

UNTERSUCHUNG UND VERGLEICH DER MIKRO-  
RIBONUKLEINSÄURE EXPRESSIONSPROFILE IM  
SERUM IN DEN VERSCHIEDENEN STADIEN DER  
DOBERMANN KARDIOMYOPATHIE

von Laura Ulla Teresa Mang

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

UNTERSUCHUNG UND VERGLEICH VON MIKRO-  
RIBONUKLEINSÄURE EXPRESSIONSPROFILIEN IM  
SERUM IN DEN VERSCHIEDENEN STADIEN DER  
DOBERMANN KARDIOMYOPATHIE

von Laura Ulla Teresa Mang

aus Ingolstadt

München 2016

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Privatdozent Dr. Gerhard Wess

**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. Eckhard Wolf  
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

**Tag der Promotion:** 06. Februar 2016

**Meiner Familie**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>5</b>
<b>1.</b>	<b>Die Dilatative Kardiomyopathie des Dobermanns.....</b>	<b>5</b>
1.1.	Definition und Prävalenz.....	5
1.2.	Genetik .....	6
1.3.	Pathophysiologie .....	7
1.4.	Verlaufsformen der Erkrankung und Klinik .....	9
1.5.	Diagnostische Möglichkeiten .....	12
1.5.1.	Anamnese und klinische Untersuchung .....	12
1.5.2.	Kardiovaskuläre Untersuchung .....	13
1.5.3.	Röntgenologische Untersuchung.....	14
1.5.4.	Elektrokardiographie .....	14
1.5.4.1.	Kurzzeit-EKG.....	15
1.5.4.2.	Langzeit-EKG .....	15
1.5.5.	Echokardiographische Untersuchung.....	16
1.5.6.	Kardiale Biomarker .....	18
1.5.7.	Pathologische und histopathologische Untersuchung .....	20
1.6.	Therapie.....	21
1.6.1.	Management der okkulten Phase.....	22
1.6.2.	Management der symptomatischen Phase.....	24
1.7.	Prognose .....	25
<b>2.</b>	<b>Mikro-Ribonukleinsäuren .....</b>	<b>27</b>
2.1.	Allgemeine Informationen .....	27
2.1.1.	Definition und Entdeckung .....	27
2.1.2.	Biogenese .....	28
2.1.3.	Wirkmechanismus .....	29
2.1.4.	Eigenschaften .....	30
2.1.5.	Vorkommen und Freisetzung .....	31
2.1.6.	Nachweismöglichkeiten .....	32
2.2.	Einsatzmöglichkeiten als Biomarker.....	33
2.2.1.	Einsatzmöglichkeiten als Biomarker nicht-kardialer Erkrankung .....	34
2.2.2.	Einsatzmöglichkeiten als Biomarker kardialer Erkrankung.....	35

---

2.3.	Canine Mikro-Ribonukleinsäuren .....	37
2.4.	Kardiale Mikro-Ribonukleinsäuren.....	38
2.4.1.	Mikro-Ribonukleinsäuren bei kardialer Pathophysiologie .....	38
2.4.2.	Mikro-Ribonukleinsäuren bei Dilatativer Kardiomyopathie .....	42
2.5.	Neuartige Therapieansätze mit Mikro-Ribonukleinsäuren .....	44
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Aufbau der retrospektiven Longitudinalstudie.....</b>	<b>47</b>
1.1.	Allgemeine Angaben.....	47
1.2.	Auswahl des Untersuchungsmaterials.....	47
<b>2.</b>	<b>Auswahl der Patienten .....</b>	<b>48</b>
2.1.	Einschlusskriterien .....	48
2.2.	Definition der gebildeten Gruppen.....	49
2.3.	Patientengut.....	50
2.4.	Durchgeführte Untersuchung .....	52
2.4.1.	Allgemeine Untersuchung.....	52
2.4.2.	Kurzzeit-Elektrokardiogramm .....	52
2.4.3.	Langzeit-Elektrokardiogramm .....	52
2.4.4.	Herzultraschalluntersuchung.....	53
2.4.5.	Blutentnahme .....	55
2.5.	Therapeutische Intervention.....	55
<b>3.</b>	<b>Laborverfahren .....</b>	<b>55</b>
3.1.	Extraktion der RNA .....	56
3.2.	Reverse Transkription .....	57
3.3.	Präamplifikation .....	57
3.4.	Real-Time-quantitative-PCR.....	58
3.5.	Datenauswertung.....	59
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>61</b>
<b>1.</b>	<b>Beurteilung des Laborverfahrens .....</b>	<b>61</b>
1.1.	Signalstärke der Mikro-Ribonukleinsäuren .....	61
1.2.	Referenzgene der relativen Quantifizierung .....	62
1.3.	Qualitätskontrolle .....	65
<b>2.</b>	<b>Mikro-Ribonukleinsäure-Expression .....</b>	<b>68</b>

---

2.1.	Datenanalyse .....	68
2.2.	Mikro-Ribonukleinsäuren mit gesteigerter Expression .....	72
2.3.	Mikro-Ribonukleinsäuren mit herunterregulierter Expression .....	74
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>87</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>90</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>126</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>132</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Afib	Vorhofflimmern
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AS	Aortenstenose
AVG	Average, Durchschnitt
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
cDNA	Complementary DNA
CSE	Cysthathionine- $\gamma$ -Lyase
Ct	Cycle threshold
cTnI	kardiales Troponin I
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EKG	Elektrokardiogramm
EPSS	E-Point-to-Septal-Separation
FC	Fold Change
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NT-proBNP	N-terminales Propeptid BNP
p	p-Wert
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKD	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
pre-miRNA	precursor-miRNA
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SI	Sphärizitätsindex
SVES	Supraventrikuläre Extrasystolen
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UTR	Untranslatierter Bereich
VES	Ventrikuläre Extrasystolen

## I. EINLEITUNG

Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO*) definiert primäre Kardiomyopathien in ihrem 1995 erschienenen Bericht als heterogene Erkrankungen des Myokards, die mit kardialer Dysfunktion einhergehen. Zu diesen werden die Formen *Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)*, *Dilatative Kardiomyopathie (DCM)*, *Restriktive Kardiomyopathie (RCM)*, *Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)* und *Unklassifizierte Kardiomyopathie (UCM)* gezählt (RICHARDSON et al., 1996). Die Dilatative Kardiomyopathie weist beim Menschen eine Prävalenz von 36,5/100.000 auf (CODD et al., 1989). Beim Hund ist die DCM eine der häufigsten erworbenen Kardiomyopathien und tritt vor allem bei großen Vertretern dieser Spezies und bei Riesenrassen auf. Sie ist durch exzentrische Hypertrophie und verminderte Kontraktilität des Myokards gekennzeichnet (VOLLMAR, 2000; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; BROSCHK & DISTL, 2005). Zu den ätiologischen Einflussfaktoren zählen neben Genetik, Infektion, Intoxikation, Endokrinopathie und Entzündung auch metabolische und nutritive Ursachen sowie persistierende Tachykardie (KITTLESON, 1998; TIDHOLM et al., 2001). Bei Dobermännern existiert eine familiäre Sonderform der DCM, die sich durch einen chronisch progressiven Verlauf mit später klinischer Manifestation bei Tieren mittleren Alters auszeichnet (HAZLETT et al., 1983; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; WESS et al., 2010c). Die hohe Prävalenz der Erkrankung ist auf einen autosomal dominanten Erbgang zurückzuführen (MEURS et al., 2007). Ein Schaden auf zellulärer Ebene des Myokards führt zu systolischer Dysfunktion und ventrikulären Tachyarrhythmien (CALVERT & MEURS, 2000b; CALVERT & BROWN, 2004). Besonderheit der Erkrankung ist eine meist länger andauernde okkulte Phase (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004), die diagnostisch bisher nur durch eine Kombination aus echokardiographischer Untersuchung und 24-Stunden-*Elektrokardiogramm (EKG)* erfasst werden kann (CALVERT et al., 1997a). Im klinischen Stadium dominieren neben durch Arrhythmien bedingten Symptomen wie Schwäche, Kollaps, Synkopen und Sekudentod insbesondere Anzeichen kongestiven Herzversagens.

*Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs)* sind kleine, endogene, nicht-kodierende, einzelsträngige *Ribonukleinsäuren (RNAs)*, die hochkonserviert in allen bekannten Genomen nachweisbar sind (LAGOS-QUINTANA et al., 2003). Sie liegen gehäuft in Regionen zwischen den Genen und ihre Umsetzung wird durch größtenteils

unbekannte Mechanismen gesteuert (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; AMBROS, 2008). Durch die Bindung bestimmter miRNAs an ihre jeweils spezifische Ziel-messengerRNA (*mRNA*) wird deren posttranskriptionale Verarbeitung beeinflusst und so die Proteinbiosynthese moduliert. Die daraus resultierende abnorme Proteinproduktion wiederum setzt individuell weitere Prozesse in Gang. Auf diese Weise nehmen miRNAs direkt oder indirekt Einfluss auf die Entwicklung und Pathophysiologie von Organen und Zellen und sind auch mit der Entstehung und Progression von Erkrankungen vergesellschaftet (HE & HANNON, 2004; MASSIRER & PASQUINELLI, 2006; HWANG & MENDELL, 2007). MiRNAs werden zellspezifisch exprimiert und die Höhe ihrer Umsetzung hängt von dem jeweiligen Entwicklungszustand oder der jeweiligen Pathophysiologie des Organs ab (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BARTEL, 2004). Sie sind äußerst stabil und lassen sich aus Gewebeproben und Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma, Urin oder Speichel nachweisen (TURCHINOVICH & CHO, 2014). Mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Verfahren wie *Mikroarray-Analysen*, *Northern Blotting* oder Methoden, die auf *Polymerase-Ketten-Reaktion* (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) basieren, können organspezifische physiologische Expressionsprofile erstellt und mit verschiedenen Pathologien abgeglichen werden (KONG et al., 2009; ETHERIDGE et al., 2011). Veränderungen in der Umsetzung bestimmter miRNAs dienen oftmals wie ein Fingerabdruck der Erkennung einer Erkrankung, so dass diese Ribonukleinsäuren das Potential eines leicht zugänglichen, stabilen und sensitiven Biomarkers zu haben scheinen (CHEN et al., 2008b). Aus verschiedenen medizinischen Bereichen wie der Onkologie, Endokrinologie oder Kardiologie liegen bereits erste positive Ergebnisse über die diagnostische Aussagekraft von zirkulierenden miRNAs vor (BARTELS & TSONGALIS, 2009; CREEMERS et al., 2012; CHAKRABORTY et al., 2014). Bei Patienten mit DCM konnten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe Abweichungen in der miRNA-Expression festgestellt werden (SUCHAROV et al., 2008; NAGA PRASAD et al., 2009; ZHU et al., 2013). Diese Ergebnisse werden ergänzt und bestätigt von einer ersten Pilotstudie aus der Veterinärmedizin, welche die Umsetzung kardialer miRNAs bei Dobermännern mit DCM und gesunden Tieren dieser Rasse untersuchte (STEUDEMANN et al., 2013).

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die kardialen miRNAs im Serum bei

Dobermännern mit Dilatativer Kardiomyopathie in den verschiedenen Krankheitsstadien zu untersuchen und zu klären, ob sich die miRNA-Expressionsprofile zwischen den Phasen der Erkrankung signifikant unterscheiden. Hierfür wurden Tiere ausgewählt, bei denen mehrfach eine komplette Untersuchung (Anamnese, klinische und kardiologische Untersuchung, Kurzzeit- sowie Langzeit-Elektrokardiogramm und Echokardiographie) mit progressiven kardialen Befunden erfasst wurde. Aufgrund dieser Befunde wurden die Besuche der Tiere entsprechenden Gruppen zugeordnet (Untersuchungsgruppe „Gesund“, „Frühphase“, „okkulte Phase B1“, „okkulte Phase B2“). Die aus dem Serum extrahierte Gesamt-RNA wurde auf spezielle Mikrotiterplatten (*PCR-Arrays*) mit 384 Kavitäten aufgebracht, die mit Hilfe des Verfahrens *Quantitative Echtzeit-PCR* (*qPCR*) untersucht wurden.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Die Dilatative Kardiomyopathie des Dobermanns**

Bei der DCM handelt es sich um eine der häufigsten erworbenen Herzerkrankungen bei großen Hunden und bei Riesenrassen (VOLLMAR, 2000; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; BROSCHEK & DISTL, 2005). Dobermänner sind besonders häufig von dieser Krankheit betroffen (SISSON & THOMAS, 1995; CALVERT et al., 1997b; MARTIN et al., 2009). Bei ihnen existiert eine familiäre Sonderform der DCM, bei der neben einer beeinträchtigten Pumpleistung des Herzens auch Rhythmusstörungen vorhanden sein können (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Es ist beschrieben, dass betroffene Hunde bereits vor ersten klinischen Symptomen spontan aufgrund maligner Arrhythmien versterben (CALVERT et al., 1997a). Wird das symptomatische Stadium durch Auftreten klinischer Anzeichen kongestiven Herzversagens erreicht, verläuft die Erkrankung meist rapide progressiv (CALVERT et al., 1982; O'GRADY M & HORNE, 1998; CALVERT & BROWN, 2004; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004).

#### **1.1. Definition und Prävalenz**

Beim Dobermann existiert eine familiäre Sonderform der Dilatativen Kardiomyopathie, die bei beiden Geschlechtern auftritt (CALVERT et al., 1982; SMUCKER et al., 1990; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1997b). Die Erkrankung kommt weltweit bei Tieren dieser Rasse vor, wobei Studien in Nordamerika eine Prävalenz von 47 % bis zu 63,2 % bei der Rasse zeigen konnten (O'GRADY M & HORNE, 1998; CALVERT et al., 2000b). Wess et al. wiesen in der europäischen Population eine kumulative Prävalenz von 58,2 % nach (WESS et al., 2010c). Frühere Veröffentlichungen postulierten, dass männliche Dobermänner häufiger an DCM erkranken als Hündinnen dieser Rasse (CALVERT et al., 1997b; O'GRADY M & HORNE, 1998; CALVERT et al., 2000b). Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Erkrankung bei beiden Geschlechtern mit gleicher Häufigkeit aufzutreten scheint (MEURS et al., 2007; WESS et al., 2010c). Es wird allerdings vermutet, dass der Krankheitsverlauf geschlechtsabhängig ist (WESS et al., 2010c). Die DCM tritt bei Dobermännern klinisch meist früher in Erscheinung als bei Hunden anderer Rassen (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Typischerweise entwickeln betroffene Tiere im mittleren Alter von fünf bis zehn

Jahren Symptome der Erkrankung, doch selten können auch sehr junge oder alte Hunde betroffen sein (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997b; WESS et al., 2010c). Bereits frühzeitig kann es vor Auftreten klinischer Symptome zu spontanen, durch Arrhythmien bedingten Todesfällen kommen (CALVERT et al., 1982; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Die Dobermann Kardiomyopathie verläuft typischerweise in drei Stadien: Stadium I (*Frühphase*), Stadium II (*okkulte Phase*) und Stadium III (*symptomatische Phase*) (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1997b; PETRIC et al., 2002; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004).

## 1.2. Genetik

Die hohe kumulative Prävalenz der Erkrankung innerhalb der Rasse lässt eine familiäre Prädisposition vermuten. Neuere Untersuchungen postulierten, dass der DCM des Dobermanns ein autosomal dominanter Erbgang zu Grunde liegt (MEURS et al., 2007; WESS et al., 2010c). Beim Menschen soll eine genetische Ätiologie für bis zu 35 % der Fälle Dilatativer Kardiomyopathie verantwortlich sein, wobei für diese ein monogener, autosomal dominanter Erbgang vermutet wird (GRUNIG et al., 1998). Taylor et al. gehen sogar bei bis zu 48 % der Erkrankungsfälle von einem genetischen Hintergrund aus (TAYLOR et al., 2006). Der Dobermann kann aus verschiedenen Gründen als ein exzellentes genetisches Modell für die Humanmedizin angesehen werden: Durch selektive Zucht wurde der Genpool der Rasse stark eingeschränkt und weist nur noch wenig Heterogenität auf. Des Weiteren existieren viele Parallelen zwischen Erbkrankheiten des Menschen und denen des Hundes. Moderne Untersuchungsmethoden erlauben zudem beim Hund eine ähnlich umfassende internistische Befunderhebung, wie sie beim Menschen möglich ist (SMUCKER et al., 1990). In der Humanmedizin wurden zwei Mutationen des kardialen *Aktin*-Gens als kausative Faktoren identifiziert, die zur Entstehung familiärer DCM beitragen (OLSON et al., 1998). Bei einer Untersuchung von Dobermännern mit dieser Erkrankung auf diese Genmutation hin konnten Meurs et al. keinen Zusammenhang zwischen dieser Veränderung und einer Ausprägung der Erkrankung ausmachen (MEURS et al., 2001b). Eine genomweite Assoziationsstudie aus den Vereinigten Staaten von Amerika konnte 2012 zeigen, dass eine Deletionsmutation des Gens, das für das mitochondriale Protein *Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PKD)* kodiert, mit Ausbildung der Erkrankung in Verbindung steht. Betroffen ist hierbei das *Isoenzym 4* der PKD

(MEURS et al., 2012). Ein genetisches Screening in der Dobermannpopulation in Deutschland und England konnte die Deletionsvariante des besagten Gens sowohl bei gesunden als auch erkrankten Hunden nachweisen. Man vermutet daher, dass die PKD-Mutation beim europäischen Dobermann nicht in Zusammenhang mit der phänotypischen Ausbildung der Erkrankung steht (OWCZAREK-LIPSKA et al., 2013).

Im Jahr 2011 wurde eine genomweite Assoziationsstudie bei einer Dobermannpopulation in Deutschland durchgeführt. Es konnte bei etwa der Hälfte der erkrankten Hunde ein Zusammenhang zwischen Dilatativer Kardiomyopathie und mehreren Einzelnukleotid-Polymorphismen im Bereich von Chromosom 5 nachgewiesen werden. Ein Abgleich mit einer Dobermannkohorte in England zeigte, dass die besagten Risikoallele auch dort bei erkrankten Tieren zu finden waren. Verantwortliche Gene selbst konnten nicht benannt werden, so dass zu vermuten bleibt, dass es sich nicht um einen monogenetischen Erbgang handelt, sondern dass eine Vielzahl genetischer Risikofaktoren zur Entstehung dieser Erbkrankheit beiträgt (MAUSBERG et al., 2011).

### 1.3. Pathophysiologie

Das Hauptmerkmal der Dilatativen Kardiomyopathie ist eine Reduktion der myokardialen Kontraktionsfähigkeit (WYNNE & BRAUNWALD, 1997). Pathologische Veränderungen in der Genexpression der Kardiomyozyten führen zu Veränderungen des Zellmetabolismus und verursachen durch Beeinträchtigung von Vitalität und Inotropie eine progressive Erweiterung der Ventrikel mit zunächst systolischer, später auch diastolischer Dysfunktion. Die genauen Mechanismen, die auf molekularer Ebene die Genexpression der Kardiomyozyten beeinflussen, sind bisher unbekannt (IKEDA et al., 2007).

Pathophysiologisch scheint eine inadäquate Produktion von *Adenosintriphosphat* (ATP) in den Mitochondrien der Herzmuskelzellen mitverantwortlich für eine reduzierte Kontraktilität zu sein. Eine kanadische Studie konnte durch den Vergleich metabolischer Aktivität in Herzmuskelzellen gesunder Mischlingshunde und an DCM erkrankter Dobermänner mögliche Ursachen hierfür aufzeigen. Bei DCM ist die mitochondriale Elektronentransportaktivität bei gleichzeitiger energetischer Verarmung und Azidose der Zellen deutlich herabgesetzt (MCCUTCHEON et al., 1992; O'BRIEN et al., 1992). Auch die Konzentration von

Myoglobin, das als sarkoplasmatischer Speicher und Transporter für Sauerstoff fungiert und so vor Hypoxie schützt, war in erkrankten Herzmuskelzellen deutlich reduziert. O'Brien et al. zeigten, dass bei einem experimentell durch anhaltende Tachykardie induzierten Myokardversagen der Myoglobingehalt in den Kardiomyozyten deutlich vermindert ist (O'BRIEN et al., 1992). Ob diese metabolischen Defekte, die für kongestives Herzversagen prädisponieren, primär genetisch verankert oder Folge einer rasseeigenen defizitären Atmungskette sind, bleibt unklar (MCCUTCHEON et al., 1992).

Seit die Rolle neurohumoraler kompensatorischer Mechanismen des Körpers näher bekannt ist, wurde offensichtlich, dass es sich bei kongestivem Herzversagen nicht nur um die Folge einer Pumpschwäche des Herzens sondern um ein komplexes Syndrom handelt (BORGARELLI et al., 2001). Während des asymptomatischen Krankheitsstadiums versucht der Körper durch das Zusammenspiel neurohumoraler und endokriner Substanzen den Herzauswurf und damit die Perfusion lebensnotwendiger Organe konstant zu gewährleisten. Da das Schlagvolumen durch die verminderte Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels abnimmt, verbleibt endsystolisch mehr Blut in den Ventrikeln und die Vorlast ist erhöht. Aufgrund des verminderten Herzauswurfs fällt der Blutdruck ab und der Sympatikotonus steigt als erste gegenregulatorische Maßnahme an, wodurch Herzfrequenz und Pumpkraft erhöht werden (positiv chronotrope und inotrope noradrenerge Wirkung). Der Blutdruckabfall stimuliert auch die Freisetzung von *Renin* aus dem juxtaglomerulären Apparat und damit die Aktivierung des *Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)*. Renin führt zu Aktivierung von *Angiotensin-II*, einem Peptid, das eine Vasokonstriktion und damit eine Erhöhung der Nachlast bewirkt. Zum anderen induziert Renin durch die Freisetzung von *Aldosteron* und dem *Anti-Diuretischen-Hormon (ADH)* eine Flüssigkeitsretention und stabilisiert durch diese Wirkmechanismen den Blutdruck (NICHOLLS et al., 1981; UNGER, 2000). Das Blutvolumen wird somit durch Aktivierung des RAAS vermehrt und das Schlagvolumen normalisiert sich. Da die sekundäre Volumenüberladung zu einer Dehnung des Herzmuskels führt, wird das Wachstum der Myozyten stimuliert und es resultiert eine exzentrische Hypertrophie (WYNNE & BRAUNWALD, 1997). Viele dieser beteiligten Modulatoren üben zusätzlich einen Stimulus auf Zellproliferation und Fibrosierung von Myokard und Gefäßwänden aus und induzieren dadurch das sogenannte *Remodeling* (UNGER, 2000; BORGARELLI et

al., 2001). Diese Umbauprozesse des Herzmuskels führen zu einer gestörten Relaxation des Myokards. Durch vermehrte Rigidität des Muskels wird die Füllung der Ventrikel erschwert und es resultiert eine zusätzliche diastolische Dysfunktion (OHTANI et al., 2012). Im chronisch progressiven Verlauf der Erkrankung kann das Myokard der Ventrikel nicht weiter gedehnt werden, so dass es aufgrund der Druckerhöhung zu einer Dilatation der Vorhöfe und letztendlich zu kardialer Dekompensation kommt. Liegen Arrhythmien vor, können diese durch ihre hämodynamische Beeinträchtigung zusätzlich ein Herzversagen begünstigen (KITTLESON, 1998).

Humanmedizinische Studien evaluierten das autonome Wechselspiel von Sympathikus und Parasympathikus bei Patienten im Herzversagen im Vergleich zu gesunden Individuen. Hierbei wurde festgestellt, dass der Tonus des Sympathikus erhöht und der Parasympathikotonus sowie die Sensitivität der Barorezeptoren erniedrigt sind (PORTER et al., 1990; CREAGER & CREAGER, 1994). Auch bei der DCM des Dobermanns stellt sich bei verminderter Pumpkraft des Herzens eine generalisierte Aktivierung neurohumoraler Substanzen ein und der Parasympathikus wird herabreguliert, um die vorherrschende Kreislaufsituation zu stabilisieren. Auf lange Sicht begünstigen diese Faktoren allerdings eine kardiale Dekompensation (KLUGER et al., 1982; FLORAS, 1993).

#### **1.4. Verlaufsformen der Erkrankung und Klinik**

Die Dilatative Kardiomyopathie verläuft beim Dobermann typischerweise in drei aufeinanderfolgenden Krankheitsstadien (siehe Abbildung 1).

In der *Frühphase* vollzieht sich der Schaden auf zellulärer Ebene des Myokards. Es liegen keine morphologischen Veränderungen vor. Die echo- und elektrokardiographisch erhobenen Befunde sind physiologisch (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Diese Krankheitsphase kann mit aktuell verfügbaren diagnostischen Mitteln nicht erfasst werden.

Die *okkulte Phase* zeichnet sich durch das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien variablen Ausmaßes sowie progressiver Dimensionsveränderungen des Herzens aus (CALVERT et al., 1982; CALVERT & BROWN, 1986). Diese morphologischen und elektrischen Anomalitäten liegen bei der DCM des Dobermanns meist gemeinsam vor, allerdings kann auch nur eine Form dominieren (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Treten zuerst isolierte Arrhythmien auf, entwickeln sich

echokardiographische Veränderungen meist innerhalb von ein bis zwei Jahren (CALVERT & MEURS, 2000b). Typischerweise handelt es sich bei den elektrokardiographischen Veränderungen um ventrikuläre Extrasystolen (VES), doch auch supraventrikuläre Extrasystolen (SVES) oder Vorhofflimmern (*Atrial fibrillation*, *Afib*) können auftreten (CALVERT & WALL, 2001). Calvert et al. stellten fest, dass mit zunehmendem Alter eines Dobermanns die Wahrscheinlichkeit ansteigt, dass während eines 24-Stunden-EKGs mindestens eine VES auftritt (CALVERT et al., 2000b). Bei weiblichen Hunden kommen signifikant häufiger ventrikuläre Rhythmusstörungen vor als bei männlichen Tieren und diese treten meist bereits vor echokardiographischen Veränderungen oder gar isoliert auf. Rüden weisen dagegen vermehrt Abnormitäten bei der Herzultraschalluntersuchung auf und zeigen häufiger Anzeichen kongestiven Herzversagens als Hündinnen (CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; WESS et al., 2010c). Während der okkulten Phase versterben bereits bis zu 30 % der Tiere am sogenannten Sekudentod. Meist werden hierfür maligne, ventrikuläre Tachyarrhythmien verantwortlich gemacht, die einen akuten Bewusstseinsverlust und einen Herztod bei betroffenen Hunden auslösen (CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 2000a; CALVERT & WALL, 2001; CALVERT & BROWN, 2004). In seltenen Fällen können auch neurogen bedingte vasovagale Synkopen mit spontaner Reflexbradykardie und peripherer Vasodilatation auftreten; diese Episoden werden vergleichsweise häufig überlebt (CALVERT et al., 1996). Generell scheinen Tiere, die am Sekudentod versterben, im Schnitt etwa ein Jahr jünger zu sein als Hunde, die ein kongestives Herzversagen entwickeln (CALVERT et al., 1997a). In der okkulten Phase zeigen betroffene Tiere keinerlei klinische Symptome, so dass dieser Abschnitt der Erkrankung für den Besitzer unerkant bleibt. Das Stadium dauert je nach Zeitpunkt der ersten Detektion circa zwei bis vier Jahre (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Die Progression der Erkrankung von der okkulten in die symptomatische Phase verläuft bei der DCM des Dobermanns meist schneller als bei der DCM anderer Rassen (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004).

In der *symptomatischen Phase* entwickeln betroffene Tiere erste Anzeichen der zugrunde liegenden Herzerkrankung und werden aus diesem Grund meist in tierärztliche Behandlung gegeben. Frühe klinische Anzeichen von DCM sind Leistungsintoleranz oder abnehmende Leistungsbereitschaft, Schwäche sowie das Auftreten von Synkopen. Diese werden meist durch anhaltende Tachyarrhythmien

ausgelöst, die eine Minderperfusion des Gehirns verursachen und somit einen spontanen Bewusstseinsverlust auslösen. Wird das Tier nach einer Synkope, die durch maligne Arrhythmien ausgelöst wurde, nicht antiarrhythmisch therapiert, versterben bis zu 50 % der Patienten innerhalb der darauf folgenden sechs Wochen am Sekudentod (CALVERT & MEURS, 2000a). Selten treten bei der DCM des Dobermanns multiple synkopale Episoden auf; meist versterben die Hunde bereits bei dem ersten Ereignis (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004).

Schreitet die Erkrankung fort, treten auch Symptome eines progressiven Herzversagens auf. Unter Herzversagen versteht man die Unfähigkeit des Herzens, durch ausreichende Pumpleistung den metabolischen Bedarf des Körpers zu decken. Es kann sowohl diastolisches Herzversagen aufgrund einer gestörten Relaxation des Kammermyokards als auch systolisches Herzversagen, verursacht durch mangelhafte Kontraktionsfähigkeit der Ventrikel, vorliegen (LIEW & DZAU, 2004). Meist tritt bei der DCM ein Linksherzversagen mit Vergrößerung des linken Vorhofs und Entstehung eines Lungenödems auf, es kann in seltenen Fällen allerdings auch bilaterales Herzversagen bestehen (CALVERT et al., 1997a). Eine Untersuchung konnte zeigen, dass sportlich genutzte Tiere bis zu zwei Wochen vor der Entwicklung eines kongestiven Herzversagens uneingeschränkte Leistung zeigten, da der Körper die Erkrankung und deren Auswirkungen auf den Kreislauf lange kompensieren kann (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Deutliche Symptome kongestiven Herzversagens sind Tachykardie, Husten und Tachypnoe bis hin zu Dyspnoe. Kardiale Todesursache ist in dieser Phase meist Sekudentod, kardialer Schock oder Versterben/Euthanasie aufgrund hochgradigen oder therapieresistenten Herzversagens (JAMES & DRAKE, 1968; CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b; PETRIC et al., 2002). Ist das letzte Stadium mit dem Auftreten klinischer Symptome erreicht, verläuft die Erkrankung meist rapide progressiv (CALVERT et al., 1982; O'GRADY M & HORNE, 1998; CALVERT & BROWN, 2004; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns (Stadium I: Frühphase, Stadium II: okkulte Phase, Stadium III: symptomatische Phase).

### 1.5. Diagnostische Möglichkeiten

Um das Vorliegen einer okkulten DCM bei klinisch unauffälligen Dobermännern möglichst frühzeitig festzustellen, wird ein jährliches Screening von Tieren ab einem Alter von zwei Jahren empfohlen (CALVERT & BROWN, 1986; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; CALVERT & MEURS, 2009; WESS et al., 2010c). Als diagnostischer Goldstandard gilt aktuell die Kombination aus Herzultraschalluntersuchung und Langzeit-Elektrokardiogramm (*Holter-EKG*). Durch diese diagnostischen Möglichkeiten können echokardiographische Anomalitäten und Rhythmusstörungen festgestellt werden (CALVERT & BROWN, 1986; CALVERT et al., 1997a; MEURS et al., 2001a; TIDHOLM et al., 2001). Verlaufsuntersuchungen ermöglichen zudem, dass individuelle subtile Veränderungen frühzeitig erkannt werden können und so bei entsprechender Indikation bereits in einer frühen Phase der Erkrankung eine therapeutische Intervention erfolgen kann.

#### 1.5.1. Anamnese und klinische Untersuchung

Da in der Frühphase der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns noch keine funktionellen Veränderungen des Herzens vorhanden sind, werden die Tiere zu diesem Zeitpunkt nicht aufgrund eines kardialen Vorberichts vorgestellt. Auch in

der okkulten Phase treten sehr selten klinische Symptome auf. Meist versterben klinisch zu diesem Zeitpunkt gesund erscheinende Tiere akut am Sekudentod, so dass keine tierärztliche Konsultation mehr erfolgt. Eine Synkope kann als ein abgebrochener Sekudentod bezeichnet werden und tritt in seltenen Fällen als frühes klinisches Anzeichen der DCM bereits in der okkulten Phase auf (HOHNLOSER et al., 1984; CALVERT et al., 1996). Auch in der symptomatischen Phase können bei einigen Patienten Synkopen oder ein präsynkopales Einknicken der Hinterläufe als Anzeichen der Herzerkrankung vorkommen. Klinische Auffälligkeiten wie Leistungsintoleranz, Schwäche oder bei Belastung blasse Schleimhäute stellen sich meist erst ein, wenn sich das Tier im kongestiven Herzversagen befindet (HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'GRADY et al., 2009). Die meisten Patienten werden im Linksherzversagen vorgestellt, eine bilaterale Kongestion liegt nur in seltenen Fällen vor. Betroffene Hunde zeigen aufgrund eines Lungenödems oder einer pleuralen Flüssigkeitsansammlung eine erhöhte Atemfrequenz, Husten und eventuell auch eine Zunahme des Bauchumfangs (TIDHOLM & JONSSON, 1997).

### **1.5.2. Kardiovaskuläre Untersuchung**

Die kardiovaskuläre Untersuchung wird ergänzend zur Allgemeinuntersuchung durchgeführt, um Hinweise auf eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zu erhalten. Bis zum Eintreten in die symptomatische Phase bleibt die klinische Untersuchung bei betroffenen Patienten ohne besonderen Befund, sofern keine anderen Erkrankungen vorliegen. Im akuten klinischen Fall eines kongestiven Herzversagens zeigen die Tiere blasse Schleimhäute, eine verlängerte kapilläre Füllungszeit aufgrund der unzureichenden Perfusion sowie einen schwachen Puls. Liegen Arrhythmien vor, kann bei der kardiovaskulären Untersuchung ein unregelmäßiger Herzschlag auffallen; bei gleichzeitiger Palpation des Pulses an der Arteria femoralis können Pulsdefizite festgestellt werden. Bei Auskultation des Herzens kann eine Tachykardie und ein systolisches Regurgitationsgeräusch über der Mitralklappe auffallen (HAZLETT et al., 1983; TIDHOLM et al., 2001; PETRIC et al., 2002). Möglicherweise ist ein Galopprrhythmus vorhanden, da der dritte Herzton durch eine diastolische Beeinträchtigung des Myokards zu hören ist (REDDY, 1985). Im Falle eines Linksherzversagens zeigen die Patienten Atemnot und Husten, der teilweise auch durch laryngeale Kompression ausgelöst werden

kann. Bei Auskultation der Lunge sind verschärfte Atemgeräusche und Knistern zu vernehmen. Ein Rechtsherzversagen stellt sich klinisch durch Aszites, Thoraxerguss und gestaute Jugularvenen dar. Oftmals ist den Besitzern vorberichtlich eine Zunahme des Bauchumfanges aufgefallen und eine Undulationsprobe des prall gefüllten Abdomens verläuft positiv. Abhängig von der Menge des vorhandenen Pleuralergusses können die Herz- und Atemgeräusche bei der Auskultation stark gedämpft sein. Die Jugularvenen können einer genauen Adspektion unterzogen werden, indem der Kopf des Patienten überstreckt wird. Liegt ein Rechtsherzversagen vor, sind die Venen meist deutlich gestaut (CALVERT, 1986).

