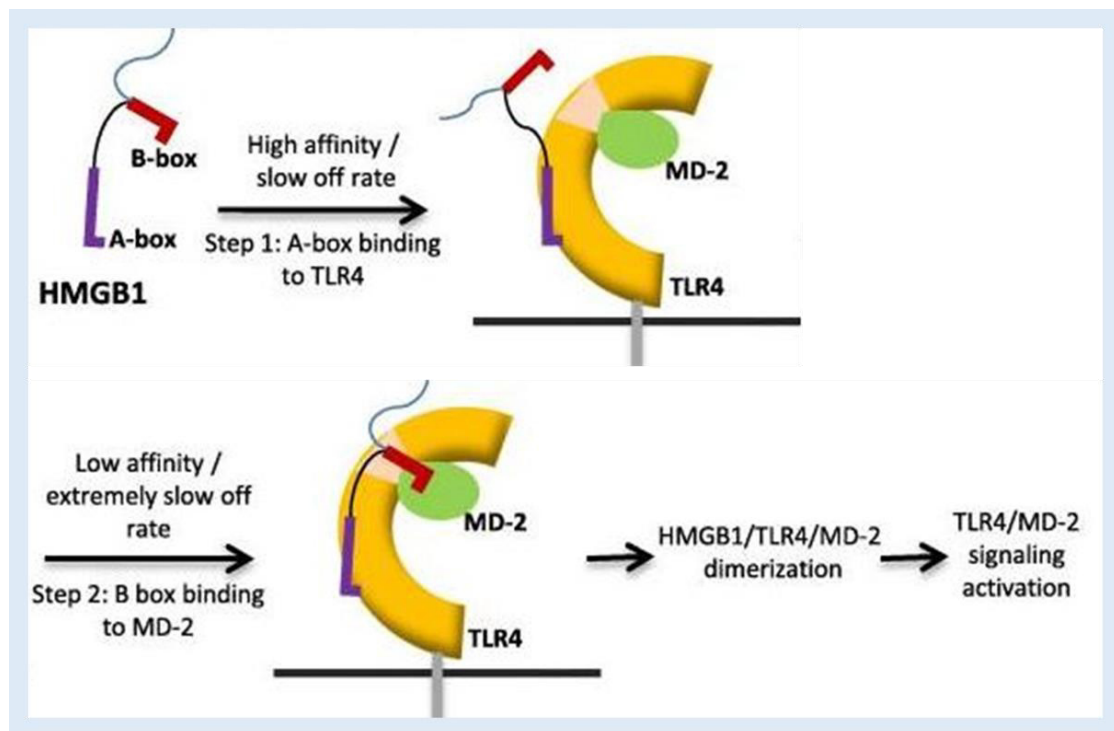


Abbildung 1.2 Bindung von HMGB1 an den TLR4/MD-2 Komplex

Schematische Darstellung der schrittweisen Bindung von HMGB1 an den TLR4/MD-2 Komplex modifiziert nach He et al., [13]. Die Bindung von HMGB1 erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet die A Box des HMGB1 an den TLR4. In einem zweiten Schritt bindet die B Box des HMGB1 an das TLR4 assoziierte MD-2. Anschließend dimerisieren zwei HMGB1/TLR4/MD-2 und lösen die nachgeschaltete Signaltransduktion aus.

HMGB1 kann verschiedenen posttranslationalen Modifikationen wie der Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung oder Oxidation unterliegen, welche unter anderem

Auswirkungen auf die Bindefähigkeit von HMGB1 an die DNS oder auf dessen Lokalisation (nukleär, zytosolisch oder interzellulär) haben [14], [15], [16], [17]. Die biologische Aktivität von HMGB1 wird von diesen posttranslationalen Modifikationen und seiner Lokalisation im Organismus bestimmt. Nukleäres HMGB1 agiert beispielsweise als DNS Chaperon und ist in der Lage die Konformation der DNS zu verändern. Dabei konnte eine erhöhte Affinität zu nicht-kanonischen oder veränderten DNS Strängen gefunden werden [18], [19]. Weiterhin ist nukleäres HMGB1 in der Modulation der DNS Replikation, der V(D)J Rekombination und Regulierung der Telomeraseaktivität beteiligt [20], [21], [22]. Zytoplasmatisches HMGB1 kommt unter normalen Bedingungen nur in geringen Konzentrationen vor. Hierbei ist es vor allem in der Regulation der Autophagie und Apoptose beteiligt [7]. Interzelluläres HMGB1 kann in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin oder *Liquor Cerebrospinalis* nachgewiesen werden [7]. Das Protein wird entweder passiv durch Zellnekrose oder aktiv beispielsweise durch Exozytose freigesetzt [23].

Die Funktionen der extrazellulären Form sind vielfältig und reichen von Migration von Leukozyten, Proliferation, Zelldifferenzierung, Adhäsion über Inflammation hin zu Gewebsreparatur und hängen dabei stark von der Oxidationsstufe des Moleküls ab [24]. Entscheidend ist hier die Oxidation von drei verschiedenen Cysteinresten an den Positionen 23, 45 und 106. Bisher sind drei verschiedene Oxidationsstufen bekannt. Die komplett oxidierte Form ist an den drei genannten Cysteinresten mit jeweils einer Sulfonylgruppe besetzt und ist immunologisch inaktiv [24]. Die partiell reduzierte Form besitzt eine Disulfidgruppe zwischen den Cysteinen 23 und 45 und ist an Stelle 106 mit einer Thiolgruppe besetzt. Diese sogenannte Disulfidform interagiert vornehmlich mit dem TLR4/MD-2 Komplex [25], [26], [27]. Die vollständig reduzierte Form besitzt an den drei relevanten Cysteinresten jeweils eine Thiolgruppe und interagiert hauptsächlich mit RAGE [28]. Aufgrund seiner vielseitigen Funktionen scheint HMGB1 in einer Vielzahl von Krankheiten eine wichtige Rolle einzunehmen.

1.4 Beteiligung von HMGB1 in kardiovaskulären Krankheiten

Die Rolle von HMGB1 bei kardiovaskulären Erkrankungen wird kontrovers diskutiert [29-36]. So konnten Limana et al. in einem Myokardinfarktmodell der Maus zeigen, dass unmittelbar nach Infarktinduktion in das Myokard injiziertes HMGB1 zur Verbesserung der kardialen Funktion führte. Weiterhin kam es durch die Rekrutierung von endogenen kardialen c-kit⁺ Progenitorzellen zu einer gesteigerten Regeneration der betroffenen Infarktbereiche [29]. Nakamura et al. induzierten in einem transgenen Mausmodell mit kardial spezifischer Überexpression von HMGB1, einen Myokardinfarkt. Sie konnten nach-

weisen, dass in den transgenen Tieren die Größe der Infarktbereiche kleiner war im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Außerdem migrierten an den Grenzflächen des Infarktgebietes der transgenen Tiere signifikant mehr endotheliale Progenitorzellen, was laut Autoren mit einer gesteigerten Angiogenese assoziiert ist [30]. Des Weiteren konnten Foglio et al., zeigen, dass die intramyokardiale Injektion von HMGB1 nach Myokardinfarktinduktion in Mäusen mit gesteigerter Autophagie und verringerter Apoptose der Kardiomyozyten assoziiert ist [31]. Insgesamt zeigen diese drei Studien eine protektive Wirkung des HMGB1.

Im Gegensatz dazu führte die intraperitoneale Injektion von HMGB1 in einem Ischämie/Reperusionsmodell der Maus zu vergrößerten Infarktgebieten und zur Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege [32]. Zhang et al., konnten in Mäusen mittels transverser Aortenkonstriktion nachweisen, dass die Injektion von HMGB1 in das kardiale Gewebe mit gesteigerter Hypertrophie und einer Verschlechterung der kardialen Funktion einhergeht [33]. Dies ist laut Autoren vermutlich auf die HMGB1 induzierte Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise dem TLR4 zurückzuführen.

Neben den tierexperimentellen Ansätzen gibt es zahlreiche Studien mit Patienten, in denen HMGB1 untersucht wurde. So wiesen Goldstein et al., erhöhte HMGB1 Serumspiegel in Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu gesunden Probanden nach [34]. Kohno et al., konnte bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkten zeigen, dass erhöhte HMGB1 Serumspiegel mit einem verschlechterten klinischen Verlauf assoziiert sind, der sich in einer verminderten Pumpleistung des Herzens oder frühzeitigem Versterben während des Klinikaufenthaltes manifestierte [35]. In einem Studienkollektiv von 347 chinesischen Patienten (86 Frauen) mit chronischer Herzinsuffizienz zeigten Wang et al., eine positive Korrelation von HMGB1 mit dem linksventrikulären enddiastolischen-/ endsystolischen Volumen und dem NT-proBNP sowie eine negative Korrelation mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) [37]. Unabhängig davon konnte in einer europäischen Herzinsuffizienzstudie mit 154 Patienten (32 Frauen) ebenfalls eine positive Korrelation zwischen HMGB1 und NT-proBNP bzw. eine negative Korrelation zwischen HMGB1 und der LVEF bestätigt werden [38]. Insbesondere die beiden letzten klinischen Studien deuten darauf hin, dass HMGB1 für die Herzinsuffizienztherapie ein wertvoller prognostischer Marker sein kann.

