

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg

**Role of microRNA in human blood plasma of patients with
atrial fibrillation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Fabienne Risch
aus
Waldshut-Tiengen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Reza Wakili
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christopher Reithmann
PD Dr. Tobias Heer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2021

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
2	HINTERGRUND.....	8
2.1	Vorhofflimmern.....	8
2.1.1	Definition von Vorhofflimmern	8
2.1.2	Epidemiologie von Vorhofflimmern	8
2.1.3	Klassifikation von Vorhofflimmern.....	8
2.1.4	Klinische Bedeutung von Vorhofflimmern.....	10
2.1.4.1	Risikofaktoren und kausale Faktoren für die Entstehung von Vorhofflimmern	10
2.1.4.2	Symptomatik von Vorhofflimmern.....	10
2.1.4.3	Komplikationen von Vorhofflimmern	11
2.1.4.4	Sozioökonomische Auswirkungen von Vorhofflimmern	12
2.2	Physiologische Grundlagen der Erregungsausbreitung am Herzen.....	13
2.2.1	Erregungsausbreitung am Herzen.....	13
2.2.2	Elektrophysiologische Mechanismen zur Entstehung und dem Ablauf einer physiologischen Herzaktion.....	13
2.2.3	Pathophysiologische Aspekte.....	13
2.2.3.1	Atriale Ektopie	14
2.2.3.2	Re-entry	15
2.2.3.2.1	Strukturelles Remodelling	15
2.2.3.2.2	Funktionelles Remodelling.....	16
2.3	Diagnostik von VHF.....	17
2.3.1	Elektrokardiogramm	17
2.3.2	Langzeit-Elektrokardiogramm und Event-Rekorder	17
2.4	Therapie von Vorhofflimmern	18
2.4.1	Frequenzkontrolle	18
2.4.2	Rhythmuskontrolle	20
2.4.2.1	Akute Rhythmuskontrolle	20
2.4.2.2	Langfristige Rhythmuskontrolle	21
2.4.2.3	Interventionelle Therapie mittels Ablation	21
2.4.3	Embolieprophylaxe durch Antikoagulation.....	22
2.5	Stratifizierung des Therapieerfolgs nach Katheterablation.....	23
2.6	microRNA und ihre mögliche Bedeutung als Biomarker bei Vorhofflimmern.....	25
2.6.1	Synthese von microRNA	25
2.6.2	Rolle der miRNA in der Pathophysiologie von Vorhofflimmern	26
2.6.3	Rolle der miRNA als potentielle Therapieansätze bei Vorhofflimmern	31
2.6.4	Rolle der miRNA als Biomarker	32
3	EIGENE FRAGESTELLUNG	33
4	MATERIAL UND METHODIK	34
4.1	Molekularbiologie	34
4.1.1	Materialien	34
4.1.2	Methodik	36
4.1.2.1	Plasmagewinnung.....	36
4.1.2.2	miRNA-Isolation	36
4.1.2.3	Reverse Transkription	37
4.1.2.4	Real-Time-PCR.....	37
4.2	Auswertung und Statistik.....	38
5	ERGEBNISSE	38
5.1	Klinische Daten der Studiengruppe	38
5.1.1	Patientenkollektiv und Einteilung der Vergleichsgruppen	38

5.1.2	Allgemeine Patientencharakteristika.....	39
5.2	Erfolgsraten der Ablationstherapie nach drei, sechs und 12 Monaten	42
5.3	Übersicht über die Konzentrationsraten der miRNA	44
5.4	Konzentration der untersuchten miRNA bei Patienten mit paroxysmale Vorhofflimmern	45
5.5	Konzentration der untersuchten miRNA bei Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern	49
6	DISKUSSION	53
6.1	Diskussion methodischer Aspekte.....	54
6.1.1	Plasmagewinnung.....	54
6.1.2	miRNA-Isolation	55
6.1.3	Reverse Transkription	56
6.1.4	Real-Time PCR.....	56
6.2	Diskussion des Patientenkollektivs	57
6.3	Diskussion der Ablationstherapie sowie der ermittelten Rezidivraten	59
6.4	Diskussion der Konzentration der einzelnen miRNA sowie ihre Korrelation zum VHF-Typ und Rezidiv nach Ablation	60
6.5	Diskussion der Rolle der miRNA als Biomarker für die Ablationstherapie.....	66
6.6	Limitationen der Arbeit	68
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	69
8	AUSBLICK.....	70
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	72
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	83
11	TABELLENVERZEICHNIS	85
12	DANKSAGUNG	86
13	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Abkürzungsverzeichnis

AAD	Anti-arrhythmic drugs
Abb.	Abbildung
ACC	American College of Cardiology
ACT	Activated Clotting Time
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AFA	ESC-EHRA atrial fibrillation ablation long-term registry (AFA)
AFG	EURObservational Research Programme Atrial Fibrillation (EORP-AF) Pilot General Registry (AFG)
AHA	American Heart Association
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
art.	arteriell
AV-Knoten	Atrio-ventrikulärer Knoten
BMI	Body-Mass-Index
BNP	B-type-natriuretic peptide
Bp	Basenpaare
CAD	Chronisch arterielle Erkrankungen
chron.	Chronisch
CT	Cycle Threshold
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CT-Wert	cycle threshold
DAD	delayed after depolarisation = späte Nachdepolarisation
cDNA	complementary DNA
DF	dominant frequency
d.h.	das heißt
DOAK	direkte orale Antikoagulantien
EAD	early after depolarization = frühe Nachdepolarisation
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHRA	European Heart Association
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ESC	European Society of Cardiology
FBN	Fibrillin
FGF	Fibroblast growth factor
FU	Follow-up

EF	Ejektionsfraktion
eGFR	errechnete glomeruläre Filtrationsrate
cGMP	cyclisches Guanin-Monophosphat
h	hour (Stunde)
HDM	High-density Mapping
HMGA2	High-Mobility-Group-AT-hook 2
JAK	Janus-Kinase
kg/m ²	Kilogramm pro Quadratmeter
km/Woche	Kilometer pro Woche
LA	Linkes Atrium
LNA	locked nucleid acid
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MLP	Macherey-Nagel Lysis Puffer
MPP	Macherey-Nagel Protein Precipitation Puffer
MRT	Magnetresonanztomographie
MW1/2	Waschpuffer ½
NW	Nebenwirkung
NPPA	Natriuretic peptides precursor A
Nt	Nucleotid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
PACT	PKR activation protein
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
qPCR	quantitative Polymeraseketten-Reaktion
PDE-5-Inhibitor	Phosphodiesterase-5-Inhibitor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PP2A	Protein-Phosphatase
PV	Pulmonalvene
PVI	Pulmonalvenenisolation
RA	Rechtes Atrium
RAS	Rat sarcoma
mRNA	messenger- Ribonukleinsäuren
miRNA	micro-Ribonukleinsäuren
RF	Radiofrequenzablation
RISC	RNA-induced silencing complex

RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	Real-time quantitative Polymeraseketten-Reaktion
RV	Rechter Ventrikel
RyR	Ryanodinrezeptor
SPRY1	Sprouty homologue 1
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TRBP	TAR RNA binding protein
TRPC3	Transient receptor potential channel 3
UE	Untereinheit
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vgl.	vergleiche
VHF	Vorhofflimmern
VKA	Vitamin-K-Antagonisten
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZEB	Zinkfinger E-box-binding homebox

2 Hintergrund

2.1 Vorhofflimmern

2.1.1 Definition von Vorhofflimmern

Nach der Definition der European Society of Cardiology (ESC) sowie der American Heart Association (AHA) handelt es sich bei Vorhofflimmern (VHF) um eine supraventrikuläre Tachyarrhythmie, die gekennzeichnet ist durch unkoordinierte Erregung und Kontraktion des Atriums mit konsekutiver Reduktion der mechanischen Funktion (January, Wann et al. 2014). Charakteristika im Elektrokardiogramm sind hierbei absolut unregelmäßige RR-Intervalle ohne repetitive Muster, fehlende P-Wellen sowie irreguläre Vorhofaktivität (Kirchhof, Benussi et al. 2016). Während normalerweise die P-Welle eine regelmäßige Erregung des Vorhofs darstellt, finden sich beim VHF lediglich oszillierende, flimmernde Wellen unterschiedlicher Amplitude und Form mit einer Frequenz von 350-600/min. Diese arrhythmischen Vorhofimpulse führen zu einer unregelmäßigen Erregung der Herzkammern, die sich sowohl normofrequent als auch als Tachy- oder Bradyarrhythmie präsentieren kann (Falk 2001). Die Flimmerfrequenz und die Filterfunktion des AV-Knotens bestimmen dabei die Zykluslänge, Morphologie und Amplitude der QRS-Komplexe.

2.1.2 Epidemiologie von Vorhofflimmern

VHF gehört mit einer Prävalenz von 1-2% der europäischen Gesamtbevölkerung zu den häufigsten Herzrhythmusstörungen (Camm, Kirchhof et al. 2010). Während die Prävalenz in den USA mit ca. 1% etwas niedriger ist, so ist VHF in Deutschland mit einer Prävalenz von ca. 2.5% sehr verbreitet (Go, Hylek et al. 2001), (Writing Group, Lloyd-Jones et al. 2010) (Schnabel, Wilde et al. 2012). Auffallend ist hierbei ein Anstieg der Prävalenz mit steigendem Alter. So sind in Deutschland nur ca. 1% der VHF-Patienten unter 50 Jahre, während bei den über 80-Jährigen ca. 9-16% betroffen sind. Aktuelle Einschätzungen sagen voraus, dass sich die Anzahl Betroffener in den kommenden Jahren weiter erhöhen wird (Schnabel, Yin et al. 2015). Dies liegt zum einen im demographischen Wandel mit seiner wachsenden älteren Generation begründet zum anderen auch in der häufigeren Detektion der Rhythmusstörung durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten.

Insgesamt beträgt das Lebenszeitrisiko an VHF zu erkranken global ca. 25% (Lloyd-Jones, Wang et al. 2004). Sowohl Inzidenz als auch Prävalenz liegen im Allgemeinen bei Männern höher als bei Frauen (Heeringa, van der Kuip et al. 2006).

2.1.3 Klassifikation von Vorhofflimmern

Zur Einteilung von VHF gibt es eine Vielzahl von Klassifikationssystemen basierend auf ätiologischen oder elektrophysiologischen Aspekten, dem zeitlichem Verlauf oder auch den

Symptomen und deren Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten (Lubitz, Benjamin et al. 2010). Im klinischen Alltag findet sich heute aber vor allem die Charakterisierung nach dem zeitlichen Auftreten des VHF wieder, die schon 1997 von Gallagher und Camm beschrieben wurde (Gallagher and Camm 1997). In den aktuellen Leitlinien von ACC/AHA (January, Wann et al. 2014) und ESC (Kirchhof, Benussi et al. 2016) werden demnach 5 Formen des VHF unterschieden:

1. *Erstmals diagnostiziertes VHF*
 - a. VHF, das bisher noch nicht diagnostiziert wurde, unabhängig von der Dauer der Rhythmusstörung oder von Vorliegen und Schwere von Symptomen
2. *Paroxysmales VHF*
 - a. Endet von alleine, meist binnen 48 Stunden. VHF-Episoden, die binnen 7 Tagen zum Sinusrhythmus zurückkehren oder in diesem Zeitraum kardiovertiert werden, sollten als paroxysmal bezeichnet werden
3. *Persistierendes VHF*
 - a. VHF, das länger als 7 Tage anhält, einschließlich Episoden, die frühestens nach 7 Tagen durch medikamentöse oder elektrische Kardioversion beendet werden
4. *Langanhaltendes persistierendes VHF*
 - a. Ununterbrochenes VHF, das mindestens 1 Jahr angehalten hat, bevor die Entscheidung zu einer Rhythmus-erhaltenden Behandlung getroffen wird
5. *Permanentes VHF*
 - a. VHF, dessen Vorliegen von Patienten (und Arzt) akzeptiert wird. Definitionsgemäß werden Rhythmus-erhaltende Maßnahmen bei Patienten mit permanentem VHF nicht durchgeführt.

Nicht selten kommt es zu Übergängen innerhalb der verschiedenen Stadien und eine progressive Entwicklung vom paroxysmalen VHF hin zur permanenten Rhythmusstörung ist häufig. Dies scheint mit den zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen zusammenzuhängen, da die Arrhythmie selbst weitere strukturelle oder funktionelle Veränderungen im Vorhof hervorruft oder eine Verschlechterung einer zugrundeliegenden kardiovaskulären Grunderkrankung eintritt. (Iwasaki, Nishida et al. 2011)

2.1.4 Klinische Bedeutung von Vorhofflimmern

2.1.4.1 Risikofaktoren und kausale Faktoren für die Entstehung von Vorhofflimmern

Die steigende Prävalenz von VHF sorgte dafür, dass sich verschiedenste Studien in den letzten Jahren damit beschäftigt haben, Risikofaktoren und damit auch potentielle kausale Faktoren für die Entwicklung von VHF zu identifizieren.

Durch Untersuchungen der Framingham Heart Study konnten schon früh Risikofaktoren wie das Vorhandensein weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit, Klappenvitien und linksventrikuläre Hypertrophie, aber auch ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) und ein bestehender Diabetes mellitus benannt werden (Benjamin, Levy et al. 1994) (Schnabel, Sullivan et al. 2009) (Schnabel, Yin et al. 2015). Weitere Komorbiditäten wie eine hyperthyreote Stoffwechsellage (Selmer, Olesen et al. 2012) oder ein Schlafapnoe-Syndrom (Arias, Sanchez et al. 2007, Gami, Hodge et al. 2007, Cadby, McArdle et al. 2015) erhöhen das Risiko für die Entstehung von VHF ebenfalls. Neben all diesen Faktoren gilt weiter die Empfehlung einer gesunden Lebensweise mit Verzicht auf Nikotin- und Alkoholkonsum sowie regelmäßige sportliche Betätigung. (Gorenk Chair, Pelliccia Co-Chair et al. 2017) (Lau, Nattel et al. 2017) (Alonso, Krijthe et al. 2013) (Chamberlain, Agarwal et al. 2011) (Mukamal, Tolstrup et al. 2005, Liang, Mente et al. 2012) Untersuchungen zur Entstehung von VHF rücken auch immer mehr genetische Prädispositionen als Ursache für die Rhythmusstörung in den Vordergrund (Lubitz, Yi et al. 2009) (Weng, Lunetta et al. 2017).