### **1.5.3. Röntgenologische Untersuchung**

Befindet sich die DCM in der okkulten Phase, sind selten röntgenologische Veränderungen vorhanden. Erst mit Progression der Erkrankung nimmt die Herzgröße zu und ist als Kardiomegalie im Röntgenbild ersichtlich. Aufgrund der variablen Thoraxform der einzelnen Hunderassen sollte immer eine Evaluierung der Herzgröße mittels der *Vertebral-Heart-Score-Messung (VHS)* erfolgen (BUCHANAN & BUCHELER, 1995). Liegt ein Linksherzversagen in fortgeschrittenem Stadium vor, ist eine Vergrößerung des linken Vorhofs dadurch erkennbar, dass die Trachea deutlich zur Wirbelsäule hin angehoben wird. Ein Lungenödem ist röntgenologisch durch eine meist perihiläre, intersitielle oder alveoläre Lungenzeichnung und eine Verbreiterung der Pulmonalvenen ersichtlich. Bei Rechtsherzversagen stellt sich der rechte Vorhof vergrößert dar. Ergusslinien an den Lungenlappengrenzen sowie Detailverlust durch Flüssigkeitsansammlung können hinweisend auf das Vorliegen von Erguss sein (HAZLETT et al., 1983; CALVERT, 1986).

### **1.5.4. Elektrokardiographie**

Da in der okkulten und symptomatischen Phase der DCM des Dobermanns häufig Arrhythmien auftreten, ist eine elektrokardiographische Untersuchung des Tieres mit Hilfe eines EKGs unerlässlich und dient der Aufzeichnung und der Evaluierung von Rhythmusstörungen (CALVERT et al., 1997a). Bei den vorliegenden Arrhythmien handelt es sich sehr häufig um mono- oder polymorphe VES. Diese können vereinzelt oder als sogenannte *Couplets, Triplets, Salven, Bigemini* oder *Trigemini* auftreten (CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001; CALVERT & BROWN, 2004). Abhängig von ihrer Morphologie,

Frequenz und Geschwindigkeit sollte die Malignität evaluiert und entschieden werden, ob eine antiarrhythmische Therapie ratsam ist. Calvert et al. konnten zeigen, dass bei bis zu 30 % der Hunde im Herzversagen Afib vorliegt (CALVERT et al., 1997b). Anhand der EKG-Morphologie können Hinweise auf eine Vergrößerung der Ventrikel und Atrien erhalten werden, wobei diese recht unspezifisch sind (HAZLETT et al., 1983).

#### **1.5.4.1. Kurzzeit-EKG**

Unter einem Kurzzeit-EKG versteht man ein ambulantes EKG, das in der Tierarztpraxis angefertigt wird. Die meisten Geräte können die Aufzeichnung speichern und ausdrucken, so dass eine genaue Auswertung möglich ist. Wenn vorhanden, können alle elektrokardiographischen Veränderungen in einem derartigen EKG detektiert werden. Die Laufzeit eines Kurzzeit-EKGs beträgt zwei bis fünf Minuten. Unter Praxisbedingungen ist es weit verbreitet, Kurzzeit-EKGs anzufertigen, da das benötigte Equipment relativ kostengünstig zu erwerben und einfach anzulegen ist. Im Vergleich zu einem 24-Stunden-EKG weist ein Kurzzeit-EKG allerdings eine deutlich geringere Sensitivität auf, da Arrhythmien intermittierend und zeitlich variabel auftreten können. Daher ist ein Kurzzeit-EKG als wenig sensitive Methode zur Detektion von Arrhythmien zu werten (MEURS et al., 2001a; WESS et al., 2010d). Eine Studie von Wess et al. konnte allerdings zeigen, dass das Auftreten von mindestens einer VES bei Dobermännern in einem fünfminütigen EKG sehr verdächtig für das Vorliegen von Arrhythmien ist. Die Spezifität und der positiv prädiktive Wert im Falle von einer VES in fünf Minuten sprechen dafür, dass ein Kurzzeit-EKG Hinweise auf das Vorliegen der Erkrankung geben kann (WESS et al., 2010d). Ist die Untersuchung negativ, schließt dies allerdings nicht aus, dass bei dem Patienten dennoch Arrhythmien auftreten (MILLER et al., 1999; WESS et al., 2010d).

#### **1.5.4.2. Langzeit-EKG**

Als Goldstandard zur Diagnosestellung von ventrikulären Arrhythmien gilt das Holter-EKG (CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001; MEURS et al., 2001a). Die Anfertigung eines Langzeit-EKGs ist kostenintensiver und aufwändiger als die eines Kurzzeit-EKGs. Auch die benötigten EKG-Rekorder sowie die zugehörige Auswertungssoftware sind nicht so weit verbreitet und einfach verfügbar. Zur Durchführung eines 24-Stunden-

EKGs werden dem Patienten Elektroden, die mit einem EKG-Rekorder in Verbindung stehen, auf die rasierte Brustwand aufgeklebt und schützend fixiert. Das ambulante EKG-Gerät wird in einer Tasche am Hund befestigt und verbleibt dort über 24 Stunden (HOLTER, 1961). Im Nachhinein wird die EKG-Aufzeichnung mit einer geräteeigenen Software ausgewertet. Bei gesunden Hunden treten im Verlauf von 24 Stunden keine oder nur wenige vereinzelte Extrasystolen auf (CALVERT et al., 2000b). Liegen auf eine DCM hinweisende elektrische Anomalitäten vor, können diese unabhängig von echokardiographischen Befunden zur Diagnosestellung herangezogen werden. Hierbei ist wichtig, dass die Anzahl der VES offenbar keinen Rückschluss über das Sekundentodrisiko des Patienten zulässt (MEINERTZ et al., 1984; ROMEO et al., 1989). Calvert et al. untersuchten elektrische Anomalitäten, die für einen Sekundentod prädisponieren und konnten nachweisen, dass lediglich anhaltende ventrikuläre Tachykardien mit der Gefahr des Sekundentods korrelieren (CALVERT et al., 1997a). So treten bei Hunden, die bereits eine Synkope aufgrund maligner Arrhythmien erlitten, typischerweise über 10.000 VES und variable Phasen ventrikulärer Tachykardie in einer Langzeit-EKG-Untersuchung auf (CALVERT et al., 1997a). Eine Verlaufsstudie konnte zeigen, dass das Auftreten von VES während einer ersten Holter-EKG-Untersuchung bei echokardiographisch unauffälligen oder als grenzwertig eingestuften Dobermännern positiv mit der Entwicklung einer DCM korreliert. In besagter Studie entwickelten alle Hunde, bei denen mehr als 50 VES in 24 Stunden auftraten, im Folgejahr eine Dilatative Kardiomyopathie. Auch Couplets oder Triplets deuten auf die Entwicklung dieser Erkrankung hin (CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001). Eine Auswertung von Langzeit-EKGs bei echokardiographisch im Sinne einer DCM auffälligen Hunden zeigte, dass die Anzahl der VES pro 24 Stunden positiv mit dem Auftreten von Couplets, Triplets und Salven korreliert. Eine negative Korrelation bestand zwischen der Anzahl der VES und der sogenannten *Verkürzungsfraktion* (*Fractional shortening, FS*), einem systolischen Funktionsparameter der Herzultraschalluntersuchung (CALVERT et al., 2000a)

#### **1.5.5. Echokardiographische Untersuchung**

Eine Diagnosestellung bei DCM im symptomatischen Stadium stellt normalerweise keine große Herausforderung dar. Liegen bereits in der okkulten Phase morphologische Veränderungen des Herzens vor, können diese mit Hilfe einer echokardiographischen Untersuchung festgestellt werden. Im Anfangsstadium der

Erkrankung können die Veränderungen allerdings sehr subtil und damit schwer zu diagnostizieren sein. Eine Hilfestellung zur echokardiographischen Diagnosestellung der DCM beim Hund bieten die 2003 veröffentlichten *Guidelines der ESVC (European Specialists of Veterinary Cardiology)*. Ein Punktesystem bezieht hierbei M-Mode-Messungen und die Geometrie des linken Ventrikels sowie systolische Funktionsparameter als sogenannte Haupt- und Nebenkriterien mit ein. Diese Guidelines gelten allgemein zur Diagnosestellung der DCM beim Hund. Rassespezifische Eigenheiten der Erkrankung wie beispielsweise die hohe Prävalenz von Arrhythmien beim Dobermann sind gesondert zu bewerten. Auch rasseeigene Cut-off-Werte für die einzelnen Parameter der Herzultraschalluntersuchung wurden nicht definiert (DUKES-MCEWAN et al., 2003).

Echokardiographische Hauptmerkmale der DCM sind eine Volumenüberladung des linken Ventrikels, eine systolische und im Verlauf der Erkrankung auch diastolische Dysfunktion, sowie eine Zunahme der Sphärizität des Ventrikels (LEE et al., 2002a; DUKES-MCEWAN et al., 2003; WESS et al., 2010a). Zusätzlich kann die Wandstärke des betroffenen Ventrikels verringert sein. Da durch die Dilatation des linken Ventrikels der Mitralklappenannulus geweitet wird, ist das Vorliegen einer sekundären Mitralklappeninsuffizienz möglich. Der Regurgitationsjet ist meist zentral gerichtet, die Klappensegel scheinen morphologisch unauffällig und weisen keine degenerativen Veränderungen auf. Befinden sich Patienten im Herzversagen, liegt aufgrund des erhöhten ventrikulären und atrialen Drucks eine deutliche Vergrößerung des jeweiligen Vorhofs vor (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997a).

Neuere Untersuchungen beschäftigten sich explizit mit der echokardiographischen Diagnosestellung der DCM beim Dobermann. Lange Zeit wurde die M-Mode-Messung als Goldstandard zur Diagnose von Volumenüberladung und unzureichender Pumpleistung verwendet (CALVERT et al., 1982; CALVERT & BROWN, 1986; O'GRADY M & HORNE, 1998). In der Humanmedizin gilt aktuell die Scheibchensummationsmethode nach Simpson, die auf Volumenberechnungen des linken Ventrikels im 2-D-Bild beruht, als beste Möglichkeit zur Diagnosestellung einer DCM (LANG et al., 2006). Wess et al. demonstrierten, dass diese Methode sich auch bei der Detektion subtiler echokardiographischer Anomalitäten in der okkulten Phase der DCM beim Dobermann als sensitiver erweist als die M-Mode-Messung. Es wurden rassespezifische Normwerte für den Dobermann erstellt und

definiert, dass ein enddiastolisches linksventrikuläres Volumen (LVEDV) von  $\geq 95$  ml bezogen auf die Körperoberfläche und ein endsystolisches linksventrikuläres Volumen (LVESV) von  $\geq 55$  ml bezogen auf die Körperoberfläche beim Dobermann als auffällig zu befunden sind (WESS et al., 2010a). Eine weitere Studie evaluierte den Einsatz der Parameter *EPSS* (*E-Point-to-Septal-Separation*) und *Sphärizitätsindex* (*SI*) für die Diagnosestellung der DCM beim Dobermann und definierte rasseeigene Cut-off-Werte. Die EPSS dient als Parameter zur Evaluierung der linksventrikulären Füllung und Funktion und wird in den Guidelines als Minor-Kriterium geführt (DUKES-MCEWAN et al., 2003; HOLLER & WESS, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass eine EPSS von  $> 6,5$  mm sich als ähnlich sensitiver Parameter erweist wie die Scheibchensummationsmethode nach Simpson (HOLLER & WESS, 2014). Für den SI wurde beim Dobermann ein Cut-off von 1,65 definiert (DUKES-MCEWAN et al., 2003; HOLLER & WESS, 2014). Dieser Wert scheint sich allerdings erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium merklich zu verändern und konnte den diagnostischen Wert der Simpson-Methode oder des Parameters EPSS nicht erreichen (HOLLER & WESS, 2014).

#### **1.5.6. Kardiale Biomarker**

Aktuell gilt die Kombination aus 24-Stunden-EKG-Untersuchung und Herzultraschall als Goldstandard für die Diagnose der DCM beim Dobermann, doch auch diese Methoden weisen Nachteile auf. Zum einen sind diesen Verfahren aufgrund der Verfügbarkeit von Untersuchungsgeräten und speziell geschultem Personal finanzielle und technische Grenzen gesetzt (OYAMA et al., 2008; WESS et al., 2010b). Zum anderen wäre aus züchterischer, prognostischer und therapeutischer Sicht erstrebenswert, dass die Erkrankung noch früher diagnostisch erfasst werden kann. Aus diesem Anlass wird der Einsatz zirkulierender, organ- und krankheitsspezifischer Biomarker intensiv beforscht. Ein idealer Biomarker sollte neben hoher Sensitivität und Spezifität gut zugänglich sein, sich durch vorhersehbare Halbwertszeiten auszeichnen, mit den pathologischen Zuständen des jeweiligen Organsystems korrelieren sowie schnell, einfach und kostengünstig nachweisbar sein. Bei den meisten Biomarkern, die aktuell im klinischen Einsatz verwendet werden, handelt es sich um Polypeptide und Proteine (LI et al., 2012a). Als zirkulierende Biomarker für myokardialen Schaden gelten aktuell das *kardiale Troponin I* (*cTnI*) sowie die natriuretischen Peptide *Atriales Natriuretisches Peptid* (*ANP*) und *Natriuretisches Peptid Typ B* (*Brain Natriuretic Peptide*, *BNP*).

CTnI ist ein Protein des Troponin-Komplexes. Dieser dreiteilige Proteinkomplex ist Teil des myofibrillären Apparats und für die Kontrolle der Herzmuskelkontraktion zuständig (BARBARO et al., 2000). CTnI wird bei einer Zerstörung von Sarkomeren aus den Herzmuskelzellen freigesetzt und ist ein Marker für myokardiale Schädigung und Zellnekrose (FISHBEIN et al., 2003). Es ist bei Hunden mit Herzerkrankungen im Vergleich zu gesunden Hunden erhöht, wobei der Anstieg des Biomarkers mit dem Ausmaß der Herzmuskelschädigung korreliert (OYAMA & SISSON, 2004; SPRATT et al., 2005; O'BRIEN et al., 2006). Auch in der okkulten und symptomatischen Phase der DCM des Dobermanns ist cTnI bei Hunden mit elektrischen Anomalitäten und echokardiographischen Auffälligkeiten erhöht. Ein Cut-off Wert von 0,22 ng/ml kann alle Formen der Erkrankung mit einer Sensitivität von 79,5 % und einer Spezifität von 84,4 % detektieren (WESS et al., 2010b). Ein neuer, hochsensitiver Troponin-I Assay wurde kürzlich in einer klinischen Studie evaluiert und konnte bei einem Cut-off Wert von 0,104 ng/ml mit einer Sensitivität von 82,9 % gesunde Dobermänner von an DCM erkrankten Dobermännern unterscheiden (MAIER & WESS, 2012).

Bei BNP handelt es sich um ein Peptid, das unter physiologischen Bedingungen überwiegend in atrialen Myokardzellen synthetisiert, gespeichert und bei erhöhtem intraatrialen Druck freigesetzt wird (DE BOLD et al., 1996). Im Myokard der Ventrikel wird BNP dagegen nur unter pathologischen Bedingungen wie kardialer Dysfunktion mit resultierender Hypoxie synthetisiert (LUCHNER et al., 1998; WIESE et al., 2000). Es wird als Vorläufermolekül BNP freigesetzt und durch Serum-Proteasen in die biologisch aktive Form *C-terminales BNP* und das inaktive *N-terminale Propeptid BNP (NT-proBNP)* gespalten (GOETZE et al., 2005). Biologisch wirkt das C-terminale BNP als Gegenspieler von Angiotensin und Aldosteron, indem es unter anderem die Natriurese steigert und dadurch den Blutdruck senkt und das kardiale Füllvolumen reduziert. Das biologisch inaktive Spaltprodukt NT-proBNP dient als kardialer Biomarker, da es über eine längere Halbwertszeit im Blut verfügt. Untersuchungen zeigten, dass NT-proBNP bei Hunden mit kardialer Erkrankung unabhängig von dem Vorliegen einer Kongestion erhöht ist (MACDONALD et al., 2003; OYAMA et al., 2007b). Mit zunehmender Progression der Erkrankung und dem Auftreten eines Herzversagens steigen die Plasmaspiegel des Biomarkers weiter an (MACDONALD et al., 2003). Auch bei Dobermännern ist NT-proBNP in allen Krankheitsstadien im Vergleich zu

gesunden Tieren erhöht (WESS et al., 2011; SINGLETARY et al., 2012). Es konnte sogar gezeigt werden, dass NT-proBNP bereits angestiegen war, wenn die Hunde gemäß der Goldstandarduntersuchung noch kardiologisch unauffällig waren und in den folgenden 18 Monaten an einer DCM erkrankten. Wess et al. definierten Cut-off-Werte für NT-proBNP bei der DCM des Dobermanns und legten fest, dass bei einem Wert unter 400 pmol/l echokardiographisch erkennbare Veränderungen unwahrscheinlich sind. Liegt der Wert über 550 pmol/l, sind pathologische Befunde wahrscheinlich und es sollte eine Untersuchung mit den diagnostischen Goldstandardmethoden erfolgen (WESS et al., 2011). Durch eine Kombination aus Biomarker und Holter-EKG konnten Singletary et al. okkulte DCM mit einer Sensitivität von 94,5 % detektieren (SINGLETARY et al., 2012). Weitere Studien evaluierten die Einsatzmöglichkeiten kardialer Biomarker bei der Detektion okkulten DCM. Nach aktuellem Kenntnisstand können NT-proBNP und cTnI bei der Diagnose der DCM des Dobermanns als diagnostische Hilfsmittel verwendet werden. Aufgrund zu geringer Sensitivität und Spezifität konnten weder NT-proBNP, ANP oder cTnI als alleinige Parameter den Goldstandard ersetzen oder eine frühzeitigere Diagnosestellung ermöglichen (OYAMA et al., 2007b; OYAMA et al., 2008; WESS et al., 2010b).

### **1.5.7. Pathologische und histopathologische Untersuchung**

Bei der Sektion von Hunden mit DCM fällt eine generalisierte, durch Dilatation der Ventrikel und Atrien verursachte Kardiomegalie auf. Da der Quotient aus Herzmasse und Körpergewicht ansteigt, handelt es sich um eine exzentrische Hypertrophie des Myokards. Die linksventrikuläre freie Wand und das interventrikuläre Septum können verdünnt sein (HAZLETT et al., 1983; TIDHOLM & JONSSON, 1996, 1997). Je nach Stadium der Erkrankung ist es möglich, dass bereits weitere Hinweise auf kardiale Dekompensation vorliegen. Bei Linksherzversagen ist eine hochgradige Dilatation des linken Vorhofs mit pulmonaler Kongestion vorhanden. Eine Vergrößerung des rechten Vorhofs sowie das Vorhandensein von Thoraxerguss, Aszites und hepatischer Kongestion sind typische Befunde bei Rechtsherzversagen (VOLLMAR et al., 2003). Auch milde degenerative Veränderungen der Atrioventrikularklappen können als zusätzlicher Befund je nach Alter des Tieres auftreten (HAZLETT et al., 1983).

Tidholm et al. konnten durch den Vergleich histologischer Myokardpräparate zeigen, dass die Sonderform der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns

andere pathologische Veränderungen des Herzmuskels mit sich bringt als die DCM anderer Rassen (TIDHOLM et al., 2001). Typischerweise fallen bei Menschen, Hunden und Katzen mit idiopathischer DCM gedehnte, ausgedünnte, oft wellenförmig angeordnete und atrophierende Myofibrillen auf. Weitere Merkmale sind eine Heterogenität in Zelldurchmesser und -größe, fettige Infiltration, Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie das Vorhandensein von fibrotischen und nekrotischen Prozessen (TIDHOLM & JONSSON, 1997; TIDHOLM et al., 2001). Bei Neufundländern konnten diese histologischen Modifikationen bereits zu einem Zeitpunkt festgestellt werden, als weder klinische noch echokardiographische Hinweise einer Herzerkrankung vorlagen, so dass es sich um frühzeitig im Krankheitsprozess auftretende Veränderungen zu handeln scheint (TIDHOLM et al., 2000). Bei der DCM des Dobermanns dominieren ähnliche histologische Veränderungen wie bei der ARVC des Boxers (TIDHOLM et al., 2001). Die anomalen histologischen Befunde treten vor allem in der linksventrikulären freien Wand auf, können aber auch im interventrikulären Septum und in den Papillarmuskeln zu finden sein (CALVERT et al., 1982; EVERETT et al., 1999). Es liegen eine Degeneration, eine Atrophie und teilweise auch eine Vakuolisierung der Herzmuskelzellen vor. Eine multifokale interstitielle Fibrose des Herzmuskels und fettige Infiltration führen zusätzlich zu einer Verdrängung des Herzmuskelgewebes (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; EVERETT et al., 1999). In einer retrospektiven Untersuchung erkrankter Hunde konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen bei allen Hunden auftraten, die am Sekudentod verstarben (CALVERT et al., 1997a).

### **1.6. Therapie**

Da es für die Therapie der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann entscheidend ist, in welchem Stadium der Erkrankung sich der Patient befindet und welche Ausprägungsform die DCM hat, können keine generellen Therapieempfehlungen gegeben werden. Es sollte für jedes Tier individuell aufgrund der erhobenen Befunde und abhängig von der jeweiligen Therapieansprache eine medikamentöse Behandlung der Erkrankung erfolgen. Antiarrhythmika sind gebräuchlich im Einsatz gegen maligne ventrikuläre Arrhythmien, auch wenn die Erfahrungen aus der Humanmedizin eher für einen eingeschränkten Nutzen und möglicherweise sogar für eine Gefährdung durch potentielle proarrhythmogene Effekte sprechen (BHEIN et al., 1993; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Es ist

unklar, bei welchen Befunden eine antiarrhythmische Therapie indiziert ist und welche Behandlungsstrategie die beste Kontrolle der ventrikulären Arrhythmien erzielt (KRAUS et al., 2009).

### 1.6.1. Management der okkulten Phase

Ein jährliches Screening von Dobermännern ab einem Alter von zwei Jahren soll ermöglichen, dass betroffene Hunde bereits frühzeitig in der okkulten Phase detektiert und therapiert werden können. Es wäre erstrebenswert, durch eine entsprechende Therapie die Progression der Erkrankung zu verlangsamen und das Sekudentodrisiko bei Hunden mit Arrhythmien zu senken. Daher evaluierten viele Studien den Einsatz verschiedener Medikamente in diesem Stadium der Erkrankung (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Dobermänner im echokardiographisch okkulten Stadium der DCM profitieren von einer frühzeitigen Gabe des Wirkstoffs *Pimobendan*, einem Hemmer der *Phosphodiesterase-3 und -5*, der positiv inotrop und peripher vasodilatatorisch wirkt (SUMMERFIELD et al., 2012). *Pimobendan* verstärkt die Kontraktilität des gesunden Myokards hauptsächlich durch Hemmung des Enzyms Phosphodiesterase-3. Im Herzversagen steigert es vor allem die Affinität des kardialen Troponin C für intrazelluläres Calcium und erhöht dadurch die myokardiale Sensibilität für dieses Elektrolyt. Durch Inhibition der Phosphodiesterase-3 wird ein potenter vasodilatatorischer Effekt erzielt, der die Vor- und Nachlast des Herzens senkt und so den Kreislauf entlastet. Indem *Pimobendan* die Wiederaufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum verbessert, wirkt das Medikament zusätzlich positiv lusitrop (FUJIMOTO, 1994; RAVENS et al., 1996; ENDOH, 2001). Im Gegensatz zu früher gebräuchlichen positiv inotropen Wirkstoffen wie herzwirksamen Glykosiden hat *Pimobendan* den Vorteil, dass es die Kontraktilität steigert ohne den Sauerstoff- und Energiebedarf der Herzmuskelzelle zu erhöhen (HAGEMEIJER, 1993). Wie eine prospektive Multicenterstudie zeigte, verlängert eine Verabreichung dieses Medikaments bei klinisch unauffälligen Hunden mit echokardiographischer DCM die mittlere Dauer bis zum Auftreten eines kongestiven Herzversagens oder Sekudentods um neun Monate. Auch die gesamte Überlebenszeit war signifikant länger als bei Tieren, die ein Placebo erhielten (SUMMERFIELD et al., 2012). Da sich der Einsatz von ACE-Inhibitoren bei Menschen mit systolischer Dysfunktion als hilfreich erweist (INVESTIGATORS, 1992), empfehlen die Guidelines der *American Heart Association* aktuell den

Einsatz von ACE-Inhibitoren bei asymptomatischer linksventrikulärer Dysfunktion (HUNT et al., 2005). Eine retrospektive Studie konnte zeigen, dass auch Dobermänner mit echokardiographischer DCM im okkulten Stadium von der Gabe eines ACE-Inhibitors profitieren können, da die Zeit bis zum kongestiven Herzversagen oder Sekundentod bei Tieren, die einen ACE-Inhibitor erhielten, im Vergleich zu unbehandelten Hunden signifikant verlängert war (O'GRADY et al., 1997; O'GRADY et al., 2009). Um eine definitive Therapieempfehlung geben zu können, sind allerdings weitere prospektive Studien von Nöten (BORGARELLI et al., 2001).

In der okkulten Phase können anfangs auch nur isolierte Arrhythmien auftreten und je nach Malignität lebensbedrohlich für das Tier sein (CALVERT & MEURS, 2000a). Eine retrospektive Auswertung von Daten ergab, dass die Überlebenszeit bei okkulten Hunden mit elektrokardiographischen Auffälligkeiten länger war, wenn die Tiere antiarrhythmische Therapie erhielten. Es waren allerdings mehrere verschiedene Antiarrhythmika im Einsatz, so dass keine generelle Therapieempfehlung gegeben werden kann (CALVERT & BROWN, 2004). Aufgrund von mangelhaftem Therapieerfolg und Nebenwirkungen wie proarrhythmogenen Effekten, negativer Inotropie und Organotoxizität einiger antiarrhythmischer Medikamente herrscht Unklarheit bezüglich einer geeigneten Therapie bei ventrikulären Herzrhythmusstörungen (BHEIN et al., 1993; CONNOLLY, 1999; KRAUS et al., 2009). Mit zunehmender Malignität der Arrhythmien besteht allerdings ein sehr hohes Sekundentodrisiko, das die Gefahr der Nebenwirkungen übersteigt. Generell sollte eine antiarrhythmische Therapie nur bei schnellen Extrasystolen mit einer Geschwindigkeit von über 180 Schlägen pro Minute angewendet werden. Auch bei anhaltenden Tachyarrhythmien und bei Tieren, die aufgrund der Arrhythmien Symptome wie Schwäche oder Synkopen zeigen, ist zu einer entsprechenden Therapie der Rhythmusstörungen zu raten. Als orale Antiarrhythmika werden *Sotalol*, *Mexiletin* und *Amiodaron* verwendet (CALVERT & MEURS, 2009). Meurs et al. veröffentlichten, dass eine Steigerung der antiarrhythmischen Wirkung durch eine Kombination von Mexiletin mit einem  $\beta$ -adrenergen Rezeptorblocker erreicht werden kann (MEURS et al., 2002). Da bekannt ist, dass unter Therapie mit Amiodaron hepatotoxische Nebenwirkungen auftreten können, sollte dieses Medikament nur bei therapieresistenten, malignen Arrhythmien und in möglichst niedrigen Dosierungen angewendet werden.

Während der Verabreichung dieses Wirkstoffs ist auf klinische Symptome wie Anorexie oder Erbrechen zu achten und es sollte eine regelmäßige Kontrolle der Leberenzyme erfolgen (KRAUS et al., 2009).

Verschiedene Studien aus der Humanmedizin postulieren, dass Angiotensin II neben anderen neurohumoralen Faktoren myokardiale Bindegewebeinlagerungen stimuliert und so eine weitere Progression der Erkrankung verursacht. Man nimmt an, dass diese Umbauprozesse durch den therapeutischen Einsatz von ACE-Inhibitoren oder Angiotensin-II-Rezeptorblockern gemindert werden können (TAN et al., 1991; UNGER, 2000, 2002). Der Aldosteron-Rezeptor-Antagonist *Spironolacton* verhindert die durch Aldosteron induzierte Aktivierung kardialer Fibroblasten und scheint durch seine antifibrotische Wirkung das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen (ROBERT et al., 1999; GUYONNET et al., 2010)

### **1.6.2. Management der symptomatischen Phase**

Wenn die Patienten erste erkennbare klinische Symptome der Erkrankung zeigen, liegt meist bereits ein Herzversagen vor. Primäres Ziel in dieser Phase ist es, die Funktion des Herz-Kreislaufsystems aufrechtzuerhalten, betroffene Tiere durch entwässernde Therapie zu stabilisieren und die klinischen Symptome des Herzversagens zu reduzieren. Mittel der Wahl, um eine schnelle Reduktion der Stauungserscheinungen zu erreichen, ist *Furosemid*, ein sehr potentes Schleifendiuretikum, das in akuten Fällen intravenös oder in oraler Form als Dauertherapie verabreicht werden sollte. Ist die entwässernde Wirkung nicht ausreichend, kann eine sogenannte *sequentielle Nephronblockade* durch Gabe eines Aldosteron-Rezeptor-Blockers wie *Spironolacton* oder eines *Thiaziddiuretikums* durchgeführt werden (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; KEENE & BONAGURA, 2009; GUYONNET et al., 2010). Liegt aufgrund eines Rechtsherzversagens Pleuralerguss oder Aszites vor, sollte die freie Flüssigkeit durch eine Thorako- oder Abdominozentese entfernt werden, um eine schnelle Verbesserung der klinischen Symptome herbeizuführen.

Da ACE-Inhibitoren in der Humanmedizin schon lange zur Behandlung eines Linksherzversagens eingesetzt werden, wurde dieser Therapieansatz für die Behandlung des kongestiven Herzversagens beim Hund übernommen, obwohl lange Zeit keine Studien über den potentiellen Nutzen dieser Medikamentengruppe vorlagen (MILLER et al., 1988; FLATHER et al., 2000). Eine multizentrische

Studie konnte zeigen, dass eine Verabreichung des ACE-Inhibitors *Enalapril* ergänzend zur Standardbehandlung des kongestiven Herzversagens mit Furosemid eine signifikante klinische Verbesserung der Tiere bewirkt. Durch eine zusätzliche Therapie mit einem ACE-Inhibitor kann sowohl die Zeit bis zu einer Progression der Erkrankung, als auch die Überlebenszeit insgesamt deutlich verlängert werden (THE COVE STUDY GROUP, 1995; THE BENCH (BENAZEPRIL IN CANINE HEART DISEASE) STUDY GROUP, 1999). Hunde, die an DCM erkrankt sind, scheinen besser auf eine ACE-Inhibitor-Therapie anzusprechen als Patienten mit Mitralklappenendokardiose (THE IMPROVE STUDY GROUP, 1995).

Nach aktuellem Wissensstand gilt eine Kombination aus Furosemid, einem ACE-Inhibitor und dem Inodilator Pimobendan als Standardtherapie für Hunde, die aufgrund einer DCM Herzversagen entwickeln. Eine zusätzliche Gabe von Pimobendan bei der Therapie kongestiven Herzversagens konnte die Zeitspanne bis zur Therapieresistenz signifikant verlängern und damit auch die Überlebenszeit (O'GRADY et al., 2008). Auch die Lebensqualität und die klinische Präsentation der Patienten verbesserte sich durch die ergänzende Gabe von Pimobendan (FUENTES et al., 2002).

Da eine chronische Aktivierung des Sympathikus eine tragende Rolle in der Pathophysiologie der DCM spielt, kommen in der Humanmedizin teilweise  $\beta$ -Blocker zur Therapie kongestiven Herzversagens zum Einsatz (PACKER et al., 2001). Eine Behandlung mit  $\beta$ -Blockern sollte, wenn indiziert, nur nach erfolgreicher Stabilisierung und in niedriger Dosierung begonnen werden, da aufgrund der negativ inotropen Wirkung dieser Wirkstoffklasse bei Dysfunktion des Myokards die Gefahr einer Dekompensation besteht (BORGARELLI et al., 2001; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Oyama et al. evaluierten den Einsatz von *Carvedilol* bei Hunden mit DCM und konnten keine Verbesserung der echokardiographischen Werte oder der neurohumoralen Parameter verzeichnen (OYAMA et al., 2007a).

### **1.7. Prognose**

Bei der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns handelt es sich um eine chronisch progressive Erkrankung mit hoher Mortalität. Die individuelle Prognose hängt zum einen von den elektro- und echokardiographischen Befunden des Patienten ab. Zum anderen ist entscheidend, wie alt das Tier ist und in welcher Phase der Erkrankung es sich befindet. Je jünger das Tier bei Einsetzen erster

klinischer Symptome ist, desto schlechter ist die Prognose (TIDHOLM et al., 1997). Durchschnittlich treten die ersten elektrischen Anomalitäten und echokardiographischen Veränderungen im Alter von drei bis sechs Jahren auf (CALVERT & MEURS, 2009). Meist entwickeln die Patienten innerhalb von zwei bis drei Jahren nach Eintritt in die okkulte Phase kongestives Herzversagen (CALVERT et al., 2000b). Treten beim Dobermann klinische Anzeichen einer Dekompensation auf, liegt die Überlebenszeit der Hunde bei nur etwa zwei bis vier Monaten (CALVERT et al., 1997b; PETRIC et al., 2002). Petric et al. verglichen den Verlauf von DCM bei Dobermännern und Hunden anderer Rassen und konnten zeigen, dass die Überlebenszeit nach ersten Anzeichen eines Herzversagens bei Dobermännern signifikant kürzer ist (PETRIC et al., 2002). Liegt röntgenologisch ein Lungenödem oder Pleuralerguss vor oder haben an DCM erkrankte Hunde Aszites oder Dyspnoe, ist dies als negativ prognostisch zu werten. Eine Kongestion im fortgeschrittenen Stadium verschlechtert also die Prognose des Patienten (MONNET et al., 1995; TIDHOLM et al., 1997). Die Mortalitätsrate innerhalb des ersten Jahres nach Dekompensation liegt bei mindestens 90%. Wenn zum Zeitpunkt der Diagnose bilaterales, kongestives Herzversagen oder zusätzliches Vorhofflimmern besteht, ist das Mortalitätsrisiko innerhalb des ersten Monats nach Diagnosestellung erhöht. Entwickeln sich nach medikamentöser Stabilisierung des Linksherzversagens Vorhofflimmern oder bilaterale Kongestion, ist dies ebenso negativ prognostisch zu werten. In der klinischen Phase versterben die Tiere meist aufgrund ihres therapieresistenten kongestiven Herzversagens. Zwar lässt sich die dekompensierte Herzerkrankung meist zunächst medikamentös stabilisieren, doch häufig kommt es innerhalb von sechs Monaten zu einem Rückfall. Mit Progression der Erkrankung wird das Herzversagen immer schwerer durch entsprechende Therapie zu kontrollieren (CALVERT et al., 1997b).

Bei circa 30 – 50 % der Tiere ist das erste klinische Anzeichen der Herzerkrankung ein plötzlicher Herztod. Wird eine erste Synkope, die durch maligne Rhythmusstörungen ausgelöst wurde, überlebt, versterben die Tiere meist innerhalb von sechs Wochen am Sekudentod, wenn keine antiarrhythmische Therapie verabreicht wird (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; CALVERT & MEURS, 2009). Wird entsprechend therapeutisch interveniert, erliegen die Patienten etwa ein Jahr nach dem ersten synkopalen Event ihren malignen Arrhythmien (CALVERT & BROWN, 2004). Insgesamt geht man davon aus, dass bis zu 50 %

der an DCM erkrankten Dobermänner am Sekundentod versterben (CALVERT et al., 2000a).