1.5 Zielsetzung

Die DCM ist ein komplexes Krankheitsbild mit unterschiedlichen Ursachen. Trotz intensiver Forschung unter anderem im Bereich der medikamentösen Behandlung ist die Erkrankung bisher nicht kausal therapierbar. Ein besseres Verständnis der mannigfaltigen molekularen Ursachen kann die Risikostratifizierung der betroffenen Patienten verbessern und ggf. die individuelle Behandlung modifizieren. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Beteiligung von TLR4 Korezeptoren und Aktivatoren bei der DCM. Es wurde untersucht, ob die TLR4 Korezeptoren LBP und CD14 sowie die TLR4 Aktivatoren LPS und HMGB1 mit der Sterblichkeit in DCM Patienten assoziiert sind.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde retrospektiv ein Studienkollektiv bestehend aus 67 Patienten mit dem Krankheitsbild einer DCM analysiert. Dabei handelte es sich um 12 Frauen und 55 Männer mit einem Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Datenerhebung von 53,6 Jahren. Die Datenerhebung erfolgte im Zeitraum von August 2005 bis September 2010 jeweils zum Zeitpunkt der klinischen Erstaufnahme in der Klinik und Poliklinik für innere Medizin B der Universitätsmedizin Greifswald. Die Einschlusskriterien für diese Kohorte waren eine Reduktion der LVEF $< 40\%$ und eine Vergrößerung des linksventrikulären Durchmessers nach Henry ($LVEDD^{\text{Henry}} > 117\%$). Nicht eingeschlossen wurden Patienten mit koronarer Herzkrankheit, aktiven Infektionskrankheiten, akuter Myokarditis, Krebs und chronischem Alkoholabusus. In Zusammenarbeit mit dem Zentralen Melderegister wurde der Vitalstatus der untersuchten Patienten bis zur Datenbeantragung über 12 Jahre bestimmt (bis März 2017). Neben den klinischen Routineparametern wurden im Rahmen weiterer Projekte zusätzliche Parameter wie LBP, CD14 und LPS im Blut der Patienten bestimmt und in dieser Arbeit verwendet [39]. Weiterhin wurde lösliches HMGB1 im Blutplasma bestimmt.

Die detaillierte Durchführung sämtlicher Messungen sowie die statistische Auswertung wurde in der für diese Arbeit zugrundeliegenden Publikation [40] beschrieben. Die Rekrutierung des Studienkollektivs wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald (DCM Patienten: interne Reg.-Nr. IIIUV 30/04 bis 34/04) genehmigt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivatoren des TLR4 (HMGB1 und LPS), sowie die TLR4 Korezeptoren (LBP und CD14) und der klassische Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP mit der Sterblichkeit von DCM Patienten assoziiert sind.

Für diese Untersuchung wurden Daten von insgesamt 67 DCM Patienten zum Zeitpunkt der klinischen Erstaufnahme ausgewertet. Die Kohorte wurde anhand des HMGB1 Median in zwei Gruppen unterteilt. Die beiden Gruppen unterschieden sich statistisch weder in der Alters- und Geschlechtsverteilung (Alter: $52,8 \pm 2,2$ Jahre vs. $54,4 \pm 0,1$ Jahre; $p=0,583$; Geschlecht [Anzahl weiblich]: 8 vs. 4; $p=0,341$). Außerdem zeigten beide Gruppen eine stark eingeschränkte LVEF und einen dilatierten LVEDD, wobei sich beide Parameter ebenfalls nicht zwischen den Gruppen unterschieden (LVEF: $28,8 \pm 1,0\%$ vs. $29,8 \pm 1,1\%$; $p=0,504$ LVEDD: $144,0 \pm 2,6\%$ vs. $145,7 \pm 2,4\%$; $p=0,641$). Bezüglich der bestimmten kardiovaskulären Risikofaktoren war ausschließlich der systolische Blutdruck in der Gruppe mit erhöhten HMGB1 Spiegel im Vergleich zur Gruppe mit niedrigen HMGB1 Spiegel signifikant vermindert (systolischer Blutdruck: $122,6 \pm 2,4$ mmHg vs. $114,1 \pm 3,1$ mmHg; $p=0,035$). Weiterhin wurde der Vitalstatus der Kohorte für bis zu 12 Jahre untersucht, wobei innerhalb des Beobachtungszeitraums 28 Individuen verstarben und die Zahl der Verstorbenen in der Gruppe mit erhöhten HMGB1 Spiegel im Vergleich zur Gruppe mit niedrigen HMGB1 Spiegel signifikant höher lag (Verstorbene: 18 vs. 10; $p=0,049$).

Die Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von NT-proBNP, CD14, LBP, HMGB1 und LPS wurde mittels Kaplan-Meier-Schätzer und anschließendem Log-Rank Test untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit erhöhten NT-proBNP eine signifikant erniedrigte Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu jenen mit niedrigen NT-proBNP Werten aufwiesen ($\chi^2=22,22$; $p<0,001$). Die Betrachtung der TLR4 Korezeptoren hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit ergab, dass CD14 und LBP in der Gruppe mit erhöhten Werten keine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Gruppe mit niedrigen Werten aufwies (CD14: $\chi^2=0,54$; $p=0,463$; LBP: $\chi^2=0,28$; $p=0,595$). Die Analyse der TLR4 Aktivatoren zeigte, dass eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit mit erhöhten HMGB1 aber nicht mit erhöhten LPS Spiegel assoziiert war (HMGB1: $\chi^2=4,59$; $p=0,032$; LPS: $\chi^2=0,01$; $p=0,922$).

In einem multivariablen Cox-Regressionsmodell wurde nachgewiesen, dass die HMGB1-Plasmaspiegel unabhängig von Alter, Geschlecht und NT-proBNP positiv mit der Gesamtmortalität assoziiert waren. Die standardisierte Hazard Ratio für Patienten mit einem um eine SD höheren HMGB1-Plasmaspiegel betrug 1,920 (95%CI: 1,401, 2,631;

$p < 0,001$), war jedoch im Vergleich zu NT-proBNP niedriger (HR = 2,777; 95%CI: 2,006, 3,845; $p < 0,001$).

Für die tabellarische und graphische Darstellung der Ergebnisse wird auf die für diese Arbeit zugrundeliegende Publikation [40] verwiesen.

4 Diskussion

HMGB1 wirkt als *damage-associated molecular pattern* (DAMP) und ist so in der Lage die Pathogenese von Entzündungs-, Autoimmun- und kardiovaskulären Erkrankungen voranzutreiben. Obwohl HMGB1 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist, kann es während Zellaktivierung und beim Zelltod in das Zytoplasma sowie in den extrazellulären Raum translozieren. Während der Aktivierung und Freisetzung kann HMGB1 posttranslationale Modifikationen erfahren [41].

HMGB1 ist ein redoxsensitives Protein, welches an drei konservierten Cysteinresten an den Positionen 23, 45 und 106 modifiziert werden kann. Der Redoxstatus der Cysteine bestimmt seine extrazellulären chemokin- oder zytokininduzierenden Eigenschaften. Vor allem teilweise oxidiertes HMGB1, mit einer Cys23-Cys45-Disulfid-Bindung und einem reduzierten Cys106 (Disulfid HMGB1), aktiviert eigenständig Immunzellen zur Produktion von Zytokinen/Chemokinen über den TLR4/MD-2 Komplex [25].

4.1 HMGB1 ist mit erhöhter Sterblichkeit in DCM Patienten assoziiert

In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP die TLR4 Korezeptoren CD14 und LBP sowie die TLR4 Aktivatoren HMGB1 und LPS, hinsichtlich ihrer Assoziation mit dem Sterblichkeitsrisiko in DCM Patienten untersucht. Dabei konnte mittels Kaplan Meier Analyse gezeigt werden, dass Werte oberhalb des Medians von NT-proBNP und HMGB1 mit einer gesteigerten Sterblichkeit assoziiert sind. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen. Der Marker NT-proBNP gilt als Goldstandard der Herzinsuffizienztherapie und es konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel dieses Markers mit einer erhöhten Sterblichkeit und einem schweren Verlauf in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz assoziiert sind, [42], [43]. Auch für HMGB1 konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass erhöhte Plasmaspiegel mit erhöhter Sterblichkeit beziehungsweise mit einem schlechten Krankheitsverlauf bei Patienten mit Herzinsuffizienz [38, 44] und akutem ST-Hebungsinfarkt [45] einhergehen. In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Publikation [40] konnte erstmals gezeigt werden, dass erhöhte Plasmaspiegel von HMGB auch bei Patienten mit DCM, einer häufigen Ursache der Herzinsuffizienz, mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert sind.

