

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Privatdozent Dr. Gerhard Wess

NACHWEIS UND VERGLEICH VON MIKRO-
RIBONUKLEINSÄURE EXPRESSIONSPROFILIEN IM
SERUM VON GESUNDEN UND AN DER DILATATIVEN
KARDIOMYOPATHIE ERKRANKTEN DOBERMÄNNERN

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Carola Laura Steudemann

aus München

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring
Prof. Dr. Cornelia Deeg

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meiner Mama

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	2
1.	Die Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann.....	2
1.1.	Allgemeines zur Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann: Signalement, Prävalenz und Ätiologie.....	2
1.2.	Pathophysiologie	3
1.3.	Verlauf der Erkrankung, verschiedene Krankheitsstadien.....	5
1.4.	Diagnostik	7
1.4.1.	Anamnese	7
1.4.2.	Allgemeine und spezielle kardiovaskuläre Untersuchung	8
1.4.3.	Röntgen	8
1.4.4.	Elektrokardiographie	9
1.4.4.1.	Kurzzeit-Elektrokardiographie	9
1.4.4.2.	24-Stunden-Elektrokardiographie	10
1.4.5.	Echokardiographie	11
1.4.6.	Biomarker.....	11
1.4.7.	Pathologische und pathohistologische Befunde	14
1.5.	Therapie	15
1.6.	Prognose.....	18
2.	Mikro-Ribonukleinsäuren	19
2.1.	Allgemeines zu Mikro-Ribonukleinsäuren	19
2.1.1.	Biogenese und Wirkmechanismus.....	19
2.1.2.	Freisetzung aus der Zelle	20
2.1.3.	Eigenschaften	21
2.1.4.	Nachweis.....	22
2.2.	Canine Mikro-Ribonukleinsäuren	23
2.3.	Herzspezifische Mikro-Ribonukleinsäuren.....	24
2.3.1.	Mikro-Ribonukleinsäuren bei der Dilatativen Kardiomyopathie.....	24
2.3.2.	Mikro-Ribonukleinsäuren bei anderen Kardiomyopathien.....	25
2.4.	Potential von Mikro-Ribonukleinsäuren als Biomarker	27
2.4.1.	Mikro-Ribonukleinsäuren als Biomarker nicht-kardialer Erkrankungen ..	27
2.4.2.	Mikro-Ribonukleinsäuren als Biomarker kardialer Erkrankungen	28

2.5.	Neue Therapieansätze	29
III.	PUBLIKATION.....	31
IV.	DISKUSSION	45
V.	ZUSAMMENFASSUNG	51
VI.	SUMMARY.....	53
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	55
VIII.	ANHANG	79
IX.	DANKSAGUNG	81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme (Angiotensin Konvertierendes Enzym)	pri-miRNA(s)	Primäre Mikro-Ribonukleinsäure(n) Transkripte
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid	pre-miRNA(s)	Precursor Mikro-Ribonukleinsäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat	qPCR	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
AV-Block	Atrioventrikulärer Überleitungsblock	qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid	RISC	RNA-induced silencing complex
CCL	Chronische lymphatische Leukämie	RNA(s)	Ribonukleinsäure(n)
cTnI	Kardiales Troponin I	RNase(n)	Ribonukleinsäure spaltende(s) Enzym(e)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie	TLR	Toll-like Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm	UTR	Untranslierte Region
l	Liter	VES	Ventrikuläre Extrasystole(n)
LVIDd	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Enddiastole	VHS	Vertebral Heart Score
LVIDs	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Endsystole	z. B.	Zum Beispiel
miRNA(s)	Mikro-Ribonukleinsäure(n)	%	Prozent
ml	Milliliter		
mm	Millimeter		
mRNA(s)	messenger- (Boten-) Ribonukleinsäure(n)		
mV	Millivolt		
m ²	Quadratmeter		
µl	Mikroliter		
ng	Nanogramm		
NT-proBNP	N-terminales pro-B-Typ Natriuretisches Peptid		
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion		
PKD4	Pyruvat Dehydrogenase Kinase, Isoenzym 4		
pmol	Pikomol		

I. EINLEITUNG

Die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine bei der Rasse Dobermann vererbte Erkrankung (MEURS et al., 2007). Mit einer 58 %igen Prävalenz in Europa stellt sie die häufigste Herzerkrankung beim Dobermann dar (WESS et al., 2010a). Die Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann zeichnet sich durch das Vorhandensein einer systolischen Dysfunktion und das Auftreten ventrikulärer Rhythmusstörungen aus (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 2000a). Bevor klinische Symptome auftreten, durchlaufen betroffene Tiere eine okkulte Phase (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004), deren Diagnosestellung bislang nur mittels der Kombination von Echokardiographie und 24-Stunden-Elektrokardiogramm (EKG) möglich ist (CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 2000b).

Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) sind kurze, nicht kodierende Ribonukleinsäuren (RNAs), die intrazellulär synthetisiert werden und eine bedeutende Rolle in der Genregulation spielen (LEE et al., 1993; BARTEL, 2004). Ihre Expression ist bei zahlreichen pathologischen Zuständen dereguliert und kann im Gewebe wie auch im Blut bestimmt und interpretiert werden (ETHERIDGE et al., 2011; MIZUNO et al., 2011). Veränderte miRNA Expressionsmuster wurden bei humanen Herzerkrankungen inklusive der DCM beschrieben und stellen potentielle diagnostische wie auch prognostische Marker dar (IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008; SATOH et al., 2010; VOELLENKLE et al., 2010; ZHOU et al., 2010; SATOH et al., 2011). Bislang gibt es keine Studien über miRNA Expressionsveränderungen bei der caninen DCM.

Ziel der Studie ist es, miRNAs im Serum von Hunden mittels miRNA Mikroarray nachzuweisen und zu überprüfen, ob an der DCM erkrankte Dobermänner im Vergleich zu gesunden Kontrollen veränderte miRNA Expressionsmuster aufweisen.

Nach Anamnese, klinischer Untersuchung, Kurzzeit- und 24-Stunden-EKG sowie Echokardiographie wurden Dobermänner in verschiedene Gruppen eingeteilt. Es wurde Serum von je vier gesunden und an der DCM erkrankten Tieren untersucht. Die extrahierte Gesamt-RNA wurde auf einen miRNA Mikroarray hybridisiert, der jede Probe für insgesamt 1368 miRNAs testete.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann

Die DCM ist eine der häufigsten Herzerkrankungen bei mittelgroßen bis großen Hunderassen. Die Rasse Dobermann ist besonders stark betroffen (TIDHOLM & JONSSON, 1997; TIDHOLM et al., 2001; MARTIN et al., 2009). Hier ist eine Sonderform der DCM anzutreffen, bei der zusätzlich zu oder schon vor morphologischen Veränderungen am Herzen auch Rhythmusstörungen auftreten können (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Die Tiere versterben an den klinischen Folgen eines kongestiven Herzversagens oder auftretenden letalen Arrhythmien (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a).

1.1. Allgemeines zur Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann: Signalement, Prävalenz und Ätiologie

Die DCM ist eine der häufigsten Herzerkrankungen beim Hund (TIDHOLM & JONSSON, 1997; TIDHOLM et al., 2001; MARTIN et al., 2009). Bei der Rasse Dobermann tritt eine Sonderform der DCM auf (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004), die weltweit verbreitet ist. Verschiedene Studien in Nordamerika zeigten eine Prävalenz in den Vereinigten Staaten von Amerika von 45 bis 63 % (O'GRADY, 1998; CALVERT et al., 2000a). Die Prävalenz in Europa liegt bei 58,2 % (WESS et al., 2010a). Obwohl die Geschlechterverteilung in einigen Studien heterogen erscheint und eine gehäufte Erkrankung der männlichen Tiere beschrieben wird (CALVERT et al., 1997b; O'GRADY, 1998), wird in neueren Veröffentlichungen wiederum eine gleichmäßige Geschlechterverteilung geschildert (CALVERT et al., 2000a; MEURS et al., 2007; WESS et al., 2010a). Allerdings gibt es in der Manifestation und im klinischen Verlauf der Krankheit einen Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren (WESS et al., 2010a).

Die DCM tritt typischerweise ab dem mittleren Alter vermehrt auf. Durchschnittlich manifestiert sich das symptomatische Stadium beim Dobermann früher als bei anderen Rassen (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). So wurden die meisten symptomatischen Tiere mit einem Altersdurchschnitt von fünf bis

zehn Jahren diagnostiziert (CALVERT et al., 1997b). Seltener können die Tiere aber auch in sehr jungen oder sehr späten Jahren (zwei bis 15 Jahre) klinisch symptomatisch werden (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004).

Der Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann liegt eine genetische Ätiologie zugrunde. Eine Studie zeigte ein autosomal dominantes Vererbungsmuster beim Dobermann (MEURS et al., 2007). Kürzlich konnte mittels Genomanalyse ein für die Vererbung der Erkrankung wichtiger Genlokus entschlüsselt werden. Es konnte hierbei ein direkter Zusammenhang zwischen mehreren Einzelnukleotid-Polymorphismen am caninen Chromosom 5 und den an der DCM erkrankten Dobermännern gefunden werden. Da das beschriebene Risiko-Allel bei 50 % der erkrankten Tiere gefunden wurde, konnte somit der Hauptteil der genetischen Risikofaktoren, die für die Vererbung der Krankheit zuständig sind, identifiziert werden. Allerdings sind zusätzlich mehrere kleinere, bislang unentdeckte genetische Risikofaktoren zu vermuten (MAUSBERG et al., 2011). Kürzlich wurde in einer Studie aus den Vereinigten Staaten von Amerika eine Deletions-Mutation an dem Gen der Pyruvat Dehydrogenase Kinase, Isoenzym 4 (PKD4) mit dem Auftreten der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann assoziiert (MEURS et al., 2012). In einer aktuellen Studie mit Dobermännern aus Europa konnte diese Verbindung allerdings nicht bestätigt werden (OWCZAREK-LIPSKA et al., 2012). Neben der genetischen Ätiologie der DCM gibt es weitere seltenere Ursachen für eine reduzierte Kontraktilität des Herzens, die bei Verdacht auf eine DCM ausgeschlossen werden sollten. So können nutritive Defizite wie Taurin- (PION et al., 1987; KRAMER et al., 1995; KITTLESON et al., 1997) und Carnitin-Mangel (KEENE et al., 1991; KITTLESON et al., 1997), wie auch die pharmakologische Wirkung bestimmter Medikamente und Toxine zu einer sekundären Schädigung der Myozyten führen. Desweiteren zählen metabolische, immunologische und infektiöse Erkrankungen sowie anhaltende Tachykardien zu den möglichen Ursachen für eine gestörte systolische Funktion des Herzens (ARMSTRONG et al., 1986; KITTLESON, 1998; SISSON et al., 2000; TIDHOLM et al., 2001).

1.2. Pathophysiologie

Die DCM beim Hund zeichnet sich primär durch eine abnehmende Kontraktilität

des Herzens aus (CALVERT & BROWN, 1986). Als pathophysiologischer Mechanismus wird eine inadäquate Adenosintriphosphat-Produktion (ATP-Produktion) in den Mitochondrien der Myozyten angenommen, welche eine verschlechterte Funktion der Atmungskette bedingt (MCCUTCHEON et al., 1992). Ferner wurden eine Reduzierung der Myoglobinkonzentration und ein verminderter mitochondrialer Elektronentransport beschrieben (MCCUTCHEON et al., 1992; O'BRIEN, 1997).

Über die Aktivierung verschiedener körpereigener Mechanismen kommt es sekundär zu der reduzierten Kontraktion zu einer Volumenüberladung der Ventrikel. Durch das verminderte endsystolische Volumen fällt das Schlagvolumen ab. Anfänglich steuert das sympathische Nervensystem dem abgefallenen Blutdruck entgegen, welches zu einer erhöhten Herzfrequenz und einer Steigerung der Kontraktilität führt. Allerdings kann dieser Mechanismus nicht lange aufrecht erhalten werden. Durch die Aktivierung des Renin Angiotensin Aldosteron Systems wird nun vermehrt Natrium und Wasser in den Nieren rückresorbiert. Somit wird das Blutvolumen aufgefüllt und das Schlagvolumen normalisiert. Es entsteht eine kardiale Volumenüberladung, die das Herz initial mit exzentrischer Hypertrophie kompensieren kann. Durch die Dehnung des Myokards werden die Sarkomere zum Wachstum angeregt. Dadurch entsteht zusätzlich eine diastolische Volumenüberladung. Bei weiterem Fortschreiten des Myokardversagens sind die kompensatorischen Mittel des Herzens ab einem bestimmten Zeitpunkt ausgeschöpft. Die Ventrikel können sich nicht weiter dehnen und der enddiastolische Druck steigt an. Es kommt zur Dekompensation mit kongestivem Herzversagen. Andere Faktoren, die zu der Entwicklung von Herzversagen beitragen, sind zum einen die zusätzliche diastolische Dysfunktion als Komponenten der DCM, die die Ventrikelfüllung erschweren, und zum anderen die Reduzierung des Schlagvolumens durch möglicherweise bestehende Arrhythmien (KITTLESON & KIENLE, 1998).

Die beschriebene Volumenüberladung kann sich uni- oder bilateral manifestieren. Tiere mit bilateralem Herzversagen haben eine deutlich schlechtere Prognose als Tiere mit einer einseitigen Volumenüberladung (CALVERT et al., 1997b). Als Folge der Volumenüberladung und der damit verbundenen Erweiterung des Mitralannulus oder der Dysfunktion der Papillarmuskeln kann zusätzlich eine Mitralklappeninsuffizienz entstehen. Der systolische Klappenschluss ist

verhindert und eine funktionelle Regurgitation ist entstanden (BOLTWOOD et al., 1983; KONO et al., 1991; KONO et al., 1992).

1.3. Verlauf der Erkrankung, verschiedene Krankheitsstadien

Das Fortschreiten der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann kann in drei aufeinander folgende Krankheitsstadien unterteilt werden.

Im ersten, dem subklinischen Stadium (Phase I), liegt ein Schaden auf zellulärer Ebene vor. Das Herz ist sowohl morphologisch als auch elektro- und echokardiographisch unauffällig. Dieses Stadium kann bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht diagnostiziert werden.

Die okkulte Phase (Phase II) ist durch Rhythmusstörungen (ventrikuläre Arrhythmien) oder morphologische Veränderungen am Herzen gekennzeichnet. Für den Besitzer verhalten sich die Tiere in der okkulten Phase vollkommen normal. Es sind keine klinischen Anzeichen vorhanden. Es können elektro- oder echokardiographisch detektierbare Veränderungen vorliegen. Diese Veränderungen können entweder gleichzeitig auftreten oder sich zeitlich versetzt entwickeln (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Die echokardiographischen Veränderungen entwickeln sich meist innerhalb von ein bis zwei Jahren nachdem Arrhythmien diagnostiziert wurden (CALVERT & MEURS, 2009). Die typischen elektrokardiographischen Veränderungen beim Dobermann sind durch das Auftreten ventrikulärer Extrasystolen (VES) geprägt. Weibliche Tiere zeigen einen langsameren Krankheitsverlauf und das vermehrte Vorhandensein von VES bevor sie zusätzliche morphologische Veränderungen am Herzen entwickeln (WESS et al., 2010a). Einige von den weiblichen Tieren dieser Studie zeigten bis ins hohe Alter keine echokardiographischen Veränderungen. Männliche Tiere konnten in jüngerem Alter als die weiblichen Tiere mit echokardiographischen Veränderungen diagnostiziert werden (WESS et al., 2010a). Die Diagnose erfolgt mittels Herzultraschall und 24-Stunden-EKG (CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 2000b). Etwa 30 % der Hunde sterben in der okkulten Phase am plötzlichen Herztod, der durch die Rhythmusstörungen verursacht werden kann. Hierbei können anhaltende ventrikuläre Tachykardien in Kammerflimmern übergehen und so zum Sekudentod führen (CALVERT et al., 1997a; CALVERT & MEURS, 2009). Die okkulte Phase dauert beim Dobermann durchschnittlich

zwei bis vier Jahre. Momentan wird eine jährliche Kontrolle von allen Tieren ab zwei Jahren empfohlen, um das subklinische Stadium möglichst früh zu erkennen (CALVERT & WALL, 2001; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; CALVERT & MEURS, 2009).

Die symptomatische Phase (Phase III) präsentiert sich mit zusätzlichen klinischen Anzeichen. Als Folge der durch die Arrhythmie bedingten Minderperfusion im Gehirn können Synkopen auftreten. Desweiteren sind bei Tieren im kongestiven Herzversagen Tachypnoe bis hin zur Dyspnoe oder Husten zu beobachten. Klinische Anzeichen entwickeln Dobermänner erst spät im Verlauf der Erkrankung. Studien zeigten eine normale Leistungsbereitschaft bis zu zwei Wochen vor der Entwicklung eines Herzversagens (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Synkopen werden durch schnelle anhaltende Tachykardien verursacht. In selteneren Fällen können aber auch neurokardiogene Synkopen auftreten, die durch reflexartige Bradykardie und Vasodilatation bedingt sind. Wird eine durch eine ventrikuläre Tachykardie verursachte Synkope nicht antiarrhythmisch therapiert, führt dies bei bis zu 50 % der Tiere innerhalb von sechs Wochen zum Sekudentod (CALVERT & MEURS, 2009). Mehr als zwei Synkopen bei einem Patienten werden selten überlebt. Die restlichen Tiere versterben durch die klinischen Folgen des kongestiven Herzversagens im dekompenzierten Stadium (CALVERT & WALL, 2001; OYAMA et al., 2007; CALVERT & MEURS, 2009). Es konnte statistisch belegt werden, dass männliche Tiere öfter Herzversagen entwickeln und früher als die weiblichen Tiere sterben (WESS et al., 2010a). Abbildung 1 stellt den Krankheitsverlauf der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann schematisch dar.

Die Prognose für Tiere im Herzversagen ist schlecht. Je jünger die Tiere sind, umso kürzer ist die Überlebenszeit (TIDHOLM et al., 1997). Bilaterales Herzversagen oder Vorhofflimmern verschlechtern die Prognose zusätzlich (CALVERT et al., 1997b).

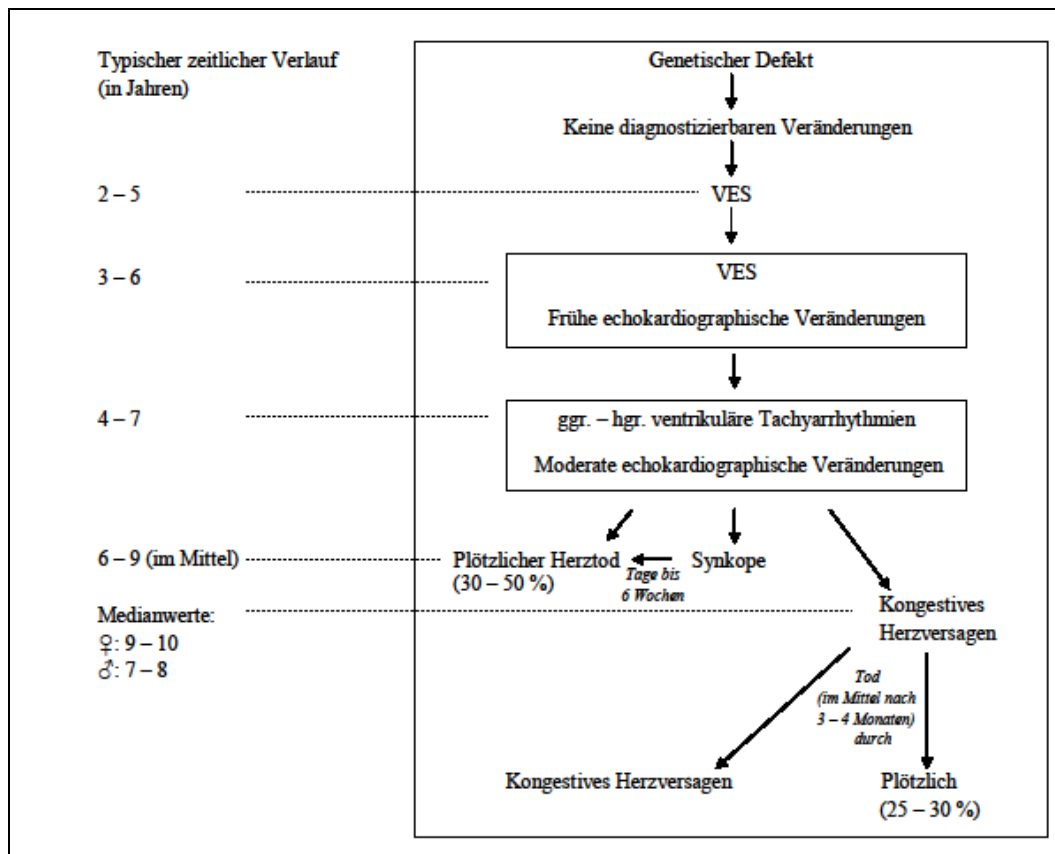


Abbildung 1: schematische Darstellung des typischen Krankheitsverlaufes der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann (nach CALVERT & MEURS, 2009). VES: ventrikuläre Extrasystolen, ggr.: geringgradig, hgr.: hochgradig

1.4. Diagnostik

Die Methode der Wahl zur Diagnose der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann ist die Kombination von Echokardiographie und 24-Stunden-EKG (Holter-EKG). Um zusätzliche internistische Erkrankungen auszuschließen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden (CALVERT, 1986; CALVERT et al., 2000b).

1.4.1. Anamnese

In den ersten zwei Stadien der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann verhalten sich die Tiere absolut unauffällig. So sind anamnestisch keine Auffälligkeiten festzustellen.

Im klinischen Stadium der Erkrankung sind Synkopen oder klinische Anzeichen des Herzversagens auffällig. So berichten die Besitzer beispielsweise von verminderter Leistungsbereitschaft, blassen Schleimhäuten bei Belastung,

vermehrter Atmung (auch in Ruhe), Husten, zunehmendem Bauchumfang oder Gewichtsverlust. Desweiteren können präsynkopale Anzeichen wie Einknicken in den Hinterläufen auffallen (CALVERT, 1986; CALVERT et al., 1997b).

1.4.2. Allgemeine und spezielle kardiovaskuläre Untersuchung

Sofern keine zusätzlichen internistischen Erkrankungen vorliegen, verläuft die allgemeine klinische Untersuchung bei Tieren bis zum klinischen Stadium ohne besonderen Befund. In der speziellen kardiovaskulären Untersuchung können Hinweise auf eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems gefunden werden. Bei Auskultation des Herzens können systolische Herzgeräusche im Bereich der Apex auffallen. Außerdem können Tachykardien, Arrhythmien oder Galopprrhythmen auskultiert werden. Möglicherweise sind bei gleichzeitiger Palpation des Pulses an der Vena femoralis Defizite oder eine geschwächte Qualität vorhanden. Klinische Symptome wie blasse Schleimhäute, eine verlängerte kapilläre Rückfüllzeit und allgemeine Schwäche sind Anzeichen für eine Dekompensation im klinischen Stadium. Linksherzversagen präsentiert sich mit Tachypnoe, Dyspnoe und/oder Husten. Husten kann durch Palpation der Trachea ausgelöst werden. Bei der Auskultation der Lunge können verschärfte Atemgeräusche oder Knistern festgestellt werden. Aszites, Pleuralerguss oder gestaute Jugularvenen sind hinweisend für ein bestehendes Rechtsherzversagen. Ein gefülltes bis prall erscheinendes Abdomen, das in der klinischen Untersuchung undulationspositiv ist, deutet auf das Vorhandensein von Aszites hin. Ist ausreichend Pleuralerguss vorhanden, können die Herztöne und die Lungenauskultation nur gedämpft wahrgenommen werden. Gestaute Jugularvenen fallen bei genauerer Betrachtung eines leicht gestreckten Halses auf (CALVERT, 1986; KITTLESON & KIENLE, 1998).