## 2. Mikro-Ribonukleinsäuren

### 2.1. Allgemeine Informationen

Unter den sogenannten *non-messenger* Ribonukleinsäuren versteht man eine Vielzahl verschiedener nicht-kodierender RNAs, die regulatorische, enzymatische oder strukturelle Funktionen besitzen. Zu den aktiv steuernd fungierenden, nicht kodierenden RNAs zählen Mikro-Ribonukleinsäuren (AMBROS, 2004). Diese kleinen, endogenen, hochkonservierten Ribonukleinsäuren spielen während der physiologischen und pathologischen Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression (BARTEL, 2004). Sie treten organspezifisch in vielen Geweben und auch im Blut auf und stellen so einen neuartigen Biomarker für verschiedene Erkrankungen dar (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BARTELS & TSONGALIS, 2009). Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin konnten Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen Patienten mit DCM und einer herzgesunden Kontrollgruppe festgestellt werden (NAGA PRASAD et al., 2009; GUPTA et al., 2013; STEUDEMANN et al., 2013).

#### 2.1.1. Definition und Entdeckung

Mikro-Ribonukleinsäuren sind endogene kleine, einzelsträngige, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden, denen aufgrund ihrer posttranskriptional modulatorischen Fähigkeiten eine wichtige Rolle bei der Genregulation zugesprochen wird (BARTEL, 2004). Ihre Existenz wurde 1993 bekannt, als die Forschungsgruppe um Victor Ambros das Gen *lin-4* genauer untersuchte, von dem bekannt war, dass es die larvale Entwicklung von *C. elegans* kontrolliert. Dabei stellte sie fest, dass *lin-4* nicht wie bisher vermutet für eine mRNA und deren regulatorisches Protein kodiert, sondern für ein Paar kurzer, nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs (LEE et al., 1993). Auch der Genlokus war ungewöhnlich klein und enthielt keine typische gebräuchliche kodierende Sequenz (AMBROS, 2008). Bei genauerer Untersuchung der beiden miRNAs von *lin-4* fiel auf, dass sie Antisense-Sequenzen komplementär zu einigen Stellen der 3'-UTR (*untranslated region, untranslatierter Bereich*) des *lin-14*-Genes besitzen, über die vermutlich die Interaktion und Beeinflussung der Umsetzung dieses Gens vermittelt wird. Reguliert *lin-4* die Höhe an umgesetzten *lin-14*-Proteinen herunter, führt der

relative Mangel dieser Proteine zu einer beginnenden Entwicklung des ersten larvalen Zyklus (LEE et al., 1993). Nach dieser Entdeckung wurden miRNAs in den folgenden Jahren in allen bekannten Genomen von Tieren und Pflanzen nachgewiesen. Fast alle der aktuell bekannten sind evolutionär hoch konserviert in nahe verwandten Lebewesen wie dem Menschen und der Maus (LAGOS-QUINTANA et al., 2003; LIM et al., 2003a). Mittlerweile sind etwa 2000 miRNAs im menschlichen Genom bekannt, die mehr als 1 % des gesamten genetischen Materials ausmachen (GRIFFITHS-JONES, 2004; HE & HANNON, 2004; CHEN & RAJEWSKY, 2007; LEMONS et al., 2013). Manche miRNAs sind in bestimmten Zelltypen in großer Menge von bis zu 10.000 Molekülen pro Zelle vorhanden, wohingegen andere gerade einmal in geringen Spuren nachweisbar sind (LIM et al., 2003b; AMBROS, 2004). Alle bisher detektierten miRNAs werden in einer *miRBASE* genannten Datenbank, die online einsehbar ist, benannt und laufend aktualisiert gesammelt (GRIFFITHS-JONES, 2006).

### 2.1.2. Biogenese

Die Mehrheit der miRNAs ist in Regionen zwischen den Genen kodiert und ihre Translation wird durch eigene, unabhängige regulatorische Sequenzen und Promotoren gestartet. Ein kleiner Teil befindet sich allerdings auch in Introns von mRNA-Vorläufern (*prä-messenger-RNA*) oder ist in Clustern angeordnet und wird daher mit anderen Sequenzen koreguliert (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; AMBROS, 2004). Die Biogenese von miRNAs erfolgt durch Transkription der inter- oder intragenetischen Genomloki mittels des Enzyms *Polymerase II*. Dabei entsteht ein Vorläuferprodukt namens *pri-miRNA* (*primary-miRNA*), das meist mehrere Kilobasen lang ist und lokale haarnadelförmige Strukturen enthält (BARTEL, 2004; KIM, 2005). Diese werden von einer nukleären *Ribonuklease* namens *Drosha* (*RNase III*) abgespalten, um das Vorläuferprodukt der miRNA, eine sogenannte *pre-miRNA* (*precursor-miRNA*) von circa 70 Nukleotiden Länge, die typischerweise haarnadelförmig angeordnet ist, freizusetzen (LEE et al., 2003). Nach diesen ersten Prozessierungsschritten werden die *pre-miRNAs* durch den nukleozytoplasmatischen Transporter *exportin-5* ausgeschleust und im Zytoplasma durch einen Proteinkomplex, der eine *RNase III* namens *Dicer* enthält, in die finalen Produkte aufgespalten. Es entsteht eine doppelsträngige Mikro-Ribonukleinsäure, die einen Strang reifer miRNA und einen komplementären, meist funktionslosen und kurzlebigen Strang enthält. Die

Faktoren, die eine Umsetzung von miRNA initiieren und kontrollierend auf die Transkription einwirken, sind bisher größtenteils unbekannt (HUTVAGNER et al., 2001; LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LEE et al., 2002b; BARTEL, 2004).

### 2.1.3. Wirkmechanismus

Mikro-Ribonukleinsäuren üben posttranskriptional einen negativ regulatorischen Einfluss auf bestimmte mRNAs aus. Die Beeinflussung erfolgt über eine komplementäre Bindung zwischen einer als *seed* bezeichneten Sequenz der Nukleotide 2 – 7 am 5'-Ende der miRNA und der UTR am 3'-Ende der jeweiligen Ziel-mRNA (LEE et al., 1993; LEWIS et al., 2003; FRIEDMAN et al., 2009). Abhängig vom Bindungsgrad der komplementären Basen kann die Einflussnahme über zwei verschiedene, im Detail größtenteils unbekannt Mechanismen ablaufen, die zu einer Unterdrückung der Translation oder zum Abbau der mRNA führen (MASSIRER & PASQUINELLI, 2006; LIU, 2008; SELBACH et al., 2008). Im tierischen Organismus herrscht meist das Prinzip einer inkompletten Basenpaarung zwischen miRNA und ihrer Ziel-mRNA vor, die zu einer Inhibition der Proteinsynthese führt, ohne die Stabilität der mRNA zu verändern (HUTVAGNER & ZAMORE, 2002). Möglicherweise verbleibt die unterdrückte mRNA auch in einer Bindung an Ribosomen erhalten (SEGGERSON et al., 2002). Bei Pflanzen kommt es dagegen meist zu einer kompletten oder nahezu kompletten komplementären Basenpaarung, die den Abbau oder die Zerstörung der Ziel-mRNA bewirkt (RHOADES et al., 2002; TANG et al., 2003). In vielen Fällen scheint auch die sogenannte *RNA interference machinery (RNAi)* in das Zusammenspiel von miRNA und mRNA involviert zu sein. Der Strang reifer miRNA bindet vermittelt durch das Enzym *Dicer* an einen Ribonukleoprotein-Komplex, der *RNA-induced silencing complex (RISC)* genannt wird (KETTING et al., 2001; BARTEL, 2004; HE & HANNON, 2004). Dieses Zusammenwirken ermöglicht eine Wechselwirkung zwischen der jeweiligen mRNA und kurzen RNA-Fragmenten (*microRNAs* oder *small interfering RNAs*), die in einer Stilllegung bestimmter mRNAs resultiert (HUTVAGNER et al., 2001; ZENG et al., 2003; JARONCZYK et al., 2005). Durch diese Prozesse kann eine einzige miRNA direkt oder indirekt die Proteinbiosynthese tausender Gene beeinflussen und besitzt so ein enormes regulatorisches Potential (BARTEL & CHEN, 2004; SELBACH et al., 2008). Teilweise scheinen miRNAs lediglich als Feinregulatoren der Proteinumsetzung zu fungieren, indem sie nur graduell die Transkription bestimmter mRNAs modulieren

(BARTEL & CHEN, 2004; BAEK et al., 2008). Die bekannten miRNAs des menschlichen Genoms scheinen bis zu 60 % des gesamten Proteoms zu regulieren (FRIEDMAN et al., 2009).

MiRNAs wirken auf Entwicklung, Proliferation, Lebensdauer und Differenzierung vieler Zellen ein (HE & HANNON, 2004; IKEDA et al., 2007) und steuern so lebenswichtige Vorgänge wie Hämatopoese, Organopoese, Apoptose und Tumorgenese (KIM, 2005; CALIN & CROCE, 2006; HWANG & MENDELL, 2007). Studien der letzten Jahre zeigten außerdem, dass sie maßgeblich die Reaktion differenzierter Gewebe auf physiologischen und pathologischen Stress beeinflussen und auch auf immunmedierte Signalwege einwirken. Somit nehmen sie eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Krankheiten ein (HWANG & MENDELL, 2007; HUANG et al., 2015).

Durch genetische Verfahren, die den Gehalt bestimmter miRNAs artifiziell erhöhen oder ihre Umsetzung blockieren, ist es möglich, den Einfluss spezifischer miRNAs auf die Proteinbiosynthese zu untersuchen (AMBROS, 2004; SELBACH et al., 2008). Da das Wirkspektrum meist sehr komplex ist, ist die genaue individuelle biologische Funktion nur schwer zu identifizieren. Ablauf und Steuerung vieler molekularer Interaktionen, die die Aktivität von miRNAs und ihre Wechselwirkung mit mRNA beeinflussen, bleiben bisher ungeklärt und sind Objekt zahlreicher Forschungsprojekte, die laufend neue Ergebnisse präsentieren und den aktuellen Wissensstand erweitern (MASSIRER & PASQUINELLI, 2006; AMBROS, 2008).

#### **2.1.4. Eigenschaften**

Mit Hilfe von Mikroarray-Analysen stellte sich heraus, dass jeder Zelltyp ein für unterschiedliche Entwicklungs- und Differenzierungsstadien ihm eigenes spezifisches miRNA-Expressionsprofil aufweist. MiRNAs sind damit zellspezifisch und die Höhe ihrer Expression ist abhängig von der jeweiligen lokalen Stoffwechsellage des Gewebes und von pathophysiologisch einwirkenden Einflüssen (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BARTEL, 2004). Es scheint eine inverse Korrelation im örtlichen Auftreten von miRNAs und ihren Ziel-messengerRNAs zu bestehen, da bestimmte miRNAs genau in solchen Geweben zahlreich vorliegen, in denen ihre Zielobjekte nur in geringer Anzahl vorhanden sind (MASSIRER & PASQUINELLI, 2006). MiRNAs sind evolutionär hochkonserviert, das heißt, sie treten zwischen verschiedenen Spezies mit gleicher Reihenfolge der Nukleotide auf

(LAGOS-QUINTANA et al., 2003; LIM et al., 2003a; CHEN et al., 2008b). Die miRNA-Expressionshöhen im Serum sind konstant, reproduzierbar und bei Individuen verschiedener Spezies einheitlich (CHEN et al., 2008b; GILAD et al., 2008). Ein Abgleich der genetischen Datenbanken zeigte auch, dass eine signifikante Konservierung der miRNA-Gene zwischen Mensch und Hund vorliegt (BOGGS et al., 2007). Generell zeichnen sich miRNAs durch extreme Stabilität aus. Sie sind beispielsweise auch nach einer Fixierung mit Formalin oder einer Paraffineinbettung von Präparaten gut erhalten und lassen sich extrahieren und bestimmen (LI et al., 2007). Endogene miRNAs scheinen sich dem Abbau durch endogene RNasen im Plasma zu entziehen, wohingegen exogen zugeführte miRNAs durch dieses Enzym schnell abgebaut werden. Auch in ungefrorenen Serumproben sind sie mindestens vier Stunden stabil und überstehen mehrfache Gefrier- und Auftauvorgänge, sowie extreme Schwankungen von Temperatur oder pH-Wert ohne signifikante Schädigung (CHEN et al., 2008b; GILAD et al., 2008; MITCHELL et al., 2008). Inwiefern die Dauer der Probenlagerung Einfluss auf die darin enthaltenen Mikro-Ribonukleinsäuren nimmt, ist noch unklar, da häufig mehrere Jahre alte Proben verarbeitet werden oder die Lagerungsdauer stark variiert (KROH et al., 2010).

### **2.1.5. Vorkommen und Freisetzung**

Ein Großteil der Mikro-Ribonukleinsäuren ist intrazellulär lokalisiert, doch in zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass sie auch im Blutkreislauf auftreten (MITCHELL et al., 2008; AI et al., 2010; STEUDEMANN et al., 2013; WILLEIT et al., 2013; CHEN et al., 2014d; JEANSON-LEH et al., 2014). Dort können sie nicht nur in Serum und Plasma nachgewiesen werden, sondern ebenso in peripheren mononukleären Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs*) (GUPTA et al., 2013). Auch in Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Urin, Speichel, Milch oder Tränen konnten miRNAs nachgewiesen werden (GILAD et al., 2008; TURCHINOVICH & CHO, 2014). Entgegen der im Extrazellularraum extrem instabilen RNA scheinen miRNAs in diesem Milieu sehr stabil zu sein und sich dem Abbau durch endogene RNasen zu entziehen (GILAD et al., 2008; MITCHELL et al., 2008; ETHERIDGE et al., 2011). Die Vermutung, dass sie sich möglicherweise in Exosomen befinden und durch diese geschützt extrazellulär beständig sind, konnte bestätigt werden (CABY et al., 2005; VALADI et al., 2007; MITCHELL et al., 2008; RAYNER & HENNESSY, 2013;

PENFORNIS et al., 2015). Auch apoptotische Körperchen und Mikrovesikel, die von einer Vielzahl an Zellen hergestellt werden, können nach aktiver Beladung mit miRNA als deren Transporter fungieren. Eine nicht unbeträchtliche Anzahl an miRNAs liegt extrazellulär nicht in lipid-gebundener Form, sondern in Verbindung mit einem Protein vor. Eine weitere Erklärung für ihre Stabilität gegenüber endogenen RNasen wäre eine Komplexbildung mit anderen, schützenden Molekülen oder eine Modifizierung ihrer Struktur, die sie gegenüber der RNase-Aktivität resistent macht (MITCHELL et al., 2008). Während die protektiven Mechanismen nach und nach entschlüsselt werden konnten, war es bisher nicht möglich, die Gründe für die Selektivität der miRNAs bei spezifischen Transportsystemen zu identifizieren (RAYNER & HENNESSY, 2013). Auch die Herkunft und insbesondere die Funktion der extrazellulären miRNAs sind bisher nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass sie der Zell-Zell-Interaktion dienen und so aktiv und gezielt von einer Zelle ausgeschleust werden, um von einer anderen Zelle erkannt und aufgenommen zu werden (CAMUSSI et al., 2010; IGUCHI et al., 2010; WANG et al., 2010b; TURCHINOVICH & CHO, 2014). Eine weitere Theorie wäre, dass es sich um Nebenprodukte zellulärer Aktivität ohne spezifische Aufgabe handelt (TURCHINOVICH et al., 2011; TURCHINOVICH & CHO, 2014).

#### **2.1.6. Nachweismöglichkeiten**

Wie bereits beschrieben, können Mikro-Ribonukleinsäuren sowohl in Geweben und Zellen als auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Gebräuchliche Verfahren zur Erstellung von miRNA-Profilen sind aktuell Mikroarray-Systeme, PCR-basierte Verfahren, Northern Blotting, In-Situ-Hybridisierung und direkte Sequenzierung durch das sogenannte *next generation sequencing*. Jede dieser Methoden bietet gewisse Vorteile und Limitierungen, daher ist je nach Fragestellung und den experimentellen Bedingungen ein geeignetes Verfahren zu wählen (KONG et al., 2009; LI et al., 2009; LI & RUAN, 2009; THOMAS & ANSEL, 2010; ETHERIDGE et al., 2011). Das Northern Blotting galt lange Zeit als Goldstandardverfahren zum Nachweis von Mikro-Ribonukleinsäuren, allerdings ist es vergleichsweise zeitaufwändig, benötigt große Mengen an Probenmaterial und ist auf den Einsatz radioaktiver Substanzen angewiesen (LIU et al., 2004; LIU et al., 2008a; VARALLYAY et al., 2008; LI & RUAN, 2009). Da der Mikroarray und die PCR-basierenden Verfahren aktuell am häufigsten

Verwendung finden (ETHERIDGE et al., 2011), werden sie kurz vorgestellt. Bei einem Mikroarray handelt es sich um ein molekulares Hochdurchlaufverfahren, das auf dem Prinzip der Watson-Crick-Basenpaarung beruht. Dabei ist es möglich, gleichzeitig hunderte miRNAs durch Bindung an synthetisierte, auf einem Mikro-Chip fixierte Antisense-Oligonukleotid-Sonden zu detektieren und so zellspezifische Expressionsprofile zu erstellen (LIU et al., 2004; LEMONS et al., 2013). Es existieren verschiedene Mikroarray-Verfahren, die sich in Hinblick auf den Aufbau der enthaltenen Sonden, die chemischen Verfahren zur Immobilisierung der Sonden, die Probenkennzeichnung oder die Methoden zur Signaldetektion unterscheiden (LIU et al., 2008a). Auch diese Technologie weist jedoch Grenzen auf: Aufgrund der kleinen Größe der miRNAs kann es sich schwierig gestalten, optimale Hybridisierungsbedingungen zu schaffen, die für alle auf dem Chip enthaltenen miRNAs geeignet sind. Auch die Komplementarität der Sonden kann zwischen reifer miRNA und pre-miRNA variieren. Außerdem kann es zu einer sogenannten *cross hybridization* zwischen einer Sonde und einer der Ziel-miRNA ähnlichen Struktur kommen (KIM & NAM, 2006).

Die meisten zirkulierenden miRNAs sind mittels PCR-basierender Verfahren nachweisbar (ETHERIDGE et al., 2011). Die *Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)* scheint das sensitivste Verfahren beim Nachweis von Mikro-Ribonukleinsäuren zu sein und benötigt nur kleinste Probenmengen zur schnellen Analyse. Der Einsatz für eine Hochdurchsatzanalyse ist allerdings beschränkt, sobald mehr als 300 miRNAs nachzuweisen sind. Ein technisches Problem stellt auch die geringe Größe der reifen miRNAs dar, so dass viele aktuelle Verfahren auf dem Nachweis des längeren Vorläufers, der pre-miRNA, basieren (KIM & NAM, 2006; LIU et al., 2008a; PARIKH & CHAN, 2013). Um die Expressionshöhe bestimmter miRNAs zu quantifizieren, finden quantitative PCR-Methoden wie die *qPCR* Anwendung (KROH et al., 2010). Sie eignen sich hervorragend zum schnellen quantitativen Nachweis einer miRNA-Teilmenge und finden daher regelmäßig in medizinischen Studien Verwendung zur Validierung von durchgeführten Mikroarray-Datenanalysen (LIU et al., 2008a; COHN et al., 2010; GUPTA et al., 2013; CHEN et al., 2014b; GENINI et al., 2014; HU et al., 2015).

## **2.2. Einsatzmöglichkeiten als Biomarker**

Mikro-Ribonukleinsäuren werden organspezifisch umgesetzt und Veränderungen innerhalb des Expressionsprofils eines Gewebes können mit pathologischem

Geschehen in Verbindung stehen. Sie eignen sich als endogene Biomarker für Diagnose, Prognose und Therapiekontrolle und befinden sich daher im Fokus der medizinischen Wissenschaft (BARTELS & TSONGALIS, 2009). Spezifische Expressionsprofile mancher Gewebe scheinen regelrecht einen Fingerabdruck bestimmter Erkrankungen darzustellen, zeichnen sich durch hohen diagnostischen Wert aus (CHEN et al., 2008b) und sind teilweise schon in sehr frühen Krankheitsstadien detektierbar (COHN et al., 2010). Als Untersuchungsmaterialien eignen sich Serum und Plasma gleichermaßen, da miRNAs darin besonders stabil sind (MITCHELL et al., 2008). Neuere Studien werfen die Frage auf, inwiefern die Level zirkulierender miRNAs zusätzlich durch systemische Erkrankungen beeinflusst werden können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch neoplastische Prozesse induzierte Zytokine und der *Tumornekrosefaktor  $\alpha$*  (*TNF  $\alpha$* ) die miRNA-Expression herunterregulieren können (CHEN et al., 2014a).

### **2.2.1. Einsatzmöglichkeiten als Biomarker nicht-kardialer Erkrankung**

Wie bereits erwähnt, wirkt die Hoch- oder Herunterregulierung der miRNA-Expression direkt oder indirekt auf die Umsetzung von Genen ein und steuert so mitunter gezielt auch die Umsetzung solcher Gene, die mit Zelldifferenzierung, Apoptose, Onkogenese und somit der Entstehung verschiedener Erkrankungen in Zusammenhang stehen (DI LEVA et al., 2006). Vor allem aus dem Bereich der Onkologie existieren bereits zahlreiche Studien über miRNAs, die eine Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen spielen (sogenannte *oncomirs*), und deren potentiellen Einsatz als frühdiagnostischen Biomarker bei verschiedenen Krebserkrankungen. Da bestimmte miRNAs als Tumorsuppressor agieren, indem sie den Gehalt onkogener Proteine negativ steuern, kann deren Herunterregulierung zur Tumorentstehung beitragen. Eine Hochregulierung von miRNAs, die als Onkogene wirken, indem sie Tumorsuppressor-Proteine unterdrücken, kann ebenfalls eine Onkogenese begünstigen (ESQUELA-KERSCHER & SLACK, 2006). So konnte für verschiedene Krebserkrankungen wie beispielsweise Brustkrebs, chronische lymphatische Leukämie, kolorektale Neoplasien, hepatozelluläre Karzinome, Prostata-, Lungen- und Bauchspeicheldrüsenkrebs durch eine signifikante Veränderung der Expression bestimmter miRNAs gezeigt werden, dass diese mit der Erkrankung in Verbindung stehen (CALIN & CROCE, 2006; CHEN et al., 2008b; BARTELS & TSONGALIS, 2009; HU et al., 2015). Auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und bei

Gebärmutterhalskrebs, der mit dem *Humanen Papillomavirus (HPV)* assoziiert ist, konnte eine Deregulierung von miRNAs festgestellt werden (PEDROZA-TORRES et al., 2014; MASOOD et al., 2015). Bei zahlreichen anderen Erkrankungen wie Diabetes Mellitus, chronischen Darm- und Lebererkrankungen sowie Rheumatoider Arthritis konnten ebenfalls signifikant abweichende Expressionsprofile ausgemacht werden (CHEN et al., 2008b; PAULEY & CHA, 2011; ZAHM et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2014; FENG et al., 2014; JANSEN et al., 2014; JANSEN et al., 2015).

Auch in der Veterinärmedizin liegen bereits erste Veröffentlichungen zum Einsatz von miRNAs als Marker bei verschiedenen Erkrankungen vor. Anhand der Muskeldystrophie des Golden Retriever, die aktuell als bestes klinisch relevantes Tiermodell für die *Duchenne Muskeldystrophie* gilt, wurden charakteristisch deregulierte miRNAs identifiziert und näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass bestimmte, muskeleigene miRNAs spezifischer als der aktuelle Goldstandard sind und sich daher besser zur Diagnosestellung eignen (MIZUNO et al., 2011; JEANSON-LEH et al., 2014). Genini et al. identifizierten mittels Mikroarray-Analyse miRNAs, die mit retinaler Degeneration des Hundes in Zusammenhang stehen. Sie untersuchten gezielt solche miRNAs mit Hilfe von quantitativer RT-PCR näher, die im Verdacht standen, mit Apoptose in Verbindung zu stehen (sogenannte *apoptomirs*). Demnach werden im frühen Krankheitsverlauf anti-apoptotische miRNAs heraufreguliert und pro-apoptotische herunterreguliert, so dass diese Mikro-Ribonukleinsäuren vermutlich den degenerativen Prozessen entgegensteuern (GENINI et al., 2014). Auch beim caninen Mammatumor unterscheiden sich die Expressionsprofile bei gesunden und betroffenen Tieren massiv, allerdings waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien der Tumorerkrankung nicht prägnant genug, um ein Tumor-Staging anhand der miRNA-Expression zu erlauben (VON DEETZEN et al., 2014).

### **2.2.2. Einsatzmöglichkeiten als Biomarker kardialer Erkrankung**

In der Kardiologie ist der Einsatz eines zirkulierenden, einfach zugänglichen und schnell nachweisbaren Biomarkers zur Erkennung und zeitnahen Behandlung akuter Notfälle und zur Verlaufskontrolle progressiver Erkrankungen ein wünschenswertes diagnostisches Instrument. Im Blut befindliche Marker für kongestives Herzversagen wie die natriuretischen Peptide oder cTnI sind klinisch und diagnostisch wertvoll, doch ihr Einsatz ist gerade im Bereich der

Frühdiagnostik noch unbefriedigend. Die krankheitsspezifischen Expressionsprofile kardialer miRNAs bergen das Potential diese Lücke zu schließen (GUPTA et al., 2013). Ein Nachweis kardialer miRNA aus Gewebeproben ist möglich, die Entnahme ist allerdings aufwändig, birgt große Risiken und ist daher in der Veterinärmedizin kein gängiges Standardverfahren. Mehrere humanmedizinische Studien belegen bereits den Nutzen organspezifischer miRNAs im diagnostischen Einsatz für Beginn und Verlauf verschiedener Herzerkrankungen wie beispielsweise für *Akuten Myokardinfarkt (AMI)*, Herzversagen und Koronararterienerkrankung (VAN EMPEL et al., 2012). So konnte eine erste umfangreiche, genomweite Untersuchung der miRNA-Expression in humanen Myokardproben bei DCM, *Ischämischer Kardiomyopathie (ICM)*, *Aortenstenose (AS)* und einer gesunden Vergleichsgruppe zeigen, dass sich die Profile der einzelnen diagnostischen Gruppen deutlich voneinander unterscheiden. Bei 69 % der Proben konnte aufgrund ihrer miRNA-Expression die jeweils richtige Diagnose zugeordnet werden. Die Expression vieler miRNAs zeigte sich bei kardialer Pathologie verändert, wenn auch die meisten Abweichungen eher gering waren. Die Deregulierung korreliert daher anscheinend nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung oder einer Dekompensation, sondern scheint eher ursächlich durch Modulation der Genexpression zur Pathogenese der Herzerkrankung beizutragen (VAN ROOIJ et al., 2006; IKEDA et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse liefert eine aktuelle veterinärmedizinische Studie, bei der die miRNA-Expressionsprofile bei gesunden Katzen und solchen, die sich aufgrund einer HCM im Herzversagen befanden, verglichen wurden. Bei Katzen mit primärer HCM konnten eindeutige miRNA-Signaturen festgestellt werden, wobei miRNAs beteiligt waren, die bereits mit Kardiomyopathien des Menschen in Verbindung gebracht werden konnten (WEBER et al., 2015).

Nicht nur spezifische Expressionsprofile, sondern auch einzelne Mikro-Ribonukleinsäuren konnten in verschiedenen Untersuchungen mit bestimmten Krankheitsbildern oder pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Mehrere Studien beschäftigten sich mit dem Einsatz von *miR-208* als Biomarker für akute, myokardiale Schädigung. Diese miRNA kommt ausschließlich im Herzen vor, ist unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar, aber kann bereits eine Stunde nach Verschluss der Koronararterien detektiert werden (WANG et al., 2010a). Ji et al. führten chemisch eine myokardiale Schädigung bei Ratten

herbei und verglichen die zeitnahe Expression bestimmter miRNAs mit cTnI, dem gängigen Biomarker für Herzmuskelschädigung. Nach dieser Beeinträchtigung des Herzmuskels ist der zeitliche Anstieg von *miR-208* und cTnI ähnlich und auch die Höhe der Plasmaspiegel beider Marker korreliert (JI et al., 2009). Die Ausscheidung von cTnI erfolgt renal und der Wert kann bei asymptomatischen Tieren mit einer Nierenerkrankung im Endstadium erhöht sein (AHMADI et al., 2014). Eine bilaterale Nephrektomie bei Labortieren veränderte die nachweisbare Menge an *miR-208* nicht, so dass diese Mikro-Ribonukleinsäure sogar dem aktuellen Biomarker für myokardialen Schaden, cTnI, überlegen zu sein scheint (JI et al., 2009). Da die *miR-208-Familie* nachweislich auch mit pathologischen Umbauprozessen des Myokards in Verbindung steht, verglichen Satoh et al. die Expression von *miR-208* und *miR-208b* zwischen endomyokardialen Zellen aus Biopsien von DCM-Patienten und Patienten, bei denen keine linksventrikuläre Dysfunktion vorlag. Die Erhöhung der Umsetzung dieser miRNAs korrelierte mit den Veränderungen des Myokards und auch mit den klinischen Ergebnissen der Patienten im zeitlichen Verlauf. Es wird vermutet, dass *miR-208* mit der Progression der DCM in Verbindung steht und sich hervorragend als negativ prognostischer Indikator eignet (SATOHI et al., 2010).

Eine weitere Studie untersuchte den Einsatz spezifischer miRNAs als Biomarker für kongestives Herzversagen und identifizierte sechs bestimmte miRNAs, die bei betroffenen Probanden signifikant erhöht waren. Im zusätzlichen Abgleich mit Patienten, die unter extrakardialer Dyspnoe litten, trat besonders *miR-423-5p* als signifikanter Biomarker für Kongestion hervor und korrelierte mit dem Biomarker NT-proBNP und dem Klassifikationsschema der New York Heart Association für Herzinsuffizienz (TIJSEN et al., 2010).

### **2.3. Canine Mikro-Ribonukleinsäuren**

Wie bereits erwähnt sind Mikro-Ribonukleinsäuren hochkonserviert und treten mit gleicher Nukleotid-Sequenz bei verschiedenen Spezies auf (LAGOS-QUINTANA et al., 2003; LIM et al., 2003a; CHEN et al., 2008b). Die meisten molekularen Verfahren zur Quantifizierung von miRNAs wurden für den Menschen und für Mäuse entwickelt, so dass lange Zeit kein hundespezifisches Diagnostikum zur Verfügung stand. Die Verwendung humanmedizinischer PCR-Verfahren mit speziellen, für humane mature miRNAs hergestellten Primern zeichnet sich auch beim Hund durch hohe Sensitivität und Spezifität aus und belegt die Konservierung

der reifen miRNAs (BOGGS et al., 2007). Neuerdings werden auch verschiedene hundespezifische, quantitative RT-PCR-Assays produziert und sind versuchsweise im Einsatz (VON DEETZEN et al., 2013). Mikro-Ribonukleinsäuren können als Biomarker beim Hund ebenso wie bei anderen Tieren oder dem Menschen sowohl aus Gewebeproben als auch aus Serum oder Plasma erfolgen (BOGGS et al., 2008; MIZUNO et al., 2011; STEUDEMANN et al., 2013; CHEN et al., 2014c).

## **2.4. Kardiale Mikro-Ribonukleinsäuren**

### **2.4.1. Mikro-Ribonukleinsäuren bei kardialer Pathophysiologie**

Mit Hilfe von organspezifischen miRNA-Profilen aus menschlichen und murinen Myokardproben konnten bisher circa 200 kardiale miRNAs mit konstanter Expression identifiziert werden (DORN, 2011). Viele davon, darunter beispielsweise *miR-1*, *miR-133*, *miR-208* und *miR-22*, scheinen eine wichtige regulatorische Funktion bei der Entwicklung des Herzens und der myokardialen Zelldifferenzierung einzunehmen (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; VAN ROOIJ et al., 2007; GURHA et al., 2012). Durch Versuche an Labortieren, bei denen gezielt die Umsetzung bestimmter kardialer miRNAs durch gentechnische Maßnahmen oder den Einsatz von miRNA-Antagonisten und -imitatoren beeinflusst wurde, konnte zusätzlich eine Einflussnahme besagter Ribonukleinsäuren auf pathologisches Geschehen wie Stress und Schädigung des Herzmuskels, Hypertrophie und Herzversagen nachgewiesen werden (WANG et al., 2009; DORN, 2011). Auch eine artifiziell herbeigeführte übermäßige Volumen- oder Drucküberlastung des Herzens kann eine von der Norm abweichende miRNA-Expression provozieren (TOISCHER et al., 2010).

Mehrere Studien, die sich mit den Expressionsprofilen bei herzkranken Menschen oder Labortieren beschäftigen, konnten einen Zusammenhang zwischen *miR-22* und verschiedenen kardialen Erkrankungen herstellen. So korreliert der Schweregrad von künstlich hervorgerufenem Herzversagen bei Mäusen mit signifikanten Veränderungen der miRNA-Expressionsprofile, wobei vor allem die abnorme Expression von *miR-22* auffällt. Gemeinsam mit dieser scheint *miR-18b* eine wichtige regulatorische Rolle in Hinblick auf die Differenzierung und Proliferation des Myokards als Reaktion auf Stress einzunehmen (TATSUGUCHI et al., 2007). Über eine Beeinflussung des Kalziumhaushalts und des Gehalts an myofibrillären Proteinen setzt eine abnorme Expression von *miR-22* die inotrope und lusitrope

Reaktionsfähigkeit des Myokards auf artifizielle Drucküberlastung herab und führt so schneller zu linksventrikulärer Dilatation und Dekompensation (GURHA et al., 2012). Interessant ist, dass die Expression von *miR-22* nicht in Kardiomyozyten, sondern vor allem in kardialen Fibroblasten sehr hoch zu sein scheint. Diese Mikro-Ribonukleinsäure wirkt auf Überlebensdauer und Wachstum der Fibroblasten ein und steuert so das Ausmaß von Fibrose und Hypertrophie des Herzmuskels (THUM et al., 2008; DONG et al., 2014). Da kardiale Fibrosierungsvorgänge die gesamte kardiale Struktur und Funktion beeinflussen und dadurch maßgeblich mit zur Entstehung von Herzversagen beitragen, scheint die Expression von *miR-22* auf diese Weise eine Rolle bei Dekompensation zu spielen (GURHA et al., 2012; DONG et al., 2014).

MiR-208 wird spezifisch in Kardiomyozyten als Teil des für  *$\alpha$ MHC* ( *$\alpha$ -myosin heavy chain*) kodierenden Gens exprimiert. Van Rooij et al. konnten durch einen gezielten Knock-out dieser miRNA bei Mäusen zeigen, dass sie für Hypertrophie und Fibrose der Kardiomyozyten notwendig ist. Besagte Tiere waren lebensfähig und ihre Entwicklung unauffällig, auf artifiziell erhöhte Nachlast fanden metaplastische Umbauprozesse im Sinne von Hypertrophie und Fibrose allerdings nur verzögert statt. Dadurch konnte ein Zusammenhang zwischen *miR-208* und der myokardialen Reaktion auf Stress hergestellt und gezeigt werden, dass diese miRNA durch Beeinflussung der Expression von  *$\beta$ MHC* ( *$\beta$ -myosin heavy chain*), einer langsamen *Adenosintriphosphatase* (*ATPase*), auf die Stoffwechselaktivität des Herzmuskels einwirkt (VAN ROOIJ et al., 2007). Auch andere Studien stellten einen Zusammenhang zwischen der *miR-208-Familie* und kardialem Remodeling her (CHEN et al., 2014c) und belegten sogar eine negativ prognostische Korrelation zwischen einer Erhöhung von *miR-208* und der Gefahr eines Herzversagen oder Versterbens (LV et al., 2014).