Weiter zeigte sich, dass die Sterblichkeit der Patienten des untersuchten Studienkollektivs nicht mit erhöhten Spiegeln der Marker LPS, LBP und CD14 assoziiert war. LPS ist Bestandteil der äußeren Hüllmembran gram-negativer Bakterien. Gelangen diese Bakterien oder Bestandteile in den Organismus wird LPS freigesetzt und wirkt als starkes *pathogen-*

associated molecular pattern (PAMP) über den TLR4/MD-2 Komplex. In Patienten mit schwerer Sepsis zeigten solche mit hohen LPS-Spiegeln eine deutlich höhere Sterblichkeit als diejenigen mit niedrigen Werten [46]. Auch ist bekannt, dass Infektionen eine mögliche Ursache einer Kardiomyopathie sein können. Die Arbeitsgruppe von Yücel et al. konnte *in vitro* zeigen, dass in LPS behandelten Kardiomyozyten die Genexpression der inflammatorischen Zytokine *IL-6*, *TNF α* und *IL-1 β* hochreguliert sind [47]. Derzeit gibt es keine Studien zur Assoziation von LPS-Spiegeln mit der Sterblichkeit bei der DCM. Im Körper wird LPS zunächst an LBP gebunden und danach weiter über CD14 an den TLR4/MD-2 Komplex übertragen. Bei einer Infektion steigen die LBP Spiegel bis auf das zehnfache der Normalkonzentration an. Da das LBP eine längere Halbwertszeit besitzt als das LPS würde es sich möglicherweise besser als Marker eignen [48]. So konnten Asada et al. in einer Longitudinalstudie einer japanischen Kohorte zeigen, dass erhöhte LBP Spiegel mit einem gesteigerten Risiko mit dem Auftreten einer kardiovaskulären Erkrankung assoziiert sind [48]. Es gibt aber auch für diesen Marker keine publizierten Daten zur Assoziation von LBP Plasmaspiegeln mit der Sterblichkeit von DCM Patienten. Auch für den Marker CD14 konnte gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert sind [49]. Aber auch für diesen Marker existieren bisher keine Studien für Assoziation zur Sterblichkeit von DCM Patienten.

Für die weiterführenden Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit anhand der Ergebnisse der Kaplan Meier Analyse nur die Marker NT-proBNP und HMGB1 betrachtet. Mittels alters- und geschlechtsadjustierten multivariablen Cox-Regressionsmodellen konnte erstmals gezeigt werden, dass beide Parameter unabhängige prädiktive Faktoren für die Sterblichkeit bei der DCM sind. Durch Normalisierung der Daten mittels Z-Transformation wurde ein direkter Vergleich der standardisierten *Hazard Ratios* zwischen den einzelnen Parametern ermöglicht. Dabei stellte sich heraus, dass das Sterblichkeitsrisiko stärker mit steigenden NT-proBNP Plasmaspiegeln (Änderung um 1 SD) (HR: 2,7 [1,9 - 3,8]), als mit steigenden HMGB1 Plasmaspiegeln (HR: 1,8 [1,3 - 2,6]) war. Ein direkter Vergleich dieser beiden Parameter bei der DCM ist in der aktuellen Literatur bisher nicht zu finden. Allerdings unterstützen die Daten der referierten Publikation [40] den Befund, dass NT-proBNP unverändert der Goldstandard in der Herzinsuffizienzdiagnostik ist.

4.2 Limitationen und Ausblick

Dies ist der erste Bericht über die Assoziation von HMGB1-Plasmaspiegeln mit der Gesamtmortalität bei DCM. Aufgrund methodischer Einschränkungen, die mit der geringen Stichprobengröße und der Tatsache zusammenhängen, dass nur die Gesamtmortalität als Ergebnis ausgewertet werden konnte, war die Entwicklung eines umfassenden Vorhersagemodells als potenzieller klinischer Score unter Einbeziehung von HMGB1 bei DCM-

Patienten nicht möglich. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die beobachtete relativ hohe HR in unserer kleinen DCM-Patientenkohorte möglicherweise kohortenspezifisch ist und derzeit nicht verallgemeinert werden kann. So ist z. B. die HR für NT-proBNP in unserer Kohorte größer als die insgesamt beobachtete HR bei HFrEF-Patienten [50]. Ob dies ein spezifisches Merkmal bei DCM-Patienten ist, bleibt ebenfalls unklar. Um zu untersuchen, ob die Quantifizierung von HMGB1 die Risikostratifizierung von DCM-Patienten im Hinblick auf die Vorhersage des Krankheitsverlaufs und weiterer klinisch relevanter Endpunkte wie Hospitalisierung wegen Herzinsuffizienz oder kardiovaskuläre Mortalität verbessert, sind weitere prospektive Studien mit einer größeren DCM-Kohorte erforderlich.

Es besteht nach wie vor ein ungedeckter Bedarf an zuverlässigen Biomarkern zur Vorhersage der Prognose von DCM-Patienten. Im Hinblick auf die Präzisionsmedizin ist eine weitere Risikostratifizierung erforderlich, um Patientenuntergruppen zu identifizieren, bei denen ein hohes Risiko für eine Verschlechterung der Erkrankung besteht. In unserer Studie war HMGB1 unabhängig von NT-proBNP mit der Gesamtmortalität bei DCM assoziiert, allerdings lässt dieser Befund zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Rückschlüsse auf die mechanistischen Auswirkungen dieses neuen Biomarkers bei der Herzinsuffizienz und DCM zu.

In unserer Studie wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten HMGB1-Spiegeln und TLR4-Aktivierung nicht direkt untersucht. Auf der Grundlage unserer Daten und in Anbetracht der Tatsache, dass die angeborene Immunität eine Rolle bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt, ist es denkbar, dass HMGB1 auch eine Rolle bei der Pathogenese der DCM spielt.

In diesem Zusammenhang kann die Integration von Präzisionsmedizin, maschinellem Lernen und Bioinformatik nützlich sein, um die Rolle neuartiger potenzieller Biomarker sowie des genetischen und epigenetischen Hintergrunds und von Veränderungen der myokardialen Genexpression bei der Krankheitsentwicklung und dem Fortschreiten der DCM zu ermitteln [51-53].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP die TLR4 Korezeptoren CD14 und LBP sowie die TLR4 Aktivatoren HMGB1 und LPS, hinsichtlich ihrer Assoziation mit dem Sterblichkeitsrisiko in DCM Patienten untersucht. Dabei konnte erstmals gezeigt dass, HMGB1 mit einer gesteigerten Sterblichkeit bei DCM Patienten assoziiert ist.

Aufgrund methodischer Einschränkungen, die mit der geringen Stichprobengröße und der Tatsache zusammenhängen, dass nur die Gesamtmortalität als Ergebnis ausgewertet werden konnte, war die Entwicklung eines umfassenden Vorhersagemodells als potenzieller klinischer Score unter Einbeziehung von HMGB1 bei DCM-Patienten nicht möglich.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten HMGB1-Spiegeln und TLR4-Aktivierung wurde nicht direkt untersucht. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten und in Anbetracht der Tatsache, dass die angeborene Immunität eine Rolle bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt, ist es denkbar, dass HMGB1 auch eine Rolle bei der Pathogenese der DCM spielt.

Um zu untersuchen, ob die Quantifizierung von HMGB1 die Risikostratifizierung von DCM-Patienten im Hinblick auf die Vorhersage des Krankheitsverlaufs und verfeinerter Endpunkte wie HF-Hospitalisierung oder kardiovaskuläre Mortalität verbessert, sind weitere prospektive Studien mit größeren DCM-Kohorten erforderlich.

6 Summary

In the present study, in addition to the heart failure marker NT-proBNP, the TLR4 coreceptors CD14 and LBP as well as the TLR4 activators HMGB1 and LPS were investigated with regard to their association with mortality risk in DCM patients. For the first time, HMGB1 was shown to be associated with increased mortality in DCM patients.

Due to methodological limitations related to the small sample size and the fact that only all-cause mortality could be evaluated as an outcome, the development of a comprehensive predictive model as a potential clinical score including HMGB1 in DCM patients was not possible.

