

Echokardiographische Charakterisierung und microRNA
Profil im Mausmodell für Angiotensin II-induzierte
Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

David Adrian Kraft

aus Gießen

Gießen 2017

Aus dem Franz-Grödel-Institut der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim

AG Experimentelle Kardiologie

Leiter: PD Dr. Christian Troidl

Gutachter: PD Dr. C. Troidl

Gutachter: Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Disputation: 21.08.2017

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
HFpEF	1
Definition.....	1
Epidemiologie.....	2
Ätiologie	3
Pathophysiologie.....	4
RAAS und diastolische Dysfunktion.....	7
Diagnostik.....	9
Therapie	12
microRNA	14
Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	21
Materialien.....	21
Tiermodell	24
Ethische Grundlagen.....	24
Versuchsaufbau.....	24
Operationstechnik	25
Vorbereitung zur Echokardiographie	26
Euthanasie/Gewebeaufarbeitung	26
Methodik.....	27
Grundlagen transthorakale echokardiographische Untersuchung	27
2D-Modus	27
M-Modus	28
Flussdoppler.....	28

Gewebedoppler	28
Molekularbiologische Untersuchungen	30
mRNA Extraktion aus Gewebe	30
Photospektrometrische RNA-Quantifizierung.....	30
microRNA Extraktion aus Gewebe	30
Qualitätskontrolle der microRNA und mRNA	31
microRNA Microarray.....	31
PCR-Gel-Primertest.....	33
Reverse Transkription der mRNA	33
qRT-PCR	34
TaqMan qRT-PCR.....	35
Reverse Transkription der microRNA.....	36
microRNA qRT-PCR	37
Statistische Analyse	38
3 Ergebnisse	40
Echokardiographie.....	40
Herzfrequenz.....	40
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion	41
Verkürzungsfraktion	42
Linksventrikulärer enddiastolischer innerer Durchmesser, Interventrikuläre Septumdicke	43
Isovolumetrische Relaxationszeit	44
Dezelerationszeit.....	45
E/A-Ratio.....	46
E/E'	47
E'/A'	48
E' septal	49

qRT-PCR.....	50
Bestimmung von BNP	50
Connective Tissue Growth Factor	51
Kollagen 1 und Kollagen 3	52
TIMP 2.....	53
SERCA 2	54
microRNA-Microarray	55
Volcano Plot	55
Tabellarische Darstellung ausgewählter Daten	57
microRNA qRT-PCR	58
miR-21	59
miR-29c	60
miR-15b.....	61
miR-133a	62
miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b, miR-133b	63
miR-214, miR-709, let-7a, let-7e.....	64
4 Diskussion.....	65
Auswahl des Tiermodells	65
Nachweis der HFpEF unter Angiotensin-II Stimulation im Mausmodell.....	67
Klinische Zeichen und Symptome.....	67
LVEF - Systolische Funktion	68
BNP	69
Echokardiographische Zeichen der diastolischen Funktionsstörung.....	70
Vergleich zu anderen Studien.....	73
Bewertung.....	75
Bestätigung der Auswirkungen von Angiotensin II auf molekularer Ebene.....	77
microRNA	79

Bewertung und Ausblick	84
Zusammenfassung	87
Summary	89
Abkürzungsverzeichnis.....	90
Abbildungsverzeichnis	94
Tabellenverzeichnis	95
Literaturverzeichnis	96
Veröffentlichungen.....	118
Erklärung zur Dissertation	119
Danksagung.....	120
Lebenslauf	121

1 Einleitung

HFpEF

Definition

Der Begriff Herzinsuffizienz beschreibt die Unfähigkeit des Herzens, eine ausreichende Versorgung der Organe und Gewebe des Körpers mit Blut und folglich mit Sauerstoff zu gewährleisten. Die Minderversorgung mit Sauerstoff, die Kompensationsmechanismen des Organismus und die Veränderungen der Kreislaufverhältnisse führen zu den klinischen Symptomen dieser Erkrankung. Beispiele dieser Symptome sind Müdigkeit, Leistungsminderung, Dyspnoe und Flüssigkeitsretention. Ursächlich ist dabei eine durch verschiedene Faktoren bedingte funktionelle oder strukturelle kardiale Störung. Diese kann sowohl in einer systolischen als auch in einer diastolischen Dysfunktion münden. Bei einer systolischen Funktionsstörung kommt es durch eine unzureichende Kontraktionsfähigkeit des Myokards zu einem verminderten Auswurf aus dem Ventrikel, welcher sich letztlich in einer verminderten Ejektionsfraktion widerspiegelt (HFrEF = Heart Failure with reduced Ejection Fraction). Bei der diastolischen Dysfunktion hingegen ist die Füllung des Ventrikels durch verminderte Relaxationsfähigkeit oder erhöhte Steifigkeit beeinträchtigt. Ist die EF trotz Vorliegen von Zeichen der Herzinsuffizienz sowie der diastolischen Funktionsstörung nicht erniedrigt, wird diese Form der Herzinsuffizienz definitionsgemäß als Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion bezeichnet (HFpEF = Heart Failure with preserved Ejection Fraction). Der Begriff der erhaltenen Ejektionsfraktion bedeutet, dass eine systolische Funktionsstörung vorhanden sein kann, die Auswurffraktion jedoch nicht maßgeblich reduziert ist. Zusätzlich erfolgt seit Veröffentlichung der ESC Leitlinien 2016 die Einteilung in eine weitere Gruppe, die HFmrEF. Diese Gruppe schließt die zuvor bestehende Lücke in der Definition zwischen der HFpEF, mit einer $EF \geq 50\%$ und der HFrEF mit einer $EF < 40\%$ (McMurray et al. 2012). Die HFmrEF beschreibt folglich die Entität einer Herzinsuffizienz mit mittelgradiger (mid-range) Ejektionsfraktion (Ponikowski et al. 2016).

Darüber hinaus wird die Herzinsuffizienz in eine akute und chronische Herzinsuffizienz unterteilt. Hierbei kann „akut“ sowohl ein plötzliches Eintreten aus dem zuvor nicht insuffizienten Herzen („de novo“), als auch eine rasche Dekompensation einer vorbestehenden chronischen Herzinsuffizienz bedeuten. Der Begriff „chronische Herzinsuffizienz“ beschreibt ein konstantes Vorliegen gleichbleibender Symptome über mindestens einen Monat. Der Schweregrad der Herzinsuffizienz wird entsprechend der NYHA Klassifikation nach Ausprägung der Symptome und Belastungsfähigkeit definiert (Ponikowski et al. 2016).

Epidemiologie

Obwohl die Herzinsuffizienz bereits jetzt zu einer der häufigsten internistischen Erkrankungen zählt, nimmt die Relevanz in einer zunehmend alternden Gesellschaft, mit höherer Lebenserwartung und besserer Behandlung akuter kardialer Ereignisse, weiter zu. Die Prävalenz liegt in der erwachsenen Bevölkerung der ökonomisch höher entwickelten Länder etwa bei 1-2% (Redfield et al. 2003). Dabei ist ab einem Alter von ≥ 70 Jahren mehr als jeder Zehnte von einer Herzinsuffizienz betroffen (Mosterd und Hoes 2007). In frühen Studien wurde die Relevanz der HFpEF unterschätzt. Es wurde davon ausgegangen, dass lediglich etwa ein Drittel der Patienten mit Herzinsuffizienz an einer Herzinsuffizienz mit normaler Auswurfraction leiden. Weiterhin nahm man an, dass Morbidität und Mortalität deutlich unter der der systolischen Herzinsuffizienz liegen. Zurückliegende Studien ergaben einen Anteil der HFpEF Patienten an allen Herzinsuffizienzpatienten, von zwischen 22 bis 73 % (van Riet et al. 2016; Tiller et al. 2013; Filippatos und Parissis 2011; Peyster et al. 2004). Diese große Variation beruht unter anderem auf den unterschiedlichen Diagnose- und Einschlusskriterien der entsprechenden statistischen Erhebungen. Darüber hinaus kommt es nach Analyse früherer Studien scheinbar zu einer relativen Zunahme der HFpEF an allen Herzinsuffizienzfällen. Die Prävalenz der HFpEF hingegen zeigt sich tendenziell rückläufig. Die mittlere Prävalenz der HFpEF liegt laut einer Metaanalyse verschiedener Studien mit 4,9 % etwas höher als die der HFpEF mit 3,3 % (van Riet et al. 2016). Weiterhin zeigen sich eine im Alter zunehmende Prävalenz sowie eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechtes. Als Vorerkrankung liegt häufig eine

arterielle Hypertonie vor (Bui et al. 2011; MAGGIC 2012). Patienten mit Herzinsuffizienz und verminderter EF hingegen sind jünger, mehrheitlich männlich und haben in der Anamnese oftmals eine ischämische Herzerkrankung (Mosterd et al. 1999).

Die Gesamtmortalitätsrate der HFrEF ist höher als die der HFpEF. Hierbei zeigt sich eine um 32 % geringe 3 Jahres-Mortalität der HFpEF im Vergleich zur HFrEF. Bezüglich der Morbidität und Hospitalisationsrate nähern sich beide Entitäten zunehmend an (MAGGIC 2012; Steinberg et al. 2012).

Obwohl die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz tendenziell stabil bleibt, nimmt die relative Prävalenz der HFpEF unter allen Herzinsuffizienzfällen mit etwa 1% pro Jahr stetig zu (Owan et al. 2006). Die Gründe hierfür liegen einerseits in der verbesserten Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Ereignisse sowie einer Reduktion der Mortalitätsrate in Folge besserer Behandlungsmöglichkeiten der HFrEF. Andererseits zeigen sich hingegen keine positiven Entwicklungen der Therapieoptionen für die HFpEF. Die Mortalitätsrate dieser Form der Herzinsuffizienz bleibt konstant. Der demographische Wandel hin zur älteren Bevölkerung und ein damit verbundener statistischer Anstieg der Prävalenz von Risikofaktoren für die HFpEF unterstützen diesen Trend.

Ätiologie

Die Ursachen und Risikofaktoren der multifaktoriell bedingten HFpEF sind bisher nicht ausreichend geklärt. Aktuell sind wenige zufriedenstellende Studienergebnisse vorhanden und die Ergebnisse der vorhandenen Studien sind nicht einheitlich. Wie bei der HFrEF sind häufig eine Koronare Herzerkrankung, ein Herzinfarkt, Herzklappenerkrankungen, eine arterielle Hypertonie, Herzrhythmusstörungen oder andere Erkrankungen, wie beispielsweise Kardiomyopathien, Teil der Krankheitsvorgeschichte der Patienten. Das Vorkommen von ischämischen und valvulären Herzerkrankungen ist im Falle der HFpEF geringer ausgeprägt als bei der HFrEF, wohingegen eine arterielle Hypertonie und Vorhofflimmern sehr häufig als Grunderkrankung vorliegen. Des Weiteren tritt die HFpEF häufiger als die HFrEF in höherem Alter auf und ist deutlicher mit dem weiblichen Geschlecht, Diabetes mellitus

und Adipositas assoziiert. Zusätzliche Risikofaktoren stellen Anämien, Lungen- und Nierenerkrankungen dar (Owan et al. 2006; MAGGIC 2012; Ho et al. 2013).

Pathophysiologie

So unterschiedlich die Ursachen der HFpEF sind, so unterschiedlich sind auch die zugrunde liegenden Pathomechanismen der diastolischen Funktionsstörung. Unabhängig von der Ursache ist die Füllung des Ventrikels in der Diastole durch eine erhöhte passive Steifigkeit des Myokards beziehungsweise durch eine verminderte aktive Relaxationsfähigkeit beeinträchtigt (Zile et al. 2004). Folglich erhöht sich der notwendige Druck zur Füllung des Ventrikels. Entsprechend der verlängerten Dauer der Relaxations- und Füllungsphase, sinkt der Druck nach der Systole zu langsam ab und die erneute Füllung wird zusätzlich erschwert. Die diastolischen Drücke nehmen hierbei, insbesondere unter höheren Frequenzen, zu (Wachter et al. 2009).

Da der Ventrikel in der Diastole nicht mehr in der Lage ist das Blut wie zuvor zu größten Teilen passiv aufzunehmen, muss der Beitrag des Vorhofs zur Füllung des Ventrikels steigen (Phan et al. 2009b). Das Druck-Volumen-Diagramm erfährt eine Verschiebung nach oben und links (Zile et al. 2004). Infolge der konstant erhöhten enddiastolischen Drücke steigt der pulmonal venöse Druck dauerhaft an (Lam et al. 2009).

Im Gegensatz zur HFrEF führt die HFpEF eher zu konzentrischer statt zu exzentrischer Hypertrophie des Herzens, was ein höheres Massen-Volumenverhältnis zur Folge hat. Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen von Patienten mit HFpEF ist im Gegensatz zur systolischen Herzinsuffizienz normal oder leicht vermindert (van Heerebeek et al. 2006).

Zudem kommt es bei der HFpEF zu Veränderungen der ventrikulär-arteriellen Koppelung. Neben einer vermehrten ventrikulären Steifigkeit führt eine zunehmende arterielle Rigidität zu einer überschießenden Blutdruckreaktion in Folge von Änderungen der Vor- oder Nachlast. Daher kommt es bei steigender Nachlast zu deutlich erhöhten Blutdruckwerten, mit einer weiteren Abnahme der Relaxationsfähigkeit und erneut ansteigenden Füllungsdrücken (Borlaug und Kass

2008). Dieser Mechanismus führt zusätzlich zu einer Belastungsintoleranz der Patienten sowie zu stark schwankenden Blutdruckverhältnissen (Hundley et al. 2001).

Die chronotrope Inkompetenz stellt einen weiteren Grund für die verminderte Belastbarkeit der Patienten mit HFpEF dar. Durch eine reduzierte Katecholaminsensitivität kommt es bei diesen Patienten zu keinem ausreichenden Anstieg der Herzfrequenz unter Belastung (Borlaug et al. 2006).

Die Ursachen der pathologischen mechanischen Myokardeigenschaften sind vielfältig und liegen vermutlich in einer Modifikation der extrazellulären Matrix sowie veränderten passiven und aktiven mechanischen Eigenschaften der kardialen Myozyten (Borlaug und Paulus 2011). Bisher bleibt nicht abschließend festzuhalten, ob es sich bei den biomechanischen und molekularbiologischen Beobachtungen um Ursachen oder Resultate der diastolischen Funktionsstörung handelt.

Bei den Veränderungen der extrazellulären Matrix, die eine diastolische Funktionsstörung auslösen können, steht das Strukturprotein Kollagen im Vordergrund. Es kann dabei im Rahmen eines fibrotischen Umbaus zu einer Anhäufung von Kollagen im Interstitium, einer Erhöhung des Verhältnisses von Kollagen I zu Kollagen III und zu einer vermehrten Quervernetzung des Kollagens kommen (Weber et al. 1993; Kasner et al. 2011). Bei Diabetes mellitus und im Alter kann die Steifigkeit des Ventrikels auch durch Quervernetzung infolge von Glykierung des Kollagens verändert werden und zur diastolischen Funktionsstörung beitragen (Aronson 2003).

Der Gesamtgehalt des Kollagens in der extrazellulären Matrix wird durch die Genexpression des Kollagens in den Fibroblasten, die Aktivität der kollagenabbauenden Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie deren Inhibitoren (Tissue-Inhibitors-of-Matrix-Metalloproteinases, TIMPs) bestimmt. Bei der hypertensiven Herzerkrankung konnte entsprechend eine reduzierte Aktivität der MMPs nachgewiesen werden und es zeigte sich eine vermehrte Expression der TIMPs (Ahmed et al. 2006b). Im Plasma konnte in Folge dessen ein Anstieg von Biomarkern des Kollagenumsatzes dargestellt werden (Lopez et al. 2010; Gonzalez et al. 2010).

Patienten mit HFpEF zeigen hypertrophierte Kardiomyozyten mit einem etwa 50% größeren Durchmesser und einer dichteren Myofilamentanordnung als Gesunde (van Heerebeek et al. 2006). Weiterhin kommt es zu einem Wechsel von der weniger

dehnbaren und kürzeren Isoform N2B des Strukturproteins Titin zur Isoform N2BA. Dies resultiert in einem gesteigerten Verhältnis N2BA:N2B in Folge einer erhöhten Ruhespannung der Myozyten (Nagueh et al. 2004; Borbely et al. 2005). Es zeigen sich zusätzlich Hinweise, dass ein Phosphorylationsdefizit von Titin N2B durch Proteinkinase A und Proteinkinase G besteht (Kruger et al. 2009; Borbely et al. 2009). Eine unter oxidativem Stress eintretende Bildung von Disulfidbrücken innerhalb der Titinmoleküle trägt, gemeinsam mit der veränderten Phosphorylierung, zusätzlich zu einer gesteigerten intrinsischen Steifigkeit der Kardiomyozyten bei (Grutzner et al. 2009)

Veränderungen in der Kalzium-Homöostase können über eine erhöhte Ruhespannung ebenfalls in einer diastolischen Dysfunktion resultieren. Wenn es zu einer unphysiologischen Anhäufung in den Kardiomyozyten oder einer verminderten Ausfuhr von Kalzium aus diesen kommt, kann die Kontraktion nicht rechtzeitig und nicht vollständig beendet werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression der sarcolemmalen Kalzium-Pumpe SERCA sowie die verminderte Phosphorylierung ihres inhibitorischen Proteins Phospholamban, durch eine Anhäufung von Kalzium in der Zelle zu einer verminderten Relaxationsfähigkeit führen können (Bers et al. 2003).

Grundlegend für die aktive Relaxation der Kardiomyozyten ist das Lösen der Querbrücken der Myofilamente Aktin und Myosin nach der Kontraktionsphase. Dieses kann in vielfältiger Weise gestört sein und eine verschlechterte Relaxation nach sich ziehen. Beispielsweise erhöht die verminderte Phosphorylierung von Troponin I die Kalziumsensitivität der Myofibrillen und führt dadurch zu einem verspäteten Lösen der Querbrücken (Ramirez-Correa und Murphy 2007).

Da das Lösen der Querbrücken der Myofilamente ein energieabhängiger Prozess ist, kann eine Unterversorgung der Herzmuskelzellen mit Sauerstoff, wie bei KHK oder starker Hypertrophie, zu einem verminderten Angebot an ATP führen und die Relaxation ebenfalls behindern (Phan et al. 2009a; Smith et al. 2006).

Die Relaxationsfähigkeit des Ventrikels wird außerdem durch die Wirkung von Stickstoffmonoxid moduliert. Es führt zu geringerer Kalziumsensitivität der Myozyten und schnellerer Kalzium-Wiederaufnahme in das sarcoplasmatische Retikulum (Paulus et al. 1994). Ersteres wird induziert durch Phosphorylierung von Troponin I und

letzteres durch Inhibition von Phospholamban. Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Entkopplung der kardialen NO-Synthetase zu einer diastolischen Dysfunktion führt (Silberman et al. 2010).

RAAS und diastolische Dysfunktion

Die bei der Herzinsuffizienz erhöhte Belastung des Herzmuskels, das verminderte Herzzeitvolumen und die Unterversorgung mit Sauerstoff führen auf Dauer zu vielfältigen Kompensationsreaktionen des kardiovaskulären Systems. Neben funktionellen und kurzfristigen Reaktionen wie dem Frank-Starling-Mechanismus oder einer reflektorischen Tachykardie, kommt es auch zu Anpassungsreaktionen im neurohumoralen System. Unter diesem Begriff wird eine Reihe von kurz und längerfristig wirkenden Hormonen zusammengefasst. Dazu zählen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das sympathoadrenerge System, die natriuretischen Peptide sowie Vasopressin und Endothelin. Die Ausschüttung dieser Hormone führt unter anderem zu einer Erhöhung des Herzzeitvolumens durch erhöhte Herzfrequenz und Schlagkraft. Außerdem erfolgt eine Anhebung der Nachlast des Herzens durch periphere Vasokonstriktion sowie eine Erhöhung der Vorlast in Folge einer Volumenretention (Baig et al. 1998).

Obwohl die kurzfristige Kompensation der Herzinsuffizienz durch diese Systeme vorübergehend erfolgreich ist, führt die dauerhafte Aktivierung dieser Kompensationsmechanismen zu Umbauvorgängen des Herzmuskelgewebes und trägt dadurch grundlegend zum weiteren Progress der Erkrankung bei. Besonders die Hormone des RAAS tragen über systemische und lokale Wirkungen zur Hypertrophie- und Fibroseinduktion bei und führen weiterhin durch Flüssigkeitsretention und Vasokonstriktion zur Volumenüberladung des Herzkreislaufsystems. Dies bedingt, insbesondere im Hinblick auf die HFpEF, steigende diastolische Füllungsdrücke (Weber et al. 1994; Dempsey et al. 1971).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System scheint dabei über autokrine und parakrine Effekte eine Schlüsselfunktion in der Pathophysiologie der Entwicklung der diastolischen Funktionsstörung zu haben (Chinnaiyan et al. 2005).

Angiotensin II führt bei Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor AT1R zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen, darunter ERK1/2, JNK sowie p38-MAPK. Diese bedingen ein vermehrtes Zellwachstum und tragen dadurch zur Hypertrophie der Kardiomyozyten bei (Mehta und Griendling 2007).

Neben der Induktion myokardialer Hypertrophie steht auch die profibrotische Wirkung von Angiotensin II und Aldosteron im Vordergrund der Pathogenese der diastolischen Dysfunktion.

Angiotensin II und Aldosteron stimulieren über Ihre jeweiligen Rezeptoren Fibroblasten zur Produktion von Kollagen I und III. Zusätzlich modulieren sie die Expression von ECM modifizierenden Enzymen wie MMPs und TIMPs (Deschamps und Spinale 2006).

Ferner fördert Angiotensin II die perivaskuläre Inflammation des kardiovaskulären Systems, die ihrerseits zytokin- und wachstumsfaktorabhängig zu perivaskulärer Fibrose führt (Tokuda et al. 2004; Brown 2008). Eine Schlüsselfunktion haben dabei der Wachstumsfaktor TGFbeta und die Zytokine TNFalpha sowie IL-6 inne. Im Rahmen der Angiotensin II induzierten perivaskulären Inflammation werden diese von in den perivaskulären Raum einwandernden Lymphozyten und Makrophagen vermehrt produziert. Nachfolgend erhalten diese Faktoren die Inflammation aufrecht und führen zusätzlich zu einer vermehrten Kollagendisposition durch Fibroblasten sowie zu einer Zunahme der myokardialen Hypertrophie (Lim et al. 2005; Li et al. 2000).

Neben der Produktion von TGFbeta über Immunzellen im Rahmen der Inflammation kommt es unter Einwirkung von Angiotensin II auch zu einer direkten Produktion dieses Wachstumsfaktors in Fibroblasten und Myozyten (Campbell und Katwa 1997). Des Weiteren erhöht TGFbeta die Expression des profibrotischen Wachstumsfaktors CTGF in Fibroblasten und Myozyten des Herzens. Dieser wiederum erhöht die Expression von Kollagen I, PAI-1 sowie Fibronectin und wirkt dadurch zusätzlich profibrotisch (Chen et al. 2000).

Darüberhinaus bedingen eine endotheliale Dysfunktion, die perivaskuläre Inflammation sowie die durch Angiotensin II und Aldosteron induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies einen verstärkten oxidativen Stress (Sun et al. 2002). Dieser führt zu

einer geringeren Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, dessen relaxierende Wirkung entgegen der diastolischen Dysfunktion ausbleibt (Silberman et al. 2010).

Diagnostik

Zu Beginn der Erforschung der HFpEF gab es keine einheitlichen Kriterien für die Diagnostik dieser Erkrankung. Durch die zuvor unbekannte Relevanz waren die ersten Daten häufig Nebenprodukte aus Studien über Herzinsuffizienz mit systolischer Funktionsstörung. Die Vergleichbarkeit späterer Studien war auf Grund uneinheitlicher Einschlusskriterien oftmals nicht gegeben. Es zeigte sich in den folgenden Jahren, dass es sich bei der HFpEF um eine klinisch relevante eigenständige Erkrankung handelt und klinische Vorgaben für die Diagnostik benötigt werden. Aus diesem Anlass erstellte eine Arbeitsgruppe der European Society of Cardiology im Einklang zu den jeweils aktuellen experimentellen und klinischen Forschungsergebnissen die „Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der Herzinsuffizienz“. Das fortschreitende Verständnis der Erkrankung, das zunehmende Bewusstsein über die sozioökonomische Relevanz der Herzinsuffizienz sowie die Fortschritte in der Diagnostik und Therapie veranlassten zuletzt eine Überarbeitung dieser Leitlinien im Jahr 2016 (Ponikowski et al. 2016).

Die Diagnosestellung der HFpEF erfordert nach den Leitlinien der ESC von 2016 drei Bedingungen:

- Es müssen Zeichen oder Symptome einer Herzinsuffizienz bestehen (I)
- Es muss eine normale oder nur leicht verminderte systolische Auswurffrac-tion vorliegen (II)
- Es muss eine laborchemische Erhöhung der natriuretischen Peptide nachweisbar sein und es müssen apparativ darstellbare Zeichen einer strukturellen Herzerkrankung bestehen, welche auf eine diastolische Dysfunktion hinweisen (III)

(I) - Zu den Symptomen und Zeichen der Herzinsuffizienz zählen unter anderem Rasselgeräusche bei der Lungenauskultation, eine Jugularvenenstauung, ein Lungenödem, die Dyspnoe bei Belastung oder in Ruhe, Knöchelödeme, ein

lateralisierter Herzspitzenstoß und vermehrte Müdigkeit. Schwierigkeiten bereiten dabei häufig die Beurteilung der Symptome sowie die differenzialdiagnostische Abgrenzung zu anderen Erkrankungen. Beispielsweise zeigt sich dies in Bezug auf die Dyspnoe, welche eines der frühesten und führenden Symptome darstellt. Insbesondere bei alten und übergewichtigen Menschen, die eine besondere Risikogruppe für die HFpEF verkörpern, ergeben sich hierbei Probleme in der differenzialdiagnostischen Abgrenzung. Entsprechend zeigt sich bezüglich oben genannter Zeichen und Symptome eine geringe Spezifität für die Diagnostik der Herzinsuffizienz (Oudejans et al. 2011). Der Anamneseerhebung mit Erfassung der bekannten Risikofaktoren einer Herzinsuffizienz und insbesondere der HFpEF wird hierbei zur weiteren Abgrenzung ein besonderer Stellenwert beigemessen.

(II) - Die normale oder nur leicht verminderte Auswurffraktion des Herzens ist definiert als LVEF > 50%. Diese stellt den Anteil des in der Systole ausgeworfenen Volumens am enddiastolisch bestehenden Volumen des linken Ventrikels dar. Hierbei wird die Planimetrie nach Simpson in 2 Ebenen, gegebenenfalls unter Verwendung eines Kontrastmittels zur besseren Darstellung der Endokardgrenzen, empfohlen (Lang et al. 2015a).

(III) - Zusätzlich wird eine Erhöhung des Serumspiegels der natriuretischen Peptide auf > 35 pg/mL für BNP und > 125 pg/mL für nt-pro-BNP als Kriterium gefordert. Da BNP und nt-proBNP unter erhöhter kardialer Wandspannung vermehrt ins Blut sezerniert werden, gelten sie als Hinweis auf das wahrscheinliche Vorliegen einer Herzinsuffizienz als Ursache der Symptome. Dies ermöglicht eine vorläufige Abgrenzung gegenüber anderen Differenzialdiagnosen (Weber und Hamm 2006).

Ferner wird der Nachweis einer funktionellen oder strukturellen Veränderung des Herzens als Hinweis auf das Vorliegen einer diastolischen Funktionsstörung neben den erhöhten Spiegeln natriuretischer Peptide gefordert.

Als direkter echokardiographischer Hinweis auf eine strukturelle Veränderung und als Resultat der erhöhten Füllungsdrücke wird ein linksatrialer Volumenindex (LAVI) von > 34 mL/m² beziehungsweise ein linksventrikulärer Massenindex (LVMI) von ≥ 115

g/m^2 für Männer sowie von $\geq 95 \text{ g/m}^2$ für Frauen als ausreichendes Kriterium angesehen (Lang et al. 2015a).

Einen zusätzlichen hinreichenden echokardiographischen Hinweis auf eine funktionelle Veränderung im Sinne einer diastolischen Dysfunktion liefert ein $E/E' \geq 13$. Es handelt sich dabei um den Quotienten aus der maximalen Geschwindigkeit des frühen transmitralen Blutflusses (E) und der maximalen frühen Gewebegeschwindigkeit im Bereich des Mitralringes (E'). Daneben stellt auch ein aus Mittelwert der septal und lateral durchgeführten Messung bestimmtes $E' < 9 \text{ cm/s}$ einen Nachweis dar (Paulus et al. 2007; Caballero et al. 2015).

Weiteren Aufschluss über das Vorliegen einer funktionellen Veränderung kann ein echokardiographischer Stress-Test liefern. Hierbei werden unter Belastung, im Hinblick auf die diastolische Funktion, das E/E' Verhältnis, die Geschwindigkeit der Trikuspidalklappenregurgitation (als Marker des pulmonalarteriellen Druckes) sowie die Änderungen des Herzzeitvolumens, bestimmt (Donal et al. 2016).

Ebenfalls kann eine invasive intrakardiale Druckmessung mit Nachweis eines erhöhten pulmonal-kapillären Verschlussdruckes oder eines erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druckes zur weiteren diagnostischen Abgrenzung hinzugezogen werden. Diese Untersuchungen können ebenfalls sowohl in Ruhe als auch unter Belastung durchgeführt werden (Borlaug et al. 2010).

Neben den echokardiographischen Hauptkriterien gibt es auch indirekte echokardiographische Hinweise auf das Vorliegen einer diastolischen Funktionsstörung. Diese stellen sich als Folge der unphysiologischen linksventrikulären Relaxation oder myokardialen Steifigkeit dar.

In den zurückliegenden Leitlinien waren dabei die 2D und die Blutfluss-Doppler Echokardiographie als eigenständige Kriterien ausreichend für die Evaluierung der diastolischen Funktion und die Diagnosestellung der HFpEF. Die Abhängigkeit einiger dieser Parameter von der Progression der diastolischen Funktionsstörung, bis hin zur Pseudonormalisierung bestimmter Werte im Verlauf der Erkrankung, wurde auf Grund der dadurch entstehenden diagnostischen Unsicherheiten zu einem Kritikpunkt.