Die muskelspezifischen Mikro-Ribonukleinsäuren *miR-1* und *miR-133* sind auf dem gleichen genetischen Locus kodiert und werden während der Entwicklung von Herz- und Skelettmuskulatur gewebespezifisch polycistronisch transkribiert (CHEN et al., 2006; ZHAO et al., 2007). *MiR-1-1* und *1-2* werden im Herzen vor allem während der Kardiogenese und bei Differenzierungsprozessen des Gewebes exprimiert. Sie werden kammerspezifisch umgesetzt und scheinen negativ regulatorisch auf die Proliferation des Myokards einzuwirken. Während der kardialen Entwicklung geht eine übermäßige Expression von *miR-1* mit einer verminderten

Anzahl an proliferierenden ventrikulären Kardiomyozyten einher (ZHAO et al., 2005). Eine gezielte Beseitigung dieser miRNA resultiert wiederum in einer Fehlsteuerung der Kardiogenese. So traten bei Knock-out-Mäusen mit Mangel an *miR-1-2* gehäuft morphologische Anomalitäten des Herzens auf, die bei bis zu 50 % der Tiere bis zum Absetzalter zum Tode führten. Bei überlebenden Mäusen wurden gehäuft Rhythmusstörungen und eine Beeinträchtigung des normalen Zellzyklus festgestellt. Ein Mangel an *miR-1-2* konnte nicht durch *miR-1-1* ausgeglichen werden, so dass das Fehlen beider Mikro-Ribonukleinsäuren vermutlich zu einer Häufung an abnormen Befunden führt (ZHAO et al., 2007). Besser et al. wiesen nach, dass eine verminderte Umsetzung der *miR-1/miR-133-Cluster* zu einer  $\beta$ -Rezeptor-vermittelten Modulation der Kalziumströmung und zu einem langen QT-Intervall im EKG führt. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass besagte miRNAs durch Kontrolle der  $\beta$ -adrenergen Wirkung auf die kardiale Repolarisation Einfluss nehmen (BESSER et al., 2014). Zusätzlich scheint eine gesteigerte Expression von *miR-133* über Hemmung des genregulatorisch wirksamen Proteins *Serum-Response-Faktor* die myoblastische Proliferation zu fördern (CHEN et al., 2006). Mehrere Studien konnten zeigen, dass sowohl *miR-1* als auch *miR-133* Einfluss auf diejenigen Gene nehmen, die mit myokardialem Wachstum, Differenzierung und Apoptose in Verbindung stehen und somit eine Schlüsselrolle bei der Entstehung kardialer Hypertrophie innehaben (XU et al., 2007; WANG et al., 2009).

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Einfluss von miRNAs auf die Angiogenese, da diese für das Ausmaß der Folgeschädigung nach myokardialer Ischämie aufgrund von Infarkten maßgeblich entscheidend ist. Eine Stilllegung des Enzyms *Dicer*, das für die zytoplasmatische Reifung von miRNAs unersetzlich ist, führt in vivo durch eine negative Beeinträchtigung der Angiogenese zu embryonaler Letalität. Bestimmte miRNAs scheinen also Einfluss auf Faktoren zu haben, die für die Bildung von Blutgefäßen bedeutend sind, so dass eine Deregulierung der miRNA-Expression zu einer gestörten Gefäßbildung führt (YANG et al., 2005). Eine Folgestudie konnte diese Faktoren näher bestimmen und nachweisen, dass miRNAs regulatorisch auf Redox-regulierte Signalwege einwirken, die für die Signalübertragung zur Induktion der Angiogenese wichtig sind, wobei vor allem die *miR-29-Gruppe* von Bedeutung war (SHILO et al., 2008).

Eine Profilerstellung der miRNA-Expression aus murinen Myokardproben nach in

vivo herbeigeführter Ischämie identifizierte Mikro-Ribonukleinsäuren, die mit dem sogenannten *Ischämie-Reperfusion-Syndrom* in Verbindung stehen. Hier fiel auf, dass vor allem die Expression von *miR-21* nach ischämischer Reperfusion massiv gesteigert war (ROY et al., 2009). Shan et al. demonstrierten, dass *miR-1* und *miR-206* vermutlich den apoptotischen Zelltod nach kardialer Ischämie regulieren, da deren Expression nach einem experimentell herbeigeführten Myokardinfarkt bei Laborratten signifikant erhöht war (SHAN et al., 2009).

Dass sich miRNAs auch nachteilig auf die Herzfunktion auswirken können, konnte durch die übermäßige Expression von *miR-1* in transgenen Mäusen nachgewiesen werden. Eine massive Erhöhung dieser miRNA verursachte ungünstige strukturelle Umbauprozesse, die zu einer beeinträchtigten Kontraktilität des Herzmuskels führten (AI et al., 2012).

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der kardialen Reaktion auf Schädigung und Stress und untersuchte diejenigen miRNAs eingehend, die scheinbar durch besagte Noxen induzierbar sind und hypertrophe metaplastische Prozesse in Gang setzen. In vitro führte eine gesteigerte Umsetzung dieser Mikro-Ribonukleinsäuren zu Hypertrophie der Kardiomyozyten. Eine übermäßige Expression von *miR-195*, die durch kardialen Stress induzierbar ist und bei Hypertrophie gehäuft vorkommt, führte bei transgenen Mäusen zu pathologischen Umbauprozessen des Myokards und Herzversagen (VAN ROOIJ et al., 2006).

Ein in vitro durchgeführter Vergleich der Expressionsprofile atrialer, humaner Kardiomyozyten mit Sinusrhythmus und chronischem Vorhofflimmern zeigte, dass die Expression von *miR-21* bei Vorhofflimmern signifikant erhöht war. Chronisches Vorhofflimmern induziert morphologische und elektrische atriale Anomalitäten, wobei die Abnahme der Anzahl an L-Typ-Calcium-Kanälen Hauptmerkmal der elektrischen Umbauprozesse ist und maßgeblich für die Verkürzung des Aktionspotentials verantwortlich gemacht wird, die grundlegend für die Aufrechterhaltung der Arrhythmie ist. Es wird vermutet, dass der Anstieg von *miR-21* mitverantwortlich für die durch Vorhofflimmern induzierten elektrischen Umbauprozesse des atrialen Myokards ist (BARANA et al., 2014). Eine weitere aktuelle Studie führte bei Hunden mit Hilfe von Schrittmachern künstlich ein Tachykardie-induziertes Herzversagen herbei und untersuchte zeitabhängig die zell- und kammerspezifische Expressionshöhe kardialer miRNAs. Es zeigte sich, dass die Abweichung der miRNA-Umsetzung im linken Vorhof

prägnanter war als im linken Ventrikel und in Fibroblasten größer als in Kardiomyozyten. *MiR-21* trat auch hier als miRNA mit der stärksten profibrotischen Wirkung hervor und scheint auf diese Weise mit der Entstehung von Vorhofflimmern assoziiert (CHEN et al., 2014c).

#### **2.4.2. Mikro-Ribonukleinsäuren bei Dilatativer Kardiomyopathie**

Eine genomweite Untersuchung der kardialen Mikro-Ribonukleinsäuren-Expression zeigte, dass sich die Umsetzung bestimmter miRNAs zwischen herzkranken und gesunden Patienten unterscheidet (IKEDA et al., 2007). Hierbei ist von Bedeutung, dass nicht eine bestimmte miRNA für die phänotypische Ausprägung einer Erkrankung verantwortlich zu sein scheint, sondern dass die Gesamtheit der Veränderungen dieser organspezifischen Biomarker auf die Genexpression einwirkt (NAGA PRASAD & KARNIK, 2010). Bei verschiedenen Kardiomyopathien wie DCM, ICM und AS treten spezifische Expressionsprofile auf, so dass diese zur Diagnosestellung herangezogen werden können (IKEDA et al., 2007). Sogar im Spätstadium einer Erkrankung mit klinischer Manifestation einer Dekompensation kann das vorhandene kardiale miRNA-Profil als spezifischer Fingerabdruck der zugrunde liegenden Herzerkrankung abgelesen werden (NAGA PRASAD & KARNIK, 2010).

Um den Einfluss kardialer Mikro-Ribonukleinsäuren auf die Integrität der Kardiomyozyten zu untersuchen, führten Rao et al. bei Labortieren eine herzmuskelspezifische Deletion von *dgcr8* herbei, einem Gen, das für die Biogenese von Mikro-Ribonukleinsäuren verantwortlich ist. Betroffene Tiere zeigten frühzeitig eine linksventrikuläre Dysfunktion, die noch vor Erreichen des Erwachsenenalters zu Kongestion führte (RAO et al., 2009). Ähnliche Resultate lieferte eine Studie von Chen et al., bei der aus dem Kardiomyozyten-spezifischen Knockout des Enzyms *Dicer* eine mangelhafte Produktion kardialer kontraktiler Proteine und eine fehlerhafte Anordnung der Sarkomere resultierte. Alle Mäuse mit *Dicer*-Mutation verstarben postnatal an hochgradiger DCM mit kongestivem Herzversagen. Da dieses Enzym so essentiell für eine normale Herzfunktion zu sein scheint, wurde das enzymatische Level bei Menschen mit DCM im Endstadium untersucht und festgestellt, dass die Expression von *Dicer* stark reduziert ist. Nach Implantation eines linksventrikulären Herzunterstützungssystems, das die Herzfunktion fördert, stiegen die Werte wieder deutlich an (CHEN et al., 2008a). Diese Ergebnisse belegen die tragende Rolle kardialer miRNAs bei der komplexen

Regulation von Signalverarbeitung und -vernetzung der Herzfunktion und zeigen, dass deren Verlust zu einer Kardiomyopathie und letztendlich final zu Herzversagen führt (ZHU et al., 2013).

Naga Prasad et al. identifizierten ein für DCM spezifisches Expressionsprofil aus Myokardproben von Patienten im Endstadium der Erkrankung. Acht miRNAs waren im Vergleich zu physiologischen Proben signifikant verändert, darunter auch zwei (*miR-7* und *miR-378*), die zuvor noch nicht mit kardialer Pathologie in Verbindung gebracht wurden. Eine Untersuchung der Zielmoleküle zeigte, dass deren Gehalt invers mit dem Auftreten der regulatorisch agierenden miRNAs korreliert (NAGA PRASAD et al., 2009). Die bisherigen Studien beschäftigten sich meist mit der miRNA-Umsetzung bei Patienten im Endstadium des Herzversagens und verwendeten Myokardproben nach Explantation des betroffenen Organs. Um herauszufinden, inwiefern bereits in früheren Stadien der Erkrankung spezifische Profile nachweisbar sind, führten Gupta et al. eine Mikroarray-Analyse mit PBMCs von Patienten mit chronischem stabilen Herzversagen aufgrund einer DCM durch. Die Expressionsprofile aus PBMCs bei Patienten mit DCM unterschieden sich signifikant von dem bisher bekannten spezifischen Muster kardialer miRNAs bei dieser Erkrankung. Nicht eine der bisher bekannten mit DCM in Zusammenhang stehenden miRNAs, war bei der Untersuchung der miRNA-Expression in PBMCs verändert. Allerdings konnte auch in diesem Probenmaterial bereits in frühem Krankheitsstadium ein eindeutiges miRNA-Muster nachgewiesen werden, das einheitlich von einer Herunterregulierung der *miRNA-548-Gruppe* geprägt war. Eine Analyse der Zielmoleküle der besagten Gruppe ergab eine eindeutige Zunahme von Signalmolekülen und -wegen, die mit kardiovaskulärer Erkrankung in Verbindung stehen (GUPTA et al., 2013).

Da die *miR-30-Familie* in vitro prägnanten Einfluss auf kardiale zelluläre Vorgänge wie Fibrose, Hypertrophie, Zellproliferation, Apoptose sowie mitochondriale Prozesse ausübt, führten Wijnen et al. bei transgenen Labortieren eine spezifisch in Kardiomyozyten gesteigerte Produktion von *miR-30c* herbei. Betroffene Tiere waren in den ersten Lebenswochen unauffällig, entwickelten dann aber progressiv eine schwere Form der DCM. Eine Analyse der Genexpression vor der phänotypischen Manifestation der Erkrankung zeigte, dass eine mitochondriale Dysfunktion aufgrund eines Proteinmangels der Oxidative-Phosphorylierungskomplexe ursächlich hierfür ist. Somit konnte in vivo ein Zusammenhang zwischen

der Expression der *miR-30-Familie* und der kardiomyozytären Entwicklung von DCM durch Einflussnahme auf die mitochondriale Funktion hergestellt werden (WIJNEN et al., 2014). Die individuelle Stilllegung kardialer miRNAs (*miR-1*, *-29c*, *-30c*, *-30d*, *-149*, *-486*, *-499*), die bei Labortieren mit Phospholamban-Mangel und daraus resultierender DCM herunterreguliert waren, resultierte in vitro durch eine Erhöhung apoptotisch fungierender Effektoren jeweils in einem stark ausgeprägten Zelltod. Besagte miRNAs scheinen kardioprotektiv das Überleben der Zellen zu schützen und ein Abfall ihres Levels scheint pro-apoptotisch wirksame Systeme zu aktivieren und so zu Zellverlust und Dekompensation zu führen (ISSERLIN et al., 2015).

In der Veterinärmedizin liegt derzeit erst eine Studie vor, die sich mit der Mikro-Ribonukleinsäure-Expression bei DCM beschäftigte. Steudemann et al. untersuchten in einer ersten Pilotstudie die Umsetzung kardialer miRNAs bei Dobermännern, die an einer DCM mit elektro- und echokardiographischen Veränderungen erkrankt waren. Im Vergleich zu gesunden Tieren dieser Rasse waren geringe Abweichungen in der Expression bestimmter miRNAs detektierbar (STEUDEMANN et al., 2013).

## **2.5. Neuartige Therapieansätze mit Mikro-Ribonukleinsäuren**

Mikro-Ribonukleinsäuren scheinen großes Potential als neuartige Biomarker zur Diagnosestellung, prognostischen Einschätzung und Kontrolle des Therapieerfolgs bei verschiedenen Erkrankungen zu besitzen. Da sie häufig große regulatorische Bedeutung bei der Entstehung und Progression verschiedener pathophysiologischer Vorgänge haben, besteht großes wissenschaftliches Interesse daran, die Beeinflussung der miRNA-Expression als neuartigen therapeutischen Ansatz zu verwenden (GENINI et al., 2014). Eine Möglichkeit, die Expressionshöhe bestimmter miRNAs zu senken, stellen sogenannte *Antagomirs* dar. Bei *Antagomirs* handelt es sich um chemisch synthetisierte Oligonukleotid-Analoga, die gezielt spezifische miRNAs stilllegen können (GANGULI et al., 2011). Eine derartige Inhibierung bestimmter miRNAs bietet großes therapeutisches Potential (BARTELS & TSONGALIS, 2009). Beispiel für einen solchen Therapieansatz ist der Einsatz von *Antagomir-92a*. Bei *miR-92* handelt es sich um eine Mikro-Ribonukleinsäure mit anti-angiogenetischem Potential. Auf Antagomir-92a-basierende Verfahren konnten zeigen, dass eine lokale Therapie frühzeitige postischämische Reperfusionsschäden reduziert und langfristig Ischämie-

induzierte Umbauprozesse des Myokards verhindert. Eine einzige intrakoronare Injektion von *Antagomir-92a* zum Zeitpunkt der Reperfusion konnte die Wirkung von *miR-92a* beim Minipig für bis zu zehn Tage hemmen, begünstigte die Neubildung von Gefäßen und verhinderte ungünstige Umbauprozesse des Herzmuskels (HINKEL et al., 2013; BELLERA et al., 2014). Shen et al. beschäftigten sich mit dem therapeutischen Nutzen der *miR-30-Familie* bei myokardialer Ischämie, da diese miRNAs nachweislich eine regulatorische Rolle bei kardialen Infarkten und Hypoxie innehaben. Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) ist ein gasförmiges Molekül, das protektiv kardiovaskuläre hypoxische Schädigung abmildert und im Herzen hauptsächlich durch das Enzym *Cystathionine- $\gamma$ -Lyase* (CSE) produziert wird. CSE konnte als direktes Zielobjekt der *miR-30-Gruppe* identifiziert werden, da die Expression bei erhöhtem Level an *miR-30* deutlich reduziert ist und folglich auch der  $H_2S$ -Gehalt sinkt. Eine Stilllegung der *miR-30-Familie* konnte in vitro und in vivo Schutz vor ischämischer Schädigung bieten, da CSE verstärkt exprimiert wird und dadurch der Gehalt des kardioprotektiven  $H_2S$  ansteigt (SHEN et al., 2015). Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass die therapeutische Verwendung von *Antagomir-30* ähnliche kardioprotektive Effekte bei Patienten mit kardialer Ischämie aufweist.

Die Wirkung bestimmter miRNAs kann nicht nur durch Antagomirs unterdrückt, sondern im Gegenzug auch durch Verwendung der synthetisch produzierten doppelständigen miRNA selbst verstärkt werden. Es ist beispielsweise bekannt, dass *miR-146a* einen wichtigen negativ regulatorischen Effekt auf die angeborene entzündliche Immunreaktion hat und bei verschiedenen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis abweichend exprimiert wird. Pauley et al. konnten zeigen, dass *miR-146a* nicht nur in vitro einen inhibitorischen Effekt auf die Bildung von Osteoklasten hat, sondern dass auch die intravenöse Applikation dieser miRNA bei Labortieren mit künstlich erzeugter Arthritis zu einer verminderten Zerstörung des Knorpel- und Knochengewebes führt (PAULEY & CHA, 2011).

Die Erforschung der spezifischen Zielobjekte bestimmter miRNAs sowie eine umfassende Kenntnis über die Art der Beeinflussung von Signal- und Transportwegen durch miRNAs können weitere therapeutische Optionen eröffnen. Durch ihre weitreichende Einflussnahme auf die Pathogenese bei Herz- und Gefäßerkrankungen besteht auch im Bereich der Kardiologie große Hoffnung, dass durch weitere Forschungsprojekte der therapeutische Einsatz von Mikro-

---

Ribonukleinsäuren zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen möglich wird (WANG et al., 2009).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Aufbau der retrospektiven Longitudinalstudie

##### 1.1. Allgemeine Angaben

Ziel der Studie ist es, die Mikro-Ribonukleinsäure-Expression bei einzelnen Dobermännern mit DCM in verschiedenen Stadien ihrer Erkrankung zu untersuchen und zu evaluieren, ob sich die Umsetzung der kardialen miRNAs im Krankheitsverlauf signifikant verändert.

Als Untersuchungsmaterial der retrospektiven Longitudinalstudie dienten Proben und Daten aus der Patientenkartei der 2004 begonnenen Dobermannstudie der kardiologischen Abteilung an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mittlerweile circa 2500 Untersuchungen umfasst. Bei den Patienten handelt es sich um kundeneigene Tiere, deren Daten während einer tierärztlichen Routineuntersuchung erhoben wurden. Die Hunde wurden zunächst im Rahmen des jährlichen kardiologischen Routinechecks in der Abteilung für Tierkardiologie vorstellig und wurden nach Manifestation einer DCM in regelmäßigen Intervallen zur Kontrolluntersuchung einbestellt.

##### 1.2. Auswahl des Untersuchungsmaterials

Als Probenmaterial wurden Serumproben von Dobermännern gewählt, bei denen ein typischer Krankheitsverlauf der rassespezifischen DCM vorlag. Die Hunde waren bei der jährlichen Kontrolluntersuchung zunächst unauffällig, entwickelten dann elektrokardiographische Anomalitäten (*Okkultes Stadium B1*) und mit zunehmender Progression der Erkrankung auch echokardiographische Auffälligkeiten im Sinne einer systolischen Dysfunktion (*Okkultes Stadium B2*). Je Hund wurden zwei Proben von Untersuchungstagen, an denen sie als herzgesund befunden wurden, verwendet (*Probennummer 1 und 2*); diese bilden gemeinsam die gesunde Kontrollgruppe. Mit dieser Kontrollgruppe wurde jeweils die Mikro-Ribonukleinsäure-Expression in den Proben der Phase Okkult B1 (*Probennummer 3*) und Okkult B2 (*Probennummer 4*) derselben Tiere verglichen.

**Demnach wurden folgende Gruppen zur Analyse gebildet:**

- **Kontrollgruppe:** setzt sich zusammen aus den Untersuchungstagen „Gesund“ (*Probe Nummer 1 jedes Hundes*) und der letzten kardiologisch unauffälligen Untersuchung des Tieres („Frühstadium“) innerhalb von 18 Monaten vor ersten diagnostisch erfassbaren Anzeichen einer DCM (*Probe Nummer 2 jedes Hundes*)
- **Gruppe „Okkult B1“** (*Probe Nummer 3 jedes Hundes*)
- **Gruppe „Okkult B2“** (*Probe Nummer 4 jedes Hundes*)

Eine zusätzliche Patientengruppe, bei der je Tier eine Untersuchung der Krankheitsstadien „Okkult B1“ und „Okkult B2“ erfolgte, ergänzt die Proben mit DCM-Befund.

## **2. Auswahl der Patienten**

### **2.1. Einschlusskriterien**

Folgende Kriterien mussten erfüllt sein, um den Einschluss eines Patienten in die Studie zu ermöglichen:

- Das Alter des Hundes beträgt mehr als zwölf Monate.
- Es handelt sich bei dem Patienten um einen reinrassigen Dobermann.
- Die echokardiographische Untersuchung ergibt keinen Hinweis auf eine kongenitale Herzerkrankung oder Mitralklappenendokardiose.
- Die klinische Untersuchung ist abgesehen von den eventuell erhobenen kardiologischen Befunden unauffällig, die Tiere haben ein ungestörtes Allgemeinbefinden.
- Jeder Untersuchungstag umfasst eine allgemeine klinische, sowie eine spezielle kardiologische Befunderhebung inklusive echokardiographischer Untersuchung mit M-Mode-Messung, Volumenmessung mittels Scheibchensummationsmethode nach Simpson zur Erhebung des auf die Körperoberfläche normalisierten LVEDV und LVESV sowie die Durchführung eines Kurz- und Langzeit-EKGs.
- Im Rahmen der Routineuntersuchung wurde eine Blutuntersuchung (Serumparameter, cTnI) durchgeführt und restliches Probenmaterial wurde

aufbewahrt.

## 2.2. Definition der gebildeten Gruppen

Es wurden abhängig von den Befunden folgende Untersuchungsgruppen gebildet:

- **„Gesund“:** Die Hunde zeigten keine klinischen Symptome einer systemischen Erkrankung. Die klinische und kardiologische Untersuchung war inklusive der erhobenen echokardiographischen und elektrokardiographischen Befunde unauffällig. Im 24-Stunden-EKG traten  $< 50$  VPCs auf. Die Volumenmessung ergab ein  $LVEDV/BSA < 95$  ml/m<sup>2</sup> und ein  $LVESV/BSA < 55$  ml/m<sup>2</sup>.
- **„Frühstadium“:** Die Kriterien entsprechen denen des Stadiums „Gesund“ und die Untersuchung wurde gemeinsam mit der Phase „Gesund“ als gesunde Kontrollgruppe verwendet. Das Stadium wurde retrospektiv zugeordnet, wenn bei den Patienten im Zeitraum von 18 Monaten nach dieser Untersuchung Auffälligkeiten okkulter DCM diagnostiziert wurden.
- **„Okkulte Phase B1“:** Die Hunde zeigten keine klinischen Symptome einer systemischen Erkrankung. Es waren keine für den Besitzer ersichtlichen Symptome der DCM wie Leistungsschwäche, Kollaps oder Synkopen aufgetreten. Die klinische Untersuchung war unauffällig, kardiovaskuläre Anomalitäten (auskultatorische Arrhythmien, Pulsdefizite) waren, insofern vorhanden, zulässig. Es traten bei dieser oder einer bereits vorangegangenen elektrokardiographischen Untersuchung  $> 100$  VPCs im Holter-EKG auf (therapiebedingte Normalisierung der Befunde bei der verwendeten Untersuchung möglich). Die echokardiographische Volumenmessung war unauffällig bei  $LVEDV/BSA < 95$  ml/m<sup>2</sup> und  $LVESV/BSA < 55$  ml/m<sup>2</sup>.
- **„Okkulte Phase B2“:** Die Patienten zeigten keine klinischen Symptome einer systemischen Erkrankung. Es waren keine für den Besitzer ersichtlichen Symptome der DCM wie Leistungsschwäche, Kollaps, Synkopen oder Husten aufgefallen. Die klinische Untersuchung war unauffällig, kardiovaskuläre Anomalitäten (blasse Schleimhäute, schwacher Puls, Herzgeräusch links apikal, auskultatorische Arrhythmien, Pulsdefizit) waren, insofern vorhanden, zulässig. In einer früheren 24-Stunden-EKG-Untersuchung traten bereits  $> 100$  VPCs auf (Okkult B1), so

dass manche Tiere abhängig von ihren individuellen Befunden bereits antiarrhythmische Therapie erhielten. Zusätzlich traten bei den Patienten im Krankheitsverlauf echokardiographische Auffälligkeiten mit LVEDV/BSA  $\geq 95$  ml/m<sup>2</sup> und LVESV/BSA  $\geq 55$  ml/m<sup>2</sup>, wobei LA/Ao  $\leq 1,5$  war. Bei Patienten mit myokardialer Dysfunktion, die über einen längeren Zeitraum mehrmals zur Kontrolluntersuchung vorgestellt wurden, kam es unter Therapie möglicherweise wieder zu einer Normalisierung der Befunde am verwendeten Untersuchungstag.

### **2.3. Patientengut**

Von vier Patienten lagen die kompletten Untersuchungsdaten für alle Stadien vor (Patient A, Patient B, Patient C, Patient D). Bei einer Untergruppe von vier zusätzlichen Patienten wurden Proben des Stadiums „Okkult B1“ und „Okkult B2“ untersucht (Patient E, Patient F, Patient G, Patient H).

Von den insgesamt acht Tieren waren fünf männlich und drei weiblich. Die für die einzelnen Untersuchungsstadien zutreffenden klinischen Charakteristika der Patienten können in Tabelle 1 eingesehen werden.

**Tabelle 1:** Basischarakteristika und klinische Merkmale der Patienten in den untersuchten Stadien (Median und Bereich)

	<b>Gesund (n = 4)</b>	<b>Frühstadium (n = 4)</b>	<b>B1 (n = 8)</b>	<b>B2 (n = 8)</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	6,1 (5,0 – 6,9)	7,5 (6,8 – 8,4)	8,0 (5,5 – 8,6)	9,0 (5,8 – 11,9)
<b>w/m</b>	2/2	2/2	3/5	3/5
<b>Gewicht (kg)</b>	36,4 (28,0 – 42,0)	38,9 (27,5 – 41,6)	37,0 (27,3 – 40,3)	37,5 (26,8 – 40,4)
<b>LVESV (ml/m<sup>2</sup>)</b>	47,1 (36,0 – 52,3)	36,1 (34,6 – 51,8)	49,7 (38,1 – 54,1)	62,4 (48,0 – 83,1)
<b>LVEDV (ml/m<sup>2</sup>)</b>	82,0 (77,1 – 91,9)	85,5 (63,3 – 93,1)	89,2 (76,2 – 94,9)	101,7 (81,5 – 126,1)
<b>EF (%)</b>	57,9 (43,7 – 73,7)	51,5 (46,6 – 60,9)	43,6 (37,3 – 59,8)	40,6 (31,6 – 48,9)
<b>VPCs/24h</b>	12 (0 – 35)	27 (7 – 96)	194,5 (0 – 4613)	3534 (7 – 11500)
<b>cTnI (ng/ml)</b>	0,26 (0,20 – 0,35)	0,34 (0,17 – 0,46)	0,34 (0,06 – 0,96)	0,21 (0,13 – 0,79)
<b>Harnstoff (mmol/l)</b>	6,2 (5,6 – 7,3)	6,2 (5,2 – 9,5)	6,4 (4,3 – 7,5)	5,4 (3,9 – 8,7)
<b>Kreatinin (µmol/l)</b>	78 (73 – 96)	70 (64 – 107)	69 (54 – 88)	65 (56 – 86)

(n: Anzahl der Patienten, w/m: weibliche/männliche Patienten, VPCs/24h: Anzahl der Ventrikulären Extrasystolen in 24 Stunden, LVEDV: enddiastolisches linksventrikuläres Volumen genormt auf die Körperoberfläche, LVESV: endsystolisches linksventrikuläres Volumen genormt auf die Körperoberfläche, EF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion).

## **2.4. Durchgeführte Untersuchung**

Die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Tiere können in Tabelle 2 eingesehen werden.

### **2.4.1. Allgemeine Untersuchung**

Das Signalement (Rasse, Geschlecht, Alter, Gewicht) des jeweiligen Patienten wurde festgestellt und die Identität anhand eines Mikrochips oder einer Tätowierung kontrolliert. Es wurde eine Anamnese aufgenommen und das Tier einer vollständigen klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Im Rahmen der kardiologischen Untersuchung erfolgte eine Adspektion der Schleimhäute mit Beurteilung der kapillären Füllungszeit, eine Auskultation über den Zeitraum von einer Minute bei zeitgleicher Palpation des Pulses an der Arteria femoralis, sowie eine Begutachtung der Venae jugulares.

### **2.4.2. Kurzzeit-Elektrokardiogramm**

Zur Beurteilung der Herzfrequenz und des vorherrschenden Rhythmus wurde ein Kurzzeit-EKG gemäß der Standardtechnik in rechter Seitenlage angefertigt. Es wurde ein EKG-Gerät mit zwölf Kanälen verwendet (Schiller Cardiovit AT-10, SCHILLER Medizintechnik GmbH, Germany). Bei allen Hunden wurden die Ableitungen I, II, III nach Eindhoven, aVR, aVL, aVF nach Goldberger sowie die Brustwandableitungen aufgezeichnet. Das EKG wurde über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden aufgenommen und zur genauen Evaluierung der elektrischen Aktivität ausgedruckt und ausgewertet. Während der gesamten Dauer der echokardiographischen Untersuchung wurde zusätzlich ein mitlaufendes EKG angeschlossen.

### **2.4.3. Langzeit-Elektrokardiogramm**

Nach der echokardiographischen Untersuchung wurde ein Holter-EKG angebracht, das die elektrische Aktivität über eine Dauer von 24 Stunden zu Hause im normalen Umfeld des Hundes aufzeichnete. Die Besitzer wurden angewiesen, die Tiere nicht in ihrer Leistung zu limitieren und gewohnte Aktivitäten während der EKG-Aufzeichnung nicht zu reduzieren. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde der EKG-Rekorder abgebaut und es erfolgte eine Auswertung der Aufnahme mit Hilfe kommerziell erwerblicher Programme zur Holteranalyse (*Custo tera, Arcon Systems GmbH, Starnberg, Deutschland; Amedtech ECGpro Holter Software, EP 810 digital recorder, Medizintechnik Aue GmbH, Aue, Deutschland*). Eine manuelle

Überprüfung und Korrektur der durch die Software vorgenommenen Einteilung und Auswertung wurde durchgeführt. Die genaue Anzahl an VPCs wurde ebenso dokumentiert wie Malignitätskriterien der vorhandenen Arrhythmien (Couplets, Triplets, Salven, Polymorphismus der VPCs, Geschwindigkeit der in den Herzrhythmus einfallenden Extrasystolen) oder anderweitige elektrokardiographische Auffälligkeiten.

#### **2.4.4. Herzultraschalluntersuchung**

Die echokardiographische Untersuchung erfolgte ohne Sedierung in zunächst rechter, dann linker Seitenlage mit Hilfe des Ultraschallgerätes *Vivid 7* der Firma *GE* (*Vivid 7 dimension, General Electric Medical System, Waukesha, Wisconsin*). Es wurde eine 2,0/4,3 MegaHertz Ultraschallsonde verwendet und während der kompletten Dauer der Untersuchung ein mitlaufendes EKG an das Tier angeschlossen. Alle Ultraschallaufnahmen wurden über die Dauer von mindestens drei Herzzyklen aufgenommen und zur späteren Auswertung und Dokumentation digital gespeichert. Die Volumenmessung mittels Scheibchensummationsmethode nach Simpson erfolgte sowohl in der Längsachse von rechts parasternal als auch von links apikal im Vierkammerblick. Alle vier Herzklappen wurden mit Hilfe des Farbdopplers auf Undichtigkeiten hin untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Spektraldopplermessung (pulsed-wave und continuous-wave Doppler) der Aorten- und Pulmonalflussgeschwindigkeit.

**Tabelle 2:** Untersuchungsergebnisse der Patienten im zeitlichen Verlauf (Probencodes: 1 = Untersuchung „Gesund“, 2 = Untersuchung „Frühstadium“, 3 = Untersuchung „Okkult B1“, 4 = Untersuchung „Okkult B2“, Patient A - H)

Probe	Datum	Nr.	VES/24 h	LVEDV	LVESV	EF
A1	05.08.2010	1	22	83,9	50,2	59,7
A2	20.12.2011	4	30	93,1	51,8	46,98
A3	05.04.2012	5	208	94,7	54,1	43,30
A4	31.07.2012	6	498	103	64,1	37,46
B1	11.05.2010	2	35	80,1	52,3	73,7
B2	07.04.2011	3	96	63,6	34,6	46,6
B3	06.03.2012	6	2495	93,3	50,9	42,4
B4	24.03.2013	10	2914	103,1	70,6	31,56
C1	08.07.2010	2	2	77,1	36,0	56,0
C2	09.04.2013	5	24	81,6	36,6	56,03
C3	19.11.2013	6	127	76,2	38,1	50,76
C4	25.09.2014	9	4153	96,5	60,8	44,0
D1	16.05.2012	1	0	91,6	44,0	43,74
D2	16.05.2013	3	7	89,3	35,5	60,9
D3	02.10.2013	4	130	94,8	52,3	50,0
D4	08.09.2014	6	8328	105,1	56,4	48,9
E3	11.12.2012	3	4613	85,0	53,9	37,3
E4	05.12.2013	7	1000	100,0	57,8	41,8
F3	08.08.2006	3	207	81,7	48,0	43,9
F4	22.12.2006	5	4285	81,5*	48,0*	39,37
G3	20.12.2006	1	182	94,90	48,5	59,79
G4	17.02.2011	14	11500	126,1	83,1	37,73
H3	03.07.2014	4	0*	81,7	46,5	43,3
H4	13.11.2014	5	7*	100,45	63,9	43,17

(Nr.: laufende Nummer der verzeichneten Untersuchung des jeweiligen Hundes, VES/24 h: Anzahl der Ventrikulären Extrasystolen in 24 Stunden, LVEDV: linksventrikuläres enddiastolisches Volumen genormt auf die Körperoberfläche (ml/m<sup>2</sup>), LVESV: linksventrikuläres endsystolisches Volumen genormt auf die Körperoberfläche (ml/m<sup>2</sup>), EF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%), \*: Befund normalisiert unter bereits bestehender Therapie).