A causal relationship between elevated HMGB1 levels and TLR4 activation has not been directly investigated. Based on the available data and considering that innate immunity plays a role in the pathogenesis of heart failure, it is conceivable that HMGB1 also plays a role in the pathogenesis of DCM.

Further prospective studies with larger DCM cohorts are needed to investigate whether quantifying HMGB1 improves risk stratification of DCM patients in terms of predicting disease progression and refined endpoints such as HF hospitalisation or cardiovascular mortality.

7 Literaturverzeichnis

1. Weintraub, R.G., C. Semsarian, and P. Macdonald, *Dilated cardiomyopathy*. Lancet, 2017. **390**(10092): p. 400-414.
2. 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.
3. 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.
4. Pinto, Y.M., et al., *Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases*. European Heart Journal, 2016. **37**(23): p. 1850-1858.
5. Frantz, S., et al., *The innate immune system in chronic cardiomyopathy: a European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on Myocardial Function of the ESC*. European journal of heart failure, 2018. **20**(3): p. 445-459.
6. Goodwin, G.H., C. Sanders, and E.W. Johns, *A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids*. Eur J Biochem, 1973. **38**(1): p. 14-9.
7. Pellegrini, L., et al., *HMGB1 and repair: focus on the heart*. Pharmacol Ther, 2019. **196**: p. 160-182.
8. Ferrari, S., et al., *The mouse gene coding for high mobility group 1 protein (HMG1)*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 28803-8.
9. Gariboldi, M., et al., *Mapping of the Hmg1 gene and of seven related sequences in the mouse*. Mamm Genome, 1995. **6**(9): p. 581-5.
10. Sessa, L. and M.E. Bianchi, *The evolution of High Mobility Group Box (HMGB) chromatin proteins in multicellular animals*. Gene, 2007. **387**(1-2): p. 133-40.
11. Wen, L., et al., *A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1*. Nucleic acids research, 1989. **17**(3): p. 1197-1214.
12. Hardman, C.H., et al., *Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy*. Biochemistry, 1995. **34**(51): p. 16596-607.
13. He, M., et al., *Exploring the biological functional mechanism of the HMGB1/TLR4/MD-2 complex by surface plasmon resonance*. Mol Med, 2018. **24**(1): p. 21.
14. Kim, Y.H., et al., *N-linked glycosylation plays a crucial role in the secretion of HMGB1*. J Cell Sci, 2016. **129**(1): p. 29-38.
15. Bonaldi, T., et al., *Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion*. Embo j, 2003. **22**(20): p. 5551-60.
16. Oh, Y.J., et al., *HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5800-9.
17. Tang, D., et al., *Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide)-induced HMGB1 cytoplasmic translocation and release*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7376-84.
18. Jain, A., G. Wang, and K.M. Vasquez, *DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential*. Biochimie, 2008. **90**(8): p. 1117-1130.
19. Gaillard, C. and F. Strauss, *High affinity binding of proteins HMG1 and HMG2 to semicatenated DNA loops*. BMC Molecular Biology, 2000. **1**(1): p. 1.

20. Alexandrova, E.A., L.N. Marekov, and B.G. Beltchev, *Involvement of protein HMG1 in DNA replication*. FEBS Lett, 1984. **178**(1): p. 153-5.
21. Agrawal, A. and D.G. Schatz, *RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination*. Cell, 1997. **89**(1): p. 43-53.
22. Ke, S., et al., *Downregulation of high mobility group box 1 modulates telomere homeostasis and increases the radiosensitivity of human breast cancer cells*. Int J Oncol, 2015. **46**(3): p. 1051-8.
23. Kato, J. and C.I. Svensson, *Chapter Nine - Role of Extracellular Damage-Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) as Mediators of Persistent Pain*, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, T.J. Price and G. Dussor, Editors. 2015, Academic Press. p. 251-279.
24. Antoine, D.J., et al., *A systematic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins*. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 2014. **20**(1): p. 135-137.
25. Yang, H., et al., *MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling*. The Journal of experimental medicine, 2015. **212**(1): p. 5-14.
26. Venereau, E., et al., *Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release*. The Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(9): p. 1519-1528.
27. Yang, H., et al., *Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1)*. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 2012. **18**(1): p. 250-259.
28. Janko, C., et al., *Redox modulation of HMGB1-related signaling*. Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(7): p. 1075-1085.
29. Limana, F., et al., *Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation*. Circ Res, 2005. **97**(8): p. e73-83.
30. Nakamura, Y., et al., *High Mobility Group Box 1 Promotes Angiogenesis from Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells after Myocardial Infarction*. J Atheroscler Thromb, 2015. **22**(6): p. 570-81.
31. Foglio, E., et al., *HMGB1 Inhibits Apoptosis Following MI and Induces Autophagy via mTORC1 Inhibition*. J Cell Physiol, 2017. **232**(5): p. 1135-1143.
32. Andrassy, M., et al., *High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart*. Circulation, 2008. **117**(25): p. 3216-26.
33. Zhang, L., et al., *Extracellular high-mobility group box 1 mediates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure*. J Cell Mol Med, 2016. **20**(3): p. 459-70.
34. Goldstein, R.S., et al., *Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia*. Shock, 2006. **25**(6): p. 571-4.
35. Kohno, T., et al., *Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodelling*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 565-73.
36. Wang, L.J., et al., *Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure*. Eur J Heart Fail, 2011. **13**(4): p. 440-9.
37. Wang, L.J., et al., *Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure*. European Journal of Heart Failure, 2011. **13**(4): p. 440-449.

38. Volz, H.C., et al., *HMGB1 is an independent predictor of death and heart transplantation in heart failure*. *Clinical Research in Cardiology*, 2012. **101**(6): p. 427-435.
39. Riad, A., et al., *MD-2 is a new predictive biomarker in dilated cardiomyopathy and exerts direct effects in isolated cardiomyocytes*. *Int J Cardiol*, 2018. **270**: p. 278-286.
40. Kümmel, A., et al., *High-Mobility Group Box Protein 1 Is an Independent Prognostic Marker for All-Cause Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy*. *The American Journal of Cardiology*, 2022. **178**: p. 119-123.
41. Harris, H.E., U. Andersson, and D.S. Pisetsky, *HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2012. **8**(4): p. 195-202.
42. Berger, R., et al., *B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure*. *Circulation*, 2002. **105**(20): p. 2392-7.
43. Gardner, R.S., et al., *N-terminal pro-brain natriuretic peptide: A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure*. *European Heart Journal*, 2003. **24**(19): p. 1735-1743.
44. Liu, T., et al., *Increased serum HMGB1 level may predict the fatal outcomes in patients with chronic heart failure*. *International Journal of Cardiology*, 2015. **184**: p. 318-320.
45. Sørensen, M.V., et al., *Plasma High-Mobility Group Box 1 Levels Predict Mortality After ST-Segment Elevation Myocardial Infarction*. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 2011. **4**(3): p. 281-286.
46. Opal, S.M., et al., *Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock*. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999. **180**(5): p. 1584-1589.
47. Yücel, G., et al., *Lipopolysaccharides induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 2935.
48. Asada, M., et al., *Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein Levels and the Incidence of Cardiovascular Disease in a General Japanese Population: The Hisayama Study*. *Journal of the American Heart Association*, 2019. **8**(21): p. e013628.
49. Reiner, A.P., et al., *Soluble CD14: genomewide association analysis and relationship to cardiovascular risk and mortality in older adults*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2013. **33**(1): p. 158-164.
50. Rørth, R., et al., *Comparison of BNP and NT-proBNP in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction*. *Circ Heart Fail*, 2020. **13**(2): p. e006541.
51. Orphanou, N., E. Papatheodorou, and A. Anastakis, *Dilated cardiomyopathy in the era of precision medicine: latest concepts and developments*. *Heart Fail Rev*, 2022. **27**(4): p. 1173-1191.
52. Napoli, C., et al., *Precision medicine in distinct heart failure phenotypes: Focus on clinical epigenetics*. *Am Heart J*, 2020. **224**: p. 113-128.
53. Schiano, C., et al., *Machine Learning and Bioinformatics Framework Integration to Potential Familial DCM-Related Markers Discovery*. *Genes (Basel)*, 2021. **12**(12).