1.4.3. Röntgen

Die im Verlauf der DCM zunehmende Ventrikelvergrößerung kann im Röntgen als Kardiomegalie beobachtet werden. Aufgrund des langen, schmalen Brustkorbes des Dobermannes erscheint die Herzgröße im Thoraxröntgen subjektiv oft unauffällig. Die Messung des Vertebral Heart Score (VHS) nach Buchanan liegt allerdings bei einer vorhandenen Kardiomegalie über dem Referenzbereich (BUCHANAN & BUCHELER, 1995). Je nach Stadium können zusätzlich die Vorhöfe dilatiert erscheinen. Die Trachea kann durch einen

dilatierten linken Vorhof und die linksventrikuläre Vergrößerung angehoben werden. Zusätzlich treten bei Lungenödem interstitielle bis alveoläre Lungenmuster und gestaute Pulmonalvenen auf. Bei Rechtsherzversagen kann ein Detailverlust im Abdomen hinweisend auf Aszites sein. Zusätzlich findet man im Thoraxröntgen Ergusslinien entlang der Lungenlappengrenzen und abgerundete Lungenlappenspitzen im kaudodorsalen Bereich, welche Pleuralerguss identifizieren (CALVERT et al., 1982; CALVERT, 1986; KITTLESON & KIENLE, 1998).

1.4.4. Elektrokardiographie

Die Elektrokardiographie wird vor allem zur Identifizierung von für die Erkrankung typischen Rhythmusstörungen durchgeführt. Das Auftreten von mono- oder polymorphen VES ist ein typischer Befund der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 2000b). Neben einem normalen Sinusrhythmus können morphologische Variationen wie Couplets, Triplets, Bi- und Trigemini, Salven, ventrikuläre Tachykardien bis hin zum tödlichen Kammerflimmern diagnostiziert werden (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 2000b; CALVERT et al., 2000a; CALVERT & WALL, 2001; CALVERT & BROWN, 2004). Auch supraventrikuläre Extrasystolen und Vorhofflimmern können auftreten (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b). Zusätzlich zu Arrhythmien können Abweichungen in der Komplexbreite und -höhe hinweisend auf Kammervergrößerungen sein. Diese sind allerdings recht unspezifisch (CALVERT et al., 1982).

1.4.4.1. Kurzzeit-Elektrokardiographie

Alle bereits genannten elektrokardiographischen Veränderungen können in einem Kurzzeit-EKG gefunden werden. Es handelt sich hierbei um ein während des Tierarztbesuches geschriebenes EKG, das direkt abgelesen, ausgedruckt und ausgewertet werden kann. Die Aufzeichnungsdauer des Kurzzeit-EKG beträgt zwei bis fünf Minuten. Weitere Vorteile eines Kurzzeit-EKG sind die große Verbreitung von EKG-Geräten in den Praxen und somit deren schnelle Verfügbarkeit, die einfache Anwendung und Durchführung sowie die relativ niedrigen Kosten. Allerdings zeigten verschiedene Studien, dass die Sensitivität deutlich geringer ist als bei einem 24-Stunden-EKG (MEURS et al., 2001; WESS

et al., 2010c). Die Spezifität bei mindestens einer vorhandenen VES im Kurzzeit-EKG war hingegen sehr gut (WESS et al., 2010c). Folglich kann ein Kurzzeit-EKG zwar Hinweise auf eine Erkrankung geben aber im Umkehrschluss eine vorhandene Arrhythmie nicht ausschließen (KITTLESON & KIENLE, 1998; MEURS et al., 2001; WESS et al., 2010c).

1.4.4.2. 24-Stunden-Elektrokardiographie

Das 24-Stunden-EKG (Holter-EKG) ist die Methode der Wahl um die Arrhythmien im okkulten Stadium der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann zu diagnostizieren (CALVERT et al., 2000b; CALVERT et al., 2000a; CALVERT & WALL, 2001; MEURS et al., 2001; CALVERT & MEURS, 2009). Hierbei wird dem Patienten ein ambulant es EKG-Gerät angebracht, welches den Rhythmus über 24 Stunden aufzeichnet und anschließend ausgewertet werden kann. Während bei gesunden Tieren keine oder nur wenige Arrhythmien auftreten, können bei erkrankten Tieren oben genannte EKG-Veränderungen zu der Diagnose führen. Lange Zeit galt der Bereich 50 - 100 VES in 24 Stunden als Graubereich. Neuere Studien zeigen, dass das zweimalige Überschreiten von 50 VES in 24 Stunden innerhalb von einem Jahr diagnostisch für eine Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann ist (GERAGHTY, 2011). Ist ein im Holter-EKG auffälliges Tier echokardiographisch gleichzeitig ohne Befund, der auf eine DCM hindeutet, so folgen diese Veränderungen meist innerhalb von ein bis zwei Jahren (CALVERT & MEURS, 2009). Das vermehrte Vorkommen von Couplets oder Triplets scheint in Zusammenhang mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von zusätzlichen echokardiographischen Veränderungen zu stehen (CALVERT et al., 2000a). So weisen in einer Folge-Studie Dobermänner mit bereits verändertem Herzultraschall im Holter-EKG zu 96 % Couplets, zu 66 % Triplets und zu 64 % nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardien auf. Alle Tiere in dieser Studie, bei denen anhaltende ventrikuläre Tachykardien mit einer Dauer über 30 Sekunden beobachtet wurden, verstarben später am Sekudentod (CALVERT et al., 2000b). Bei Patientengruppen mit echokardiographischen Messungen im Graubereich und mehr als 100 VES, Couplets, Triplets und ventrikulären Tachykardien im Holter-EKG entwickelten die meisten Tiere innerhalb eines Jahres echokardiographisch eindeutige Abnormalitäten (CALVERT & WALL, 2001).

Zusammenfassend ist das 24-Stunden-EKG in Kombination mit dem

Herzultraschall das wichtigste prognostische und diagnostische Mittel in der Befunderhebung der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann.

1.4.5. Echokardiographie

Mittels Echokardiographie ist es möglich, morphologische Veränderungen am Herzen ab dem okkulten Stadium der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann zu diagnostizieren. Das okkulte Stadium kann sich allerdings auch ohne oder mit nur grenzwertigen echokardiographischen Veränderungen präsentieren, sodass eine sichere Diagnose nicht immer einfach zu stellen ist. Neben der anfänglichen systolischen Dysfunktion entsteht im Verlauf der Erkrankung zusätzlich eine diastolische Dysfunktion (O'SULLIVAN et al., 2007a). Echokardiographische Hinweise auf das Vorliegen der Erkrankung sind eine Vergrößerung des endsystolischen und enddiastolischen linksventrikulären Durchmessers und Volumens. Außerdem können die linksventrikulären Wandstärken vermindert sein. Tiere im Herzversagen zeigen, je nach Beteiligung einer oder beider Ventrikel, eine zusätzliche Vergrößerung des linken Vorhofs oder beider Vorhöfe (CALVERT et al., 1982; CALVERT, 1986; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1998; CALVERT et al., 2000a).

Kürzlich konnten Referenzwerte für das linksventrikuläre Volumen beim Dobermann veröffentlicht werden. Hierbei war die Volumenbestimmung mittels der Scheibchensummationsmethode nach Simpson zur Früherkennung des okkulten Stadiums den M-Mode-Messungen als bisherigen Standard überlegen (WESS et al., 2010b). Laut dieser Studie gelten enddiastolische Werte über 95 ml bezogen auf die Körperoberfläche und endsystolische Werte über 55 ml bezogen auf die Körperoberfläche als auffällig (WESS et al., 2010b). Befinden sich der enddiastolische linksventrikuläre Innendurchmesser (LVIDd) über oder gleich 46 mm beim weiblichen Tier und über oder gleich 48 mm beim männlichen Tier und der endsystolische linksventrikuläre Innendurchmesser (LVIDs) über oder gleich 36 mm, gilt dies als eindeutig abnormaler Befund beim Dobermann (WESS et al., 2010d). Modernere echokardiographische Techniken wie Gewebedoppler können zur Unterstützung der Diagnose hinzugezogen werden (SIMAK et al., 2011).

1.4.6. Biomarker

Die Kombination von Echokardiographie und Holter-EKG gilt als Gold-Standard zur Diagnose der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann. Allerdings

bieten diese Techniken auch viele Nachteile wie einen hohen finanziellen Aufwand, die Verwendung von Spezialgeräten, deren geringe Verfügbarkeit und eine erhöhte Variabilität (vor allem bei den Messungen im Ultraschall) zwischen verschiedenen Untersuchern. Außerdem ist es oft schwierig, grenzwertige Messungen richtig zu beurteilen. Die Verwendung von Biomarkern könnte eine attraktive Alternative zur bisherigen Diagnosestellung darstellen. Biomarker sind charakteristische biologische Merkmale, die objektiv gemessen werden können und auf einen normalen biologischen oder krankhaften Prozess im Körper hinweisen. Ein optimaler Biomarker weist sich durch eine minimalinvasive Probenentnahme, eine leichte Bestimmbarkeit, eine weit verbreitete Verfügbarkeit, eine quantitative Schlussergebnisaussage und geringe Kosten aus (OYAMA & SISSON, 2004; OYAMA et al., 2007). Die Erforschung von im Blut zirkulierenden Biomarkern bei kardialen Erkrankungen in Form von Neurohormonen und myokardialen Enzymen oder Proteinen erlangte daher in den letzten Jahren an Bedeutung und Interesse für die Wissenschaft (O'SULLIVAN et al., 2007b). Besonders genau wurden vor allem die natriuretischen Peptide Atriales Natriuretisches Peptid (ANP), B-Typ Natriuretisches Peptid (BNP) und das kardiale Troponin I (cTnI) und deren Verbindung zu kardialen Erkrankungen untersucht. Es handelt sich hierbei um im Blut befindliche Substanzen, die mit der Herzstruktur und -funktion sowie Verletzung von myokardialen Gewebe assoziiert sind. Bei erhöhtem Stress an der myokardialen Wand kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von den vasodilatatorischen Peptiden ANP und BNP. cTnI ist ein Teil der filamentösen Struktur der kardialen Sarkomere und wird durch Verletzung oder Absterben der Myozyten freigesetzt. Man geht davon aus, dass diese Substanzen im Verlauf der Krankheitsentwicklung immer stärker freigesetzt werden und daher auch bei sehr frühen präklinischen Stadien der caninen DCM schon erhöht sind (OYAMA et al., 2007). In anderen Studien wurden weitere potenzielle Biomarker bei gesunden und an der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann erkrankten Tieren untersucht (O'SULLIVAN et al., 2007b; WESS et al., 2011; MAIER & WESS, 2012; SINGLETARY et al., 2012). Bei erkrankten Dobermännern im okkulten Stadium wurde ein erhöhter ANP Spiegel gemessen. Plasma Big Endothelin 1, Aldosteron und Norepinephrin waren beim Fortschreiten der Erkrankung zusätzlich erhöht. Sich innerhalb eines Monats kontinuierlich erhöhende Plasma Big Endothelin 1- oder Norepinephrin-Konzentrationen wurden mit einer kürzeren Überlebenszeit in Verbindung

gebracht (O'SULLIVAN et al., 2007b).

Bei Patientengruppen mit einer erhöhten Prävalenz für DCM konnte eine erhöhte BNP Konzentration im okkulten Stadium nachgewiesen werden. Die Messungen von ANP und cTnI entsprachen bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität in dieser Studie nicht den gewünschten Kriterien (OYAMA et al., 2007). In vorherigen Studien über die canine DCM konnte allerdings eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöhte cTnI Konzentration bei erkrankten Tieren gemessen werden (OYAMA & SISSON, 2004; SPRATT et al., 2005). Eine aktuelle klinische Studie beim Dobermann bewies kürzlich eine mögliche Identifizierung an der DCM erkrankter Tiere mittels eines neuen, hochsensitiven Troponin-I-Assays (MAIER & WESS, 2012). In dieser Studie konnten bei einem Grenzwert von 0,104 ng/ml mit einer Sensitivität von 82,9 % gesunde von an der DCM erkrankten Dobermännern unterschieden werden (MAIER & WESS, 2012). Inwieweit die cTnI Werte durch andere Faktoren wie Alter, renale und hepatische Erkrankungen oder andere internistische krankhafte Umstände beeinflusst werden, ist bislang unklar und bedarf weiterer Erforschung (SCHOBER et al., 2002; OYAMA & SISSON, 2004; SPRATT et al., 2005).

Das N-terminale pro-B-Typ Natriuretische Peptid (NT-proBNP) ist eine Vorstufe des BNP. Es weist sich durch seine längere Halbwertszeit im Blut aus und kann somit leichter nachgewiesen werden (PROSEK & ETTINGER, 2009). NT-proBNP ist bei Dobermännern in allen Krankheitsstadien der Dilatativen Kardiomyopathie im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren erhöht (WESS et al., 2011; SINGLETARY et al., 2012). Es konnten sogar Erhöhungen des NT-proBNP Wertes festgestellt werden, bevor sich mittels des Goldstandards elektro- oder echokardiographische Veränderungen einer Dilatativen Kardiomyopathie diagnostizieren ließen. Die Diagnose mittels Goldstandard konnte hier bei den betroffenen Tieren spätestens eineinhalb Jahre nach der erhöhten NT-proBNP Messung gestellt werden (WESS et al., 2011). Laut dieser Veröffentlichung sind bei Tieren mit einem Wert über 550 pmol/l echokardiographische Veränderungen wahrscheinlich und sollten daher unbedingt weiter mit den Goldstandards untersucht werden. Bei einem Wert unter 400 pmol/l sind Veränderungen im Herzultraschall unwahrscheinlich. Allerdings können verschiedene Faktoren wie das Alter der Tiere die Messwerte beeinträchtigen und müssen für zukünftige Aussagen noch genauer untersucht werden (WESS et al., 2011). Durch die Messung von NT-proBNP und die gleichzeitige Durchführung eines Holter-EKG

konnte eine noch genauere Detektion von Dobermännern im okkulten Stadium erfolgen. Mit einer Sensitivität von 94,5 % konnten in dieser Veröffentlichung Dobermänner im okkulten Stadium der Dilatativen Kardiomyopathie erkannt werden (SINGLETARY et al., 2012). Die Bestimmung von NT-proBNP kann somit als diagnostisches Hilfsmittel, aber nicht zur alleinigen Diagnosestellung verwendet werden.

Trotz der intensiven Forschung nach einem optimalen Biomarker für die Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann konnte bislang noch keine Standardempfehlung gegeben werden.

1.4.7. Pathologische und pathohistologische Befunde

Typische pathologische Befunde der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann sind die Dilatation der Ventrikel und Atrien. Genauer genommen handelt es sich bei der Dilatation um eine exzentrische Hypertrophie, die durch die Volumenüberladung entsteht (TIDHOLM & JONSSON, 2005). Zusätzlich kann eine Verdünnung der linksventrikulären freien Wand und des interventrikulären Septum gefunden werden. Eine pulmonäre Kongestion ist Folge eines eingetretenen Lungenödems, welches als Konsequenz eines Linksherzversagens entsteht. Bei vorhandenem Rechtsherzversagen können typische sekundäre Befunde wie hepatische Stauungserscheinungen, Aszites oder Pleuralerguss erhoben werden (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; VOLLMAR et al., 2003).

In der histopathologischen Untersuchung können eine interstitielle oder multifokale Fibrose und eine myokardiale Degeneration und Atrophie festgestellt werden (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; EVERETT et al., 1999). Die beschädigten Myozyten werden durch Bindegewebe oder Fettzellen ersetzt. Histopathologisch unterscheidet man bei der DCM zwei Formen: zum einen der Ersatz von Myozyten durch wellenförmige Myozyten und zum anderen den fettig infiltrativen-degenerativen Typ (TIDHOLM et al., 2001; TIDHOLM & JONSSON, 2005). Ersteres tritt bei den meisten Riesenrassen und mittelgroßen bis großen Hunden mit DCM auf (SANDUSKY et al., 1984; TIDHOLM et al., 1998; DAMBACH et al., 1999; SLEEPER et al., 2002). Diese Veränderungen können klinischen und echokardiographischen Veränderungen der Erkrankung vorangehen und deuten somit auf eine frühe Krankheitsform hin (TIDHOLM et al., 2000). Die zweite

Form, der fettig infiltrative-degenerative Typ, wird vor allem bei den Rassen Boxer (HARPSTER, 1983) und Dobermann beobachtet (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; EVERETT et al., 1999). Diese zeichnet sich durch ein typisches histopathologisches Bild mit Atrophie der Myozyten und Ersatz der degenerierten Muskelfasern durch starke Fibrose und Fettzelleninfiltration aus (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; EVERETT et al., 1999). Diese Veränderungen konnten beim Dobermann sowohl im intraventrikulären Septum, in der linksventrikulären freien Wand als auch in den Papillarmuskeln des linken Ventrikels gefunden werden (CALVERT et al., 1982; EVERETT et al., 1999). Weitere typische Befunde sind eine mediale oder myointimale Hyperplasie der Koronargefäße, die zu einer intramuralen Verengung führen (CALVERT et al., 1982; EVERETT et al., 1999). Teilweise konnten Spuren von chronischen Entzündungsprozessen beobachtet werden (EVERETT et al., 1999).

1.5. Therapie

Es gibt keine einheitlichen Empfehlungen zur Therapie der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann. Die Therapie kann sich je nach Krankheitsstadium, vorhandenen echo- oder elektrokardiographischen Veränderungen und dem Ansprechen auf die Medikation zwischen den einzelnen Individuen unterscheiden und muss bei jedem Patienten individuell angepasst werden (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Ziele sind hierbei zum einen die Aufrechterhaltung der hämodynamischen Leistung des Herzens, die Reduktion von malignen Arrhythmien als auch die Behandlung von klinischen Symptomen des Herzversagens.

Kann die hämodynamische Leistung nicht aufrecht erhalten werden und besteht eine systolische Dysfunktion, sollten positiv inotrope Medikamente eingesetzt werden. Pimobendan gilt hier als Mittel der Wahl (FUENTES et al., 2002; O'GRADY et al., 2008; SUMMERFIELD et al., 2012). Es handelt sich um einen Inodilatator, der sowohl positiv inotrope wie auch vasodilatative Eigenschaften besitzt (CALVERT & MEURS, 2009). Die positiv inotrope Wirkung wird über zwei Mechanismen gewährleistet: Zum einen wird die Sensitivität des regulierenden Proteins Troponin C zu dem in der Zelle vorhandenen Kalzium

erhöht. Zum anderen erhöht Pimobendan durch Hemmung der Phosphodiesterase III die Kontraktilität des Herzens. Durch die zusätzliche Hemmung der Phosphodiesterase V entsteht der vasodilatatorische Effekt (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Summerfield et al. empfehlen die Therapie mit Pimobendan bereits ab den frühen Stadien der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann, da kürzlich eine verlängerte Zeitspanne bis zum Auftreten von klinischen Symptomen und somit eine verlängerte Überlebenszeit bewiesen wurde (SUMMERFIELD et al., 2012).

Die Therapie von Herzversagen besteht vor allem in der Beseitigung klinischer Symptome der Stauungserscheinungen und der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung einer adäquaten Herzfunktion. Furosemid ist ein Schleifendiuretikum und wird in der Veterinärmedizin als sehr potentes Entwässerungsmedikament eingesetzt. Sollte seine diuretische Wirkung alleine nicht ausreichen, kann es mit Aldosteron Rezeptor Antagonisten wie Spironolaktone oder Thiaziden kombiniert werden (KEENE & BONGURA, 2009). Desweiteren zählen die Inhibitoren des Angiotensin Konvertierenden Enzyms (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) zur Standardtherapie des Herzversagens (COVE, 1995; IMPROVE, 1995; ETTINGER et al., 1998). Durch ihre Blockierung des Renin Angiotensin Aldosteron Systems, welches im Herzversagen aktiviert ist, führen sie zu einer Vasodilatation, welche den diastolischen Druck der Ventrikel vermindert. Somit kann die kardiale Auswurfleistung erhöht werden (KITTLESON & KIENLE, 1998). Als dritte Komponente der Therapie des Herzversagens gilt Pimobendan. Bei Dobermännern mit Dilatativer Kardiomyopathie im Stadium des Herzversagens verlängert die Therapie mit Pimobendan zusätzlich zu der konventionellen Therapie die Überlebenszeit deutlich und verbessert die Lebensqualität (FUENTES et al., 2002; O'GRADY et al., 2008).

Sind elektrokardiographische Veränderungen vorhanden, sollte über eine antiarrhythmische Therapie entschieden werden. Allerdings besitzen die meisten Antiarrhythmika aber auch Nebenwirkungen, die nicht vernachlässigt werden sollten. Sie können proarrhythmogene Aktivität aufweisen, negativ inotrop oder systemisch toxisch wirken (CALVERT et al., 1996; THOMASON et al., 2008; KRAUS et al., 2009; GELZER et al., 2010). Bislang fehlen Langzeitstudien zu den einzelnen Antiarrhythmika. Man geht davon aus, dass durch entsprechende

Therapie zwar der plötzliche Herztod verzögert, aber nicht verhindert werden kann (CALVERT & BROWN, 2004). Ab einem bestimmten Malignitätsgrad der Arrhythmien überwiegt das Risiko des Sekudentodes aber dem der Nebenwirkungen, sodass eine Therapie gestartet werden sollte (CALVERT & BROWN, 2004). Ein Therapiestart wird momentan beim Auftreten von VES mit einer Geschwindigkeit von mehr als 200 Schlägen pro Minute, Synkopen in Verbindung mit zahlreichen VES und dem Vorhandensein von Couplets oder Triplets mit einer Anzahl von über 6000 – 8000 VES in 24 Stunden empfohlen (CALVERT & MEURS, 2009). Häufig werden orale Antiarrhythmika wie Mexiletin, Sotalol und Amiodaron gegen ventrikuläre Rhythmusstörungen eingesetzt (CALVERT & MEURS, 2009). Mexiletin wirkt vor allem in Kombination mit einem beta-adrenergen Rezeptor Blocker sehr gut (MEURS et al., 2002; GELZER et al., 2010). Amiodaron kann starke gastrointestinale und hepatotoxische Nebenwirkungen haben und sollte daher vorsichtig verwendet werden (KRAUS et al., 2009). Zur Therapie-Kontrolle werden regelmäßige Holter-Untersuchungen im ein- bis dreimonatigem Abstand empfohlen. Bei der Behandlung mit Amiodaron sollten regelmäßige Serumprofile eingeleitet werden, um eventuelle Organschäden früh zu erkennen (CALVERT & MEURS, 2009; KRAUS et al., 2009).

Anlehnend an humanmedizinische Studien, wird angenommen, dass ACE-Inhibitoren das Fortschreiten einer ventrikulären Bindegewebeinlagerung, welche als Folge der dauerhaften Aktivierung des Renin Angiotensin Aldosteron Systems auftreten kann, mindern (TAN et al., 1991; KAJSTURA et al., 1997; UNGER, 2002; BLUMER, 2009). Die Therapie mit Benazepril als ACE-Inhibitor in der okkulten Phase der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann verlängert laut einer retrospektiven Studie die Zeit bis zum Erreichen des Herzversagens oder des plötzlichen Herztodes (O'GRADY et al., 2009). Außerdem kann Spironolakton als Aldosteron Rezeptor Antagonist zusätzlich zu einer Therapie mit einem ACE-Hemmer in der okkulten Phase verabreicht werden. Spironolakton kann durch eine Inhibition der kardialen Fibroblasten antifibrotische Wirkung auf das Myokard ausüben und so die voranschreitende Degeneration verlangsamen (CALVERT & MEURS, 2009).