### 2.4.5. Blutentnahme

Zur diagnostischen Beurteilung der Serumparameter erfolgte eine Blutentnahme aus der Vena jugularis. Überschüssiges Probenmaterial wurde mit schriftlicher Zustimmung des Besitzers für zusätzliche Analysen aufbewahrt. Die Blutprobe wurde mindestens 20 Minuten für den Gerinnungsprozess ruhen gelassen und anschließend mit einer Rotordrehzahl von 4000 Umdrehungen pro Minute über fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Serum wurde in 0,5 ml Polypropylen-Röhrchen (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*) pipettiert und bis zur Isolierung der RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

### 2.5. Therapeutische Intervention

Wenn indiziert, erhielten Patienten mit okkulten DCM bereits kardiale Medikation. Zum Zeitpunkt der Probennahme für Stadium „Okkult B1“ erhielten drei von acht (3/8) Tieren antiarrhythmische Therapie (2/3: ACE-Inhibitor und Sotalol, 1/3: ACE-Inhibitor mit Sotalol und Mexiletin). Die Wirkstoffe und eventuelle Wirkstoffkombinationen wurden abhängig von den individuellen Befunden der Tiere gewählt. Bei den fünf Hunden, die zum Zeitpunkt der Probennahme für dieses Stadium noch keine antiarrhythmische Therapie erhielten, war es die erste Untersuchung mit elektrokardiographischen Auffälligkeiten und die Besitzer entschieden sich dazu, vor Therapiestart eine zeitnahe Folgeuntersuchung zur erneuten Evaluierung durchführen zu lassen. Als die Probe für das Stadium „Okkult B2“ genommen wurde, erhielten alle acht (8/8) Hunde eine kardiale Therapie (2/8: ACE-Inhibitor, 4/8: ACE-Inhibitor und Sotalol, 1/8: ACE-Inhibitor mit Sotalol und Mexiletin, 1/8: Sotalol und Mexiletin). Vier der Tiere (50%) wurden zusätzlich aufgrund bereits detektierter echokardiographischer Auffälligkeiten mit dem Inodilator Pimobendan behandelt. Bei den anderen Patienten wurde diese Therapie im Anschluss an die Probennahme gestartet. Im Falle antiarrhythmischer Therapieresistenz kam es bei einigen Patienten im Krankheitsverlauf zu einer Modifikation der eingesetzten Medikamente, beziehungsweise zu einer Ergänzung durch zusätzliche Antiarrhythmika.

## 3. Laborverfahren

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis der Mikro-Ribonukleinsäure-Expression wurden spezielle Labor-Sets des *miScript PCR Systems* (*miScript II RT Kit*, *miScript PreAMP PCR Kit*, *miScript miRNA PCR Array*, *miScript miRNA PCR*

*Array data analysis tool*) von Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet. Das *miScript® miRNA PCR Array Handbook* bietet einen Überblick über die Abläufe der Laborverfahren und wird mit speziellen Erläuterungen zu den einzelnen Arbeitsschritten durch das *miRNeasy Mini Handbook*, das *miRNeasy Serum/Plasma Handbook* und das *miScript® PreAMP Handbook* ergänzt. Zur Extraktion der RNA aus dem Probenmaterial wurde zusätzlich das *miRNeasy Mini Kit* benutzt. *MiScript miRNA PCR Arrays* enthalten für reife miRNA spezifische Vorwärtsprimer, die in Hinblick auf das miRNome der zu untersuchenden Spezies und unter Berücksichtigung der biologischen Relevanz auf bestimmte Platten aufgebracht wurden. Es wurden spezielle Arrays (*MIFD-3216Z*) mit 384 Kavitäten für das miRNome des Hundes verwendet (siehe Anhang: Abbildung 8, Tabelle 8). Der Versand und die Lagerung der Labormaterialien erfolgten ebenso wie die Handhabung und der Einsatz von labortechnischen Hilfsmitteln exakt nach den Anweisungen des Herstellers.

### 3.1. Extraktion der RNA

Die Aufbereitung und quantitative Amplifikation der Mikro-Ribonukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des *miRNeasy Mini Kits* nach Anleitung des zugehörigen Protokolls (*Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit*) des Herstellers Qiagen.

Die bei -80 °C verwahrten Serumproben wurden gemäß der Anweisung bei Raumtemperatur aufgetaut und unverzüglich weiter verarbeitet. Hierbei wurden jeweils 200 µl des Probenmaterials mit 1000 µl eines speziellen Lyse-Reagens (*Qiazol Lysis Reagent*) versehen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 3,5 µl *Serum/Plasma Spike-In Control miRNeasy* (entsprechend einer Konzentration von  $1,6 \times 10^8$  Kopien pro Mikroliter der Arbeitslösung). Hierbei handelt es sich um die gelöste, synthetisch erzeugte *miR-39* von *C. elegans*, die eine Normierung der Ergebnisse ermöglicht. Nach Hinzufügen von 200 µl Chloroform und anschließender Zentrifugierung trennte sich das Homogenisat in eine obere wässrige, RNA enthaltende Schicht, eine mittlere, DNA enthaltende Schicht und eine untere, Proteine enthaltende, organische Phase. Die relevante obere Phase wurde abpipettiert und die erhaltene Menge quantitativ erfasst. Es erfolgte eine mengenmäßig angepasste Zugabe (1,5 x das Volumen der wässrigen Phase) von 100% Ethanol, das optimale Bindungsbedingungen für RNA-Moleküle ab einer Größe von 18 Nukleotiden

produziert. Während eines multizyklischen Waschvorgangs mit verschiedenen Pufferlösungen wurde das gesamte Probenmaterial in speziellen Spin-Säulen (*RNeasy Mini Spin Columns*) bei Raumtemperatur mehrfach abzentrifugiert und die RNA so an den Filter der Säulen gebunden. Anschließend wurden die isolierten Produkte protokollgemäß in 14 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

### 3.2. Reverse Transkription

Bevor eine Präamplifikation zur quantitativen Anreicherung des Probenmaterials erfolgen kann, ist die Reverse Transkription von Ribonukleinsäure in komplementäre Desoxyribonukleinsäure, sogenannte *complementary DNA (cDNA)*, nötig. Durch Einsatz eines speziellen Laborsets (*MiScript II RT Kit*) ist die Synthese von cDNA, die zum Nachweis hunderter miRNAs verwendet werden kann, in einem einzigen Reaktionsschritt möglich. Die in RNase-freiem Wasser gelöste RNA wurde gemäß der Anleitung des Herstellers *Qiagen (miScript® PreAMP Handbook)* wie folgt verarbeitet: Die Reagenzien zur Herstellung einer speziellen Reaktionsmischung (*Reverse Transcription Master Mix*, bestehend aus *miScript HiSpec Buffer*, *miScript Nucleis Mix*, *miScript Reverse Transcriptase Mix*, und *RNase-freiem Wasser*) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, protokollgemäß vermengt und auf Eis gelagert. Durch die Zugabe der jeweiligen RNA-Probe wurde ein Gesamtvolumen von 10 µl erzeugt. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die selektive Konversion reifer miRNAs in cDNA während einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C. Die spezielle Reaktionsmischung enthält ein duales Puffersystem, das die Umsetzung langer Ribonukleinsäuren hemmt und gezielt die Transkription von miRNAs und snRNAs fördert. Dadurch werden Hintergrundsignale durch längere Ribonukleinsäuren wie mRNAs vermieden, und die Profilerstellung der Expression reifer miRNAs wird optimiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkription ist eine Inkubation bei 95 °C über fünf Minuten nötig. Bei den Proben A1-4, B1-4, C1-4, D1-4, E3, E4, F3 und F4 wurden jeweils 10 µl der cDNA direkt nach der Reversen Transkription in 40 µl RNase freiem Wasser gelöst und dem nächsten Reaktionsschritt zugeführt. Aus organisatorischen Gründen wurden die Proben G3, G4, H3 und H4 nach der Reversen Transkription für ca. 16 Stunden bei – 20°C verwahrt, bevor die Präamplifikation erfolgte.

### 3.3. Präamplifikation

Eine Amplifikation des Probenmaterials mittels PCR-basierender Verfahren

ermöglicht auch die Untersuchung sehr geringer RNA-Mengen von bis zu 10 Nanogramm und resultiert in einer 1000-fachen bis 4000-fachen Vermehrung der Ausgangsprodukte. Mit Hilfe des entsprechenden Laborsets (*miScript PreAMP PCR Kit*) und des zugehörigen Protokolls (*miScript® PreAMP Handbook*) wurden 20 µl einer speziellen Reaktionsformulierung (*Preamplification Master Mix*, bestehend aus *miScript PreAMP Buffer*, *HotStarTaq DNA Polymerase*, *miScript preAMP Primer Mix*, *RNase-freiem Wasser*, *miScript PreAMP Universal Primer*) bei Raumtemperatur aus den verschiedenen Komponenten zusammengestellt und mit jeweils 5 µl gelöster cDNA vermischt. Der Master Mix enthält unter anderem den entsprechenden Primer (*C. elegans mi-39 miScript Primer Assay*) für die interne Kontrolle der miRNA-Expression. Mit Hilfe dieses Verfahrens können die Ergebnisse der Umsetzung endogener miRNAs nach erfolgreicher Beendigung der Realtime-RT-PCR normiert werden.

Ein Thermozykler wurde gemäß der Anleitung für die Amplifizierung von 384 cDNA-Objekten programmiert. Für den Beginn der Reaktion ist die Aktivierung einer bestimmten DNA Polymerase, der sogenannten *HotStarTaq*, durch eine initiale Inkubation über 15 Minuten bei 95°C nötig. Daraufhin erfolgen zwei Durchgänge eines Zyklus, der sich aus drei Schritten zusammensetzt: Denaturierung der DNA bei 94°C über 30 Sekunden, spezifische Anlagerung der Primer bei 55°C über 60 Sekunden, Elongation der DNA-Stränge durch *HotStarTaq* bei 70°C über 60 Sekunden). Es schließt sich ein aus zwei Schritten bestehender PCR-Zyklus (Denaturierung bei 94 °C über 30 Sekunden, Primerhybridisierung und Elongation bei 60 °C über 180 Sekunden) an, der sich zehnmal wiederholt. Nach Beendigung des Prozesses wurde die präamplifizierte cDNA der Anleitung entsprechend in der fünffachen Menge an RNase-freiem Wasser gelöst und auf Eis gelagert.

#### **3.4. Real-Time-quantitative-PCR**

Nach erfolgreicher Präamplifikation der cDNA erfolgt der Nachweis der Expression reifer miRNAs durch qPCR. Das Labor-Set, das hierfür eingesetzt wurde (*MiScript miRNA PCR Array*), enthält spezifische Vorwärtsprimer für mature miRNAs. Das Protokoll (*Reverse Transcription for Quantitative, Real-Time PCR*) kann im entsprechenden Handbuch (*miScript® miRNA PCR Array Handbook*) eingesehen werden. Gemäß der Anleitung wurde ein Reagens aus verschiedenen Komponenten (*QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, *miScript*

*Universal Primer, RNase freies Wasser, Template-cDNA*) zur Anwendung für 384-Well-Platten hergestellt. Die miScript miRNA PCR Platten wurden unter Zuhilfenahme einer Mehrfachkanalpipette mit einem Standardvolumen von 10  $\mu$ l an Untersuchungsmaterial pro Vertiefung beschickt. Anschließend wurden die Platten mit speziellen Schutzfolien versiegelt. Die Arrays wurden bis zur weiteren Verarbeitung für einen maximalen Zeitraum von 20 Stunden bei - 20 °C gelagert, dann bei Raumtemperatur aufgetaut und über den Zeitraum von 60 Sekunden bei 1000 g zentrifugiert. Ein Real-Time PCR System (*Applied Biosystems® 7900HT*) wurde entsprechend des Protokolls programmiert und die Mikro-Ribonukleinsäure-Expressionsanalyse gestartet.

### 3.5. Datenauswertung

Zur Analyse der Real-Time PCR-Daten wurde eine internetbasierte Software (*miScript miRNA PCR Array Web-based Software*) von *Qiagen* verwendet (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>). Nach erfolgreich durchgeführter qPCR wurden die erhaltenen Rohdaten online in das System geladen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der sogenannte *Ct-Wert (cycle threshold)* jeder miRNA. Dabei handelt es sich um eine theoretische Messgröße, die bei einer quantitativen PCR den Moment angibt, in dem bei exponentieller Vermehrung des Probenmaterials das Fluoreszenzsignal erstmalig über das Hintergrundsignal hervortritt. Liegt der Ct-Wert einer Mikro-Ribonukleinsäure beispielsweise bei < 25, dann war deren Fluoreszenzsignal bereits nach weniger als 25 Zyklen detektierbar.

Zur Erhebung der Expressionsabweichungen zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode für relative Quantifizierung verwendet. Hierbei werden die Ct-Werte einzelner miRNAs einer Platte jeweils in Bezug zu dem gemittelten Ct-Wert konstanter Kontrollfaktoren derselben Probe gesetzt, sprich normalisiert. Die zur Normalisierung eingesetzten Referenzgene müssen sich durch eine stabile und weder durch endogene (z.B. Zellzyklus, Zellpathologie) noch exogene (z.B. Probenbearbeitung, Reagenzien) Faktoren beeinflusste Expression auszeichnen. Laut Angaben des Herstellers *Qiagen* sind die Referenzgene *SNORD61*, *SNORD68*, *SNORD72*, *SNORD95*, *SNORD96a*, *RNU6-6P*, für die Primer in den PCR-Platten enthalten sind, in allen Zell- und Gewebetypen des Hundes vorhanden und weisen nach erfolgter Präamplifikation eine PCR-Effizienz von nahezu 100% auf. Zur Datennormalisierung wird

zusätzlich der Ct-Wert der Spike-in Control (*miR-39 von C. elegans*) empfohlen. Für jede Platte wurde der Mittelwert aus den Ct-Werten der *housekeeping genes* sowie der Spike-in Control gebildet und dieser wurde als Referenz zur Erhebung des  $\Delta$ Ct-Wertes einer jeden miRNA verwendet.

Durch Einsatz der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode für relative Quantifizierung sollen methodische und endogene Störfaktoren reduziert und eventuell vorhandene Unterschiede in der RNA-Extraktionseffizienz eliminiert werden.

Der  $\Delta$ Ct-Wert einer Probe wird wie folgt berechnet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$$

Der Expressionsunterschied einer miRNA zwischen zwei Untersuchungsgruppen wird als  $\Delta\Delta$ Ct-Wert angegeben und folgendermaßen berechnet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Gruppe1}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Gruppe2}}$$

Durch die Feststellung des Ct-Wertes wird also eine relative quantitative Beurteilung der Umsetzung einzelner miRNAs möglich. Mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode für relative Quantifizierung analysiert das Analyseprogramm von Qiagen die Expressionsunterschiede der einzelnen Mikro-Ribonukleinsäuren und kalkuliert die sogenannte *fold change* (FC), die angibt, um wie viel sich der Wert der Expression zwischen Vergleichsgruppen verändert.

Die FC wird wie folgt berechnet:

$$\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Für jede miRNA wurde der Mittelwert ihrer Ct-Werte in der gesunden Kontrollgruppe und den beiden Krankheitsgruppen (Okkult B1 und Okkult B2) gebildet und ihr  $\Delta$ Ct-Wert für die jeweilige Gruppe berechnet. Zur Beurteilung des miRNA-Gehaltes zwischen der Kontrollgruppe „Gesund“ und der jeweiligen Krankheitsgruppe wurde der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert jeder miRNA und die FC kalkuliert. Zu jedem Ergebnis wurde das 95% Konfidenzintervall sowie der zugehörige p-Wert angegeben (siehe Tabelle 7). Mit Hilfe der Analysesoftware ist eine Aufbereitung der Ergebnisse sowohl tabellarisch als auch mit Hilfe verschiedener visueller Darstellungsmethoden möglich. Die Grundeinstellungen zur Datenanalyse wurden nach Anleitung des entsprechenden Handbuchs (*miScript® miRNA PCR Array Handbook*) vorgenommen.

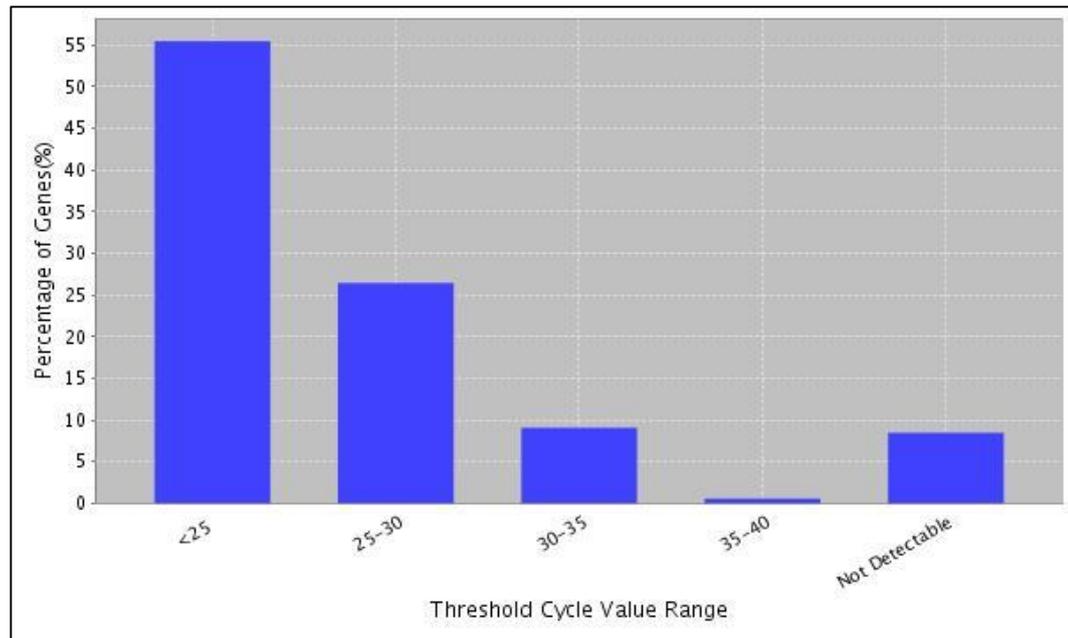
## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Beurteilung des Laborverfahrens**

Es wurden speziell für das miRNome des Hundes ausgelegte Platten des Herstellers *Qiagen* mit 384 Kavitäten verwendet. Von Vorteil gegenüber der Verwendung muriner oder humaner Mikroarrays ist bei diesem Verfahren, dass nur spezies-spezifische miRNAs in Abhängigkeit von ihrer biologischen Relevanz untersucht werden.

#### **1.1. Signalstärke der Mikro-Ribonukleinsäuren**

Die Probe des Untersuchungsstadiums „Okkult B1“ von Patient G (Probe G3) wurde aus der Gesamtauswertung ausgeschlossen, da die Signalstärke der miRNA-Expression im Vergleich zu den anderen Proben zu schwach war. Von den auf den Platten enthaltenen miRNAs konnten durchschnittlich 91,28 % nachgewiesen werden (90,96 % in der Kontrollgruppe, 92,19 % in Gruppe „Okkult B 1“ und 90,70 % in Gruppe „Okkult B2“). In der Kontrollgruppe lag der Ct-Wert bei 55,45 % ( $\pm 0,0852$ ) der miRNAs bei  $< 25$ , ähnlich wie in der Gruppe „Okkult B1“ (55,71 %  $\pm 0,0641$ ) und „Okkult B2“ (52,51 %  $\pm 0,1403$ ). Eine beispielhafte prozentuale Darstellung der Signalintensität der miRNAs anhand des Ct-Wertes kann in Abbildung 2 eingesehen werden. Die durchschnittlichen Ct-Werte der miRNAs waren in den einzelnen Untersuchungsgruppen nahezu einheitlich (siehe Tabelle 3).



**Abbildung 2:** Signalstärke der miRNA-Expression in der Kontrollgruppe dargestellt anhand des Ct-Wertes (repräsentativ für die okkulten Stadien B1 und B2). Der Ct-Wert ist eine theoretische Messgröße, die bei einer quantitativen PCR den Moment angibt, in dem bei exponentieller Vermehrung des Probenmaterials das Fluoreszenzsignal erstmalig über das Hintergrundsignal hervortritt.

**Tabelle 3:** Durchschnittliche Ct-Werte der miRNAs in den einzelnen Gruppen

	Control	Okkult B1	Okkult B2
AVG $C_t \pm$ SD DEV	24,04 $\pm$ 1,27	24,15 $\pm$ 0,99	24,38 $\pm$ 1,84

(AVG: Average, durchschnittlicher Wert, SD DEV: standard deviation, Standardabweichung in der jeweiligen Gruppe).

## 1.2. Referenzgene der relativen Quantifizierung

Wie bereits bei der Auswertung der Ergebnisse beschrieben, ist es notwendig, die erhaltenen Daten anhand einer geeigneten endogenen Referenz zu normalisieren um nach der Vervielfältigung des Probenmaterials möglichst exakte Ergebnisse zu erhalten. Dieser Vorgang wird als *relative Quantifizierung* bezeichnet. Voraussetzung dafür ist, dass die Expression der verwendeten Referenzgene stabil und reproduzierbar abläuft und nicht durch äußere Faktoren beeinflusst wird.

Abweichungen in der Menge des eingebrachten Probenmaterials können ebenso wie ein Abbau von RNA, hemmende Faktoren im Probenmaterial oder suboptimales, beziehungsweise variierendes Probenhandling die Umsetzung der Mikro-Ribonukleinsäuren beeinflussen. Zur Normalisierung der Ergebnisse sind auf den Platten sechs sogenannte *housekeeping genes* (*SNORD61*, *SNORD68*, *SNORD72*, *SNORD95*, *SNORD96a*, *RNU6-6P*) vorhanden, deren Expression konstant und unabhängig von äußeren Einflüssen abläuft. Sie dienen als beständiger Bezugspunkt, um die relative Expression des Probenmaterials auch bei abweichender Transkriptionshöhe zu beurteilen. Die Ergebnisse von *SNORD72* wurden aus der Auswertung genommen, da die Werte sehr inkonstant waren. Der Hersteller empfiehlt, als zusätzliches Referenzgen die synthetisch hergestellte Spike-in Control (*cel-miR-39-3p*, Mimik der miR-39 von *C. elegans*) zu verwenden. Für jede PCR-Platte wurde der Mittelwert aus den Ct-Werten dieser genannten Referenzgene gebildet. Dieser wurde als Referenz zur Erhebung des  $\Delta$ Ct-Wertes einer jeden miRNA verwendet. Einen Überblick über die Ct-Werte der einzelnen Referenzgene und die aus ihnen gebildeten Mittelwerte liefert Tabelle 4.

**Tabelle 4:** Ct-Werte der Haushaltsgen-Expression (P15-20) sowie der Spike-in Control (P13-14) in den einzelnen Proben mit arithmetischem Mittel (AVG)

	<b>P13</b>	<b>P14</b>	<b>P15</b>	<b>P16</b>	<b>P18</b>	<b>P19</b>	<b>P20</b>	<b>AVG</b>
<b>Ct A1</b>	11,04	11,03	26,13	22,80	22,02	25,10	25,14	20,47
<b>Ct A2</b>	11,12	11,15	26,83	23,43	22,49	24,57	25,98	20,80
<b>Ct A3</b>	10,35	10,46	25,32	21,95	21,43	24,10	24,82	19,78
<b>Ct A4</b>	14,01	14,13	29,41	25,24	27,27	24,63	28,13	23,26
<b>Ct B1</b>	10,40	10,20	25,36	22,47	21,09	24,73	24,9	19,88
<b>Ct B2</b>	9,94	9,84	24,01	21,27	20,35	23,63	22,8	18,84
<b>Ct B3</b>	9,76	9,76	24,36	21,42	21,07	24,25	24,11	19,25
<b>Ct B4</b>	9,25	9,10	24,17	21,13	20,16	23,35	23,33	18,64
<b>Ct C1</b>	12,66	12,49	29,63	26,63	24,81	26,9	28,61	23,11
<b>Ct C2</b>	9,51	9,48	23,68	21,65	19,18	24,21	24,21	18,85
<b>Ct C3</b>	10,21	9,87	24,83	22,37	19,67	23,55	23,37	19,12
<b>Ct C4</b>	10,73	10,50	25,98	25,39	20,42	24,96	24,73	20,10
<b>Ct D1</b>	10,18	9,94	28,14	20,59	21,6	23,65	24,51	19,80
<b>Ct D2</b>	10,73	10,64	26,54	24,24	21,93	24,56	24,74	20,48
<b>Ct D3</b>	10,65	10,53	27,80	23,42	22,27	24,76	25,71	10,74
<b>Ct D4</b>	10,74	10,35	25,50	21,55	21,40	23,49	24,70	19,68
<b>Ct E3</b>	11,16	10,94	26,42	23,79	21,11	24,84	25,35	20,51
<b>Ct E4</b>	12,97	12,75	30,62	27,26	25,36	32,22	28,35	24,22
<b>Ct F3</b>	10,39	10,32	25,78	21,49	21,67	24,93	25,56	20,02
<b>Ct F4</b>	10,48	10,35	25,88	21,71	21,48	25,63	24,57	20,02
<b>Ct G4</b>	11,28	10,98	26,60	23,66	21,82	25,49	24,86	20,67
<b>Ct H3</b>	11,31	10,92	28,12	24,96	22,95	25,37	25,39	21,29
<b>Ct H4</b>	10,48	9,96	24,83	22,45	20,79	23,78	25,23	19,64

(P13-P19: Position auf der PCR-Platte; P13: cel-miR-39-3p, P14: cel-miR-39-3c, P15: SNORD61, P16: SNORD68, P18: SNORD95, P19: SNORD96A, P20: RNU6-6P. Proben der Patienten A-H, Probencodes: 1 = Untersuchung „Gesund“, 2 = Untersuchung „Frühstadium“, 3 = Untersuchung „Okkult B1“, 4 = Untersuchung „Okkult B2“).

### 1.3. Qualitätskontrolle

Die Vertiefungen P21 bis P24 sind mit Kontrollen zur qualitativen Validierung des Laborverfahrens versehen.

Die Vertiefungen P23 und P24 enthalten replizierte positive PCR-Kontrollen (*PPC* = *Positive PCR Controls*). Laut Hersteller ist eine fehlerfrei Durchführung der PCR ebenso wie die korrekte Grundeinstellung der Schwellenwerte bestätigt, wenn die Ct-Werte der PPCs aller Arrays einen Wert von  $Ct^{PPC} = 19 \pm 2$  aufweisen. Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, ist dies in der vorliegenden Analyse der Fall (siehe Tabelle 5).

Um zu überprüfen, ob die Reverse Transkription in den ersten Schritten des Laborverfahrens fehlerfrei und vollständig abgelaufen ist, sind die Kavitäten P21 und P22 mit einer entsprechenden Kontrolle (*miRTC miScript Primer Assay zur Reverse Transcription Control, RTC*) versehen. Jede Form der Verunreinigung, die die Reverse Transkription dieser externen RNA-Kontrolle beeinträchtigt, verfälscht auch die Reverse Transkription der untersuchten Proben. Zur Evaluierung der RTC wird der Ct-Wert der PPC herangezogen und  $\Delta Ct$  kalkuliert ( $\Delta Ct = Ct^{RTC} - Ct^{PPC}$ ). Wenn  $\Delta Ct$  der beiden Qualitätskontrollen  $< 0$  ist, liegt laut Hersteller keine Beeinträchtigung der Reversen Transkription vor. Die Auswertung der Analyse zeigt, dass die Reverse Transkription mit Ausnahme von Probe A4 bei allen Patienten fehlerfrei abgelaufen ist (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Überblick über die durchschnittlichen Ct-Werte (AVG Ct) mit Standardabweichung (ST DEV) der Qualitätskontrollen *Positive PCR Control (PPC)* und *Reverse Transcription Control (RTC)*.  $\Delta C$  der Qualitätskontrollen evaluiert die Qualität der Reversen Transkription (*Soll: < 0*).

	AVG Ct <sup>PPC</sup>	ST DEV Ct <sup>PPC</sup>	AVG Ct <sup>RTC</sup>	ST DEV Ct <sup>RTC</sup>	$\Delta C$ t (AVG RTC – AVG PPC)
<b>Ct A1</b>	18,82	0,08	15,56	0,07	-3,26
<b>Ct A2</b>	18,93	0,08	16,72	0,16	-2,21
<b>Ct A3</b>	18,71	0,05	15,32	0,1	-3,39
<b>Ct A4</b>	18,89	0,17	19,33	0	0,44
<b>Ct B1</b>	18,31	0,25	15,68	0,25	-2,63
<b>Ct B2</b>	17,86	0,06	15,69	0,12	-2,17
<b>Ct B3</b>	18,07	0	14,67	0,01	-3,4
<b>Ct B4</b>	20,21	0,12	15,56	0,05	-4,65
<b>Ct C1</b>	17,82	0,08	17,03	0,21	-0,79
<b>Ct C2</b>	18,07	0,13	15,24	0,13	-2,83
<b>Ct C3</b>	17,98	0,26	15,07	0,42	-2,91
<b>Ct C4</b>	17,91	0,52	15,01	0,16	-2,9
<b>Ct D1</b>	18,32	0,39	14,70	0,19	-3,62
<b>Ct D2</b>	18,10	0,31	14,59	0,12	-3,51
<b>Ct D3</b>	18,19	0,16	15,09	0,18	-3,10
<b>Ct D4</b>	18,17	0,18	15,10	0,20	-3,07
<b>Ct E3</b>	17,94	0,19	15,09	0,15	-2,85
<b>Ct E4</b>	18,01	0,03	16,01	0,21	-2,00
<b>Ct F3</b>	17,96	0,2	14,95	0,07	-3,01
<b>Ct F4</b>	17,89	0,03	15,36	0,06	-2,53
<b>Ct G4</b>	17,79	0,20	14,70	0,06	-2,53
<b>Ct H3</b>	18,00	0,19	15,48	0,08	-2,52
<b>Ct H4</b>	18,05	0,14	14,98	0,17	-3,07

Bisher ist unklar, ob die Lagerdauer der Proben die Qualität und Quantität der im Probenmaterial enthaltenen miRNAs beeinflusst. Die Lagerzeit der Serumproben betrug zwischen 7 und 3031 Tagen; durchschnittlich lag sie bei 1439 (+/-345,86) Tagen in der Gruppe „Gesund“, in der Gruppe „Frühstadium“ bei 888 (+/-374,98) Tagen, in „Okkult B1“ bei 1190 (+/- 1131,83) Tagen und in „Okkult B2“ bei 763 (+/- 978,22) Tagen. Tabelle 6 zeigt die Dauer der Lagerung für die einzelnen untersuchten Proben. Der Prozentsatz der auf den Platten nachweisbaren miRNAs unterschied sich bei Proben mit kurzer Lagerdauer (z.B. Probe C4: 92,73 %, D4: 92,39 %, H4: 93,08 %, H3: 90,66 %) nicht von den Ergebnissen des Untersuchungsmaterials, das überdurchschnittlich lange aufbewahrt wurde (z.B. Probe F3: 91,70 %, F4: 93,43 %). Bei den Proben A4 und E4 lag die Anzahl nachweisbarer miRNAs mit 84,43 % (Probe A4) und 84,78 % (Probe E4) unter der allgemeinen Norm, obwohl die Lagerdauer des Materials unter dem Durchschnitt lag.

Von Patient C war bei einer zu untersuchenden Probe zu wenig Material vorhanden (Probe C1: 150 µl anstatt 200 µl). Die Reagenzien wurden dem Protokoll gemäß an die jeweilige Probenmenge angepasst. Prozentual waren in C1 mit 83,39 % deutlich weniger miRNAs nachweisbar als in den anderen Proben dieses Tieres (C2: 94,46 %, C3: 94,81 %, C4: 92,73 %) und als in den Proben der anderen drei Tiere in dieser Untersuchungsgruppe (durchschnittlich 92,27 % in den anderen Proben der Gruppe „Gesund“). Auch die Anzahl der miRNAs mit einem Ct-Wert < 25 liegt mit 38,75 % deutlich unter dem Durchschnitt der anderen drei Patienten in der Gruppe „Gesund“ (56,63 %).

Das Serum mit den Probencodes D4 und F4 war makroskopisch hämolytisch. Die Anzahl der detektierbaren miRNAs in diesen Proben war ähnlich hoch wie in makroskopisch unauffälligen Serumproben.

**Tabelle 6:** Lagerzeit (*Storage*, angegeben in Tagen) der Proben und Prozentsatz der auf der jeweiligen Platte nachweisbaren miRNAs für Patient A – H

	<b>Gesund</b> Storage (detectable miRNA %)	<b>Frühphase</b> Storage (detectable miRNA %)	<b>Okkult B1</b> Storage (detectable miRNA %)	<b>Okkult B2</b> Storage (detectable miRNA %)
<b>A</b>	1573 (91,35)	1071 (89,62)	964 (93,43)	847 (84,43)
<b>B</b>	1659 (92,04)	1328 (90,31)	994 (92,04)	489 (93,08)
<b>C</b>	1601 (83,39)	595 (94,46)	371 (94,81)	61 (92,73)
<b>D</b>	923 (93,43)	558 (93,08)	419 (92,04)	78 (92,39)
<b>E</b>			714 (90,66)	355 (84,78)
<b>F</b>			3031 (91,70)	2895 (93,43)
<b>G</b>			2890 (-)	1372 (91,70)
<b>H</b>			138 (90,66)	7 (93,08)
	<b>AVG ± ST DEV</b> 90,05 ± 4,53	<b>AVG ± ST DEV</b> 91,87 ± 2,29	<b>AVG ± ST DEV</b> 92,19 ± 1,49	<b>AVG ± ST DEV</b> 90,70 ± 3,80

(Arithmetisches Mittel (AVG) ± Standardabweichung (ST DEV) der prozentual nachweisbaren miRNAs in den einzelnen Gruppen).