Einen wichtigen neuen Forschungsansatz bei der Untersuchung der möglichen kausalen Faktoren zur Entwicklung der Rhythmusstörung bilden die microRNAs (miRNA). Ihre Funktion bei der Entstehung von VHF wird seit einigen Jahren eingehend untersucht und auch eine potentielle Möglichkeit der therapeutischen Nutzung wird diskutiert. Genauer zur Rolle der miRNA beim VHF wird in Kapitel 2.6.2 erläutert.

2.1.4.2 Symptomatik von Vorhofflimmern

VHF hat als klinisches Krankheitsbild verschiedene symptomatische Manifestationsformen. Der unregelmäßige Herzschlag verbunden mit erhöhter oder erniedrigter Herzfrequenz wird von Betroffenen oft als Herzstolpern, sog. Palpitationen wahrgenommen. Nicht selten beschreiben Patienten ein Engegefühl in der Brust, Atemnot und Kurzatmigkeit. Auch bei Patienten mit Schwindel und rezidivierenden Synkopen sollte an VHF als Ursache gedacht werden. Häufig ist es jedoch klinisch stumm und wird im Rahmen von Routineuntersuchungen beim Kardiologen festgestellt.

Zur relativen Quantifizierung der Schwere der Symptomatik verwendet man im klinischen Alltag den sog. EHRA-Score, eine Einteilung der European Heart Rhythm Society.

Bezeichnung	Bezeichnung
EHRA I	keine Symptome
EHRA II	Leichte Symptome, die normale Alltagstätigkeit ist nicht eingeschränkt
EHRA III	Schwere Symptome, die Alltagstätigkeit ist beeinträchtigt
EHRA IV	Massiv behindernde Symptome, die Alltagstätigkeit kann nicht mehr wahrgenommen werden

Tab. 2.1-1: EHRA Score, modifiziert nach der European Heart Rhythm Society

Die mit der Erkrankung einhergehende Einschränkung der Lebensqualität ist sehr ernst zu nehmen (Thrall, Lane et al. 2006), es ist bisher aber noch umstritten, ob verschiedene Therapieansätze die Lebensqualität unterschiedlich gut verbessern (Jenkins, Brodsky et al. 2005).

2.1.4.3 Komplikationen von Vorhofflimmern

Es ist jedoch nicht die starke Beeinflussung der Alltagsfähigkeit der Patienten, die VHF zu einer der bedeutendsten kardiovaskulären Erkrankungen macht. Viel mehr sind der Einfluss auf andere Erkrankungen und die möglichen Komplikationen der Grund dafür, dass diese Rhythmusstörung im Zentrum verschiedenster Forschungen steht.

Grundsätzlich ist VHF assoziiert mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität (Benjamin, Wolf et al. 1998). Dies liegt zum einen begründet in einem ca. fünffach erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse (Wolf, Abbott et al. 1991) zum anderen in der deutlich verschlechterten Prognose kardiovaskulärer Vorerkrankungen durch den Einfluss von VHF (Stewart, Hart et al. 2002). Die veränderte Hämodynamik bei VHF durch eine ineffektive Vorhofkontraktion führt zur Blutstase und es kommt zur Thrombusbildung, der sich nicht selten als Embolus im Hirn absetzt und so einen Schlaganfall auslöst. Insgesamt schätzt man, dass ca. 15% aller Schlaganfälle VHF als Ursache haben. Das attributable Risiko einen Schlaganfall zu erleiden liegt bei Patienten über 50 Jahren bei 1,5%; bei Patienten über 80 Jahre bereits bei 23.5%. Diese Zahlen sind bedeutend, wenn man bedenkt, dass die Bedeutung andere kardiovaskuläre Erkrankungen als Auslöser eines Schlaganfalls im Alter eher abnimmt (Wolf, Abbott et al. 1991). Doch nicht nur die Häufigkeit auch die Beeinträchtigung durch den Insult, sein klinisches Outcome und die Mortalität sind in Kombination mit VHF stark negativ assoziiert (Wolf, Dawber et al. 1978). Zur individuellen Risikostratifizierung für die Entwicklung eines ischämischen Insults in Folge von VHF nutzt man nach den ESC Leitlinien von 2010 den sog.

CHA₂DS₂-VASc-Score. Anhand des Risikoscores kann die Notwendigkeit einer oralen Antikoagulation zur Schlaganfallprävention abgeschätzt werden. (Camm, Kirchhof et al. 2010)

Kriterium		Punkte
Congestive heart failure (=Herzinsuffizienz)	→	1
Hypertonie	→	1
Alter > 75 Jahre	→	2
Diabetes mellitus	→	1
Stroke (= Schlaganfall)	→	2
Vaskuläre Erkrankungen (pAVK, cAVK...)	→	1
Alter > 60 Jahre	→	1
Sex category female (= Geschlecht weiblich)	→	1
Maximal		10

Tab. 2.1-2: CHA₂DS₂-VASc-Score

Ein weiterer Effekt der ineffektiven Vorhofkontraktion ist eine Verminderung des diastolischen Füllvolumens des Ventrikels um ca. ein Fünftel. Da durch die tachykarde Überleitung zusätzlich die Ventrikelkontraktion verschlechtert ist, kommt es bei insgesamt verringertem Schlagvolumen zu einer verminderten Auswurfleistung. Die veränderte Anforderung an die kardiale Pumpleistung durch VHF kann also eine Herzinsuffizienz zur Folge haben gleichzeitig kann eine bereits bestehende Herzinsuffizienz aber auch strukturelle Veränderungen am Myokard verursachen und damit eine Rhythmusstörung auslösen. (Wang, Larson et al. 2003) So spielt VHF also besonders als Teil eines kardiovaskulären Kontinuums eine bedeutende Rolle und es sind die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Erkrankungen des Herzens, die für die hohe Mortalität verantwortlich sind.

2.1.4.4 Sozioökonomische Auswirkungen von Vorhofflimmern

In Anbetracht der steigenden Prävalenz von VHF, der hohen Komplikationsrate sowie der starken negativen prognostischen Beeinflussung zugrundeliegender Herzerkrankungen wird schnell ersichtlich, welche finanziellen Belastungen die Erkrankung für das gesamte Gesundheitssystem mit sich bringt. Zahlen für Europa belegen, dass man mit bis zu 3000€ pro Patient pro Jahr für direkte Kosten der Behandlung von VHF rechnen muss (Wolowacz, Samuel et al. 2011). Neben diesen direkten Kosten durch Hospitalisierung und interventionelle bzw. medikamentöse Therapien des VHF, welche bis zu 70% der Gesamtkosten ausmachen (Ringborg, Nieuwlaat et al. 2008), müssen aber zusätzlich auch indirekte Kosten durch zum Beispiel verstärkte Pflegebedürftigkeit berechnet werden (Stewart, Murphy et al. 2004).