Auch wenn uns mit der Bestimmung des E/E' Verhältnisses ein vorlastunabhängiger Parameter zur Verfügung steht (Nagueh et al. 1997), erlaubt die Bestimmung

klassischer, in der M-Mode-, 2D- und Blutfluss-Doppler-Echokardiographie ermittelter Parameter dennoch Rückschlüsse auf das Bestehen einer diastolischen Funktionsstörung (Cohen et al. 1996).

Zu den auf eine Relaxationsstörung des linken Ventrikels hinweisenden Parametern der Doppler-Messung zählen laut aktueller ESC Leitlinie das Verhältnis von früher und atrialer Welle im Mitraleinflussprofil $E/A < 1$, die Dezelerationszeit des frühen Geschwindigkeitsmaximums über der Mitralklappe (DT) $> 220\text{ms}$ sowie eine Isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) $> 110\text{ms}$. Ein $E/A > 2$, eine DT $< 140\text{ms}$ und eine IVRT $< 60\text{ms}$ weisen hingegen auf ein restriktives Füllungsmuster hin (Ponikowski et al. 2016).

Therapie

Bisher gibt es noch keine kausalen Therapien der HFpEF, welche die Morbidität und Mortalität der Patienten signifikant positiv beeinflussen. Die in Klinik und Forschung verfolgten Ansätze entsprechen den medikamentösen Therapieoptionen der HFrEF und verfolgen die Besserung der Symptome der Herzinsuffizienz beziehungsweise der Grund- und Begleiterkrankungen. Entsprechend zeigt sich in klinischen Studien, dass Patienten mit HFpEF und HFrEF in ähnlicher Häufigkeit mit den Leitsubstanzen der Herzinsuffizienztherapie behandelt werden (Maggioni et al. 2013).

Das RAAS nimmt nach aktuellen Kenntnissen eine zentrale Rolle in der Genese der diastolischen Dysfunktion ein und es ist seit einigen Jahren bekannt, dass eine klare Prognoseverbesserung für Patienten mit HFrEF unter Therapie mit Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (ACEI) und Angiotensin Rezeptor-1 Blockern (ARB) besteht (CONSENSUS 1987; SOLVD 1992; McMurray et al. 2003). Dennoch konnte in den bisher durchgeführten Studien zur Anwendung von ACEIs und ARBs bei Patienten mit HFpEF keine signifikante Besserung der Prognose festgestellt werden.

So zeigte sich in den Studien PEP-CHF (Cleland et al. 2006), I-PRESERVE (Massie et al. 2008) und CHARM-Preserved (Yusuf et al. 2003) unter Einnahme von Perindopril, Irbesartan und Candesartan keine signifikante Verbesserung der Gesamtmortalität oder der HFpEF-bedingten Hospitalisierungsrate.

Ein weiteres grundlegendes Element in der Therapie der Herzinsuffizienz stellen Beta-Rezeptorenblocker dar. Positive Effekte dieser Medikamentengruppe für die HFrEF, im Hinblick auf Reduktion von Mortalität und Hospitalisationsrate, bestätigten sich in verschiedenen großen Studien (MERIT-HF 1999; CIBIS-II 1999; Packer et al. 2002). Im Bezug auf die HFpEF konnten sich diese Ergebnisse, unter Anwendung von Nebivolol, nicht bestätigen. Es zeigte sich jedoch eine geringe Reduktion der Gesamtmortalität und krankheitsbezogenen Hospitalisationsrate für ältere Patienten (Flather et al. 2005; Mulder et al. 2012).

Im Vergleich zu den deutlich positiven Effekten der Aldosteronantagonisten Spironolacton (Pitt et al. 1999) und Eplerenon (Zannad et al. 2011) auf Mortalität und Hospitalisation der HFrEF, konnten diese Effekte kein entsprechendes Ergebnis in der Übertragung auf die HFpEF erreichen (Pitt et al. 2014).

Der Einsatz des Herzglykosid Digoxin erbrachte sowohl bei reduzierter (Ziff et al. 2015) als auch bei erhaltener Ejektionsfraktion keine Prognoseverbesserung (Ahmed et al. 2006a).

Den wichtigsten Stellenwert in der symptomorientierten Therapie der Herzinsuffizienz nimmt die diuretische Therapie zur Behandlung der stauungsbedingten Beschwerden, ein. Dieser positive Effekt bestätigt sich für alle Formen der Herzinsuffizienz (Faris et al. 2002).

Die neue Medikamentengruppe der Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitoren konnte, unter Anwendung von LCZ696 bei Patienten mit HFpEF, eine signifikante Reduktion des nt-proBNP-Spiegels nach 12 Wochen im Vergleich zu Valsartan erreichen (Solomon et al. 2012). Nachfolgende Studien werden zeigen, ob sich diese Effekte auch auf die Mortalität oder Hospitalisationsrate dieses Patientenkollektives auswirken.

microRNA

MicroRNAs sind kleine, 19-25 Nukleotide lange, nichtkodierende, einzelsträngige RNA Sequenzen, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene spielen. Die erste microRNA wurde 1993 in *Caenorhabditis elegans* gefunden und zunächst als genetische Eigenheit dieser Fadenwürmer betrachtet (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). Später stellte sich heraus, dass microRNAs entscheidende Funktionen in der Genregulation der einzelnen Zelle und des Organismus von Pflanzen, Tieren und Mensch haben (Pasquinelli et al. 2000). Dies betrifft sowohl die Entwicklung und Physiologie als auch die Pathophysiologie verschiedenster Systeme.

Die Produktion der microRNA beginnt im Zellkern durch die Transkription von mehrere Kilobasen langen pri-microRNA Sequenzen mit Hilfe der RNA Polymerase II. Nachfolgend nimmt die pri-microRNA eine haarnadelförmige und dadurch doppelsträngige Struktur an (Lee et al. 2004). Diese doppelsträngigen Bereiche werden durch einen Multiproteinkomplex, der auch Microprozessor genannt wird (enthält die RNase DROSHA und das RNA-Bindeprotein PASHA), herausgeschnitten (Denli et al. 2004; Gregory et al. 2004; Lee et al. 2003) und zur Weiterverarbeitung als 70 Nukleotide lange pre-microRNA mittels Exportin 5 aus dem Zellkern befördert (Yi et al. 2003). Dort wird die pre-microRNA durch die RNase Dicer in einen ca. 19-25 Nukleotide langen Doppelstrang geschnitten (Chendrimada et al. 2005). Dieser wird an Argonaut-Proteine gebunden und in einen Komplex namens RISC (RNA-induced-silencing-complex) geladen. Dabei bleibt nur einer der beiden microRNA-Stränge zurück und erfüllt als reife microRNA innerhalb des RISC seine Funktion. Die microRNA kann nun an einen komplementären messenger-RNA (mRNA) Strang, im Bereich seiner 3'UTR, binden und diese mRNA im Falle einer perfekten oder nahezu perfekten Bindung spalten und degradieren. Falls der entsprechende mRNA-Strang nur teilweise komplementär ist, bindet die microRNA unvollständig und stattdessen erfolgt die Inhibition der Translation dieser mRNA. Die meisten microRNAs binden unvollständig, weshalb die Inhibition, gegenüber der Spaltung und Degradation, im Vordergrund steht (Hutvagner und Zamore 2002; Khvorova et al. 2003).

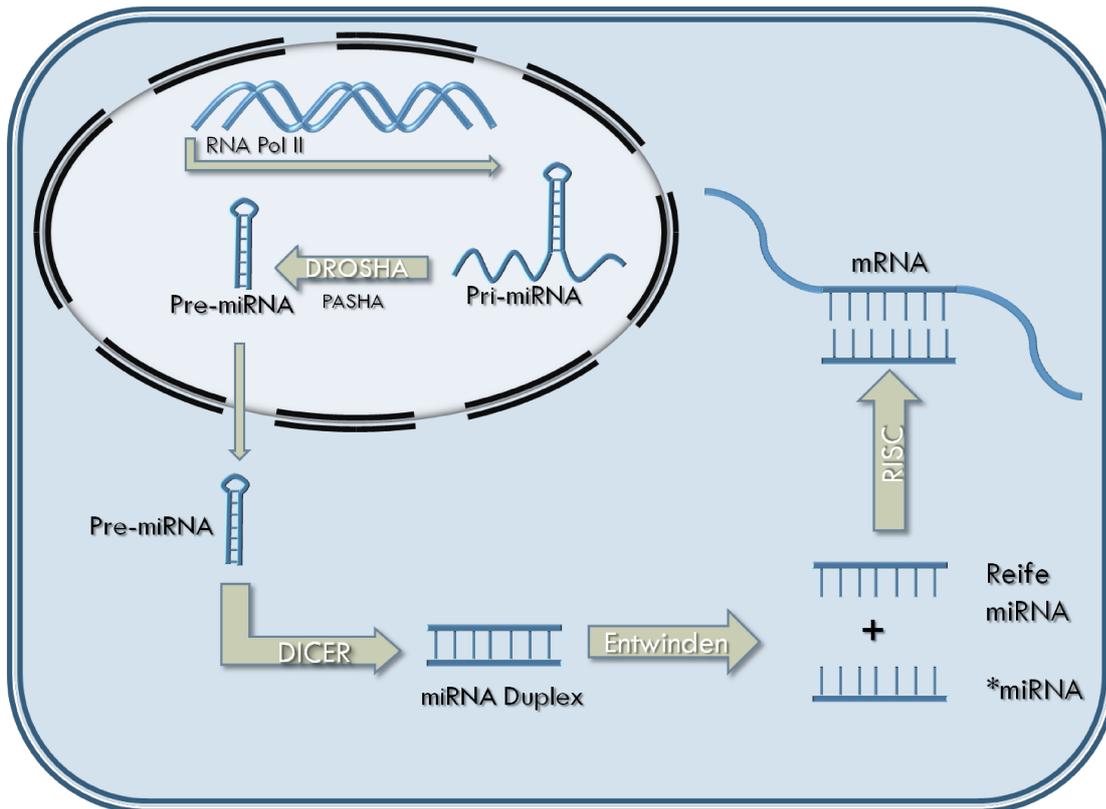


Abbildung 1.1: Reifung der microRNA

Verschiedene microRNAs können an verschiedenen mRNAs binden und gleichermaßen kann die Regulation einer mRNA über verschiedene microRNAs erfolgen. Dies erklärt, warum die Expression der microRNAs weitreichende Auswirkungen auf die Proteinsynthese der Zellen hat und diese damit eine zentrale Rolle in der Regulation verschiedener Prozesse im Organismus einnehmen (Selbach et al. 2008).

Bereits zu einem frühen Zeitpunkt konnte nachgewiesen werden, dass microRNAs eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Organe der Säugetiere spielen. Nach homozygoter Entfernung des Gens für die RNase Dicer zeigten sich massive Störungen in der Embryogenese der Maus (Yang et al. 2005). Auch eine spezifische Deletion von Dicer in Kardiomyozyten der Maus führte zu einer Veränderung des Herzens mit Entwicklung einer postnatalen dilatativen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz sowie entsprechend erhöhter Letalität (Chen et al. 2008).

Darüber hinaus kann auch der fehlende Einfluss einzelner microRNAs zu signifikanten Defekten in der Entstehung der Organe führen. Beispielsweise löst die Deletion von

miR-133a im Mausmodell schwere Entwicklungsstörungen des Herzens aus (Liu et al. 2008).

Nachfolgend konnte nachgewiesen werden, dass microRNAs an der Regulation der Entwicklung von Stammzellen teilnehmen. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass miR-145 unmittelbar an der Differenzierung embryonaler Stammzellen beteiligt ist, indem sie Faktoren für die Erhaltung der Pluripotenz dieser Zellen hemmt (Yi und Fuchs 2011).

Neben der Relevanz für die Entwicklung des Organismus konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass microRNAs auch an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass es in B-Zellen des Menschen bei einer chronisch lymphatischen Leukämie zu verminderten Expressionen von miR-15 und miR-16 kommt (Calin et al. 2002). Nachfolgend konnte in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen microRNAs und der Genese von Neoplasien dargestellt werden. Bestimmte microRNAs erhielten im Zuge dessen den Namen Oncomirs (Manikandan et al. 2008).

Im Jahre 2006 erfolgten die ersten Studien zu veränderten microRNA Profilen im Myokard der Maus unter pathologischen Einflüssen. Eine Forschungsgruppe untersuchte hierbei die microRNA Expression infolge operativ induzierter Nachlaststeigerung (van Rooij et al. 2006).

Heute gibt es zahlreiche microRNAs, die bereits im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen erforscht wurden. Einige dieser microRNAs spielen unter anderem eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Fibrose und Hypertrophie des Herzmuskels.

So konnte in oben genanntem Mausmodell für kardiale Fibrose und Hypertrophie (Aortenligatur) nachgewiesen werden, dass es zu einer vermehrten Expression von miR-208 unter diesen Bedingungen kommt. Darüber hinaus konnte durch Entfernen des Gens für miR-208 gezeigt werden, dass die prohypertrophischen und profibrotischen Effekte in Abwesenheit dieses Regulators kaum nachweisbar sind. Damit konnte dargelegt werden, dass miR-208 ein notwendiger Faktor für die Entwicklung der Hypertrophie und Fibrose in diesem Mausmodell ist (van Rooij et al. 2007). Wiederrum reicht eine Überexpression von miR-208a im Herzen transgener Mäuse aus, um eine

Hypertrophie sowie Störung der elektrischen Reizleitung zu induzieren (Callis et al. 2009).

Nachweislich zeigen myokardiale Proben von Patienten mit Herzinsuffizienz eine vermehrte Expression von miR-199b (da Costa Martins et al. 2010). Die Inhibition von miR-199b im Mausmodell der Aortenligatur vermindert, wie auch für miR-208 gezeigt, die Ausprägung der myokardialen Fibrose und Hypertrophie. Für miR-199a und miR-214 konnten in einem sehr ähnlichem Versuchsaufbau, sowohl im Bezug auf das vermehrte Vorhandensein dieser microRNAs nach Aortenligatur, als auch im Bezug auf die Effekte unter Antagonisierung ähnliche Ergebnisse nachgewiesen werden (el Azzouzi et al. 2013).

In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass miR-1 und miR-133 bei kardialer Hypertrophie im Mausmodell eine verringerte Expression aufweisen (Elia et al. 2009). Sowohl die Behandlung mit einem miR-133 Antagonisten, als auch das Knock-out von miR-1 sind dabei für sich ausreichend, um eine kardiale Hypertrophie zu provozieren (Care et al. 2007).

In einer weiteren Studie zeigte sich, dass die Expression von miR-133b und miR-30c direkte Auswirkungen auf die Expression von CTGF hat. Die Suppression von miR-133b und miR30c führte dabei zu einer gesteigerten Expression von CTGF und darüberhinaus zur vermehrten Expression dessen Targets Kollagen I und Fibronectin (Duisters et al. 2009).

Eine direkte Wirkung in Richtung einer Fibrose zeigt auch miR-21, welche in späteren Stadien der Herzinsuffizienz hochreguliert ist. Diese microRNA steigert das Fibroblastenwachstum und die Expression von Wachstumsfaktoren über eine Aktivierung der MAP-Kinase ERK, welche letztlich zu einer interstitiellen Fibrose und myokardialen Hypertrophie führt (Thum et al. 2008).

Weiterhin sei miR-29 erwähnt. Es handelt sich dabei um eine microRNA, die in der Randzone des Herzinfarktes der Maus vermindert exprimiert wird und an der Regulation zahlreicher Bestandteile der extrazellulären Matrix beteiligt ist. Unter anderem scheint miR-29 die Synthese von Kollagen zu hemmen. In vitro und in vivo Versuche ergeben dabei Hinweise, dass eine vermehrte Expression von TGFbeta zu

einer Reduktion des Vorkommens von miR-29 führt und damit eine Fibrose induziert (van Rooij et al. 2008).

Neben dem Vorkommen in Geweben, konnte das Vorhandensein von microRNAs auch im Serum nachgewiesen werden. Diese existieren in einer sehr stabilen Form, die sowohl wiederholte Frost- und Auftauzyklen übersteht, als auch vor RNasen geschützt ist (Mitchell et al. 2008). Der Grund für diese Beständigkeit ist bisher nicht abschließend geklärt. Unabhängig vom Sekretionsmechanismus wurde nachgewiesen, dass bei einer Erkrankung unterschiedliche microRNA Muster in Blutzellen und Serum auftreten und infolgedessen das microRNA-Profil im Serum nicht Resultat zerfallener Blutzellen sein kann.

Auch wenn bisher nicht endgültig geklärt ist, auf welchem Weg die microRNAs ins Serum übertreten, gibt es Hinweise, dass diese in membranösen Mikrovesikeln (Ohshima et al. 2010), apoptotischen Körperchen (Min und Chan 2015), Lipoproteinkomplexen (Vickers et al. 2011) oder Proteingebunden mittels Argonaut Proteinen (Arroyo et al. 2011) vorkommen. Vermutlich tragen sie in dieser Form auch zur Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen bei (Hergenreider et al. 2012; Bang et al. 2014).

Neuere Erkenntnisse zeigen die mögliche Anwendbarkeit von bestimmten Serum-microRNAs als Biomarker für myokardiale Prozesse. Zahlreiche Untersuchungen zu Serum-microRNA Profilen bei kardialen Erkrankungen sind bereits erfolgt. Beispielhaft seien dabei Studien an Patientenseren erwähnt, welche die Anwendbarkeit von miR-208 als Biomarker für kardiale Ischämien (Wang et al. 2010) oder von miR-423-5p als Biomarker für eine Herzinsuffizienz (Tijssen et al. 2010) bestätigt haben. Auch wenn eine Verwendung dieser microRNAs als Biomarker in der Klinik bereits jetzt prinzipiell möglich wäre, erfolgte bisher noch kein Nachweis einer Überlegenheit gegenüber den etablierten Markerproteinen auf Basis größerer klinischer Studien.

Um microRNAs auch als Therapieoption zu etablieren, wurde ebenfalls an Möglichkeiten der Beeinflussung des microRNA Haushaltes geforscht. Besonders interessant erweist sich dabei die Verwendung intravenös anwendbarer Antagomirs. Nach Verabreichung führen diese in verschiedenen Geweben zu verminderten Spiegeln der antagonisierten microRNA (Krutzfeldt et al. 2005). Im Hinblick auf die

Auswirkungen dieser antisense Oligonukleotide ergaben sich einige Hinweise, dass die Verwendung im Mausmodell vielversprechende Möglichkeiten bietet.

So konnte am Beispiel von miR-133 eine Hypertrophie und Fibrose allein durch Anwendung eines Antagomir induziert sowie im Bezug auf miR199a und miR-214 ein prohypertrophischer Einfluss durch Antagonisierung abgemildert werden (Care et al. 2007). Auch wenn eine Anwendung als Therapeutikum zwar vorstellbar, jedoch noch nicht in Sicht ist, so kann in der Grundlagenforschung ein tiefergehendes Verständnis der von microRNAs ausgehenden Regulationsmechanismen ermöglicht werden.

Zielsetzung der Arbeit

Die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion stellt eine Erkrankung mit zunehmender Relevanz in unserer Bevölkerung dar. Entgegen der Fortschritte in der Grundlagenforschung sowie klinischer Erfolge in Diagnostik und Therapie der HF_rEF, stagnieren diese in Bezug auf die HF_pEF. Dies liegt zum einen an der geringeren allgemeinen Bekanntheit und damit geringeren Forschungsarbeit zu diesem Thema, als auch an dem Mangel an gut validierten Tiermodellen für die experimentelle Erforschung dieser Erkrankung. Ebenso liegen nur begrenzt Forschungsergebnisse zur Ursache der HF_pEF auf molekularer Ebene vor, welche die Grundlage für neue Wege in der Therapie, als auch für mögliche Methoden zur Diagnostik darstellen.

Ziel der Arbeit ist die Validierung und echokardiographische Charakterisierung eines Mausmodells für HF_pEF. Nachfolgend soll zunächst ein Profil der microRNA im Myokard erstellt werden und dieses im Anschluss validiert und quantifiziert werden. Die Herzinsuffizienz soll dabei durch eine subkutane Applikation von Angiotensin II in mittlerer Dosierung induziert werden. Um nähere Aussagen über die Progression der hämodynamischen und molekularbiologischen Veränderungen zu erhalten, werden verschiedene Zeitspannen der Applikation gewählt.

Bei der echokardiographischen Evaluation soll der Fokus insbesondere auf den diagnostischen Leitlinien der European Society of Cardiology sowie weiterer grundlegender Parameter der diastolischen Funktion liegen. Hintergrund hierfür ist die besondere Relevanz der Echokardiographie, als einzige nahezu flächendeckend vorhandene, einfach anzuwendende und insbesondere nichtinvasive Möglichkeit zur Diagnosestellung und Verlaufskontrolle der HF_pEF.

Ist diese Evaluation des Mausmodelles erfolgt, soll anschließend ein Profil der microRNA im Mäusemyokard per Microarray erstellt werden. Dieses wird bioinformatisch ausgewertet und eine Auswahl der vielversprechendsten Targets per qRT-PCR quantifiziert. Auf Grundlage dieser Daten wollen wir sowohl Aufschlüsse über das microRNA-Profil in der diastolischen Dysfunktion und HF_pEF, als auch über die Auswirkungen von Angiotensin II auf das microRNA Profil des Myokards erhalten. Wir erhoffen uns durch diese Daten neue Ansatzpunkte für eine therapeutische Beeinflussung sowie zur Erleichterung der Diagnostik der HF_pEF zu finden.

2 Material und Methoden

Materialien

Nachfolgend werden die für die molekularbiologischen Versuche verwendeten Geräte, Software und Primer aufgelistet. Die verwendeten Reagenzien und Kits werden im Rahmen der Erläuterung der Methoden genannt.

Geräte	
Arbeitsbank	Captair bio, Erlab, Val de Reuil, Frankreich
Arbeitsbank	Captair flex, Erlab, Val de Reuil, Frankreich
Autoclav	VX-95, Systec GmbH, Linden
Feinwaage	ALJ I60-4NM, Kern & Sohn GmbH, Balingen
Microarray Scanner	GenePix 4100A, Molecular Devices, CA, USA
Mikrokapilläre RNA Analyse	2100 Bioanalyzer, Agilent, CA, USA
Mikrowelle	Microwave 800, Severin GmbH, Sundern
Mini Zentrifuge	Galaxy Mini, VWR, PA, USA
Mini Zentrifuge	D-6015, neoLab, Heidelberg
PCR System	labcycler, SensoQuest GmbH, Göttingen
PCR System	PCR System 9700, ThermoFisher, MA, USA
Pipetten	Research Plus, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	pipetus, Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Pipettierroboter	Qiacube, Qiagen N.V., Hilden
qRT-PCR optisches Reaktionsmodul	CFX96 Real-Time System, Bio-Rad, CA, USA
qRT-PCR Thermocycler	C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, CA, USA
Schwingmühle	MM 301, Retsch GmbH, Haan
Spannungsquelle	GPS 200/400, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
Spektrometer	ND-1000, ThermoFisher, MA, USA
Spülmaschine	Mielabor G7783, Miele & Cie. KG, Gütersloh
Sterilisator	T6060, Heraeus GmbH, Hanau
Trockeninkubator	Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg
Vortex	MS2 Minishaker, IKA GmbH, Staufen im Breisgau
Waage	DeltaRange PE3600, Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R, Heraeus GmbH, Hanau
Zentrifuge	Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D, Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5402, Eppendorf AG; Hamburg

Zentrifuge	SpeedVac, ThermoFisher, MA, USA
------------	---------------------------------

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Software	Name
Auswertung Echokardiographie	VisualSonics Vevo770 System, Toronto, Canada
Datenanalyse Microarray	R 2.12, The R Project, Wien, Österreich
Graphen und Statistik	Graphpad Prism 5, Graphpad, CA, USA
qRT-PCR Software	Bio-Rad CFX Manager 2.0, Applied Biosystems, CA, USA
Scanner Software Microarray	GenePix Pro 5, Molecular Devices, CA, USA
Statistik Microarray	Limma 3.8.3, Bioconductor, Open source

Tabelle 2.2: Verwendete Software

Primer	
Kollagen 1 a1 antisense	TGAGGCACAGACGGCTGAGTA
Kollagen 1 a1 sense	CCCAGTGGCGGTTATGACTT
Kollagen 3 a1 antisense	GACCTCGTGCTCCAGTTAGC
Kollagen 3 a1 sense	CCTGGAATAGCTGGACCAA
CTGF antisense	GCTCCACTCTGTGGTCTGGA
CTGF sense	TAGCTGCCTACCGACTGGAA
GAPDH antisense	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG
GAPDH sense	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC
SERCA 2 a antisense	GACAAGCTGTTGAGGGCATT
SERCA 2 a sense	GACAACCCAGACTTCGATGG
18 S	TaqMan Hs99999901_s1, Applied Biosystems, CA, USA
BNP	TaqMan Mm01255770_g1, Applied Biosystems, CA, USA
TIMP 2	TaqMan Mm00441825_m1, Applied Biosystems, CA, USA
miR-21	mmu-miR-21 TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-29c	mmu-miR29c TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-15b	mmu-miR-15b TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-133a	mmu-miR-133a TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-133b	mmu-miR-133b TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA

miR-199a-3p	mmu-miR-199a-3p TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-199a-5p	mmu-miR-199a-5p TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-199b	mmu-miR-199b TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-709	mmu-miR-709 TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
miR-214	mmu-miR-214 TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
let-7a	mmu-let-7a TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
let-7e	mmu-let-7e TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
snoRNA 234	snoRNA234 TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA
snoRNA 202	snoRNA202 TaqMan microRNA Assay Applied Biosystems, CA, USA

Tabelle 2.3: Verwendete Primer

Tiermodell

Ethische Grundlagen

Alle durchgeführten Tierversuche wurden nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Gen. Nr. B2/246). Die Tierversuche wurden unter Einhaltung der Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde durchgeführt.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere, die vom Zuchtbetrieb JANVIER S.A.S, 53940 Le Genest Saint Isle in Frankreich bezogen wurden.

Versuchsaufbau

Die HFpEF wurde im Mausmodell mittels parenteraler Verabreichung einer mittleren Dosis Angiotensin II induziert. Hierfür wurden weiblichen C57Black6 Mäusen im Alter von 11 Wochen osmotische Minipumpen der Firma ALZET (Model 1004, CA, USA) subkutan unter die Haut des Rückens implantiert. Damit die Pumpen die gewünschte Angiotensin-II-Abgabe von 500 ng/kg/min (Entsprechend 0,72 mg/kg/d) bei einer Förderrate von 0,11 µl/h erreichen, wurden die Pumpen adaptiert an das Körpergewicht der betreffenden Maus mit Angiotensin II-Lösung gefüllt. Die Pumpen der Sham-Mäuse wurden mit NaCl Lösung gefüllt. Die konstante Abgabe von 0,11 µl/h wird laut Herstellerangaben über 28 Tage gewährleistet. Um eine suffiziente Abgabe von Angiotensin II zum Zeitpunkt der Implantation zu gewährleisten, wurden die Pumpen vor Implantation für 48 Stunden in 37 °C warmer NaCl-Lösung inkubiert.

Der Versuchsaufbau bestand aus 2 Behandlungs-Gruppen und 2 Sham-Gruppen:



Abbildung 2.1: Versuchsaufbau

- C57Bl/6 Mäuse mit Angiotensin II per osmotischer Minipumpe über 7 Tage
- C57Bl/6 Mäuse mit Angiotensin II per osmotischer Minipumpe über 28 Tage
- C57Bl/6 Mäuse mit NaCl per osmotischer Minipumpe über 7 Tage
- C57Bl/6 Mäuse mit NaCl per osmotischer Minipumpe über 28 Tage

Die Implantation der Pumpen erfolgte am ersten Tag. Die Echokardiographie der Versuchstiere wurde einen Tag vor der Euthanasie und Gewebeentnahme, die am 7ten respektive 28ten Tag stattfand durchgeführt.

Operationstechnik

Implantation der osmotischen Mini-Pumpen:

Die intraoperative Analgesie erfolgte durch subkutane Gabe von Buprenorphin in einer gewichtsadaptierten Dosierung von 0.1 mg/kg KG. Die Narkose des Tieres fand im allseits verschlossenen Becherglas durch Zufuhr eines Isofluran-Luft-Gemisches (5% Forene®, AbbVie GmbH, Wiesbaden) über einen Isofluran-Verdampfer statt. Die Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose wurde mit Isofluran-Luft-Gemisch (2% Forene®, AbbVie GmbH, Wiesbaden) über einen Atemtrichter gewährleistet. Die Lagerung des Tieres fand während des gesamten Eingriffes in Bauchlage auf einer beheizten Wärmeplatte statt. Die Körpertemperatur des Tieres wurde dabei rektal gemessen.

Nach ausführlicher Hautdesinfektion im Schnittführungsbereich wurde mit einer 0,6cm langen transversalen Inzision durch Kutis und Subkutis in Höhe des Kreuzbeins begonnen. Die Subkutis wurde stumpf in der Medianen nach kranial bis zum Nacken von der Muskulatur getrennt. In diese künstlich geformte Höhle unter der Haut konnte dann die ALZET-Pumpe eingebracht werden.

Im Anschluss erfolgte der Wundverschluss durch Naht mit einem resorbierbaren 5-0 Faden (VICRYL, Ethicon, NJ, USA). Postoperativ erfolgte über mindestens 3 Tage eine analgetische und antiphlogistische Behandlung mit Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, NY, USA) in einer Dosierung von 5mg/kg subkutan.

Vorbereitung zur Echokardiographie

Zur echokardiographischen Untersuchung der Versuchstiere wurde eine Narkose mit 3% Isofluran-O₂-Gemisch im allseits verschlossenen Becherglas eingeleitet und diese mit 1-1.5% Isofluran-O₂-Gemisch über einen Atemtrichter aufrechterhalten. Die Mäuse wurden auf einer Wärmeplatte gelagert und ihre Körpertemperatur mit einer rektalen Temperatursonde gemessen. An den Extremitäten fand eine EKG-Ableitung statt. Die Brustwand der Mäuse wurde rasiert und überbleibende Haare mit einem chemischen Haarentferner gelöst. Zur besseren Schallübertragung auf die Haut wurde ein vorgewärmtes Ultraschallgel aufgetragen.