1.6. Prognose

Da es sich bei der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann um eine nicht heilbare Erkrankung handelt, die zum Tod führt, ist die Prognose immer ungünstig. Prognostisch wichtig sind zum einen der Schweregrad der Veränderungen im EKG oder Echokardiographie und zum anderen das Stadium der Erkrankung, in dem sich das Tier befindet. Je jünger die betroffenen Tiere sind, umso schlechter ist die Prognose (TIDHOLM et al., 1997; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Die meisten Tiere haben in einem Alter von drei bis sechs Jahren die ersten elektro- oder echokardiographischen Abnormalitäten und befinden sich somit im anfänglichen okkulten Stadium. Innerhalb von durchschnittlich zwei bis drei Jahren enden diese Tiere im Herzversagen (CALVERT & MEURS, 2009). Verschlechtern sich die elektro- oder echokardiographischen Veränderungen zunehmend, können bei bis zu 50 % der Tiere gefährliche Rhythmusstörungen auftreten (CALVERT & MEURS, 2009). Diese zeigen sich klinisch entweder als Synkope oder enden letal. Bei 30 – 50 % der betroffenen Dobermänner ist der plötzliche Herztod das erste klinische Anzeichen für eine Erkrankung (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Dies tritt vor allem in einem Alter von sechs bis acht Jahren auf. Tiere, die eine erste Synkope überstehen und nicht behandelt werden, überleben selten länger als sechs Wochen, sondern sterben an einer zweiten letalen Arrhythmie (CALVERT & MEURS, 2009). Bei adäquater Therapie kann die Zeit bis zum Eintreten des plötzlichen Herztodes verlängert werden, sodass dieser dann meist innerhalb von einem Jahr nach der ersten Synkope auftritt (CALVERT & BROWN, 2004). Ist das Stadium des Herzversagens erreicht, beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit drei bis vier Monate (CALVERT & MEURS, 2009). 20 – 30 % der Tiere versterben auch in dieser Phase am plötzlichen Herztod (CALVERT et al., 1997b; CALVERT et al., 2000a), die restlichen Tiere erliegen den klinischen Folgen des kongestiven Herzversagens (siehe Abbildung 1) (CALVERT et al., 1997b).

In verschiedenen Studien wurden weitere Faktoren als zusätzliche negative prognostische Umstände der Krankheitsentwicklung beschrieben. In einer Studie, die die verschiedenen prognostischen Faktoren der DCM bei verschiedenen Hunderassen untersuchte, konnte festgestellt werden, dass ein erhöhtes linksventrikuläres Volumen in der Systole die höchste prognostische Aussage

erzielt (MARTIN et al., 2010). Weitere Kriterien in dieser Studie, die mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert wurden, waren das Vorhandensein von Lungenödem, das Auftreten von VES, ein erhöhter Kreatinin- und erniedrigter Proteinspiegel im Plasma. Rassespezifische Unterschiede waren ebenfalls vorhanden: Hunde der Rasse Great Dane zeigten die kürzesten Überlebenszeiten im Herzversagen, gefolgt von Tieren der Rasse Dobermann (MARTIN et al., 2010). Der Verlauf des klinischen Stadiums der Erkrankung schreitet laut O'Grady beim Dobermann schneller als bei anderen Hunderassen voran (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Auch Vorhofflimmern und bilaterales Herzversagen konnten mit einer deutlichen kürzeren Überlebenszeit bei Dobermännern mit Dilatativer Kardiomyopathie im Endstadium in Verbindung gebracht werden (CALVERT et al., 1997b).

2. Mikro-Ribonukleinsäuren

Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) sind kleine, hochkonservierte Ribonukleinsäuren (RNAs), die an der Genregulation beteiligt sind. Sie sind in zahlreichen Geweben wie auch im Blut nachweisbar und stellen potentiell neue Biomarker verschiedener Erkrankungen dar. Beim Menschen ergaben sich Unterschiede im miRNA Expressionsmuster von an der DCM erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

2.1. Allgemeines zu Mikro-Ribonukleinsäuren

Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1993 repräsentieren miRNAs neue Regulatoren der Genexpression und werden intensiv bei verschiedenen biologischen und pathologischen Zuständen erforscht (LEE et al., 1993).

2.1.1. Biogenese und Wirkmechanismus

miRNAs sind 18 – 25 Nukleotide lange, nichtkodierende, einzelsträngige RNAs. Die miRNA Gene sind entweder auf den Introns von Protein-kodierenden Genen oder als unabhängige Einheit zwischen den Genen lokalisiert. Aus diesen intra- und intergenetischen Genomregionen werden sie von dem Enzym Polymerase II abgelesen, wodurch lange primäre RNA Transkripte (pri-miRNAs) als Vorstufen

der miRNAs entstehen (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004). Diese Vorstufen werden anschließend durch zwei weitere Verwandlungsprozesse in adulte miRNAs umgebaut: Die nukleäre pri-miRNA wird durch ein RNA spaltendes Enzym (RNase) III Drosha/Dgcr8 Enzym Komplex zunächst weiter gespalten, wodurch eine charakteristischerweise haarnadelförmige „precursor“ miRNA (pre-miRNA) entsteht. Die pre-miRNA wird mit exportin-5 aus dem Zellkern geschleust und im Zytoplasma mittels eines Dicer-enthaltenen Komplexes weiter aufgeteilt. Auf diese Weise entsteht eine doppelsträngige miRNA, die die adulte miRNA und einen funktionslosen komplementären Strang enthält. In seltenen Fällen kann der Doppelstrang auch aus zwei funktionsfähigen miRNAs bestehen. Die adulte einsträngige miRNA bindet mit Hilfe des Dicer an einen „RNA-induced silencing complex“ (RISC Komplex), wodurch folglich eine Bindung an die Ziel-messengerRNA (mRNA) mit komplementärer Basenpaarung entsteht (BERNSTEIN et al., 2001; YI et al., 2003; DENLI et al., 2004; HU et al., 2009). Die Translation von mRNA wird anschließend auf zwei verschiedene Arten verhindert oder gehemmt: Adulte miRNAs induzieren entweder die Degradierung von mRNA oder sie hemmen die Protein Translation von mRNA Transkripten, indem sie sich unvollständig an die 3'-untranslierte Region (UTR) der Ziel-mRNA heften. (BARTEL, 2004; RODRIGUEZ et al., 2004; VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006). Folglich erfolgt keine Umschreibung der genetischen Information in Proteine. Eine einzige miRNA kann an mehrere mRNAs binden und eine mRNA kann von mehreren synergistisch wirkenden miRNAs erfasst werden (LIM et al., 2005; RAJEWSKY, 2006). Auf diese Weise werden vermutlich bis zu 60 % der humanen Gene feinreguliert (FRIEDMAN et al., 2009).

2.1.2. Freisetzung aus der Zelle

Während sich der Großteil der miRNAs intrazellulär aufhält, konnten zahlreiche Studien das Vorhandensein von miRNAs in der Zirkulation beweisen (WANG et al., 2010c; WEBER et al., 2010; ZEN & ZHANG, 2010; ZUBAKOV et al., 2010). Der genaue Mechanismus und die Funktion der Freisetzung aus der Zelle konnten allerdings bislang nicht exakt erforscht werden (ETHERIDGE et al., 2011). Da sich endogene miRNAs in der Zirkulation stabil verhalten, wird angenommen, dass sie auf verschiedene Weise vor zirkulierenden RNasen geschützt werden. Neben der Verpackung in Lipid-Körperchen wird auch die

Bindung an Proteinkomplexe oder eine Kombination aus beiden Schutzmechanismen vermutet (VALADI et al., 2007; GIBBINGS et al., 2009). Die Verpackung in Mikrovesikel mit anschließender aktiver Sekretion aus der Zelle stellt eine weitere These der Freisetzung zellulärer miRNAs dar (ZHANG et al., 2010b). Es wird angenommen, dass 80 % der miRNAs als Protein-gebundene Form zirkulieren, wohingegen der restliche Teil als Membran-gebundene Vesikel (in Form von apoptotischen Körpern, Lipid-Körperchen oder Exosomen) freigesetzt werden (VALADI et al., 2007; WANG et al., 2010c; ARROYO et al., 2011; VICKERS et al., 2011; CREEMERS et al., 2012). miRNAs sind in Exosomen und Mikrovesikeln in Blut, Urin und Speichel vorhanden (HUNTER et al., 2008; DIMOV et al., 2009; MICHAEL et al., 2010).

miRNAs werden mehrfach als Mediatoren einer Zell-zu-Zell Kommunikation diskutiert (CAMUSSI et al., 2010; IGUCHI et al., 2010; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010; WANG et al., 2010c). In manchen Studien konnte bereits eine regulatorische Funktion der zirkulierenden miRNAs bewiesen werden (PEGTEL et al., 2010; ZHANG et al., 2010b). Sollte dies der Fall sein, werden bestimmte miRNAs aus der einen Zelle heraus transportiert, um von einer Ziel-Zelle bemerkt, aufgenommen und verwendet zu werden. Dies unterstützt die Annahme, dass miRNAs mittels eines spezifischen Systems selektiv in die Zirkulation freigesetzt und vor dem extrazellulären Milieu geschützt werden (OHSHIMA et al., 2010; WANG et al., 2010c). Es sind allerdings weitere Studien nötig, um die zugrunde liegenden Mechanismen der selektiven Freisetzung, der Informationsübertragung und Aufnahme in andere Zellen zu verstehen.

2.1.3. Eigenschaften

miRNAs sind evolutionär konserviert und besitzen daher eine identische Nukleotid-Reihenfolge bei verschiedenen Spezies (CHEN et al., 2008b). Einige miRNAs sind so hoch konserviert, dass sie identische Sequenzen zwischen primitiven Organismen und dem Menschen aufweisen (GRIMSON et al., 2008). Diese Homogenität besteht auch zwischen der Mehrheit der caninen und humanen miRNAs (BOGGS et al., 2007).

miRNAs zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Stabilität in der Zirkulation aus (CHEN et al., 2008b; MITCHELL et al., 2008; AI et al., 2010). Sie sind widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen wie starken

Temperaturschwankungen und pH-Wert-Veränderungen. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen von Blutproben hatte keinen Einfluss auf die miRNA Expressionshöhen (GILAD et al., 2008; KROH et al., 2010). Weil die miRNA Expression in Blutpräparaten über ein Jahr stabil war, wurden miRNAs als Hilfsmittel zur forensischen Identifizierung verschiedener Körperflüssigkeiten vorgeschlagen. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur unter Laborbedingungen mit konstanter Luftfeuchte, ohne UV-Belichtung und staubfrei aufbewahrt und wiesen nach einem Jahr konstante Expressionslevel auf (ZUBAKOV et al., 2010).

Die miRNA Expressionshöhen im Serum von Mäusen, Ratten, Rinder-Feten, Kälbern und Pferden sind konstant und zeigten keine individuellen Abweichungen innerhalb einer Spezies (CHEN et al., 2008b).

2.1.4. Nachweis

In zahlreichen Studien wurden miRNAs in Geweben, Zelllinien und verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basierte Ansätze und Mikroarrays stellen hierbei die am häufigsten verwendeten Techniken dar. Seltener kommen miRNA Nachweismethoden wie Northern Blotting, Ligation-basierte Messungen oder direkte Sequenzierung durch „next generation sequencing“ zum Einsatz (ETHERIDGE et al., 2011). Einzelne miRNAs können mittels PCR Assays bestimmt werden (GILAD et al., 2008; KROH et al., 2010). miRNA Mikroarray Systeme hingegen können ganze miRNA Expressionsmuster detektieren, indem mehrere hundert miRNAs gleichzeitig in einer Probe getestet werden (RESNICK et al., 2009). Die meisten humanmedizinischen Studien bestehen aus einer miRNA Profil-Analyse mittels miRNA Mikroarray, deren Ergebnisse mit einzelnen quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) Assays verifiziert werden (RESNICK et al., 2009; TIJSEN et al., 2010; ZHAO et al., 2010; JI et al., 2011; LI et al., 2011; ZAHM et al., 2011; ZHAO et al., 2011; ZHU et al., 2011). miRNA Expressionsstärken beim Hund wurden bislang mittels PCR Techniken in verschiedenen Geweben und im Serum bestimmt (BOGGS et al., 2008; MORTARINO et al., 2010; GIOIA et al., 2011; MIZUNO et al., 2011). Aufgrund der erwähnten hohen evolutionären Konservierung, konnten hierfür humane oder murine Ziel-miRNAs erfolgreich als Assays verwendet werden (BOGGS et al., 2007). Eine Untersuchung des caninen miRNA Expressionsprofiles mittels miRNA Mikroarray ist bisher nicht bekannt.

2.2. Canine Mikro-Ribonukleinsäuren

Obwohl Hunde zur Erforschung vieler humaner Erbkrankheiten ein interessantes genetisches Modell darstellen, existieren bisher nur wenige Studien über canine miRNA Expressionsprofile. miRNA Gene zwischen Hund und Mensch sind hoch konserviert. Die erfolgreiche Verwendung humaner qRT-PCR Assays zur Bestimmung caniner zellulärer miRNAs beweist, dass auch die Sequenzen ausgereifter miRNAs von Mensch und Hund einheitlich sind (BOGGS et al., 2007).

Die miRNA Expressionsmuster verschiedener neoplastischer Gewebe unterscheiden sich von Gewebeproben gesunder Kontrollen. miRNA Expressionen von caninen malignen Mamma-Tumoren unterscheiden sich deutlich von gesunden Kontrollen und gleichen dem miRNA Expressionsmuster, das bei Menschen mit Brustkrebs gefunden wurde (BOGGS et al., 2008). Proben aus Lymphknoten von am caninen Lymphom erkrankten Tieren zeigen Unterschiede in der Expression von miR-17-5p und miR-181a (MORTARINO et al., 2010). In Blutproben von Hunden mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) sind ebenfalls Unterschiede im miRNA Expressionsmuster vorhanden. Im peripheren Blut sind statistisch signifikant erhöhte miR-125b Expressionen bei Tieren mit B-Zell CLL vorhanden. Blutproben von B-Zell CLL, T-Zell CLL und gesunden Kontrollen lassen sich mittels ihrer spezifischer miRNA Genverhältnisse differenzieren (GIOIA et al., 2011). Mittels miRNA Expressions-Assays ist auch eine Unterscheidung von Gewebeproben unauffälliger Harnblasen und Harnblasen mit infektiöser oder neoplastischer Veränderung möglich (VINALL et al., 2012).

Auch in caninen Serumproben können miRNAs nachgewiesen werden. Hunde mit einer Muskeldystrophie des Typ Duchenne zeigen deutlich messbare Expressionsveränderungen muskelspezifischer miRNAs im Serum, die mittels qRT-PCR Assays erfassbar sind (MIZUNO et al., 2011).

Studien zu miRNAs bei caninen Kardiomyopathien wie der DCM existieren bislang nicht.

2.3. Herzspezifische Mikro-Ribonukleinsäuren

Zahlreiche humanmedizinische Studien untersuchten miRNA Expressionsunterschiede bei verschiedenen Kardiomyopathien. miRNAs sind nachweislich an der kardialen Entwicklung, Zelldifferenzierung, dem Myozyten-Wachstum und dem Auftreten von myokardialen Ischämien mit folgenden Rhythmusstörungen beteiligt (VAN ROOIJ & OLSON, 2007; VAN ROOIJ et al., 2007; YANG et al., 2007; ZHAO et al., 2007; CAI et al., 2010; IKEDA & PU, 2010). Einige miRNAs sind verstärkt im kardialen Gewebe angereichert und werden daher als herzspezifische miRNAs beschrieben (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BASKERVILLE & BARTEL, 2005; SATOH et al., 2010).

2.3.1. Mikro-Ribonukleinsäuren bei der Dilatativen Kardiomyopathie

Ikeda et al. entdeckten 2007 spezifische miRNA Expressionsmuster in kardialen Gewebeproben. Die miRNA Expressionsprofile von an der DCM und anderen Kardiomyopathien erkrankten Patienten unterscheiden sich von gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 1, Anhang). Auch die in dieser Studie untersuchten Kardiomyopathien können mit Hilfe spezifischer Expressionsmuster differenziert werden (IKEDA et al., 2007). Seitdem wird angenommen, dass jede Form und jeder Phänotyp verschiedener Herzerkrankungen ein eigenes miRNA Expressionsprofil aufweisen. Führt die DCM zum Herzversagen, können - anhand der spezifischen miRNA Expressionsprofile - auch in diesem Stadium noch Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Erkrankung gezogen und die DCM somit von anderen kardiologischen Pathomechanismen (wie z. B. der Ischämischen Kardiomyopathie) unterschieden werden (SUCHAROV et al., 2008). Der Toll-like Rezeptor (TLR) 4 ist nachweislich an der Ätiologie der humanen DCM beteiligt (SATOH et al., 2004). Eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe bestätigt die Deregulierung bestimmter miRNAs in endomyokardialen Biopsien von an der DCM erkrankten Menschen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Bei erkrankten Proben sind miR-126, miR-155 und let-7i niedriger und miR-21 und TLR4 stärker exprimiert als bei gesunden Kontrollen. Expressionshöhen von let-7i korrelierten negativ mit Messungen des TLR4 Protein-Levels. Der Bestimmung der let-7i Expressionshöhe wird desweiteren eine prognostische Rolle für die klinische Entwicklung der DCM zugeschrieben (SATOH et al., 2011). miR-208 scheint an der Progression von DCM beim Menschen beteiligt zu sein und eine erhöhte Expression in kardialen DCM-Gewebeproben steht in Zusammenhang mit

kürzeren Überlebenszeiten (SATO et al., 2010). Die Deregulierung bestimmter zellulärer miRNAs gibt also Hinweise auf den klinischen Verlauf und die Prognose der humanen DCM. miR-196a und miR-499 sind an der Entstehung einer DCM beim Menschen beteiligt: Durch genetische Veränderung an Vorstufen dieser miRNAs steigt das Risiko, an der DCM zu erkranken, deutlich an (ZHOU et al., 2010).

Mehrere Studien an Labortieren zeigen, dass spezielle miRNAs an der Kontrolle des kardialen Wachstums und an Umbauvorgängen beteiligt sind und durch Deregulierung dieser miRNAs ein DCM Phänotyp am Herzen entsteht (VAN ROOIJ et al., 2006; CHEN et al., 2008a; LIU et al., 2008; RAO et al., 2009). Eine vermehrte kardiale Expression von miR-195 in transgenetischen Mäusen führt zu einer anfänglichen Fehlanordnung von Myozyten und fehlerhaftem kardialen Wachstum, welches im Alter von sechs Monaten zu einer echokardiographisch diagnostizierbaren DCM fortschreitet und im Herzversagen endet (VAN ROOIJ et al., 2006). Durch gezielte Hemmung der Enzymbestandteile Dicer oder Dgcr8 wird die miRNA Biogenese inhibiert. Betroffene Mäuse aus diesen Studien zeigen eine erhöhte perinatale Lethargie und Sterblichkeit bedingt durch einen DCM Phänotyp des Herzens und dessen pathophysiologische Folgen (CHEN et al., 2008a; RAO et al., 2009). Auch miR-133a ist an der kardialen Proliferation beteiligt: Mutationen an miR-133a-1 und miR-133a-2 bei Mäusen führen zu großen Defekten an der Herzscheidewand, welche mit einer erhöhten perinatalen Mortalität in Verbindung gebracht werden. Tiere, die trotz der Mutation adult werden, entwickeln eine DCM und versterben am Herzversagen. Im Alter von zwei bis vier Monaten sind bei diesen Tieren starke Fibrose und eine verschlechterte kardiale Funktion vorhanden. In der Echokardiographie zeigen diese Mäuse eine erniedrigte Verkürzungsfraction und einen erhöhten LVIDs. Mit fortschreitendem Alter treten zusätzlich eine Vergrößerung des LVIDd und verdünnte Kammerwände auf. Manche Tiere zeigen Thrombenbildung in den Vorhöfen. Die Hälfte dieser adulten Mäuse sterben am Sekudentod, welcher vermutlich durch zusätzlich auftretende Rhythmusstörungen verursacht wird (LIU et al., 2008).

2.3.2. Mikro-Ribonukleinsäuren bei anderen Kardiomyopathien

Auch bei anderen humanen Kardiomyopathien wie Hypertropher Kardiomyopathie, Myokard- und Herzversagen sind miRNA

Expressionsunterschiede zwischen erkrankten und gesunden Patienten vorhanden (JI et al., 2009; AI et al., 2010; TIJSEN et al., 2010; WANG et al., 2010a; DORN, 2011; ELTON et al., 2011).

Van Rooij et al. beschrieb zuerst Dysregulationen von miRNA Expressionsprofilen bei kardialer Hypertrophie und Herzversagen beim Menschen (VAN ROOIJ et al., 2006). Zahlreiche Folgestudien unterstützen die These von differentiellen miRNA Expressionen bei kardialer Hypertrophie bei Mäusen oder dem Menschen (CARE et al., 2007; CHENG et al., 2007; SAYED et al., 2007; TATSUGUCHI et al., 2007; THUM et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2007). Stress-regulierte miRNAs erzeugen positiven wie auch negativen Einfluss auf das hypertrophe kardiale Wachstum in Mausmodellen (VAN ROOIJ et al., 2006; CARE et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2007).

Auch im Herzversagen sind zahlreiche miRNAs dereguliert. miRNAs im Herzversagen wurden vor allem in experimentellen Modellen und kardialen Zellkulturen untersucht (VAN ROOIJ et al., 2006; CARE et al., 2007; CHENG et al., 2007; SAYED et al., 2007; TATSUGUCHI et al., 2007). Auch in Gewebeproben von Patienten im Herzversagen sind miRNA Expressionsunterschiede vorhanden (THUM et al., 2007; NAGA PRASAD et al., 2009).

In Labortieren ist die Expression von miR-1 in Folge von myokardialen Ischämien mit anschließender Wiederdurchblutung (Ischämie-/Reperfusionssyndrom) und myokardialen Infarkten verändert (YANG et al., 2007; SHAN et al., 2009; TANG et al., 2009). In Mausmodellen ist miR-320 an der Regulation von ischämisch bedingten kardialen Verletzungen und Dysfunktionen beteiligt. Indem miR-320 vor Apoptose schützt, kann die Größe eines Infarktes vermindert werden. (REN et al., 2009). Die Expressionsunterschiede zeigen einen zeitlich unterschiedlichen Verlauf: So unterscheiden sie sich nach kardialer Ischämie in Gewebeproben an aufeinander folgenden Tagen (ROY et al., 2009). Auch lokale Unterschiede sind vorhanden: miRNA Expressionen von Gewebeproben, die aus den von Infarkten betroffenen Regionen selbst oder aus deren Randgebieten entnommen werden, sind differentiell. Die Expression von miR-21 ist z. B. in von Infarkten betroffenem Gewebe deutlich niedriger als im Randgebiet von ischämischen Bereichen, wo diese miRNA auffallend hoch reguliert ist (DONG et al., 2009).

2.4. Potential von Mikro-Ribonukleinsäuren als Biomarker

Aufgrund ihres Vorkommens und ihrer Stabilität in verschiedenen Körperflüssigkeiten, der hohen evolutionären Konservierung, der einfachen Bestimmbarkeit sowie der spezifischen Expression bei bestimmten biologischen wie auch pathologischen Zuständen, werden miRNAs als wertvolle neue Biomarker angesehen. Spezifische miRNA Expressionsmuster im Blut wurden bei unterschiedlichen biologischen und pathologischen Zuständen beschrieben. Wie Fingerabdrücke bestimmter Erkrankungen können sie abgelesen und interpretiert werden (MITCHELL et al., 2008; WANG et al., 2009; HENEGHAN et al., 2010; TSUJIURA et al., 2010). Bei manchen Krankheiten geht die Veränderung der miRNA Expression sogar einer bisherigen Diagnosestellung mittels Goldstandard voran und scheint dieser somit überlegen zu sein (WANG et al., 2009; WANG et al., 2010a; MIZUNO et al., 2011). Einzelne miRNAs stellen prognostische Marker für die Progression der Erkrankung dar (HU et al., 2010; SATOH et al., 2010; KONG et al., 2011).