2.2 Physiologische Grundlagen der Erregungsausbreitung am Herzen

2.2.1 Erregungsausbreitung am Herzen

Die Herzfrequenz eines erwachsenen Menschen beträgt in Ruhe ca. 60-70 Schläge pro Minute und kann unter Belastung auf bis zu 180-200 Schläge pro Minute ansteigen.

Der Ausgangspunkt für eine rhythmische Erregung ist der Sinusknoten, der dem Herzen als primärer Schrittmacher dient. Über den Sinusknoten breitet sich die Erregung über Gap-Junctions auf die Vorhöfe aus. Die Gap-Junctions stellen dabei den Ort des geringsten Widerstandes dar, sodass eine Erregungsausbreitung von Zelle zu Zelle gewährleistet ist und das Vorhofmyokard ein funktionelles Synzytium bildet. Sind die Vorhöfe gleichmäßig erregt, trifft die Erregung auf den AV-Knoten. Der AV-Knoten dient dem Herzen als „Frequenzsieb“, so dass enorm gesteigerte Frequenzen - wie sie beispielweise im Rahmen eines VHF auftreten - aus den Vorhöfen nicht auf die Kammern weitergeleitet werden können. Über das nachfolgende His-Bündel und die beiden Tawara-Schenkel erfolgt nachfolgend die Erregung der Herzkammern.

2.2.2 Elektrophysiologische Mechanismen zur Entstehung und dem Ablauf einer physiologischen Herzaktion

Zur regelmäßigen Kontraktion des Herzens benötigt es eine kontrollierte Erregung der kardialen Muskelzellen. Hierzu können kardiale Schrittmacherzellen die Kardiomyozyten durch eigenständige Übertragung von Aktionspotentialen anregen.

Physiologisch entsteht ein Aktionspotential durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel aus depolarisierenden Einwärtsströmen und repolarisierenden Auswärtsströmen. Entlang der isolierenden Zellmembran werden Ionen durch Ionenkanäle, Austauschsysteme und Pumpen sowohl aktiv als auch passiv zwischen den einzelnen Kompartimenten hin und her transportiert. Die Zusammensetzung der Ionenkanäle sowie der Ablauf eines Aktionspotentials unterscheiden sich zwischen den Schrittmacherzellen und den Kardiomyozyten. Ebenso haben Schrittmacherzellen im Gegensatz zu den Kardiomyozyten kein stabiles Ruhemembranpotential, was unter anderem dazu beiträgt, dass eine unkontrollierte Entstehung eines Aktionspotentials an diesem Zelltyp möglich ist.

2.2.3 Pathophysiologische Aspekte

Eine Arrhythmie als eine unphysiologische Erregung des Herzmuskels kann durch eine Dysbalance verschiedenster Faktoren entstehen. Elektrophysiologisch benötigt es zur Entstehung einer Arrhythmie einerseits einen auslösenden Trigger zum anderen ein Substrat, durch das die unkoordinierte Erregung aufrechterhalten wird (Wakili, Clauss et al. 2012). Pathophysiologisch lassen sich hierbei zwei Hauptmechanismen unterteilen:

- 1.) Ektopie als eine spontane elektrische Aktivität, die aufgrund verschiedener Prozesse generiert wird (z.B. physiologisch spontane Depolarisation im Sinusknoten oder pathophysiologisch frühe Depolarisationen bei Verlängerung der Aktionspotentialdauer) und
- 2.) Kreisende Erregung, sog. Re-entry, welche durch einen stabilen Erregungskreis eine Arrhythmie initiiert und unterhält (Iwasaki, Nishida et al. 2011)

2.2.4 Atriale Ektopie

Verschiedene Studien der letzten Jahre zeigten, dass fokale atriale Ektopien auf drei verschiedenen Mechanismen basieren (Wakili, Clauss et al. 2012):

- späte Nachdepolarisationen (DAD = delayed after depolarisation)
- frühe Nachdepolarisationen (EAD = early after depolarisation)
- vermehrte Automatizität

Späte Nachdepolarisationen

Eine Veränderung in der Ionenkanalaktivität und -expression von Kalziumkanälen (u.a. L-Typ-Kalziumkanäle I_{Ca-L} /Ryanodin-Rezeptoren RyR/Sarcoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase SERCA/ Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher NCX) führt zu einer Abweichung der physiologischen Kalziumhomöostase. Eine somit pathologisch erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration in der Diastole ermöglicht das Auftreten von DADs und die dadurch verstärkte zelluläre Aktivität kann zu atrialen Ektopien führen. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig entschlüsselt, eine Theorie geht von einer Überladung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) mit Ca^{2+} aus, sodass es zu einem unkontrollierten Ausstrom der Ionen zurück ins Zellinnere kommt, was eine erneute Depolarisation auslöst. (Nattel, Burstein et al. 2008)

Frühe Nachdepolarisationen

Auch für die Entstehung von EADs werden genetisch bedingte Veränderungen der Ionenkanalexpression von L-Typ-Kalziumkanälen verantwortlich gemacht. Diese sorgen für eine Verlängerung des Aktionspotentials. Durch die längere Dauer des APs können sich temporär deaktivierte Kalziumkanäle spannungsabhängig wieder öffnen und damit in der Endphase des Aktionspotentials durch einen erneuten Ca^{2+} -Einstrom zu einer Depolarisation führen. Sie werden vor allem mit verschiedenen Long-QT-Syndromen und damit assoziiertem VHF in Verbindungen gebracht. (Wakili, Voigt et al. 2011)

Vermehrte Automtizität

Da der das Ruhemembranpotential bildende Strom I_{K1} den Schrittmacherstrom I_f überlagert, können die Schrittmacherzellen des Herzens nicht ungehemmt aktiviert werden. Eine ungewollte Automtizität in der Aktivität der Schrittmacherzellen tritt dann auf, wenn es zu einer Dysbalance zwischen diesen beiden Strömen kommt. (Wakili, Voigt et al. 2011), (Iwasaki, Nishida et al. 2011) Diese eine atriale Ektopien auslösende Automtizität wurde vor allem für atriale Tachykardien und Arrhythmien im Zuge einer Herzinsuffizienz nachgewiesen. Eine kausale Rolle der Automtizität scheint jedoch auch bei VHF naheliegend. (Nattel, Burstein et al. 2008)

2.2.4.1 Re-entry

Als Substrat, das die durch fokale Ektopien ausgelösten unkoordinierten Erregungen aufrechterhält, sieht man das sog. Re-entry an. Veränderungen im Atrium, die dieses Re-entry ermöglichen, führt man einerseits auf morphologische Umstrukturierungen (=strukturelles Remodelling) aber auch auf eine Modifikation auf zellulärer Ebene (=elektrisches Remodelling) zurück. (Wakili, Voigt et al. 2011)

Aus funktioneller, elektrophysiologischer Sicht können kreisende Erregungen dann entstehen, wenn entweder die Refraktärzeit selbst verkürzt ist oder aber die Leitungsgeschwindigkeit an sich abnimmt, es insgesamt also zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer kommt (Iwasaki, Nishida et al. 2011).