Euthanasie/Gewebeaufarbeitung

Je nach Gruppe wurden die Versuchstiere zur Organentnahme nach 7 beziehungsweise 28 Tagen mittels Isofluran analgesiert und nach Wiegen und retroorbitaler Blutentnahme durch zervikale Dislokation euthanasiert. Das Blut wurde in einem mit EDTA benetzten Röhrchen direkt in einer vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert, der Plasmaüberstand in ein Gefäß abpipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das entnommene ganze Herz wurde in Kochsalzlösung ausgewaschen und auf einer Feinwaage gewogen. Je nach Verwendungszweck wurden die entnommenen Gewebe unterschiedlich verarbeitet. Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die Organe in etwa 2mm große Stücke zerteilt und innerhalb eines verschraubbaren Gefäßes in flüssigem Stickstoff gefroren. Für mögliche histologische Untersuchungen wurden die Organe in Tissue-Tek, einem Medium aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen,

eingebettet und vorsichtig auf flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung aller Gewebe erfolgte anschließend bei -80°C .

Methodik

Grundlagen transthorakale echokardiographische Untersuchung

Das bildgebende Verfahren der transthorakalen echokardiographischen Untersuchung ermöglicht die nichtinvasive Beurteilung von Morphologie, mechanischer Funktion und Strömungsverhältnissen des Herzens durch Ultraschall. Gleich dem Prinzip der Sonographie nutzt man den Effekt der Reflexion von Ultraschallwellen an Grenzflächen unterschiedlicher Impedanz. Das Ultraschallgerät erzeugt Ultraschallwellen einer Frequenz von 1 bis 40 MHz durch Ausnutzen des inversen piezoelektrischen Effektes und misst die reflektierten Wellen durch den direkten piezoelektrischen Effekt. Die Latenzzeit und der Schalldruck reflektierter Wellen erlauben eine Berechnung der Tiefe und Echogenität der untersuchten Gewebe. Eine Frequenzverschiebung detektierter Wellen ermöglicht darüber hinaus die Bestimmung der Geschwindigkeit bewegter reflektierender Grenzflächen. Die Daten werden geräteintern verarbeitet und optisch auf einem Monitor ausgegeben (Feigenbaum 1977).

Die echokardiographische Untersuchung der Versuchstiere wurde mit einem Gerät der Fima VisualSonics (Vevo 770 high resolution imaging System, Toronto, Canada) sowie einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Die anschließende Analyse der Echokardiogramme erfolgte mit der geräteinternen Software des Vevo 770.

2D-Modus

In der 2D-Mode Echokardiographie verwendet man in einer Ebene fächerförmig ausgesandte Ultraschallimpulse zur zweidimensionalen Darstellung eines Gewebequerschnittes.

In der Echokardiographie unserer Versuchstiere wurden dabei standardmäßig 3 Schnittebenen untersucht. Die parasternale lange Achse, die parasternale kurze Achse sowie der apikale Vierkammerblick.

M-Modus

Der M-Mode ermöglicht die Darstellung des Verlaufes eines linearen Schnittes, entlang der Schallrichtung innerhalb des 2D-Modus, aufgetragen auf die Zeitachse. Dies ermöglicht die nachträgliche Analyse eines Bewegungsablaufes und die Messung von veränderlichen, herzaktionsabhängigen Parametern.

In der parasternal langen Achse wurden dabei auf Höhe der Mitralsegelspitzen die volumetrischen Parameter (u.a. LVIDd, IVSd, LVPWD, LVEF, LVFS) bestimmt.

Flussdoppler

Die Flussdopplerechokardiographie ermöglicht die Messung von Strömungsgeschwindigkeiten an sich gegen die Ausbreitungsrichtung des Ultraschalls bewegenden Grenzflächen durch Ausnutzen des Doppler-Effektes (Baker et al. 1977). Im Falle des Blutflusses dient die Erythrozytenmembran als frequenzverschiebende Grenzfläche.

Es gibt die Methoden des Continuous-Wave- und des Pulsed-Wave-Dopplers. Hierbei erhält man im Falle des Pulsed-Wave-Verfahrens eine Ermittlung der Flussgeschwindigkeit in einem ortsgenauen Sektor des Schallstrahles, wohingegen der Continuous-Wave-Doppler eine exakte Bestimmung aller Flussgeschwindigkeiten im Verlauf des gesamten Schallstrahls ermöglicht.

In unserem Versuchsaufbau wurden die Parameter E, A, die Dezelerationszeit (DT) sowie die isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) im apikalen Vierkammerblick mittels PW-Doppler bestimmt. E und A, als früher und später maximaler transmitraler Fluss, sowie die Dezelerationszeit des frühen transmitralen Flusses, wurden auf Höhe der Mitralsegelspitzen bestimmt. Die IVRT wurde im linksventrikulären Ausflusstrakt bestimmt.

Gewebedoppler

Der Doppler-Effekt lässt sich auch an sich bewegenden Geweben wie dem Herzen nachweisen. Dabei kommt es an der Grenzfläche des sich bewegenden Endokards zur Frequenzverschiebung. Die Messung der frühen und späten maximalen

Gewebebeschwindigkeiten, E' und A', erfolgte aus apikaler Anlotung in den Bereichen medial und lateral des Mitralklappenringes.

Molekularbiologische Untersuchungen

mRNA Extraktion aus Gewebe

Das gefrorene Gewebe wurde mit Hilfe von Metallkugeln und einer Schwingmühle (MixerMill, Retsch GmbH, Haan) zerkleinert und homogenisiert. Die RNA wurde entsprechend den Herstellerprotokollen des mRNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Nach der Denaturierung von Proteinen und insbesondere RNasen sowie der mechanischen Homogenisierung, folgte die Gewinnung und Aufreinigung der RNA in einer Säule auf einer Silikat-basierten Membran und die abschließende Elution der gebundenen RNA in RNase freiem Wasser. Diese Methode ermöglicht die Isolation von RNA mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden. Die Schritte vor und nach der Homogenisierung des Gewebes wurden manuell durchgeführt, die Schritte der Aufreinigung über die Silikatsäule hingegen wurden nach manueller Beladung maschinell durch einen Pipettierroboter (QIAcube, Qiagen, Hilden) ausgeführt. Die Extraktion wurde strikt unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde nach der Quantifizierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Photospektrometrische RNA-Quantifizierung

Nach Extraktion der Gesamt RNA schloss sich die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes und der Qualität der Proben per Photospektrometer (NanoDrop ND-1000, ThermoFisher, MA, USA) an. Das Gerät stellt die Adsorptionskurve zur Qualitätskontrolle über den Bereich von 220 nm bis 350 nm graphisch dar und quantifiziert die Menge der erhaltenen RNA. Die Reinheit wird als Quotient der Adsorption bei 260nm zu 280nm angegeben.

microRNA Extraktion aus Gewebe

Das gefrorene Gewebe wurde entsprechend den Herstellerprotokollen des miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden) unmittelbar mit einer Guanidinium-Thiocyanat und Phenol haltigen Reagenz (Qiazol, Qiagen, Hilden) versetzt und anschließend mit Hilfe einer Metallkugel und einer Schwingmühle (MixerMill, Retsch GmbH, Haan) zerkleinert und homogenisiert. Die ersten Isolationsschritte entsprechen einer Guanidinium-Thiocyanat-

Phenol-Chloroform Extraktion. Dabei kommt es nach hinzufügen von Chloroform und Zentrifugation zur Trennung in 3 Phasen. Die obere aquatische Phase, welche die RNA enthält und weiter verwendet wird, die DNA-haltige Interphase sowie eine untere organische und proteinreiche Phase. Es folgte die Gewinnung und Aufreinigung der microRNA auf einer Silikatsäule und die anschließende Elution der gebundenen RNA in RNase freiem Wasser. Die Methode des miRNeasy Micro Kit ermöglicht die Isolation von RNA ab einer Länge von etwa 18 Nukleotiden. Die Durchführung der Homogenisierung und Phasentrennung wurde manuell durchgeführt, die Schritte der Aufreinigung über die Silikatsäule wurden maschinell (QIAcube, Qiagen, Hilden) ausgeführt. Die Extraktion wurde strikt unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. Die gewonnene microRNA wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Qualitätskontrolle der microRNA und mRNA

Zur Qualitätskontrolle von Gehalt und Integrität der microRNA und mRNA wurden elektrophoretische Untersuchungen per mikrokapillären Analysechips durchgeführt (Bioanalyzer 2100 - RNA Assay/small RNA Assay, Agilent, CA, USA).

microRNA Microarray

Die Suche nach veränderten Expressionsmustern auf microRNA Ebene wurde mit Hilfe eines microRNA Microarrays durchgeführt. Microarrays stellen „Bio-Chips“ dar, welche es ermöglichen, eine große Anzahl von Targets in einer Probe zu untersuchen. microRNA Arrays bedienen sich dabei der Hybridisierung von microRNA aus einer Versuchsprobe, an eine mit vielen tausend microRNA-spezifischen Oligonukleotiden bestückte Oberfläche. Da die zu untersuchenden microRNAs zuvor mit einem Farbstoff versehen wurden, ist es im Anschluss nach Binden der microRNA an diese Oberfläche möglich mit einem Scanner die Intensität der Fluoreszenz der einzelnen Targets auszulesen. Hierüber kann die Expression vieler microRNAs in einer einzelnen Probe ausgewertet werden.

Verwendet wurden die Microarrays „Mouse miRNA Microarray 2.0“ der Firma Agilent (Design ID 021828, Agilent, CA, USA). Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit den Reagenzien des „miRNA Complete Labeling and Hyb Kit“ durchgeführt. Die Erstellung der Arrays erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Hierzu wurde die aus dem LV

isolierte gesamte RNA zunächst mittels einer Kalbsphosphatase über 30 Minuten bei 37°C dephosphoryliert. Anschließend wurde die dephosphorylierte RNA mittels DMSO bei 100°C über 10 Minuten denaturiert, um im nächsten Schritt einen Farbstoff zu ligieren. Hierbei wurden über einen Zeitraum von 2 Stunden, mit Hilfe einer RNA Ligase, Cyanine 3-pCp Moleküle an die 3' Enden der RNA ligiert.

Darauf folgend wurde die gelabelte RNA Vakuum-reduziert. Die vom Hersteller vorgeschlagene Säulenaufreinigung wurde dabei nicht angewendet. Stattdessen erfolgte eine verlängerte Vakuumrotation über 3 h bei 55 °C zur weiteren Aufkonzentration.

Die konzentrierte RNA wurde mittels Hybridisationspuffer gelöst, bei 100 °C für 5 Minuten inkubiert und anschließend auf Eiswasser für 5 Minuten gekühlt. Die Hybridisierung der RNA an das Microarray erfolgte innerhalb spezieller Metallkammern (Agilent Microarray Hybridization Chambers – G2543, Agilent, CA, USA). Die RNA wurde in diesen Kammern zwischen dem Microarray und einer abdichtenden Glasplatte, gemeinsam mit einer mobilen Luftblase eingeschlossen. Anschließend kamen die Kammern zur Hybridisierung unter Rotation mit 20 rpm für 20 Stunden in einen 55°C heißen Ofen.

Abschließend wurde die überschüssige, nicht gebundene RNA in mehreren Schritten ausgewaschen. Hierzu wurden die Hybridisationskammern zunächst in Waschpuffer eröffnet und zerlegt. Die Microarrays wurden nachfolgend in eine Halterung eingefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur in einem Triton X-102 enthaltenden Puffer gewaschen und anschließend erneut für 5 Minuten, in einem über Nacht auf 37°C vorgewärmten Puffer ausgewaschen.

Das Fluoreszenzmuster wurde dann unmittelbar nach dem Auswaschen mit einem Scanner (GenePix 4100A, Molecular Devices, CA, USA) bei 532 nm mit einer Auflösung von 5 µm / Pixel ausgelesen. Zur Steuerung des Scanners sowie der Bildanalyse wurde GenePix Pro (5.1.0.19, Molecular Devices, CA, USA) verwendet. Die Datenanalyse erfolgte in R (2.12, open source). Korrigiert wurden systematische Unterschiede zwischen den ausgelesenen Arrays, durch Verschieben der einzelnen Spot-Intensitäten um die Differenz des Mittelwertes der Intensitäten des jeweiligen Arrays, gegen den Globalen Mittelwert der Intensitäten aller Arrays. Anschließend erfolgte eine Quantilen-Normalisierung.

Da jede microRNA pro Array mehrfach vorkommt, wurden die verschiedenen Expressionswerte der einzelnen Replikate gemittelt, um pro untersuchter microRNA und Microarray einen einzigen Expressionswert zu erhalten.

Die weitere statistische Analyse wurde mittels Limma (Bioconductor, 3.8.3, open source) durchgeführt. Es erfolgte die Bestimmung der Änderung der mittleren Expression zwischen den Gruppen sowie eine Bestimmung der Konfidenzintervalle und p-Werte mittels moderierter t-Statistik nach Bayes.

Die Durchführung der oben genannten Schritte erfolgte in Kooperation mit Dr. Jochen Wilhelm, dem Leiter der Zentraleinheit für Biostatistik und Microarray-Analytik des Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System der Justus-Liebig Universität Gießen.

PCR-Gel-Primertest

Vor Verwendung für die quantitative Real-Time-PCR wurden neue Oligonukleotidprimer auf optimale Reaktionstemperatur und Spezifität getestet. Dazu wurde eine Polymerase Kettenreaktion mit Temperaturgradient durchgeführt. Die Produkte wurden unter Verwendung einer Längenreferenz in einer Agarose-Gel-Elektrophorese (1% Agarosegel) mit Ethidiumbromid aufgetrennt und die Banden in einem UV-Imager (Chemi Doc, Biorad, CA, USA) dargestellt.

Jeder Reaktionsansatz bestand aus 2.5µL 10x PCR-Puffer, 0.5µL 10mM dNTP mix, 0.6µL 20mM MgCl₂, je 0.5µL Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 18.9µL Nuklease-freiem Wasser sowie 1µL cDNA und 0.5µL Taq-Polymerase.

Der verwendete Thermocycler erhitze für 5 Minuten auf 95°C und wiederholte 40 Zyklen von 95°C für 30 Sekunden, der Gradienten-Temperatur für 30 Sekunden und 72°C für 30 Sek. Nach den repetitiven Zyklen wurde die Temperatur für 10 Minuten auf 72°C gehalten, ehe das Reaktionsprodukt in das Gel pipettiert und über eine Spannungsquelle aufgetrennt werden konnten.

Reverse Transkription der mRNA

Zur Quantifizierung bestimmter Targets auf mRNA-Ebene musste die isolierte RNA vor Verwendung in der qRT-PCR in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde eine reverse Transkription mit dem SuperSkript II Reverse Transkription Kit (ThermoFisher,

MA, USA) durchgeführt. Die Verwendung eines Random Primers ermöglicht das Umschreiben der gesamten RNA in cDNA.

10 µL der isolierten RNA wurden mit 1µL Random Primer (200ng/µl) und 1µL dNTP-Mix gemischt und anschließend auf dem Thermoblock eines Thermocyclers für 5 Minuten bei 65°C zur Anlagerung gebracht. Es wurden 2µL 0.1M DTT, 4µL 5x First Strand Buffer und 1µL RNase-Out hinzugefügt. Nach Inkubation bei 25° C für 2 Minuten wurde 1µL der reversen Transkriptase SuperSkript II hinzugefügt. Es folgten 10 Minuten Inkubation bei 25°C, 50 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C. Alle Schritte außerhalb des Thermoblocks wurden auf Eis durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

qRT-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR entspricht der klassischen PCR mit optischer Echtzeit-Bestimmung der Menge an synthetisierter DNA nach jedem Zyklus. Die Detektion der DNA-Menge geschieht durch unspezifische Einlagerung eines fluoreszierenden Moleküls in doppelsträngige DNA und die Messung dieser Fluoreszenz in einem optischen Thermocycler. Als interkalierender Farbstoff wurde SYBR-Green verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität der PCR wurde nach Beendigung der Zyklen der q-RT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die Reaktion wurde in 96-Well Platten durchgeführt, wobei jedes Template als Triplet vorzufinden war. Auf jeder Platte wurde ein Kontroll-Triplet mit Reaktionsansatz ohne Template cDNA aufgetragen. Als Template diente die cDNA aus der reversen Transkription mit Random Primer.

Pro Well befanden sich im Reaktionsansatz:

- 0.5µL Vorwärtsprimer
- 0.5µL Rückwärtsprimer
- 12.5µL SYBR-Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, CA, USA)
- 10.5µL Nuklease freies Wasser
- 1µL Template

Die Herstellung des Reaktionsansatzes fand unter ständiger Kühlung der Reagenzien und unter DNA und Nuklease freien Bedingungen statt.

Das eingestellte Programm des Thermocyclers startete für 2 Minuten bei 50°C und es folgten 10 Minuten bei 95°C. Anschließend erfolgten 44 repetitive Zyklen von 15 Sekunden Inkubation bei 95°C und 1 Minute bei einer Primer-abhängigen Temperatur sowie dem Ablesen der Fluoreszenz jedes Wells am Ende jedes Zyklus. Nach Beendigung aller Zyklen folgte die Erstellung einer Schmelzkurve durch schrittweise Erhöhung der Temperatur von 65°C auf 95°C in 0.5°C Intervallen und einer Fluoreszenzmessung der Platte am Ende jedes Intervalls. Zur relativen Quantifizierung der Untersuchten mRNA wurde diese mittels GAPDH auf die RNA-Menge normalisiert.

Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse wurde mit dem Programm des Geräteherstellers durchgeführt (CFX Manager, BioRad, CA, USA).

TaqMan qRT-PCR

Neben der klassischen quantitativen PCR mittels interkalierender Farbstoffe wurden ebenfalls FRET-basierte (Fluorescence Resonance Energy Transfer) TaqMan Sonden verwendet. Bei dieser Form der qRT-PCR nutzt man den Effekt des Förster-Resonanzenergietransfers, einer abstandsabhängigen, strahlungsfreien Energieübertragung zwischen zwei zumeist fluoreszierenden Molekülen. Das Energie gebende Molekül wird Donor genannt, das Energie aufnehmende Molekül Akzeptor. Es kann bei Annäherung der Moleküle einerseits zu einer Fluoreszenzverschiebung von Donor zu Akzeptor kommen, andererseits kann auch eine Fluoreszenzlöschung resultieren. Im Falle der TaqMan qRT gibt es einen fluoreszierenden Donor, der als Reporter bezeichnet wird und einen Fluoreszenzlöschenden Akzeptor, der Quencher genannt wird (Whitcombe et al. 1999).

Eine Sonde bestehend aus fluoreszierendem Reporter und nichtfluoreszierendem Quencher, jeweils angeheftet an das 5', beziehungsweise 3' Ende einer zum Target komplementären Sequenz, dient als Farbstoff für die Detektion der Syntheseprodukte bei der TaqMan Methode. Die Sonde bindet dabei spezifisch an eine bestimmte Sequenz der zu detektierenden cDNA. Diese befindet sich zwischen den Bindungsstellen von Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Im gebundenen und ungebundenen Zustand befinden sich Reporter und Quencher in enger räumlicher Nähe und es resultiert eine Fluoreszenzlöschung. Erreicht die DNA-Polymerase bei der

Synthese den doppelsträngigen Bereich aus Sonde und cDNA, wird die gebundene Sonde durch die zusätzliche 5'-3'-Exonukleasefähigkeit der Polymerase abgebaut. Der Quencher löst sich von der Sonde und entfernt sich vom Reporter. Dies führt zur detektierbaren Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs.

Die Taq-Man qRT-PCR wurde mit cDNA aus der mit Random-Primern transkribierten mRNA durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden pro Target als Triplet, inklusive eines Template freien Ansatzes, auf einer 96-Well Platte aufgetragen und die Reaktion in einem optischen Thermocycler durchgeführt. Als Reporter fungierte der Farbstoff FAM, ein Derivat des fluoreszierenden Moleküls Fluorescein.

Als Reaktionsansatz befanden sich pro Well:

- 1.25µL 20x TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, CA, USA)
- 12.5µL 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA)
- 10.25µL Nuklease freies Wasser
- 1µL cDNA Template

Das Ansetzen des Reaktionsgemisches wurde unter gekühlten Bedingungen in einem cDNA- und Nuklease-freien Milieu durchgeführt.

Der Thermocycler heizte für die Reaktion 2 Minuten auf 50 °C und anschließend 10 Minuten auf 95°C. Es folgten 44 repetitive Zyklen aus Temperaturen von 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden.

Die Auswertung erfolgte auf dem zugehörigen Programm CFX Manager (BioRad, CA, USA), als Normalisierung diente das 18S rRNA Gen.

Reverse Transkription der microRNA

Das Umschreiben der microRNA in cDNA wurde mittels einer Target-spezifischen Methode durchgeführt (TaqMan microRNA Assay, Applied Biosystems). Verwendet wurde totale RNA, inklusive microRNA. Im Gegensatz zur klassischen reversen Transkription wird kein Random-Primer verwendet, sondern ein für eine einzelne microRNA spezifischer haarnadelförmiger Primer. Dieser Primer lagert sich an das 3' Ende des microRNA Templates an und bildet eine Doppelstrangstruktur mit seinem in Richtung des eigenen 3' Ende gelegenen Anteil. Es erfolgt nun die Verlängerung des

Primers entlang des Template. Diese Form der reversen Transkription ist trotz der kurzen Länge der Template Sequenzen hochgradig spezifisch und produziert längere cDNA Stränge als das eigentliche Ausgangsmaterial.

Pro Reaktion, für ein Template und einen Primer, wurde ein RT-Mastermix (ThermoFisher, MA, USA) von 7 μL hergestellt. Dieser bestand aus:

- 0.15 μL 100mM dNTPs
- 1 μL MultiScribe reverse Transkriptase (50 U/ μL)
- 1.5 μL 10x Reverse Transkription Puffer
- 0.19 μL RNase Inhibitor (20 U/ μL)
- 4.16 μL Nuklease freiem Wasser.

Diesem Ansatz wurden 5 μL totale RNA hinzugefügt. Zuletzt wurde dieser Mastermix mit 3 μL des spezifischen Primers zu 15 μL Reaktionsansatz komplettiert.

Alle Reaktionsansätze und Enzyme befanden sich dabei kontinuierlich auf Eis. Bei Produktion der cDNA bedarf es mit dieser Methode eines eigenen Reaktionsansatzes für jeden verwendeten Primer und jedes verwendete Template.

Das Reaktionsgemisch wurde, für die Synthese auf dem Thermocycler, für 30 Minuten bei 16°C gehalten, 30 Minuten auf 42°C erwärmt, 5 Minuten auf 85°C erhitzt und zuletzt auf 4°C abgekühlt. Die Lagerung der produzierten cDNA fand bei -20° C statt.

microRNA qRT-PCR

Zur Quantifizierung der Menge an cDNA, respektive microRNA, des ursprünglichen Gewebes wurde eine quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion mit den Produkten der zuvor beschriebenen reversen Transkription durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine FRET-Sonden basierte Form der qRT-PCR (TaqMan smallRNA Assay, Applied Biosystems, CA, USA). Wie bei der TaqMan qRT-PCR beschrieben, dient eine Sonde, bestehend aus fluoreszierendem Reporter und nichtfluoreszierendem Quencher, welche an die Enden einer targetspezifischen Sequenz angeheftet sind als Farbstoff. Die 5'-3'-Exonuklease Fähigkeit der DNA-Polymerase ermöglicht das Auslösen der Fluoreszenz. Die hohe Spezifität ergibt sich neben der Verwendung spezifischer Sonden aus der Verwendung spezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer sowie der Target-spezifischen reversen Transkription (Chen et al. 2005). Die qRT-PCR

wurde auf 96-Well-Platten in einem optischen Thermocycler, mit je einem Triplet pro Template und Target durchgeführt. Auf jeder Platte befand sich ein Triplet mit cDNA freiem Reaktionsansatz als Negativkontrolle. Als Reporter wurde der Farbstoff FAM verwendet.

Der Reaktionsansatz für ein Well enthielt:

- 1µL TaqMan SmallRNA Assay (20x)
- 1.33µL Template
- 10µL TaqMan Universal PCR Mastermix II (2x)
- 7.67 µL Nuklease freies Wasser

Das Ansetzen des Reaktionsgemisches wurde unter gekühlten Bedingungen in einem cDNA- und Nuklease-freien Milieu durchgeführt.

Zum Start der Reaktion erhitze der Thermocycler zur Enzymaktivierung 10 Minuten auf 95°C. Es folgten 40 Zyklen aus Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C und anschließendem Anlagern und Verlängern für 60 Sekunden bei 60°C.

Als Normalisierung wurden für Gewebeproben der Maus die small nucleolar RNAs snoRNA-202 und snoRNA-234 in Kombination verwendet (Brattelid et al. 2011; Kaeuferle et al. 2014). Zur Auswertung der qRT-PCR diente das geräteeigene Programm CFX-Manager (BioRad, CA, USA).

Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse und graphischen Darstellung der Daten wurden die Versuchsergebnisse mit der Software Graph Pad Prism 5 (Graphpad, CA, USA) verarbeitet. Zunächst erfolgte eine Bestimmung der Mittelwerte, Standardabweichungen sowie des Standardfehlers innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen. Die Darstellung erfolgte dann gruppenbasiert als Balkengrafik unter Einbeziehung des Mittelwertes sowie des SEM.

Die weitere Analyse erfolgte dann im Rahmen einer 1 Wege Anova Varianzanalyse. Als Post-hoc-Test erfolgte ein Tukey Test zum Vergleich der einzelnen Gruppenpaare. Bei Erhalt signifikanter Differenzen wurde im Anschluss ein Mann-Whitney-Test zur Bestimmung des Signifikanzniveaus durchgeführt.

Von einer statistischen Signifikanz wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % ($p < 0,05$) ausgegangen.

3 Ergebnisse

Echokardiographie

Zu Beginn des Versuchsaufbaus steht die echokardiographische Evaluation des Mausmodells. Hierbei erfolgte die systematische Untersuchung der einzelnen Gruppen:

- Kontrollgruppe (Sham)
- Stimulation mit mittlerer Dosierung Angiotensin II für 7 Tage (AT II 7d)
- Stimulation mit mittlerer Dosierung Angiotensin II für 28 Tage (AT II 28d).

Es wurden Parameter der systolischen und diastolischen Funktion sowie strukturelle Messwerte bestimmt.

Herzfrequenz

Auf Grund der Frequenzabhängigkeit einiger echokardiographischer Parameter, insbesondere in der Diastole, erfolgte die Bestimmung der Herzfrequenz im Rahmen der Echokardiographie. Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg unter Gabe von Angiotensin II im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mittelwerte: Sham 457 / min ($\pm 11,43$, n=7), AT II 7d 474 / min ($\pm 12,41$, n=21), AT II 28d 464 /min ($\pm 10,34$, n=26).

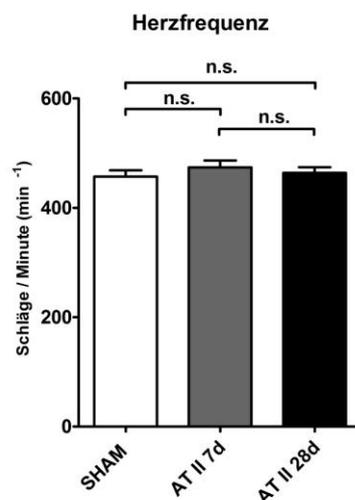


Abbildung 3.1: Bestimmung der Herzfrequenz im Flussprofil der Mitralklappe

Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Ein zentraler Parameter der linksventrikulären systolischen Funktion und der diagnostischen Kriterien der HFpEF ist die LVEF. Es handelt sich hierbei um das prozentual in der linksventrikulären Systole ausgeworfene Volumen in Bezug auf das enddiastolische Volumen des Ventrikels. Gemessen wurde diese in unserem Versuchsaufbau in der parasternalen Achse im M-Mode nach Teichholz.

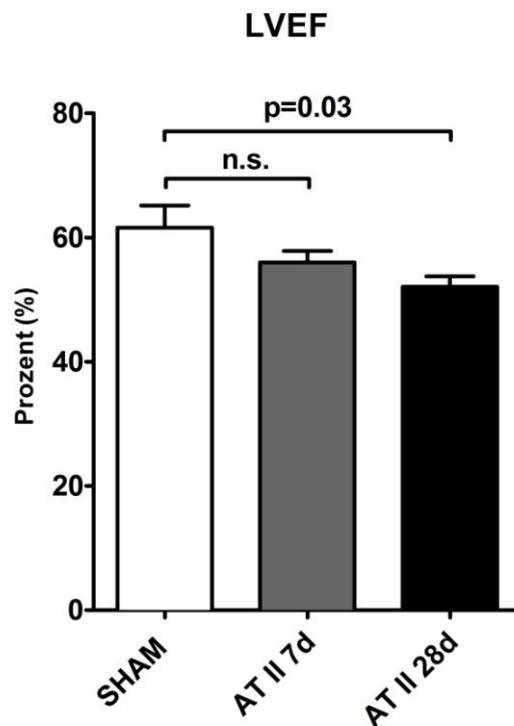


Abbildung 3.2: Echokardiographische Bestimmung der LVEF

Es zeigte sich eine Reduktion der LVEF zwischen den Gruppen Sham sowie Angiotensin II 7d und 28d. Eine Signifikanz sahen wir hierbei im Vergleich des Paares Sham und AT II 28 d. Im Mittel liegt die Ejektionsfraktion in der Gruppe Sham bei 61,6 % ($\pm 3,57$, $n=8$), nach 7 Tagen Angiotensin II bei 55,98 % ($\pm 1,86$ $n=23$) sowie nach 28 Tagen bei 52,08 % ($\pm 1,66$ $n=32$).

Verkürzungsfraction

Ein weiterer Parameter der systolischen Funktion des linken Ventrikels ist die Verkürzungsfraction (FS, fractional shortening). Diese wurde ebenfalls im M-Mode in der parasternalen langen Achse bestimmt und gilt als Parameter der linksventrikulären Kontraktilität. Die Bestimmung erfolgt als prozentuale Verkürzung des linksventrikulären Diameters, von Diastole zur Systole, bezogen auf den diastolischen Diameter.