8 Anhang

8.1 High-Mobility Group Box Protein 1 Is an Independent Prognostic Marker for All-Cause Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy

High-Mobility Group Box Protein 1 Is an Independent Prognostic Marker for All-Cause Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy



Andreas Kümmel, PhD^{a,b,1}, Stefan Gross, PhD^{a,b,1}, Rico Feldtmann, PhD^{a,b}, Bishwas Chamling, MD^{a,b}, Anne Strohbach, PhD^{a,b}, Kristin Lehnert, MD^{a,b}, Martin Bahls, PhD^{a,b}, Lisa Loerzer, BSc^a, Katharina Moormann, MD^a, Jeannine Witte, PhD^c, Alexander Riad, MD^d, Marcus Dörr, MD^{a,b}, Jens Fielitz, MD^{a,b}, and Stephan B. Felix, MD^{a,b,*}

High-mobility group box protein 1 (HMGB1) is released during tissue damage and activates the innate immune system through toll-like receptor 4. Because mortality in dilated cardiomyopathy (DCM) is associated with activation of the innate immune system, we hypothesized that HMGB1 possesses a prognostic value in estimating mortality in patients with DCM. We determined HMGB1 and N-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) levels in 67 patients with DCM (12 women, mean age 53.6 ± 1.5 years). Kaplan–Meier analyses revealed that higher levels of HMGB1 and NT-proBNP are related to increased all-cause mortality. Multivariable Cox regression confirmed HMGB1 as a risk factor for mortality in patients with DCM, independent of NT-proBNP, age, and gender (hazard ratio per 1 SD 1.920, 95% confidence interval 1.401 to 2.631, $p < 0.001$). HMGB1 is a promising candidate to estimate the prognosis of patients with DCM. © 2022 Elsevier Inc. All rights reserved. (Am J Cardiol 2022;178:119–123)

Dilated cardiomyopathy (DCM) is characterized by left ventricular (LV) dilatation and systolic dysfunction in the absence of known abnormal loading conditions or significant coronary artery disease.^{1–3} Causes of DCM can be classified as genetic or nongenetic.³ The innate immune system contributes to development and progression of DCM.^{4,5} It is activated through pattern recognition receptors (PRRs) that either recognize pathogen-associated molecular patterns (e.g., the membrane component of gram-negative bacteria lipopolysaccharide [LPS]) or damage-associated molecular patterns (e.g., high-mobility group box protein 1 [HMGB1]).⁴ Toll-like receptor 4 (TLR4), one of the most important PRRs,⁴ is supported by its coreceptors, such as LPS binding protein (LBP), cluster of differentiation 14 (CD14), and myeloid differentiation factor-2, for signal transduction.⁶ Recently, we showed that the combined measurement of myeloid differentiation factor-2, a mandatory coreceptor

of TLR4, and N-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) plasma levels was superior in predicting mortality in patients with DCM compared with NT-proBNP plasma levels alone.⁷ HMGB1, a nonhistone binding protein, which is released because of cell death,⁸ was also shown to predict survival in patients with heart failure.⁹ Once released to the extracellular space, HMGB1 can activate TLR4,¹⁰ which in turn leads to the activation of endothelial cells and immune cells, such as monocytes.⁴ Therefore, we hypothesized that HMGB1 has a prognostic value in estimating mortality of patients with DCM. We assessed whether HMGB1 and TLR4 c-receptors and activators, LBP, CD14, and LPS, are risk factors for increased mortality in patients with DCM.

Methods

We used data of 67 patients with DCM (12 women, mean age 53.6 ± 1.5 years) from a prospective DCM cohort, with a first hospital admission between August 2005 and September 2010.⁷ Inclusion criteria were reduced LV ejection fraction <40% and dilated LV end-diastolic diameter, according to HENRY score >117%. Exclusion criteria were primary valvular diseases (≥second degree), acute myocarditis according to Dallas criteria, active infection diseases, pulmonary diseases, cancer, chronic alcoholism, and heart failure of other origins.⁷ All patients received heart failure medication according to the guidelines of the European Society of Cardiology (ESC).^{1,11,12} Mean survival time was 7.5 years (0.48 months to 11.61 years) and was assessed until March 2017, using official data from the residents' registration office. All patients gave written informed consent. This study's protocol conforms to the ethical

^aDepartment of Internal Medicine B, Cardiology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany; ^bDZHK (German Center for Cardiovascular Research), Partner Site Greifswald, Germany; ^cInstitute of Physiology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany; and ^dInternal Medicine (Cardiology), DRK-Krankenhaus Teterow gGmbH, Teterow, Germany. Manuscript received January 27, 2022; revised manuscript received and accepted May 16, 2022.

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, Bonn, Germany), FI 965/5-2 to Dr. Fielitz, FI 965/9-1 to Dr. Fielitz, the DZHK (German Center for Cardiovascular Research, Berlin, Germany), partner site Greifswald, 81X2400109 to Dr. Felix and 81Z5400153 to Dr. Fielitz.

See page 5 for disclosure information.

¹Drs. Kümmel and Gross contributed equally as first authors.

*Corresponding author: Tel: +49-3834-86-80500; fax: +49-3834-86-80502.

E-mail address: felix@med.uni-greifswald.de (S.B. Felix).

guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee of the University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany (Reg-Nr IIIUV 30/04 to 34/04).

All echocardiographic parameters were measured as recommended by the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging.¹³ LV ejection fraction was determined according to Simpson biplane method. LV dilatation was determined by measurement of LV end-diastolic diameter in long-axis M-mode. LV mass (LVM) was calculated according to the Devereux formula. Left atrial volume (LAV) was estimated using the biplane area-length method. LA long-axis dimension and area were measured from standard apical 2- and 4-chamber views at end-systole. LVM index and left atrial volume index were calculated using body surface area according to Du Bois formula.

Blood samples were collected by standard forearm vein puncture. Plasma and serum were obtained after centrifugation at 2.000 g for 10 minutes at room temperature. Before

serum-centrifugation, blood samples were kept at room temperature for 30 minutes to allow blood clotting. Serum levels of LPS (Cusabio, Cologne, Germany), CD14 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) and LBP (USCN Life Science Inc., Wuhan, China) and plasma levels of NT-proBNP (Fine Biotech Co., Wuhan, China) and HMGB1 (HMGBiotech, Milano, Italy) were quantified using enzyme-linked immunoassay technique according to the manufacturer's protocol.

Patients with DCM were divided into 2 groups according to the median plasma level of HMGB1 (0.53 ng/ml). A group with plasma levels equal or below the median (i. e., ≤ 0.53 ng/ml) was categorized as "low" HMGB1 (HMGB1^{low}, n = 34), whereas values above the median (i. e., >0.53 ng/ml) were classified as "high" HMGB1 (HMGB1^{high}, n = 33). The same strategy was applied for NT-proBNP (median: 1,721 pg/ml), LBP (median: 477.46 ng/ml), CD14 (median: 1,506.46 ng/ml), and LPS (median 24.67 pg/ml). Baseline characteristics of patients in both HMGB1 groups were compared using *t* test for continuous

Table 1
Baseline characteristics by median HMGB1 levels

Parameter	HMGB1 (ng/ml)		p-Value
	Low (≤ 0.53 , N=34)	High (>0.53 , N=33)	
Age [years]	52.8 \pm 2.2	54.4 \pm 2.0	0.583
Female	8 (24%)	4 (12%)	0.341
LVEF [%]	28.8 \pm 1.0	29.8 \pm 1.1	0.504
LVEDD Henry [%]	144 \pm 3	146 \pm 2	0.641
LVMi [g/m ² BSA]	204 \pm 10	207 \pm 74	0.045
LAVI [mL/m ² BSA]	32.7 \pm 2.5	34.1 \pm 2.1	0.432
Follow-up [years]	8.5 \pm 0.6	6.4 \pm 0.7	0.022
Disease duration [years]	1.5 \pm 0.6	2.0 \pm 0.7	0.588
Mitral valve regurgitation (< grade 2)	8 (24%)	15 (45%)	0.075
NT-proBNP [pg/ml]	2781 \pm 519	2887 \pm 460	0.883
CRP [mg/ml]	6.0 \pm 1.0	12.4 \pm 4.2	0.136
Leukocyte count [GPT/L]	7.5 \pm 0.3	8.0 \pm 0.6	0.456
Hematocrit [l/l]	0.42 \pm 0.01	0.44 \pm 0.01	0.237
Median NYHA class (25 th ;75 th)	III (I;III)	II (I;IV)	0.523
Body mass index [kg/m ²]	26.6 \pm 0.6	28.2 \pm 0.7	0.116
Systolic blood pressure [mmHg]	123 \pm 2	114 \pm 3	0.035
Diastolic blood pressure [mmHg]	80 \pm 2	74 \pm 2	0.093
Smoker	19 (56%)	18 (55%)	1.000
Diabetes mellitus [N (%)]	6 (18%)	9 (27%)	0.392
Devices			
ICD [N (%)]	5 (15%)	7 (21%)	0.539
Pacemaker [N (%)]	2 (6%)	1 (3%)	0.567
Medication			
Beta-blockers [N (%)]	29 (85%)	33 (100%)	0.709
ACE / AT1-inhibitors [N (%)]	34 (100%)	33 (100%)	1.000
Aldosterone-antagonists [N (%)]	11 (32%)	14 (42%)	0.455
Statins [N (%)]	14 (41%)	10 (30%)	0.447
TLR4 co-receptors			
CD14 [ng/ml]	1546 \pm 56	1552 \pm 77	0.951
LBP [ng/ml]	955 \pm 148	725 \pm 129	0.258
TLR4 activators			
LPS [pg/ml]	36.7 \pm 4.5	34.0 \pm 4.9	0.685
HMGB1 [ng/ml]	0.29 \pm 0.03	0.59 \pm 0.05	—

Statistical analyses were performed using a two-tailed t-test for continuous variables or chi2 test for categorical variables.