2.2.4.1.1 Strukturelles Remodelling

Als ein grundlegendes Charakteristikum des VHF und damit als Grundlage des Re-entry gilt die atriale Fibrose (siehe oben Re-entry Mechanismus). Die irreversible fibrotische Umwandlung und die Vermehrung der Interzellulärsubstanz des atrialen Gewebes bilden die Grundlage zur Aufrechterhaltung der Arrhythmogenität (= arrhythmogenes Substrat) (Wakili, Clauss et al. 2012). Kurz gesagt, entsteht atriale Fibrose dann, wenn die Aktivität und Proliferation der Fibroblasten stimuliert wird.

Dies geschieht über lokale und zirkulierende profibrotische Mediatoren (Nattel 2017). Zu diesen Mediatoren zählen unter anderem der Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Verheule, Sato et al. 2004) (Nakajima, Nakajima et al. 2000), der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Zhao, Zhao et al. 2013) sowie der Connective Tissue Growth Factor (CTGF) (Xiao, Fuchs et al. 2004), welche durch Phosphorylierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) eine Fibrosierung auslösen (Travers, Kamal et al. 2016) (Burstein and Nattel 2008).

Auch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems durch Aktivierung des Typ I Rezeptors durch Angiotensin II spielt eine Rolle in der Fibrosierung des atrialen Gewebes. Über andere Signalkaskaden aktivieren Angiotensin II und auch PDGF die sog. Janus-Kinasen (JAK) sowie deren Aktivierungsprodukte Signal transducers and activators of transcription STAT (Chen, Surinkaew et al. 2017).

Ebenso führt oxidativer Stress durch eine Ausschüttung von NADH durch Angiotensin II sowie TGF- β 1 zu einer Aktivierung von MAPK sowie JAK (Nattel, Burstein et al. 2008) (Youn, Zhang et al. 2013). Insgesamt können auch inflammatorische Zytokine und Zellmediatoren all diese Rezeptoren aktivieren (Nattel 2017). Durch eine positive Feedbackreaktion kann es ebenso vorkommen, dass bereits aktivierte Fibroblasten weitere profibrotische Mediatoren ausschütten. Experimente konnten außerdem zeigen, dass auch mechanischer Stress (Carver and Goldsmith 2013) im Rahmen einer funktionellen Mitralklappeninsuffizienz sowie einer linksatrialen Dilatation eine Ausschüttung profibrotischer Stimuli zur Folge haben kann .

2.2.4.1.2 Funktionelles Remodelling

Funktionelles Remodelling umfasst primär die elektrischen Veränderungen, die die Entstehung eines Re-entry begünstigen. Dies sind zumeist Veränderungen auf zellulärer Ebene, vor allem Abweichungen der Ionenkanalleitfähigkeit oder ihrer Expression, die eine Verkürzung des Aktionspotentials zur Folge haben oder auch die Leitungsgeschwindigkeit selbst verringern.

Hier spielt wiederum die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Kalziumionen eine Rolle. Durch die bei VHF erhöhte Flimmerfrequenz steigt die Ca^{2+} -Konzentration intrazellulär stetig an. Der Überladung des Intrazellulärraums mit den positiven Ionen versuchen Kardiomyozyten mit einer Reduktion des Kalziumeinstroms durch den plateaubildenden L-Typ-Kalziumkanal $I_{Ca^{2+}, L}$ entgegenzuwirken. Somit verkürzt sich die Plateauphase des Aktionspotentials und daher auch seine Gesamtdauer. Gleichzeitig werden zum Ausgleich des Potentials vermehrt positive Kaliumionen über den repolarisierenden Kaliumstrom I_{K1} aus der Zelle gefördert. Dieser verstärkte repolarisierende Strom führt durch eine schnellere Repolarisation zur weiteren Verkürzung des Aktionspotentials und begünstigt somit eine kreisende Erregung. (Wakili, Clauss et al. 2012)

Eine Reduktion der Leitungsgeschwindigkeit kann u.a. durch eine Reduzierung des depolarisierenden Natriumstroms oder auch durch Connexin-Dysfunktion (Iwasaki, Nishida et al. 2011). Auch wenn bisher über ein Remodeling der Gap Junctions noch wenig bekannt ist, geht man dennoch davon aus, dass Mutationen des Connexin-40 eine Verzögerung in der Impulsweiterleitung zur Folge haben, weshalb diese Mutation auch als prädisponierend für die Entstehung von VHF angesehen wird (Nattel, Burstein et al. 2008).

Insgesamt wird dem elektrischen Remodeling eine wichtige Bedeutung für die klinische Präsentation von VHF zugeschrieben. So geht man davon aus, dass ein Rezidiv der Erkrankung nach einer Kardioversion, eine Resistenz von persistierenden Formen gegenüber der Medikation sowie die Konversion der paroxysmalen Form zur persistierenden Variante mit den Modifikationen der elektrischen Impulsgebung zusammenhängen. (Iwasaki, Nishida et al. 2011)

2.3 Diagnostik von VHF

Primär umfasst die Diagnostik des VHF natürlich die Feststellung des Vorhandenseins der Rhythmusstörung an sich. Um im Anschluss die bestmögliche Therapie zu wählen, sollte jedoch zusätzlich untersucht werden, ob Begleiterkrankungen vorliegen, die das Auftreten von VHF auslösen oder beeinflussen können. Im Rahmen einer individualisierten Therapie sollten auch all jene Parameter ermittelt werden, welche als Prognosemarker Hinweise darauf geben, wie erfolgsversprechend eine mögliche Therapie gerade in Bezug auf die invasive Ablationstherapie zu sein scheint.

2.3.1 Elektrokardiogramm

Der unregelmäßige, meist zu schnelle Puls durch VHF kann zwar oft schon in der körperlichen Untersuchung durch Palpation und Auskultation festgestellt werden. Als Goldstandard in der Diagnostik von VHF gilt jedoch das EKG. Die elektrokardiografischen Kriterien für die Diagnose VHF sind laut Leitlinien der ESC (Camm, Kirchhof et al. 2010):

- (1) absolut irreguläre RR-Intervalle ohne repetitive Muster
- (2) nicht klar abgrenzbare oder gänzlich fehlende P-Wellen, meist in Ableitung V1
- (3) unregelmäßige Zykluslänge unter >200ms

Die Schwierigkeit in der Detektion von VHF liegt darin, auch paroxysmales VHF aufzuzeichnen. Hierfür verwendet man häufig Langzeit-EKGs über 24h oder einen Event-Recorder. Die längere Aufzeichnungsspanne des Herzschlags ermöglicht es so auch kurzzeitige oder sich selbst limitierende Sequenzen von VHF zu detektieren.

2.3.2 Langzeit-Elektrokardiogramm und Event-Rekorder

In Anbetracht der Tatsache, dass VHF häufig nur kurzzeitig auftritt (siehe Definition von paroxysmalem VHF), muss es Möglichkeiten geben, diese selteneren Episoden der Rhythmusstörung aufzuzeichnen und zu dokumentieren. Eine Möglichkeit stellt das Langzeit-EKG dar, welches den Herzrhythmus der Patienten über 24h protokolliert. Ein Vorteil dieser Untersuchung ist es, dass nicht nur Flimmerepisoden aufgenommen werden, sondern auch

weitere Irregularitäten des Herzrhythmus des Patienten, wie zum Beispiel Vorhofflattern oder ventrikuläre Extrasystolie.