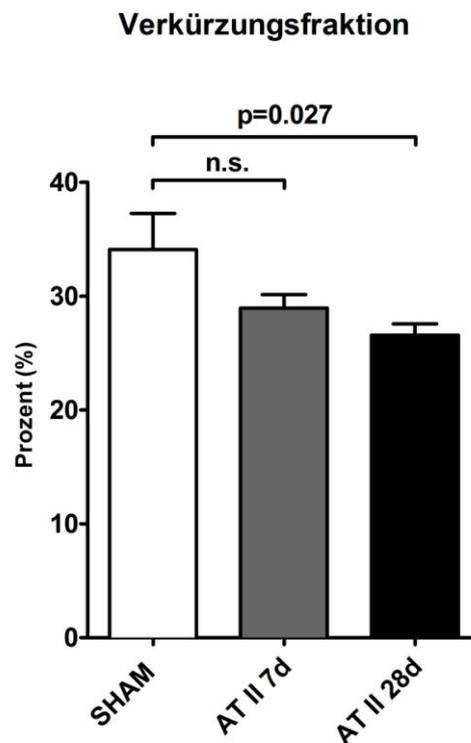


Abbildung 3.3: Echokardiographische Bestimmung der Verkürzungsfraction

Es zeigte sich eine Abnahme der FS mit einer Signifikanz zwischen Sham und AT II 28d. Die Mittelwerte liegen bei 34,1 % ($\pm 3,176$, $n=7$), respektive 28,95 % ($\pm 1,19$, $n=24$) und 26,58 % ($\pm 0,99$, $n=32$) für Sham, AT II 7 d und AT II 28d.

Linksventrikulärer enddiastolischer innerer Durchmesser, Interventrikuläre Septumdicke

Der enddiastolische linksventrikuläre innere Durchmesser (LVIDd, LVEDd) beschreibt den im M-Mode der parasternalen langen Achse gemessenen Durchmesser des linken Ventrikels. Dieser wird in Höhe der Mitralklappensegelspitzen zum Zeitpunkt der Enddiastole bestimmt. Die IVSd beschreibt den Durchmesser des Septums in der Enddiastole. Über diese Parameter lassen sich Rückschlüsse über eine mögliche Dilatation und Hypertrophie des linken Ventrikels gewinnen.

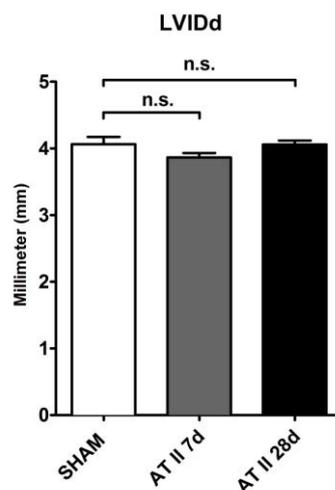


Abbildung 3.4: Echokardiographische Bestimmung des enddiastolischen linksventrikuläre inneren Diameters

	Sham (n=8)	AT II 7d (n=21)	AT II 28d (n=19)
IVSd (mm)	0,6050 ($\pm 0,04$)	0,768 ($\pm 0,03$) *	0,7005 ($\pm 0,02$)

Tabelle 3.1 Echokardiographische Bestimmung der interventrikulären Septumdicke

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in keiner der Angiotensin II stimulierten Gruppen eine signifikante Änderung des LVIDd (Sham n=8, AT II 7d n=24, AT II 28d n=30).

Der enddiastolische Septumdiameter zeigte einen signifikanten Anstieg zwischen Sham und AT II 7d (* p< 0,01). In der Gruppe AT II 28d war der Mittelwert rückläufig.

Isovolumetrische Relaxationszeit

Die Isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) beschreibt die Dauer der Entspannungsphase des linken Ventrikels nach Schluss der Aortenklappe zum Zeitpunkt der Endsystole bis zur Öffnung der Mitralklappe mit Einstrom des Blutes aus dem linken Vorhof in den linken Ventrikel. Bestimmt wurde diese durch Doppler-Anlotung eines Zwischenbereiches des linksventrikulären Ausflusstraktes sowie des mitralen Einstromes. Die IVRT konnte dabei als Zeitspanne zwischen dem Ende der Ejektionszeit und dem Beginn des transmitralen Flusses gemessen werden. Die Anlotung erfolgte von transapikal. Eine verlängerte IVRT kann Hinweise auf eine gestörte diastolische Funktion geben.

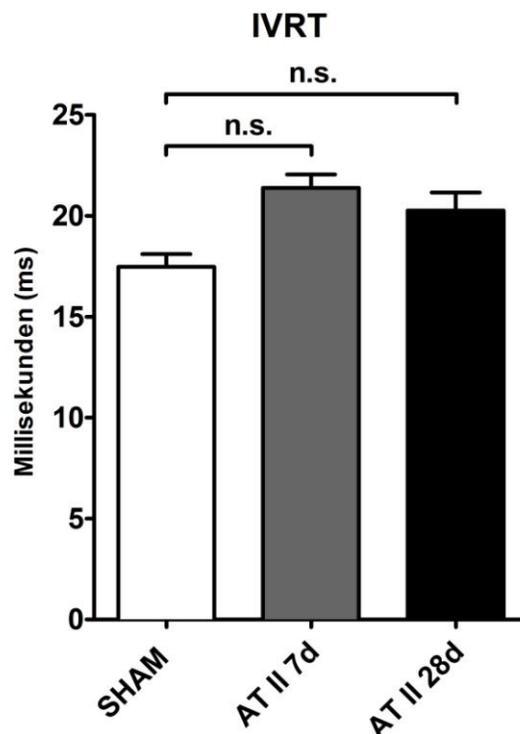


Abbildung 3.5: Echokardiographische Bestimmung der isovolumetrischen Relaxationszeit

Die Bestimmung der isovolumetrischen Relaxationszeit ergab keinen signifikanten Anstieg zwischen den einzelnen Gruppen (Sham n=8, AT II 7d n=23, ATII 28d n=30).

Dezelerationszeit

Die Dezelerationszeit (Deceleration Time, DT) der Mitralklappe beschreibt die Dauer des Geschwindigkeitsabfalles der E-Welle des Mitraleinstromprofils vom Maximalfluss bis zur Nulllinie. Die Bestimmung erfolgte aus transapicaler Anlotung durch Vermessung aus der Darstellung des Mitraleinstromprofils mittel Pulsed-Wave Doppler auf Höhe der Mitralsegelspitzen.

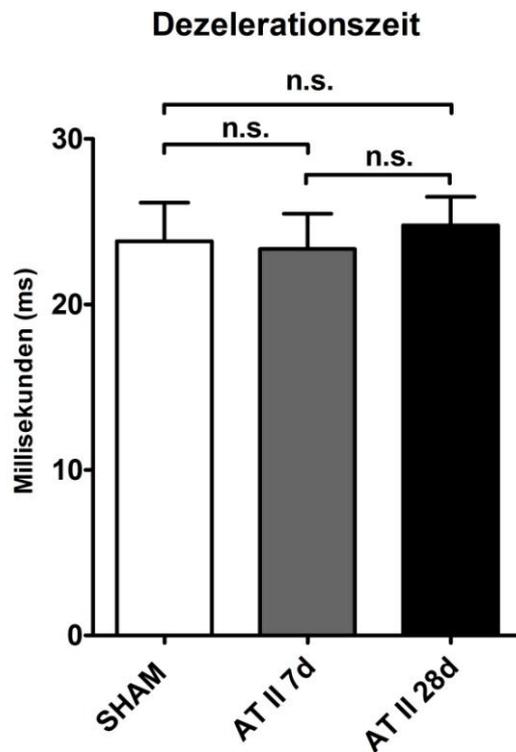


Abbildung 3.6: Echokardiographische Bestimmung der Dezelerationszeit des frühen Mitralklappeneinstromes

Es zeigte sich hierbei keine signifikante Änderung der Dezelerationszeit zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Sham n=4, AT II 7d n=5, AT II 28d n=9).

E/A-Ratio

Es handelt sich hierbei um das Verhältnis der Geschwindigkeit des frühen transmitralen Flusses (E) zum späten transmitralen Fluss (A). Die E Welle beschreibt dabei die passive Ventrikelfüllung durch Relaxation des linken Ventrikels, die A-Welle die aktive Füllung durch Kontraktion des linken Vorhofs. Die jeweiligen Flussgeschwindigkeiten wurden mittels Pulsed-Wave Doppler im Bereich der Mitralsegelspitzen aus transapikaler Anlotung gemessen. Verminderte oder erhöhte Werte können Hinweise auf eine diastolische Funktionsstörung liefern.

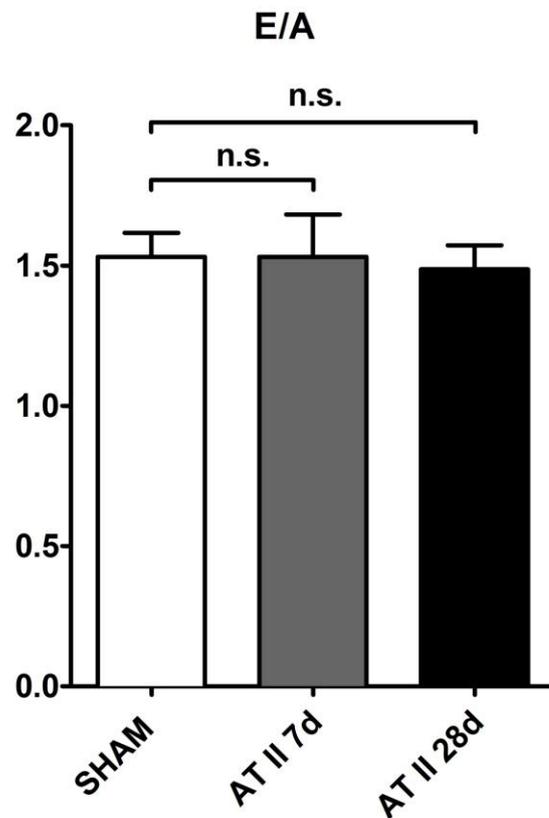


Abbildung 3.7: Echokardiographische Bestimmung des E/A-Verhältnisses

Zwischen den einzelnen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des E/A-Verhältnisses (Sham n=8, AT II 7d n=13, AT II 28d n=21).

E/E'

Ein zentraler Parameter der diastolischen Funktion ist das Verhältnis E/E'. Die Bestimmung von E' erfolgte dabei durch Mittelung der Messungen der Gewebegeschwindigkeit im Bereich des Septums sowie lateral auf Höhe des Mitralklappenringes aus transapicaler Anlotung.

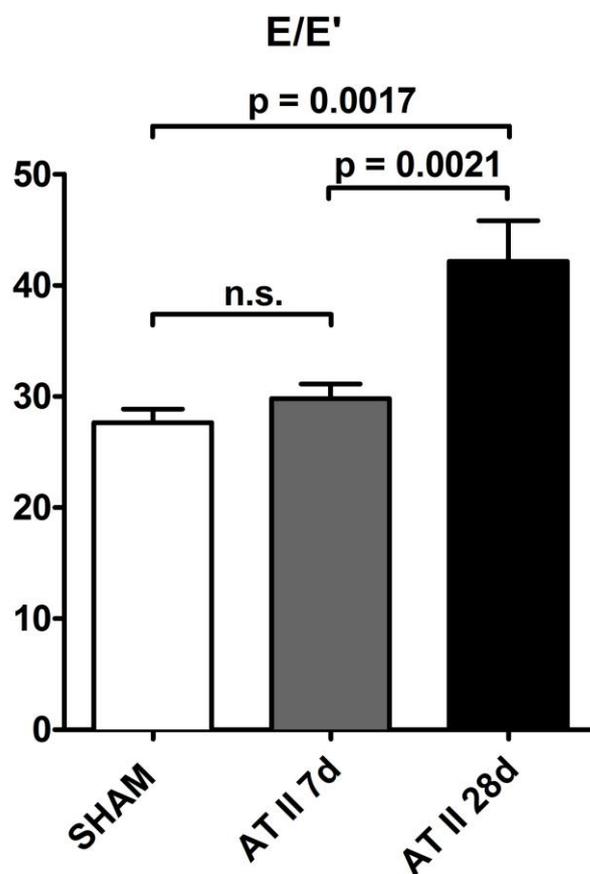


Abbildung 3.8: Echokardiographische Bestimmung des Verhältnis E/E'

Wir sahen einen signifikanten Anstieg des Verhältnis E/E' sowohl im Vergleich der Gruppen Sham zu Angiotensin II 28d, als auch zwischen Angiotensin II 7d und 28 d. Eine signifikante Elevation zwischen der Kontrollgruppe und nach Stimulation mit Angiotensin II für 7 Tage bestand nicht (Sham n=8, AT II 7d n=21, Angiotensin II 28d n=28).

E'/A'

Entsprechend der E/A-Ratio lässt sich auch das Verhältnis E'/A' im Gewebedoppler aus transapicaler Anlotung bestimmen.

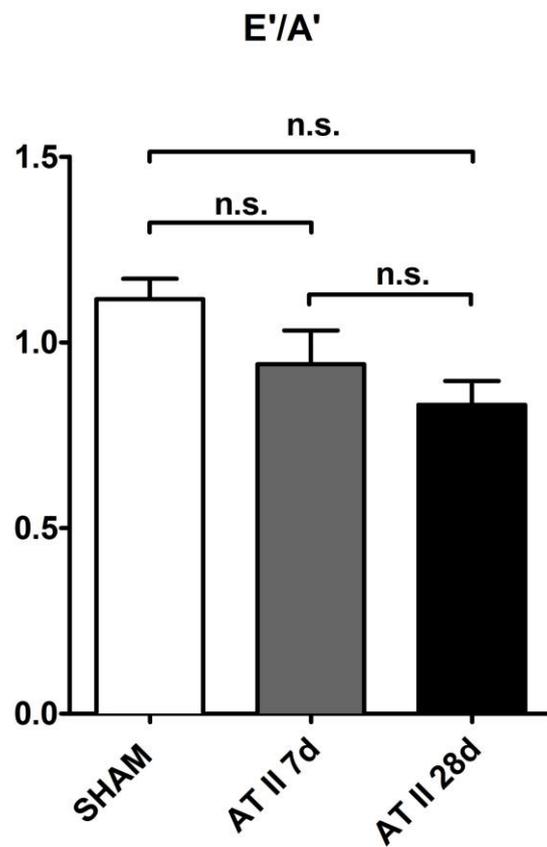


Abbildung 3.9: Echokardiographische Bestimmung des Verhältnis E'/A'

Wir sahen keine Signifikanz des Absinken des Verhältnis E'/A' (Sham n=7, AT II 7d n=18, AT II 28d n=23).

E' septal

Die Bestimmung von E' im Bereich des Septums auf Höhe des Mitralklappenringes aus transapicaler Anlotung.

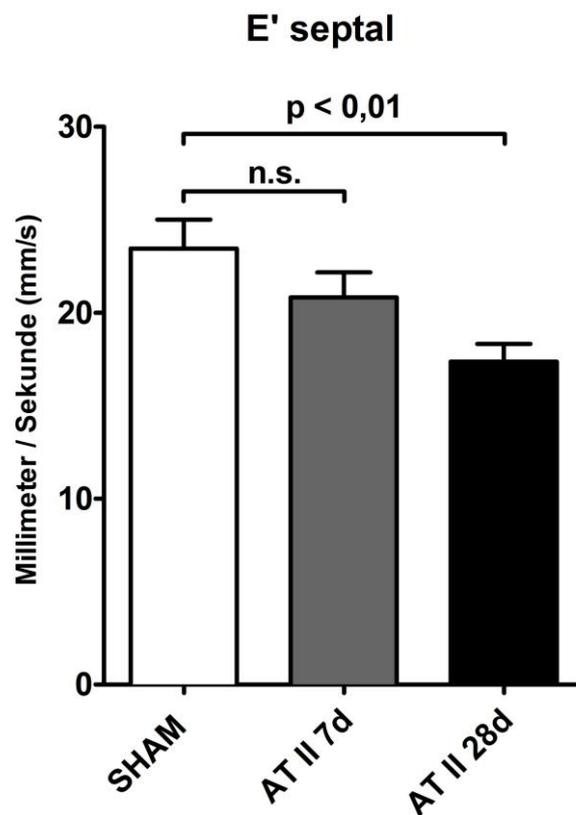


Abbildung 3.10: Echokardiographische Bestimmung des Parameter E' septal

Es zeigt sich ein Absinken der Gewebegeschwindigkeit der frühen septal gemessenen Welle E', zwischen den einzelnen Gruppen. Eine Signifikanz sahen wir im Vergleich von Sham und AT II 28d (Sham n=7, AT II 7d n=20, AT II 28d n=23).

qRT-PCR

Im Anschluss an die echokardiographische Evaluation der strukturellen und funktionellen kardialen Parameter erfolgte die Bestimmung der Expression ausgewählter Targets in der quantitativen Echtzeit-PCR. Ziel hierbei ist der Nachweis und die Bestätigung molekularbiologischer Veränderungen im Myokard unter Stimulation mit niedrig dosiertem Angiotensin II für 7 Tage, 28 Tage und im Vergleich zur Kontrollgruppe Sham. Verwendet wird isolierte RNA aus dem linksventrikulären Myokard der Versuchstiere. Als Normalisierung dienen GAPDH und 18S.

Bestimmung von BNP

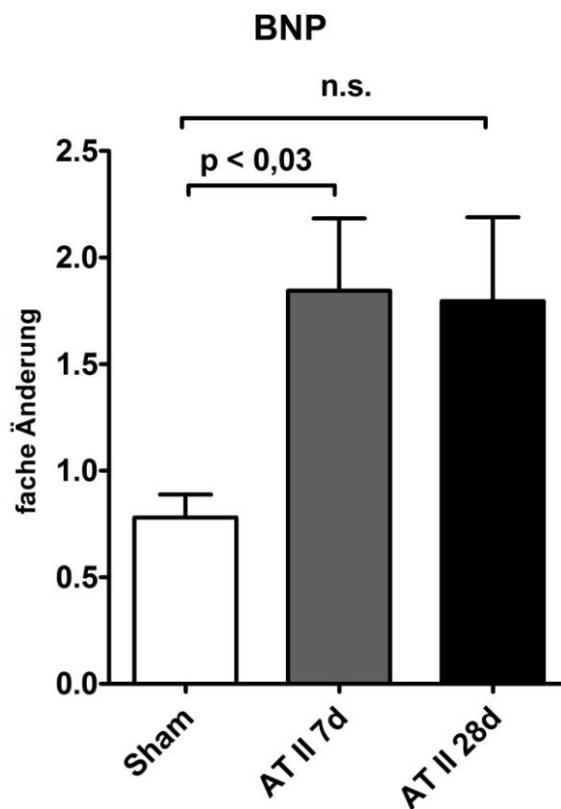


Abbildung 3.11: Bestimmung von BNP in der qRT-PCR des LV-Myokard

Die Bestimmung von BNP ergab eine gesteigerte Expression von BNP im Vergleich der Kontrollgruppe zu den Interventionsgruppen. Eine signifikante Steigerung ergab sich hierbei zwischen den Gruppen Sham und AT II 7d (Sham n=8, AT II 7d n=9, AT II 28d n=9).

Connective Tissue Growth Factor

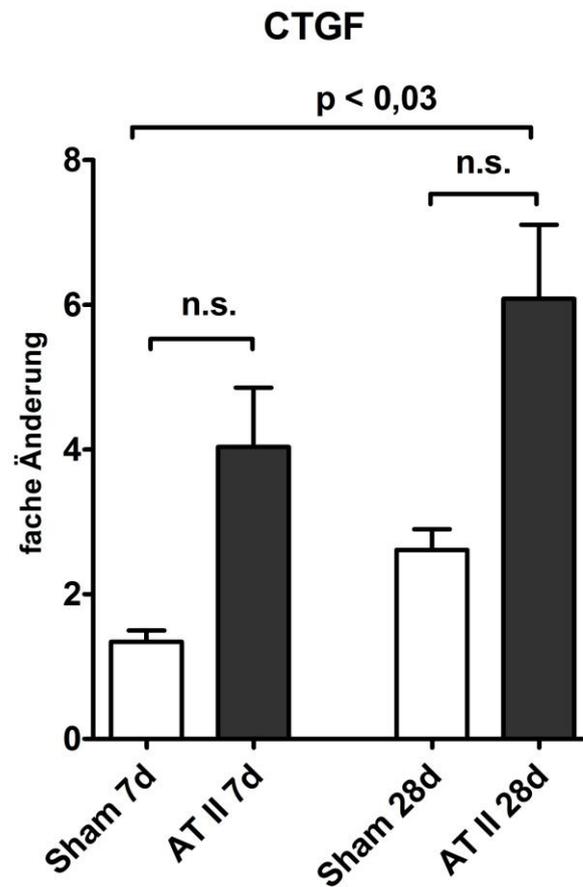


Abbildung 3.12: Bestimmung von CTGF in der qRT-PCR des LV

Es zeigte sich eine gesteigerte Expression von CTGF zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Eine Signifikanz ergibt sich im Vergleich der Gruppen Sham 7d und AT II 28d (Sham 7d n=4, Sham 28d n=5, AT II 7d n=5, AT II 28d n=5).

Kollagen 1 und Kollagen 3

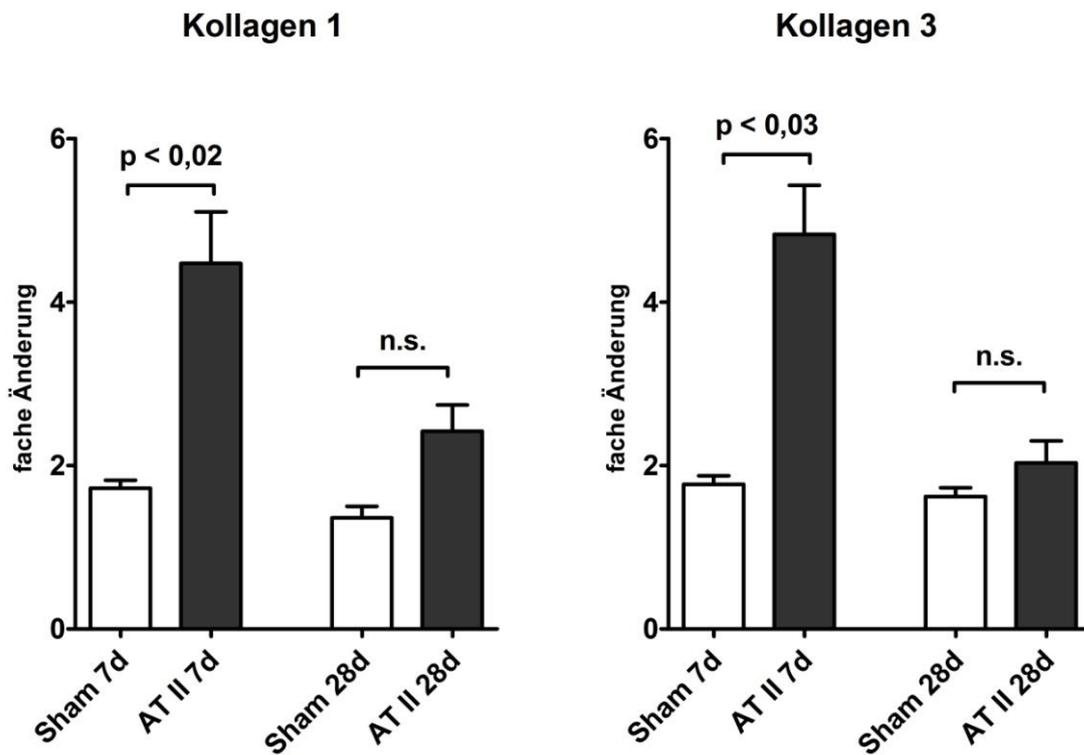


Abbildung 3.13: Bestimmung von Kollagen 1 und 3 in der qRT-PCR des LV

Wir sahen einen signifikanten Anstieg der Expression von Kollagen 1 und 3 zwischen den Gruppen Sham 7d und Angiotensin II 7d (Sham 7d n=4, Sham 28d n=5, AT II 7d n=5, AT II 28d n=5).

TIMP 2

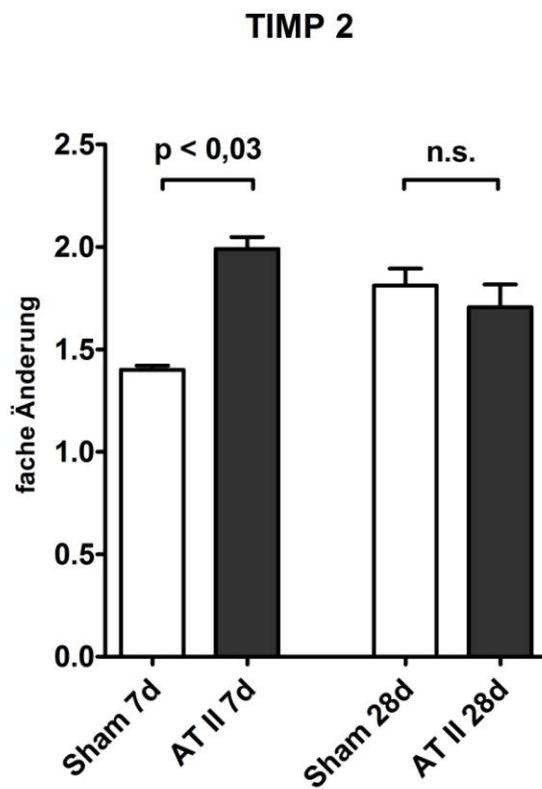


Abbildung 3.14: Bestimmung von TIMP 2 in der qRT-PCR des LV

Die Bestimmung des Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinase 2 ergab einen signifikanten Anstieg der Expression in der Vergleichsgruppe Sham und AT 7d (Sham 7d n=4, Sham 28d n=5, AT II 7d n=5, AT II 28d n=5).

SERCA 2

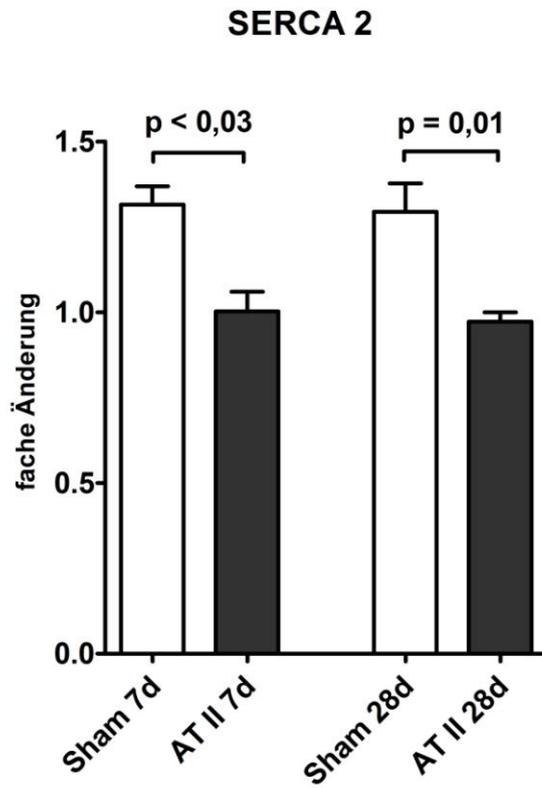


Abbildung 3.15: Bestimmung von SERCA 2 in der qRT-PCR des LV

Es zeigte sich eine Verringerte Expression der sarkoplasmatischen Kalzium-Pumpe 2 im zeitlichen Verlauf. Signifikanzen ergaben sich hierbei jeweils zwischen den Gruppen Sham und Angiotensin II zu beiden Versuchszeitpunkten (Sham 7d n=4, Sham 28d n=5, AT II 7d n=5, AT II 28d n=5).

microRNA-Microarray

Ziel des Projektes ist neben der echokardiographischen Evaluierung des Mausmodells das Erstellen eines Expressionsprofils der microRNA im linksventrikulären Myokard der Maus unter Stimulation mit Angiotensin II. Hierfür wurden aus der microRNA des LV der Versuchstiere Microarrays erstellt und diese vergleichend ausgewertet. Hierbei gab es eine Kontrollgruppe / Sham (n=4) sowie die Gruppen Angiotensin II 7 Tage (n=3) und Angiotensin II 28 Tage (n=4).