ACE = angiotensin converting enzyme; AT1 = angiotensin-II-receptor-subtype-1; CRP = C-reactive protein; ICD = implantable cardioverter-defibrillator; IVS = inter ventricular septum; LAVI = left atrial volume index; LVEDD = left ventricular end-diastolic diameter; LVEF = left ventricular ejection fraction; LVMi = left ventricular mass index; NT-proBNP = N-terminal pro B-type natriuretic peptide; NYHA = New York Heart Association.

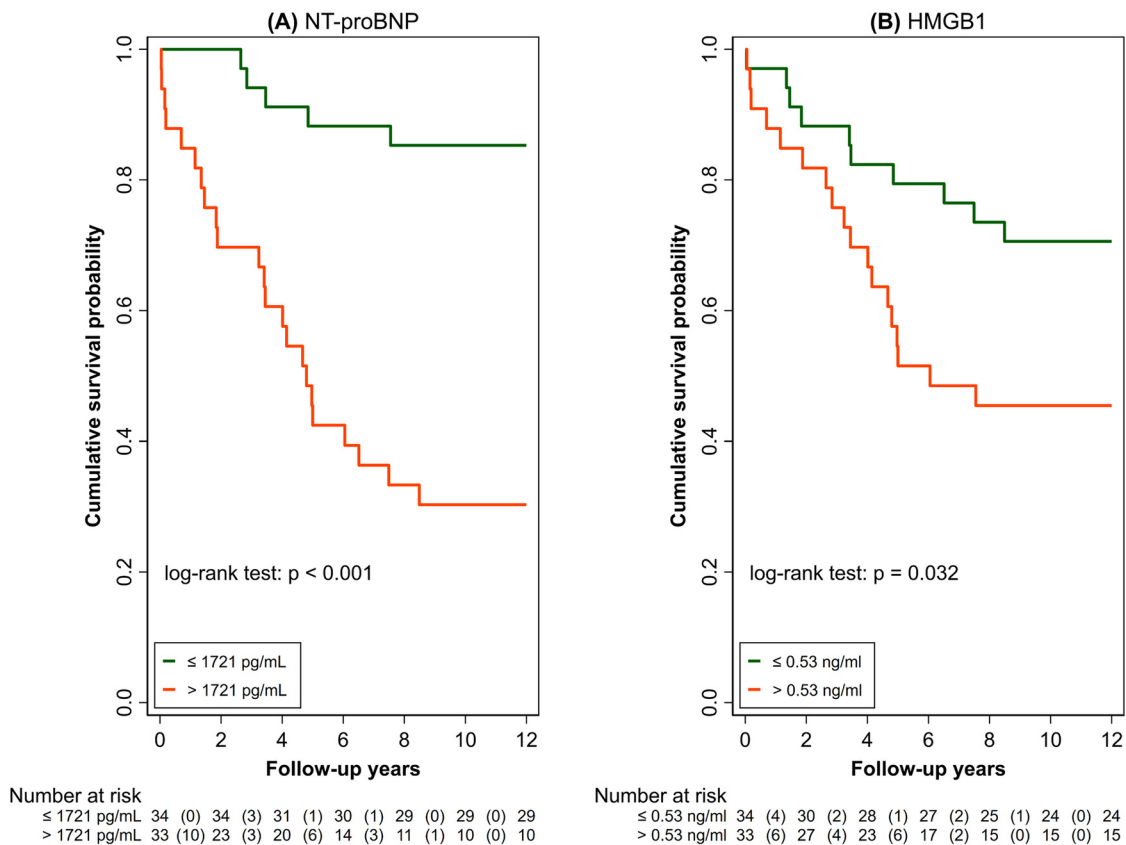


Figure 1. Kaplan–Meier analyses for all-cause mortality. Patients were observed over 12 years with survival as outcome and divided according to median plasma levels of (A) NT-proBNP and (B) HMGB1. Statistical differences were determined by means of a log-rank test. The risk table below each figure shows how many patients are in the risk area at the indicated time points.

variables or chi-square test for categoric variables. To compare Kaplan–Meier survival estimates between groups, log-rank tests were used. Association of HMGB1 plasma levels with all-cause mortality was analyzed using a multivariable Cox regression model with age, gender, and NT-proBNP as covariables. For comparability, all biomarker parameters were z-transformed. Hazard ratios (HRs) per 1 SD are reported with 95% confidence intervals (CIs). Data are expressed as mean \pm SEM and a $p < 0.05$ was considered statistically significant, unless otherwise stated. All statistical analyses were done with STATA 14 (StataCorp. 2015, StataCorp, College Station, Texas).

Results

Baseline characteristics of the 67 patients with DCM are summarized in Table 1. There were no group differences regarding age, gender, echocardiographic parameters (except for LV mass index), disease duration, cardiovascular risk factors (except for systolic blood pressure), and medication (Table 1). Furthermore, no group differences for LBP, CD14, and LPS plasma levels were observed.

Figure 1 shows Kaplan–Meier survival estimates of all patients stratified by plasma levels of NT-proBNP and HMGB1 in each “low” versus “high” group at baseline, respectively. Among the patients ($n = 33$) in the NT-proBNP^{high} group ($>1,721$ pg/ml), 23 died (absolute mortality rate

69.7%), whereas 5 died (absolute mortality rate 14.7%) among the subjects ($n = 34$) in the NT-proBNP^{low} group (log-rank test: chi-square = 22.22 $p < 0.001$; Figure 1).

Comparing patients in the HMGB1^{high} group (>0.53 ng/ml; $n = 33$) with those in the HMGB1^{low} group ($n = 34$), we observed 18 versus 10 deaths (absolute mortality rates 55% vs 29%). Thus, patients with HMGB1^{high} had a significantly lower survival probability (log-rank test: chi-square = 4.59, $p = 0.032$; Figure 1). In contrast, no significant differences in mortality rates between median-cut groups were detected for CD14, LBP, and LPS (Figure 2).

In a multivariable Cox regression model (Table 2), plasma levels of HMGB1 were positively associated with all-cause mortality, independent of age, gender, and NT-proBNP. The standardized HR for patients whose HMGB1 plasma level was 1 SD higher was 1.920 (95% CI 1.401 to 2.631, $p < 0.001$) but lower compared with NT-proBNP (HR 2.777, 95% CI 2.006 to 3.845, $p < 0.001$).

Discussion

There is still an unmet need for reliable biomarkers to predict the prognosis of patients with DCM. NT-proBNP is the gold standard used to estimate the prognosis in all stages of heart failure.^{1,12,14} In our study, a new potential biomarker, HMGB1, was compared with the established marker, NT-proBNP, using a multivariable Cox regression