2.4 Therapie von Vorhofflimmern

Das Konzept der Therapie des VHF basiert zum einen auf der eigentlichen Behandlung der Rhythmusstörung zum anderen auf der Vermeidung eventueller Komplikationen durch Thrombembolien sowie der Behandlung bestehender Begleiterkrankungen. (Camm, Kirchhof et al. 2010)

Zur primären Therapie des VHF stehen prinzipiell zwei Strategien zur Auswahl:

- (1) Frequenzkontrolle
- (2) Rhythmuskontrolle

2.4.1 Frequenzkontrolle

Die Frequenzkontrolle bezeichnet einen Ansatz, bei dem darauf verzichtet wird einen Sinusrhythmus herzustellen. Patienten mit VHF leiden zumeist unter den Palpationen durch eine Kammerfrequenz von >150 Schlägen pro Minute. Ziel dieser Therapievariante ist es daher, ein normofrequentes VHF mit einer Ruhefrequenz von < 110 Schlägen pro Minute einzustellen. Die RACE II Studie von 2010 zeigte, dass eine strengere Einstellung durch Ruhefrequenz < 80 Schläge pro Minute keine signifikante Verringerung der Anzahl der Hospitalisierungen aufgrund einer entstehenden Herzinsuffizienz, Blutungen, Thrombembolien, lebensbedrohliche Arrhythmien oder einem kardiovaskulären Tod bewirke (Van Gelder, Groenveld et al. 2010). Daher gilt auch in den Leitlinien von 2016, dass eine strenge Frequenzkontrolle mit < 80 Schlägen pro Minute nur bei weiter symptomatischen Patienten erwogen werden sollte. (Kirchhof, Benussi et al. 2016) (Groenveld, Crijns et al. 2011).

Physiologisch ist es die Funktion des AV-Knotens die Vorhofkontraktion auf den Ventrikel zu übertragen. Um die bei VHF bestehende fehlerhafte schnelle Vorhofaktivität mit bis zu 400 Schlägen pro Minute nicht auf den Ventrikel überleiten zu lassen, muss diese Überleitung gehemmt werden. Medikamentös erfolgt dies durch Hemmung der Überleitung am AV-Knoten durch Beta-Blocker, Digitalispräparate oder Kalziumantagonisten. Sollte dies nicht erfolgreich sein, kann man als letzten Therapieschritt eine Ablation des AV-Knoten vornehmen, was jedoch aufgrund der Irreversibilität einen palliativen Ansatz darstellt. (Kirchhof, Benussi et al. 2016)

Medikation	Dosierung in Akutsituation	Dosierung zur Langzeiteinnahme	Nebenwirkungen (NW)	Kommentar
Beta-Blocker				
Bisoprolol	-	1,25 - 20mg pro Tag (Einmalgabe oder geteilt)		Bronchospasmus ist selten. Bei Asthma werden Beta-I-selektive Blocker empfohlen (kein Carvedilol). Kontraindiziert bei akuter Herzinsuffizienz und bei schwerem Bronchospasmus in der Anamnese
Carvedilol	-	3,125 - 50mg zweimal täglich	Häufige NW: Lethargie, Kopfschmerzen, periphere Ödeme, Symptome im Bereich des oberen Respirationstrakts, gastrointestinales Unwohlsein.	
Metoprolol	2,5 - 10mg i.v. Bolus (Wiederholungen möglich)	100-200mg pro Tag	Nebeneffekte: Bradykardien, AV-Block und Hypotension	
Nebivolol	-	2.5 - 10mg ro Tag (Einmalgabe oder geteilt)		
Esmolol	0,5mg/kg i.v. Bolus über 1min, danach 0,05 - 0,25mg/kgKG/min			
Calciumkanal-Blocker				
Diltiazem	15 - 25mg i.v. Bolus (Wiederholungen möglich)	60mg 3x pro Tag, max. 360mg pro Tag	Häufige NW: Unwohlsein, Lethargie, Kopfschmerzen, Flush, gastrointestinales Unwohlsein, Ödeme.	Vorsicht bei Kombination mit Beta-Blocker. Dosisreduktion bei Leber- und Niereninsuffizien z. Kontraindiziert bei Herzinsuffizienz mit EF < 40%
Verapamil	2,5 - 10mg i.v. Bolus (Wiederholungen möglich)	40 - 120mg 3x pro Tag, max. 120 - 480mg pro Tag	Nebeneffekte: Bradykardie, AV-Block und Hypotension (eher bei Verapamil)	
Herzglykoside				
Digoxin	0,5mg i.v. Bolus (Wiederholungen möglich)	0,0625 - 0,25mg pro Tag	Häufige NW: Unwohlsein, gastrointestinales Unwohlsein, Sehstörungen, Kopfschmerz, Hautausschlag. Bei Überdosierung (> 2 ng/mL) wirkt Digoxin pro-arrhythmisch und kann Herzversagen verschlechtern, vor allem bei Hypokaliämie	Hohe Plasmalevel sind assoziiert mit erhöhter Mortalität. Disosreduktion bei Niereninsuffizien z. Kontraindiziert bei Patienten mit akzessorischen Leitungsbahnen, ventrikulärer Tachykardie und HOCM
Digitoxin	0,4 - 0,6mg i.v. Bolus	0,05 - 0,3mg pro Tag		
Spezielle Indikation				
Amiodaron	300mg i.v. in 250ml 5% dextrose über 30-60min	200mg pro Tag	Häufige NW: Hypotension, Bradykardie, Übelkeit, QT-Zeit-Verlängerung, Lungentoxizität, Hautveränderungen, UV-Empfindlichkeit, Schilddrüsendysfunktion, Corneaablagerungen	Empfohlen als additive Therapie, wenn Kombinationstherapie der oben genannten Medikamente frustan verbleibt

Tab. 2.4-1: Medikamente zur Frequenzkontrolle bei VHF, modifiziert nach ESC-Leitlinien (Kirchhof, Benussi et al. 2016)

2.4.2 Rhythmuskontrolle

Das Ziel der Rhythmuskontrolle ist es, den Sinusrhythmus wiederherzustellen und aufrechtzuerhalten. Auch wenn die Stabilisierung des Sinusrhythmus aus physiologischer Sicht dringlich erscheint, so fehlt doch die klinische Evidenz dafür, dass sich eine entscheidende Verbesserung der Prognose der Erkrankung unter reiner Rhythmuskontrolle einstellt (Wyse, Waldo et al. 2002). Deshalb wird die Rhythmuskontrolle meist nur bei Patienten mit entsprechender Symptomatik durchgeführt (EHRA-Score > 1) bzw. bei Symptompersistenz trotz Frequenzkontrolle.