Volcano Plot

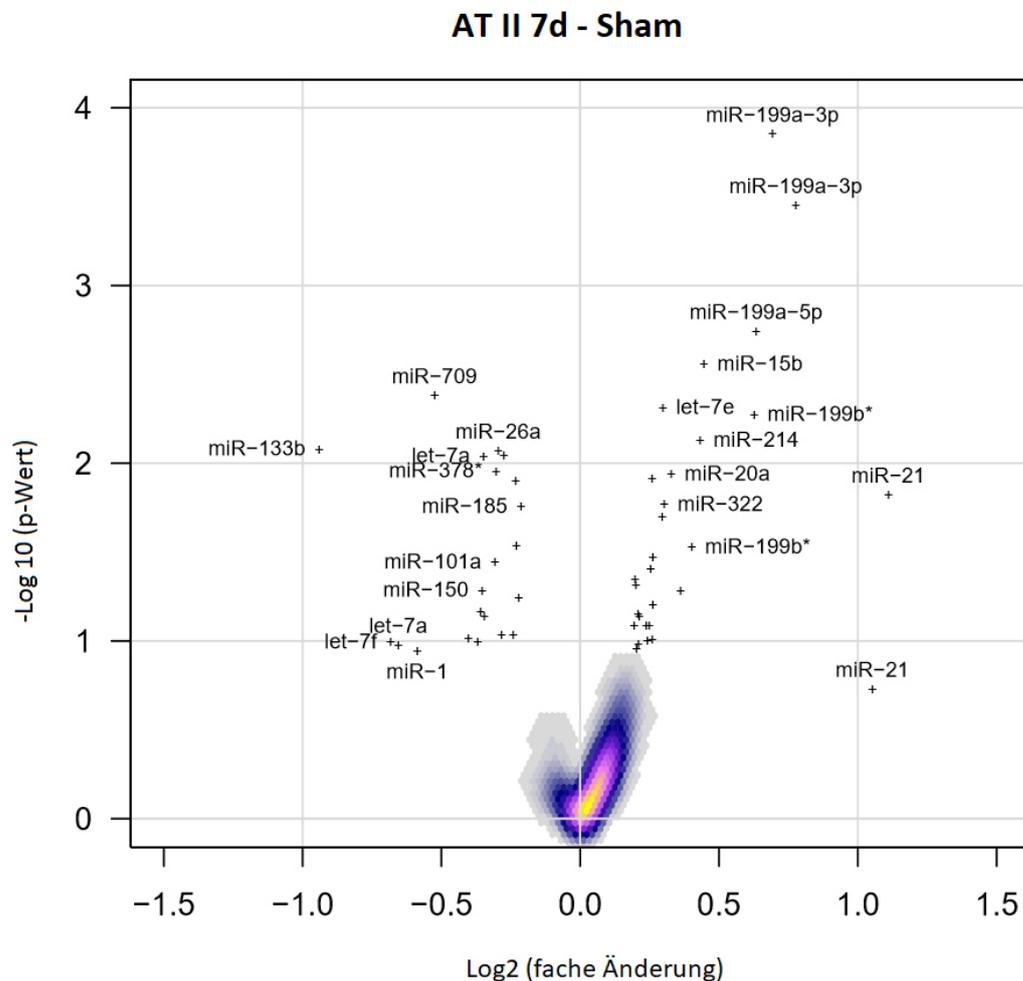


Abbildung 3.16: Volcano-Plot der Microarrays im Vergleich AT II 7d gegen Sham

AT II 28d - Sham

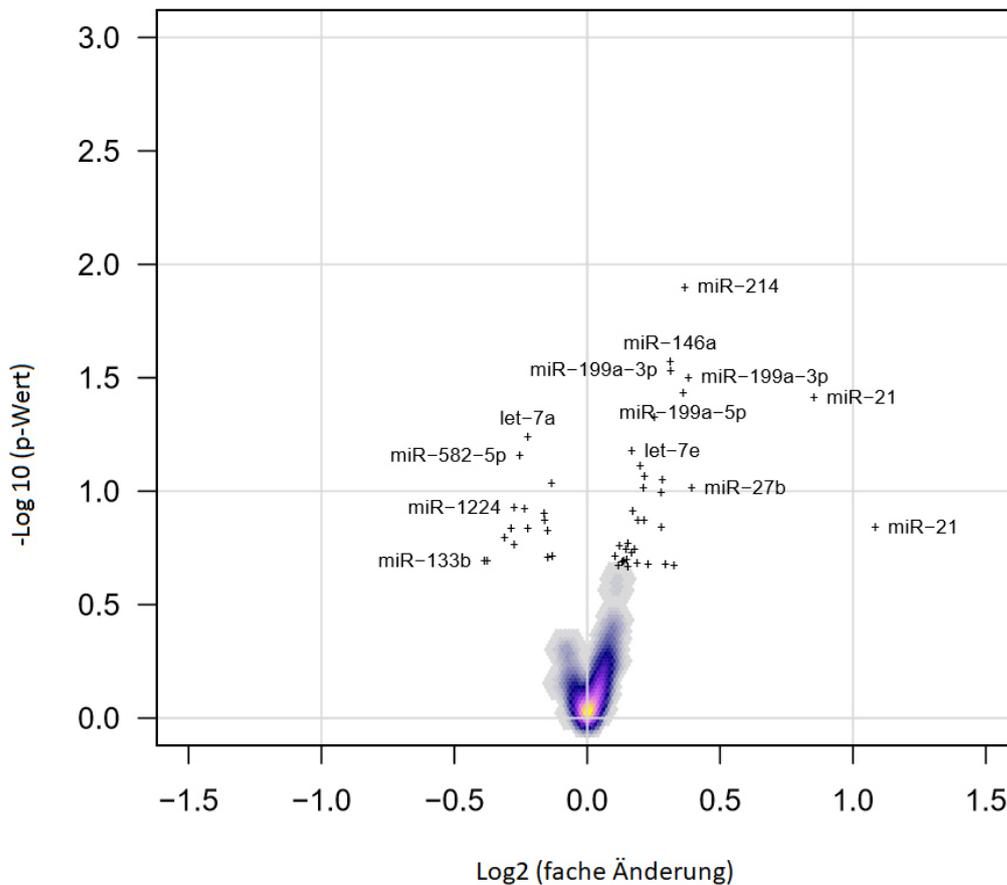


Abbildung 3.17: Volcano-Plot der Microarrays im Vergleich AT II 28d gegen Sham

Die Darstellung der Daten als Volcano Plot zeigt einen Vergleich zwischen Grad der Expressionssteigerung und der Signifikanz. Dieser ermöglicht eine schnelle visuelle Wiedergabe der deutlichsten und signifikantesten Abweichungen zwischen den untersuchten Gruppen.

Tabellarische Darstellung ausgewählter Daten

AT II 28 d vs Sham			AT II 7 d vs Sham		
Symbol	FC	p-Wert	Symbol	FC	p-Wert
<i>miR-214</i>	1,290	0,013	<i>miR-199a-3p</i>	1,616	0,0001
miR-146a	1,242	0,027	<i>miR-199a-3p</i>	1,713	0,0004
<i>miR-199a-3p</i>	1,243	0,030	<i>miR-199a-5p</i>	1,551	0,0018
<i>miR-199a-3p</i>	1,302	0,032	<i>miR-15b</i>	1,362	0,0028
<i>miR-199a-5p</i>	1,284	0,037	<i>miR-709</i>	0,695	0,0042
<i>miR-21</i>	1,806	0,039	<i>let-7e</i>	1,229	0,0050
miR-106b	1,191	0,048	<i>miR-199b*</i>	1,544	0,0054
let-7a	0,856	0,058	<i>miR-214</i>	1,348	0,0076
let-7e	1,123	0,068	<i>miR-133b</i>	0,521	0,0085
miR-582-5p	0,838	0,071	<i>miR-26a</i>	0,815	0,0086
miR-322	1,148	0,079	<i>miR-30b</i>	0,826	0,0092
miR-15b	1,161	0,087	<i>let-7a</i>	0,785	0,0093
miR-199b*	1,216	0,091	miR-378*	0,810	0,0113
miR-185	0,911	0,093	miR-20a	1,255	0,0117
miR-342-3p	1,157	0,097	<i>miR-15b</i>	1,196	0,0124
miR-27b	1,313	0,098	miR-378*	0,851	0,0127
miR-223	1,213	0,102	<i>miR-21</i>	2,158	0,0153
miR-1224	0,826	0,119	miR-322	1,233	0,0174
miR-29a	0,849	0,121	miR-185	0,862	0,0179
miR-19a*	1,126	0,124	miR-106b	1,227	0,0205
miR-139-5p	0,893	0,127	miR-26b	0,852	0,0294
miR-28	1,160	0,136	miR-199b*	1,321	0,0302
miR-574-3p	0,895	0,136	miR-322	1,198	0,0342
miR-140*	1,141	0,136	miR-101a	0,808	0,0366
miR-199b*	1,213	0,146	miR-19a*	1,192	0,0400
miR-21	2,118	0,147	miR-103	1,146	0,0459
miR-709	0,856	0,148	miR-25	1,149	0,0493

Tabelle 3.2: Darstellung ausgewählter Daten des Microarray

Expressionsänderung und p-Werte innerhalb der Gruppen AT II 7d vs. Sham und AT II 28d vs. Sham, sortiert nach p-Werten. p-Werte < 0,05 wurden fett markiert. Die für weitere Untersuchungen ausgewählten microRNAs wurden fett und kursiv markiert.

microRNA qRT-PCR

Es wurden insgesamt 12 microRNAs zur nachfolgenden Quantifizierung mittels qRT-PCR ausgewählt:

- miR-21
- miR-29c
- miR-15b
- miR-133a
- miR-133b
- miR-199a-3p
- miR-199a-5p
- miR-199b
- miR-214
- miR-709
- let-7a
- let-7e

Nach Auswahl der zu untersuchenden microRNA-Targets, erfolgte die Quantifizierung mittels qRT-PCR. Die Normalisierung des Experimentes erfolgte mittels small nucleolar RNAs.

- snoR-202
- snoR-234

Die Untersuchung erfolgte vergleichend zwischen zwei Kontrollgruppen, Sham 7 Tage (n=5) und Sham 28 Tage (n=5) sowie zwei Interventionsgruppen. Die Interventionsgruppen wurden für 7 Tage (n=10) und 28 Tage (n=10) mit Angiotensin II behandelt.

miR-21

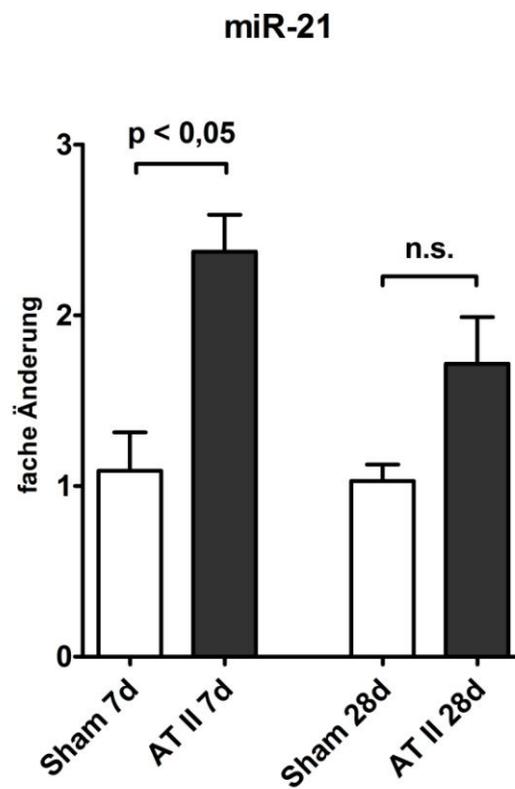


Abbildung 3.18: qRT-PCR von miR-21 im LV Myokard

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression von miR-21 im linksventrikulären Myokard im Vergleich der Gruppen Sham 7d und AT II 7d. Im Vergleich der Kontroll- mit der Interventionsgruppe nach 28 Tagen sahen wir keine Signifikanz der Expressionsänderung.

miR-29c

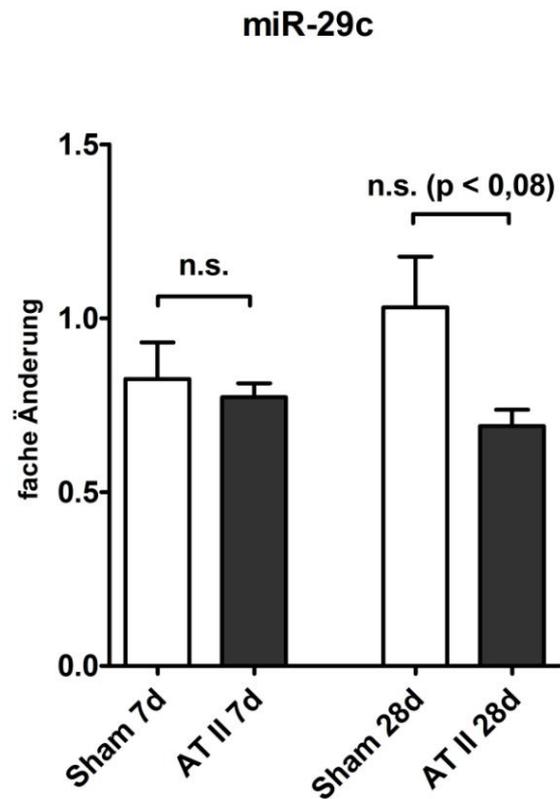


Abbildung 3.19: qRT-PCR von miR-29c im LV Myokard

Es zeigte sich in der Untersuchung von miR-29c keine signifikante Änderung der Expression. Im Vergleich zwischen Sham 28d und AT II 28d wird das geforderte Signifikanzniveau verfehlt.

miR-15b

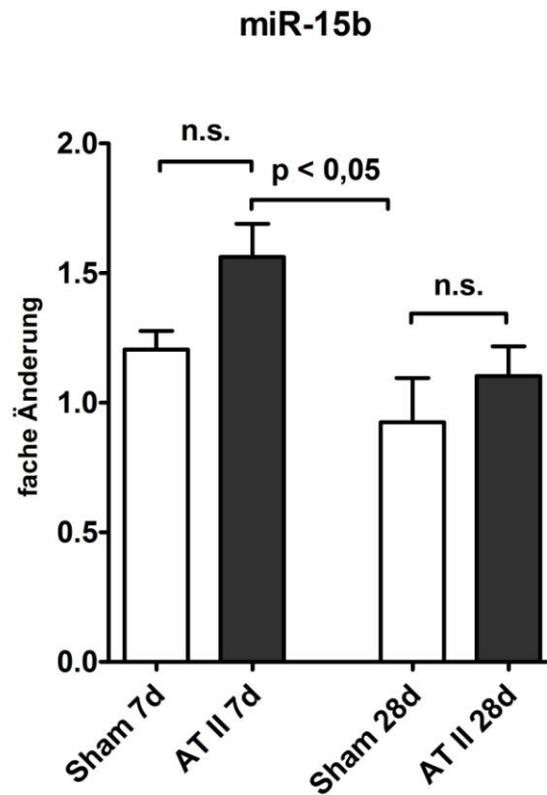


Abbildung 3.20: qRT-PCR von miR-15b im LV Myokard

Die vergleichende Untersuchung der Expression von miR-15b ergab keine Signifikanz der Expressionssteigerung innerhalb der Vergleichspaare. Lediglich im Vergleich AT II 7d versus Sham 28d konnte eine signifikant verminderte Expression nachgewiesen werden.

miR-133a

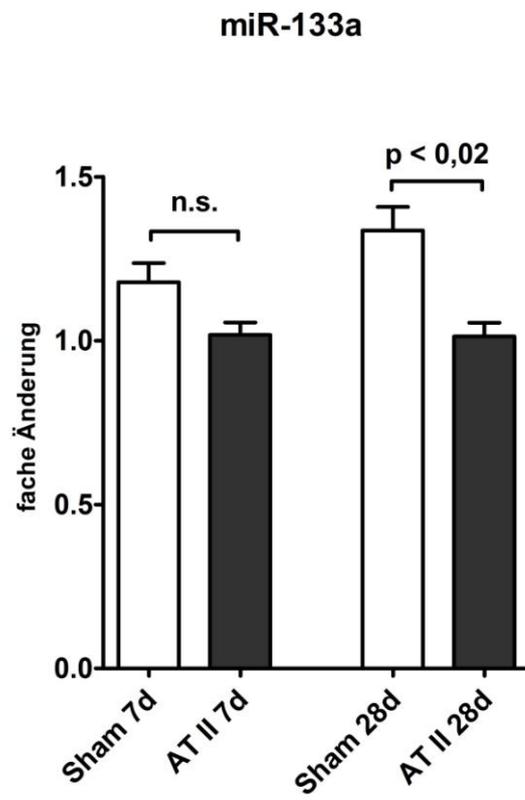


Abbildung 3.21: qRT-PCR von miR-133a im LV Myokard

Die Untersuchung von miR-133a erbrachte eine signifikante Reduktion der Expression in den Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt 28 Tage.

miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b, miR-133b

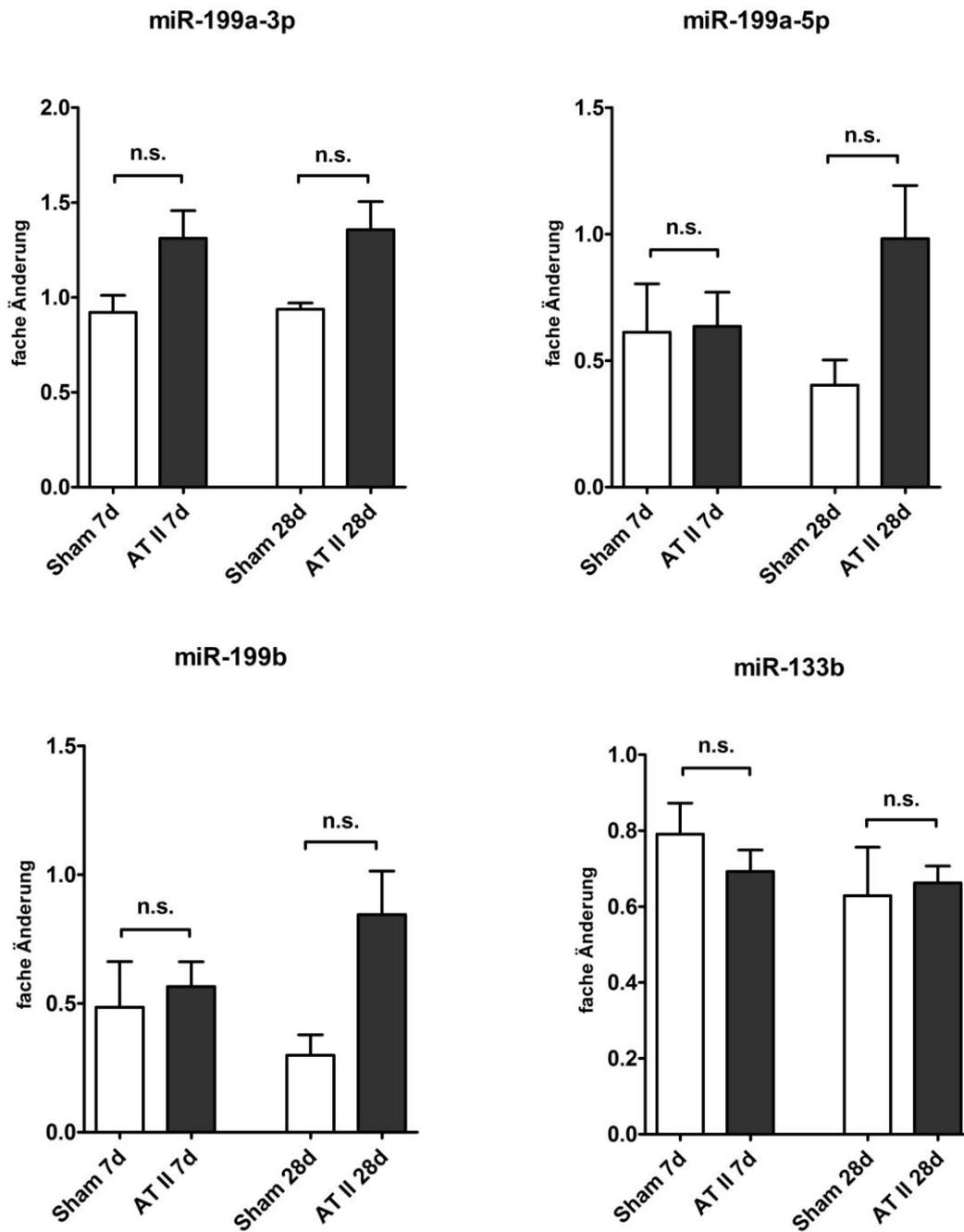


Abbildung 3.22: qRT-PCR von miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b und miR-133b im LV Myokard

Die Untersuchung von miR-199a-3p und -5p sowie miR-199b und miR-133b erbrachte keine Signifikanz der Expressionsänderung innerhalb der Gruppen.

miR-214, miR-709, let-7a, let-7e

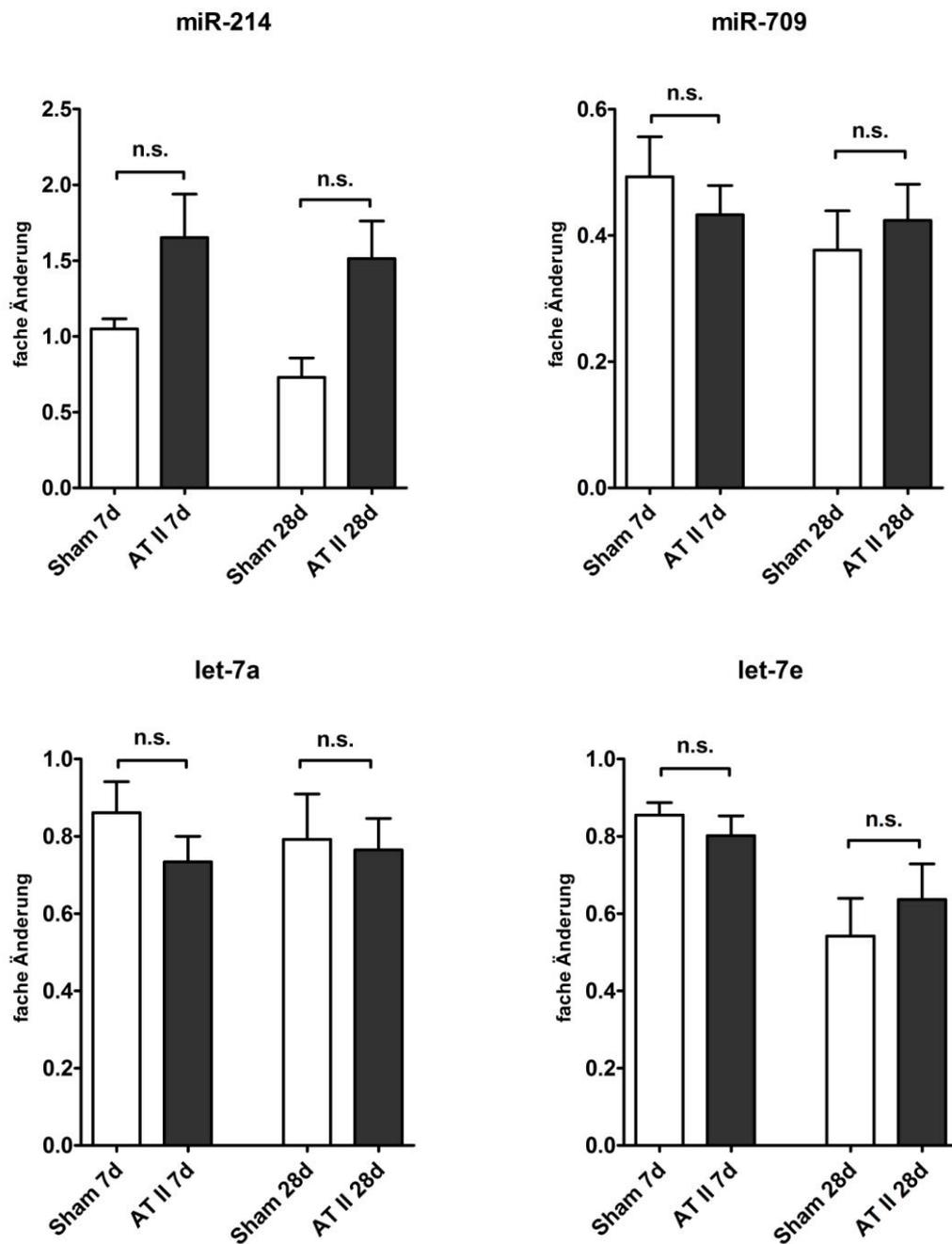


Abbildung 3.23: qRT-PCR von miR-214, miR-709 let-7a, let-7e im LV Myokard

Auch die Quantifizierung von miR-214, miR-709, let-7a und let-7e erbrachte keine Signifikanz in den Änderungen zwischen den Untersuchungsgruppen.

4 Diskussion

Auswahl des Tiermodells

Die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion stellt ein zunehmendes Problem in unserer Bevölkerung dar. Insbesondere die diffizile Diagnosestellung und unbefriedigende Möglichkeiten der Therapie im Vergleich zur HFrEF stellen eine Herausforderung für die Grundlagenforschung dar. Bisher gibt es nur wenige Kleintiermodelle anhand derer eine weitere Erforschung dieser Entität erfolgen kann.

Hierbei handelt es sich um Nagetiermodelle wie beispielsweise Dahl Salz-sensitive hypertensive Ratten (Doi et al. 2000), operativ herbeigeführte Nachlaststeigerung mittels Aortenligatur (Litwin et al. 1995) und die Gabe prohypertrophischer Agenzien wie Angiotensin II (Regan et al. 2015). Weitere Möglichkeiten stellen Modelle für metabolische Störungen, darunter Diabetes mellitus (Mori et al. 2014) und Adipositas (Christoffersen et al. 2003) sowie Tiermodelle für Alterungsprozesse dar (Reed et al. 2011).

Letztlich stellt die HFrEF eine multifaktoriell bedingte Krankheit dar, weshalb die beschriebenen Tiermodelle nur Teilaspekte der Pathogenese beleuchten können. Als Grundlage für unseren Versuchsaufbau wurde die Gabe von Angiotensin II in einer mittleren, gering blutdruckrelevanten Dosierung gewählt (Ichihara et al. 2001).

Grundlage für die Auswahl ist zum einen die Relevanz der arteriellen Hypertonie als wichtigem Risikofaktor der HFpEF (Oktay und Shah 2014; Owan et al. 2006). Zum anderen war die Steuerbarkeit einer medikamentösen Intervention über eine konstante subkutane Infusion an ansonsten gesunden und gesund geborenen Versuchstieren ein zentrales Entscheidungskriterium. Damit einher geht die Zurückführbarkeit der detektierbaren Veränderungen auf einen einzelnen, externen Stimulus. Weiterhin spielt Angiotensin II als Bestandteil des RAAS eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HFpEF.

Über die Implantation osmotischer Minipumpen ist im Hinblick auf die Kontrollierbarkeit des Stimulus eine konstante Rate der Applikation über den gesamten Versuchszeitraum möglich.

Da die diastolische Funktionsstörung des linken Ventrikels sowie die Entwicklung der HFpEF vermutlich in fließenden Stadien ablaufen, erfolgte die Untersuchung der Versuchstiere in einer frühen Gruppe nach 7 Tagen sowie in einer späten Versuchsgruppe nach 28 Tagen.

Nachweis der HFpEF unter Angiotensin-II Stimulation im Mausmodell

Ziel der Arbeit ist zunächst der Nachweis der Entstehung einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion in unserem Mausmodell. Die Bestätigung soll hierbei in Anlehnung an die Kriterien der European Society of Cardiology erfolgen (Ponikowski et al. 2016).

Nach den neuen Leitlinien der ESC von 2016 gliedert sich die Diagnose der HFpEF in:

- (1) Zeichen und Symptome der Herzinsuffizienz
- (2) Eine LVEF $\geq 50\%$
- (3) Einen Anstieg von BNP / nt-pro-BNP
- (4) Zeichen der strukturellen Herzerkrankung oder diastolischen Funktionsstörung

Klinische Zeichen und Symptome

Betrachtet man das erste vorgegebene diagnostische Kriterium stellen wir fest, dass die klinischen Zeichen beziehungsweise Symptome der Herzinsuffizienz zahlreich, in Abgrenzung zu anderen krankheitsbedingten Ursachen jedoch nicht sehr spezifisch und darüber hinaus aus wissenschaftlichem Standpunkt im Bezug auf Kleintiere schwer zu quantifizieren und reproduzieren sind. Da es sich, bezogen auf den Menschen, häufig um anamnestisch zu eruiende Entitäten handelt, erschwert dies die Evaluation im Mausmodell zusätzlich. Darüber hinaus sind diese Zeichen und Symptome in der HFpEF im Vergleich zur HFrEF häufig milder ausgeprägt. Weiterhin ist die Ausprägung in der chronisch stabilen Form geringer und die klinische Symptomatik kann zu Erkrankungsbeginn inapparent verlaufen (Boonman-de Winter et al. 2015; Kelder et al. 2011a; Mant et al. 2009).

Wenngleich es als Beispiel möglich wäre, das Gewicht der feuchten Lunge im Rahmen der Gewebeentnahme zu messen, so wäre es weder als spezifischer Hinweis auf eine Herzinsuffizienz zu werten, noch würde ein fehlender Nachweis einer pulmonalen Gewichtszunahme im Sinne einer Überwässerung als negatives Kriterium hinreichen.

Auf Basis oben genannter Problematiken und dem Ziel ein Modell für die sich entwickelnde und chronisch stabile HFpEF zu finden, wurde in unserer Studie auf den Versuch der Evaluation dieser Zeichen und Symptome verzichtet.

LVEF - Systolische Funktion

Wie der Name Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion impliziert, spielt die Ejektionsfraktion eine zentrale Rolle in der Definition der HFpEF. Als grundlegender Parameter der systolischen linksventrikulären Funktion wird gefordert, dass die LVEF in Patienten mit HFpEF mit $\geq 50\%$ nahe dem Normbereich liegt. In früheren Studien lag der Grenzwert zur Abgrenzung einer HFrEF mit $< 40\%$ häufig niedriger (Ponikowski et al. 2016).

Die echokardiographische Untersuchung der systolischen Ejektionsfraktion erbrachte ein signifikantes Absinken der LVEF im Vergleich zwischen Sham und AT II im Intervall nach 28 Tagen (Abb. 3.2). Trotz der sinkenden Tendenz der LVEF zeigt sich diese nach 28 Tagen Stimulation mit Angiotensin II im Mittel bei $52,08\% (\pm 1,66)$. Im Vergleich hierzu lag die Gruppe Sham bei $61,6\% (\pm 3,57)$ und die Gruppe AT II 7d bei $55,98\% (\pm 1,86)$. Nur eine einzige Maus, welche sich in der Gruppe Angiotensin II 28 Tage befand, zeigte eine LVEF $< 40\%$, ist damit in die HFrEF einzuordnen und wurde für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen nicht verwendet.

Wenngleich die Reduktion der LVEF einen negativen Einfluss auf die systolische Funktion vermuten lässt, zeigt sich der Mittelwert innerhalb der für die HFpEF festgelegten Grenzwerte. Einschränkend ist hierbei festzuhalten, dass die Bestimmung in unserem Versuch mittels Teichholz-Methode erfolgte (Lang et al. 2015b). Im Gegensatz hierzu wird in den aktuellen ESC Leitlinien die Bestimmung mit Hilfe der Planimetrie in zwei Ebenen nach Simpson empfohlen.

Auch die Bestimmung der Verkürzungsfraction, welche als Fraktion der Verkürzung des intraventrikulären Diameters in der Systole eingeschränkte Rückschlüsse über die Kontraktilität des linken Ventrikels erlaubt (Lang et al. 2015b), bestätigte eine Reduktion der systolischen Funktion des linken Ventrikels (Abb.3.3). Wir sahen hierbei eine signifikante Abnahme der FS im Vergleich der Versuchsgruppen Sham und AT II 28d ($p < 0,03$). Es handelt sich hierbei um einen relativ unspezifischen Parameter. Auch hier zeigt sich die FS der Versuchstiere unter Angiotensin II-Stimulation im Mittel mit

26,58 % ($\pm 0,99$) stets innerhalb der für Menschen angenommenen Normwerte (Lang et al. 2015b).