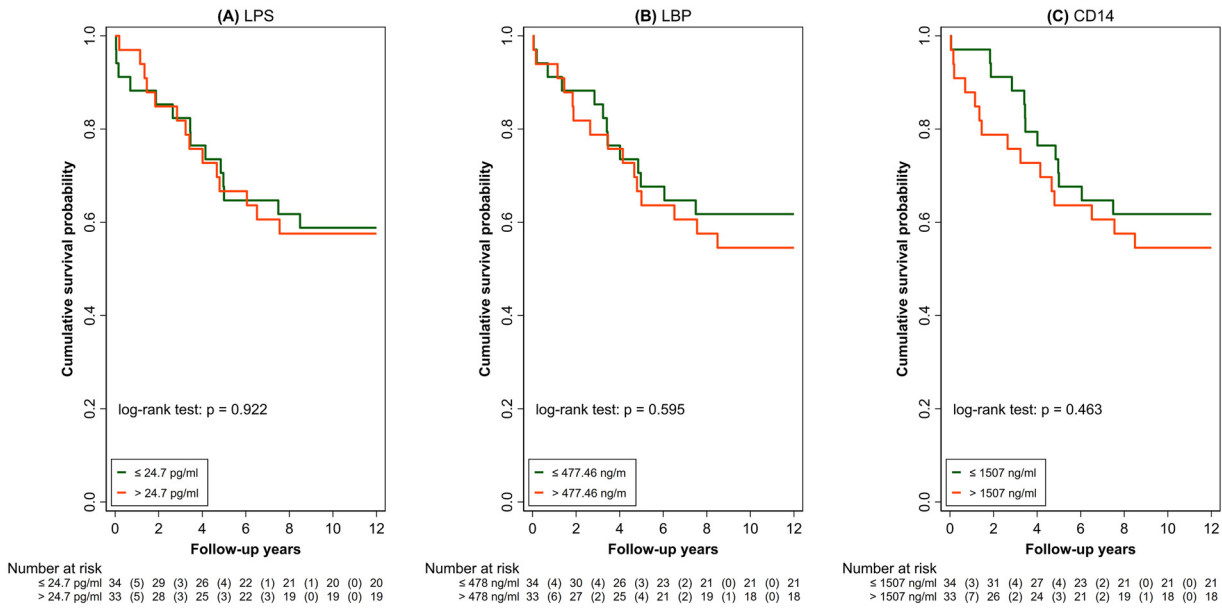


Figure 2. Patients were observed over 12 years with survival as outcome and divided according to median plasma levels of (A) CD14, (B) LBP and (C) LPS. Statistical differences were determined by a log-rank test. The risk table below each figure shows how many patients are in the risk area at the indicated time points.

model. Z-transformation of all included parameters allowed a direct comparison of the prognostic value between HMGB1 and NT-proBNP. HMGB1 was associated with the prognosis of DCM, independent of NT-proBNP but with a lower HR than NT-proBNP.

Our results are in line with a clinical study by Wang et al that showed that in patients with heart failure, elevated HMGB1 serum levels were associated with impaired cardiac function, symptoms, and clinical outcome.¹⁵ Both in the latter study and in our study, the extracellular form of HMGB1 was determined. The extracellular form of HMGB1 possesses inflammatory or chemotactic properties and increases the production of cytokines, such as tumor necrosis factor, interleukin (IL)-1, and IL-6.¹⁶ In an ischemia-reperfusion injury mouse model, Andrassy et al¹⁷ have mimicked this process and demonstrated that HMGB1 treatment leads to severe inflammation in the reperfused myocardium. They reported a time-dependent increase of IL-6 and tumor necrosis factor in murine macrophages after HMGB1 treatment.¹⁷ Mechanistically, HMGB1 is released into the extracellular milieu by apoptotic or necrotic cells

or damaged tissue¹⁸ and binds to TLR4.¹⁰ Thus, we determined serum levels of TLR4 to be cofactors of LPS, LBP, and CD14 as well. However, none of them were related to overall mortality, which may be explained by the fact that LBP and CD14 do not activate TLR4.⁶ Regarding LPS, it is known that this penta-ampere is derived from gram-negative bacteria, and we hypothesize that these microorganisms are of minor importance in DCM. In contrast, HMGB1 is released by injured or dying cells or by damaged extracellular matrix and subsequently activates TLRs.⁴ In our study, a causal relation between increased HMGB1 levels and TLR4 activation was not directly investigated. On the basis of our data and considering that the innate immunity plays a role in the pathogenesis of heart failure, it is conceivable that HMGB1 plays a role in DCM prognosis.

To the best of our knowledge, this study is the first to report on the association of plasma levels of HMGB1 with mortality in DCM. Due to methodologic constraints, which are related to the small sample size, the development of a comprehensive prediction model as a potential clinical score, including HMGB1 in patients with DCM, was not possible. To investigate whether quantification of HMGB1 improves risk stratification of patients with DCM in terms of predicting disease progression and mortality, further prospective studies with larger patient cohorts are needed.

We identified HMGB1 as a biomarker, which was associated with mortality in patients with DCM. The 3 main aspects should be clarified in future clinical trials. First, a causal relation between HMGB1 plasma levels and TLR4 activation needs to be proved. Second, it needs to be shown whether or not HMGB1 has any additional prognostic value (to NT-proBNP). Finally, it should be analyzed whether (1) HMGB1 levels increase with disease progression and (2) if there is an association between HMGB1 plasma levels and the disease course.

Table 2
Multivariable Cox regression analyses for all-cause mortality

Variable	Hazard ratio (per 1 SD)	95% Confidence interval	p-Value
NT-proBNP	2.777	[2.006; 3.845]	<0.001
HMGB1	1.920	[1.401; 2.631]	<0.001
Age	1.029	[0.993; 1.066]	0.112
Sex (female)	1.033	[0.341; 5.908]	0.341

The table shows multivariable Cox regression analyses including NT-proBNP, HMGB1, age and sex as parameters. All parameters were z-transformed in advance. Data are presented as estimated hazard ratio, p-value and 95% confidence interval.

NT-proBNP = N-terminal pro-brain-type natriuretic peptide; HMGB1 = high-mobility group box protein 1.

Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2022.05.014>.

- McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A, ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021;42:3599–3726.
- Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, Adler Y, Anastasakis A, Böhm M, Duboc D, Gimeno J, de Groote P, Imazio M, Heymans S, Klingel K, Komajda M, Limongelli G, Linhart A, Mogensen J, Moon J, Pieper PG, Seferovic PM, Schueler S, Zamorano JL, Caforio AL, Charron P. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* 2016;37:1850–1858.
- Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, Fu M, Helio T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto YM, Ristic A, Schultheiss H-P, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott PM. European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. 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. *Eur Heart J* 2013;34:2636–2648.
- Frantz S, Falcao-Pires I, Balligand JL, Bauersachs J, Brutsaert D, Ciccarelli M, Dawson D, de Windt LJ, Giacca M, Hamdani N, Hilfiker-Kleiner D, Hirsch E, Leite-Moreira A, Mayr M, Thum T, Tocchetti CG, van der Velden J, Varricchi G, Heymans S. The innate immune system in chronic cardiomyopathy: a European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on myocardial function of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2018;20:445–459.
- Mann DL. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res* 2015;116:1254–1268.
- Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 2013;45:e66.
- Riad A, Gross S, Witte J, Feldtmann R, Wagner KB, Reinke Y, Weitmänn K, Empen K, Beug D, Westermann D, Lindner D, Klingel K, Dörr M, Hoffmann W, Felix SB. MD-2 is a new predictive biomarker in dilated cardiomyopathy and exerts direct effects in isolated cardiomyocytes. *Int J Cardiol* 2018;270:278–286.
- Kato J, Svensson CI. Role of extracellular damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) as mediators of persistent pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;131:251–279.
- Volz HC, Laohachewin D, Schellberg D, Wienbrandt AR, Nelles M, Zugck C, Kaya Z, Katus HA, Andrassy M. HMGB1 is an independent predictor of death and heart transplantation in heart failure. *Clin Res Cardiol* 2012;101:427–435.
- Weng H, Deng Y, Xie Y, Liu H, Gong F. Expression and significance of HMGB1, TLR4 and NF- κ B p65 in human epidermal tumors. *BMC Cancer* 2013;13:311.
- Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Lévy S, Linde C, Lopez-Sendon JL, Nieminen MS, Piérard L, Remme WJ. Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26:1115–1140.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016;37:2129–2200.
- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt JU. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16:233–270.
- Januzzi JL, Troughton R. Are serial BNP measurements useful in heart failure management? Serial natriuretic peptide measurements are useful in heart failure management. *Circulation* 2013;127:500–508.
- Wang LJ, Lu L, Zhang FR, Chen QJ, De Caterina R, Shen WF. Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011;13:440–449.
- Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, Liu J, Antonelli A, Preti A, Raeli L, Shams SS, Yang H, Varani L, Andersson U, Tracey KJ, Bachi A, Ugucioni M, Bianchi ME. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med* 2012;209:1519–1528.
- Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, Buss S, Autschbach F, Pleger ST, Lukic IK, Bea F, Hardt SE, Humpert PM, Bianchi ME, Mairbörl H, Nawroth PP, Remppis A, Katus HA, Bierhaus A. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation* 2008;117:3216–3226.
- Martinotti S, Patrone M, Ranzato E. Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer. *ImmunoTargets Ther* 2015;4:101–109.