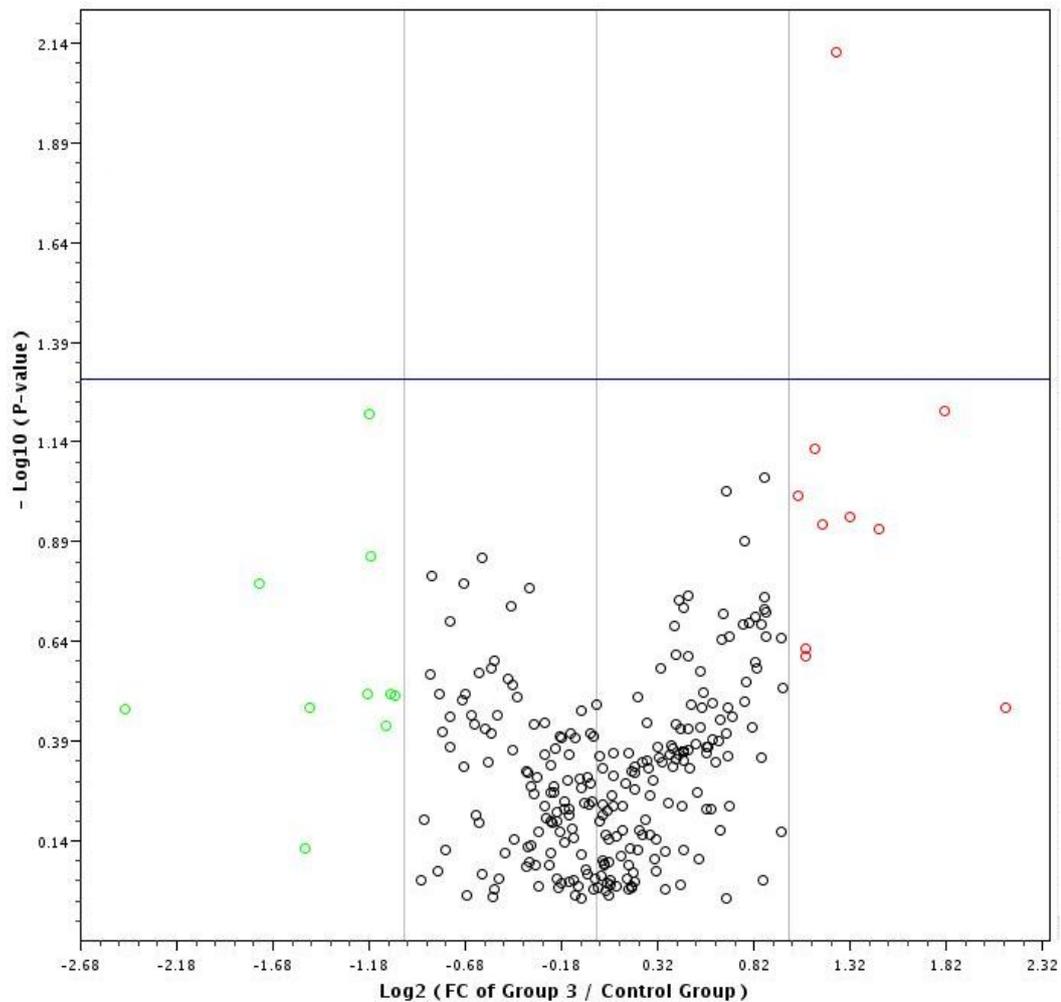
## 2. Mikro-Ribonukleinsäure-Expression

Die Untersuchung der Mikro-Ribonukleinsäure-Expression in den einzelnen Serumproben der Patienten wurde mit Hilfe des *miScript PCR Systems* des Herstellers *Qiagen* durchgeführt.

### 2.1. Datenanalyse

Nach erfolgreich durchgeführter PCR wurden die Grundeinstellungen zur Datenanalyse der erhaltenen Rohdaten entsprechend des Handbuchs (*miScript® miRNA PCR Array Handbook*) vorgenommen. Es erfolgte eine Subtraktion der Hintergrundsignale. Final waren insgesamt 266 von 277 Mikro-Ribonukleinsäuren nachweisbar (96,03 %), elf auf dem Assay enthaltene miRNAs waren nicht nachweisbar (3,97 %). Die FC dient der Darstellung der Expressionsunterschiede

zwischen verschiedenen Gruppen und wird berechnet als Quotient aus der normalisierten Genexpression der Probe dividiert durch die normalisierte Genexpression in einer Kontrollprobe. Die sogenannte *Fold Regulation* wird ermittelt, um die Fold Change in einen biologisch sinnvollen Zusammenhang zu bringen. Eine FC von  $> 1$  steht für eine Hochregulierung und die Fold Regulation entspricht dem jeweiligen Wert der FC. Eine FC von  $< 1$  steht für eine Herunterregulierung und die Fold Regulation wird als negativ inverser Wert der FC kalkuliert. Zur weiteren Betrachtung herangezogen wurden alle miRNAs, deren Expression mit einer FC von  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  zwischen der Vergleichsgruppe und der Gruppe „Okkult B1“, bzw. „Okkult B2“ dereguliert war. Dies traf auf 34 Mikro-Ribonukleinsäuren (12,78 % der detektierten miRNAs) zu. Die Umsetzung von 11 miRNAs (4,14 % der detektierten miRNAs) war zwischen den Proben erkrankter Tiere mit okkultem DCM und der Kontrollgruppe mehr als 2-fach erhöht. Verglichen mit der Kontrollgruppe waren 1/11 miRNAs in der Gruppe „Okkult B1“ und 10/29 in der Gruppe „Okkult B2“ mehr als 2-fach höher exprimiert. Keine dieser elf miRNAs war in beiden Gruppen okkultem DCM mehr als 2-fach vermehrt exprimiert. Die Expression von 23 miRNAs (8,65 % der detektierten miRNAs) war zwischen den Proben okkultem DCM und der Kontrollgruppe mehr als 2-fach herunterreguliert. Verglichen mit der Kontrollgruppe waren 17/23 miRNAs in der Gruppe „Okkult B1“ und 10/23 in der Gruppe „Okkult B2“ entsprechend dereguliert. Vier dieser miRNAs fielen in beiden Stadien durch eine mehr als 2-fach herunterregulierte Expression auf. Abbildung 3 zeigt exemplarisch anhand eines Volcano Plots die Abweichungen der Mikro-Ribonukleinsäure-Expression zwischen der Kontrollgruppe und dem Krankheitsstadium „Okkult B2“. Tabelle 7 listet alle miRNAs, deren Expression mit einer FC von  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  zwischen der Vergleichsgruppe und der Gruppe „Okkult B1“, bzw. der Gruppe „Okkult B2“ dereguliert war.



**Abbildung 3 (Volcano Plot):** Abweichungen der Mikro-Ribonukleinsäure-Expression zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Krankheitsphase „Okkult B2“ dargestellt anhand der Fold Change. Die FC dient der Darstellung der Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen und wird berechnet als die normalisierte Genexpression der Probe dividiert durch die normalisierte Genexpression in einer Kontrollprobe. *x*-Achse:  $\log_2$  des Quotienten aus der FC von miRNAs in Gruppe Okkult B2 und deren FC in der Kontrollgruppe. *y*-Achse:  $\log_{10}$  des p-Wertes. Die Kreise stellen jeweils eine bestimmte miRNA dar (*grün*:  $FC \leq 0,5$ , *schwarz*:  $0,5 > FC < 2$ , *rot*:  $FC \geq 2$ ). Die horizontale Linie stellt die Grenze zur statistischen Signifikanz dar ( $p = 0,01$ ).

**Tabelle 7:** Überblick über die Mikro-Ribonukleinsäuren mit einer im Krankheitsverlauf deregulierten Expression ( $FC \geq 2,0$  oder  $\leq 0,5$ )

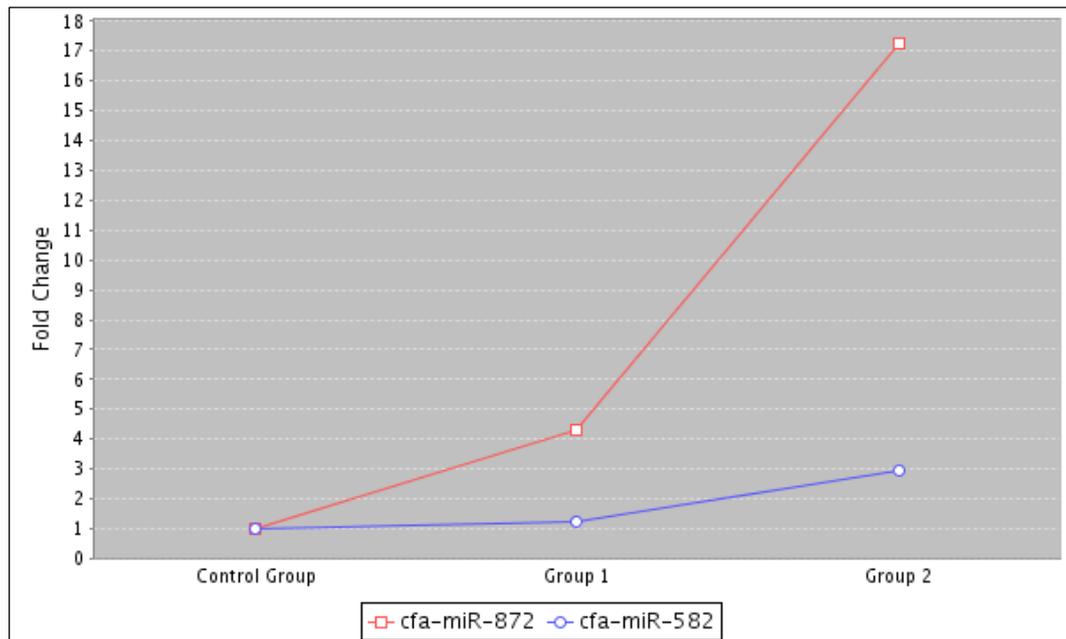
miRNA	Fold Change (FC) and Fold Regulation (FR) comparing to control group							
	Okkult B1				Okkult B2			
	FC	p-Wert	95% CI	FR	FC	p-Wert	95% CI	FR
cfa-miR-133c	2,3897	0,304606	(0.00001, 5.78)	2,3897	1,3067	0,414237	(0.00001, 2.68)	1,3067
cfa-miR-132	1,7129	0,086735	(0.75, 2.67)	1,7129	2,3659	0,007564	(1.04, 3.86)	2,3659
cfa-miR-490	1,6527	0,899637	(0.30, 3.28)	1,6527	2,7675	0,118097	(0.18, 5.74)	2,7675
cfa-miR-872	1,3747	0,648039	(0.00001, 11.64)	1,3747	3,4931	0,059887	(0.00001, 42.78)	3,4931
cfa-miR-384	1,3213	0,996549	(0.00001, 4.49)	1,3213	2,4897	0,110123	(0.00001, 5.85)	2,4897
cfa-miR-1306	1,2502	0,928696	(0.47, 2.03)	1,2502	2,2527	0,115911	(0.66, 4.00)	2,2527
cfa-miR-1837	1,1894	0,635859	(0.21, 2.17)	1,1894	2,069	0,097882	(0.27, 4.01)	2,069
cfa-miR-676	1,0879	0,596462	(0.24, 1.94)	1,0879	2,1259	0,235923	(0.00001, 4.45)	2,1259
cfa-miR-582	1,0219	0,6643	(0.35, 2.09)	1,0219	4,3662	0,33365	(0.00001, 9.66)	4,3662
cfa-miR-193b	0,9973	0,858498	(0.44, 1.56)	-1,0027	2,1981	0,074793	(0.00001, 4.57)	2,1981
cfa-miR-331	0,8604	0,435223	(0.06, 1.66)	-1,1623	0,4672	0,368811	(0.00001, 1.10)	-2,1406
cfa-miR-551b	0,8219	0,598045	(0.00001, 1.69)	-1,2166	0,4765	0,306938	(0.00001, 1.14)	-2,0987
cfa-miR-545	0,8173	0,456098	(0.00001, 0.47)	-1,2235	2,1283	0,247187	(0.00001, 6.28)	2,1283
cfa-miR-125a	0,7112	0,455188	(0.27, 1.15)	-1,4061	0,4389	0,306551	(0.00001, 0.83)	-2,2785
cfa-miR-143	0,6551	0,483619	(0.04, 1.28)	-1,5265	0,3505	0,748278	(0.00001, 0.77)	-2,8528
cfa-miR-340	0,6393	0,30583	(0.16, 1.12)	-1,5642	0,4833	0,31081	(0.00001, 1.01)	-2,0692
cfa-miR-802	0,5613	0,114618	(0.26, 0.86)	-1,7815	0,4408	0,060874	(0.14, 0.76)	-2,2687
cfa-miR-592	0,4914	0,09469	(0.00001, 0.82)	-2,0351	1,0204	0,620272	(0.00001, 1.39)	1,0204
cfa-let-7b	0,4805	0,129816	(0.11, 0.85)	-2,0812	1,3659	0,450134	(0.09, 2.73)	1,3659
cfa-miR-98	0,4737	0,099524	(0.09, 0.85)	-2,1112	0,7894	0,732698	(0.00001, 1.76)	-1,2667
cfa-miR-628	0,4683	0,083645	(0.16, 0.78)	-2,1356	1,1116	0,514172	(0.31, 1.63)	1,1116
cfa-miR-215	0,4637	0,236384	(0.03, 0.89)	-2,1568	0,6693	0,374259	(0.17, 1.21)	-1,494
cfa-miR-200c	0,4560	0,114558	(0.14, 0.78)	-2,1982	0,6888	0,990569	(0.00001, 1.43)	-1,4519

cfa-miR-21	0,4354	0,07667	(0.10, 0.78)	-2,2965	0,828	0,4355	(0.11, 1.61)	-1,2077
cfa-miR-10b	0,4345	0,128645	(0.02, 0.78)	-2,3017	0,7246	0,282575	(0.08, 1.42)	-1,3801
cfa-miR-122	0,4332	0,207858	(0.01, 0.85)	-2,3085	1,1321	0,938016	(0.00001, 2.42)	1,1321
cfa-miR-135b	0,4226	0,213915	(0.02, 0.82)	-2,3663	0,6545	0,271851	(0.00001, 0.98)	-1,5279
cfa-miR-135a-5p	0,3804	0,140131	(0.03, 0.73)	-2,629	0,139334	0,4426	(0.01, 0.83)	-2,2594
cfa-miR-1836	0,3768	0,123683	(0.00001, 0.47)	-2,6536	0,9756	0,514423	(0.00001, 1.95)	-1,025
cfa-miR-181c	0,3746	0,177234	(0.03, 0.71)	-2,6698	0,2964	0,162539	(0.00001, 0.66)	-3,3743
cfa-miR-18b	0,3409	0,36502	(0.00001, 0.95)	-2,9336	0,3562	0,332818	(0.00001, 0.56)	-2,8077
cfa-miR-454	0,3234	0,109248	(0.03, 0.61)	-3,0917	0,9063	0,619038	(0.00001, 1.88)	-1,1034
cfa-miR-216b	0,2893	0,312734	(0.00001, 0.66)	-3,4572	0,5663	0,306885	(0.00001, 0.88)	-1,7658
cfa-miR-211	0,1458	0,368832	(0.00001, 0.58)	-6,8592	0,1826	0,334276	(0.00001, 0.73)	-5,4773

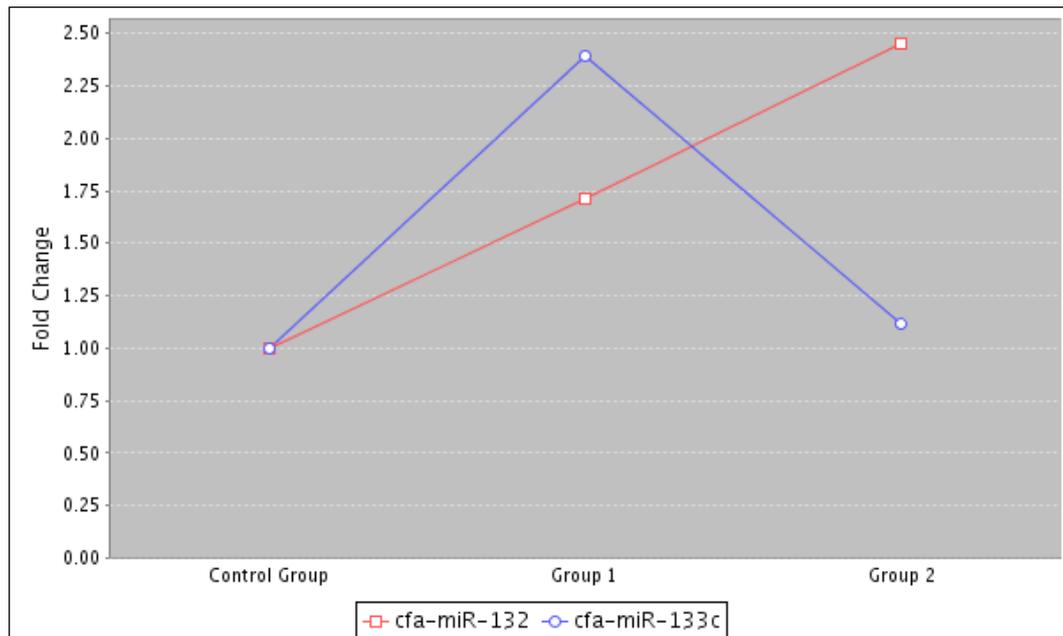
(Die Fold Change (FC) dient der Darstellung der Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen und wird mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur relativen Quantifizierung berechnet. Die Fold Regulation (FR) wird verwendet, um die FC in einen biologisch sinnvollen Zusammenhang zu bringen. Eine FC von  $> 1$  steht für eine Hochregulierung und die Fold Regulation entspricht dem jeweiligen Wert der FC. Eine FC von  $< 1$  steht für eine Herunterregulierung und die Fold Regulation wird als negativ inverser Wert der FC kalkuliert).

## 2.2. Mikro-Ribonukleinsäuren mit gesteigerter Expression

Die Expression von *miR-132* war in der Gruppe „Okkult B1“ 1,71-fach heraufreguliert ( $p: 0,0867$ ). In der Gruppe „Okkult B2“ erreichte die 2,37-fach ( $p: 0,0076$ ) gegenüber der Kontrolle erhöhte Umsetzung statistische Signifikanz (siehe Abbildung 5). Bei den meisten miRNAs mit gesteigerter Expression stellte sich die Deregulierung als progressiv im Krankheitsverlauf dar (*miR-132*, *miR-490*, *miR-872*, *miR-384*, *miR-1306*, *miR-1837*, *miR-676*, *miR-582*). Verglichen mit den herzgesunden Kontrollproben der Patienten war *miR-872* beispielsweise 1,37-fach ( $p: 0,6480$ ) höher exprimiert, wenn die Tiere elektrokardiographische Anomalitäten aufwiesen. Mit dem Auftreten echokardiographischer Veränderungen stieg die Expression sogar auf das 3,49-fache ( $p: 0,0600$ ) der gesunden Norm an. Abbildung 4 zeigt beispielhaft anhand von *miR-872* und *miR-582* den Expressionsanstieg im Krankheitsverlauf.



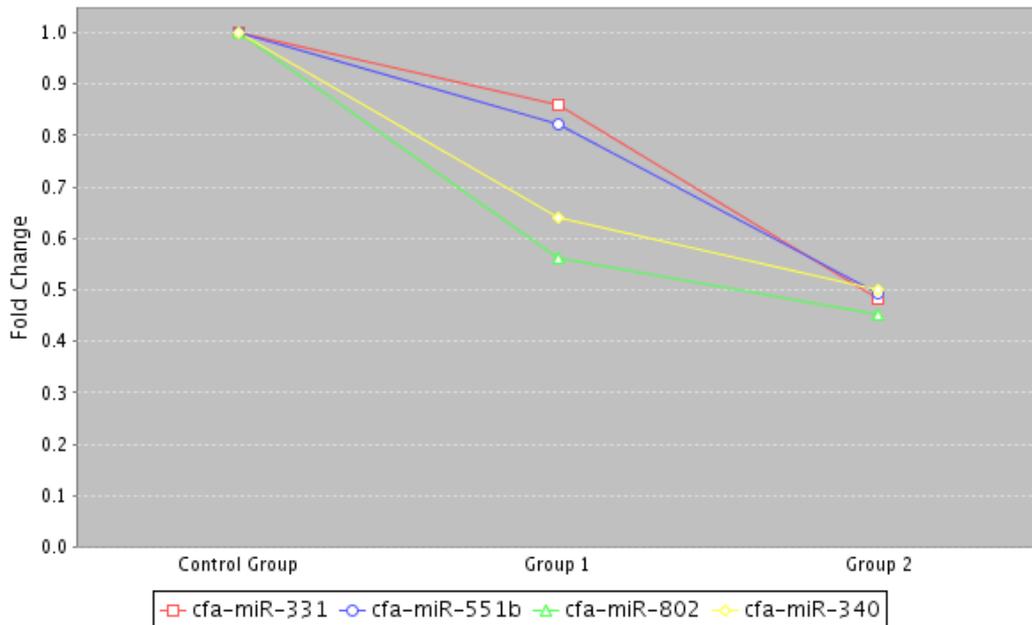
**Abbildung 4:** Gemittelte Fold Change der Expression von miR-872 und miR-582 im Krankheitsverlauf, berechnet mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode für relative Quantifizierung (Control Group = Gruppe Gesund und Frühphase, Group 1 = Okkult B1, Group 2 = Okkult B2).



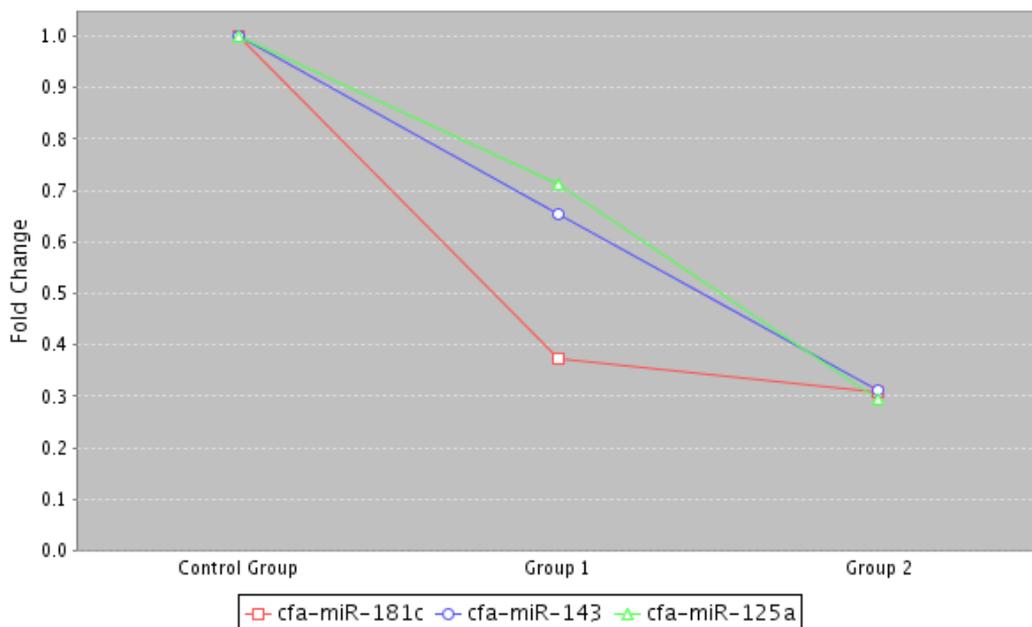
**Abbildung 5:** Gemittelte Fold Change der Expression von miR-132 und miR-133c im Krankheitsverlauf berechnet, mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode für relative Quantifizierung (Control Group = Gruppe Gesund und Frühphase, Group 1 = Okkult B1, Group 2 = Okkult B2).

### 2.3. Mikro-Ribonukleinsäuren mit herunterregulierter Expression

Zwischen der Kontrollgruppe und den Proben der Stadien okkulten DCM war die Expression von keiner Mikro-Ribonukleinsäure mit statistischer Signifikanz herunterreguliert. Die Expression von *miR-331*, *miR-340*, *miR-802* und *miR-551b* fiel im Krankheitsverlauf konstant ab (siehe Abbildung 6). *MiR-802* war in den Proben der Gruppe „Okkult B2“ in Bezug auf die gesunden Kontrollproben 2,3-fach ( $p: 0,0609$ ), *miR-331* 2,14-fach ( $p: 0,4672$ ), *miR-551b* 2,10-fach ( $p: 0,3069$ ) und *miR-340* 2,07-fach ( $p: 0,3108$ ) herunterreguliert. Mit dem Auftreten der Erkrankung im Stadium „Okkult B1“ und ihrem Fortschreiten in Stadium „Okkult B2“ war auch die Expression von den Mikro-Ribonukleinsäuren *miR-125a*, *miR-143* und *miR-181* progressiv vermindert (siehe Abbildung 7). *MiR-125a* wurde im Stadium „Okkult B1“ 1,4-mal ( $p: 0,4552$ ) und in Stadium „Okkult B2“ 2,3-mal ( $p: 0,3066$ ) geringer exprimiert als in der Kontrollgruppe. Bei okkulten DCM mit Arrhythmien war die Expression von *miR-143* 1,5-fach ( $p: 0,4836$ ) herunterreguliert, mit Auftreten echokardiographischer Auffälligkeiten sogar 2,9-fach ( $p: 0,7483$ ). Die Expression von *miR-181c* verzeichnete in „Okkult B1“ eine 2,7-fache ( $p: 0,1772$ ), bzw. eine 3,4-fache ( $p: 0,1625$ ) Herunterregulierung in „Okkult B2“.



**Abbildung 6:** Gemittelte Fold Change der Expression von miR-331, miR-551b, miR-802 und miR-340 im Krankheitsverlauf, berechnet mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode für relative Quantifizierung (Control Group = Gruppe Gesund und Frühphase, Group 1 = Okkult B1, Group 2 = Okkult B2).



**Abbildung 7:** Gemittelte Fold Change der Expression von miR-181-c, miR-143 und miR-125a im Krankheitsverlauf, berechnet mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode für relative Quantifizierung (Control Group = Gruppe Gesund und Frühphase, Group 1 = Okkult B1, Group 2 = Okkult B2).

## V. DISKUSSION

Zur Analyse der miRNA-Expression wurden Serumproben von Dobermännern verwendet, die im Rahmen der Dobermannstudie an der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt wurden. Wir wählten gezielt die DCM des Dobermanns als Forschungsobjekt, da bereits zahlreiche Studien vorliegen, die Informationen über diese Erkrankung liefern und da auch beim Menschen eine Herzerkrankung mit ähnlicher Ausprägung und Ätiologie vorkommt. Der durch selektive Zucht sehr eng gehaltene Genpool der Rasse bietet beste Voraussetzungen für genetische Forschung und auch die Möglichkeit, die Einflussnahme regulatorisch fungierender kardialer miRNAs auf die mRNA-Translation weitergehend zu verfolgen.

Die Untersuchung der Hunde erfolgte standardisiert durch Kardiologen, die im Speziellen mit dieser Erkrankung des Dobermanns vertraut waren. Die einzelnen Besuche der Patienten wurden nach aktuellem Stand der Wissenschaft den jeweiligen Befunden entsprechend in Untersuchungsgruppen eingeteilt. Es wurden nur Hunde mit eindeutigen kardialen Auffälligkeiten eingeschlossen, die sich außerhalb des diagnostischen Graubereiches befanden.

Eine Limitation der Studie stellt die nur geringe Anzahl an Probanden dar, anhand derer die miRNA-Expression im Verlauf der DCM untersucht werden konnte. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass der Dobermann in Deutschland nicht zu den am häufigsten gehaltenen Hunderassen zählt und dass das empfohlene jährliche kardiale Screening von Hunden dieser Rasse noch nicht bei allen Besitzern bekannt und gängige Praxis ist. Eine kardiologische Untersuchung ist auch von Zuchtverbänden bisher nicht vorgeschrieben. Zum anderen wurden um ein longitudinales Studiendesign zu ermöglichen nur Patienten eingeschlossen, die in allen Untersuchungsstadien vorgestellt wurden und von denen eine Serumprobe jedes relevanten Untersuchungstags vorhanden war. Auch die Tatsache, dass ein nicht zu vernachlässigender Anteil an Dobermännern mit DCM bereits vor der Ausprägung echokardiographischer Veränderungen (Untersuchungsstadium „Okkult B2“) am Sekudentod verstirbt, beeinflusste das Patientengut. Zudem wurden nur Probanden verwendet, bei denen eindeutige kardiale Befunde vorlagen und die frei von systemischen Erkrankungen waren. Da bei Tieren dieser Rasse generell sowohl andere hereditäre (z.B. von-Willebrand-Faktor-Mangel) als auch

chronisch degenerative Erkrankungen (z.B. chronische Hepatitis) und Neoplasien gehäuft auftreten, limitierte auch dies die Anzahl möglicher Probanden.

Ein longitudinales Studiendesign, das eine mehrfache Probenentnahme bei Patienten vor und zur Zeit der Manifestation und Progression ihrer Herzerkrankung in bestimmten definierten Stadien vorsah, sollte sicherstellen, dass jeder Proband auch seine eigene Kontrolle darstellte. So war es möglich, individuelle Auffälligkeiten in der miRNA-Expression, die auch durch extrakardiale Vorgänge bedingt sein können, besser nachzuvollziehen und zu beurteilen. Auch für die Auswertung von Signalstärke und Qualität der miRNA-Untersuchung war die sequentielle Beprobung eines Patienten hilfreich.

Um individuelle Schwankungen in der miRNA-Expression zwischen einzelnen Probanden nachvollziehen zu können und in der Auswertung zu berücksichtigen, und um die Probenanzahl kardiologisch diagnostisch (noch) unauffälliger Tiere zu erhöhen, wurden von jedem Patienten zwei Proben aus der Zeit verwendet, als die kardialen Befunde unauffällig waren. Dies sollte die Aussagekraft bezüglich der miRNA-Expression in den Proben der noch herzgesunden Tiere verbessern. Es wurde darauf geachtet, dass der zeitliche Abstand zwischen den Probenentnahmen in jedem Fall mindestens sechs Monate betrug, um eine gewisse Entwicklung der herzspezifischen miRNA-Expression zuzulassen. Die gesunde Vergleichsgruppe setzte sich daher aus den Probenmaterialien der Untersuchungsgruppe „Gesund“ und „Frühphase“ zusammen.

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme für die Stadien „Okkult B1“, bzw. „Okkult B2“ erhielten die Hunde teilweise bereits eine kardiale Therapie. Es liegen keine Studien vor, ob und inwiefern eine therapeutische Intervention, die idealerweise zu einer Verbesserung der vorliegenden abnormen Befunde führt, auch die organspezifische miRNA-Expression beeinflusst. Da bei allen Patienten kardiologisch abnorme Befunde vorlagen und Studien einen frühzeitigen Therapiebeginn anraten (O'GRADY et al., 2009; SUMMERFIELD et al., 2012), wäre es unethisch gewesen, den Tieren entsprechende Maßnahmen zu verweigern. Auch eine standardisierte Therapie war bei den in die Studie eingeschlossenen Tieren nicht möglich, da es an konkreten Empfehlungen bezüglich einer optimalen antiarrhythmischen Medikation mangelt (CALVERT & BROWN, 2004; KRAUS et al., 2009). Zusätzlich dazu können die elektrokardiographischen Auffälligkeiten sehr individuell sein und auch die Therapieansprache unterscheidet sich von Patient zu Patient.

Mikro-Ribonukleinsäuren werden organspezifisch umgesetzt, so dass eine von der Norm abweichende Expression innerhalb eines Gewebes auf pathologisches Geschehen hinweist. Auf diese Weise haben miRNAs das Potential, als endogene Biomarker für Diagnose, Prognose und Therapiekontrolle bestimmter Erkrankungen zu fungieren (BARTELS & TSONGALIS, 2009). Die meisten humanmedizinischen Studien, die sich mit der kardialen miRNA-Expression beschäftigten, verwendeten endomyokardiale Gewebeproben. Eine Untersuchung der herzspezifischen miRNAs aus diesen Proben ist gut möglich und die Abweichungen in der Expression scheinen bei pathologischen Prozessen so signifikant, dass ein diagnostischer Einsatz denkbar ist. Eine Gewinnung von Biopsien des Herzmuskels ist allerdings sehr invasiv und mit hohen Risiken für den Patienten verbunden. Bei den aktuell vorliegenden Studien wurden daher meist Gewebeproben explantierter Organe verwendet (IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008; NAGA PRASAD & KARNIK, 2010). Generell sind Mikro-Ribonukleinsäuren in der Zirkulation aufgrund ihrer Stabilität gegenüber endogenen RNasen aus Serum- und Plasmaproben gut geeignet, auch wenn ihr Ursprung und der Mechanismus ihrer Freisetzung bis jetzt nicht vollständig geklärt sind (GILAD et al., 2008; MITCHELL et al., 2008; TURCHINOVICH & CHO, 2014). Einige Autoren bevorzugen daher, bei der Untersuchung von miRNAs in der Zirkulation von *miRNA-Abundanz* zu sprechen, da bisher nicht gesichert ist, dass Schwankungen des miRNA-Gehalts in der Zirkulation tatsächlich auf Veränderungen ihrer Expression zurückzuführen sind. Theoretisch wäre auch eine Erhöhung dieser Marker aufgrund von Zell-Zell-Interaktion oder Zelluntergang möglich. Da diesen Thesen bisher fundierte Grundlagen fehlen und nach unserem Kenntnisstand aktuell keine beweisenden Forschungsergebnisse vorliegen, folgten wir der Mehrheit der Autoren und wählten den Begriff *miRNA-Expression* zur Beurteilung des miRNA-Gehalts in Serumproben.

Aus vielen internistischen Bereichen der Humanmedizin liegen bereits Untersuchungen vor, die den Einsatz zirkulierender miRNAs als Biomarker für verschiedene Krankheitsbilder mit gutem Erfolg beschreiben (MITCHELL et al., 2008; ZAHM et al., 2011; LEIDINGER et al., 2013; WILLEIT et al., 2013; LATORRE et al., 2015). Mehrere humankardiologische Studien evaluierten den diagnostischen Wert zirkulierender miRNAs bei verschiedenen Herzerkrankungen: Gupta et al. analysierten kardiale miRNAs bei Patienten mit DCM im frühen

Herzversagen aus PBMCs und zeigten, dass sich eine Deregulierung bestimmter miRNAs (in diesem Falle eine Herunterregulierung der *miRNA-548-Familie*) hervorragend als Biomarker für die Frühdiagnostik eignet (GUPTA et al., 2013). Fan et al. untersuchten Plasmaproben von Patienten mit DCM und konnten im Vergleich zu gesunden Kontrollproben feststellen, dass *miR-423-5p* bei DCM deutlich heraufreguliert ist und die Expressionshöhe positiv mit dem kardialen Biomarker NT-proBNP korreliert (FAN et al., 2013).

Dass der Einsatz zirkulierender Mikro-Ribonukleinsäuren auch als prognostischer Parameter einer Erkrankung möglich ist, bewiesen unabhängig voneinander zwei Studien, indem sie miRNAs als negativ prognostische Faktoren nach akutem Myokardinfarkt identifizierten. Matsumoto et al. zeigten, dass *miR-192*, *-194* und *-34a* im Serum bereits frühzeitig nach AMI ansteigen und ihre Hochregulierung negativ mit LVEDV und Herzversagen korreliert. Lv et al. beschrieben, dass *miR-34a* hierbei über eine Induktion des Remodelings die Herzfunktion negativ beeinflusst und dass eine Erhöhung dieser miRNA ebenso wie eine Hochregulierung von *miR-208* im Plasma die Mortalität und Gefahr eines Herzversagens in den ersten sechs Monaten nach AMI steigern (MATSUMOTO et al., 2013; LV et al., 2014). Diese beispielhaft genannten Studien bestätigen, dass eine Untersuchung von miRNAs aus dem Serum oder Plasma aufgrund ihrer Stabilität möglich ist und Abweichungen in der miRNA-Expression das Potential haben, als Biomarker verwendet zu werden.

Die Untersuchung zirkulierender miRNAs ist bei Labortieren bereits gängige Praxis und auch bei Hund und Katze möglich. Es liegen bereits mehrere Studien vor, die sich mit der miRNA-Expression bei verschiedenen Erkrankungen dieser beiden Spezies beschäftigten (MIZUNO et al., 2011; STEUDEMANN et al., 2013; JEANSON-LEH et al., 2014; WEBER et al., 2015).