BNP

Einen großen Stellenwert in der Diagnose der Herzinsuffizienz im Allgemeinen, als auch als Kriterium der HFpEF haben die natriuretischen Peptide BNP und nt-pro-BNP inne (Oudejans et al. 2011). In Folge erhöhter Wandspannungen produzieren die Kardiomyozyten vermehrt proBNP, welches dann in das aktive BNP sowie das inaktive nt-pro-BNP gespalten wird (Levin et al. 1998; Bold und Bold 2005). Diese werden im Rahmen der Herzinsuffizienz aus dem linken Ventrikel in das Blut abgegeben und sind dann laborchemisch in der klinischen Anwendung als wichtigster Biomarker der Herzinsuffizienz nachweisbar (Yasue et al. 1994; Weber und Hamm 2006). Generell bleibt anzumerken, dass die BNP-Spiegel der HFpEF im Vergleich zur HFrEF niedriger sind (Anjan et al. 2012).

Auf Grund fehlender Referenzwerte für BNP-Spiegel bei HFpEF im Serum der Maus sowie geringer verfügbarer Serummengen als Versuchsmaterial, erfolgte die indirekte Bestätigung im Sinne des Nachweises einer gesteigerten Expression von BNP im Mausmyokard mittels qRT-PCR.

Hier konnten wir nachweisen, dass es in unserem Experiment unter Stimulation mit Angiotensin II zu einer Elevation der Expression von BNP im Mausmyokard kommt. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich der Gruppen Sham gegen AT II 7d ($p < 0,03$). Im Intervall nach 28 Tagen zeigt sich keine Signifikanz der scheinbaren Expressionssteigerung.

Insgesamt bleibt die Beurteilung der Elevation von BNP diffizil, da die Serum-Spiegel auch in der humanen HFpEF in der chronisch stabilen Form sowie im Vergleich zur HFrEF geringer sind (Maisel et al. 2003; Kelder et al. 2011b; Roberts et al. 2015).

Abschließend werten wir das Ergebnis der vermehrten BNP-Expression auf molekularer Ebene als indirekten Nachweis der Auswirkungen herzinsuffizienzbedingter hämodynamischer Veränderungen und Belastungen.

Echokardiographische Zeichen der diastolischen Funktionsstörung

Nachfolgend stellt die Evaluation der diastolischen Funktion des linken Ventrikels sowie einiger struktureller Parameter das zentrale Element der echokardiographischen Studie dar. Diese sollen sowohl als Bestätigung einer einsetzenden diastolischen Funktionsstörung als auch für die Bestätigung der diagnostischen Kriterien der HFpEF dienen (Ponikowski et al. 2016).

In einer vergleichenden Messung der Herzfrequenzen nach Erfassung im transmitralen Flusddoppler, konnte eine signifikante Frequenzänderung unter Stimulation mit Angiotensin II in unserem Mausmodell ausgeschlossen werden. Damit können wir annehmen, dass keine Verfälschung frequenzabhängiger echokardiographischer Parameter vorliegt (Abb. 3.1).

Darüber hinaus konnten wir durch Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers eine dilatative Veränderung des linken Ventrikels in unseren Versuchsaufbau ausschließen. Diese wäre für eine HFpEF untypisch (van Heerebeek et al. 2006). Im Vergleich der Gruppen kam es entsprechend zu keinem signifikanten Anstieg des LVIDd zu den untersuchten Zeitintervallen (Abb. 3.4). Die Bestimmung der diastolischen interventrikulären Septumdicke ergab einen moderaten, jedoch signifikanten Anstieg in der Gruppe AT II 7d. Nach 28 Tagen erscheint dies jedoch nicht progredient, sondern eher rückläufig. Damit zeigt sich die Entwicklung einer geringen und im Verlauf nicht progredienten Hypertrophie.

Eine Schlüsselrolle in der Diagnose der HFpEF stellt das Verhältnis E/E' dar. Dieses wird als Quotient des frühen transmitralen Flusses über der Mitralklappe und der frühen, aus septaler und lateraler Messung gemittelten Gewebegeschwindigkeit auf Höhe des Mitralklappenringes bestimmt (Nagueh et al. 2016). Die Leitlinien der ESC fordern hierbei einen Quotient von ≥ 13 als sicheren Nachweis der diastolischen Funktionsstörung.

Wir konnten zeigen, dass es nach 28 Tagen Angiotensin II im Vergleich zu den Gruppen Sham und AT II 7d zu einem signifikanten Anstieg des E/E' -Verhältnisses kommt ($p < 0,002$ für Sham vs. AT II 28d, $p < 0,003$ für AT II 7d vs. 28d) (Abb. 3.8).

Mangels validierter Referenzwerte für das E/E' Verhältnis und als Diagnosekriterium für eine diastolische Dysfunktion oder HFpEF der Maus, können die Werte der

Messungen nicht quantitativ mit den geforderten Kriterien der ESC verglichen werden. Qualitativ lässt sich festhalten, dass es im Vergleich der Gruppe Sham vs. AT II 28d zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg des E/E' um 52,53 % kommt.

Der Anstieg der Verhältnisses E/E' erlaubt hierbei Rückschlüsse auf steigende linksatriale Füllungsdrücke. Es handelt sich somit im Gegensatz zu anderen diastolischen Parametern wie der IVRT, dem E/A-Verhältnis oder der DT um einen vorlastunabhängigen Parameter (Nagueh et al. 1997).

Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass die septal gemessene Gewebegeschwindigkeit E' ebenfalls eine Reduktion unter Stimulation mit Angiotensin II erfährt (Abb. 3.10). Signifikant rückläufig zeigt sich hierbei der Parameter E' septal im Vergleich der Gruppen Sham und AT II 28d. Als ebenfalls vorlastunabhängiger Parameter ergibt die Reduktion im Verlauf Hinweise auf eine abnehmende Relaxationsgeschwindigkeit im Herzen der Versuchstiere (Nagueh et al. 1997). Der Quotient E'/A' erreichte, trotz scheinbarer Reduktion im Verlauf, im Vergleich der Gruppen kein ausreichendes Signifikanzniveau (Abb. 3.9).

Neben den Gewebedoppler-gestützten Messwerten erfolgte die Bestimmung klassischer diastolischer Parameter wie der IVRT, des E/A-Verhältnisses und der Dezelerationszeit des frühen Mitralklappeneinstromes (DT).

Wenngleich augenscheinlich ein tendenzieller Anstieg der isovolumetrischen Relaxationszeit nachweisbar ist, kann hierbei in unserem Mausmodell keine Signifikanz nachweisen werden (Abb. 3.5). Eine Verlängerung der IVRT ist bei Auftreten einer Relaxationsstörung mit verlängerter Entspannungsphase des linken Ventrikels zu beobachten. Steigt im Progress der Erkrankung die Vorlast beziehungsweise der Füllungsdruck des linken Atriums, so normalisiert sich die IVRT wieder (Cohen et al. 1996). Man spricht dabei von einer Pseudonormalisierung. Bei einer späteren restriktiven Störung der Füllung kann es dann wiederum zu einer verkürzten IVRT kommen. Ob es sich im Falle unseres Mausmodells um einen Prozess der Pseudonormalisierung handelt und der maximale Anstieg oder einer Reduktion der IVRT durch die Auswahl der Versuchszeitpunkte verpasst wurde, lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht feststellen.

Die Bestimmung des E/A-Quotienten (Abb. 3.7) sowie der DT (Abb. 3.6) ergab ebenfalls keine signifikanten Änderungen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Im Rahmen der Entwicklung einer Relaxationsstörung des linken Ventrikels wären eine Reduktion des E/A-Quotienten sowie ein Anstieg der Dezelerationszeit sowie im Zuge eines restriktiven Füllungsmusters eine Steigerung von E/A und eine kürzere DT zu erwarten gewesen. Auch hier kann es im Progress der Erkrankung durch die Vorlastabhängigkeit der Parameter zu einer Pseudonormalisierung kommen (Cohen et al. 1996). Wie zuvor diskutiert, kann auch hier anhand der Daten nicht festgestellt werden, ob durch die Auswahl der Versuchszeitpunkte eine signifikante Änderung verpasst wurde oder diese erst zu einem späteren Zeitpunkt als nach 28 Tagen auftritt.

Vergleich zu anderen Studien

Bisher gibt es wenige ausführliche Studien, welche sich auf die echokardiographische Untersuchung eines Mausmodells mit Angiotensin II Substitution, im Hinblick auf eine diastolische Dysfunktion oder HFpEF beziehen. Parallel zu unserer Forschungsarbeit haben Regan et al. 2015 in Mäusen mit einer Angiotensin II Substitution von 200 µg/kg/d eine HFpEF induziert. Die Applikation erfolgte subkutan über eine implantierte osmotische Pumpe. Durch Druckmessung mittels eines Katheters konnte die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus unter Intervention ausgeschlossen werden. Bezüglich der diastolischen Funktionsstörung gelang Regan et al. der echokardiographische Nachweis einer normalen LVEF bei erhöhter IVRT sowie die Darstellung eines erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druckes in der LV-Katheter Messung. Der Nachweis eines pathologisch veränderten E/E' gelang der Forschungsgruppe nicht (Regan et al. 2015). Vergleichend bleibt festzuhalten, dass in dieser Studie mit einer niedrigeren Dosierung von Angiotensin II gearbeitet wurde (200 µg/kg/d vs. 720 µg/kg/d). Bezüglich des erhöht gemessenen LVEF ist anzunehmen, dass dies in gesteigerter Ausprägung in unserem Versuch ebenfalls zu erwarten ist. Mögliche Ursachen für die Unterschiede der echokardiographischen Ergebnisse lassen sich bei ähnlichem Studiendesign am ehesten auf die unterschiedliche Konzentration von AT II zurückführen. Ob es sich ohne Nachweis eines pathologischen E/E' Verhältnisses und ohne Nachweis eines erhöhten BNP um ein adäquates Modell für die HFpEF handelt, bleibt zu diskutieren.

In einer Studie von Zhong et al. 2010 wurden Mäuse über 14 Tage per subkutaner Infusion über osmotische Minipumpen mit Angiotensin II in den Dosierungen 1,5 mg/kg/d und 0,15 mg/kg/d versorgt (Zhong et al. 2010). Dies erfolgte im Rahmen einer Untersuchung der Effekte von ACE 2 im Hinblick auf myokardiale Hypertrophie, Fibrose und diastolische Dysfunktion. Bereits hier zeigten sich im Hinblick auf die hohe Angiotensin II-Dosierung Hinweise auf eine diastolische Funktionsstörung bei erhaltener LVEF. Zeitgleich entwickelten die Mäuse jedoch eine stark ausgeprägte myokardiale Hypertrophie und Fibrose sowie eine arterielle Hypertonie. Ähnlich der Ergebnisse von Regan et al. konnte unter niedrig dosierter Gabe von Angiotensin II kein pathologisches E/E'-Verhältnis nachgewiesen werden. Möglicherweise bedeutet der erfolgreiche Nachweis eines reduzierten E/A-Verhältnisses nach 14 Tagen, dass dieser Nachweis durch die in unserem Projekt gewählten zeitlichen Intervalle verpasst wurde.

Sowohl unter der niedrigen als auch der höher dosierten Gabe von Angiotensin II kam es nachweislich zu einer gesteigerten BNP Expression in der qRT-PCR.

2008 versorgten Yagi et al. ebenfalls Mäuse mit einer osmotischen Minipumpe, welche eine deutlich höhere Rate von 2 mg/kg/d Angiotensin II über 2 Wochen applizierte. Es entwickelten sich hierunter eine arterielle Hypertonie, eine echokardiographisch nachweisbare Hypertrophie sowie ein verringerter E/A-Quotient und eine verminderte Dezelerationszeit. Messungen mittels Gewebedoppler wurden in dieser Studie nicht durchgeführt (Yagi et al. 2008).

Eine weitere Studie über implantierte Angiotensin II Pumpen im Mausmodell mit einer Rate von 2 mg/kg/min über 4 Wochen wurde 2010 publiziert (Jia et al. 2012). Hier wurde der Einfluss von Allopurinol auf oxidativen Stress und kardiale Fibrose untersucht. Unter AT II wurde hier eine arterielle Hypertonie und ein vermindertes E/A-Verhältnis festgestellt. Auch hier erfolgten keine erweiterten Messungen mittels Gewebedoppler.

Die in unserem Projekt verwendete Dosierung von 0,72 mg/kg/d wurde, im Vergleich zu den bisher verwendeten Dosierungen in anderen Studien, in einem mittleren Dosis-Bereich gewählt. Der Untersuchungszeitraum wurde, im Vergleich zu Zhong et al. sowie Yagi et al., mit 28 Tagen in der doppelten Länge gewählt. Wir vermuten hierbei, dass durch die höhere Dosierung im Vergleich zu den niedrigen subpressorischen Dosen eine ausgeprägtere diastolische Funktionsstörung, gemessen am E/E' Verhältnis, erreicht werden kann. Auf der anderen Seite gehen wir davon aus, dass durch eine niedrigere Dosierung im Vergleich zur hochdosierten Gabe eine überschießende Hypertrophie mit frühzeitigem Übergang in eine HFrEF vermieden wird. Trotz moderatem Anstieg der Septumdicke nach 7 Tagen Angiotensin, sehen wir diese These bei Verlaufskonstanz und ausbleibendem Progress der Hypertrophie nach 28 Tagen AT II als bestätigt an.

Bewertung

Abschließend stellt sich die Frage, ob die erhobenen Daten eine Verwendung des Mausmodells für eine Angiotensin II induzierte HFpEF rechtfertigen.

Wenngleich wir aus oben genannten Gründen eine zuverlässige Auswertung der klinischen Zeichen und Symptome der HFpEF als nicht realisierbar ansehen, war es uns möglich den Marker BNP in gesteigerter Expression im Myokard der Versuchstiere unter Angiotensin II Stimulation nachzuweisen. Einschränkend ist hier zu erwähnen, dass uns eine Messung der Konzentration im Serum der Mäuse, in Übereinstimmung mit den Leitlinien der ESC 2016, nicht sinnvoll erschien. Begründet ist dies in mangelnder Übertragbarkeit auf Grund fehlender Referenzwerte in der Maus sowie infolge geringer gewonnener Probenmengen. Der gewählte indirekte Nachweis einer deutlichen Expressionssteigerung von BNP sollte hierbei ersatzweise, als Surrogat der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, eine berechtigte Bestätigung liefern.

Trotz einer tendenziellen Reduktion der gemessenen systolischen Parameter unter Intervention, sahen wir in den Mittelwerten aller Gruppen eine $EF \geq 50 \%$. Eine linksventrikuläre Dilatation konnte ausgeschlossen werden.

Bezüglich der diastolischen Parameter bestätigte sich eine Steigerung des von der ESC geforderten Parameters E/E' . Auch die Messung von E' erbrachte eine weitere Bestätigung des in den Leitlinien geforderten Nachweises einer diastolischen Funktionsstörung. Weshalb es bei den weiteren gemessenen diastolischen Parametern zu keinen signifikanten Änderungen kam, lässt sich nicht abschließend beantworten.

Darüberhinaus erreichten wir, im Gegensatz zu den oben genannten Studien, durch die mittlere Dosierung der Angiotensin II-Applikation neben einer signifikanten diastolischen Dysfunktion nur eine geringe und im Verlauf stabile myokardiale Hypertrophie. Wir sehen darin einen Vorteil gegenüber der niedrigen und hochdosierten Gabe von AT II.

Unter Zusammenschau der erhaltenen Ergebnisse sehen wir die grundlegenden Kriterien der HFpEF als erfüllt und damit die Verwendung des Mausmodells der Angiotensin II induzierten HFpEF als berechtigt an. In nachfolgende Studien sollten eine arterielle und linksventrikuläre Druckmessung sowie die echokardiographische

Untersuchung zu anderen Zeitintervallen zusätzlichen Aufschluss über die hämodynamischen Auswirkungen erbringen.

Zuletzt bleibt einschränkend festzuhalten, dass über die Angiotensin II-Applikation nur eine vermutete Facette der multifaktoriellen Genese der Erkrankungen dargestellt werden kann und die genauen Pathomechanismen nicht abschließend geklärt sind. Insbesondere die fehlende Wirksamkeit von ACE-Hemmern und ARBs in klinischen Studien lassen diesbezüglich viele Fragen offen (Cleland et al. 2006; Massie et al. 2008; Yusuf et al. 2003). Nichtsdestoweniger stellt daher die weitere Entwicklung und Erforschung der Tiermodelle eine wichtige Möglichkeit zur Lösung dieser Fragestellungen dar.

Bestätigung der Auswirkungen von Angiotensin II auf molekularer Ebene

Als Bestätigung der Auswirkungen der Gabe von Angiotensin II auf das Myokard auf molekularbiologischer Ebene erfolgte die vergleichende Bestimmung der Expression einiger für die Entwicklung der HFpEF relevanter Schlüsselproteine. Ziel ist eine Bestätigung des Versuchskonzeptes. Die Untersuchung und Darstellung soll dabei keinen Anspruch auf Vollständigkeit besitzen.

CTGF spielt eine wichtige Rolle als Mediator einer Angiotensin II induzierten Fibrose via Angiotensin Rezeptor 1 (Ruperez et al. 2003; Ahmed et al. 2004). Wir konnten bestätigen, dass es in unserem Modell unter Gabe von AT II zu einem Anstieg der Expression von CTGF kommt. Signifikanz zeigte sich lediglich im Vergleich zwischen Sham 7d und AT II 28d.

Weiterhin zeigte sich in der qRT-PCR von Kollagen 1 und 3 ein deutlicher Anstieg der Expression, jeweils im Vergleich Sham 7d gegen AT II 7d. Nach 28 Tagen lässt sich die gesteigerte Expression nicht mehr signifikant darstellen. Die vermehrte Einlagerung von Kollagen in die extrazelluläre Matrix führt bekanntermaßen zu einer Fibrose mit reduzierter Relaxationsfähigkeit und erhöhter Steifigkeit des Ventrikels (Kasner et al. 2011). Weshalb die Expressionssteigerung zum späteren Zeitpunkt nicht mehr darstellbar ist bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Bestimmung von TIMP 2, eines Inhibitors der ECM abbauenden Matrix-Metallo-Proteinasen (Ahmed et al. 2006b), ergab eine Expressionssteigerung nach 7d, welche ebenfalls nach 28 Tagen nicht mehr nachweisbar war.

Wir werten die oben genannten Ergebnisse als Bestätigung einer vermehrten profibrotische Stimulation unter Angiotensin II und als mögliche Ursache der einsetzenden diastolischen Funktionsstörung. Weshalb es nach 28 Tagen zu einer Angleichung der Expression von Kollagen 1, 3 und TIMP 2 zwischen den Gruppen AT II und Sham kommt, lässt sich anhand der Daten nicht darlegen. Die anhaltende Expressionssteigerung von CTGF ließe eine entsprechend vermehrte Proteinsynthese dieser Parameter erwarten (Chen et al. 2000) und spricht hierbei gegen eine Reduktion der Exkretion der implantierten osmotischen Mini-Pumpen als Ursache.

Zuletzt erfolgte die Quantifizierung der sarkolemmalen Kalzium-Pumpe SERCA 2. In der diastolischen Dysfunktion kann ein anhaltend erhöhter Kalziumspiegel der Herzmuskelzellen zu einer verlängerten Kontraktion mit reduzierter Relaxationsfähigkeit führen. Wir konnten zeigen, dass es in unserem Modell unter Angiotensin II-Infusion zu einer verminderten Expression von SERCA 2 im linksventrikulären Myokard kommt. Dies bestätigt sich sowohl zum Zeitpunkt nach 7 Tagen als auch nach 28 Tagen. Pathophysiologisch ist hierbei eine verminderte Kalziumrückbeförderung aus dem myokardialen Zytosol in das sarcoplasmatische Retikulum als Resultat bekannt. Dieser erhöhte Kalziumspiegel führt zu einer erschwerten Terminierung der Kontraktion (Bers et al. 2003).

Unter Zusammenschau der erhaltenen Ergebnisse sehen wir die Annahme einer Angiotensin II-bedingten Induktion von molekularbiologischen Veränderungen im Sinne der Genese der diastolischen Dysfunktion als bestätigt an.

Unklar bleibt jedoch weiterhin, weshalb trotz mutmaßlich zentraler Beteiligung des RAAS an der Genese der HFpEF, eine Therapie mittels ACE-Hemmern oder ARB in der klinischen Erprobung keine Verbesserung der Prognose erbrachte (Cleland et al. 2006; Massie et al. 2008; Yusuf et al. 2003). Ob es sich zum Zeitpunkt der eingetretenen Herzinsuffizienz bereits um einen irreversiblen Zustand handelt und es bei frühzeitiger Anwendung dieser Medikamentengruppen zu einer Prognoseverbesserung kommen könnte bleibt Gegenstand der Forschung. Wir hoffen, dass dieses Mausmodell in Zukunft zur Beantwortung dieser Fragestellungen beitragen kann.

microRNA

Nach erfolgreicher Evaluation des Mausmodells für HFpEF soll zuletzt per Microarray ein Profil der Änderungen des microRNA-Haushaltes des Myokards unter Einfluss von Angiotensin II erstellt werden. Im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Sham, AT II 7d und AT II 28d sahen wir nur eine geringe Zahl an microRNAs, welche eine deutliche und signifikante Abweichung des Expressionsmusters aufweisen (Abb. 3.16, 3.17). Letztlich sahen wir 24 microRNAs in der Gruppe AT II 7d und lediglich 6 in der Gruppe AT II 28 d, welche eine Expressionsänderung mit einem Konfidenzintervall von $p < 0,05$ aufweisen.

Unter diesen wurden miR-21, miR-15b, miR-133b, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b, miR-709, miR-214, let-7a und let7e mittels qRT-PCR in den Gruppen Sham 7d (n=5), Sham 28d(n=5), AT II 7d(n=10) und AT II 28d(n=10) untersucht. Weiterhin erfolgte die Untersuchung von miR-29 und miR-133a, welche in den Microarrays keine signifikanten Expressionsänderungen ergaben, jedoch als profibrotisch wirkende microRNAs zur weiteren Quantifizierung im Modell ausgewählt wurden (van Rooij et al. 2008, Duisters et al. 2009).

Trotz scheinbarer Expressionsänderungen im Vergleich zwischen den Kontroll- und Interventionsgruppen, konnte lediglich für miR-21 eine signifikante Hochregulation in AT II 7d versus Sham 7d sowie für miR-133a ein signifikantes Absinken der Expression für AT II 28 d versus Sham 28 d gezeigt werden. Zum einen gehen wir hierbei von falsch positiven Ergebnissen im Rahmen des Microarrays bei niedrigen Zahlen n der Versuchsgruppen aus. Zum anderen wäre möglicherweise eine größere Anzahl an Versuchstieren notwendig gewesen, um bei den geringen detektierten Expressionsänderungen und der Variabilität innerhalb der Gruppen ein entsprechendes Signifikanzniveau in der qRT-PCR zu erreichen.

miR-21 ist eine nicht organspezifische, universell im Organismus der Säugetiere vorkommende microRNA (Lagos-Quintana et al. 2002). In verschiedenen Studien konnte die Rolle dieser microRNA an der Entstehung von Tumoren dargestellt werden. Auf Grund dieses Potentials sowie der Überexpression in einigen Tumoren wird miR-21 auch als oncomir eingeordnet (Selcuklu et al. 2009). Die Bedeutung von miR-21 scheint dabei unter anderem in antiapoptischen Effekten (Chan et al. 2005), einer Induktion

vermehrten Tumorwachstums (Feng et al. 2014) sowie der Hemmung von Tumorsuppressorgenen zu liegen (Meng et al. 2007).

Daneben spielt miR-21 eine wichtige Rolle im Bezug auf die Entwicklung des Herzens sowie in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen einer kardialen Hypertrophie zu einer vermehrten Expression von miR-21 kommt (Cheng et al. 2007; Sayed et al. 2008). Darüberhinaus erbrachte dessen Inhibition in der Kultur von Kardiomyozyten eine Reduktion der Hypertrophie (Thum et al. 2007).

Thum et al. konnten 2008 zeigen, dass microRNA-21 in Fibroblasten des Myokards via MAP-Kinase-Signalweg zu einem vermehrten Ausschütten von Wachstumsfaktoren sowie einer Zunahme der extrazellulären Matrix führt. Darüber hinaus zeigte sich eine Apoptosehemmung und Proliferationssteigerung der Fibroblasten. Dies fördert die Entwicklung einer Hypertrophie und interstitiellen Fibrose im Myokard. Die Behandlung eines Mausmodells für Hypertrophie (Aortenligatur) mittels Antagomir führte hierbei zu einer Reduktion der Hypertrophie und Fibrose (Thum et al. 2008). Die Infiltration der Fibroblasten ins Gewebe scheint dabei über eine Expressionssteigerung von MMP2 durch miR-21 gefördert zu werden (Roy et al. 2009).

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine Apoptose-hemmende Funktion von miR-21 in Endothelzellen unter Scherkräften darstellen. Daneben führte dieser Stress auch zu einer miR-21-induzierten Steigerung der Stickstoffmonoxid-Verfügbarkeit via endothelialer NO-Synthetase (Weber et al. 2010). Ob es zu ähnlichen Effekten auch im Myokard unter erhöhten linkventrikulären Drücke im Rahmen der HFpEF kommt ist bisher nicht geklärt.

MicroRNA-133a stellt eine der am häufigsten vorkommenden microRNAs im Myokard dar und ist im gesunden Organismus muskelspezifisch (Yu et al. 2014). Sie stellt weiterhin ebenfalls einen wichtigen Faktor in der Entwicklung des Herzens dar (Chen et al. 2006).

Carè et al. konnten 2007 zeigen, dass miR133a eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der myokardialen Hypertrophie spielt. Eine gesteigerte Expression milderte hierbei in vitro die Effekte einer hypertrophischen Stimulation ab. Weiterhin erfolgte der Nachweis, einer verminderten miR-133 Expression in drei verschiedenen Nagernmodellen für

myokardiale Hypertrophie. Schlussendlich konnte gezeigt werden, dass eine Infusion von Antagomir 133a im Mausmodell ausreichend zur Induktion einer kardialen Hypertrophie ist (Care et al. 2007).

Darüberhinaus konnte in der Zellkultur in Kardiomyozyten und Fibroblasten von Ratten nach Knock-Out von miR-133 ein deutlicher Anstieg der Expression der ECM Regulators CTGF festgestellt werden (Duisters et al. 2009).

In einem weiteren Versuchsaufbau konnte in der Zellkultur auch eine direkte Regulation von Kollagen 1A1 durch miR-133a und miR-29b nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Irbesartan im Rattenmodell unter Angiotensin II Infusion zu einer signifikant reduzierten myokardialen Fibrose, geringeren Expression von Kollagen 1A1 und normalen Expression mir-133a und miR-29b führt (Castoldi et al. 2012).

Auch in Reaktion auf oxidativen Stress zeigt sich ein Einfluss von miR-133. So ergeben sich in der Zellkultur unter Expressionssteigerung von miR-133 deutlich geringere Apoptoseraten von Kardiomyozyten nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid (Xu et al. 2014). Dies weist auf eine kardioprotektive Rolle dieser microRNA hin.

Wie oben dargestellt zeigen vorhergehenden Studien die prohypertropischen sowie profibrotischen Effekte einer vermehrten Expression von miR-21 sowie einer reduzierten Expression von miR-133a. Dies spiegelt sich auch im Einklang zu den in unserem Mausmodell gemessenen Effekten wieder.

Letztlich liegen auch zu anderen der von uns näher untersuchten microRNAs Hinweise auf eine Rolle in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen vor. So zeigt sich beispielsweise miR-199 im Rahmen einer Hypertrophie ebenfalls erhöht exprimiert (Sucharov et al. 2008).

Nach Aortenligatur konnte weiterhin eine vermehrte Expression von miR-15 dargestellt werden. Es konnte belegt werden, dass diese microRNA zu einer Hemmung von TGFbeta führt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte nach Behandlung mit miR-15 Antagomir eine gesteigerte Fibrose nachgewiesen werden (Tijsen et al. 2014).

miR-15 führte darüberhinaus in weiteren Versuchen zur Reduktion einer postnatalen Proliferation der Kardiomyozyten (Porrello et al. 2011; Porrello et al. 2013). Die

Hemmung von miR-15 konnte im Modell die Regenerationsfähigkeit des Myokards erhöhen (Hullinger et al. 2012).

Für miR-214 wurde im Rahmen von Ischämie und Reperfusion eine kardioprotektive Wirkung durch Hemmung von Apoptose und Fibrose sowie einer Modulation des Kalzium-Haushaltes entgegen einer Kalzium-Überladung nachgewiesen (Aurora et al. 2012).

Die Forschungsgruppe um Zhou konnte kürzlich belegen, dass Let-7a eine antihypertrophische Wirkung hat. Unter dem Einfluss von Angiotensin II konnte eine verminderte Expression von Let-7a im Mausmodell dargestellt werden. Eine Überexpression von Let-7a wiederum milderte die Hypertrophie deutlich ab (Zhou et al. 2017).

Nach Myokardinfarkt zeigte sich ebenfalls eine verminderte Expression der Let-7-Familie im Rattenmodell. Im Hinblick auf Let-7e konnte nach Expressionssteigerung eine Verminderung von Arrhythmien nach Myokardinfarkt via Suppression von Beta-1-Adrenorezeptoren im Myokard nachgewiesen werden (Li et al. 2014).

Neuere Untersuchungen ergaben das Let-7e einen Mediator proinflammatorischer Reaktionen im Gefäßsystem darstellt (Lin et al. 2017). Hierbei lässt sich ein Zusammenhang zur perivaskulären Inflammation und endothelialen Dysfunktion im Rahmen der HFpEF vermuten.

Lediglich in Bezug auf miR-709 ergaben sich bisher keine Forschungsergebnisse die eine Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie des Herzens nahelegen. Bisher zeigte sich ein Mitwirken in der Regulation inflammatorischer Prozesse (Li et al. 2016), der Differenzierung von Adipozyten (Chen et al. 2014) und der Entwicklung des hepatozellulären Karzinomes (Liu et al. 2015). Ob diese microRNA einen Anteil an der Pathogenese der HFpEF hat bleibt auch im Hinblick auf die Ergebnisse unseres Versuches fraglich.