2.4.1. Mikro-Ribonukleinsäuren als Biomarker nicht-kardialer Erkrankungen

miRNAs gelten als neue Biomarker für verschiedene humanmedizinische Tumorarten, Leberschädigungen, Darmerkrankungen und Diabetes Mellitus (CHEN et al., 2008b; MITCHELL et al., 2008; LODES et al., 2009; WANG et al., 2009; HENEGHAN et al., 2010; HUANG et al., 2010; ZHANG et al., 2010c; ZAHM et al., 2011; ZHAO et al., 2011). Mitchell et al. bestimmte zuerst miRNAs im neoplastischen Gewebe und in der Zirkulation gleichzeitig. Ihm gelang hiermit der Nachweis von Gewebe-spezifischen miRNAs aus Prostata-Gewebe im Serum. Desweiteren konnten Veränderungen der gewebespezifischen miRNAs des neoplastischen Gewebes auch im zirkulierenden miRNA Expressionsmuster widerspiegelt werden (MITCHELL et al., 2008).

In der Veterinärmedizin wurden miRNAs bei Muskeldystrophie des Typ Duchenne im Hunde- und Mausmodell untersucht und festgestellt, dass der Nachweis von zirkulierenden Expressionsunterschieden muskelspezifischer miRNAs dem Goldstandard zur Diagnosestellung überlegen ist (MIZUNO et al., 2011).

2.4.2. Mikro-Ribonukleinsäuren als Biomarker kardialer Erkrankungen

Zur Erkennung kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Etablierung eines im Blut zirkulierenden Biomarkers besonders vorteilhaft. Gerade in der Kardiologie ist eine Gewebeproben-Entnahme nur unter hohen Risiken und mit großem Aufwand möglich. In der Veterinärmedizin sind myokardiale Biopsien bislang kein etablierter diagnostischer Standard. Aber auch eine Diagnosestellung mittels Echokardiographie oder EKG erfordert spezialisiertes Personal und ist zeit- und kostenaufwendig.

Mehrere Studien bewiesen das Potential von miRNAs als diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Marker für kardiovaskuläre Veränderungen wie Koronararterien-Erkrankungen, Herzinfarkt, Diabetes Mellitus oder Hypertension (VAN EMPEL et al., 2012).

Verschiedenen miRNAs (miR-1, miR-208, miR-499) wird Potential als Biomarker zur Diagnose von akuten myokardialen Infarkten zugesprochen (JI et al., 2009; ADACHI et al., 2010; AI et al., 2010; CORSTEN et al., 2010; WANG et al., 2010a; REID et al., 2011). Ihre Präsenz in der Zirkulation nach myokardialer Schädigung korreliert mit klinischen Markern einer Myozyten-Schädigung wie Troponinen und Kreatinin-Kinase-MB Aktivität (ADACHI et al., 2010; CORSTEN et al., 2010). Die Veränderung im miRNA Muster mag sogar detektierbaren Troponin-Erhöhungen voranschreiten (WANG et al., 2010a). Ji et al. bewiesen die Korrelation von miR-208 Expressionsstärken im Plasma zu cTnI Erhöhungen nach myokardialen Verletzungen. Im Gegensatz zu cTnI ist miR-208 allerdings nicht durch eine mechanisch induzierte renale Schädigung beeinflussbar, was somit einen klaren Vorteil darstellt (JI et al., 2009). Eine erhöhte Serumkonzentration der genannten miRNAs zeigt demnach eine erhöhte Sekretion aus den geschädigten kardialen Myozyten an. miR-1 in der Blutzirkulation ist ebenfalls nach akuter myokardialer Schädigung erhöht. Die Expression von zirkulierendem miR-1 steigt nach mechanisch induzierter akuter myokardialer Infarzierung schnell bis auf über 200-fache Werte an (CHENG et al., 2010). Im Labormodell wie auch beim Menschen sinken die erhöhten Werte allerdings nach Tagen und unter Therapie wieder auf Normalwerte zurück, sodass einst auffällige Patienten nicht mehr von gesunden Kontrollen zu unterscheiden sind (AI et al., 2010; CHENG et al., 2010).

Bei Patienten mit chronischem stabilem Herzversagen ist die Expression von

sechs zirkulierenden miRNAs verändert. Unter diesen sechs miRNAs ist die Deregulierung von miR-423-5p am engsten mit der Diagnose Herzversagen verbunden (TIJSEN et al., 2010). Obwohl der genaue zelluläre Ursprung von dieser miRNA nicht bekannt ist, stellt miR-423-5p daher einen potentiellen neuen Biomarker für Herzversagen dar.

In endomyokardialen Biopsien bei Patienten mit DCM konnten Veränderungen in miRNA Expressionsmustern im Vergleich zu gesunden Kontrollen kürzlich bestätigt werden. Die Expressionshöhen von zellulären miRNAs (let-7i und miR-208) stellen Parameter für den Verlauf und die Prognose der DCM dar (SATO et al., 2010, 2011). Untersuchungen von zirkulierenden miRNA Expressionsmustern bei der DCM existieren bislang nicht.

2.5. Neue Therapieansätze

Es wird angenommen, dass durch Dysregulation bestimmter miRNAs gewisse pathologische Veränderungen entstehen können. Eine extern steuerbare Regulation bestimmter miRNAs bietet neue therapeutische Ansatzpunkte und Möglichkeiten. Ist die Expression bestimmter miRNAs bei einer Erkrankung erniedrigt, wäre eine Erhöhung dieser miRNAs von Vorteil. Ist eine bestimmte miRNA bei einer Erkrankung dagegen erhöht, könnte eine extern gesteuerte Erniedrigung ihrer Expression zur Besserung der pathologischen Folgen führen. Mehrere Studien evaluierten daher den Effekt der Applikation von synthetisch hergestellten miRNAs auf bestimmte pathologische Zustände am Herzen.

Wang et al. demonstrierten als erste Arbeitsgruppe, dass die Infusion von miR-9 *in vivo* zu einer reduzierten (zuvor induzierten) kardialen Hypertrophie und zu verbesserter kardialer Funktion führt. Die exogen zugeführte miRNA reguliert hierbei das Ziel-Protein der endogenen miR-9, Myocardin (WANG et al., 2010b). Derartige therapeutische Interventionen sind unspezifisch und erhöhen zusätzlich die miRNA Level anderer Gewebe. Die Folgen einer solchen unspezifischen Applikation sind bislang weitgehend unerforscht. Indem die Applikation mit Adenoviren assoziiert wird, kann die Freisetzung der exogenen miRNA gewebespezifisch erfolgen. Während miRNAs bislang noch nicht spezifisch in kardialen Gewebe freigesetzt wurden, gelang ein Versuch der Virus-assoziierten Freisetzung von RNA Interferenzen im kardialen Gewebe mit Verbesserung der kardialen Funktion bei Ratten mit Kardiomyopathien und Herzversagen

(FECHNER et al., 2008; SUCKAU et al., 2009; POLLER et al., 2010). RNA Interferenzen dienen unter anderem der zielgerechten Abschaltung von Genen in Eukaryoten, indem sie - ähnlich wie miRNAs - posttranskriptionell verschiedene mRNAs hemmen (FIRE et al., 1998).

Es existieren außerdem Ansätze, um die Konzentration von miRNAs, die während eines pathologischen Zustandes vermehrt exprimiert werden, zu reduzieren. Neben der Applikation sogenannter Antagomirs gelten auch miRNA Schwämme als vielversprechende therapeutische Ansätze. Antagomirs sind synthetisch hergestellte, an Cholesterol gebundene miRNA Gegenstücke, an die sich die gewünschte miRNA heftet und somit ihre Konzentration reduziert wird. miRNA Schwämme sind kleine RNA Stücke, die ebenfalls Bindungsstellen für die gewünschte miRNA besitzen und somit ihre Bindung an die eigentliche Ziel-mRNA vermindern. Durch die Infusion von miR-133 Antagomir und miR-133 Schwämmen konnte die endogene Wirkung von miR-133 gehemmt werden. Behandelte Mäuse zeigten folglich eine kardiale Hypertrophie. Mittels Adenovirus-assoziiierter Applikation wurde eine gezielte Freisetzung in Kardiomyozyten erreicht (CARE et al., 2007). Die erfolgreiche Hemmung von miR-21 mittels eines spezifischen Antagomirs resultierte in verminderter interstitieller Fibrose und verbesserter kardialer Funktion in Mausmodellen (THUM et al., 2008).

Diese Studien beweisen das hohe Potential von miRNAs als neue therapeutische Ansatzpunkte zur Behandlung verschiedener Kardiomyopathien. Im Gegensatz zu anderen Arzneimitteln, besitzen miRNAs die Eigenschaft, an mehrere mRNAs binden zu können. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer Applikation zusätzlich unerwünschte Effekte auftreten. Daher ist zunächst die detaillierte Erforschung der genetischen Ziele, Funktionen und die Verteilung der miRNAs in verschiedenen Geweben anzustreben.

III. PUBLIKATION

Steudemann et al. *BMC Veterinary Research* 2013, **9**:12
http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/12



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls

Carola Steudemann¹, Stefan Bauersachs², Karin Weber¹ and Gerhard Wess^{1*}

Abstract

Background: Dilated cardiomyopathy (DCM) is the most common heart disease in Doberman Pinschers. MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs playing important roles in gene regulation. Different miRNA expression patterns have been described for DCM in humans and might represent potential diagnostic markers. There are no studies investigating miRNA expression profiles in canine DCM. The aims of this study were to screen the miRNA expression profile of canine serum using miRNA microarray and to compare expression patterns of a group of Doberman Pinschers with DCM and healthy controls.

Results: Eight Doberman Pinschers were examined by echocardiography and 24-hour-ECG and classified as healthy (n = 4) or suffering from DCM (n = 4). Total RNA was extracted from serum and hybridized on a custom-designed 8x60k miRNA microarray (Agilent) containing probes for 1368 individual miRNAs. Although total RNA concentrations were very low in serum samples, 404 different miRNAs were detectable with sufficient signal intensity on miRNA microarray. 22 miRNAs were differentially expressed in the two groups ($p < 0.05$ and fold change (FC) > 1.5), but did not reach statistical significance after multiple testing correction (false discovery rate adjusted $p > 0.05$). Five miRNAs were selected for further analysis using quantitative Real-Time RT-PCR (qPCR) assays. No significant differences were found using specific miRNA qPCR assays ($p > 0.05$).

Conclusions: Numerous miRNAs can be detected in canine serum. Between healthy and DCM dogs, miRNA expression changes could be detected, but the results did not reach statistical significance most probably due to the small group size. miRNAs are potential new circulating biomarkers in veterinary medicine and should be investigated in larger patient groups and additional canine diseases.

Keywords: Dobermann Pinscher, Dilated cardiomyopathy, miRNA, Serum, Dog, Microarray

Background

Dilated cardiomyopathy (DCM) is the most common acquired heart disease in large- and giant-breed dogs. DCM in dogs is therefore an important cause of cardiac morbidity and death [1-3]. Doberman Pinschers are among the most frequently affected breeds. DCM in Doberman Pinschers is inherited and typically shows a unique disease progression with a late onset [1,4-8]. Most dogs with clinical signs of heart disease were diagnosed at an age of 5 to 10 years [9]. Doberman Pinschers at an age of 6 to 8 years showed a prevalence of 43.6%

and older dogs a prevalence of 44.1%. Even if disease manifests itself with an increasing age, younger Doberman Pinschers are also affected. The cumulative prevalence of DCM in Doberman Pinschers in Europe was demonstrated to be 58.2% [8].

The natural progression of DCM can be characterized by three stages [1,6,9-11]. Stage I is defined by a morphologically and electrically normal heart. There is no evidence of clinical signs of heart disease in this phase. None of the currently available diagnostic tests can identify this stage. In the second stage (also called "occult stage"), morphologic and/or electrical derangement is presented in the absence of clinical signs of cardiac disease. Dogs typically appear absolutely normal to their owners, despite evidence of abnormalities detectable by

* Correspondence: gwess@lmu.de

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Veterinärstrasse 13, Munich 80539, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Steudemann et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

cardiac examination. Abnormalities consist of left ventricular enlargement and occurrence of ventricular premature contractions (VPCs). Morphological and electrical abnormalities may coexist or be of predominantly one form at the time of occult stage [1,12-15]. The diagnosis of stage II consists of echocardiographic evaluation of left ventricular dimensions and function and 24-hour ambulatory electrocardiogram (Holter monitoring) evaluating evidence of ventricular arrhythmias. The DCM in Doberman Pinschers usually starts with VPCs, which can lead to sudden cardiac death in about one third of the dogs. Later morphological changes typical for DCM develop, which can be detected by echocardiography. Stage III, the overt stage, is characterized by the presence of clinical signs of heart failure [1,12-15]. For prognostic and therapeutic but also for breeding purposes, it is essential to diagnose DCM before clinical signs develop.

Board-certified cardiologists recommend yearly screening of Doberman Pinschers for DCM by echocardiography and Holter examination, starting at two years of age [4,8]. The combination of echocardiography and Holter monitoring are considered to be the gold standard for the diagnosis of DCM in Doberman Pinschers. But both diagnostic methods have several disadvantages, including high financial costs for the owners, the need for specialized equipment and veterinary training, therefore limited availability and high interobserver variability [16]. The use of circulating biomarkers in the diagnostic approach would offer an attractive alternative because of widespread availability, quantitative nature, potential cost efficiency and minimally invasive sample collection [16]. Therefore various neurohormones and myocardial enzymes as biomarkers of DCM were evaluated [16-20].

MicroRNAs (miRNAs) are short (18 – 25 nucleotide in length) non-coding RNAs which play important roles in post-transcriptional gene regulation. miRNAs regulate gene expression by binding to the 3'-untranslated region of their target mRNA and consequently attenuating protein translation. miRNAs are involved in multiple biological processes [21,22]. It is estimated that more than 60% of human genes are fine-tuned by miRNAs [23].

Multiple studies investigated the potential benefit of circulating miRNAs as noninvasive biomarkers and discovered a remarkable stability of miRNAs in blood [24-26]. The levels of miRNAs in serum are stable, reproducible, and consistent among individuals of the same species [26]. Endogenous circulating miRNAs are stably expressed in human serum, whereas synthetic miRNAs are immediately degraded [24]. However, the exact mechanism how miRNAs enter into the serum and how they are protected from enzymatic degradation is still unknown [27].

A specific circulating miRNA expression pattern has been described for various pathological conditions. It is

presumed that changes in the circulating miRNA expression pattern represent fingerprints for various diseases [28-30] and may even precede detectable changes of standard diagnostic tools [28,31]. Several studies in humans reported circulating miRNAs to be promising biomarkers for cancer [24,30,32,33] and liver injury [28,34].

Various studies evaluated differences of miRNA expression in heart diseases. Several miRNAs were found to be highly enriched in the heart [35-37]. miRNAs were shown to be involved in cardiac development, myocyte growth and arrhythmias following myocardial ischemia [38-43]. Experiments in mice have shown that gain or loss of function of individual miRNAs may elicit different forms of heart disease. Cardiac overexpression of miR-195 in transgenic mice initially induced pathological cardiac growth with disorganization of cardiomyocytes and progressed to an echocardiographically confirmed dilated phenotype at the age of six months that finally resulted in heart failure [44]. Inhibition of miRNA biogenesis revealed DCM, premature lethargy and heart failure in mice [45,46]. Liu et al. demonstrated the essential role of miR-133a in the cardiomyocyte proliferation: miR-133a-1 and miR-133a-2 double-mutant mice developed early large septal defects that led to perinatal death, whereas mice that survived to adulthood succumbed to DCM and heart failure. About 50% of surviving mice died from sudden death [47]. Findings of these studies support the assumption that specific miRNAs play an essential role in the control of cardiac growth and remodeling leading to a dilated phenotype of the heart. In 2007, Ikeda et al. detected different miRNA expression patterns in human heart samples from control patients and patients with DCM, aortic stenosis and ischemic cardiomyopathy (ICM). Eight miRNAs were differentially expressed in ICM and DCM which indicates that each form of heart disease is characterized by a specific miRNA expression profile. Among other miRNAs, let-7c, miR-21, miR-92 and miR-101 were deregulated in DCM diseased tissue in contrast to healthy controls [48]. Later experiments demonstrated miRNA expression differences in heart failure either caused by idiopathic or ischemic DCM and confirmed the aberrant expression of miR-92 in DCM [49]. Levels of miR-208, miR-208b and miR-499 were higher in human endomyocardial samples of DCM patients than in controls. Deregulation of individual miRNA expression was associated with a poor clinical outcome and therefore represents a potential prognostic marker of human DCM [37,50]. Satoh et al. found a significant difference in the expression of miR-21 in DCM diseased tissue as well [50]. An increased risk of DCM was also found in people with genetic polymorphisms in the pre-stages of miR-196a and miR-499 [51]. In humans with chronic heart failure caused by nonischemic DCM, miR-142-3p was found to be upregulated in peripheral blood cells [52].

However, circulating miRNAs are only emerging as potential diagnostic and prognostic biomarkers in cardiovascular disease. Cardiac hypertrophy, myocardial infarction and heart failure were associated with different expression profiles of circulating miRNA [25,31,53-58]. Several studies have also reported the potential of circulating miRNAs as diagnostic, prognostic and therapeutic marker for cardiovascular pathologies like coronary artery disease, stroke, diabetes mellitus or hypertension [55]. With the exception of one study in humans investigating miRNA expression in peripheral blood cells in chronic heart failure caused by different cardiomyopathies (including DCM [52]), studies about circulating miRNA expression patterns in human DCM do not exist to date.

Because of the increasing interest in canine genetics and the benefits of using the domestic dog as a model for human hereditary diseases, investigations on canine miRNAs were initiated [59-64]. In 2007, a search of genetic databases revealed significant conservation of miRNA genes between the domestic dog and the human. Expression levels of seven miRNAs were analyzed in several canine tissues. This was the first study that successfully used quantitative Real-Time RT-PCR (qPCR) assays originally designed for human miRNA detection and showed full conservation of mature sequences of canine and human miRNAs [61]. In 2008, Zhou et al. identified 357 miRNA candidates from the dog genome, 300 of which were orthologous to already characterized human miRNAs [60]. Deregulation of miRNA expression patterns has been reported in various canine neoplastic tissues and muscular dystrophy [59,62-64].

To our knowledge this is the first study about circulating miRNAs in canine DCM. The aim of this study was to investigate whether Doberman Pinschers with DCM and healthy controls display different serum miRNA expression patterns in order to evaluate a possible use of miRNAs as biomarkers in dogs.

Results

Patient characteristics

Eight Doberman Pinschers with a mean age of 8.6 years were included in the study and assigned to a DCM ($n = 4$) and a control group ($n = 4$). Analysis using the Mann-Whitney test revealed statistically significant differences between the two groups for the parameters 'ventricular premature contractions' (VPCs) and 'left ventricular end-diastolic volume' (LVEDV), 'left ventricular end-systolic volume' (LVESV, $p = 0.0143$) and 'ejection fraction' (EF, $p = 0.0286$; Table 1).

Sample characteristics

None of the dogs had evidence of renal disease with urea and creatinine values in reference ranges. Serum samples

were stored at -80°C for 240 ± 144 days (mean $\pm$ SD) prior to analysis. Circulating cardiac troponin I (cTnI) levels showed significant difference between the two groups. Total RNA amounts of the serum samples used did not differ between the two groups (for further baseline characteristics see Table 1).

miRNA microarray

By employing a highly sensitive and custom-designed 8x60k miRNA microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), miRNA expression profiles of canine serum were determined. After subtracting background signals, a total of 404 individual miRNAs could be detected.

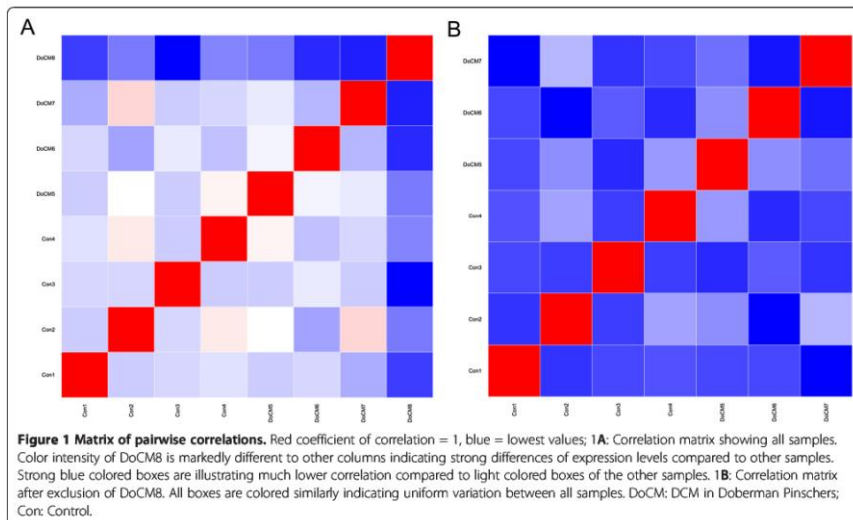
One sample of the DCM group was removed from further miRNA microarray analysis because of inconsistency of expression levels compared to other samples (Figures 1 and 2).

Expression of 22 miRNAs was different between the two groups ($p < 0.05$ and fold change (FC) > 1.5 , moderated t -test, Software "LIMMA"). Expression differences of all miRNAs were relatively small and did not exceed a 2.3-fold change. miR-142-3p showed a 2.18-fold change ($p: 0.0042$), miR-144* a 2.20-fold change ($p: 0.0016$), miR-21 a 1.67-fold change ($p: 0.0089$) and let-7c was negatively 1.53-fold changed ($p: 0.0340$). Adjusted p -values of all 22 miRNAs after multiple testing correction did not reach statistical significance (false discovery rate adjusted $p > 0.05$; Table 2). miR-92a was different between the groups but marginally missed the inclusion criteria for the definition of differential expression (cf. miR-92a: $p: 0.0359$; FC: - 1.45; mmu-miR-92a: $p: 0.0422$; FC: - 1.41). However, miR-92a was considered for further analysis (see qPCR). Hierarchical cluster analysis

Table 1 Baseline and clinical characteristics of study population in the control and DCM diseased group

	Control ($n = 4$)	DCM ($n = 4$)
Age (years)	9.3 ± 2.1	7.9 ± 3.3
Body weight (kg)	39.3 ± 8.9	36.6 ± 4.5
Gender (male/female)	2/2	3/1
VPCs/24 hours	12.75 ± 15.39	$2748 \pm 4842^*$
LVEDV (ml/m^2)	67.68 ± 11.60	$120.30 \pm 3.85^*$
LVESV (ml/m^2)	33.63 ± 7.45	$72.50 \pm 2.85^*$
EF (%)	49.83 ± 6.37	$39.67 \pm 3.68^*$
Urea (mmol/l)	6.00 ± 0.68	4.80 ± 1.22
Creatinine ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	62.25 ± 6.40	65.00 ± 6.58
cTnI (ng/ml)	≤ 0.20	$0.36 \pm 0.04^*$
total RNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	3.63 ± 0.33	4.23 ± 1.23

Age, body weight, VPCs, LVEDV, LVESV, EF, urea, creatinine, cTnI and total RNA values in mean $\pm$ SD. cTnI ≤ 0.2 representing values under the detectable limit. DCM: Dilated cardiomyopathy; VPCs/24 hours: ventricular premature complexes in 24 hours; LVEDV: left ventricular end-diastolic volume; LVESV: left ventricular end-systolic volume; EF: left ventricular ejection fraction; cTnI: cardiac troponin I; RNA: Ribonucleic acid. * $p < 0.05$ vs control.