In der vorliegenden Untersuchung wurde für die Analyse das System *miScript miRNA PCR Array* verwendet. Dieses benötigt nur kleinste Probenmengen von 1 µg RNA und bietet damit auch für Tiere mit geringem Körpergewicht realistische diagnostische Möglichkeiten. Wir verwendeten einheitlich ein Probenvolumen von 200 µl Serum, wobei laut Angaben des Herstellers bei limitiertem Probenmaterial auch die Verwendung von ≤ 50 µl Serum oder Plasma möglich ist. Unserer Kenntnis nach existiert keine standardisierte Methode, mit der die miRNA-Gesamtmenge aus Serumproben bestimmt werden kann, da keine stabilen Faktoren

existieren, die eine Normalisierung zulassen. Aktuell gilt eine Normalisierung über die verwendete Serummenge als beste Methode, um die im Probenmaterial enthaltene miRNA-Menge zu vereinheitlichen (CHENG et al., 2010). Mit der verwendeten Probenmenge von 200 µl Serum konnten durchschnittlich 91,28 % der auf der Platte enthaltenen miRNAs nachgewiesen werden. Von einem Untersuchungstag des Patienten C (Probe C1) war nur 150 µl Probenmaterial vorhanden, so dass die im Zuge des Laborverfahrens verwendeten Reagenzien dieser Menge entsprechend angepasst wurden. Dennoch lag die Menge nachweisbarer miRNAs in dieser Probe deutlich unter dem Durchschnitt und die Signalstärke der miRNAs war insgesamt schlechter. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Verwendung von größeren Probenvolumina auch in einer höheren Anzahl nachweisbarer miRNAs und einer besseren Signalstärke resultiert. Ein Verfahren zur Normalisierung der miRNA-Gesamtmenge wäre erstrebenswert und könnte zu einer Verbesserung der Ergebnisse in Folgestudien führen. Durch eine quantitative Anpassung des Untersuchungsmaterials könnten Abweichungen in der miRNA-Expression zwischen den einzelnen Patienten, die auf Schwankungen der Probenmenge beruhen, reduziert werden.

Eine Probe (G3) wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da die Signalqualität selbst nach erfolgter Normalisierung weit unter dem allgemeinen Durchschnitt lag. Das Untersuchungsmaterial stammte von einem Hund mittleren Alters und hatte eine überdurchschnittlich lange Lagerdauer von 2890 Tagen. Zwei andere Proben (F3, F4), die eine noch längere Lagerdauer als G3 hatten, zeigten durchschnittlich gute Signalintensitäten. Wieso die miRNA-Qualität bei der besagten Probe unzureichend war, bleibt unklar.

Generell stellt die unterschiedliche Lagerzeit des Probenmaterials sicherlich einen Kritikpunkt dar, doch war dies aufgrund der sequentiellen Beprobung derselben Individuen unumgänglich. Wir entschieden uns für das longitudinale Studiendesigns, da der Literatur nach weder das Alter des Patienten noch langjährige Gefriervorgänge den miRNA-Gehalt in Blutproben beeinflussen (MITCHELL et al., 2008; AI et al., 2010; KROH et al., 2010) und da die serielle Beprobung eines Tieres unserer Meinung nach eine bessere Beurteilung der individuellen miRNA-Expression erlaubt.

Der verwendete *miScript miRNA PCR Array* enthält Primer für den Nachweis hundespezifischer miRNAs. Nach Angaben des Herstellers werden mit Hilfe des

Arrays diejenigen 277 miRNAs untersucht, die beim Hund am häufigsten exprimiert werden und deren Sequenzen laut der Datenbank miRBASE am besten charakterisiert sind. Durch Verwendung der genannten Primer soll die Wahrscheinlichkeit maximiert werden, relevante miRNA-Expressionsunterschiede zu detektieren. Bisher existiert nur eine limitierte Anzahl an Veröffentlichungen, die sich speziell dem miRNome des Hundes widmen. Chen et al. untersuchten nach initialem Screening mit Hilfe eines Mikroarrays miRNAs mit auffällig abweichender Expression in Gewebeproben von Hunden im induzierten Herzversagen. Die 15 miRNAs, die hier besonders hervortraten, waren allesamt auf den verwendeten PCR Arrays enthalten. Es sind auch alle caninen miRNAs untersucht worden, die in der Vorgängerstudie von Steudemann et al. als dereguliert hervortraten. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bisher noch unbekannte, hundespezifische kardiale miRNAs existieren, die mit der Ausprägung der DCM beim Dobermann in Verbindung stehen und die durch das System *miScript miRNA PCR Array* nicht erfasst wurden. Künftige Studien, die sich mit der miRNA-Expression bei kardialer Pathologie des Hundes befassen, werden dazu beitragen, den aktuellen Kenntnisstand zu erweitern und können so, falls nötig, dazu beitragen, die diagnostischen Möglichkeiten zu verbessern.

Die Mikro-Ribonukleinsäure, deren Deregulierung bei okkulten DCM durch statistische Signifikanz auffiel, ist *miR-132*. Verschiedene humanmedizinische Studien belegen die tragende Rolle dieser miRNA bei kardialer Pathologie und der Reaktion des Herzmuskels auf Stressoren und Noxen. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass *miR-132* in Kardiomyozyten sowohl in vitro als auch in vivo nach Hypertrophie verursachenden Stimuli wie beispielsweise persistierender Aktivierung von  $\beta$ -Adrenozeptoren vermehrt exprimiert wird (UCAR et al., 2012; CARRILLO et al., 2015). Durch eine intravenöse Injektion von *miR-132*-Antagomiren konnten bei Labortieren kardiale Hypertrophie und Herzversagen verhindert werden, so dass ein therapeutischer Einsatz dieser miRNA zur Behandlung kongestiven Herzversagens erfolgsversprechend ist (UCAR et al., 2012). Eine Studie von Hong et al. belegt, dass *miR-132* eine Apoptose von Kardiomyozyten nach hypoxischer Schädigung verhindert, so dass dieser miRNA scheinbar auch eine wichtige Rolle bei der Reaktion des Herzmuskels auf Sauerstoffunterversorgung und auf konsekutive Umbauprozesse zukommt (HONG et al., 2015). Zusätzlich wirkt sie über verschiedene Mechanismen regulierend auf

die Entstehung von Arteriosklerose ein (CHOE et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Ucar et al. identifizierten den anti-hypertrophen und Autophagozytose fördernden Transkriptionsfaktor *FoxO3* als direktes Ziel von *miR-132*, über das diese miRNA eine Hypertrophie des Herzmuskels begünstigt und Autophagie vermindert (UCAR et al., 2012). Eine balancierte Beseitigung geschädigter Zellen durch das körpereigene System ist für die Aufrechterhaltung einer guten Organfunktion unerlässlich. Durch einen gesteigerten Abbau von Zellen kann ebenso wie durch unzureichende katabole Prozesse sogar Herzversagen ausgelöst werden (NAKAI et al., 2007; GOTTLIEB & GUSTAFSSON, 2011). Es ist möglich, dass die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Hochregulierung von *miR-132* durch eine Hemmung kataboler Prozesse die Stoffwechselaktivität und Vitalität des Myokards beeinträchtigte und auf diese Weise die Manifestation einer Dilatativen Kardiomyopathie förderte.

Bei der *miR-125-Gruppe* handelt es sich um miRNAs, die ubiquitär in vielen Geweben, darunter auch in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert werden (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BANZHAF-STRATHMANN & EDBAUER, 2014). In der vorliegenden Studie war die Expression von *miR-125a* bei Patienten mit okkultem DCM deutlich niedriger als zu dem Zeitpunkt, als die Tiere noch kardiologisch unauffällig waren. Mit Progression der Erkrankung nahm auch das Level an *miR-125a* weiter ab. *MiR-125b* war sowohl in „Okkult B1“, als auch in „Okkult B2“ geringer exprimiert als in der Vergleichsgruppe (1,18-fach, bzw. 1,04-fach herunterreguliert). *MiR-125a* und *miR-125b* sind jeweils ein Homolog von *lin-4*, der ersten Mikro-Ribonukleinsäure, die in *C. elegans* nachgewiesen wurde (LEE et al., 1993). Van Rooij et al. beschreiben, dass es sich bei *miR-125b* um eine auf kardialen Stress responsive miRNA handelt, die eine Rolle bei morphologischen und funktionellen Umbauprozessen der Kardiomyozyten spielt und mit zur Entstehung von Herzversagen beiträgt (VAN ROOIJ et al., 2006). Einen Zusammenhang dieser miRNA-Familie mit DCM stellte eine humanmedizinische Studie her, die zeigte, dass *miR-125b* bei Patienten mit DCM im Endstadium deutlich hochreguliert ist (NAGA PRASAD et al., 2009; NAGA PRASAD & KARNIK, 2010). Ge et al. untersuchten die Wirkung dieser miRNA auf Muskelgewebe und demonstrierten, dass *miR-125b* in vitro negativen Einfluss auf die Differenzierung von Myoblasten nimmt und in vivo die Regeneration von Muskelgewebe unterbindet. Auf molekularer Ebene findet die Einflussnahme auf

die Myogenese über eine Modulation der Expression von *IGF-II* (*Insulin-like growth factor 2*) statt (GE et al., 2011). Bisher wurde diese Wirkung von *miR-125b* lediglich auf die Skelettmuskulatur untersucht, es ist allerdings anzunehmen, dass auch eine IGF-II-vermittelte Beeinflussung der Differenzierung und Regeneration bei Kardiomyozyten erfolgt. Eine aktuelle Untersuchung zeigte, dass eine in vivo herbeigeführte Überexpression von *miR-125b* in atrialen Kardiomyozyten selektiv den Transkriptionsfaktor *myocyte enhancer factor 2D* (*mef2D*) hochreguliert, ihn in skelettalen Myoblasten dagegen aber herunterreguliert. Es ist daher anzunehmen, dass diese miRNA zellspezifisch regulatorisch auf verschiedene mRNAs einwirkt, die für die Differenzierung von Skelett- und Herzmuskulatur von Bedeutung sind (LOZANO-VELASCO et al., 2015). Die in der vorliegenden Studie detektierte Deregulierung dieser miRNA-Gruppe scheint plausibel und eine weitere Untersuchung dieser miRNAs und ihrer Zielobjekte bei kardialer Pathologie des Hundes ist wünschenswert.

Bei *miR-133* handelt es sich um eine Gruppe muskelspezifischer miRNAs, die in Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert werden und auf Proliferation und Differenzierung der Myoblasten einwirken (CHEN et al., 2006; FENG et al., 2013). Dieser Gruppe wird nicht nur eine tragende Rolle bei der kardialen Entwicklung beigemessen, sondern sie konnte auch vielfach mit Herzerkrankungen in Verbindung gebracht werden (YIN et al., 2012). In der hier vorgestellten Studie zeigte sich die Expression von *miR-133c* bei okkulten DCM im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben der Patienten erhöht, allerdings waren die Level im Stadium „Okkult B2“ niedriger als in „Okkult B1“. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine gehemmte Expression dieser miRNA-Familie mit kardialer Hypertrophie und Remodeling des Myokards einhergeht (CARE et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008; DUISTERS et al., 2009). Liu et al. gelang es, durch einen gezielten Knockout von *miR-133a* bei Labortieren einen Zusammenhang dieser miRNA mit DCM herzustellen: Eine anormale Proliferation und Apoptose von Kardiomyozyten führte zu letalen embryonalen Missbildungen (vor allem Ventrikel-Septums-Defekt) und bei überlebenden Tieren zur Entwicklung einer DCM mit Todesfolge (LIU et al., 2008b). *MiR-133* nimmt auch direkten Einfluss auf die Expression des Proteins *CTGF* (*connective tissue growth factor*), das eine Schlüsselrolle bei der profibrotischen Antwort des Herzmuskels auf Stress und Schädigung einnimmt. Auf diese Weise wirkt diese miRNA antifibrotisch auf

strukturelle Umbauprozesse des ventrikulären Myokards ein und beeinflusst somit auch das mechanische Leistungsvermögen des Herzens (DUISTERS et al., 2009). Bei Hunden mit chronischem Vorhofflimmern war *miR-133* bereits frühzeitig und vor ersten Anzeichen atrialer Umbauprozesse herunterreguliert. Bei dieser Deregulierung handelt es sich daher vermutlich nicht um eine Folge der Erkrankung, sondern sie wird einem konservierten Mechanismus zugedacht, der kardiales Remodeling und Fibrosierung steuert (LI et al., 2012b). Da die *miR-133-Familie* über viele komplexe Wege auf die kardiomyozytäre Vitalität und Funktionalität einwirkt, ist die in der vorliegenden Studie aufgefallene Deregulierung dieser Gruppe in Zusammenhang mit der Manifestation einer DCM beim Dobermann plausibel und bedarf weiterer Untersuchungen.

Durch eine abweichende Expressionshöhe in den Proben der Stadien „Okkult B1“ und „Okkult B2“ trat auch *miR-21* hervor. Eine Deregulierung dieser miRNA wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären Krankheitsbildern wie AMI, Arteriosklerose, myokardialer Fibrose und Herzversagen beschrieben (CHENG & ZHANG, 2010; DA COSTA MARTINS & DE WINDT, 2010). Aktuelle Studien sprechen *miR-21* eine tragende Rolle bei der Entstehung kardialer Fibrose zu, da sie positiv auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die Kollagensynthese und das Überleben von Fibroblasten einwirkt (THUM et al., 2008). Durch den Einsatz von *AntagomiR-21* konnte ein durch Angiotensin-II induziertes Remodeling verhindert werden (LORENZEN et al., 2015). Die Expressionshöhe von *miR-21* ist in Stadium „Okkult B1“ stärker herunterreguliert als in „Okkult B2“. Der Großteil der Patienten (8/9) wurde zum Zeitpunkt der Probennahme für die Untersuchungsgruppe „Okkult B2“ bereits mit einem ACE-Inhibitor therapiert, welcher unter anderem die Bildung von Angiotensin-II unterdrückt und so antifibrotisch auf das Myokard einwirken soll (UNGER, 2002). Inwiefern diese Medikation durch eine Hemmung des Remodelings auch die miRNA-Expression bei den Hunden unserer Studie beeinflusst hat, ist fraglich.

Einige der miRNAs, die in der vorliegenden Studie durch eine progressiv deregulierte Expression im Krankheitsverlauf okkulter DCM hervortraten, wurden bisher nicht in Zusammenhang mit kardiologischen Erkrankungen beschrieben, so dass es sich möglicherweise um Abweichungen der miRNA-Level handelt, die durch andere Pathologien ausgelöst wurden. Vereinzelt miRNAs wurden in

Zusammenhang mit kardiologischer Pathologie erwähnt, so dass weiter abgeklärt werden muss, inwiefern sie auch bei einer DCM durch eine Deregulierung hervortreten. Zu diesen miRNAs zählt *miR-181c*, die als in Verbindung mit einem Ventrikel-Septum-Defekt stehend beschrieben wurde und möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese dieser kongenitalen Missbildung spielt (LI et al., 2013). *MiR-18b* wird als ein Regulator von Differenzierungs- und Proliferationsprozessen des Myokards nach Stresseinwirkung erwähnt (TATSUGUCHI et al., 2007). *MiR-143*, deren Expression sich in der vorliegenden Studie als progressiv im Krankheitsverlauf herunterreguliert zeigte, interagiert mit *adducin3 (add3)*, das für ein strukturell bedeutendes Protein von F-Aktin kodiert. Es ist anzunehmen, dass diese miRNA so die zytoskelettale Differenzierung und das Remodeling beeinflusst und damit auch die Funktionalität des Myokards (DEACON et al., 2010).

Es werden auch bestimmte Mikro-Ribonukleinsäuren in der verfügbaren Literatur mit DCM und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht, die in der aktuellen Studie nicht als auffällig dereguliert hervortraten. Die Expression von *miR-92a* beispielsweise war in Gewebeproben von Patienten mit DCM vermindert (IKEDA et al., 2007; SUCHAROV et al., 2008). Loyer et al. identifizierten diese miRNA als die bedeutsamste Mikro-Ribonukleinsäure in Endothelzellen, die mit der Entstehung von Arteriosklerose in Verbindung steht, und bezeichneten sie als *atheromiR*. (LOYER et al., 2014). *MiR-92a* wird aktuell als potenter Biomarker für die Koronararterienerkrankung des Menschen betrachtet (REN et al., 2013). Weitere Studien konnten auch einen Zusammenhang dieser miRNA mit Reendothelialisierung, Entzündung und Angiogenese nachweisen (BONAUER et al., 2009; IACONETTI et al., 2012; HINKEL et al., 2013). Eine experimentelle Unterdrückung dieser miRNA durch *antagomir-92a* steigerte nach myokardialem Infarkt die funktionelle Wiederherstellung des Herzmuskels und resultierte in einer verbesserten linksventrikulären systolischen und diastolischen Funktion (BONAUER et al., 2009). In der aktuellen Studie zeigte sich die Expression von *miR-92a* in den Proben der Untersuchungsgruppe „Okkult B1“ 1,33-fach herunterreguliert, in „Okkult B2“ dagegen 1,35-fach hochreguliert in Bezug auf die gesunden Kontrollen. Da einigen Patienten im Krankheitsverlauf das positiv inotrope Medikament Pimobendan verabreicht wurde, kann dadurch möglicherweise Einfluss auf die Expression von *miR-92a* ausgeübt worden sein. Aktuell existieren nur unzureichende Untersuchungen über den Einfluss

kardiovaskulärer Therapie auf die miRNA-Expression, so dass eine Aussage diesbezüglich nicht möglich ist.

Generell waren die Unterschiede in der miRNA-Expression im Krankheitsverlauf bis auf wenige Ausnahmen nur gering ausgeprägt und zu inkonstant, um eine sichere Aussage über ihre Deregulierung und einen Zusammenhang mit einer Progression der Erkrankung zu erlauben. Nur eine einzige miRNA (*miR-132*) erreichte mit der Abweichung ihrer Expression statistische Signifikanz. In einer Vorgängerstudie, welche die miRNA-Expression bei gesunden Dobermännern und Dobermännern im Stadium Okkult B2 mit Hilfe eines miRNA-Arrays untersuchte, erreichte keine miRNA statistische Signifikanz. Nach Durchführung einer hierarchischen Clusteranalyse einiger miRNAs waren die Unterschiede zwischen den Proben gesunder und erkrankter Tiere allerdings so eindeutig, dass eine Differenzierung der Stadien möglich war (STEUDEMANN et al., 2013). Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die besagte Pilotstudie fortzuführen und die miRNA-Expression im Krankheitsverlauf der DCM zu untersuchen. Einige miRNAs, die bereits in der Literatur in Zusammenhang mit der Erkrankung gebracht wurden, traten auch hier durch ihre Deregulierung hervor. Aufgrund der kleinen Patientengruppe ist die Aussagekraft allerdings beschränkt und es bedarf weiterer Studien mit einem größeren Probenumfang und normalisierter Probenmenge, um eine sichere Einschätzung bezüglich der Abweichungen in der miRNA-Expression abgeben zu können.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Dilatative Kardiomyopathie ist bei Dobermännern die häufigste Herzerkrankung und zeichnet sich durch eine typische Verlaufsform aus. Pathologische Umbauprozesse des Myokards führen zu Rhythmusstörungen und einer progressiven kardialen Dysfunktion in der okkulten Phase. Aufgrund der späten klinischen Manifestation und des daraufhin rapide progressiven Verlaufs stellt diese Erkrankung ein lebensbedrohliches Risiko dar. Die Diagnose kann aktuell erst in der okkulten Phase mit der Kombination aus einem 24-Stunden-Elektrokardiogramm und einer Herzultraschalluntersuchung gestellt werden.

MiRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNAs, die eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielen, indem sie posttranskriptional hemmend auf proteinkodierende Gene einwirken. Sie verhalten sich gegenüber äußeren Einflüssen sehr stabil und sind sowohl in Geweben als auch in der Zirkulation nachweisbar. Zahlreiche Studien belegen, dass sich organspezifische miRNA-Expressionsprofile bei pathologischen Prozessen signifikant verändern und dass dies als Biomarker zur Diagnosestellung bestimmter Erkrankungen herangezogen werden kann. Eine potentielle Nutzung deregulierter miRNAs für die Diagnostik und auch Prognosestellung der DCM beim Menschen wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben. Ergänzend konnte eine veterinärmedizinische Pilotstudie zeigen, dass die Expression bestimmter zirkulierender miRNAs bei Dobermännern mit DCM dereguliert ist.

Bisher gibt es noch keine Untersuchung der miRNA-Expressionsprofile im Krankheitsverlauf der DCM beim Dobermann. Es ist daher nicht bekannt, in welchem Krankheitsstadium erste Hoch- oder Herunterregulierungen spezifischer kardialer miRNAs auftreten und ob diese mit einer Progression der Erkrankung korrelieren. Ziel dieser Studie war es daher, durch eine Analyse der miRNA-Expression bei Hunden, die zuerst gesund waren und dann elektrokardiographische Auffälligkeiten gefolgt von einer systolischen Dysfunktion des Myokards entwickelten, erste Kenntnisse hierüber zu erlangen.

Es wurden Patienten ausgewählt, die bei Erstvorstellung herzgesund waren und im Verlauf mehrerer Konsultationen progressive kardiale Veränderungen des Herzens entwickelten, die auf eine DCM zurückzuführen sind. Die individuellen Untersuchungen eines jeden Hundes (Anamnese, klinische und kardiologische

Untersuchung, Kurzzeit-EKG, 24-Stunden-EKG, Echokardiographie) wurden je nach Ergebnis bestimmten Gruppen zugeordnet: „Gesund“, „Frühstadium“, „Okkult B1“ (Arrhythmien), „Okkult B2“ (Arrhythmien und systolische Dysfunktion). Vier Hunde erfüllten die Einschlusskriterien; je Gruppe wurde eine Serumprobe jedes Tieres untersucht. Ergänzend wurden Proben von vier Hunden, die jeweils in den Stadien „Okkult B1“ und „Okkult B2“ vorgestellt wurden, analysiert. Die Untersuchung der aus 200 µl Serum extrahierten Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe hundespezifischer 384-Well-PCR-Arrays des *miScript PCR Systems* von *Qiagen*.

Insgesamt konnten 266 von 277 der auf den Arrays enthaltenen miRNAs nachgewiesen werden. MiRNAs, deren Expression mit einer Fold Change von  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  zwischen der Vergleichsgruppe und den Gruppen „Okkult B1“, bzw. „Okkult B2“ dereguliert war, wurden in die Auswertung einbezogen. Dies traf auf 34 miRNAs zu, wobei die Expression von 11 miRNAs heraufreguliert und von 23 miRNAs herunterreguliert war. Die progressive Hochregulierung von *miR-132* im Krankheitsverlauf der DCM erreichte statistische Signifikanz.

Die vorliegende klinische Studie belegt, dass ein Nachweis caniner miRNAs aus dem Serum mit Hilfe eines PCR Array Systems technisch möglich ist. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse eine deregulierte Expression einiger kardialer miRNAs bei Manifestation einer okkulter DCM. Diese Deregulierung war meist positiv mit dem Fortschreiten der Erkrankung von Stadium „Okkult B1“ zu „Okkult B2“ korreliert. Zirkulierende miRNAs scheinen daher auch beim Hund das Potential zu besitzen, als Biomarker zur Detektion okkulten DCM zu dienen. Es sind weitere Studien mit größerem Probenumfang nötig, um die Abweichungen der miRNA-Expression im Krankheitsverlauf der DCM beim Dobermann statistisch zu belegen.

Um genetische Träger der Dilatativen Kardiomyopathie erkennen zu können und durch einen Zuchtausschluss betroffener Tiere die hohe Erkrankungsprävalenz in der Rasse zu senken, ist eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung von großer Relevanz. Aktuell kann erst die okkulte Phase der Erkrankung mit Hilfe des diagnostischen Goldstandards erfasst werden. Die Frühphase wird im Moment noch retrospektiv als der Zeitraum mit kardiologisch unauffälligen Befunden zugeordnet, sobald ein Patient erste Anzeichen okkulten DCM zeigt. Da viele Tiere erst einer regelmäßigen tierärztlichen Konsultation unterzogen werden, wenn sie bereits klinische Anzeichen der Herzerkrankung zeigen, limitiert dies das

---

Untersuchungsmaterial für die weitere Erforschung der relevanten Frühphase. Möglicherweise bietet eine bereits in dieser Phase der DCM abweichende miRNA-Expression das Potential, künftig Träger dieser genetischen Erkrankung frühzeitig zu erkennen und durch gezieltes Handeln die hohe Prävalenzrate innerhalb der Rasse zu senken.

## VII. SUMMARY

Dilated cardiomyopathy is the most common cardiac disease in Doberman Pinschers and is characterized by a specific progression. Pathologic remodeling of the myocardium leads to arrhythmia and progressive cardiac dysfunction in the occult stage of the disease. Because of the late clinical onset and the subsequent rapid progression, this disease has the potential for a high fatality rate. To date, diagnosis cannot be established prior to manifestation of the occult stage via a combination of echocardiography and 24-hour ambulatory electrocardiogram.

Micro-ribonucleic acids are small, non-coding RNAs which play an important gene-regulatory role by posttranscriptional repression of protein-coding genes. They are remarkably stable against external influences and can easily be detected in tissues as well as in the circulation. Various studies have proven that an organ-specific miRNA expression pattern changes significantly under pathologic conditions and thus could be used as a biomarker for detection of a specific disease. Several investigations allocate the potential use of micro-ribonucleic acids for diagnostic and even prognostic purposes in human dilated cardiomyopathy. Additionally, a veterinary pilot study showed that miRNAs are differentially expressed in the circulation of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy.

There have been no previous investigations evaluating the expression pattern of micro-ribonucleic acids in the course of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. It is not known in which stage of the disease initial up- or downregulating actions of specific cardiac miRNAs occur, and whether these changes correlate with a progression of the disease state. The aim of this study was to analyze the aberrancy in miRNA expression in formerly healthy dogs which developed electrocardiographic abnormalities followed by systolic dysfunction of the myocardium, to gain some information pertaining to these questions.

Patients, which were considered healthy upon initial presentation using currently available cardiac diagnostic tests, but exhibited progressive signs of dilated cardiomyopathy during subsequent examinations were included. The individual examinations of each dog (including history, clinical examination, short-term and 24-hour ambulatory electrocardiogram, and echocardiography) were classified within specific groups: “healthy”, “incipient”, “occult B1” (arrhythmia), and

“occult B2” (arrhythmia and systolic dysfunction). Four dogs met the inclusion criteria, and their serum samples were analyzed according to each group. Serum samples of four additional dogs, which were presented in stage “occult B1” and “occult B2”, were investigated in these groups.

Analysis of total ribonucleic acid, which was extracted from 200  $\mu$ l serum, was performed with canine 384-well PCR Arrays, which were included in the *miScript PCR System* of *Qiagen*. Altogether, 266 of the 277 micro-ribonucleic acids included in the array could be detected. Micro-ribonucleic acids were selected if they were differentially expressed with a fold change of  $\geq 2$  or  $\leq 0.5$  between the occult diseased groups B1 and/or B2 and healthy control group. A total of 34 micro-ribonucleic acids met these criteria, of which 11 were upregulated and 23 were downregulated. The progressive upregulation of *miR-132* during disease progression reached statistical significance.

This clinical study demonstrates that the detection and expression profiling of canine micro-ribonucleic acids in serum based on a PCR Array System is technically possible. Additionally, the results prove that certain cardiac miRNAs are expressed differentially once occult dilated cardiomyopathy is present. For the most part, these changes were positively correlated with a progression of the disease from stage “occult B1” to “occult B2”. Hence, the potential of circulating micro-ribonucleic acids to serve as novel biomarkers for the detection of occult dilated cardiomyopathy appears to be high. Further studies with a larger population of patients are needed to statistically confirm miRNA expression changes in Doberman Pinschers during progression of dilated cardiomyopathy.

It is essential to detect potential for the disease in individuals as early as possible to exclude genetic carriers from breeding purposes and thus reduce the high prevalence of DCM in Doberman Pinschers. To date, no stage prior to the occult stage can be diagnosed using the gold standard examinations. The last normal stage is named as such retrospectively as the period of time before patients develop echocardiographic or electrocardiographic signs of occult DCM. Due to the fact, that a lot of patients are not presented to veterinarians prior to signs of cardiac failure, material for further investigation of the last normal stage is rare. Hence, it would be important to evaluate whether cardiomyocytic damage in the early stage of dilated cardiomyopathy could be detected by differentially expressed cardiac micro-ribonucleic acids. If so, this would offer the possibility to detect genetic

carriers earlier and help reduce the high prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmadi F, Dolatkhani F, Lessan-Pezeshki M, Mahdavi-Mazdeh M, Abbasi MR, Mohebi-Nejad A. Cardiac troponins in patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients without acute cardiac symptoms. *Iran J Kidney Dis* 2014; 8: 31-6.

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, Li Z, Yang B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 73-7.

Ai J, Zhang R, Gao X, Niu HF, Wang N, Xu Y, Li Y, Ma N, Sun LH, Pan ZW, Li WM, Yang BF. Overexpression of microRNA-1 impairs cardiac contractile function by damaging sarcomere assembly. *Cardiovasc Res* 2012; 95: 385-93.

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

Ambros V. The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat Med* 2008; 14: 1036-40.

Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; 455: 64-71.

Banzhaf-Strathmann J, Edbauer D. Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun Signal* 2014; 12: 30.

Barana A, Matamoros M, Dolz-Gaiton P, Perez-Hernandez M, Amoros I, Nunez M, Sacristan S, Pedraz A, Pinto A, Fernandez-Aviles F, Tamargo J, Delpon E, Caballero R. Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014; 7: 861-8.

Barbaro G, Di Lorenzo G, Soldini M, Giancaspro G, Grisorio B, Pellicelli AM,

D'Amati G, Barbarini G, AIDS GGIplSCdpad. Clinical course of cardiomyopathy in HIV-infected patients with or without encephalopathy related to the myocardial expression of tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide synthase. *AIDS* 2000; 14: 827-38.

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

Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 396-400.

Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009; 55: 623-31.

Bellera N, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Ferret E, Asin MA, Gonzalez-Alujas MT, Perez-Rodon J, Esteves M, Fonseca C, Toran N, Garcia Del Blanco B, Perez A, Garcia-Dorado D. Single intracoronary injection of encapsulated antagomir-92a promotes angiogenesis and prevents adverse infarct remodeling. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: e000946.

Besser J, Malan D, Wystub K, Bachmann A, Wietelmann A, Sasse P, Fleischmann BK, Braun T, Boettger T. MiRNA-1/133a clusters regulate adrenergic control of cardiac repolarization. *PLoS One* 2014; 9: e113449.

Bhein S, Muller A, Gerwin R. Comparative study on the proarrhythmic effects of some antiarrhythmic agents. *Circulation* 1993; 87: 617-21.

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.

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.

Borgarelli M, Tarducci A, Tidholm A, Haggstrom J. Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part II: pathophysiology and therapy. *Vet J* 2001; 162: 182-95.

Broschk C, Distl O. [Dilated cardiomyopathy (DCM) in dogs--pathological, clinical, diagnosis and genetic aspects]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2005; 112: 380-5.

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

Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005; 17: 879-87.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-66.

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

Calvert C, Meurs KM (2000a) CVT update: Doberman Pinschers occult cardiomyopathy. WB Saunders Company, Philadelphia, PA. 800-3

Calvert C, Meurs K (2000b) Doberman pinscher occult cardiomyopathy. W.B. Saunders, Philadelphia, PA

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

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, Jacobs GJ, Pickus CW. Bradycardia-associated episodic weakness, syncope, and aborted sudden death in cardiomyopathic Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 1996; 10: 88-93.

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

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* 2000b; 216: 34-9.

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 (2009) *Cardiomyopathy in Doberman Pinschers*. Saunders Elsevier, St Louis

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.

Carrillo ED, Sampieri R, Hernandez A, Garcia MC, Sanchez JA. MiR-132 Regulates Rem Expression in Cardiomyocytes During Long-Term beta-Adrenoceptor Agonism. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36: 141-54.

Chakraborty C, Doss CG, Bandyopadhyay S, Agoramoorthy G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014; 5: 697-712.

Chen D, Goswami CP, Burnett RM, Anjanappa M, Bhat-Nakshatri P, Muller W, Nakshatri H. Cancer affects microRNA expression, release, and function in cardiac and skeletal muscle. *Cancer Res* 2014a; 74: 4270-81.

Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006; 38: 228-33.

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 K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 93-103.

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, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, 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.

Chen Y, Wakili R, Xiao J, Wu CT, Luo X, Clauss S, Dawson K, Qi X, Naud P, Shi YF, Tardif JC, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Detailed characterization of microRNA changes in a canine heart failure model: Relationship to arrhythmogenic structural remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2014b; 77: 113-24.

Chen Y, Wakili R, Xiao J, Wu CT, Luo X, Clauss S, Dawson K, Qi X, Naud P, Shi YF, Tardif JC, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Detailed characterization of microRNA changes in a canine heart failure model: Relationship to arrhythmogenic structural remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2014c; 77C: 113-24.

Chen Z, Li C, Xu Y, Li Y, Yang H, Rao L. Circulating level of miR-378 predicts left ventricular hypertrophy in patients with aortic stenosis. *PLoS One* 2014d; 9: e105702.

Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2010; 3: 251-5.

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.

Choe N, Kwon JS, Kim JR, Eom GH, Kim Y, Nam KI, Ahn Y, Kee HJ, Kook H. The microRNA miR-132 targets *Lrrfip1* to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis* 2013; 229: 348-55.

Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 1989; 80: 564-72.

Cohn DE, Fabbri M, Valeri N, Alder H, Ivanov I, Liu CG, Croce CM, Resnick KE. Comprehensive miRNA profiling of surgically staged endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 656 e1-8.

Connolly SJ. Meta-analysis of antiarrhythmic drug trials. *Am J Cardiol* 1999; 84: 90R-3R.

Creager MA, Creager SJ. Arterial baroreflex regulation of blood pressure in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 401-5.

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

da Costa Martins PA, De Windt LJ. miR-21: a miRaculous Socratic paradox. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 397-400.

de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 7-18.

Deacon DC, Nevis KR, Cashman TJ, Zhou Y, Zhao L, Washko D, Guner-Ataman B, Burns CG, Burns CE. The miR-143-adducin3 pathway is essential for cardiac chamber morphogenesis. *Development* 2010; 137: 1887-96.

von Deetzen MC, Schmeck B, Gruber AD, Klopfleisch R. Molecular quantification of canine specific microRNA species. *Res Vet Sci* 2013; 95: 562-8.

von Deetzen MC, Schmeck BT, Gruber AD, Klopfleisch R. Malignancy Associated MicroRNA Expression Changes in Canine Mammary Cancer of Different

---

Malignancies. *ISRN Vet Sci* 2014; 2014: 148597.

Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006; 78: 180-9.

Dong S, Ma W, Hao B, Hu F, Yan L, Yan X, Wang Y, Chen Z, Wang Z. microRNA-21 promotes cardiac fibrosis and development of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by up-regulating Bcl-2. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 565-74.

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

Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res* 2009; 104: 170-8, 6p following 8.

Dukes-McEwan J, Borgarelli M, Tidholm A, Vollmar AC, Haggstrom J, Cardiomyopathy ETfCD. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2003; 5: 7-19.

van Empel VP, De Windt LJ, da Costa Martins PA. Circulating miRNAs: reflecting or affecting cardiovascular disease? *Curr Hypertens Rep* 2012; 14: 498-509.

Endoh M. Mechanism of action of Ca<sup>2+</sup> sensitizers--update 2001. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 15: 397-403.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-69.

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

---

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.