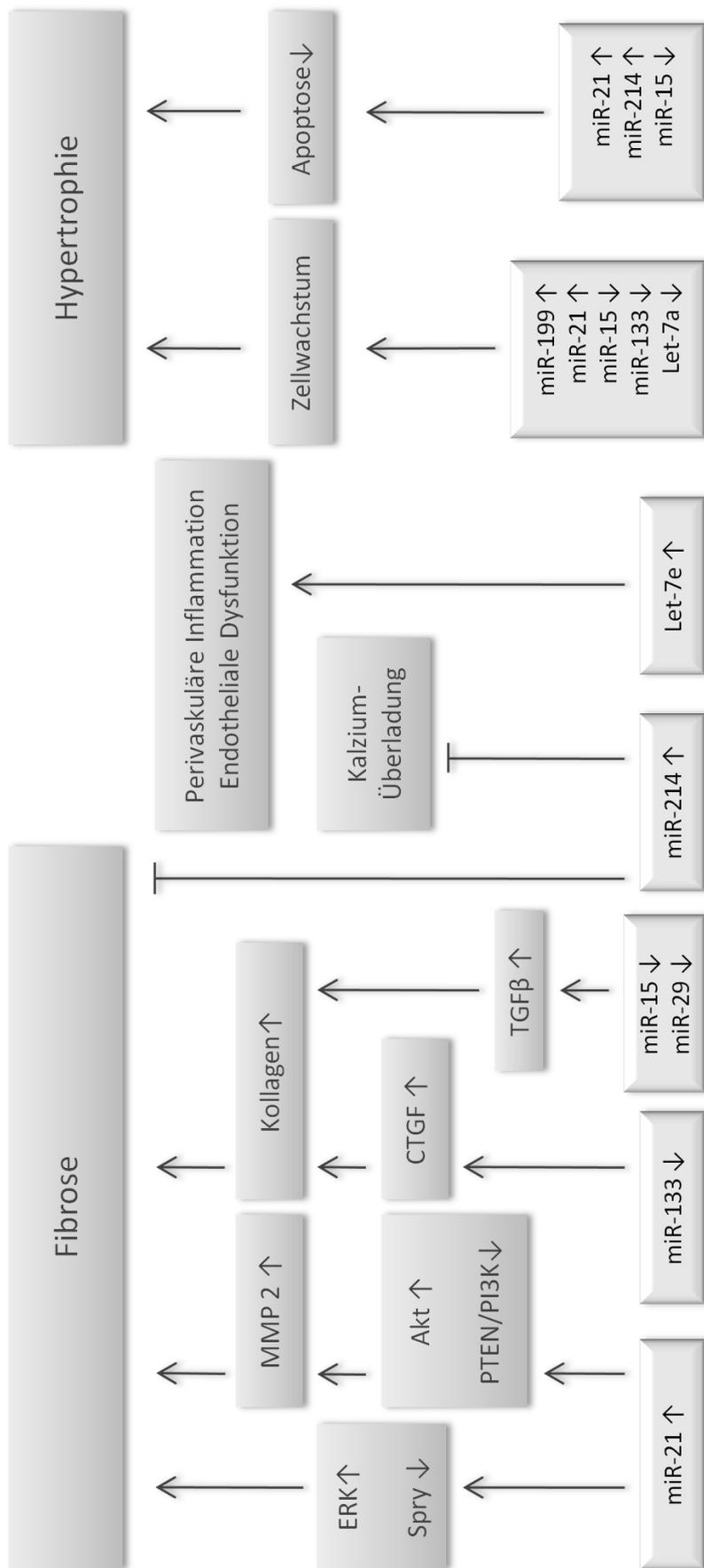


Abbildung 3.24: Funktionen der ausgewählten microRNAs

Bewertung und Ausblick

Bereits die Auswertung der Microarray Daten deutete an, dass relativ geringe Expressionsänderungen der microRNAs im Myokard unter Einfluss der geringen Dosis von Angiotensin II stattfinden.

Die Gründe liegen hierbei vermutlich an der niedrigen Dosis des applizierten Angiotensin II, mit entsprechend geringer ausgeprägten und damit schwerer zu detektierenden molekularbiologischen Veränderungen. Darüber hinaus sind möglicherweise nur geringe Expressionsänderungen der microRNAs zur Regulation des Proteinhaushaltes notwendig. Da es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung handelt, ist davon auszugehen, dass möglicherweise die Summe aus subtilen Veränderungen verschiedener microRNAs die Entstehung der Erkrankung bedingen könnte.

Ähnlich wie im Bezug auf das RAAS ist vorstellbar, dass die Änderung der Expression dieser microRNAs zunächst als protektiver Mechanismus eingeleitet werden und im Sinne eines „circulus vitiosus“ letztlich zur Aufrechterhaltung und dem Progress der Herzinsuffizienz beitragen.

Nach Analyse der Daten konnte für miR-21 und miR-133a eine deutliche und signifikante Expressionsänderungen dargestellt werden. Damit konnten wir zeigen, dass eine chronische Angiotensin II Infusion zu einer vermehrten Expression von miR-21 und reduzierten Expression von miR-133a führt. Dies zeigt sich im Einklang mit grundlegenden Forschungsergebnissen, welche diese Konstellation als Auslöser für eine myokardiale Fibrose und Hypertrophie sehen. Wir gehen davon aus, dass miR-21 und miR-133a in unserem Mausmodell eine zentrale Funktion bezüglich der strukturellen und funktionellen Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene haben und eine Schlüsselrolle in der Angiotensin II induzierten HFpEF spielen.

Darüberhinaus zeigten sich jedoch auch bei einem Großteil der weiteren untersuchten microRNAs scheinbare Tendenzen einer veränderten Expression. Wie oben dargestellt sind aktuell bereits zahlreiche verschiedene Pathomechanismen dieser microRNAs im Hinblick auf Erkrankungen des Herzens und insbesondere die myokardiale Fibrose und Hypertrophie bekannt.

Die scheinbaren Steigerungen der Expressionen von miR-199 und miR-214 könnten ähnlich wie miR-21 zur kardialen Hypertrophie beitragen. Auch eine verminderte Expression von Let-7a könnte hierbei mitwirken. Gleichmaßen zeigt sich miR-29c wie miR-133 vermindert exprimiert und ist dabei mutmaßlich an der Fibroseinduktion beteiligt. Das geforderte Signifikanzniveau der Expressionsänderungen wird in unserem Versuch zwar verfehlt, jedoch könnte das einwirken mehrerer subtiler Expressionsänderungen in Summe einen deutlichen Effekt auf Ebene der mRNA Expression bewirken.

Interessanterweise zeigt sich für die antifibrotischen microRNAs miR-15b und miR-214 eine scheinbare Steigerung der Expression. Diese erreicht für miR-15b im Vergleich der Gruppen Angiotensin II 7 Tage und Sham 28 Tage ein signifikantes Ergebnis. Nach aktuellen Erkenntnissen würden diese microRNAs bei gesteigerter Expression der myokardialen Fibrose entgegenwirken. Entsprechend könnte es sich hierbei um eine kardioprotektive Gegenregulation des Organismus handeln. Eine weitere Untersuchung dieser microRNAs ist in Zukunft nicht nur zum tieferen Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie, sondern insbesondere auch als Ansatz der medikamentösen Therapie sehr attraktiv.

Bemerkenswerte Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von Lin et al. 2017, welche einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression von Let-7e und proinflammatorischen Prozessen im Gefäßsystem erbrachten. Dies könnte im Rahmen der HFpEF zu einer zunehmenden endothelialen Dysfunktion mit nachfolgender Relaxationsstörung sowie zu einer perivaskulären Fibrose führen. In der qRT-PCR zeigten sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen der Microarrays jedoch keine signifikanten Expressionsänderungen von Let-7e.

Es bleibt festzuhalten, dass die definitiven Pathomechanismen der HFpEF bisher weitestgehend unklar sind. Auch wenn viele zur diastolischen Dysfunktion und Herzinsuffizienz führende molekularbiologische Ansätze bekannt sind, bleiben diese einer medikamentösen Beeinflussung und damit einer klinischen Bestätigung der Hypothesen schuldig.

Neben den Auswirkungen auf Hypertrophie- und Fibroseinduktion wird es von Interesse sein fehlende Verknüpfungen zwischen microRNAs und strukturellen sowie funktionellen Anteilen des kontraktiven Apparates der Kardiomyozyten, der

Kalziumhomöostase, der inflammatorischen Vorgänge im Myokard und der endothelialen Dysfunktion zu finden. In Zukunft könnte es durch die weitere Erforschung von microRNAs möglich sein fehlende Verknüpfungen in der Pathophysiologie herzustellen und die HFpEF damit einer bisher fehlenden medikamentösen Therapie erstmalig zugänglich zu machen. Insbesondere kardioprotektive microRNAs wie miR-15 und miR-214 sowie die Möglichkeit der Hemmung von profibrotisch und prohypertrophisch wirkenden microRNAs mittels Antagomir könnten völlig neue Wege in der medikamentösen Therapie einschlagen.

Darüber hinaus ermöglicht die weitere Untersuchung unseres Mausmodells sowie des microRNA Profils die Gewinnung potentieller neuer Biomarker für eine einfachere Diagnose der bisher unterdiagnostizierten und häufig übersehenen HFpEF. Insbesondere die Entdeckung der Serum-microRNAs als neue Biomarker stellt ein vielversprechendes Forschungsfeld dar. Möglicherweise wird es realisierbar sein diese multifaktorielle Erkrankung durch ein Muster an verschiedenen microRNAs gegenüber anderen Erkrankungen abzugrenzen und damit in der klinischen Routine sicher und unkompliziert zu diagnostizieren.

Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz stellt eine der relevantesten Krankheiten für unsere Bevölkerung dar und bedeutet eine starke sozioökonomische Belastung für unsere Gesellschaft. Die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) wurde dabei lange Zeit sowohl in Bezug auf die Häufigkeit, als auf Ihre Prognose im Vergleich zur HFrEF deutlich unterschätzt. Es zeigte sich jedoch, dass die Prognose der HFpEF nur wenig besser ist und man davon ausgehen muss, dass eine ähnliche Prävalenz beider Erkrankungen vorliegt. Trotz der stetigen Fortschritte im Bezug auf die Behandlung der systolischen Herzinsuffizienz kann bisher für keine der zentralen Medikamentengruppen eine deutliche Prognoseverbesserung für die Patienten mit erhaltener Ejektionsfraktion nachgewiesen werden. Begründet liegen diese Defizite unter anderem an der geringeren Grundlagenforschung sowie der geringen Anzahl gut validierter Tiermodelle für experimentelle Untersuchungen der HFpEF.

Wir konnten in unserem Versuch am Mausmodell zeigen, dass eine paraenterale Gabe von 720 $\mu\text{g/kg/d}$ Angiotensin II zu deutlichen echokardiographischen und molekularbiologischen Veränderungen im Sinne einer diastolischen Funktionsstörung führt. Die Applikation erfolgte über einen Zeitraum von 7 / 28 Tagen mittels subkutan implantierter osmotischer Minipumpen. So konnten wir im Verlauf eine signifikante Steigerung des Verhältnisses E/E' nachweisen. Zeitgleich zeigte sich die LVEF grenzwertig normal und es ergaben sich weder Hinweise auf eine ausgeprägte Hypertrophie, noch auf eine Dilatation des linken Herzens. Weiterhin ließ sich in der qRT-PCR eine deutliche Expressionssteigerung von BNP als Hinweis auf eine bestehende Herzinsuffizienz nachweisen. Wir sehen damit die grundlegenden Kriterien für die Verwendung dieses Mausmodells als Modell für die HFpEF als bestätigt an.

Nachfolgend konnten wir über die Analyse eines microRNA Microarrays den veränderten microRNA Haushalt im Myokard unter dieser Stimulation darstellen. Eine Quantifizierung ausgewählter microRNAs via qRT-PCR ermöglichte anschließend die Bestätigung einer deutlichen Expressionssteigerung von miR-21 sowie einer reduzierten Expression von miR-133a im Myokard. In dieser Konstellation sind diese microRNAs für Ihre Beteiligung in der Entwicklung einer Fibrose und Hypertrophie bekannt und

scheinen damit auch in der Entwicklung der HFpEF eine, möglicherweise zukünftig beeinflussbare, Rolle zu spielen.

Summary

Heart Failure presents one of the most relevant diseases for our community and is leading to an increasing socioeconomic burden. Heart failure with preserved ejection Fraction (HFpEF) was underestimated in its prevalence and prognosis compared to Heart Failure with reduced systolic function for a long time. Recent data shows that the prognosis of HFpEF is just slightly better, as the prevalence seems to be just as high as for HFrEF. Despite of the improvements in the therapy of HFrEF, there were no positive results of studies trying to prove advantages in the prognosis of HFpEF under therapy with the common drugs for Heart Failure treatment. The underlying reasons for this might be less fundamental research compared to HFrEF, as well as a shortage of available animal models for experimental purposes.

Our experiment was able to show that an infusion of 720 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ Angiotensin II over a period of 7 / 28 days leads to echocardiographically and molecularbiologically measurable changes indicative of an impaired diastolic function. We could prove that the E/E'-ratio shows a significant increase over the course of 28 days. At the same time the LVEF remained in a lower but near normal area and measurements of ventricular diameter and wall thickness showed no evidence of left ventricular dilatation or pronounced hypertrophy. Additionally we could show an increased expression of BNP in qRT-PCR as a surrogate for present Heart Failure. In conclusion, we rate these results as a justification for the use of this murine model as a model for HFpEF.

Following, we performed microarray screening to analyze the altered myocardial microRNA profile of the left ventricle in Angiotensin II induced HFpEF. A quantification of a selection of the most promising microRNAs from the microarray data was executed by qRT-PCR afterwards. We were able to show that the expression of miR-21 was substantially increased as the expression of miR-133a was reduced in the myocardium. In this constellation these microRNAs are known to induce myocardial hypertrophy and fibrosis and thus might play a, probably manipulable, role in the development of HFpEF.

Abkürzungsverzeichnis

18 S	18 S ribosomale RNA
A	Maximum des späten diastolischen Einstroms über der Mitralklappe
A'	Maximum der späten diastolischen Gewebeschwindigkeit des Mitralanulus
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACEI	Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor
ARB	Angiotensin Rezeptor Blocker
AT II	Angiotensin II
AT1R	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Brain natriuretic peptide
c. elegans	Caenorhabditis elegans
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTGF	Connective tissue growth factor
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DT	Dezelerationszeit
DTT	Dithiothreitol

E	Maximum des frühen diastolischen Einstroms über der Mitralklappe
E'	Maximum der frühen diastolischen Gewebeschwindigkeit des Mitralanulus
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extrazelluläres-Signal regulierte Kinase
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
FRET	Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittelgradiger Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
IL	Interleukin
IVRT	Isovolumetrische Relaxationszeit
IVSd	Diastolischer Diameter des interventrikulären Septums
JAK	Januskinase
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAVI	Linksatrialer Volumenindex
LV	Linker Ventrikel
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVFS / FS	Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion
LVIDD	Linksventrikulärer innerer diastolische Durchmesser
LVMI	Linksventrikulärer Massenindex
MAGGIC	Meta-Analysis Global Group in Chronic Heart Failure
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
miRNA	Mikro Ribonukleinsäure
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Versuchsobjekte
n. s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
nt-proBNP	n-terminales pro brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
p	Signifikanzwert
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCWP	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck

qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standartfehler
SERCA	Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums
snoRNA	small nucleolar RNA
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
UTR	Untranslatierter Bereich

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Reifung der microRNA	15
Abbildung 2.1: Versuchsaufbau	25
Abbildung 3.1: Bestimmung der Herzfrequenz im Flussprofil der Mitralklappe	40
Abbildung 3.2: Echokardiographische Bestimmung der LVEF	41
Abbildung 3.3: Echokardiographische Bestimmung der Verkürzungsfraktion	42
Abbildung 3.4: Echokardiographische Bestimmung des LVIDd	43
Abbildung 3.5: Echokardiographische Bestimmung der isovolumetrischen Relaxationszeit	44
Abbildung 3.6: Echokardiographische Bestimmung der DTdes frühen Mitralklappeneinstromes	45
Abbildung 3.7: Echokardiographische Bestimmung des E/A-Verhältnisses	46
Abbildung 3.8: Echokardiographische Bestimmung des Verhältnis E/E'	47
Abbildung 3.9: Echokardiographische Bestimmung des Verhältnis E'/A'	48
Abbildung 3.10: Echokardiographische Bestimmung des Parameter E' septal	49
Abbildung 3.11: Bestimmung von BNP in der qRT-PCR des LV-Myokard	50
Abbildung 3.12: Bestimmung von CTGF in der qRT-PCR des LV	51
Abbildung 3.13: Bestimmung von Kollagen 1 und 3 in der qRT-PCR des LV	52
Abbildung 3.14: Bestimmung von TIMP 2 in der qRT-PCR des LV	53
Abbildung 3.15: Bestimmung von SERCA 2 in der qRT-PCR des LV	54
Abbildung 3.16: Volcano-Plot der Microarrays im Vergleich AT II 7d gegen Sham	55
Abbildung 3.17: Volcano-Plot der Microarrays im Vergleich AT II 28d gegen Sham	56
Abbildung 3.18: qRT-PCR von miR-21 im LV Myokard	59
Abbildung 3.19: qRT-PCR von miR-29c im LV Myokard	60
Abbildung 3.20: qRT-PCR von miR-15b im LV Myokard	61
Abbildung 3.21: qRT-PCR von miR-133a im LV Myokard	62
Abbildung 3.22: qRT-PCR von miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b und miR-133b im LV Myokard	63
Abbildung 3.23: qRT-PCR von miR-214, miR-709 let-7a, let-7e im LV Myokard	64
Abbildung 3.24: Funktionen der ausgewählten microRNAs	83

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2.1: Verwendete Geräte</i>	22
<i>Tabelle 2.2: Verwendete Software</i>	22
<i>Tabelle 2.3: Verwendete Primer</i>	23
<i>Tabelle 3.1 Echokardiographische Bestimmung der interventrikulären Septumdicke</i>	43
<i>Tabelle 3.2: Darstellung ausgewählter Daten des Microarray</i>	57

Literaturverzeichnis

Ahmed, Ali; Rich, Michael W.; Fleg, Jerome L.; Zile, Michael R.; Young, James B.; Kitzman, Dalane W. et al. (2006a): Effects of digoxin on morbidity and mortality in diastolic heart failure: the ancillary digitalis investigation group trial. In: *Circulation* 114 (5), S. 397–403.

Ahmed, Mohammed Shakil; Oie, Erik; Vinge, Leif Erik; Yndestad, Arne; Oystein Andersen, Geir; Andersson, Yvonne et al. (2004): Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 36 (3), S. 393–404.

Ahmed, S. Hinan; Clark, Leslie L.; Pennington, Weems R.; Webb, Carson S.; Bonnema, D. Dirk; Leonardi, Amy H. et al. (2006b): Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. In: *Circulation* 113 (17), S. 2089–2096.

Anjan, Venkatesh Y.; Loftus, Timothy M.; Burke, Michael A.; Akhter, Nausheen; Fonarow, Gregg C.; Gheorghide, Mihai; Shah, Sanjiv J. (2012): Prevalence, clinical phenotype, and outcomes associated with normal B-type natriuretic peptide levels in heart failure with preserved ejection fraction. In: *The American journal of cardiology* 110 (6), S. 870–876.

Aronson, Doron (2003): Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. In: *Journal of hypertension* 21 (1), S. 3–12.

Arroyo, Jason D.; Chevillet, John R.; Kroh, Evan M.; Ruf, Ingrid K.; Pritchard, Colin C.; Gibson, Donald F. et al. (2011): Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12), S. 5003–5008.

Aurora, Arin B.; Mahmoud, Ahmed I.; Luo, Xiang; Johnson, Brett A.; van Rooij, Eva; Matsuzaki, Satoshi et al. (2012): MicroRNA-214 protects the mouse heart from

ischemic injury by controlling Ca²⁺ overload and cell death. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (4), S. 1222–1232.

Baig, M.Kamran; Mahon, Niall; McKenna, William J.; Caforio, Alida L.P.; Bonow, Robert O.; Francis, Gary S.; Gheorghiu, Mihai (1998): The pathophysiology of advanced heart failure. In: *American Heart Journal* 135 (6), S216-S230.

Baker, D. W.; Rubenstein, S. A.; Lorch, G. S. (1977): Pulsed Doppler echocardiography: principles and applications. In: *The American journal of medicine* 63 (1), S. 69–80.

Bang, Claudia; Batkai, Sandor; Dangwal, Seema; Gupta, Shashi Kumar; Foinquinos, Ariana; Holzmann, Angelika et al. (2014): Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (5), S. 2136–2146.

Bers, Donald M.; Eisner, David A.; Valdivia, Hector H. (2003): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. In: *Circulation research* 93 (6), S. 487–490.

Bold, Adolfo J. de; Bold, Mercedes L. Kuroski de (2005): Determinants of natriuretic peptide production by the heart: basic and clinical implications. In: *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 53 (7), S. 371–377.

Boonman-de Winter, Leandra J. M.; Rutten, Frans H.; Cramer, Maarten J.; Landman, Marcel J.; Zuithoff, Nicolaas P. A.; Liem, Anho H.; Hoes, Arno W. (2015): Efficiently screening heart failure in patients with type 2 diabetes. In: *European journal of heart failure* 17 (2), S. 187–195.

Borbely, Attila; Falcao-Pires, Ines; van Heerebeek, Loek; Hamdani, Nazha; Edes, Istvan; Gavina, Cristina et al. (2009): Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. In: *Circulation research* 104 (6), S. 780–786.

Borbely, Attila; van der Velden, Jolanda; Papp, Zoltan; Bronzwaer, Jean G. F.; Edes, Istvan; Stienen, Ger J. M.; Paulus, Walter J. (2005): Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. In: *Circulation* 111 (6), S. 774–781.

Borlaug, Barry A.; Kass, David A. (2008): Ventricular-vascular interaction in heart failure. In: *Heart failure clinics* 4 (1), S. 23–36.

Borlaug, Barry A.; Melenovsky, Vojtech; Russell, Stuart D.; Kessler, Kristy; Pacak, Karel; Becker, Lewis C.; Kass, David A. (2006): Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. In: *Circulation* 114 (20), S. 2138–2147.

Borlaug, Barry A.; Nishimura, Rick A.; Sorajja, Paul; Lam, Carolyn S. P.; Redfield, Margaret M. (2010): Exercise hemodynamics enhance diagnosis of early heart failure with preserved ejection fraction. In: *Circulation. Heart failure* 3 (5), S. 588–595.

Borlaug, Barry A.; Paulus, Walter J. (2011): Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. In: *European heart journal* 32 (6), S. 670–679.

Brattelid, Trond; Aarnes, Eva-Katrine; Helgeland, Erik; Guvaag, Steinar; Eichele, Heike; Jonassen, Anne K. (2011): Normalization strategy is critical for the outcome of miRNA expression analyses in the rat heart. In: *Physiological genomics* 43 (10), S. 604–610.

Brown, Nancy J. (2008): Aldosterone and vascular inflammation. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 51 (2), S. 161–167.

Bui, Anh L.; Horwich, Tamara B.; Fonarow, Gregg C. (2011): Epidemiology and risk profile of heart failure. In: *Nature reviews. Cardiology* 8 (1), S. 30–41.

Caballero, Luis; Kou, Seisyou; Dulgheru, Raluca; Gonjilashvili, Natalia; Athanassopoulos, George D.; Barone, Daniele et al. (2015): Echocardiographic reference ranges for normal cardiac Doppler data: results from the NORRE Study. In: *European heart journal cardiovascular Imaging* 16 (9), S. 1031–1041.

Calin, George Adrian; Dumitru, Calin Dan; Shimizu, Masayoshi; Bichi, Roberta; Zupo, Simona; Noch, Evan et al. (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24), S. 15524–15529.

Callis, Thomas E.; Pandya, Kumar; Seok, Hee Young; Tang, Ru-Hang; Tatsuguchi, Mariko; Huang, Zhan-Peng et al. (2009): MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (9), S. 2772–2786.

Campbell, S. E.; Katwa, L. C. (1997): Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 29 (7), S. 1947–1958.

Care, Alessandra; Catalucci, Daniele; Felicetti, Federica; Bonci, Desiree; Addario, Antonio; Gallo, Paolo et al. (2007): MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. In: *Nature medicine* 13 (5), S. 613–618.

Castoldi, Giovanna; Di Gioia, Cira R. T.; Bombardi, Camila; Catalucci, Daniele; Corradi, Barbara; Gualazzi, Maria Giovanna et al. (2012): MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension. In: *Journal of cellular physiology* 227 (2), S. 850–856.

Chan, Jennifer A.; Krichevsky, Anna M.; Kosik, Kenneth S. (2005): MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. In: *Cancer research* 65 (14), S. 6029–6033.

Chen, Caifu; Ridzon, Dana A.; Broomer, Adam J.; Zhou, Zhaohui; Lee, Danny H.; Nguyen, Julie T. et al. (2005): Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 33 (20), e179.

Chen, Hu; Mo, Delin; Li, Ming; Zhang, Yun; Chen, Luxi; Zhang, Xumeng et al. (2014): miR-709 inhibits 3T3-L1 cell differentiation by targeting GSK3beta of Wnt/beta-catenin signaling. In: *Cellular signalling* 26 (11), S. 2583–2589.

Chen, Jian-Fu; Mandel, Elizabeth M.; Thomson, J. Michael; Wu, Qiulian; Callis, Thomas E.; Hammond, Scott M. et al. (2006): The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. In: *Nature genetics* 38 (2), S. 228–233.

Chen, Jian-Fu; Murchison, Elizabeth P.; Tang, Ruhang; Callis, Thomas E.; Tatsuguchi, Mariko; Deng, Zhongliang et al. (2008): Targeted deletion of Dicer in the heart leads to

dilated cardiomyopathy and heart failure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6), S. 2111–2116.

Chen, M. M.; Lam, A.; Abraham, J. A.; Schreiner, G. F.; Joly, A. H. (2000): CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 32 (10), S. 1805–1819.

Chendrimada, Thimmaiah P.; Gregory, Richard I.; Kumaraswamy, Easwari; Norman, Jessica; Cooch, Neil; Nishikura, Kazuko; Shiekhattar, Ramin (2005): TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. In: *Nature* 436 (7051), S. 740–744.

Cheng, Yunhui; Ji, Ruirui; Yue, Junming; Yang, Jian; Liu, Xiaojun; Chen, He et al. (2007): MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? In: *The American journal of pathology* 170 (6), S. 1831–1840.

Chinnaiyan, Kavitha M.; Alexander, Daniel; McCullough, Peter A. (2005): Role of angiotensin II in the evolution of diastolic heart failure. In: *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)* 7 (12), S. 740–747.

Christoffersen, Christina; Bollano, Entela; Lindegaard, Marie L. S.; Bartels, Emil D.; Goetze, Jens P.; Andersen, Claus B.; Nielsen, Lars B. (2003): Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. In: *Endocrinology* 144 (8), S. 3483–3490.

CIBIS-II (1999): The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. In: *Lancet (London, England)* 353 (9146), S. 9–13.

Cleland, John G. F.; Tendera, Michal; Adamus, Jerzy; Freemantle, Nick; Polonski, Lech; Taylor, Jacqueline (2006): The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. In: *European heart journal* 27 (19), S. 2338–2345.

Cohen, G. I.; Pietrolungo, J. F.; Thomas, J. D.; Klein, A. L. (1996): A practical guide to assessment of ventricular diastolic function using Doppler echocardiography. In: *Journal of the American College of Cardiology* 27 (7), S. 1753–1760.

CONSENSUS (1987): Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. In: *The New England journal of medicine* 316 (23), S. 1429–1435.

da Costa Martins, Paula A.; Salic, Kanita; Gladka, Monika M.; Armand, Anne-Sophie; Leptidis, Stefanos; el Azzouzi, Hamid et al. (2010): MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. In: *Nature cell biology* 12 (12), S. 1220–1227.

Dempsey, P. J.; McCallum, Z. T.; Kent, K. M.; Cooper, T. (1971): Direct myocardial effects of angiotensin II. In: *The American journal of physiology* 220 (2), S. 477–481.

Denli, Ahmet M.; Tops, Bastiaan B. J.; Plasterk, Ronald H. A.; Ketting, Rene F.; Hannon, Gregory J. (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. In: *Nature* 432 (7014), S. 231–235.

Deschamps, Anne M.; Spinale, Francis G. (2006): Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. In: *Cardiovascular research* 69 (3), S. 666–676.

Doi, R.; Masuyama, T.; Yamamoto, K.; Doi, Y.; Mano, T.; Sakata, Y. et al. (2000): Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. In: *Journal of hypertension* 18 (1), S. 111–120.

Donal, Erwan; Lund, Lars H.; Oger, Emmanuel; Reynaud, Amelie; Schnell, Frederic; Persson, Hans et al. (2016): Value of exercise echocardiography in heart failure with preserved ejection fraction: a substudy from the KaRen study. In: *European heart journal cardiovascular Imaging* 17 (1), S. 106–113.

Duisters, Rudy F.; Tijssen, Anke J.; Schroen, Blanche; Leenders, Joost J.; Lentink, Viola; van der Made, Ingeborg et al. (2009): miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. In: *Circulation research* 104 (2), 170-8, 6p following 178.

el Azzouzi, Hamid; Leptidis, Stefanos; Dirx, Ellen; Hoeks, Joris; van Bree, Bianca; Brand, Karl et al. (2013): The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a

approximately 214 targets myocardial PPARdelta and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. In: *Cell metabolism* 18 (3), S. 341–354.

Elia, Leonardo; Contu, Riccardo; Quintavalle, Manuela; Varrone, Francesca; Chimenti, Cristina; Russo, Matteo Antonio et al. (2009): Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. In: *Circulation* 120 (23), S. 2377–2385.

Faris, R.; Flather, M.; Purcell, H.; Henein, M.; Poole-Wilson, P.; Coats, A. (2002): Current evidence supporting the role of diuretics in heart failure: a meta analysis of randomised controlled trials. In: *International journal of cardiology* 82 (2), S. 149–158.

Feigenbaum, H. (1977): Principles of echocardiography. In: *The American journal of medicine* 62 (6), S. 805–812.

Feng, Yin-Hsun; Wu, Chao-Liang; Tsao, Chao-Jung; Chang, Jan-Gowth; Lu, Pei-Jung; Yeh, Kun-Tu et al. (2014): Deregulated expression of sprouty2 and microRNA-21 in human colon cancer. Correlation with the clinical stage of the disease. In: *Cancer Biology & Therapy* 11 (1), S. 111–121.

Filippatos, Gerasimos; Parissis, John T. (2011): Heart failure diagnosis and prognosis in the elderly: the proof of the pudding is in the eating. In: *European journal of heart failure* 13 (5), S. 467–471.