2.4.2.1 Akute Rhythmuskontrolle

Die akute Rhythmuskontrolle kann durch medikamentöse oder elektrische Kardioversion erfolgen. Voraussetzung für diesen Therapieansatz ist entweder eine zeitlich ausreichende Antikoagulation mit Cumarin-Derivaten (Beginn mind. 3 Wochen vor elektiver Kardioversion) oder ein vorheriger Thrombenausschluss durch eine transösophageale Echokardiographie (TEE). So soll verhindert werden, dass sich eventuell im linken Atrium befindende Thromben ausgeschwemmt werden.

Die elektrische Kardioversion erfolgt durch gezielte Defibrillation. Hierbei wird die Herzaktion über die transthorakale Applikation eines biphasischen Gleichstroms durch den Defibrillator synchronisiert.

Für die medikamentöse Rhythmuskontrolle ist Amiodaron das Medikament der Wahl, da es auch bei Patienten mit zusätzlichen strukturellen Herzerkrankungen gegeben werden kann. Es stehen jedoch auch einige andere Wirkstoffe zur Verfügung, die unter Berücksichtigung eventueller Kontraindikationen individuell ausgewählt werden. (siehe Tabelle 2.4-3)

Klassen der Antiarrhythmika		
Klasse-Ic-Antiarrhythmika	Natriumkanal-Blocker	Flecainid
		Propafenon
Klasse-III-Antiarrhythmika	Kaliumkanal-Blocker	Amiodaron
		Sotalol
		Dronedaron

Tab. 2.4-2: Antiarrhythmika

2.4.2.2 Langfristige Rhythmuskontrolle

Langfristig kann der Rhythmus entweder medikamentös oder interventionell stabilisiert werden.

Zur pharmakologischen Therapie werden auch hier Klasse-Ic- und Klasse-III-Antiarrhythmika verwendet. Bei Patienten ohne kardiale Grunderkrankung gelten Beta-Blocker oder Dronedaron als Medikamente der ersten Wahl. Bei einer zusätzlichen kardialen Erkrankung, wie z.B. Herzinsuffizienz > NYHA I, kommt Amiodaron zum Einsatz, das aktuell als effektivstes Antiarrhythmikum gilt, da es in prospektiven Studien keine Mortalitätszunahme zeigte. Interventionell ist die Katheterablation Therapie der Wahl zur langfristigen Rhythmuskontrolle. Die Grundlage für diese katheterbasierte Therapie von VHF schuf Haissaguerre, welcher 1998 erstmalig elektrische Trigger aus den Pulmonalvenen als ursächlich für die Entstehung von VHF beschrieb (Haissaguerre, Jais et al. 1998).

Als mittlerweile eigenständiges und komplexes Therapiekonzept in der Therapie des VHF wird die Ablation im Kapitel 2.4.2.3 ausführlich beschrieben.

2.4.2.3 Interventionelle Therapie mittels Ablation

Eine Ablation ist ein kathetergestütztes Verfahren, bei dem ein Katheter über die Vena femoralis in der Leiste durch die Vena cava inferior bis in den rechten Vorhof geschoben und unter Perforation des Vorhofseptums im linken Vorhof – dem Ort der Entstehung von VHF – platziert wird. Mittels eines Messkatheters wird ein sog. Mapping der Gefäßwände durchgeführt, wodurch eine dreidimensionale Rekonstruktion der vier Pulmonalvenen (PV) erstellt wird. Nach Darstellung dieser kann die vorhofnahe Muskulatur der Pulmonalvenen verödet werden, sodass eine myoelektrische Impulsweiterleitung aus den Pulmonalvenen in die Vorhöfe verhindert wird, was eine dauerhafte Isolation des ektopen Areals zur Folge hat. Vor einer geplanten Katheterablation sollte unabhängig vom individuellen CHA₂DS₂-VASc-Score und dem aktuellen bestehenden Rhythmus eine effektive Antikoagulation mittels DOAK oder Vitamin-K-Antagonisten vorgenommen werden (Cappato, Marchlinski et al. 2015) (Di Biase, Burkhardt et al. 2014). Um peri-interventionelle thrombembolische Ereignisse zu verhindern, sollte zudem eine kontinuierliche i.v.-Gabe von nicht-fraktioniertem Heparin erfolgen.

Wie jeder invasive Eingriff birgt auch die Katheterablation Risiken, die mit dem Patienten zuvor besprochen werden müssen. Insgesamt treten bei ca. 4.5% der Patienten schwere Komplikationen wie eine Herzbeutelamponade oder eine transiente ischämische Attacke auf. Es kommt jedoch nur in sehr seltenen Fällen zum intraprozeduralen Versterben des Patienten (< 0.2%). (Cappato, Calkins et al. 2010)

Grundsätzlich stehen zwei verschiedene Ablationsverfahren zur Verfügung: die Radiofrequenzablation und die Kryoablation.

Bei der Radiofrequenzablation werden mit einem Wechselstrom mit einer Frequenz von 300 bis 750 kHz (Radiofrequenz) punktuell Gewebsläsionen im Myokard gesetzt, durch die eine Weiterleitung von Erregungen nicht mehr möglich ist. Die Kryoablation hingegen nutzt flüssigen Stickstoff, der das Gewebe lokal durch Temperaturen von bis zu -75 °C schockgefriert und so zu einer intra- und extrazellulären Eiskristallbildung führt.

Auch wenn die Radiofrequenzablation bisher am häufigsten eingesetzt wird, gewinnt auch die Kryoablation aufgrund guter Evidenzlage immer mehr an Bedeutung (Kuck, Brugada et al. 2016).

Eine aktuelle Vergleichsstudie, die die unterschiedliche Effektivität der Ablation anhand des verwendeten Verfahrens untersuchte, ist die FIRE AND ICE Studie von 2016.

In die multizentrische Studie wurden insgesamt 762 Patienten mit therapierefraktärem symptomatischem paroxysmalem VHF eingeschlossen. 374 Patienten wurden durch eine Ablation mittels Kryoballon interveniert, 376 Patienten hingegen erfuhren eine Radiofrequenzablation. Primärer Endpunkt der Untersuchung war das Auftreten eines Rezidivs innerhalb von 90 Tagen definiert als ein wiederkehrendes VHF, ein Vorhofflattern, der Bedarf an Antiarrhythmika oder einer erneuten Ablation. Das Follow-up wurde insgesamt über 1.5 Jahre weitergeführt.

Auch wenn beide Verfahren ihre Vor- und Nachteile zeigten, so differierten sie in der Erfolgsrate insgesamt nicht signifikant. Bei 35.9 % der Patienten mit Radiofrequenzablation und 34.6% mit Kryoablation mussten weitere therapeutische Schritte aufgrund eines erneuten Rezidivs eingeleitet werden. Als primären Sicherheitsendpunkt waren Komplikationen wie das Eintreten des Todes oder ein Insult definiert. Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied in beiden Verfahren (12.8 % bei Radiofrequenzablation und 10.2% bei Kryoablation). (Kuck, Brugada et al. 2016)

2.4.3 Embolieprophylaxe durch Antikoagulation

Aufgrund des bis zu fünffach erhöhten Risikos für das Auftreten eines Schlagabfalls (Wolf, Mitchell et al. 1998) spielt die medikamentöse Hemmung der Blutgerinnung bei Patienten mit VHF eine wichtige Rolle als Teil eines Gesamttherapiekonzepts. Die Prognose der Patienten ist im Wesentlichen determiniert durch den Einsatz einer suffizienten Antikoagulation.