(HCL support tree) is visualizing differences in miRNA patterns between healthy and diseased dogs. This analysis revealed a clear separation of healthy and diseased samples that was stable with 200 iterations as well as relatively high variation within both groups (Figure 3).

qPCR

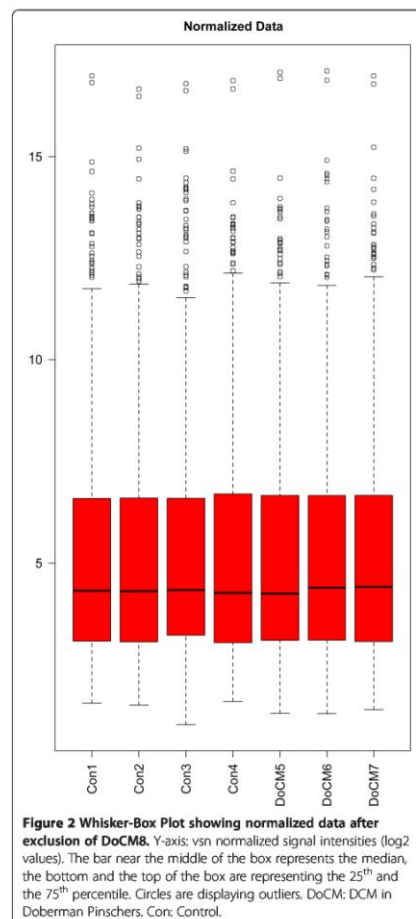
For further analysis, we selected five miRNAs which have been earlier mentioned in literature as being involved in cardiovascular pathology and which also showed a trend for differential expression in the microarray (miR-142-3p, miR-144*, miR-21, let-7c and miR-92a). Five target miRNAs and two endogenous controls were measured by qPCR in the same serum samples used previously for the microarray. The endogenous controls *hs_RNU6B_2* and *hs_RNU1A_1* did not show a difference in average $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct) between the groups (*hs_RNU6B_2*: 27.04 ± 0.62 vs 27.3 ± 0.75 ; *hs_RNU1A_1*: 15.72 ± 0.57 vs 15.27 ± 0.94 ; mean $\pm$ SD). miR-142-3p and miR-144* showed a trend of upregulation in the diseased group, whereas let-7c was slightly downregulated in DCM dogs. Differences between the groups remained very small. Results showed a high inter-individual variance of expression. While the miRNA microarray showed small differences in expression of miR-21 and miR-92a, qPCR revealed almost no differences of these miRNAs between the two groups (Figure 4). With p-values > 0.05 for all tested target assays, qPCR

revealed no statistically significant difference between diseased and healthy dogs (mmu-miR-142-3p: $p = 0.771$; mmu-miR-144*: $p = 0.421$; cfa-let-7c: $p = 0.634$; cfa-miR-21: $p = 0.940$; cfa-miR-92a: $p = 0.873$).

Discussion

To date, the role of miRNAs in human DCM has only been studied using cardiac tissue samples [44,48,50,65,66]. These samples are difficult to obtain and studies on circulating serum miRNAs present a much less invasive approach, although the origin and circumstances of miRNA release into the circulation are currently unknown. Myocardium specific miRNAs have been found to be significantly increased in the serum as soon as one hour after myocardial infarction in humans and mice [31,67]. The spontaneous disease model of canine DCM in the Doberman Pinschers may represent a useful target for translational research. We limited the sample volume to approximately 2 ml of whole blood to complete both microarray and qPCR analysis, which can safely be acquired even from small veterinary patients without adverse effects.

According to manufacturer's protocols, most microarray systems require a minimal amount of 100 ng total RNA of each sample to be examined. We used in average 117 ng (84–162 ng) total RNA per sample and more than 400 miRNAs showed a sufficient intensity for evaluation. However, higher RNA concentrations may



have resulted in more miRNAs to be detected. A standard normalization for miRNA expression analysis of serum samples using microarrays has not been established so far, but normalization of serum volume is reported to be the best method to determine quantity of miRNAs in blood using qPCR [67]. Using the same amount of total RNA in each sample could have produced less interindividual variation in microarray and

Table 2 miRNAs with different expression in the miRNA microarray analysis

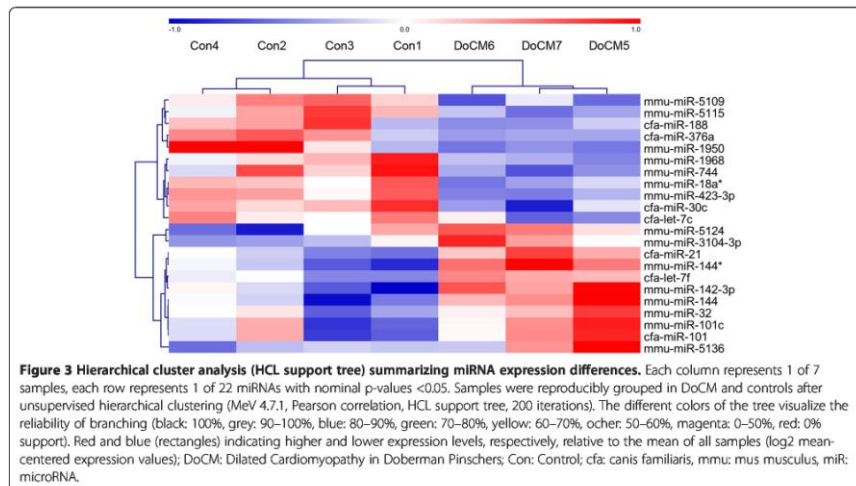
miRNA	FC	p	p adjusted
mmu-miR-1950	-2.14	0.0225	0.6331
mu-miR-744	-1.87	0.0117	0.5949
cfa-miR-30c	-1.81	0.0141	0.5856
mmu-miR-5109	-1.75	0.0185	0.5903
mmu-miR-423-3p	-1.74	0.0043	0.5558
mmu-miR-5115	-1.66	0.0110	0.5856
cfa-miR-376a	-1.62	0.0141	0.5968
mmu-miR-1968	-1.58	0.0251	0.6331
cfa-miR-188	-1.57	0.0365	0.6405
mmu-miR-18a*	-1.56	0.0159	0.6093
cfa-let-7c	-1.53	0.0340	0.6331
mmu-miR-32	1.50	0.0476	0.6468
cfa-let-7f	1.53	0.0130	0.5968
mmu-miR-3104-3p	1.59	0.0226	0.6331
mmu-miR-5124	1.65	0.0468	0.6399
cfa-miR-21	1.67	0.0089	0.5856
cfa-miR-101	1.68	0.0402	0.6331
mmu-miR-101c	1.70	0.0394	0.6331
mmu-miR-5136	1.82	0.0409	0.6331
mmu-miR-144	2.02	0.0067	0.5640
mmu-miR-142-3p	2.18	0.0042	0.5640
mmu-miR-144*	2.20	0.0016	0.5476

p < 0.05, FC > 1.5; p adjusted with FDR. FC: fold change, FDR: false discovery rate, cfa: canis familiaris, mmu: mus musculus, miR: microRNA.

PCR analysis and should be investigated in further experiments.

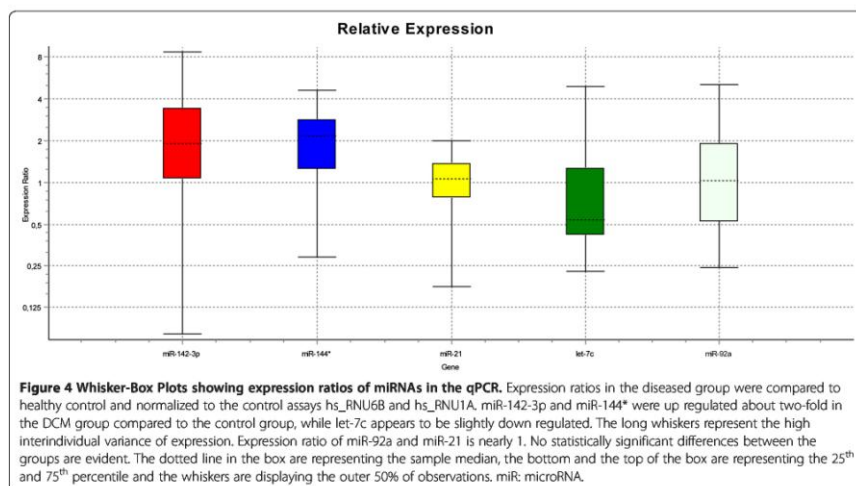
We excluded one sample of the diseased group from further analysis of microarray data since miRNA expression levels were extremely different to others even after normalization. This sample was taken from a young dog and had the longest storage time. Total RNA yield from this sample was very low compared to the other samples, whereas signals of miRNAs were intensified in this sample. Patient age is described not to influence miRNA levels in plasma [25] and miRNAs are claimed to be robust against long freezing time [24,68]. Reasons for the difference of this sample remain unexplained.

Since the miRNA database contains more murine and human miRNAs than canine sequences we chose to use both canine and murine targets for our microarray. Sequences have been found to be highly conserved among species with many mature miRNA sequences displaying 100% homology [36,61,63]. The microarray results confirm that canine miRNAs hybridize with multiple murine targets, which facilitates studies using veterinary samples. The phylogenetic relationship of mouse, dog and human is a matter of debate and not unequivocally determined



[69,70]. Homology in coding genes might not reflect the situation of noncoding DNA, some miRNA clusters have been found to be unique to primates. In a pilot study we tested mouse serum as positive controls for qPCR detection of several miRNAs vs canine serum and detected the same PCR products in both samples using murine assays.

Notably for miRNA studies of cardiac tissue, more information is available for murine samples, including studies on knockout mice. Additionally, a recent analysis of the heart transcriptome shows a higher similarity between dog and mouse than between dog and human [71]. As stated in the manuscript it cannot be ruled out that some murine



probes on the array do not match the canine miRNAs, but this would also be the case for human probes. Whether human or murine miRNAs as a whole are more closely related to dog miRNAs and which one would be the 'better' model so far remains an open question.

In our study, the differences in miRNA expression between the two groups were not large and consistent enough to reach statistical significance when the results were adjusted for multiple testing. Although single miRNAs were not statistically significant between the two groups, hierarchical cluster analysis of several miRNAs showed a clear separation of diseased and control samples and enabled a reliable differentiation between healthy and diseased dogs. Therefore, a combined expression analysis of several miRNAs may be a new diagnostic tool for the detection of DCM in Doberman Pinschers and should be further investigated in future studies. This study with its comparatively small patient cohort should be considered as a pilot study requiring confirmation and validation of results in larger sample groups.

A microarray study comparing miRNA expression in heart tissue samples from several human heart diseases revealed let-7c to be significantly upregulated and miR-101 to be significantly downregulated in human DCM, although the changes were less than two-fold [48]. In contrast, our study detected a downregulation of let-7c and an upregulation of miR-101, but the changes were quite subtle.

The let-7 family has been shown to be one of the most abundant miRNAs in murine heart tissue [46]. Recently, a decrease of myocardial let-7i was associated with severity of left ventricular dysfunction and poor clinical outcome in human DCM patients and therefore supposed to be a potential prognostic marker [50]. Let-7i was reported to target for toll-like receptor 4 (TLR4) *in vitro*, a critical transcription factor in the myocardium of DCM in humans [72,73]. In the presented study of canine DCM of Doberman Pinschers, expression changes of let-7i were not evident, but it is not known to date whether TLR4 is a critical transcription factor in canine DCM.

miR-101 has been addressed in several studies as a potential tumor suppressor and inhibitor of autophagy and is obviously expressed in many different tissues [74,75]. A specific regulating effect on the cardiovascular system has not been detected to date.

miR-21 is universally expressed in various organs like spleen, small intestine, colon and the heart [36]. Several studies demonstrated the overexpression of miR-21 in tumor tissues [76,77]. It is also highly expressed in vascular smooth muscle cells, endothelial cells, cardiomyocytes and cardiac fibroblasts [66,78-81]. Deregulated expression of miR-21 has been described for proliferative vascular disease, cardiac hypertrophy, heart failure and

ischemic heart disease [44,78,80,82-85]. Myocardial degeneration with cardiac fibrosis and myointimal hyperplasia of the coronary vessels are common histologic findings in the DCM of Doberman Pinschers [6,10,86,87]. miR-21 is upregulated during cardiac remodeling in response to cardiac stress and leads to fibroblast proliferation and fibrosis in humans [66,88]. In the Doberman Pinschers suffering from DCM, miR-21 appeared to be slightly upregulated in the microarray, but the trend could not be confirmed using qPCR assays. In human DCM heart tissue samples, one study group found a subtle and non-significant downregulation of miR-21 [48], while another study claimed miR-21 to be significantly upregulated about two-fold compared to healthy controls [50]. Recently, experimental studies demonstrated an increase of miR-21 expression in right ventricular cells induced by drug therapy. Due to the increase of miR-21, right ventricular function during right heart failure improved as well [89].

In miRNA microarray, miR-92a was slightly downregulated in DCM diseased Doberman Pinschers, but this could not be confirmed using the qPCR assay. As mentioned above, a related miRNA, miR-92, was shown to be downregulated in human DCM tissues [48,49]. Overexpression of miR-92a inhibits angiogenesis in ischemic myocardial tissues in mice and is involved in the control of cardiomyocyte survival. Experiments of external inhibition of miR-92a led to improved left ventricular function [90]. Since all of the diseased dogs received positive inotropic therapy (Pimobendan), this may influence miR-92a expression. So far, very little is known about the effects of cardiovascular therapy on miRNA expression.

For miR-142-3p and miR-144*, we found a trend for upregulation in DCM diseased dogs both in the microarrays and the qPCR results, although interindividual variation was very high. miR-144 was also upregulated in the microarray analysis. miR-144 and miR-144* are the two strands of the double stranded precursor miRNA (miR-144). miR-144 is known to be expressed in a cluster with miR-451. The miR-144/451 promoter is activated by GATA-4, a critical transcription factor in the heart. Both partners of the cluster are supposed to confer protection against stimulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death and may therefore represent possible therapeutic agents for the treatment of ischemic heart disease in humans [91]. The left ventricular dilation, which is a characteristic sign of DCM, leads to myocardial stress. The upregulation of miR-144 might be a stress response of affected myocytes and an attempt to protect the cells against this stimulus. Recruitment of a larger canine patient cohort may allow further validation of these findings.

In accordance with our findings, miR-142-3p has been shown previously to be upregulated in human patients

with chronic heart failure caused by nonischemic DCM [52]. This miRNA is one of five negatively regulating cardiac hypertrophy in recent experimental models. Therefore, miR-142-3p is currently discussed as a part of potential therapeutic targets for the treatment of cardiac hypertrophy [92].

The mechanism and exact circumstances of miRNA release into the serum are not fully understood to date [27]. Protected by protein-bound complexes or incorporated into lipid carriers, miRNAs are resistant to RNases in circulation. It is estimated that about 80% of circulating miRNAs are secreted in protein complexes. The other part of circulating miRNAs is released in membrane-bound vesicles (apoptotic bodies, microvesicles, exosomes) [93-97]. It is suspected that the release of miRNAs into the circulation occurs selectively and the existence of a specific packaging mechanism is therefore suggested. For example, in a metastatic gastric cancer cell line, members of the let-7 family are selectively released into the circulation [98]. Similarly, different human cell lines secrete certain miRNAs upon serum deprivation as part of a stress response [93]. The correlation between circulating and tissue miRNA expressions is still controversial. Diseased cells might not be the only origin of changes in circulating miRNAs. It is also possible that currently unknown signals, e.g. stress signals, are sent from the diseased tissue to other organs in the body and cause a specific release of miRNAs into the circulation. Several experimental studies have suggested that circulating miRNAs can be transferred to target cells and regulate gene expression [99,100]. Circulating miRNA expression patterns might therefore differ from expression patterns extracted from the diseased organ itself. This could explain the discrepancies of circulating miRNA expression patterns found in this study to cellular miRNA expression patterns found in other studies.

All dogs in the DCM group received a background therapy consisting of ACE-Inhibitors and Pimobendan and either Sotalol or Amiodarone as antiarrhythmic therapy. It is possible that medication did not only improve cardiac abnormalities but also influenced miRNA expression changes. The elevated cTnI levels of diseased dogs in this study reflect ongoing myocardial injury. Studies comparing circulating miRNA expression in different disease stages of DCM are needed to verify temporal changes in the course of this disease. No studies are published about a possible influence of the drugs used to treat the dogs in this study on the miRNA expression. For the purpose of this study only dogs with unequivocal echocardiographic in addition to unequivocal electrocardiographic changes were selected. Therefore, only patients in advanced disease stages were selected and it would have been unethical not to treat those dogs. All dogs received the same background

therapy (Pimobendan and ACE-inhibitors), but antiarrhythmic therapy was individualized [15,101]. Antiarrhythmic therapy was adjusted according to the patient's individual electrocardiographic changes and was therefore not completely homogenous. In some cases, antiarrhythmic therapy was changed in later visits (after serum sampling) because of inadequate response to the administered medication (change from Sotalol to Amiodarone, combination of Amiodarone and Mexiletin or combination of Sotalol and Mexiletin).

Conclusions

In conclusion, this study demonstrates that miRNA expression profiling is technically feasible in a clinical setting, revealing its potential as a possible new diagnostic approach in veterinary medicine. Standardized protocols for normalization and larger group sizes for different diseases are needed to confirm whether circulating miRNAs may serve as biomarkers in dogs in the future and whether canine disease models display changes similar to human heart diseases.

Methods

Ethic statement

The dogs in this study were examined during preventive diagnostic procedures with the written consent of their owners (to participate in a study in which remaining blood samples not used for necessary diagnostic procedures are stored and used for genetic, miRNA and other diagnostic research procedures). All local regulations (Germany) were strictly observed. The study was approved by the University of Munich Committee on Research Ethics. There is no permit number as this study is not based on an invasive animal experiment. The data were obtained during routine diagnostic procedures. As the data are from client-owned dogs that underwent normal veterinary exams, there was no "animal experiment" according to the legal definitions in Germany. Nonetheless, the study was reviewed and approved by the local ethics review boards.

Study population

Eight purebred Doberman Pinschers were retrospectively selected from a large study cohort of the Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU Munich) with a longitudinal study design starting in 2004. Each examination included a questionnaire completed by the owner, recording of body weight, physical examination, short-time electrocardiogram (ECG), Holter monitoring and echocardiography. Echocardiography included M-Mode and Simpson's method of disc measurements as well as color and spectral Doppler measurements. Venous blood was collected from each patient for screening of serum parameters and the samples were stored for further analysis with the owner's consent. We included

only purebred Doberman Pinschers without evidence of systemic disease. Exclusion criteria were evidence of concomitant congenital heart diseases or mitral valvular disease in echocardiography. We retrospectively chose eight dogs which met selection criteria of groups as defined below.

ECG

Dogs were positioned in right lateral recumbency. ECG was performed according to standard technique with a twelve channel ECG machine (Schiller Cardiovit AT-10, SCHILLER Medizintechnik GmbH, Germany). Electrical activity was recorded for about 30 seconds and printed for evaluation of any electrical abnormalities. A concurrent ECG was recorded during echocardiography without getting printed.

Echocardiography

Echocardiography was performed without sedation in right and following left lateral positions. Examinations were performed with a high frame rate ultrasound system with 2.0/4.3 MHz probes and simultaneous ECG recordings (Vivid 7 dimension, General Electric Medical System, Waukesha, WI). Simpson's method of disc measurements were recorded in right parasternal long-axis and left apical four chamber views. All valves were examined by color Doppler technique. Spectral Doppler was used for velocity measurement over the aortic and pulmonic valves and had to reveal no evidence of abnormalities.

Holter examinations

Holter monitoring was performed following echocardiography. The electrical activity was recorded for 24 hours in the normal environment of the dogs without clinical habitation. Monitor was removed after 24 hours and commercially available Holter analysis systems were used for analysis of the digitally recorded ECGs (Custotera, Arcon Systems GmbH, Starnberg, Germany; Amedtech ECGpro Holter software, EP 810 digital recorder, Medizintechnik Aue GmbH, Aue, Germany). Manual adjustments and verification of accuracy of systemically detected arrhythmias were performed by veterinarians with experience in Holter analysis. Total numbers of VPCs were tabulated.

Blood preparation

Blood (5 ml) was drawn from jugular vein of each patient and allowed to clot at room temperature for at least 20 minutes. The sample was centrifuged at 600 g RCF for five minutes at room temperature and the serum was transferred to 0.5 ml polypropylene tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and stored at - 80°C until RNA isolation.

Four dogs each were grouped into two different groups according to the results of the electrocardiographic and echocardiographic examination:

- **Control group:** Dogs in this group had an age of seven years or older and no clinical signs of systemic or cardiac disease. Renal parameters had to be in the reference range (Urea: 3.3 – 8.3 mmol/l, Creatinine: 31.8 – 117 µmol/l) and cTnI levels had to be ≤ 0.2 ng/ml. There were no electrical abnormalities in the ECG: all amplitudes, duration of PQ-interval and mean electrical axis were in normal ranges, dogs had < 50 VPCs in the Holter examination. Echocardiographic measurements were considered to be normal. This includes no or only trivial insufficiencies of the valves. Simpson's method of disc was used for calculation of the left ventricular end-diastolic (LVEDV) and end-systolic (LVESV) volume normalized to the body surface area (BSA). $LVEDV/BSA \leq 100 \text{ ml/m}^2$ and $LVESV/BSA \leq 55 \text{ ml/m}^2$ were considered as normal [102]. The ratio of the left atrium to the aorta (LA/Ao) was 1.5 or less. We are in frequent communication by phone with all owners. We perform yearly screenings to monitor healthy dogs and to detect even early changes. All healthy dogs are alive and healthy at the time of reviewing this paper. We already performed follow-up evaluations in 2012 and could not detect any evidence of DCM in these dogs.
- **DCM group (occult stage):** Dogs in this group had no clinical signs of systemic disease. Owners did not observe any events of syncope or exercise intolerance. Clinical signs of cardiovascular abnormalities (pale mucosal color, weak pulse, pulse deficit or arrhythmic pulse, heart murmur) were acceptable. Renal parameters had to be in reference range and circulating cTnI levels were elevated (> 0.2 ng/ml). Electrical and morphological abnormalities existed in the current visit or in one of the earlier visits (partly normal under therapy in the current visit): Dogs had > 100 VPCs in the Holter examination and echocardiographic changes including $LVEDV/BSA > 100 \text{ ml/m}^2$ and $LVESV/BSA > 55 \text{ ml/m}^2$ [102]. LA/Ao had to be 1.5 or less. We performed frequent control examinations every 1 – 6 months to monitor development of disease. After the diagnosis of DCM, we performed 4 – 6 follow-up examinations of dogs in this group. The time course of electrocardiographic and echocardiographic changes is listed in Table 3. Due to the severe existing changes, all dogs received therapy at the time of serum sampling. Dosing of drugs was standardized. Further characteristics of diseased dogs are listed in Table 4.