Supplementary material

High mobility group box protein 1 (HMGB1) as a prognostic marker for all-cause mortality in patients with dilated cardiomyopathy

Running title:

HMGB1 in DCM

Andreas Kümmel, PhD^{a,b,†}, Stefan Gross, PhD^{a,b,†}, Rico Feldtmann, PhD^{a,b}, Bishwas Chamling, MD^{a,b}, Anne Strohbach, PhD^{a,b}, Kristin Lehnert, MD^{a,b}, Martin Bahls, PhD^{a,b}, Lisa Loerzer, BSc^a, Katharina Moormann, MD^a, Jeannine Witte, PhD^c, Alexander Riad, MD^d, Marcus Dörr, MD^{a,b}, Jens Fielitz, MD^{a,b}, Stephan B. Felix, MD^{a,b*}

^aDepartment of Internal Medicine B, Cardiology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

^bDZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Greifswald, Germany

^cInstitute of Physiology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

^dDRK-Krankenhaus Teterow gGmbH, Internal Medicine (Cardiology), Teterow, Germany

[†]contributed equally

21 Detailed methods

22 Echocardiography

23 LVEF was determined according to Simpson's biplane method. LV dilatation was determined
24 by measurement of LVEDD in long-axis M-mode. Left ventricular mass (LVM) was calculated
25 according to Devereux's formula Left atrial volume (LAV) was estimated using the biplane
26 area-length method [1]. LA long axis dimension and area were measured from standard
27 apical 2- and 4-chamber views at end-systole. LVM index and LAV index were calculated
28 using body surface area (BSA) according to Du Bois' formula [2].

29 Blood samples

30 Plasma and serum were obtained after centrifugation at 2.000 x g for 10 min at room
31 temperature. Prior to serum-centrifugation blood samples were kept at room temperature for
32 30 min to allow blood clotting. Samples were stored at -80 °C [3]. Serum levels of LPS
33 (CUSABIO, Cologne, GER), CD14 (R&D Systems, Minneapolis, USA) and LBP (USCN Life
34 Science Inc., Wuhan, CHN) as well as plasma levels of NT-proBNP (Fine Biotech Co.,
35 Wuhan, CHN) and HMGB1 (HMGBiotech, Milano, ITA), were quantified using ELISA
36 technique according to the manufacturer's protocol.

37 According to the manufacturer data sheet the intra-assay coefficient of variation (CV) was 10.2-3.2%
38 in the high-sensitivity, and 13.7-5.5% in the normal range and the inter-assay CV was 10.7-1.3% in the
39 high-sensitivity, and 13.7-7.6% in the normal range. Recovery of concentrations was 93.4% (86.6-
40 100.2%) in the high-sensitivity, and 99.6% (94.7%-104.6%) in the normal range. Analytical Specificity
41 (cross-reactivity to HMGB2) was <2.0%. Sensitivity was 0.1 ng/ml for the high-sensitivity range and
42 0.2 ng/ml for the normal range. Furthermore, according to the manufacturer, in apparently healthy
43 people HMGB1 ranges are 0 to 2.7 ng/ml

44 Statistics

45 Baseline characteristics of patients in both HMGB1 groups were compared using t-test for
46 continuous variables or chi2 test for categorical variables. To compare Kaplan-Meier survival
47 estimates between groups, log-rank tests were used. Association of HMGB1 plasma levels
48 with all-cause mortality was analyzed using a multivariable Cox regression model with age,
49 sex and NT-pro BNP as co-variables. For comparability all biomarker parameters were z-
50 transformed. Hazard ratios (HR) per one standard deviation (SD) are reported with 95%
51 confidence intervals (CI). Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM)
52 and a p-value < 0.05 was considered statistically significant, unless otherwise stated. All
53 statistical analyses were done with STATA 14 (StataCorp. 2015, College Station, TX:
54 StataCorp LP).

55

56 **Additional Results**57 **Table S1**

58 **Number of mortality events and unadjusted incidence rates [95% confidence intervals] per 100**
 59 **person-years for combinations of NT-proBNP and HMGB1 median-cut levels.**

		HMGB1	
		Low	High
NT-proBNP	Low	2 1.1 [0.2-9.5]	3 1.7 [0.5-7.6]
	High	8 5.8 [2.7-12.9]	15 26.6 [15.1-44.6]

60

61

62 **Table S2**

63 **Cross-table of NT-proBNP/HMGB1 combinations versus all-cause mortality status. Fisher's**
 64 **exact test: $p < 0.001$.**

		all-cause mortality status		Total
		alive	dead	
NT-proBNP	HMGB1			
low	low	15	2	17
high	low	9	8	17
low	high	14	3	17
high	high	1	15	16
	Total	39	28	

65

66

67

68 **Additional references**

- 69 1. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N.
70 Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings.
71 American Journal of Cardiology. 1986;57(6):450-458.
- 72 2. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and
73 weight be known. 1916. Nutrition. 1989;5(5):303-311; discussion 312-303.
- 74 3. Ottestad W, Rognes IN, Skaga E, Frisvoll C, Haraldsen G, Eken T, Lundback P. HMGB1
75 concentration measurements in trauma patients: assessment of pre-analytical conditions and sample
76 material. Molecular Medicine. 2019;26(1).

77

8.2 Veröffentlichungen

Publikationen

Kümmel, A., et al., High-Mobility Group Box Protein 1 Is an Independent Prognostic Marker for All-Cause Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology*, 2022. 178: p. 119-123.

Feldtmann, R., **Kümmel A.**, et al., Myeloid differentiation factor-2 activates monocytes in patients with dilated cardiomyopathy. *Immunology*, 2022. 167(1): p. 40-53.

Vorträge

Feldtmann R, **Kuemmel A**, Riad A, Chamling B, Strohbach A, Westermann D, Lindner D, Felix SB. The immune protein MD-2 is associated with early death in dilated cardiomyopathy and increases M1 macrophage polarization and recruitment in vitro. *European Heart Journal*, Volume 40, Issue Suppl 1, October 2019, ehz746.0096

Kuemmel A, Feldtmann R, Strohbach A, Riad A, Chamling B, Felix SB. The involvement and interplay of HMGB1 with soluble MD-2 in dilated cardiomyopathy and its impact in immune cell recruitment. *European Heart Journal*, Volume 40, Issue Suppl 1, October 2019, ehz746.0102

Kuemmel A, Feldtmann R, Strohbach A, Riad A, Chamling B, Felix SB. Interplay of HMGB1 with soluble MD-2 in dilated cardiomyopathy and its impact in immune cell recruitment. *Clin Res Cardiol* 108, Suppl 1, April 2019 - Beitrag V1178. DOI: 10.1007/s00392-019-01435-9

Feldtmann R, **Kuemmel A**, Riad A, Chamling B, Strohbach A, Westermann D, Lindner D, Felix SB. Soluble MD-2 in patients with inflammatory and idiopathic dilated cardiomyopathy is associated with M1 macrophage polarization and early death. *Clin Res Cardiol* 107 Suppl 1, April 2018 - Beitrag V1167. DOI: 10.1007/s00392-018-1216-4

Feldtmann R, **Kuemmel A**, Abdiu E, Chamling B, Felix SB, Busch R, Strohbach A. Maturing B lymphocytes in the setting of acute myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 107 Suppl 1, April 2018 - Beitrag V824. DOI: 10.1007/s00392-018-1216-4

Posterbeiträge

Feldtmann R, **Kuemmel A**, Riad A, Chamling B, Strohbach A, Klingel K, Gross S, Doerr M, Westermann D, Lindner D, Felix SB. Soluble MD-2 in patients with dilated cardiomyopathy is associated with early death and M1 macrophage polarization and recruitment. *European Heart Journal*, Volume 39, Issue suppl_1, 1 August 2018, ehy565.P1504. – certified as **best poster** in the category *OMICS in cardiomyopathies*

Kuettel A, Stohbach A, Riad A, Chamling B, Gross S, Doerr M, Felix SB, Feldtmann R. Correlation of soluble HMGB1 with MD-2 serum levels in dilated cardiomyopathy European Heart Journal, Volume 39, Issue suppl_1, 1 August 2018, ehy565.P1506. – certified as **best poster** in the category *OMICS in cardiomyopathies*

Feldtmann R, **Kuettel A**, Abdiu E, Chamling B, Gross S, Doerr M, Felix SB, Busch R, Strohbach A. Elevated counts of naïve and memory B cells might be associated with the severity of myocardial damage in the setting of acute myocardial infarction. European Heart Journal, Volume 39, Issue suppl_1, 1 August 2018, ehy565.P1693

Kuettel A, Strohbach A, Chamling B, Riad A, Felix SB, Feldtmann R. Correlation of soluble HMGB1 with serum MD-2 levels in dilated cardiomyopathy. Clin Res Cardiol 107, Suppl 1, April 2018

Feldtmann R, **Kuettel A**, Abdiu E, Chamling B, Groß S, Felix SB, Busch R and Strohbach A. Elevated counts of naïve and memory B cells might be associated with the severity of myocardial damage in the setting of acute myocardial infarction. FASEB J. 32, 1_supplement: 717.2