Fan KL, Zhang HF, Shen J, Zhang Q, Li XL. Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian Heart J* 2013; 65: 12-6.

Feng B, Cao Y, Chen S, Ruiz M, Chakrabarti S. miRNA-1 regulates endothelin-1 in diabetes. *Life Sci* 2014; 98: 18-23.

Feng Y, Niu LL, Wei W, Zhang WY, Li XY, Cao JH, Zhao SH. A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation. *Cell Death Dis* 2013; 4: e934.

Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol* 2003; 12: 65-71.

Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, Braunwald E. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* 2000; 355: 1575-81.

Floras JS. Clinical aspects of sympathetic activation and parasympathetic withdrawal in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 72A-84A.

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.

Fujimoto S. Effects of pimobendan, its active metabolite UD-CG 212, and milrinone on isolated blood vessels. *Eur J Pharmacol* 1994; 265: 159-66.

Ganguli S, Mitra S, Datta A. Antagomirbase- a putative antagomir database. *Bioinformatics* 2011; 7: 41-3.

Ge Y, Sun Y, Chen J. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *J Cell Biol* 2011; 192: 69-81.

Genini S, Guziewicz KE, Beltran WA, Aguirre GD. Altered miRNA expression in canine retinas during normal development and in models of retinal degeneration. *BMC Genomics* 2014; 15: 172.

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.

Goetze JP, Rehfeld JF, Videbaek R, Friis-Hansen L, Kastrup J. B-type natriuretic peptide and its precursor in cardiac venous blood from failing hearts. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 69-74.

Gottlieb RA, Gustafsson AB. Mitochondrial turnover in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 1295-301.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D109-11.

Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 2006; 342: 129-38.

Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 186-

---

94.

Gupta MK, Halley C, Duan ZH, Lappe J, Viterna J, Jana S, Augoff K, Mohan ML, Vasudevan NT, Na J, Sossey-Alaoui K, Liu X, Liu CG, Tang WH, Naga Prasad SV. miRNA-548c: a specific signature in circulating PBMCs from dilated cardiomyopathy patients. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 62: 131-41.

Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, Ramirez MO, Drumond AL, van Dongen S, Chen Y, Bartonicek N, Enright AJ, Lee B, Kelm RJ, Jr., Reddy AK, Taffet GE, Bradley A, Wehrens XH, Entman ML, Rodriguez A. Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. *Circulation* 2012; 125: 2751-61.

Guyonnet J, Elliott J, Kaltsatos V. A preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic approach to determine a dose of spironolactone for treatment of congestive heart failure in dog. *J Vet Pharmacol Ther* 2010; 33: 260-7.

Hagemeyer F. Calcium sensitization with pimobendan: pharmacology, haemodynamic improvement, and sudden death in patients with chronic congestive heart failure. *Eur Heart J* 1993; 14: 551-66.

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.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-31.

Hinkel R, Penzkofer D, Zuhlke S, Fischer A, Husada W, Xu QF, Baloch E, van Rooij E, Zeiher AM, Kupatt C, Dimmeler S. Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation* 2013; 128: 1066-75.

Hohnloser S, Weiss M, Zeiher A, Wollschlager H, Hust MH, Just H. Sudden cardiac

death recorded during ambulatory electrocardiographic monitoring. *Clin Cardiol* 1984; 7: 517-23.

Holler PJ, Wess G. Sphericity index and E-point-to-septal-separation (EPSS) to diagnose dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 123-9.

Holter NJ. New method for heart studies: continuous electrocardiography of active subjects over long periods is now practical. *Science* 1961; 134: 1214–20.

Hong S, Lee J, Seo HH, Lee CY, Yoo KJ, Kim SM, Lee S, Hwang KC, Choi E. Na(+)-Ca(2+) exchanger targeting miR-132 prevents apoptosis of cardiomyocytes under hypoxic condition by suppressing Ca(2+) overload. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 460: 931-7.

Hu J, Xu J, Wu Y, Chen Q, Zheng W, Lu X, Zhou C, Jiao D. Identification of microRNA-93 as a functional dysregulated miRNA in triple-negative breast cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 251-8.

Huang L, Ma J, Sun Y, Lv Y, Lin W, Liu M, Tu C, Zhou P, Gu W, Su S, Zhang G. Altered splenic miRNA expression profile in H1N1 swine influenza. *Arch Virol* 2015;

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, American College of C, American Heart Association Task Force on Practice G, American College of Chest P, International Society for H, Lung T, Heart Rhythm S. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation

and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005; 112: e154-235.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-8.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.

Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2007; 96 Suppl: R40-4.

Iaconetti C, Polimeni A, Sorrentino S, Sabatino J, Pironti G, Esposito G, Curcio A, Indolfi C. Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after vascular injury. *Basic Res Cardiol* 2012; 107: 296.

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.

Investigators TS. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327: 685-91.

Isserlin R, Merico D, Wang D, Vuckovic D, Bousette N, Gramolini AO, Bader GD, Emili A. Systems analysis reveals down-regulation of a network of pro-survival

---

miRNAs drives the apoptotic response in dilated cardiomyopathy. *Mol Biosyst* 2015; 11: 239-51.

James TN, Drake EH. Sudden death in Doberman pinschers. *Ann Intern Med* 1968; 68: 821-9.

Jansen C, Eiseheid H, Goertzen J, Schierwagen R, Anadol E, Strassburg CP, Sauerbruch T, Odenthal M, Trebicka J. The role of miRNA-34a as a prognostic biomarker for cirrhotic patients with portal hypertension receiving TIPS. *PLoS One* 2014; 9: e103779.

Jansen C, Reiberger T, Huang J, Eiseheid H, Schierwagen R, Mandorfer M, Anadol E, Schwabl P, Schwarze-Zander C, Warnecke-Eberz U, Strassburg CP, Rockstroh JK, Peck-Radosavljevic M, Odenthal M, Trebicka J. Circulating MiRNA-122 Levels Are Associated with Hepatic Necroinflammation and Portal Hypertension in HIV/HCV Coinfection. *PLoS One* 2015; 10: e0116768.

Jaronczyk K, Carmichael JB, Hobman TC. Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? *Biochem J* 2005; 387: 561-71.

Jeanson-Leh L, Lameth J, Krimi S, Buisset J, Amor F, Le Guiner C, Barthelemy I, Servais L, Blot S, Voit T, Israeli D. Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden Retriever muscular dystrophy dogs and Duchenne muscular dystrophy patients. *Am J Pathol* 2014; 184: 2885-98.

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.

Keene BD, Bonagura JD (2009) *Management of Heart Failure in Dogs*. . Saunders Elsevier, St. Louis, PA

---

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001; 15: 2654-9.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 376-85.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22: 165-73.

Kittleson MD (1998) Primary myocardial disease leading to chronic myocardial failure (dilated cardiomyopathy and related diseases). Mosby, St Louis, MO

Kluger J, Cody RJ, Laragh JH. The contribution of sympathetic tone and the renin-angiotensin-aldosterone system in severe chronic heart failure: response to specific inhibitors (prazosin and captopril). *American Journal Cardiology* 1982; 49: 1667-74.

Kong W, Zhao JJ, He L, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol* 2009; 218: 22-5.

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.

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, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.

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.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; 9: 175-9.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart W, American Society of Echocardiography's N, Standards C, Task Force on Chamber Q, American College of Cardiology Echocardiography C, American Heart A, European Association of Echocardiography ESoC. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 2006; 7: 79-108.

Latorre I, Leidinger P, Backes C, Dominguez J, de Souza-Galvao ML, Maldonado J, Prat C, Ruiz-Manzano J, Sanchez F, Casas I, Keller A, von Briesen H, Knobel H, Meese E, Meyerhans A. A novel whole-blood miRNA signature for a rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 2015;

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.

Lee BH, Dukes-McEwan J, French AT, Corcoran BM. Evaluation of a novel doppler index of combined systolic and diastolic myocardial performance in Newfoundland dogs with familial prevalence of dilated cardiomyopathy. *Vet Radiol Ultrasound* 2002a; 43: 154-65.

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.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002b; 21: 4663-70.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*

---

2003; 425: 415-9.

Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stahler C, Lang CJ, Meder B, Bartfai T, Meese E, Keller A. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol* 2013; 14: R78.

Lemons D, Maurya MR, Subramaniam S, Mercola M. Developing microRNA screening as a functional genomics tool for disease research. *Front Physiol* 2013; 4: 223.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-98.

Li C, Pei F, Zhu X, Duan DD, Zeng C. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction. *Clin Biochem* 2012a; 45: 727-32.

Li H, Li S, Yu B, Liu S. Expression of miR-133 and miR-30 in chronic atrial fibrillation in canines. *Mol Med Rep* 2012b; 5: 1457-60.

Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 36.

Li J, Yao B, Huang H, Wang Z, Sun C, Fan Y, Chang Q, Li S, Wang X, Xi J. Real-time polymerase chain reaction microRNA detection based on enzymatic stem-loop probes ligation. *Anal Chem* 2009; 81: 5446-51.

Li J, Cao Y, Ma XJ, Wang HJ, Zhang J, Luo X, Chen W, Wu Y, Meng Y, Zhang J, Yuan Y, Ma D, Huang GY. Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects. *Int J Cardiol* 2013; 168: 1441-6.

Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 1117-24.

Liew CC, Dzau VJ. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 811-25.

Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science* 2003a; 299: 1540.

Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 2003b; 17: 991-1008.

Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9740-4.

Liu CG, Calin GA, Volinia S, Croce CM. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc* 2008a; 3: 563-78.

Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 214-21.

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* 2008b; 22: 3242-54.

Lorenzen JM, Schauerte C, Hubner A, Kolling M, Martino F, Scherf K, Batkai S, Zimmer K, Foinquinos A, Kaucsar T, Fiedler J, Kumarswamy R, Bang C, Hartmann D, Gupta SK, Kielstein J, Jungmann A, Katus HA, Weidemann F, Muller OJ, Haller H, Thum T. Osteopontin is indispensable for AP1-mediated angiotensin II-related miR-21 transcription during cardiac fibrosis. *Eur Heart J* 2015;

---

Loyer X, Potteaux S, Vion AC, Guerin CL, Boulkroun S, Rautou PE, Ramkhelawon B, Esposito B, Dalloz M, Paul JL, Julia P, Maccario J, Boulanger CM, Mallat Z, Tedgui A. Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circ Res* 2014; 114: 434-43.

Lozano-Velasco E, Galiano-Torres J, Jodar-Garcia A, Aranega AE, Franco D. miR-27 and miR-125 Distinctly Regulate Muscle-Enriched Transcription Factors in Cardiac and Skeletal Myocytes. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 391306.

Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield M, Wei CM, Porter JG, Burnett JC, Jr. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol* 1998; 274: H1684-9.

Lv P, Zhou M, He J, Meng W, Ma X, Dong S, Meng X, Zhao X, Wang X, He F. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 5774-88.

MacDonald KA, Kittleson MD, Munro C, Kass P. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 172-7.

Maier E, Wess G (2012) Analytische und klinische Evaluierung eines hochsensitiven Troponin-I-Assays bei der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns. Göttingen.

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.

Masood Y, Kqueen CY, Rajadurai P. Role of miRNA in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015; 15: 183-97.

Massirer KB, Pasquinelli AE. The evolving role of microRNAs in animal gene

---

expression. *Bioessays* 2006; 28: 449-52.

Matsumoto S, Sakata Y, Suna S, Nakatani D, Usami M, Hara M, Kitamura T, Hamasaki T, Nanto S, Kawahara Y, Komuro I. Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circ Res* 2013; 113: 322-6.

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.

Meinertz T, Hofmann T, Kasper W, Treese N, Bechtold H, Stienen U, Pop T, Leitner ER, Andresen D, Meyer J. Significance of ventricular arrhythmias in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1984; 53: 902-7.

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* 2001a; 218: 222-4.

Meurs KM, Magnon AL, Spier AW, Miller MW, Lehmkuhl LB, Towbin JA. Evaluation of the cardiac actin gene in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2001b; 62: 33-6.

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.

Miller MS, O'Grady M R, Smith FW. Current concepts in vasodilator therapy for advanced or refractory congestive heart failure. *Can Vet J* 1988; 29: 354-61.

Miller RH, Lehmkuhl LB, Bonagura JD, Beall MJ. Retrospective analysis of the clinical utility of ambulatory electrocardiographic (Holter) recordings in syncopal dogs: 44 cases (1991-1995). *J Vet Intern Med* 1999; 13: 111-22.

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.

Monnet E, Orton EC, Salman M, Boon J. Idiopathic dilated cardiomyopathy in dogs: survival and prognostic indicators. *J Vet Intern Med* 1995; 9: 12-7.

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.

Naga Prasad SV, Karnik SS. MicroRNAs--regulators of signaling networks in dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res* 2010; 3: 225-34.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 2007; 13: 619-24.

Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Maslowski AH, Lun S, Scandrett MS. Angiotensin II is more potent than potassium in regulating aldosterone in cardiac failure: evidence during captopril therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 1253-6.

O'Brien PJ, O'Grady M, McCutcheon LJ, Shen H, Nowack L, Horne RD, Mirsalimi SM, Julian RJ, Grima EA, Moe GW, et al. Myocardial myoglobin deficiency in various animal models of congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 721-30.

O'Brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ, Marchak MA, Pruimboom-Brees I, Brees DJ, Spratt DP, Archer FJ, Butler P, Potter AN, Provost JP, Richard J, Snyder PA, Reagan WJ. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim* 2006; 40: 153-71.

O'Grady M R, Horne R. The prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: A 4,5 year follow-up. *J Vet Intern Med* 1998; 12

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'Grady M, Horne R, Gordon SG. Does angiotensin converting enzyme inhibitor therapy delay the onset of congestive heart failure or sudden death in Doberman pinschers with occult dilated cardiomyopathy [abstract]? *J Vet Intern Med* 1997; 11: 138.

Ohtani T, Mohammed SF, Yamamoto K, Dunlay SM, Weston SA, Sakata Y, Rodeheffer RJ, Roger VL, Redfield MM. Diastolic stiffness as assessed by diastolic wall strain is associated with adverse remodelling and poor outcomes in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J* 2012; 33: 1742-9.

Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998; 280: 750-2.

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* 2013; 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, Prosek R, Bulmer BJ, Luethy MW, Fuentes VL. Carvedilol in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007a; 21: 1272-9.

---

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* 2007b; 68: 42-7.

Oyama MA, Fox PR, Rush JE, Rozanski EA, Lesser M. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1496-503.

Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL, Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study G. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344: 1651-8.

Parikh VN, Chan SY. Analysis of microRNA niches: techniques to measure extracellular microRNA and intracellular microRNA in situ. *Methods Mol Biol* 2013; 1024: 157-72.

Pauley KM, Cha S. miRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy. *Immunotherapy* 2011; 3: 829-31.

Pedroza-Torres A, Lopez-Urrutia E, Garcia-Castillo V, Jacobo-Herrera N, Herrera LA, Peralta-Zaragoza O, Lopez-Camarillo C, De Leon DC, Fernandez-Retana J, Cerna-Cortes JF, Perez-Plasencia C. MicroRNAs in cervical cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance. *Molecules* 2014; 19: 6263-81.

Penfornis P, Vallabhaneni KC, Whitt J, Pochampally R. Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *Int J Cancer* 2015;

Petric AD, Stabej P, Zemva A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, Causes of Death and a Pedigree Review in a Related Line. *J Vet Cardiol*

---

2002; 4: 17-24.

Porter TR, Eckberg DL, Fritsch JM, Rea RF, Beightol LA, Schmedtje JF, Jr., Mohanty PK. Autonomic pathophysiology in heart failure patients. Sympathetic-cholinergic interrelations. *J Clin Invest* 1990; 85: 1362-71.

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

Ravens U, Himmel HM, Fluss M, Davia K, Harding SE. Phosphodiesterase inhibition and Ca<sup>2+</sup> sensitization. *Mol Cell Biochem* 1996; 157: 245-9.

Rayner KJ, Hennessy EJ. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *J Lipid Res* 2013; 54: 1174-81.

Reddy PS. The third heart sound. *Int J Cardiol* 1985; 7: 213-21.

Ren J, Zhang J, Xu N, Han G, Geng Q, Song J, Li S, Zhao J, Chen H. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One* 2013; 8: e80738.

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 2002; 110: 513-20.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsfas I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-2.

Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C.

---

Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 1999; 33: 981-6.

Romeo F, Pelliccia F, Cianfrocca C, Cristofani R, Reale A. Predictors of sudden death in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1989; 63: 138-40.

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, 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.

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.

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.

Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 2002; 243: 215-25.

Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455: 58-63.

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.

Shen Y, Shen Z, Miao L, Xin X, Lin S, Zhu Y, Guo W, Zhu YZ. miRNA-30 Family Inhibition Protects Against Cardiac Ischemic Injury by Regulating Cystathionine-gamma-Lyase Expression. *Antioxid Redox Signal* 2015; 22: 224-40.

Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 471-7.

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 (1995) *Myocardial diseases.*, 4th edn. S. J. W. B. Saunders, Philadelphia, PA. 995-1005

Smucker ML, Kaul S, Woodfield JA, Keith JC, Manning SA, Gascho JA. Naturally occurring cardiomyopathy in the Doberman pinscher: a possible large animal model of human cardiomyopathy? *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 200-6.

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.

Stuedemann C, Bauersachs S, Weber K, Wess G. Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. *BMC Vet Res* 2013; 9: 12.

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

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 G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 2003; 17: 49-63.

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.

Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 27.

The BENCH (BENazepril in Canine Heart Disease) Study Group. The effect of benazepril on survival times and clinical signs of dogs with congestive heart failure: Results of a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, long-term clinical trial. *J Vet Cardiol* 1999; 1: 7-18.

The COVE Study Group. 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.

The IMPROVE Study Group. 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.

Thomas MF, Ansel KM. Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods Mol Biol* 2010; 667: 93-111.

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, Jonsson L. Dilated cardiomyopathy in the Newfoundland: a study of 37 cases (1983-1994). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32: 465-70.

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. 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.

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.

Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuss L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Kruger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schafer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 2010; 122: 993-1003.

Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 7223-33.

Turchinovich A, Cho WC. The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids. *Front Genet* 2014; 5: 30.

Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, Erikci E, Kardasinski M, Batkai S, Dangwal S, Kumarswamy R, Bang C, Holzmann A, Remke J, Caprio M, Jentsch C, Engelhardt S, Geisendorf S, Glas C, Hofmann TG, Nessling M, Richter K, Schiffer M, Carrier L, Napp LC, Bauersachs J, Chowdhury K, Thum T. The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat Commun* 2012; 3: 1078.

Unger T. Neurohormonal modulation in cardiovascular disease. *Am Heart J* 2000; 139: S2-8.

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.

Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* 2008; 3: 190-6.

Vollmar A, Fox PR, Meurs KM, Liu SK. Dilated cardiomyopathy in juvenile

---

doberman pinschers. *J Vet Cardiol* 2003; 5: 23-7.

Vollmar AC. The prevalence of cardiomyopathy in the Irish wolfhound: a clinical study of 500 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000; 36: 125-32.

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

Wang N, Zhou Z, Liao X, Zhang T. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure. *IUBMB Life* 2009; 61: 566-71.

Weber K, Rostert N, Bauersachs S, Wess G. Serum microRNA profiles in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 2015; 402: 171-80.

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* 2010a; 24: 1069-76.

Wess G, Simak J, Mahling M, Hartmann K. Cardiac troponin I in Doberman Pinschers with cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010b; 24: 843-9.

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* 2010c; 24: 533-8.

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*

---

2010d; 24: 367-71.

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.

Wiese S, Breyer T, Dragu A, Wakili R, Burkard T, Schmidt-Schweda S, Fuchtbauer EM, Dohrmann U, Beyersdorf F, Radicke D, Holubarsch CJ. Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation* 2000; 102: 3074-9.

Wijnen WJ, van der Made I, van den Oever S, Hiller M, de Boer BA, Picavet DI, Chatzispyrou IA, Houtkooper RH, Tijssen AJ, Hagoort J, van Veen H, Everts V, Ruijter JM, Pinto YM, Creemers EE. Cardiomyocyte-specific miRNA-30c over-expression causes dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9: e96290.

Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, Crosby-Nwaobi R, Prokopi M, Drozdov I, Langley SR, Sivaprasad S, Markus HS, Mitchell JA, Warner TD, Kiechl S, Mayr M. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res* 2013; 112: 595-600.

Wynne J, Braunwald E (1997) *The cardiomyopathies and myocarditis*. 5th edition., 5th edn. Saunders, Philadelphia, PA

Xu C, Lu Y, Pan Z, Chu W, Luo X, Lin H, Xiao J, Shan H, Wang Z, Yang B. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2007; 120: 3045-52.

Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 2005; 280: 9330-5.

---

Yin VP, Lepilina A, Smith A, Poss KD. Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133. *Dev Biol* 2012; 365: 319-27.

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.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9779-84.

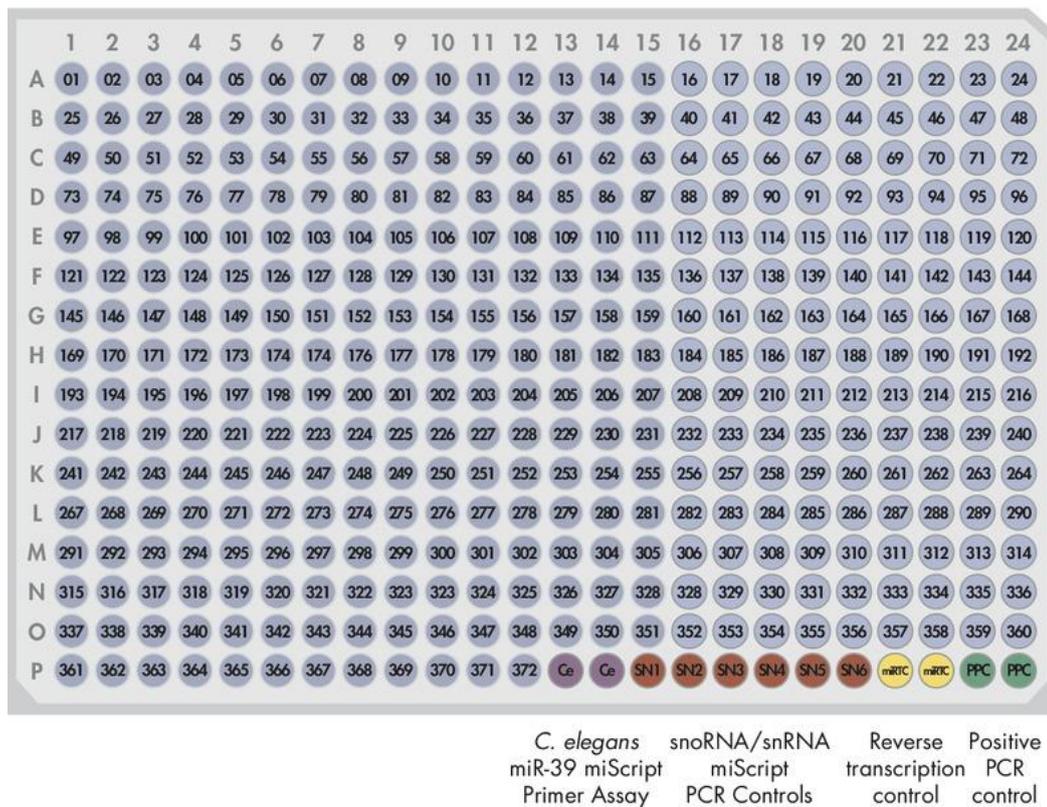
Zhang L, Huang D, Wang Q, Shen D, Wang Y, Chen B, Zhang J, Gai L. MiR-132 inhibits expression of SIRT1 and induces pro-inflammatory processes of vascular endothelial inflammation through blockade of the SREBP-1c metabolic pathway. *Cardiovasc Drugs Ther* 2014; 28: 303-11.

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005; 436: 214-20.

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.

Zhu X, Wang H, Liu F, Chen L, Luo W, Su P, Li W, Yu L, Yang X, Cai J. Identification of micro-RNA networks in end-stage heart failure because of dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med* 2013; 17: 1173-87.

## IX. ANHANG



**Abbildung 8:** Layout der verwendeten miScript miRNA 384-Well-PCR-Arrays

Die Vertiefungen A1 bis P12 (1-372) enthalten jeweils einen miScript Primer Assay für eine spezie-spezifische mature miRNA. Die Kavitäten P13 und P14 (*Ce*) beinhalten synthetisch hergestellte *C. elegans* miR-39 miScript Primer Assays, die alternativ zur Normalisierung der Daten verwendet werden können. In P15 bis P20 ist jeweils ein Assay für eine unterschiedliche snoRNA/snRNA zu finden, die zur Normalisierung der Array-Daten verwendet werden können (*SN1*: SNORD61 Assay, *SN2*: SNORD68 Assay, *SN3*: SNORD72 Assay, *SN4*: SNORD95 Assay, *SN5*: SNORD96A Assay, *SN6*: RNU6B/RNU6-2 Assay). Die Vertiefungen P21 und P22 enthalten nachgemachte miRTC miScript Primer Assays (*miRTC*). In den Kavitäten P23 und P24 sind nachgemachte positive PCR-Kontrollen (*PPC*) enthalten.

**Tabelle 8:** Überblick über die nachweisbaren miRNAs in den hundespezifischen 384-Well-PCR-Arrays (Dog miRNome)

<b>Position</b>	<b>Mature ID</b>
A01	cfa-miR-383
A02	cfa-miR-129
A03	cfa-miR-135a-5p
A04	cfa-miR-632
A05	cfa-miR-219-3p
A06	cfa-miR-494
A07	cfa-miR-208b
A08	cfa-miR-874
A09	cfa-miR-449a
A10	cfa-miR-451
A11	cfa-miR-9
A12	cfa-miR-187
A13	cfa-miR-26a
A14	cfa-miR-761
A15	cfa-miR-1837
A16	cfa-miR-331
A17	cfa-miR-146a
A18	cfa-miR-429
A19	cfa-miR-872
A20	cfa-miR-34c
A21	cfa-miR-367
A22	cfa-miR-181b
A23	cfa-miR-411
A24	cfa-miR-96
B01	cfa-miR-10a
B02	cfa-miR-27b
B03	cfa-miR-206
B04	cfa-miR-375
B05	cfa-miR-504
B06	cfa-miR-106b
B07	cfa-miR-302a
B08	cfa-miR-1835
B09	cfa-miR-204
B10	cfa-miR-193a
B11	cfa-miR-194
B12	cfa-miR-181a
B13	cfa-miR-454
B14	cfa-miR-378
B15	cfa-miR-544
B16	cfa-miR-203
B17	cfa-miR-432
B18	cfa-miR-628
B19	cfa-miR-330
B20	cfa-miR-25
B21	cfa-miR-380
B22	cfa-miR-218
B23	cfa-miR-676
B24	cfa-miR-590
C01	cfa-let-7e
C02	cfa-miR-124
C03	cfa-miR-496
C04	cfa-miR-10b
C05	cfa-miR-433
C06	cfa-miR-885

C07	cfa-miR-211
C08	cfa-miR-384
C09	cfa-miR-33a
C10	cfa-miR-342
C11	cfa-miR-217
C12	cfa-miR-1844
C13	cfa-miR-409
C14	cfa-miR-224
C15	cfa-miR-18b
C16	cfa-miR-16
C17	cfa-miR-543
C18	cfa-miR-98
C19	cfa-miR-216b
C20	cfa-miR-539
C21	cfa-miR-193b
C22	cfa-miR-145
C23	cfa-miR-103
C24	cfa-miR-138a
D01	cfa-miR-483
D02	cfa-miR-450b
D03	cfa-miR-139
D04	cfa-miR-764
D05	cfa-miR-150
D06	cfa-miR-302b
D07	cfa-miR-30c
D08	cfa-miR-876
D09	cfa-miR-95
D10	cfa-miR-568
D11	cfa-miR-365
D12	cfa-miR-582
D13	cfa-miR-545
D14	cfa-miR-421
D15	cfa-miR-379
D16	cfa-miR-1306
D17	cfa-miR-127
D18	cfa-miR-190a
D19	cfa-miR-27a
D20	cfa-miR-28
D21	cfa-miR-490
D22	cfa-let-7b
D23	cfa-miR-128
D24	cfa-miR-137
E01	cfa-miR-20b
E02	cfa-miR-31
E03	cfa-miR-138b
E04	cfa-miR-335
E05	cfa-miR-376a
E06	cfa-miR-29a
E07	cfa-miR-133b
E08	cfa-miR-144
E09	cfa-miR-759
E10	cfa-miR-500
E11	cfa-miR-181c
E12	cfa-miR-424
E13	cfa-miR-223
E14	cfa-miR-300
E15	cfa-miR-329b
E16	cfa-miR-222
E17	cfa-miR-34a

E18	cfa-miR-514
E19	cfa-miR-301a
E20	cfa-miR-1
E21	cfa-miR-1307
E22	cfa-miR-152
E23	cfa-miR-325
E24	cfa-miR-122
F01	cfa-miR-197
F02	cfa-miR-30a
F03	cfa-miR-551b
F04	cfa-miR-299
F05	cfa-miR-1841
F06	cfa-miR-542
F07	cfa-let-7f
F08	cfa-miR-105b
F09	cfa-miR-1838
F10	cfa-miR-503
F11	cfa-miR-363
F12	cfa-miR-191
F13	cfa-miR-410
F14	cfa-miR-664
F15	cfa-miR-497
F16	cfa-miR-133a
F17	cfa-miR-495
F18	cfa-miR-487b
F19	cfa-miR-17
F20	cfa-miR-205
F21	cfa-miR-589
F22	cfa-miR-599
F23	cfa-miR-212
F24	cfa-miR-487a
G01	cfa-miR-425
G02	cfa-miR-505
G03	cfa-miR-125b
G04	cfa-miR-30e
G05	cfa-miR-219-5p
G06	cfa-miR-148a
G07	cfa-miR-660
G08	cfa-miR-182
G09	cfa-let-7c
G10	cfa-miR-200c
G11	cfa-miR-136
G12	cfa-miR-326
G13	cfa-miR-382
G14	cfa-miR-215
G15	cfa-miR-221
G16	cfa-miR-190b
G17	cfa-miR-148b
G18	cfa-miR-101
G19	cfa-miR-350
G20	cfa-let-7j
G21	cfa-miR-15b
G22	cfa-miR-155
G23	cfa-miR-199
G24	cfa-miR-423a
H01	cfa-miR-450a
H02	cfa-miR-301b
H03	cfa-miR-578
H04	cfa-miR-23b

H05	cfa-miR-652
H06	cfa-miR-19b
H07	cfa-miR-574
H08	cfa-let-7g
H09	cfa-miR-592
H10	cfa-miR-302d
H11	cfa-miR-489
H12	cfa-miR-153
H13	cfa-miR-488
H14	cfa-miR-22
H15	cfa-miR-7
H16	cfa-miR-1351-3p
H17	cfa-miR-376b
H18	cfa-miR-671
H19	cfa-miR-192
H20	cfa-miR-532
H21	cfa-miR-377
H22	cfa-miR-135b
H23	cfa-miR-126
H24	cfa-miR-653
I01	cfa-miR-374a
I02	cfa-miR-210
I03	cfa-miR-1842
I04	cfa-miR-143
I05	cfa-miR-329a
I06	cfa-miR-371
I07	cfa-miR-125a
I08	cfa-miR-184
I09	cfa-miR-181d
I10	cfa-miR-324
I11	cfa-miR-140
I12	cfa-miR-1836
I13	cfa-miR-32
I14	cfa-miR-499
I15	cfa-miR-455
I16	cfa-miR-15a
I17	cfa-miR-106a
I18	cfa-miR-1839
I19	cfa-miR-132
I20	cfa-miR-345
I21	cfa-miR-361
I22	cfa-miR-21
I23	cfa-miR-34b
I24	cfa-miR-186
J01	cfa-miR-502
J02	cfa-miR-92b
J03	cfa-miR-29b
J04	cfa-miR-802
J05	cfa-miR-29c
J06	cfa-miR-24
J07	cfa-miR-130a
J08	cfa-miR-146b
J09	cfa-miR-376c
J10	cfa-miR-23a
J11	cfa-miR-493
J12	cfa-miR-188
J13	cfa-miR-875
J14	cfa-miR-374b
J15	cfa-miR-151

J16	cfa-miR-202
J17	cfa-miR-452
J18	cfa-miR-183
J19	cfa-miR-338
J20	cfa-miR-320
J21	cfa-miR-185
J22	cfa-miR-207
J23	cfa-miR-485
J24	cfa-miR-448
K01	cfa-miR-142
K02	cfa-miR-130b
K03	cfa-miR-18a
K04	cfa-miR-195
K05	cfa-miR-381
K06	cfa-miR-196a
K07	cfa-miR-30d
K08	cfa-miR-362
K09	cfa-miR-328
K10	cfa-miR-93
K11	cfa-miR-99b
K12	cfa-miR-20a
K13	cfa-miR-340
K14	cfa-miR-92a
K15	cfa-miR-200b
K16	cfa-miR-141
K17	cfa-miR-26b
K18	cfa-miR-369
K19	cfa-miR-105a
K20	cfa-miR-708
K21	cfa-miR-200a
K22	cfa-miR-216a
K23	cfa-miR-758
K24	cfa-miR-149
L01	cfa-miR-214
L02	cfa-miR-491
L03	cfa-miR-134
L04	cfa-miR-1271
L05	cfa-let-7a
L06	cfa-miR-551a
L07	cfa-miR-208a
L08	cfa-miR-19a
L09	cfa-miR-665
L10	cfa-miR-196b
L11	cfa-miR-30b
L12	cfa-miR-99a
L13	cfa-miR-133c
P13	cel-miR-39-3p
P14	cel-miR-39-3p
P15	SNORD61
P16	SNORD68
P17	SNORD72
P18	SNORD95
P19	SNORD96A
P20	RNU6-6P
P21	miRTC
P22	miRTC
P23	PPC
P24	PPC

---

## **X. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Gerhard Wess für die kardiologische Ausbildung bedanken, die ich während der klinischen Mitarbeit in seinem Team erhalten durfte. Er unterstützte mich bei der Planung meines Projekts und hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen. Gemeinsam mit Frau Dr. Karin Weber ermöglichte er letztendlich auch die kostenintensive Durchführung des Projekts, indem sie Drittmittel dafür einwarben.

Für die Planung des Laborteils und die Unterstützung, die sie mir aufgrund ihrer Erfahrung und Versiertheit im Umgang mit labortechnischen Verfahren darstellte, möchte ich mich bei Frau Dr. Karin Weber bedanken.

Mein größter Dank gilt den Personen, die mir besonders nahe stehen. Sie haben zum einen durch ihre aktive Hilfestellung (hier sei unter anderem der unermüdliche Leseinsatz meines Vaters und die stundenlange, geduldige Hilfe meines Partners bei der Suche nach längst verschollenen Serumproben in den Tiefen der klinikeigenen Gefrierschränke erwähnt) das Zustandekommen meiner Doktorarbeit in der vorliegenden Form ermöglicht. Zum anderen waren sie mir während dieser ersten Jahre meines „tierärztlichen Daseins“ eine unbezahlbare Stütze, indem sie immer für mich da waren, mir bei Problemen und Unsicherheiten mit ihrer (oftmals auch kritischen) Meinung zur Seite standen und durch ihre Liebe und Freundschaft dafür sorgten, dass ich mich nicht vom geplanten Weg abbringen ließ.