Table 3 Time course of electrocardiographic and echocardiographic changes of dogs with DCM starting from time of diagnosis

Sample name	Number of visits	VPCs/24 hours	Maximal velocity of VPCs (bpm)	LVEDV (ml/m ²)	LVESV (ml/m ²)	EF (%)
DoCM 5	1 st visit	254	240	119.20	65.80	44.67
	2 nd visit	107	203	94.60	56.70	40.08
	3 rd visit*	161	200	116.80	73.10	37.41
	4 th visit	199	214	110.90	62.40	43.72
DoCM 6	1 st visit	13641	300	105.70	63.40	39.97
	2 nd visit	10355	319	124.20	79.40	36.06
	3 rd visit*	10005	300	122.50	68.40	44.21
	4 th visit	14	196	112.30	77.60	30.93
	5 th visit	22	230	132.50	78.20	41.01
	6 th visit	24	300	142.50	94.50	33.73
DoCM 7	1 st visit	1940	230	112.70	72.90	35.31
	2 nd visit	2478	275	121.70	82.40	32.31
	3 rd visit	17	273	116.40	79.90	31.40
	4 th visit*	616	180	117.30	75.00	36.04
	5 th visit	3010	250	151.20	108.50	28.24
	6 th visit	135	300	143.70	123.30	14.19
DoCM 8	1 st visit	302	300	116.00	72.30	37.68
	2 nd visit	9	265	109.90	59.80	45.62
	3 rd visit*	209	202	124.60	73.50	41.01
	4 th visit	7295	300	99.00	50.50	48.93

DCM: Dilated cardiomyopathy, DoCM: Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinschers, VPCs: Ventricular premature complexes, VPCs/24 hours: ventricular premature complexes in 24 hours; bpm: beats per minute; LVEDV: left ventricular end-diastolic volume; LVESV: left ventricular end-systolic volume; EF: left ventricular ejection fraction, *: visit of serum sampling for microRNA analysis.

RNA extraction

Total RNA was isolated using the miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) according to the supplementary protocol "Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit". Briefly, 400 µl serum were mixed with 2 ml of QIAzol Lysis Reagent and 400 µl Chloroform. The sample was centrifuged and the upper aqueous phase was transferred to a collection tube and mixed with 975 µl 100% ethanol. The mixture was applied to RNeasy Mini spin columns and purified according to the protocol. Total RNA was eluted using 50 µl of RNase free water. RNA concentrations were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Samples were stored at -80°C.

miRNA microarray

The miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and hybridization Kit (Agilent Technologies) was used according to the manufacturer's recommended protocol. The Agilent microRNA Spike-In Kit was used for in-process control to measure labeling and hybridization efficiency. The RNA samples were dried in a Vacuum Contractor (Bachofen Plumbing Heating &

Air Conditioning, Salina, KA, USA) for one hour. All samples were dephosphorylated by incubation with calf intestinal phosphatase at 37°C in a heat block for 30 minutes and incubated in 100% DMSO at 100°C for seven minutes for denaturation. All samples were labeled with pCp-Cy3 using T4 ligase by incubation at 16°C for two hours. Micro Bio-Spin 6 chromatography columns (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) were used for purification of the labeled RNA. After drying the samples completely, samples were prepared for hybridization by adding nuclease-free water, Hyb Spike-In solution, 10X GE Blocking Agent and 2X Hi-RPM Hybridization Buffer. Samples were hybridized to a custom-designed 8x60k Agilent microarray. The custom microarray covered all murine and canine miRNAs from miRBASE version 17.0 [103] and contained probes for 1386 individual miRNAs with each miRNA covered by 40 different features. Hybridizations were performed in hybridization chambers (Agilent) for 20 hours at 55°C and the slides were washed as described in the protocol. Arrays were scanned at a resolution of 2 µm using an Agilent G2505C Scanner. The microarray data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus

Table 4 Further characteristics of DCM diseased dogs

Sample name	Age of diagnosis of DCM (years)	Age at the date of serum sampling (years)	Time of treatment prior to serum sampling (days)	Drug therapy administered until the time of serum sampling	Outcome	Age at the time of death (years)
DoCM 5	11.2	11.5	140	Pimobendan, ACE Inhibitor, Sotalol	Other systemic disease (gastric volvulus)	11.9
DoCM 6	7.5	7.8	119	Pimobendan, ACE Inhibitor, Amiodarone	Sudden cardiac death	8.6
DoCM 7	7.4	8.5	397	Pimobendan, ACE Inhibitor, Sotalol	Euthanasia because of non-responsive congestive heart failure	9.2
DoCM 8	3.0	3.6	321	Pimobendan, ACE Inhibitor, Amiodarone*	Euthanasia because of non-responsive congestive heart failure	4.3

DoCM: Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. ACE: Angiotensin Converting Enzyme. *: The medication was not consistently administered because of incomppliance of the owner.

(GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO Series accession number GSE36976.

Microarray data analysis

Feature Extraction Software Version 10.7.3.1. was used for grid alignment and data extraction. Signal intensities for each feature were scanned and calculated by subtracting the background. The flag "is well above background" (WABG) produced by the Feature Extraction Software was used to filter signals above background noise. Features had to contain a minimum of two WABG flags "1" in at least one of the experimental groups (detectable in at least two samples of the control or the DCM group) to be included in the further analysis. Mean signal intensities were calculated for each detectable miRNA probe and subsequently normalized between samples using the BioConductor package "vsn" [104]. For quality control, normalized data were analyzed with a heatmap based on pair-wise distances (BioConductor package *genefilter*). Software "LIMMA" (Bioconductor) [105] was used for significance analysis (function "decideTests") and assessment of miRNA expression changes.

Quantitative real-time RT-PCR (qPCR)

After total RNA purification, reverse transcription was performed using the miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. The miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) was used for qPCR according to the manufacturer's protocol. The miScript Primer Assays *cf_miR-92a_1*, *mm_miR-142-3p_1*, *cf_let-7c_1*, *mm_miR-144*_1* and *cf_miR-21_1* were used as target miRNAs. *hs_RNU6B_2* and *hs_RNU1A_1* were used as endogenous control assays. All samples were run as duplicates. To account for spurious PCR amplification of contaminating genomic DNA, a control containing total RNA without reverse transcription was included. As negative controls, the

amplification mixture of each assay was run without adding the reverse transcribed RNA. Relative quantification was carried out using the $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct) method with *hs_RNU6B_2* and *hs_RNU1A_1* as endogenous controls. The TaqMan 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) was used for qPCR.

Statistical analysis

Study population

The software GraphPad Prism version 5.04 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for statistical analysis of the cohort. Mann-Whitney one-way test was used to calculate differences for all parameters in Table 1.

miRNA microarray

A "moderated *t*-test" (Software "LIMMA") was used for statistical analysis of the mean miRNA expression differences in the miRNA microarray. Multiple testing correction was performed using the parameter "FDR" (false discovery rate) in the function "decideTests" for adjustment of p-values. A p-value < 0.05 was considered to be statistically significant. FC was calculated (Software "LIMMA") and included into the assessment of expression ratios (FC at least 1.5-fold was considered to be significant). Software program Multi Experiment Viewer (MeV v.4.7.1) was used for hierarchical clustering of 22 different miRNAs using HCL support trees, Pearson correlation and 200 iterations.

qPCR

Target assays were normalized to internal controls *hs_RNU6B_2* and *hs_RNU1A_1* which had been found to be suitable as controls in dog serum in a preliminary test. The software "REST 2009" was used for analysis of relative expression in PCR assays [106,107]. Mean values

of twice prepared approaches were used. A p-value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Abbreviations

BSA: Body surface area; Ct: Threshold cycle; cTnI: Cardiac Troponin I; DCM: Dilated cardiomyopathy; ECG: Electrocardiogram; EF: Ejection fraction; FC: Fold change; FDR: False discovery rate; Holter: 24-hour ambulatory electrocardiogram; ICM: Ischemic cardiomyopathy; LA/Ao: Ratio of the left atrium to the aorta; LVEDV: Left ventricular end-diastolic volume; LVESV: Left ventricular end-systolic volume; miRNA: MicroRNA; qPCR: Real-Time RT-PCR; VPC(s): Ventricular premature contraction(s); WABG: Well above background.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CS, KW and GW designed the study. GW carried out and CS participated in all patient examinations, classified groups and collected material. CS and KW carried out all laboratory procedures. SB and KW designed the miRNA microarray. SB participated in the microarray procedure, analyzed data and performed statistical analysis. CS drafted the manuscript. KW, GW and SB helped to enhance the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Carola Steuermann (CS), DVM, Clinic of Small Animal, LMU University of Munich
Dr. rer. nat. Stefan Bauersachs (SB), team leader, Functional Genomics of Reproduction, Genomics Unit, Laboratory of Functional Genome Analysis, Gene Center, LMU University of Munich
Dr. med. vet. Karin Weber (KW), DVM, specialist for veterinary physiology, head of laboratory diagnostics and molecular biology, Clinic of Small Animal, LMU University of Munich
PD, Dr. med. vet., Dr. vet. med. habil. Gerhard Wess (GW), DVM, Dipl. ACVIM (Cardiology), Dipl. ECVIM-CA (Cardiology and Internal Medicine), head of cardiology service, Clinic of Small Animal, LMU University of Munich.

Availability of Supporting Data

Supporting data has been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> and is accessible through GEO Series accession number GSE36976.

Acknowledgments

We would like to thank Anastazia Samborski for her excellent technical support. The authors also acknowledge the assistance of the faculty, staff, clinicians and pet owners that participated in the study.

Author details

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Veterinaerstrasse 13, Munich 80539, Germany. ²Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU University of Munich, Feodor-Lynen-Strasse 25, Munich 81377, Germany.

Received: 11 July 2012 Accepted: 14 January 2013
Published: 17 January 2013

References

- O'Grady MR, O'Sullivan ML: Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004, **34**(5):1187-1207.
- Tidholm A, Hagstrom J, Borgarelli M, Tarducci A: Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. *Vet J* 2001, **162**(2):92-107.
- Vollmar AC: The prevalence of cardiomyopathy in the Irish wolfhound: a clinical study of 500 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000, **36**(2):125-132.
- Calvert CA, Meurs KM: Cardiomyopathy in doberman pinschers. In *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*, vol. XIVth edition. Edited by Bonagura JD, Twedt DC. St. Louis: Saunders Elsevier; 2009:800-803.
- Calvert CA, Brown J: Influence of antiarrhythmia therapy on survival times of 19 clinically healthy doberman pinschers with dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular tachycardia, and sudden death (1985-1998). *J Am Anim Hosp Assoc* 2004, **40**(1):24-28.
- Calvert CA, Chapman WL Jr, Toal RL: Congestive cardiomyopathy in doberman pinscher dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1982, **181**(6):598-602.
- Mausberg TB, Wess G, Simak J, Keller L, Drogemuller M, Drogemuller C, Webster MT, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Leeb T: A locus on chromosome 5 is associated with dilated cardiomyopathy in doberman pinschers. *PLoS One* 2011, **6**(5):e20042.
- Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K: Prevalence of dilated cardiomyopathy in doberman pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* 2010, **24**(3):533-538.
- Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ, Brown J: Signalment, survival, and prognostic factors in doberman pinschers with end-stage cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 1997, **11**(6):323-326.
- Calvert CA, Hall G, Jacobs G, Pickus C: Clinical and pathologic findings in doberman pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1997, **210**(4):505-511.
- Petric AD, Stabej P, Zernva A: Dilated cardiomyopathy in doberman pinschers: survival, causes of death and a pedigree review in a related line. *J Vet Cardiol* 2002, **4**(1):17-24.
- Calvert CA, Jacobs G, Pickus CW, Smith DD: Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy doberman pinschers with echocardiographic abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 2000, **217**(9):1328-1332.
- Calvert CA, Jacobs GJ, Smith DD, Rathbun SL, Pickus CW: Association between results of ambulatory electrocardiography and development of cardiomyopathy during long-term follow-up of doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 2000, **216**(1):34-39.
- Hazlett MJ, Maxie MG, Allen DG, Wilcock BP: A retrospective study of heart disease in doberman pinscher dogs. *Can Vet J* 1983, **24**(7):205-210.
- O'Grady MR, O'Sullivan ML, Minors SL, Horne R: Efficacy of benazepril hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in doberman pinschers. *J Vet Intern Med* 2009, **23**(5):977-983.
- Oyama MA, Sisson DD, Solter PF: Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *Am J Vet Res* 2007, **68**(1):42-47.
- Oyama MA, Sisson DD: Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med* 2004, **18**(6):831-839.
- Spratt DP, Mellanby RJ, Drury N, Archer J: Cardiac troponin I: evaluation I of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *J Small Anim Pract* 2005, **46**(3):139-145.
- O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL: Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal doberman pinschers and doberman pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007, **21**(1):92-99.
- Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K: Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in doberman pinschers. *Am J Vet Res* 2011, **72**(5):642-649.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(4):259-269.
- Zhang S, Chen L, Jung EJ, Calin GA: Targeting microRNAs with small molecules: from dream to reality. *Clin Pharmacol Ther* 2010, **87**(6):754-758.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009, **19**(1):92-105.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, et al: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**(30):10513-10518.
- Al J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, et al: Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **391**(1):73-77.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, et al: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008, **18**(10):997-1006.
- Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K: Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011, **717**(1-2):85-90.
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ: Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**(11):4402-4407.
- Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, et al: Circulating microRNAs in

- plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010, **102**(7):1174–1179.
30. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ: Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010, **251**(3):499–505.
 31. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q: Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010, **31**(6):659–666.
 32. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X: Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010, **127**(1):118–126.
 33. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B: Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009, **4**(7):e6229.
 34. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, Fei M, Sun S: Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* 2010, **56**(12):1830–1838.
 35. Baskerville S, Bartel DP: Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 2005, **11**(3):241–247.
 36. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002, **12**(9):735–739.
 37. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M: Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2010, **16**(5):404–410.
 38. Ikeda S, Pu WT: Expression and function of MicroRNAs in heart disease. *Curr Drug Targets* 2010, **11**(8):913–925.
 39. Cai B, Pan Z, Lu Y: The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator. *Curr Med Chem* 2010, **17**(5):407–411.
 40. van Rooij E, Olson EN: MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007, **117**(9):2369–2376.
 41. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, et al: The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007, **13**(4):486–491.
 42. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz R, Srivastava D: Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007, **129**(2):303–317.
 43. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN: Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007, **316**(5824):575–579.
 44. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN: A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**(48):18255–18260.
 45. Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD, Selzman CH, et al: Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**(6):2111–2116.
 46. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, et al: Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2009, **105**(6):585–594.
 47. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 2008, **22**(23):3242–3254.
 48. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT: Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 2007, **31**(3):367–373.
 49. Sucharov C, Bristow MR, Port JD: miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J Mol Cell Cardiol* 2008, **45**(2):185–192.
 50. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M: A cellular MicroRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2011, **17**(11):923–929.
 51. Zhou B, Rao L, Peng Y, Wang Y, Chen Y, Song Y, Zhang L: Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 2010, **321**(1):60–65.
 52. Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, Melillo G, Rigolini R, Costa E, Crea F, et al: MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 2010, **42**(3):420–426.
 53. Tjissen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM: MIR423-Sp as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010, **106**(6):1035–1039.
 54. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard JM, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, et al: Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012, **60**(4):290–299.
 55. Van Empel VP, De Windt LJ, Martins PA: Circulating miRNAs: reflecting or affecting cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2012, **14**(6):498–509.
 56. Elton TS, Khan M, Terentyev D: MicroRNAs in cardiovascular disease. *F1000 Med Rep* 2011, **3**:10.
 57. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N: Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009, **55**(11):1944–1949.
 58. Dorn GW 2nd: MicroRNAs in cardiac disease. *Transl Res* 2011, **157**(4):226–235.
 59. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K: Identification of muscle-specific MicroRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One* 2011, **6**(3):e18388.
 60. Zhou D, Li S, Wen J, Gong X, Xu L, Luo Y: Genome-wide computational analyses of microRNAs and their targets from *Canis familiaris*. *Comput Biol Chem* 2008, **32**(1):60–65.
 61. Boggs RM, Moody JA, Long CR, Tsai KL, Murphy KE: Identification, amplification and characterization of miR-17-92 from canine tissue. *Gene* 2007, **404**(1–2):25–30.
 62. Giola G, Mortarino M, Gelain ME, Albonico F, Cusani E, Forno I, Marconato L, Martini V, Comazzi S: Immunophenotype-related microRNA expression in canine chronic lymphocytic leukemia. *Vet Immunol Immunopathol* 2011, **142**(3–4):228–235.
 63. Boggs RM, Wright ZM, Stickney MJ, Porter WW, Murphy KE: MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mamm Genome* 2008, **19**(7–8):561–569.
 64. Mortarino M, Giola G, Gelain ME, Albonico F, Rocca Bianca P, Ferri E, Comazzi S: Identification of suitable endogenous controls and differentially expressed microRNAs in canine fresh-frozen and FFPE lymphoma samples. *Leuk Res* 2010, **34**(8):1070–1077.
 65. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, et al: MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007, **116**(3):258–267.
 66. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, et al: MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008, **456**(7224):980–984.
 67. Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, Dong X, Qin S, Zhang C: A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2010, **119**(2):87–95.
 68. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M: Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010, **50**(4):298–301.
 69. Cannarozzi G, Schneider A, Gonnet G: A phylogenomic study of human, dog, and mouse. *PLoS Comput Biol* 2007, **3**(1):e2.
 70. Lunter G: Dog as an outgroup to human and mouse. *PLoS Comput Biol* 2007, **3**(4):e74.
 71. Zhao Y, Sheng Z, Huang J: A systematic analysis of heart transcriptome highlights divergent cardiovascular disease pathways between animal models and humans. *Mol Biosyst* 2012, **8**(2):504–510.
 72. Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF: A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem* 2007, **282**(39):28929–28938.
 73. Satoh M, Nakamura M, Akatsu T, Shimoda Y, Segawa I, Hiramori K: Toll-like receptor 4 is expressed with enteroviral replication in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy. *Lab Invest* 2004, **84**(2):173–181.
 74. Frankel LB, Wen J, Lees M, Hoyer-Hansen M, Farkas T, Krogh A, Jaattela M, Lund AH: microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *EMBO J* 2011, **30**(22):4628–4641.

75. Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM: **MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity.** *Cancer Res* 2009, **69**(3):1135–1142.
76. Krichevsky AM, Gabriely G: **miR-21: a small multi-faceted RNA.** *J Cell Mol Med* 2009, **13**(1):39–53.
77. Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C: **miR-21 as a key regulator of oncogenic processes.** *Biochem Soc Trans* 2009, **37**(Pt 4):918–925.
78. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C: **MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation.** *Circ Res* 2007, **100**(11):1579–1588.
79. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC: **Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells.** *Circ Res* 2007, **100**(8):1164–1173.
80. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C: **MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy?** *Am J Pathol* 2007, **170**(6):1831–1840.
81. Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK: **MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloproteinase-2 via phosphatase and tensin homologue.** *Cardiovasc Res* 2009, **82**(1):21–29.
82. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ: **Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy.** *J Mol Cell Cardiol* 2007, **42**(6):1137–1141.
83. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypow J, Abdellatif M: **MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy.** *Circ Res* 2007, **100**(3):416–424.
84. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES, Zhang C: **MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction.** *J Biol Chem* 2009, **284**(43):29514–29525.
85. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN: **Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**(35):13027–13032.
86. Everett RM, McGann J, Wimberly HC, Althoff J: **Dilated cardiomyopathy of Doberman pinschers: retrospective histomorphologic evaluation of heart from 32 cases.** *Vet Pathol* 1999, **36**(3):221–227.
87. Tidholm A, Jonsson L: **Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy.** *Vet Pathol* 2005, **42**(1):1–8.
88. Orenes-Pinero E, Montoro-Garcia S, Patel JV, Valdes M, Marin F, Lip GY: **Role of microRNAs in cardiac remodelling: New insights and future perspectives.** *Int J Cardiol* 2012, pii: S0167-5273(12)01241-7. doi:10.1016/j.ijcard.2012.09.120. [Epub ahead of print].
89. Liu F, Yin L, Zhang L, Liu W, Liu J, Wang Y, Yu B: **Trimetazidine improves right ventricular function by increasing miR-21 expression.** *Int J Mol Med* 2012, **30**(4):849–855.
90. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, et al: **MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice.** *Science* 2009, **324**(5935):1710–1713.
91. Zhang X, Wang X, Zhu H, Zhu C, Wang Y, Pu WT, Jegga AG, Fan GC: **Synergistic effects of the GATA-4-mediated miR-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death.** *J Mol Cell Cardiol* 2010, **49**(5):841–850.
92. Jeong MH, Lee JS, Kim DH, Park WJ, Yang DK: **Identification of novel microRNAs negatively regulating cardiac hypertrophy.** *Biochem Biophys Res Commun* 2012.
93. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ: **Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(20):7248–7259.
94. Creemers EE, Tjissen AJ, Pinto YM: **Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?** *Circ Res* 2012, **110**(3):483–495.
95. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT: **MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins.** *Nat Cell Biol* 2011, **13**(4):423–433.
96. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, et al: **Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **108**(12):5003–5008.
97. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**(6):654–659.
98. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, et al: **Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line.** *PLoS One* 2010, **5**(10):e13247.
99. Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, Li X, Lubell K, Lim DO, Cho IS, et al: **Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**(9):1150–1156.
100. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, et al: **Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration.** *Mol Cell* 2010, **39**(1):133–144.
101. Summerfield NJ, Boswood A, O'Grady MR, Gordon SG, Dukes-McEwan J, Oyama MA, Smith S, Patteson M, French AT, Culshaw GJ, et al: **Efficacy of pimobendan in the prevention of congestive heart failure or sudden death in doberman pinschers with preclinical dilated cardiomyopathy (the PROTECT study).** *J Vet Intern Med* 2012, **26**(6):1337–1349.
102. Wess G, Maurer J, Simak J, Hartmann K: **Use of Simpson's method of disc to detect early echocardiographic changes in doberman pinschers with dilated cardiomyopathy.** *J Vet Intern Med* 2010, **24**(5):1069–1076.
103. Griffiths-Jones S: **The microRNA registry.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(Database issue):D109–D111.
104. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M: **Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression.** *Bioinformatics* 2002, **18**(Suppl 1):S96–S104.
105. Smyth GK, Speed T: **Normalization of cDNA microarray data.** *Methods* 2003, **31**(4):265–273.
106. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
107. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: **Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(9):e36.

doi:10.1186/1746-6148-9-12

Cite this article as: Steudemann et al.: Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. *BMC Veterinary Research* 2013 **9**:12.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



IV. DISKUSSION

Die Rolle von miRNAs bei der humanen DCM wurde bislang in endomyokardialen Gewebeproben untersucht (VAN ROOIJ et al., 2006; IKEDA et al., 2007; THUM et al., 2007; THUM et al., 2008; SATOH et al., 2011). Aufgrund der diffizilen Gewinnung von kardialen Biopsien, existieren allerdings nur wenige Studien. Zirkulierende miRNA Expressionsprofile wurden bei der humanen DCM bislang nicht erforscht. Obwohl die Umstände und der genaue Mechanismus der Freisetzung von miRNAs in die Zirkulation bislang nicht eindeutig geklärt sind, stellt die Bestimmung von zirkulierenden miRNAs im Serum einen weitaus weniger invasiven Ansatz dar. Bereits eine Stunde nach myokardialen Infarkten beim Menschen und in Mausmodellen konnte eine erhöhte Expression von myokard-spezifischen miRNAs im Serum nachgewiesen werden (CHENG et al., 2010; WANG et al., 2010a). Die DCM beim Dobermann könnte als spontanes Krankheitsmodell einen interessanten Ansatz für translationale Forschung bieten. Für die Durchführung des Mikroarray und der quantitativen PCR (qPCR) Analysen minimierten wir das verwendete Vollblutvolumen auf 2 ml. Diese Probengröße kann auch von kleinen veterinärmedizinischen Patienten sicher und ohne Nebenwirkungen gewonnen werden.

Laut Hersteller ist für die meisten Mikroarray-Systeme eine minimale Menge von 100 ng Gesamt-RNA nötig. In den verwendeten Serumproben waren durchschnittlich 117 ng (84 - 162 ng) Gesamt-RNA enthalten. Trotz dieser geringen Mengen konnten dennoch über 400 miRNAs in den Proben detektiert werden. Dies belegt, dass das verwendete, geringe Serumvolumen als diagnostischer Ansatz verwendet werden kann. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte Gesamt-RNA-Menge zu einer höheren Zahl lesbarer miRNAs geführt hätte. Bis heute gibt es keine standardisierte Normalisierung für eine miRNA Expressionsanalyse aus dem Serum mittels Mikroarray. Bei der Bestimmung zirkulierender miRNAs mittels qPCR wird die Normalisierung am Serumvolumen als beste Methode beschrieben (CHENG et al., 2010). Eine Normalisierung der Gesamt-RNA Menge hätte interindividuelle Unterschiede dieser Studie vermindern können und sollte in Folgestudien weiter evaluiert werden.