Flather, Marcus D.; Shibata, Marcelo C.; Coats, Andrew J. S.; van Veldhuisen, Dirk J.; Parkhomenko, Aleksandr; Borbola, Jozsef et al. (2005): Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). In: *European heart journal* 26 (3), S. 215–225.

Gonzalez, Arantxa; Lopez, Begona; Querejeta, Ramon; Zubillaga, Elena; Echeverria, Tomas; Diez, Javier (2010): Filling pressures and collagen metabolism in hypertensive patients with heart failure and normal ejection fraction. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 55 (6), S. 1418–1424.

Gregory, Richard I.; Yan, Kai-Ping; Amuthan, Govindasamy; Chendrimada, Thimmaiah; Doratotaj, Behzad; Cooch, Neil; Shiekhattar, Ramin (2004): The

Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. In: *Nature* 432 (7014), S. 235–240.

Grutzner, Anika; Garcia-Manyes, Sergi; Kotter, Sebastian; Badilla, Carmen L.; Fernandez, Julio M.; Linke, Wolfgang A. (2009): Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. In: *Biophysical journal* 97 (3), S. 825–834.

Hergenreider, Eduard; Heydt, Susanne; Treguer, Karine; Boettger, Thomas; Horrevoets, Anton J. G.; Zeiher, Andreas M. et al. (2012): Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. In: *Nature cell biology* 14 (3), S. 249–256.

Ho, Jennifer E.; Lyass, Asya; Lee, Douglas S.; Vasan, Ramachandran S.; Kannel, William B.; Larson, Martin G.; Levy, Daniel (2013): Predictors of new-onset heart failure: differences in preserved versus reduced ejection fraction. In: *Circulation. Heart failure* 6 (2), S. 279–286.

Hullinger, Thomas G.; Montgomery, Rusty L.; Seto, Anita G.; Dickinson, Brent A.; Semus, Hillary M.; Lynch, Joshua M. et al. (2012): Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. In: *Circulation research* 110 (1), S. 71–81.

Hundley, W. G.; Kitzman, D. W.; Morgan, T. M.; Hamilton, C. A.; Darty, S. N.; Stewart, K. P. et al. (2001): Cardiac cycle-dependent changes in aortic area and distensibility are reduced in older patients with isolated diastolic heart failure and correlate with exercise intolerance. In: *Journal of the American College of Cardiology* 38 (3), S. 796–802.

Hutvagner, Gyorgy; Zamore, Phillip D. (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5589), S. 2056–2060.

Ichihara, S.; Senbonmatsu, T.; Price, E., JR; Ichiki, T.; Gaffney, F. A.; Inagami, T. (2001): Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. In: *Circulation* 104 (3), S. 346–351.

Jia, Nan; Dong, Peixin; Ye, Ying; Qian, Cheng; Dai, Qiuyan (2012): Allopurinol attenuates oxidative stress and cardiac fibrosis in angiotensin II-induced cardiac diastolic dysfunction. In: *Cardiovascular therapeutics* 30 (2), S. 117–123.

Kaeuferle, Theresa; Bartel, Sabine; Dehmel, Stefan; Krauss-Etschmann, Susanne (2014): MicroRNA methodology: advances in miRNA technologies. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1169, S. 121–130.

Kasner, Mario; Westermann, Dirk; Lopez, Begona; Gaub, Regina; Escher, Felicitas; Kuhl, Uwe et al. (2011): Diastolic tissue Doppler indexes correlate with the degree of collagen expression and cross-linking in heart failure and normal ejection fraction. In: *Journal of the American College of Cardiology* 57 (8), S. 977–985.

Kelder, Johannes C.; Cramer, Maarten J.; van Wijngaarden, Jan; van Tooren, Rob; Mosterd, Arend; Moons, Karel G. M. et al. (2011a): The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. In: *Circulation* 124 (25), S. 2865–2873.

Kelder, Johannes C.; Cramer, Maarten J.; Verweij, Wim M.; Grobbee, Diederick E.; Hoes, Arno W. (2011b): Clinical utility of three B-type natriuretic peptide assays for the initial diagnostic assessment of new slow-onset heart failure. In: *Journal of cardiac failure* 17 (9), S. 729–734.

Khvorova, Anastasia; Reynolds, Angela; Jayasena, Sumedha D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. In: *Cell* 115 (2), S. 209–216.

Kruger, Martina; Kotter, Sebastian; Grutzner, Anika; Lang, Patrick; Andresen, Christian; Redfield, Margaret M. et al. (2009): Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. In: *Circulation research* 104 (1), S. 87–94.

Krutzfeldt, Jan; Rajewsky, Nikolaus; Braich, Ravi; Rajeev, Kallanthottathil G.; Tuschl, Thomas; Manoharan, Muthiah; Stoffel, Markus (2005): Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. In: *Nature* 438 (7068), S. 685–689.

Lagos-Quintana, Mariana; Rauhut, Reinhard; Yalcin, Abdullah; Meyer, Jutta; Lendeckel, Winfried; Tuschl, Thomas (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. In: *Current biology : CB* 12 (9), S. 735–739.

Lam, Carolyn S. P.; Roger, Veronique L.; Rodeheffer, Richard J.; Borlaug, Barry A.; Enders, Felicity T.; Redfield, Margaret M. (2009): Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. In: *Journal of the American College of Cardiology* 53 (13), S. 1119–1126.

Lang, Roberto M.; Badano, Luigi P.; Mor-Avi, Victor; Afilalo, Jonathan; Armstrong, Anderson; Ernande, Laura et al. (2015a): Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. In: *European heart journal cardiovascular Imaging* 16 (3), S. 233–270.

Lang, Roberto M.; Badano, Luigi P.; Mor-Avi, Victor; Afilalo, Jonathan; Armstrong, Anderson; Ernande, Laura et al. (2015b): Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. In: *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 28 (1), 1-39.e14.

Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854.

Lee, Yoontae; Ahn, Chiyong; Han, Jinju; Choi, Hyounjeong; Kim, Jaekwang; Yim, Jeongbin et al. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. In: *Nature* 425 (6956), S. 415–419.

Lee, Yoontae; Kim, Minju; Han, Jinju; Yeom, Kyu-Hyun; Lee, Sanghyuk; Baek, Sung Hee; Kim, V. Narry (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *The EMBO journal* 23 (20), S. 4051–4060.

Levin, E. R.; Gardner, D. G.; Samson, W. K. (1998): Natriuretic peptides. In: *The New England journal of medicine* 339 (5), S. 321–328.

Li, Ming; Chen, Hu; Chen, Luxi; Chen, Yaosheng; Liu, Xiaohong; Mo, Delin (2016): miR-709 modulates LPS-induced inflammatory response through targeting GSK-3beta. In: *International immunopharmacology* 36, S. 333–338.

Li, Xin; Wang, Baoqiu; Cui, Hairong; Du, Yue; Song, Yang; Yang, Lei et al. (2014): let-7e replacement yields potent anti-arrhythmic efficacy via targeting beta 1-adrenergic receptor in rat heart. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 18 (7), S. 1334–1343.

Li, Y. Y.; Feng, Y. Q.; Kadokami, T.; McTiernan, C. F.; Draviam, R.; Watkins, S. C.; Feldman, A. M. (2000): Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23), S. 12746–12751.

Lim, Joong-Yeon; Park, Sung Joon; Hwang, Ha-Young; Park, Eun Jung; Nam, Jae Hwan; Kim, Joon; Park, Sang Ick (2005): TGF-beta1 induces cardiac hypertrophic responses via PKC-dependent ATF-2 activation. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 39 (4), S. 627–636.

Lin, Zongwei; Ge, Junfeng; Wang, Zhe; Ren, Jianwei; Wang, Xiaowei; Xiong, Hui et al. (2017): Let-7e modulates the inflammatory response in vascular endothelial cells through ceRNA crosstalk. In: *Scientific reports* 7, S. 42498.

Litwin, S. E.; Katz, S. E.; Weinberg, E. O.; Lorell, B. H.; Aurigemma, G. P.; Douglas, P. S. (1995): Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. In: *Circulation* 91 (10), S. 2642–2654.

Liu, Ning; Bezprozvannaya, Svetlana; Williams, Andrew H.; Qi, Xiaoxia; Richardson, James A.; Bassel-Duby, Rhonda; Olson, Eric N. (2008): microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. In: *Genes & development* 22 (23), S. 3242–3254.

Liu, Tonggang; Zhang, Xuezhong; Sha, Kaihui; Liu, Xianxian; Zhang, Liguang; Wang, Bangmao (2015): miR-709 up-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes proliferation and invasion by targeting GPC5. In: *Cell proliferation* 48 (3), S. 330–337.

Lopez, Begona; Gonzalez, Arantxa; Diez, Javier (2010): Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. In: *Circulation* 121 (14), S. 1645–1654.

MAGGIC (2012): The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure. In: *European heart journal* 33 (14), S. 1750–1757.

Maggioni, Aldo P.; Anker, Stefan D.; Dahlstrom, Ulf; Filippatos, Gerasimos; Ponikowski, Piotr; Zannad, Faiez et al. (2013): Are hospitalized or ambulatory patients with heart failure treated in accordance with European Society of Cardiology guidelines? Evidence from 12,440 patients of the ESC Heart Failure Long-Term Registry. In: *European journal of heart failure* 15 (10), S. 1173–1184.

Maisel, Alan S.; McCord, James; Nowak, Richard M.; Hollander, Judd E.; Wu, Alan H. B.; Duc, Philippe et al. (2003): Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. In: *Journal of the American College of Cardiology* 41 (11), S. 2010–2017.

Manikandan, Jayapal; Aarthi, Joseph Jude; Kumar, Srinivasan Dinesh; Pushparaj, Peter Natesan (2008): Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. In: *Bioinformatics* 2 (8), S. 330–334.

Mant, J.; Doust, J.; Roalfe, A.; Barton, P.; Cowie, M. R.; Glasziou, P. et al. (2009): Systematic review and individual patient data meta-analysis of diagnosis of heart failure, with modelling of implications of different diagnostic strategies in primary care. In: *Health technology assessment (Winchester, England)* 13 (32), 1-207, iii.

Massie, Barry M.; Carson, Peter E.; McMurray, John J.; Komajda, Michel; McKelvie, Robert; Zile, Michael R. et al. (2008): Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. In: *The New England journal of medicine* 359 (23), S. 2456–2467.

McMurray, John J. V.; Adamopoulos, Stamatis; Anker, Stefan D.; Auricchio, Angelo; Bohm, Michael; Dickstein, Kenneth et al. (2012): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. In: *European heart journal* 33 (14), S. 1787–1847.

McMurray, John J. V.; Ostergren, Jan; Swedberg, Karl; Granger, Christopher B.; Held, Peter; Michelson, Eric L. et al. (2003): Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. In: *Lancet (London, England)* 362 (9386), S. 767–771.

Mehta, Puja K.; Griendling, Kathy K. (2007): Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 292 (1), C82-97.

Meng, Fanyin; Henson, Roger; Wehbe-Janek, Hania; Ghoshal, Kalpana; Jacob, Samson T.; Patel, Tushar (2007): MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. In: *Gastroenterology* 133 (2), S. 647–658.

MERIT-HF (1999): Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). In: *Lancet (London, England)* 353 (9169), S. 2001–2007.

Min, Pil-Ki; Chan, Stephen Y. (2015): The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease. In: *European journal of clinical investigation* 45 (8), S. 860–874.

Mitchell, Patrick S.; Parkin, Rachael K.; Kroh, Evan M.; Fritz, Brian R.; Wyman, Stacia K.; Pogosova-Agadjanyan, Era L. et al. (2008): Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30), S. 10513–10518.

Mori, Jun; Patel, Vaibhav B.; Abo Alrob, Osama; Basu, Ratnadeep; Altamimi, Tariq; Desaulniers, Jessica et al. (2014): Angiotensin 1-7 ameliorates diabetic cardiomyopathy and diastolic dysfunction in db/db mice by reducing lipotoxicity and inflammation. In: *Circulation. Heart failure* 7 (2), S. 327–339.

Mosterd, A.; Hoes, A. W.; Bruyne, M. C. de; Deckers, J. W.; Linker, D. T.; Hofman, A.; Grobbee, D. E. (1999): Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. In: *European heart journal* 20 (6), S. 447–455.

Mosterd, Arend; Hoes, Arno W. (2007): Clinical epidemiology of heart failure. In: *Heart (British Cardiac Society)* 93 (9), S. 1137–1146.

Mulder, Bart A.; van Veldhuisen, Dirk J.; Crijns, Harry J. G. M.; Bohm, Michael; Cohen-Solal, Alain; Babalis, Daphne et al. (2012): Effect of nebivolol on outcome in elderly patients with heart failure and atrial fibrillation: insights from SENIORS. In: *European journal of heart failure* 14 (10), S. 1171–1178.

Nagueh, S. F.; Middleton, K. J.; Kopelen, H. A.; Zoghbi, W. A.; Quinones, M. A. (1997): Doppler tissue imaging: a noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. In: *Journal of the American College of Cardiology* 30 (6), S. 1527–1533.

Nagueh, Sherif F.; Shah, Gopi; Wu, Yiming; Torre-Amione, Guillermo; King, Nicholas M. P.; Lahmers, Sunshine et al. (2004): Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. In: *Circulation* 110 (2), S. 155–162.

Nagueh, Sherif F.; Smiseth, Otto A.; Appleton, Christopher P.; Byrd, Benjamin F. 3rd; Dokainish, Hisham; Edvardsen, Thor et al. (2016): Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. In: *European heart journal cardiovascular Imaging*.

Ohshima, Keiichi; Inoue, Kanako; Fujiwara, Akemi; Hatakeyama, Keiichi; Kanto, Kaori; Watanabe, Yuko et al. (2010): Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. In: *PloS one* 5 (10), e13247.

Oktay, A. Afsin; Shah, Sanjiv J. (2014): Current perspectives on systemic hypertension in heart failure with preserved ejection fraction. In: *Current cardiology reports* 16 (12), S. 545.

Oudejans, Irene; Mosterd, Arend; Bloemen, Johanna A.; Valk, Mark J.; van Velzen, Edwin; Wielders, Jos P. et al. (2011): Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. In: *European journal of heart failure* 13 (5), S. 518–527.

Owan, Theophilus E.; Hodge, David O.; Herges, Regina M.; Jacobsen, Steven J.; Roger, Veronique L.; Redfield, Margaret M. (2006): Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. In: *The New England journal of medicine* 355 (3), S. 251–259.

Packer, Milton; Fowler, Michael B.; Roecker, Ellen B.; Coats, Andrew J. S.; Katus, Hugo A.; Krum, Henry et al. (2002): Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. In: *Circulation* 106 (17), S. 2194–2199.

Pasquinelli, A. E.; Reinhart, B. J.; Slack, F.; Martindale, M. Q.; Kuroda, M. I.; Maller, B. et al. (2000): Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. In: *Nature* 408 (6808), S. 86–89.

Paulus, W. J.; Vantrimpont, P. J.; Shah, A. M. (1994): Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. In: *Circulation* 89 (5), S. 2070–2078.

Paulus, Walter J.; Tschope, Carsten; Sanderson, John E.; Rusconi, Cesare; Flachskampf, Frank A.; Rademakers, Frank E. et al. (2007): How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. In: *European heart journal* 28 (20), S. 2539–2550.

Peyster, Eliot; Norman, James; Domanski, Michael (2004): Prevalence and predictors of heart failure with preserved systolic function: community hospital admissions of a racially and gender diverse elderly population. In: *Journal of cardiac failure* 10 (1), S. 49–54.

Phan, Thanh T.; Abozguia, Khalid; Nallur Shivu, Ganesh; Mahadevan, Gnanadevan; Ahmed, Ibrar; Williams, Lynne et al. (2009a): Heart failure with preserved ejection fraction is characterized by dynamic impairment of active relaxation and contraction of the left ventricle on exercise and associated with myocardial energy deficiency. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (5), S. 402–409.

Phan, Thanh T.; Abozguia, Khalid; Shivu, Ganesh Nallur; Ahmed, Ibrar; Leyva, Francisco; Patel, Kiran; Frenneaux, Michael (2009b): Increased atrial contribution to

left ventricular filling compensates for impaired early filling during exercise in heart failure with preserved ejection fraction. In: *Journal of cardiac failure* 15 (10), S. 890–897.

Pitt, B.; Zannad, F.; Remme, W. J.; Cody, R.; Castaigne, A.; Perez, A. et al. (1999): The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. In: *The New England journal of medicine* 341 (10), S. 709–717.

Pitt, Bertram; Pfeffer, Marc A.; Assmann, Susan F.; Boineau, Robin; Anand, Inder S.; Claggett, Brian et al. (2014): Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. In: *The New England journal of medicine* 370 (15), S. 1383–1392.

Ponikowski, Piotr; Voors, Adriaan A.; Anker, Stefan D.; Bueno, Hector; Cleland, John G. F.; Coats, Andrew J. S. et al. (2016): 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. In: *European heart journal* 37 (27), S. 2129–2200.

Porrello, Enzo R.; Johnson, Brett A.; Aurora, Arin B.; Simpson, Emma; Nam, Young-Jae; Matkovich, Scot J. et al. (2011): MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. In: *Circulation research* 109 (6), S. 670–679.

Porrello, Enzo R.; Mahmoud, Ahmed I.; Simpson, Emma; Johnson, Brett A.; Grinsfelder, David; Canseco, Diana et al. (2013): Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (1), S. 187–192.

Ramirez-Correa, Genaro A.; Murphy, Anne M. (2007): Is phospholamban or troponin I the "prima donna" in beta-adrenergic induced lusitropy? In: *Circulation research* 101 (4), S. 326–327.

Redfield, Margaret M.; Jacobsen, Steven J.; Burnett, John C., JR; Mahoney, Douglas W.; Bailey, Kent R.; Rodeheffer, Richard J. (2003): Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. In: *JAMA* 289 (2), S. 194–202.

Reed, Alana L.; Tanaka, Atsuko; Sorescu, Dan; Liu, Hong; Jeong, Euy-Myoung; Sturdy, Megan et al. (2011): Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301 (3), H824-31.

Regan, Jessica A.; Mauro, Adolfo Gabriele; Carbone, Salvatore; Marchetti, Carlo; Gill, Rabia; Mezzaroma, Eleonora et al. (2015): A mouse model of heart failure with preserved ejection fraction due to chronic infusion of a low subpressor dose of angiotensin II. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 309 (5), H771-8.

Roberts, Emmert; Ludman, Andrew J.; Dworzynski, Katharina; Al-Mohammad, Abdallah; Cowie, Martin R.; McMurray, John J. V.; Mant, Jonathan (2015): The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 350, h910.

Roy, Sashwati; Khanna, Savita; Hussain, Syed-Rehan A.; Biswas, Sabyasachi; Azad, Ali; Rink, Cameron et al. (2009): MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. In: *Cardiovascular research* 82 (1), S. 21–29.

Ruperez, Monica; Lorenzo, Oscar; Blanco-Colio, Luis Miguel; Esteban, Vanesa; Egido, Jesus; Ruiz-Ortega, Marta (2003): Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. In: *Circulation* 108 (12), S. 1499–1505.

Sayed, Danish; Rane, Shweta; Lypowy, Jacqueline; He, Minzhen; Chen, Ieng-Yi; Vashistha, Himanshu et al. (2008): MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. In: *Molecular biology of the cell* 19 (8), S. 3272–3282.

Selbach, Matthias; Schwanhausser, Bjorn; Thierfelder, Nadine; Fang, Zhuo; Khanin, Raya; Rajewsky, Nikolaus (2008): Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. In: *Nature* 455 (7209), S. 58–63.

Selcuklu, S. Duygu; Donoghue, Mark T. A.; Spillane, Charles (2009): miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. In: *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 4), S. 918–925.

Silberman, Gad A.; Fan, Tai-Hwang M.; Liu, Hong; Jiao, Zhe; Xiao, Hong D.; Lovelock, Joshua D. et al. (2010): Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. In: *Circulation* 121 (4), S. 519–528.

Smith, Craig S.; Bottomley, Paul A.; Schulman, Steven P.; Gerstenblith, Gary; Weiss, Robert G. (2006): Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. In: *Circulation* 114 (11), S. 1151–1158.

Solomon, Scott D.; Zile, Michael; Pieske, Burkert; Voors, Adriaan; Shah, Amil; Kraigher-Krainer, Elisabeth et al. (2012): The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 380 (9851), S. 1387–1395.

SOLVD (1992): Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators. In: *The New England journal of medicine* 327 (10), S. 685–691.

Steinberg, Benjamin A.; Zhao, Xin; Heidenreich, Paul A.; Peterson, Eric D.; Bhatt, Deepak L.; Cannon, Christopher P. et al. (2012): Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: prevalence, therapies, and outcomes. In: *Circulation* 126 (1), S. 65–75.

Sucharov, Carmen; Bristow, Michael R.; Port, J. David (2008): miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 45 (2), S. 185–192.

Sun, Yao; Zhang, Jiakun; Lu, Li; Chen, Sue S.; Quinn, Mark T.; Weber, Karl T. (2002): Aldosterone-induced inflammation in the rat heart. Role of oxidative stress. In: *The American journal of pathology* 161 (5), S. 1773–1781.

Thum, Thomas; Galuppo, Paolo; Wolf, Christian; Fiedler, Jan; Kneitz, Susanne; van Laake, Linda W. et al. (2007): MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. In: *Circulation* 116 (3), S. 258–267.

Thum, Thomas; Gross, Carina; Fiedler, Jan; Fischer, Thomas; Kissler, Stephan; Bussen, Markus et al. (2008): MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. In: *Nature* 456 (7224), S. 980–984.

Tijssen, Anke J.; Creemers, Esther E.; Moerland, Perry D.; Windt, Leon J. de; van der Wal, Allard C.; Kok, Wouter E.; Pinto, Yigal M. (2010): MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. In: *Circulation research* 106 (6), S. 1035–1039.

Tijssen, Anke J.; van der Made, Ingeborg; van den Hoogenhof, Maarten M.; Wijnen, Wino J.; van Deel, Elza D.; Groot, Nina E. de et al. (2014): The microRNA-15 family inhibits the TGFbeta-pathway in the heart. In: *Cardiovascular research* 104 (1), S. 61–71.

Tiller, Daniel; Russ, Martin; Greiser, Karin Halina; Nuding, Sebastian; Ebelt, Henning; Kluttig, Alexander et al. (2013): Prevalence of symptomatic heart failure with reduced and with normal ejection fraction in an elderly general population-the CARLA study. In: *PloS one* 8 (3), e59225.

Tokuda, Keisuke; Kai, Hisashi; Kuwahara, Fumitaka; Yasukawa, Hideo; Tahara, Nobuhiro; Kudo, Hiroshi et al. (2004): Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 43 (2), S. 499–503.

van Heerebeek, Loek; Borbely, Attila; Niessen, Hans W. M.; Bronzwaer, Jean G. F.; van der Velden, Jolanda; Stienen, Ger J. M. et al. (2006): Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. In: *Circulation* 113 (16), S. 1966–1973.

van Riet, Evelien E. S.; Hoes, Arno W.; Wagenaar, Kim P.; Limburg, Alexander; Landman, Marcel A. J.; Rutten, Frans H. (2016): Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. In: *European journal of heart failure* 18 (3), S. 242–252.

van Rooij, Eva; Sutherland, Lillian B.; Liu, Ning; Williams, Andrew H.; McAnally, John; Gerard, Robert D. et al. (2006): A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (48), S. 18255–18260.

van Rooij, Eva; Sutherland, Lillian B.; Qi, Xiaoxia; Richardson, James A.; Hill, Joseph; Olson, Eric N. (2007): Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5824), S. 575–579.

van Rooij, Eva; Sutherland, Lillian B.; Thatcher, Jeffrey E.; DiMaio, J. Michael; Naseem, R. Haris; Marshall, William S. et al. (2008): Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (35), S. 13027–13032.

Vickers, Kasey C.; Palmisano, Brian T.; Shoucri, Bassem M.; Shamburek, Robert D.; Remaley, Alan T. (2011): MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. In: *Nature cell biology* 13 (4), S. 423–433.

Wachter, R.; Schmidt-Schweda, S.; Westermann, D.; Post, H.; Edelmann, F.; Kasner, M. et al. (2009): Blunted frequency-dependent upregulation of cardiac output is related to impaired relaxation in diastolic heart failure. In: *European heart journal* 30 (24), S. 3027–3036.

Wang, Guo-Kun; Zhu, Jia-Qi; Zhang, Jun-Tao; Li, Qing; Li, Yue; He, Jia et al. (2010): Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. In: *European heart journal* 31 (6), S. 659–666.

Weber, K. T.; Brilla, C. G.; Janicki, J. S. (1993): Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. In: *Cardiovascular research* 27 (3), S. 341–348.

Weber, K. T.; Sun, Y.; Guarda, E. (1994): Structural remodeling in hypertensive heart disease and the role of hormones. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 23 (6 Pt 2), S. 869–877.

Weber, Martina; Baker, Meredith B.; Moore, Jeffrey P.; Searles, Charles D. (2010): MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 393 (4), S. 643–648.

Weber, Michael; Hamm, Christian (2006): Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. In: *Heart (British Cardiac Society)* 92 (6), S. 843–849.

Whitcombe, D.; Theaker, J.; Guy, S. P.; Brown, T.; Little, S. (1999): Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. In: *Nature biotechnology* 17 (8), S. 804–807.

Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. In: *Cell* 75 (5), S. 855–862.

Xu, Chaoqian; Hu, Yingying; Hou, Liangyu; Ju, Jin; Li, Xiaoguang; Du, Ning et al. (2014): beta-Blocker carvedilol protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis by up-regulating miR-133 expression. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 75, S. 111–121.

Yagi, Shusuke; Aihara, Ken-ichi; Ikeda, Yasumasa; Sumitomo, Yuka; Yoshida, Sumiko; Ise, Takayuki et al. (2008): Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts eNOS-independent protective actions against angiotensin II induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency. In: *Circulation research* 102 (1), S. 68–76.

Yang, Wei J.; Yang, Derek D.; Na, Songqing; Sandusky, George E.; Zhang, Qing; Zhao, Genshi (2005): Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (10), S. 9330–9335.

Yasue, H.; Yoshimura, M.; Sumida, H.; Kikuta, K.; Kugiyama, K.; Jougasaki, M. et al. (1994): Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. In: *Circulation* 90 (1), S. 195–203.

Yi, Rui; Fuchs, Elaine (2011): MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 11), S. 1775–1783.

Yi, Rui; Qin, Yi; Macara, Ian G.; Cullen, Bryan R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. In: *Genes & development* 17 (24), S. 3011–3016.

Yu, Hao; Lu, Yinhui; Li, Zhaofa; Wang, Qizhao (2014): microRNA-133: expression, function and therapeutic potential in muscle diseases and cancer. In: *Current drug targets* 15 (9), S. 817–828.

Yusuf, Salim; Pfeffer, Marc A.; Swedberg, Karl; Granger, Christopher B.; Held, Peter; McMurray, John J. V. et al. (2003): Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. In: *Lancet (London, England)* 362 (9386), S. 777–781.

Zannad, Faiez; McMurray, John J. V.; Krum, Henry; van Veldhuisen, Dirk J.; Swedberg, Karl; Shi, Harry et al. (2011): Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. In: *The New England journal of medicine* 364 (1), S. 11–21.

Zhong, JiuChang; Basu, Ratnadeep; Guo, Danny; Chow, Fung L.; Byrns, Simon; Schuster, Manfred et al. (2010): Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. In: *Circulation* 122 (7), 717-28, 18 p following 728.

Zhou, Xin; Sun, Fei; Luo, Shenjian; Zhao, Wei; Yang, Ti; Zhang, Guiye et al. (2017): Let-7a Is an Antihypertrophic Regulator in the Heart via Targeting Calmodulin. In: *International journal of biological sciences* 13 (1), S. 22–31.

Ziff, Oliver J.; Lane, Deirdre A.; Samra, Monica; Griffith, Michael; Kirchhof, Paulus; Lip, Gregory Y. H. et al. (2015): Safety and efficacy of digoxin: systematic review and meta-analysis of observational and controlled trial data. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 351, h4451.

Zile, Michael R.; Baicu, Catalin F.; Gaasch, William H. (2004): Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. In: *The New England journal of medicine* 350 (19), S. 1953–1959.

Veröffentlichungen

Poster: J. Hoffmann, H. Moellmann, D. Kraft, S. Voss, C. Troidl, S. Szardien, C. Liebetrau, A. Rolf, C.W. Hamm, H.M. Nef Angiotensin II-induced diastolic dysfunction is associated with cardiac inflammation and peripheral monocytosis, ESC Kongress Paris 2011

Poster: M. Willmer, H.M. Nef, S. Szardien, J. Hoffmann, D. Kraft, S.Voss, C. Troild, C. Liebetrau, U. Fischer-Rasokat, K. Troidl, A. Elsässer, C. W. Hamm, H. Möllmann. Kardiales microRNA-Expressionsprofil bei Angiotensin-vermittelter diastolischer Herzinsuffizienz /DHF). Clin Res Cardiol 101, Suppl 1, April 2012; P1616 DGK Mannheim 2012

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, David Adrian Kraft, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Hiermit möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. phil. nat. Christian Troidl für die Möglichkeit der Forschung in der experimentellen Kardiologie des Franz-Grödel-Institutes Bad Nauheim sowie für seine ausdauernde Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Arbeit danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Jędrzej Hofmann und Frau Dr. med. vet. Sandra Voss für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Studie.

Ich danke Dr. Jochen Wilhelm, dem Leiter der Zentraleinheit für Biostatistik und Microarray-Analytik der Justus-Liebig Universität Gießen, für die Möglichkeit und Unterstützung der Durchführung der Microarrays.

Besonderer Dank gilt den technischen Assistentinnen des Labors. Ohne die Einarbeitung von Monika Rieschel, Anett Kirchhof, Oxana Bechtgoldt und Sigrun Sass hätten die Versuche nicht nur deutlich länger gedauert, sondern auch deutlich weniger Spaß gemacht.

Vielen Dank an meinen Kommilitonen Florian Rybinski, mit dem mich seit meiner Forschungszeit heute eine enge Freundschaft verbindet.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Meiner wundervollen Frau Rebekka, die mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt und aufbaut. Meinen Eltern Renée und Michael, die mir ermöglichten meinen Weg zu gehen und immer hinter mir stehen. Zuletzt und besonders meinem Bruder Aaron, der als Vorbild mein Interesse an der Medizin geweckt und meinen Lebensweg dadurch maßgeblich geprägt hat.