Eine Probe wurde im miRNA Mikroarray von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Diese Probe wies starke Abweichungen aller Expressionshöhen zu den übrigen Proben aus der gleichen Gruppe auf, welche auch nach der Normalisierung noch vorhanden waren. Diese Probe wies einige Besonderheiten im Vergleich zu den anderen Proben auf: Sie wurde von dem jüngsten Tier in der Gruppe gewonnen, war am längsten eingefroren und der Gesamt-RNA Gehalt war, im Vergleich zu allen anderen Proben, am geringsten. Erstaunlicherweise waren die Signal-Intensitäten bei dieser Probe allerdings stärker ausgeprägt als bei den anderen Proben. Alter beeinflusst den miRNA Gehalt im Plasma nicht (AI et al., 2010). Da miRNAs sich sehr stabil nachweisen lassen und auch von mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgängen nicht beschädigt werden, sollte auch die längere Gefrierzeit keinen Einfluss auf die Expressionslevel haben (MITCHELL et al., 2008; KROH et al., 2010). Die Gründe für die Abweichungen in der genannten Probe bleiben demnach ungeklärt.

Da die miRNA Datenbank mehr murine und humane miRNAs als canine Sequenzen enthält, entschieden wir uns bei dem Design des Mikroarray sowohl canine wie auch murine Ziel-Sequenzen zu verwenden. miRNAs sind evolutionär hoch konserviert und zeigen homologe Sequenzen maturer miRNAs (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BOGGS et al., 2007; BOGGS et al., 2008). Die Ergebnisse des Mikroarray bestätigen, dass eine Detektion caniner miRNAs durch die Verwendung vieler muriner Oligonukleotid-Sonden im miRNA Mikroarray möglich ist. Dies vereinfacht die Verwendung veterinärmedizinischer Proben für weitere Studien.

Die Unterschiede der miRNA Expression zwischen den beiden getesteten Gruppen waren in dieser Studie nicht groß und einheitlich genug, um nach einer Korrektur für multiples Testen statistische Signifikanz zu erreichen. Auch wenn einzelne miRNAs sich nicht statistisch signifikant darstellten, konnte mittels Hierarchischer Cluster Analyse mehrerer miRNAs eine klare Unterscheidung gesunder und kranker Tiere erfolgen. Eine kombinierte Expressionsanalyse mehrerer miRNAs könnte ein neues diagnostisches Mittel für die Erkennung der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann darstellen und sollte in Folgestudien genauer evaluiert werden. Diese Studie stützt sich auf eine relativ kleine Patientenzahl und sollte daher als Pilot-Studie betrachtet werden, deren Ergebnisse mittels Folgestudien mit höheren Patientenzahlen bestätigt werden

sollten.

Eine Studie, die mittels Mikroarray zelluläre miRNAs bei verschiedenen Herzerkrankungen des Menschen untersuchte, zeigte eine erhöhte Expression von let-7c und eine niedrigere Expression von miR-101 bei humaner DCM. Die Unterschiede waren zwar gering, erreichten aber dennoch statistische Signifikanz (IKEDA et al., 2007). Im Gegensatz hierzu konnte in der hier präsentierten Studie eine erniedrigte Expression von let-7c und eine erhöhte Expression von miR-101 bei erkrankten Tieren gezeigt werden. Die gefundenen Unterschiede sind allerdings sehr gering.

Die miRNA Familie let-7 ist bei Mäusen vor allem in kardialen Gewebe angereichert (RAO et al., 2009). Kürzlich wurde ein erniedrigter let-7i-Spiegel bei humanen DCM Patienten mit dem Schweregrad der vorhandenen linksventrikulären Dysfunktion und der Progression der Erkrankung in Verbindung gebracht. let-7i wird daher als potentieller prognostischer Marker bei der humanen DCM beschrieben (SATO et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass let-7i *in vitro* den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) reguliert. Bei Menschen mit DCM stellt dieser einen wichtigen Transkriptionsfaktor im Myokard dar. Der genaue Mechanismus der Aktivierung von TLR4 bei der DCM ist allerdings noch ungeklärt (SATO et al., 2004; CHENG et al., 2007). Bei den Dobermännern mit DCM in der vorliegenden Studie konnten keine Unterschiede in der Expression von let-7i gefunden werden. Bislang ist allerdings nicht bekannt, ob TLR4 auch bei der caninen DCM einen wichtigen Transkriptionsfaktor darstellt.

In mehreren Studien wird miR-101 als potenter Tumor- und Autophagie-Inhibitor beschrieben und wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert (SU et al., 2009; FRANKEL et al., 2011). Ein spezifischer regulatorischer Effekt auf das kardiovaskuläre System wurde bis heute nicht beschrieben.

miR-21 wird von mehreren Organen wie Milz, Dünndarm, Kolon und dem Herzen exprimiert (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). In verschiedenen Tumor-Geweben konnte eine verstärkte Expression von miR-21 belegt werden (KRICHEVSKY & GABRIELY, 2009; SELCUKLU et al., 2009). Die höchsten Expressionslevel werden allerdings in kardiovaskulären Zellen wie Gefäß-Muskelzellen, Endothelzellen, Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten gemessen (CHENG et al., 2007; JI et al., 2007; SUAREZ et al., 2007; THUM et

al., 2008; ROY et al., 2009). Erkrankte Tiere dieser Studie zeigten im miRNA Mikroarray eine leicht erhöhte Expression von miR-21, welche in der qPCR nicht belegt werden konnte. Eine unterschiedliche Expression von miR-21 wurde neben der DCM bereits bei Gefäßerkrankungen, Hypertropher Kardiomyopathie, Herzversagen und Ischämischer Kardiomyopathie beschrieben (VAN ROOIJ et al., 2006; CHENG et al., 2007; JI et al., 2007; SAYED et al., 2007; TATSUGUCHI et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2008; DONG et al., 2009). Myokardiale Degeneration mit kardialer Fibrose und myointimale Hyperplasie der Koronargefäße gelten als typische histologische Befunde bei der DCM des Dobermanns (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; EVERETT et al., 1999; TIDHOLM & JONSSON, 2005). Beim Menschen ist die miR-21 Expression in Folge von kardialen Stress erhöht und führt zur Fibroblastenproliferation und Fibrose von Herzgewebe (THUM et al., 2008; ORENES-PINERO et al., 2012). In humanen DCM-Gewebeproben fand eine Studiengruppe eine leichte, nicht signifikante niedrigere Expression von miR-21 (IKEDA et al., 2007), während eine andere Arbeitsgruppe eine zweifach erhöhte, statistisch signifikante Regulation von miR-21 in erkranktem Herzgewebe feststellte (SATO et al., 2011). Experimentelle Studien zeigten kürzlich eine medikamentös induzierte Erhöhung von miR-21 in Zellen der rechten Herzkammer, welche in einer verbesserten rechtsventrikulären Funktion im Rechtsherzversagen resultierte (LIU et al., 2012).

Im miRNA Mikroarray dieser Studie konnte eine geringe Verminderung der miR-92a Expression bei an der DCM erkrankten Tieren festgestellt werden. Die Verminderung der Expression einer verwandten miRNA, miR-92, wurde bereits in humanen DCM-Gewebeproben bewiesen (IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008). Im ischämischen myokardialen Gewebe von Mäusen hemmt eine verstärkte Expression von miR-92a die Angiogenese und ist an der Kontrolle des Überlebens der Kardiomyozyten beteiligt. Eine externe Inhibition der miR-92a führte zu verbesserter linksventrikulärer Funktion und zeigte zusätzliche positive Effekte in der Heilung der ischämischen Bereiche (BONAUE et al., 2009). Alle erkrankten Tiere dieser Studie erhielten eine positiv inotrope Therapie (Pimobendan). Die beobachtete verminderte Expression von miR-92a könnte in Zusammenhang mit der durch die Therapie verbesserte linksventrikuläre Funktion stehen. Die Effekte dieser Therapie auf die Expression von miRNAs wurde bisher

nicht untersucht.

Sowohl im miRNA Mikroarray wie auch in der qPCR Analyse dieser Studie konnte - trotz hoher interindividueller Variation - eine leicht erhöhte Regulation von miR-142-3p und miR-144* gefunden werden. Die Expression von miR-144 war im Mikroarray ebenfalls erhöht. miR-144* und miR-144 sind die beiden Einzelstränge der doppelsträngigen Vorläufer-miRNA mir-144. miR-144 wird in Verbindung mit miR-451 exprimiert. Der miR-144/451 Promoter wird von GATA-4 aktiviert, einem wichtigen Transkriptionsfaktor im Herzen. Beiden miRNAs wird eine Schutzfunktion gegen (durch Ischämie induzierte) Schädigung der Kardiomyozyten mit folgendem Zelluntergang zugeschrieben. Sie repräsentieren demnach einen möglichen neuen Ansatzpunkt in der Therapie von ischämischen Kardiomyopathien beim Menschen (ZHANG et al., 2010a). Durch die bei der DCM typischerweise vorhandenen linksventrikulären Dilatation entsteht ebenso myokardialer Stress. Möglicherweise ist die beobachtete differentielle Expression von miR-144 bei den erkrankten Tieren als Antwort auf diesen vorhandenen myokardialen Stress und als Versuch der folgenden Kardioprotektion zu verstehen. Die Untersuchung größerer Patientengruppen sollte diese Erkenntnisse bestätigen.

In Einklang mit den Ergebnissen der präsentierten Studie, war miR-142-3p in einer anderen Studie bei Menschen im chronischen Herzversagen, welches durch nicht-ischämische DCM entstanden ist, ebenfalls vermehrt exprimiert (VOELLENKLE et al., 2010). Durch die Erhöhung von miR-142-3p (und anderen miRNAs) konnte eine experimentell induzierte kardiale Hypertrophie vermindert werden. Diese miRNAs werden derzeit als potentielle Ziele zur Therapie der kardialen Hypertrophie diskutiert (JEONG et al., 2012).

Der Mechanismus der Freisetzung von miRNAs in das Serum ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es ist denkbar, dass nicht alleine die erkrankten Zellen als Ursprungsort der zirkulierenden miRNAs anzusehen sind. Möglicherweise werden von dem erkrankten Gewebe bislang unbekannte Signale, wie z. B. Stress-Signale, an andere Organe im Körper gesendet, die dort eine spezifische Freisetzung von miRNAs verursachen. Zirkulierende miRNA Expressionsmuster könnten sich daher von den miRNA Expressionsmustern, die aus dem erkrankten Organ gewonnen wurden, unterscheiden. Dies könnte die Diskrepanzen zwischen den in dieser Studie gefundenen zirkulierenden miRNA Expressionen zu den

zellulären Expressionsmustern vorheriger Studien erklären.

Alle Tiere in der erkrankten Gruppe erhielten die gleiche Grund-Therapie (Pimobendan und ACE-Hemmer) und eine individuell angepasste, antiarrhythmische Medikation (Sotalol, Amiodaron). Es ist möglich, dass die Medikation nicht nur die kardialen Abnormalitäten verbesserte, sondern auch die miRNA Expression beeinflusst hat. Die erhöhten cTnI Werte bei den erkrankten Tieren reflektieren die bestehende myokardiale Verletzung. Studien, die die zirkulierenden miRNA Expressionsmuster in verschiedenen Krankheitsstadien der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann vergleichen, sind zukünftig nötig, um einen zeitlichen Unterschied im Krankheitsverlauf zu verifizieren. Über einen Einfluss der verwendeten Medikamente auf die miRNA-Expression existieren bislang keine Studien. Für die präsentierte Studie wurden nur Tiere mit (sowohl echokardiographisch wie auch elektrokardiographisch) eindeutigen Veränderungen und somit im fortgeschrittenen Stadium gewählt. Es wäre unethisch gewesen, diese Tiere keiner Medikation zu unterziehen. Daher erhielten sie die gleiche Grund-Therapie, aber unterschiedliche, individuell angepasste, antiarrhythmische Therapien mit Sotalol oder Amiodaron (O'GRADY et al., 2009; SUMMERFIELD et al., 2012). Die antiarrhythmische Therapie wurde den jeweiligen elektrokardiographischen Veränderungen angepasst. Traten in späteren Kontroll-Untersuchungen weiterhin maligne Arrhythmien auf, wurde die Therapie als nicht ausreichend wirksam betrachtet und geändert (Wechsel von Sotalol zu Amiodaron, Kombinationen von Sotalol mit Mexiletin, Kombinationen von Amiodaron mit Mexiletin).

Zusammenfassend beweist diese Studie die technische Durchführbarkeit der Bestimmung von zirkulierenden miRNAs in einer klinischen Fragestellung. Zirkulierende miRNAs besitzen somit auch in der Veterinärmedizin großes Potential als neue Biomarker. Standardisierte Normalisierungs-Protokolle und erhöhte Gruppengrößen sind zukünftig nötig, um dieses Potential zu bestätigen und Unterschiede zwischen den Gruppen zu belegen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Dilatative Kardiomyopathie ist die häufigste Herzerkrankung beim Dobermann. Sie zeichnet sich durch das einzelne oder gemeinsame Auftreten einer systolischen Dysfunktion und ventrikulärer Arrhythmien aus. Klinische Symptome zeigen betroffene Tiere erst im späten Verlauf der Erkrankung. Zuvor durchlaufen sie eine okkulte Phase, in denen keine klinischen Symptome auftreten, und deren Diagnosestellung bislang nur mittels der Kombination von Echokardiographie und 24-Stunden-Elektrokardiogramm möglich ist.

Mikro-Ribonukleinsäuren sind kurze, nicht kodierende Ribonukleinsäuren, die eine bedeutende Rolle in der Genregulation spielen. Sie können in der Zirkulation nachgewiesen werden und verhalten sich äußerst stabil gegen äußere Einflüsse. Bei bestimmten pathologischen Zuständen ist die Expression einzelner Mikro-Ribonukleinsäuren dereguliert und kann im Gewebe wie auch im Blut abgelesen und interpretiert werden. Veränderte miRNA Expressionsmuster wurden bereits bei humanen Herzerkrankungen wie der Dilatativen Kardiomyopathie beschrieben und stellen potentielle, neue Biomarker dar. Bislang gibt es weder Studien über den Nachweis von Mikro-Ribonukleinsäure Expressionsprofilen im caninen Serum, noch Studien über den Vergleich von Mikro-Ribonukleinsäure Expressionsprofilen bei gesunden und an der Dilatativen Kardiomyopathie erkrankten Hunden.

Ziel dieser Studie war daher, Mikro-Ribonukleinsäuren im Serum von Hunden mittels miRNA Mikroarray nachzuweisen und zu überprüfen, ob an der Dilatativen Kardiomyopathie erkrankte Dobermänner - ähnlich wie Menschen - im Vergleich zu gesunden Kontrollen veränderte Mikro-Ribonukleinsäure Expressionsmuster aufweisen.

Nach Anamnese, klinischer Untersuchung, Kurzzeit- und 24-Stunden-Elektrokardiogramm sowie Echokardiographie wurden Dobermänner in verschiedene Gruppen eingeteilt. Gesunde Tiere waren sieben Jahre oder älter und zeigten in keiner der durchgeführten Untersuchungen Anzeichen einer bestehenden Erkrankung. Das Echokardiographie zeigte bei diesen Tieren keine Abnormalitäten und im 24-Stunden- Elektrokardiogramm wurden weniger als 50

ventrikuläre Rhythmusstörungen gefunden. Erkrankte Tiere befanden sich im okkulten Stadium der Dilatativen Kardiomyopathie. Diese Tiere hatten sowohl eindeutige elektrokardiographische wie auch echokardiographische Auffälligkeiten, die mit einer Dilatativen Kardiomyopathie im Einklang stehen, ohne jemals zuvor Symptome dieser Erkrankung gezeigt zu haben. Es wurde Serum von je vier gesunden und an der Dilatativen Kardiomyopathie erkrankten Tieren untersucht. Die aus 400 µl Serum extrahierte Gesamt-Ribonukleinsäure wurde auf einen individuell designten 8x60k Mikro-Ribonukleinsäure Mikroarray hybridisiert, der Gegenstücke muriner und caniner Mikro-Ribonukleinsäuren enthielt und somit jede Probe für insgesamt 1368 Mikro-Ribonukleinsäuren testete. Fünf Mikro-Ribonukleinsäuren wurden für eine weitere Analyse mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion ausgewählt.

Trotz einer sehr niedrigen Gesamt-Ribonukleinsäure Konzentration in den Serumproben konnten über 400 Mikro-Ribonukleinsäuren mit ausreichender Signalintensität detektiert werden. Bei 22 Mikro-Ribonukleinsäuren zeigten sich Unterschiede zwischen den gesunden und den an der Dilatativen Kardiomyopathie erkrankten Tieren. Diese Unterschiede waren allerdings gering und erreichten nach Korrektur für multiples Testen keine statistische Signifikanz. Mittels Hierarchischer Clusteranalyse der auffälligen Mikro-Ribonukleinsäuren konnten die Unterschiede zwischen den Gruppen dennoch deutlich veranschaulicht werden und ermöglichten eine klare Einteilung in die gesunde oder erkrankte Gruppe. Die Analyse mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion ergab keine signifikanten Unterschiede der getesteten Mikro-Ribonukleinsäuren und bestätigte somit die Ergebnisse des Mikroarray.

Die vorgestellte Studie beweist die technische Durchführbarkeit der Bestimmung von Mikro-Ribonukleinsäuren im caninen Serum in einer klinischen Fragestellung. Zirkulierende Mikro-Ribonukleinsäuren besitzen somit auch in der Veterinärmedizin großes Potential als neue Biomarker. Weitere Untersuchungen mit einer erhöhten Fallzahl sind zukünftig nötig, um die gefundenen Auffälligkeiten bei der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns statistisch zu belegen.

VI. SUMMARY

The dilated cardiomyopathy is the most common heart disease in Doberman Pinschers. Abnormalities like systolic dysfunction and ventricular arrhythmias may coexist or be of predominantly one form at the time of occult stage. In this stage, abnormalities concerning echocardiographic changes or arrhythmias are present. The diagnosis consists of a combination of echocardiography and 24-hour ambulatory electrocardiogram.

Micro ribonucleic acids are short, non-coding ribonucleic acids playing important roles in gene regulation. They can be detected in circulation and are remarkably stable against external impacts. The presence of particular pathological conditions can change the expression of individual micro ribonucleic acids which can be determined in tissues as well as in the blood circulation. Earlier studies show a specific micro ribonucleic acids expression pattern for human heart diseases like dilated cardiomyopathy and are discussed as potential new biomarkers. To our knowledge, there have been no previous studies profiling micro ribonucleic acids in canine serum and comparing micro ribonucleic acid expression profiles of dogs with dilated cardiomyopathy to those of healthy controls.

Therefore, the aim of this study was to determine micro ribonucleic acids in canine serum and to investigate whether Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls display different micro ribonucleic acid expression patterns like humans.

According to anamnesis, clinical, echocardiographic, short-term and 24-hour electrocardiographic examination, Doberman Pinschers were classified into different groups. Healthy dogs had an age of seven years or older and did not show evidence of systemic or cardiac disease in any of the performed examinations. Echocardiography did not show any abnormalities and electrocardiographic analysis revealed less than 50 ventricular arrhythmias in 24 hours in these dogs. Dog of the diseased group were suffering from dilated cardiomyopathy and were graded to be in the occult stage of the disease. Without having shown any symptoms of cardiac disease, unequivocal echocardiographic and electrocardiographic findings were consistent with diagnosis of dilated cardiomyopathy. We analyzed serum of four dogs in each group. Total

ribonucleic acid was extracted from 400 μ l serum, was labeled and hybridized on a custom-designed 8x60k micro ribonucleic acid microarray containing canine and murine micro ribonucleic acid targets. Each probe was therefore tested for 1368 individual micro ribonucleic acids. Five micro ribonucleic acids were selected for further analysis using quantitative polymerase chain reaction.

Even though total ribonucleic acid concentrations were very low in the serum samples, more than 400 micro ribonucleic acids with sufficient signal intensity were detectable on microarray analysis. 22 miRNAs were differentially expressed in the two groups, but did not reach statistical significance after multiple testing correction. Hierarchical cluster analysis is visualizing differences in micro ribonucleic acid patterns between healthy and diseased dogs. This analysis revealed a clear separation of healthy and diseased samples. No significant differences were found using specific micro ribonucleic acid quantitative polymerase chain reaction assays confirming the results of microarray analysis.

In conclusion, this study demonstrates that micro ribonucleic acid expression profiling in canine serum is technically feasible in a clinical setting, revealing their potential as a possible new biomarkers in veterinary medicine. Further studies with larger patient cohorts are needed in the future to statistically verify differences in the micro ribonucleic acid pattern of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy found in this study.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2010; 56: 1183-5.

Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Yang B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 73-7.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-5.

Armstrong PW, Stopps TP, Ford SE, de Bold AJ. Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation* 1986; 74: 1075-84.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 5003-8.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.

Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna* 2005; 11: 241-7.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.

Blumer BJ. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Vasodilators. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7 edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2009: 1216-23.

Boggs RM, Moody JA, Long CR, Tsai KL, Murphy KE. Identification, amplification and characterization of miR-17-92 from canine tissue. *Gene* 2007; 404: 25-30.

Boggs RM, Wright ZM, Stickney MJ, Porter WW, Murphy KE. MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mamm Genome* 2008; 19: 561-9.

Boltwood CM, Tei C, Wong M, Shah PM. Quantitative echocardiography of the mitral complex in dilated cardiomyopathy: the mechanism of functional mitral regurgitation. *Circulation* 1983; 68: 498-508.

Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 2009; 324: 1710-3.

Buchanan JW, Bucheler J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 194-9.

Cai B, Pan Z, Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator. *Curr Med Chem* 2010; 17: 407-11.

Calvert CA, Chapman WL, Jr., Toal RL. Congestive cardiomyopathy in Doberman pinscher dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 598-602.

Calvert CA. Dilated congestive cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 1986; 8(6): 417-30.

Calvert CA, Brown J. Use of M-mode echocardiography in the diagnosis of congestive cardiomyopathy in Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189: 293-7.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ. Efficacy and toxicity of tocainide for the treatment of ventricular tachyarrhythmias in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 1996; 10: 235-40.

Calvert CA, Hall G, Jacobs G, Pickus C. Clinical and pathologic findings in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1997a; 210: 505-11.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ, Brown J. Signalment, survival, and prognostic factors in Doberman pinschers with end-stage cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 1997b; 11: 323-6.

Calvert CA, Jacobs GJ, Kraus M. Possible ventricular late potentials in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 235-9.

Calvert CA, Jacobs GJ, Smith DD, Rathbun SL, Pickus CW. Association between results of ambulatory electrocardiography and development of cardiomyopathy during long-term follow-up of Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 2000a; 216: 34-9.

Calvert CA, Jacobs G, Pickus CW, Smith DD. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with echocardiographic abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 2000b; 217: 1328-32.

Calvert CA, Wall M. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with equivocal echocardiographic evidence of dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 782-4.

Calvert CA, Brown J. Influence of antiarrhythmia therapy on survival times of 19 clinically healthy Doberman pinschers with dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular tachycardia, and sudden death (1985-1998). *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 24-8.

Calvert CA, Meurs KM. Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2009: 800-3.

Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010; 78: 838-48.

Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Hoydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW, 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007; 13: 613-8.

Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD, Selzman CH, Meissner G, Patterson C, Hannon GJ, Wang DZ. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008a; 105: 2111-6.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Zen K, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008b; 18: 997-1006.

Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 2007; 170: 1831-40.

Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, Dong X, Qin S, Zhang C. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 87-95.

Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner

DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3: 499-506.

COVE. Controlled clinical evaluation of enalapril in dogs with heart failure: results of the Cooperative Veterinary Enalapril Study Group. The COVE Study Group. *J Vet Intern Med* 1995; 9: 243-52.

Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012; 110: 483-95.

Dambach DM, Lannon A, Sleeper MM, Buchanan J. Familial dilated cardiomyopathy of young Portuguese water dogs. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 65-71.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-5.

Dimov I, Jankovic Velickovic L, Stefanovic V. Urinary exosomes. *ScientificWorldJournal* 2009; 9: 1107-18.

Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES, Zhang C. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem* 2009; 284: 29514-25.

Dorn GW, 2nd. MicroRNAs in cardiac disease. *Transl Res* 2011; 157: 226-35.

Elton TS, Khan M, Terentyev D. MicroRNAs in cardiovascular disease. *F1000 Med Rep* 2011; 3: 10.

Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011; 717: 85-90.

Ettinger SJ, Benitz AM, Ericsson GF, Cifelli S, Jernigan AD, Longhofer SL, Trimboli W, Hanson PD. Effects of enalapril maleate on survival of dogs with naturally acquired heart failure. The Long-Term Investigation of Veterinary Enalapril (LIVE) Study Group. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1573-7.

Everett RM, McGann J, Wimberly HC, Althoff J. Dilated cardiomyopathy of Doberman pinschers: retrospective histomorphologic evaluation of heart from 32 cases. *Vet Pathol* 1999; 36: 221-7.

Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Muller O, Vetter R, Erdmann V, Tschöpe C, Poller W. Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86: 987-97.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.

Frankel LB, Wen J, Lees M, Hoyer-Hansen M, Farkas T, Krogh A, Jaattela M, Lund AH. microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *Embo J* 2011; 30: 4628-41.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.

Fuentes VL, Corcoran B, French A, Schober KE, Kleemann R, Justus C. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of pimobendan in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 255-61.

Gelzer AR, Kraus MS, Rishniw M, Hemsley SA, Moise NS. Combination therapy with mexiletine and sotalol suppresses inherited ventricular arrhythmias in German shepherd dogs better than mexiletine or sotalol monotherapy: a randomized cross-over study. *J Vet Cardiol* 2010; 12: 93-106.

Geraghty N (2011) Vergleich verschiedener Holterkriterien zur Diagnose der arrhythmischen Stadiums der dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann. In: Diss med vet. Ludwig-Maximilians-Universität, Munich. 1-105

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1143-9.

Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3: e3148.

Gioia G, Mortarino M, Gelain ME, Albonico F, Ciusani E, Forno I, Marconato L, Martini V, Comazzi S. Immunophenotype-related microRNA expression in canine chronic lymphocytic leukemia. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 142: 228-35.

Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, Degan BM, Rokhsar DS, Bartel DP. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 2008; 455: 1193-7.

Harpster NK. Boxer Cardiomyopathy. In: *Current Veterinary Therapy VIII*. W. KR, ed. Philadelphia, PA: WB Saunders 1983: 329-37.

Hazlett MJ, Maxie MG, Allen DG, Wilcock BP. A retrospective study of heart disease in doberman pinscher dogs. *Can Vet J* 1983; 24: 205-10.

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; 251: 499-505.

Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 2009; 10: 413.

Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1721-6.

Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 118-26.

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3: e3694.

Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol* 2010; 3: 478-81.

Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 2007; 31: 367-73.

Ikeda S, Pu WT. Expression and Function of MicroRNAs in Heart Disease. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 913-25.

IMPROVE. Acute and short-term hemodynamic, echocardiographic, and clinical effects of enalapril maleate in dogs with naturally acquired heart failure: results of the Invasive Multicenter PROspective Veterinary Evaluation of Enalapril study. The IMPROVE Study Group. *J Vet Intern Med* 1995; 9: 234-42.

Jeong MH, Lee JS, Kim DH, Park WJ, Yang DK. Identification of novel microRNAs negatively regulating cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428: 191-6.

Ji F, Yang B, Peng X, Ding H, You H, Tien P. Circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *J Viral Hepat* 2011; 18: e242-51.

Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 2007; 100: 1579-88.

Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; 55: 1944-9.

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 859-70.

Keene BD, Bongura JD. Management of Heart Failure in Dogs. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2009: 769-80.

Keene BW, Panciera DP, Atkins CE, Regitz V, Schmidt MJ, Shug AL. Myocardial L-carnitine deficiency in a family of dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 647-50.

Kittleson MD, Keene B, Pion PD, Loyer CG. Results of the multicenter spaniel trial (MUST): taurine- and carnitine-responsive dilated cardiomyopathy in American cocker spaniels with decreased plasma taurine concentration. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 204-11.

Kittleson MD, Kienle RD (1998) *Small Animal Cardiovascular Medicine*, 1st edn. Mosby Inc., St. Louis. 1-558

Kittleson MD. Primary Myokardial Disease Leading to Chronic Myocardial Failure (Dilated Cariomyopathy and Related Diseases). In: *Small Animal Cardiovascular Medicine*, 1st edn. Kittleson MD, Kienle RD, eds. St. Louis:

Mosby Inc. 1998: 319- 46.

Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, Li L, Zhang Z, Zhu J, Jing Q, Qin Y, Li Z. Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 602-9.

Kono T, Sabbah HN, Stein PD, Brymer JF, Khaja F. Left ventricular shape as a determinant of functional mitral regurgitation in patients with severe heart failure secondary to either coronary artery disease or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1991; 68: 355-9.

Kono T, Sabbah HN, Rosman H, Alam M, Jafri S, Goldstein S. Left ventricular shape is the primary determinant of functional mitral regurgitation in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 1594-8.

Kramer GA, Kittleson MD, Fox PR, Lewis J, Pion PD. Plasma taurine concentrations in normal dogs and in dogs with heart disease. *J Vet Intern Med* 1995; 9: 253-8.

Kraus MS, Thomason JD, Fallaw TL, Calvert CA. Toxicity in Doberman Pinchers with ventricular arrhythmias treated with amiodarone (1996-2005). *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1-6.

Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 39-53.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50: 298-301.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-

9.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.

Li R, Qiao J, Wang L, Li L, Zhen X, Liu P, Zheng X. MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 29.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-73.

Liu F, Yin L, Zhang L, Liu W, Liu J, Wang Y, Yu B. Trimetazidine improves right ventricular function by increasing miR-21 expression. *Int J Mol Med* 2012; 30: 849-55.

Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 2008; 22: 3242-54.

Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009; 4: e6229.

Maier E, Wess G (2012) Analytische und klinische Evaluierung eines hochsensitiven Troponin-I-Assays bei der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns. In: 20. Jahrestagung der FG "Inneren Medizin und klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab). Tierärztliche Praxis Kleintiere, Göttingen. A10

Martin MW, Stafford Johnson MJ, Celona B. Canine dilated cardiomyopathy: a retrospective study of signalment, presentation and clinical findings in 369 cases. *J Small Anim Pract* 2009; 50: 23-9.

Martin MW, Stafford Johnson MJ, Strehlau G, King JN. Canine dilated cardiomyopathy: a retrospective study of prognostic findings in 367 clinical cases. *J Small Anim Pract* 2010; 51: 428-36.

Mausberg TB, Wess G, Simak J, Keller L, Drogemuller M, Drogemuller C, Webster MT, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Leeb T. A locus on chromosome 5 is associated with dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *PLoS One* 2011; 6: e20042.

McCutcheon LJ, Cory CR, Nowack L, Shen H, Mirsalami M, Lahucky R, Kovac L, O'Grady M, Horne R, O'Brien PJ. Respiratory chain defect of myocardial mitochondria in idiopathic dilated cardiomyopathy of Doberman pinscher dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 1992; 70: 1529-33.

Meurs KM, Spier AW, Wright NA, Hamlin RL. Comparison of in-hospital versus 24-hour ambulatory electrocardiography for detection of ventricular premature complexes in mature Boxers. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 222-4.

Meurs KM, Spier AW, Wright NA, Atkins CE, DeFrancesco TC, Gordon SG, Hamlin RL, Keene BW, Miller MW, Moise NS. Comparison of the effects of four antiarrhythmic treatments for familial ventricular arrhythmias in Boxers. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 522-7.

Meurs KM, Fox PR, Norgard M, Spier AW, Lamb A, Koplitz SL, Baumwart RD. A prospective genetic evaluation of familial dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1016-20.

Meurs KM, Lahmers S, Keene BW, White SN, Oyama MA, Mauceli E, Lindblad-Toh K. A splice site mutation in a gene encoding for PDK4, a mitochondrial protein, is associated with the development of dilated cardiomyopathy in the

Doberman pinscher. *Hum Genet* 2012; 131: 1319-25.

Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010; 16: 34-8.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-8.

Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K. Identification of Muscle-Specific MicroRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy. *PLoS One* 2011; 6: e18388.

Mortarino M, Gioia G, Gelain ME, Albonico F, Roccabianca P, Ferri E, Comazzi S. Identification of suitable endogenous controls and differentially expressed microRNAs in canine fresh-frozen and FFPE lymphoma samples. *Leuk Res* 2010; 34: 1070-7.

Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 2010; 123: 1603-11.

Naga Prasad SV, Duan ZH, Gupta MK, Surampudi VS, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Kotwal A, Moravec CS, Starling RC, Perez DM, Sen S, Wu Q, Plow EF, Croce CM, Karnik S. Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J Biol Chem* 2009; 284: 27487-99.

O'Brien PJ. Deficiencies of myocardial troponin-T and creatine kinase MB isoenzyme in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 1997;

58: 11-6.

O'Grady M. The Prevalence of Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinchers: A 4.5 Year Follow-Up. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 1.

O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 1187-207.

O'Grady MR, Minors SL, O'Sullivan ML, Horne R. Effect of pimobendan on case fatality rate in Doberman Pinschers with congestive heart failure caused by dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 897-904.

O'Grady MR, O'Sullivan ML, Minors SL, Horne R. Efficacy of benazepril hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 977-83.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL. Assessment of diastolic function by Doppler echocardiography in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007a; 21: 81-91.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL. Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007b; 21: 92-9.

Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010; 5: e13247.

Orenes-Pinero E, Montoro-Garcia S, Patel JV, Valdes M, Marin F, Lip GY. Role of microRNAs in cardiac remodelling: New insights and future perspectives. *Int J Cardiol* 2012: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.09.120>.

Owczarek-Lipska M, Mausberg TB, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Wess G, Leeb T. A 16-bp deletion in the canine PDK4 gene is not associated with dilated cardiomyopathy in a European cohort of Doberman Pinschers. *Anim Genet* 2012; 44: 239.

Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 831-9.

Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *Am J Vet Res* 2007; 68: 42-7.

Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 6328-33.

Pion PD, Kittleson MD, Rogers QR, Morris JG. Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science* 1987; 237: 764-8.

Poller W, Hajjar R, Schultheiss HP, Fechner H. Cardiac-targeted delivery of regulatory RNA molecules and genes for the treatment of heart failure. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 353-64.

Prosek R, Ettinger SJ. Biomarkers of Cardiovascular Disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7 edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2009: 1187 - 95.

Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 2006; 38 Suppl: S8-13.

Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, Lodish HF, Blüthner R. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2009; 105: 585-94.

Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 80: 193-208.

Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan GC. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* 2009; 119: 2357-66.

Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; 112: 55-9.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.

Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 2009; 82: 21-9.

Sandusky GE, Jr., Capen CC, Kerr KM. Histological and ultrastructural evaluation of cardiac lesions in idiopathic cardiomyopathy in dogs. *Can J Comp Med* 1984; 48: 81-6.

Satoh M, Nakamura M, Akatsu T, Shimoda Y, Segawa I, Hiramori K. Toll-like receptor 4 is expressed with enteroviral replication in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy. *Lab Invest* 2004; 84: 173-81.

Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2010; 16: 404-10.

Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. A Cellular MicroRNA, let-7i, Is a Novel Biomarker for Clinical Outcome in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Card Fail* 2011; 17: 923-9.

Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007; 100: 416-24.

Schober KE, Cornand C, Kirbach B, Aupperle H, Oechtering G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 381-8.

Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 918-25.

Shan ZX, Lin QX, Fu YH, Deng CY, Zhou ZL, Zhu JN, Liu XY, Zhang YY, Li Y, Lin SG, Yu XY. Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381: 597-601.

Simak J, Keller L, Killich M, Hartmann K, Wess G. Color-coded longitudinal interventricular septal tissue velocity imaging, strain and strain rate in healthy Doberman Pinschers. *J Vet Cardiol* 2011; 13: 1-11.

Singletary GE, Morris NA, Lynne O'Sullivan M, Gordon SG, Oyama MA. Prospective evaluation of NT-proBNP assay to detect occult dilated cardiomyopathy and predict survival in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 1330-6.

Sisson DD, Thomas WP, Keene BW. Primary Myocardial Disease in the Dog. In:

Textbook of Veterinary Internal Medicine, 5th edn. Ettinger SJ, Feldman ED, eds. Philadelphia: WB Saunders 2000: 874- 95.

Sleeper MM, Henthorn PS, Vijayasathya C, Dambach DM, Bowers T, Tijssens P, Armstrong CF, Lankford EB. Dilated cardiomyopathy in juvenile Portuguese Water Dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 52-62.

Spratt DP, Mellanby RJ, Drury N, Archer J. Cardiac troponin I: evaluation I of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 139-45.

Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-42.

Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 2007; 100: 1164-73.

Sucharov C, Bristow MR, Port JD. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 185-92.

Suckau L, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kockskamper J, Westermann D, Bisping E, Ly H, Wang X, Kawase Y, Chen J, Liang L, Sipo I, Vetter R, Weger S, Kurreck J, Erdmann V, Tschope C, Pieske B, Lebeche D, Schultheiss HP, Hajjar RJ, Poller WC. Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation* 2009; 119: 1241-52.

Summerfield NJ, Boswood A, O'Grady MR, Gordon SG, Dukes-McEwan J, Oyama MA, Smith S, Patteson M, French AT, Culshaw GJ, Braz-Ruivo L, Estrada A, O'Sullivan ML, Loureiro J, Willis R, Watson P. Efficacy of Pimobendan in the Prevention of Congestive Heart Failure or Sudden Death in Doberman Pinschers with Preclinical Dilated Cardiomyopathy (The PROTECT

Study). *J Vet Intern Med* 2012; 26: 1337-49.

Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 1991; 69: 1185-95.

Tang Y, Zheng J, Sun Y, Wu Z, Liu Z, Huang G. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J* 2009; 50: 377-87.

Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 1137-41.

Thomason JD, Kraus MS, Surdyk KK, Fallaw T, Calvert CA. Bradycardia-associated syncope in 7 Boxers with ventricular tachycardia (2002-2005). *J Vet Intern Med* 2008; 22: 931-6.

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007; 116: 258-67.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456: 980-4.

Tidholm A, Svensson H, Sylven C. Survival and prognostic factors in 189 dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Anim Hosp Assoc* 1997; 33: 364-8.

Tidholm A, Jonsson L. A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). *J Am Anim Hosp Assoc* 1997; 33: 544-50.

Tidholm A, Haggstrom J, Jonsson L. Prevalence of attenuated wavy fibers in myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212: 1732-4.

Tidholm A, Haggstrom J, Jonsson L. Detection of attenuated wavy fibers in the myocardium of Newfoundlands without clinical or echocardiographic evidence of heart disease. *Am J Vet Res* 2000; 61: 238-41.

Tidholm A, Haggstrom J, Borgarelli M, Tarducci A. Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. *Vet J* 2001; 162: 92-107.

Tidholm A, Jonsson L. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. *Vet Pathol* 2005; 42: 1-8.

Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010; 106: 1035-9.

Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010; 102: 1174-9.

Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002; 89: 3A-9A; discussion 10A.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654-9.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006; 20: 515-24.

van Empel VP, De Windt LJ, Martins PA. Circulating miRNAs: Reflecting or Affecting Cardiovascular Disease? *Curr Hypertens Rep* 2012; 14: 498-509.

van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18255-60.

van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007; 117: 2369-76.

van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007; 316: 575-9.

van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13027-32.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 423-33.

Vinall RL, Kent MS, deVere White RW. Expression of microRNAs in urinary bladder samples obtained from dogs with grossly normal bladders, inflammatory bladder disease, or transitional cell carcinoma. *Am J Vet Res* 2012; 73: 1626-33.

Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, Melillo G, Rigolini R, Costa E, Crea F, Capogrossi MC, Napolitano M, Martelli F. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 2010; 42: 420-6.

Vollmar A, Fox PR, Meurs KM, Liu SK. Dilated cardiomyopathy in juvenile doberman pinschers. *J Vet Cardiol* 2003; 5: 23-7.

Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010a; 31: 659-66.

Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4402-7.

Wang K, Long B, Zhou J, Li PF. miR-9 and NFATc3 regulate myocardin in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 2010b; 285: 11903-12.

Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010c; 38: 7248-59.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56: 1733-41.

Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* 2010a; 24: 533-8.

Wess G, Mäurer J, Simak J, Hartmann K. Use of Simpson's method of disc to detect early echocardiographic changes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010b; 24: 1069-76.

Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a 24-hour ambulatory ECG. *J Vet Intern Med* 2010c; 24: 367-71.

Wess G, Mäurer J, Simak J, Hartmann K (2010d) Comparison of New Reference Values of Biplane Simpson Rule and New M-Mode Reference Values to Detect Early Echocardiographic Changes in Doberman Pinschers with DCM. American Collage of Veterinary Internal Medicine Forum 2010, 9-12 June 2010. Anaheim, California, USA. 156-7

Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Am J Vet Res* 2011; 72: 642-9.

Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007; 13: 486-91.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-6.

Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating MicroRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 53: 26-33.

Zen K, Zhang CY. Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev* 2010; 32: 326-48.

Zhang X, Wang X, Zhu H, Zhu C, Wang Y, Pu WT, Jegga AG, Fan GC. Synergistic effects of the GATA-4-mediated miR-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death. *J Mol Cell Cardiol* 2010a; 49: 841-50.

Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010b; 39: 133-44.

Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, Fei M, Sun S. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* 2010c; 56: 1830-8.

Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, Chen D, Xu J, Huo R, Dai J, Xia Y, Pan S, Hu Z, Sha J. Early Second-Trimester Serum MiRNA Profiling Predicts Gestational Diabetes Mellitus. *PLoS One* 2011; 6: e23925.

Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One* 2010; 5: e13735.

Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007; 129: 303-17.

Zhou B, Rao L, Peng Y, Wang Y, Chen Y, Song Y, Zhang L. Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 2010; 32: 60-5.

Zhu HT, Dong QZ, Wang G, Zhou HJ, Ren N, Jia HL, Ye QH, Qin LX. Identification of Suitable Reference Genes for qRT-PCR Analysis of Circulating microRNAs in Hepatitis B Virus-Infected Patients. *Mol Biotechnol* 2011; 50: 49-56.

Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* 2010; 124: 217-26.

VIII. ANHANG

Tabelle 1: Darstellung der bisher belegten Expressionsunterschiede bestimmter miRNAs (erhöhte (↑) oder erniedrigte (↓) Expression) bei der Dilatativen Kardiomyopathie.

miRNA	↑/↓ Regulation bei der DCM	Referenz
let-7b	↑	(IKEDA et al., 2007)
let-7c	↑	(IKEDA et al., 2007)
let-7i	↓	(SATO et al., 2011)
miR-1	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-10b	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-15b	↑	(IKEDA et al., 2007)
miR-17-5p	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-19a	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-19b	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-20a	↓	(IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008)
miR-20b	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-21	↑	(SATO et al., 2011)
miR-22	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-23a	↑	(IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008)
miR-28	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-30c	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-30e-5p	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-92	↑	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-99b	↑	(IKEDA et al., 2007)
miR-100	↑	(IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008)
miR-101	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-103	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-106a	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-125b	↑	(IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008)
miR-126	↓	(SATO et al., 2011)
miR-126*	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-133a	↓	(LIU et al., 2008; SUCHAROV et al., 2008)
miR-133b	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-139	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-140*	↑	(IKEDA et al., 2007)
miR-150	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-155	↓	(SATO et al., 2011)
miR-181b	↑	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-195	↑	(VAN ROOIJ et al., 2006; IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008)
miR-197	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-199a*	↑	(IKEDA et al., 2007)
miR-208	↑	(SATO et al., 2010)
miR-208b	↑	(SATO et al., 2010)

miR-214	↑	(IKEDA et al., 2007)
miR-221	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-222	↓	(IKEDA et al., 2007)
miR-342	↑	(IKEDA et al., 2007)
miR-382	↑	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-422b	↓	(IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008)
miR-483	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-486	↓	(SUCHAROV et al., 2008)
miR-499	↑	(SATO et al., 2010)
miR-594	↓	(SUCHAROV et al., 2008)

IX. DANKSAGUNG

An der Entwicklung, Durchführung und Fertigstellung meiner Dissertation waren folgende Personen beteiligt, bei denen ich mich hiermit recht herzlich bedanken möchte:

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Gerhard Wess für die lehrreichen Jahre in seinem kardiologischen Team und die Unterstützung bei der Durchführung meiner Dissertation bedanken. Die klinische Arbeit in der Sprechstunde, die Unterrichtung der Studenten, wie auch die Teilnahme und Unterstützung zahlreicher Fortbildungen hat mir stets sehr viel Freude bereitet. Vielen Dank!

Ich möchte mich sehr herzlich bei Dr. Karin Weber für die Planung und Unterstützung bei allen labormedizinischen Aufgaben bedanken, ohne die die technische Durchführung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre. Danke für Deine Zeit, Dein stets offenes Ohr, Deine Ideen und die konstruktive Kritik.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Katrin Hartmann für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Gerätschaften der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München, die für die Untersuchung der Patienten und die labormedizinische Durchführung meines Promotionsprojektes erforderlich waren.

Vielen Dank an Dr. Stefan Bauersachs und seinem Team der LAFUGA im Genzentrum der LMU München. Durch die zur Verfügung gestellten weiteren Gerätschaften und Räumlichkeiten wurde die sichere technische Durchführung des Mikroarray auf internationalem Niveau gewährleistet. Vielen Dank für die freundliche Zusammenarbeit, Deine Auswertung und statistische Beratung sowie die anregenden Diskussionen und Deine wertvolle Kritik.

Großer Dank gilt Dr. Lisa Keller und Dr. Julia Simak, die ihr erfahrenes kardiologisches wie auch internistisches Fachwissen mit mir teilten und damit einen überragenden Teil zu meiner Ausbildung beitrugen. Danke für Euer immer offenes Ohr, Eure Geduld und Eure Freundschaft.

Ich danke meinen Kolleginnen, Nadine und Claudia, für die unglaublich tolle Zeit in der Kardiologie, die ohne Euch niemals so viel Spaß gemacht hätte! Danke für Eure ehrliche Freundschaft, die ich sehr schätze und nicht missen möchte. Danke,

Elli, Alex, Anja und Johanna für Eure tolle Einarbeitung und die schnelle und offene Aufnahme in Euer Team! Danke an das gesamte Kardio-Team!

Der größte Dank gilt meiner Familie. Danke, Mama und Salva, für Eure allgegenwärtige Unterstützung, Beratung und Zuversicht sowie die zwischenzeitliche Betreuung von Balu. Danke, Papá, für Deine Unterstützung und Zuwendung. Ich danke meiner Schwester Lena dafür, dass sie mir als größtes Vorbild in meinem Leben voranschreitet und immer an meiner Seite ist.

Vielen Dank, liebe Melanie, für Deine Unterstützung in allen Lebenslagen, deine treue Freundschaft und Ehrlichkeit während der gesamten Studiums- und Dissertationszeit.

Danke auch an meine geliebten Haustiere, Balu und Taylor, die mit Ihren unschuldigen Blicken und plötzlichen Schmuseattacken oft für Abwechslung und Aufheiterung sorgten und meinen Blick auf das Wesentliche im Leben richteten!