Ob bei einem Patienten eine Antikoagulation indiziert ist, wird anhand des individuell berechneten CHA₂-DS₂-VASc-Scores (s. Tab. 2.4-3) evaluiert. Bei einem Score von ≥ 2 Punkten bei Männern bzw. ≥ 3 Punkten bei Frauen ist eine medikamentöse Thrombembolieprophylaxe zwingend erforderlich. Hingegen ist bei einem Scoringwert von 0 bzw. einem Punkt durch weibliches Geschlecht keine orale Antikoagulation indiziert. Ein Graubereich stellt ein Score von 1 Punkt bei Männern und 2 Punkten bei Frauen dar, bei dem gemäß den Leitlinien eine orale Antikoagulation eingeleitet werden kann. Gerade in diesen

Fällen ist es hilfreich eine Berechnung des individuellen Blutungsrisikos des Patienten durchzuführen, beispielweise anhand des im klinischen Alltag verbreiteten HAS-BLED-Scores, um so das Risiko einer Blutung dem einer Thrombembolie gegenüberzustellen.

Gleichzeitig sollte aber bei einem erhöhten CHA₂-DS₂-VASc-Score sowie einem hohen Wert im HAS-BLED-Score eine Antikoagulation dennoch nicht unterlassen werden (January, Wann et al. 2014). In diesen Fällen dient eine Gegenüberstellung lediglich der Maßnahme einer genaueren Identifikation von individuellen Risikofaktoren für eine Blutungskomplikation, sodass es diese Faktoren daraufhin zu minimieren gilt.

2.5 Stratifizierung des Therapieerfolgs nach Katheterablation

Der Erfolg (Outcome) bzw. die Wirksamkeit einer Katheterablation wird an der Rezidivfreiheit von VHF des Patienten über die Zeit bemessen. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2013, welche 6167 Patienten aus 19 verschiedenen Studien berücksichtigte, zeigte, dass sich die Erfolgsraten gemessen am Outcome nach 3 Jahren durch mehrmalige Interventionen steigern lässt. Dies veranschaulicht, dass eine Rezidivfreiheit über diesen Zeitraum nur bei einem Bruchteil der Patienten nach einer einmaligen Intervention erreicht werden kann. Nach der ersten Ablation erreichte man bei 53.1% (95% CI 46.2% bis 60.0%) der Patienten eine Rezidivfreiheit, wobei sich ein signifikanter Unterschied in der Rezidivfreiheit nach Ablation zwischen paroxysmalen und nicht paroxysmalen Formen des VHF zeigt (54.1% vs. 41.8%). Der Langzeiterfolg nach multiplen Ablationen liegt deutlich höher mit 79.8% (95% CI 75.0% bis 83.8%). (Ganesan, Shipp et al. 2013)

Im Zuge der Entwicklung einer Patienten-orientierteren Medizin und einer individualisierten, personalisierten Therapie gilt es vor der Einleitung einer therapeutischen Maßnahme zu eruieren, wie erfolgsversprechend diese für den Patienten im Einzelnen sein wird, vor allem bei einer Therapie mit den oben aufgeführten moderaten Erfolgsaussichten.

Im Kontext für eine Erfolgsstratifizierung der Ablationstherapie gelten als generell anerkannte Parameter die LA-Größe sowie das Vorliegen eines persistierenden VHF im Vergleich zu einem paroxysmalen VHF. Aber auch das Alter des Patienten oder eine zusätzlich bestehende Herzinsuffizienz scheinen eine Rolle zu spielen. Aktuelle Studien untersuchen zusätzlich, ob sich nicht auch über die Ausprägung der atrialen Fibrose als ein strukturelles Charakteristikum des VHF der Ablationserfolg abschätzen lässt. Eine weitere diagnostische Möglichkeit zur Therapiestratifizierung scheint sich in elektrokardiographischen Parametern zu ergeben (Deng, Bai et al. 2017). Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelten sich Berechnungsscores zur Einschätzung des Rezidivrisikos. Die beiden bereits etablierten Scores CHADS₂ und CHA₂DS₂-VASc zeigten sich hierbei als moderate Hilfsmittel. (Letsas, Efremidis et al. 2014) (Kornej, Hindricks et al. 2014) Eine signifikant bessere Risikoevaluation ($p < 0.001$) ermöglicht der APPLE-Score, bestehend aus den Parametern Alter > 65 Jahre,

persistierendes VHF, eingeschränkte eGFR ($<60\text{ml/min/1.73 m}^2$), linksatrialer Diameter $\geq 43\text{mm}$, linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) $<50\%$. Patienten mit einem APPLE-Score von ≥ 3 hatten eine Rezidivrate von 52%, was verglichen mit einem APPLE-Score von 0 eine 4,7fache Risikoerhöhung bedeutet. Allein aufgrund seiner einfachen Berechnung basierend auf validierten, klar definierten Parametern, die bereits mit Vorhofflimmerrezidiven in Verbindung gebracht wurden, gilt der APPLE Score als generell anwendbar. (Kornej, Hindricks et al. 2015)

Die Form des VHF, an welcher die Patienten leiden, scheint ebenfalls ein wichtiger Prädiktor für die Erfolgsrate nach Ablationstherapie zu sein. Hier zeigt sich, dass die persistierende Form mit einer höheren Rezidivquote vergesellschaftet ist. In einer Untersuchung von 385 Patienten mit sowohl paroxysmalem sowie persistierendem VHF zeigte sich, dass Rezidive (zwischen 3 Monaten und einem Jahr nach Ablation) signifikant häufiger bei nicht-paroxysmalem VHF im Vergleich zu der paroxysmalen Form auftraten (56% vs. 39%, $p=0.0001$). Außerdem zeigte die multivariate Analyse des gleichen Kollektivs, dass neben der Form des VHF auch eine bestehende arterielle Hypertonie sowie ein zuvor frustraner Versuch einer medikamentösen antiarrhythmischen Therapie einen Prädiktor für ein Rezidiv darstellten. (Khaykin, Oosthuizen et al. 2011)

Eine Vergrößerung des linken Atriums ist eng assoziiert mit dem Auftreten von VHF, weshalb es kontrovers diskutiert wurde, ob diese nicht auch ein wichtiger Prädiktor für ein Rezidiv des VHF nach Ablationstherapie sein könnte. Insgesamt ergab eine aktuelle Metaanalyse eine deutliche Assoziation. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Rezidivrisikos durch einen dilatierten LA, sodass der LA Diameter als singulärer Prädiktor eine entscheidende Rolle spielt. (Zhuang, Wang et al. 2012) Erste Hinweise darauf ergab schon die groß angelegte Atrial Fibrillation Follow-Up Investigation of Rhythm Management (= AFFIRM) Studie von 2005. Sie untersuchte, ob es eine Assoziation zwischen einem vergrößerten Atrium und einem Vorhofflimmerrezidiv nach medikamentöser antiarrhythmischer Therapie gibt. Hierfür wurden 2334 Patienten eingeschlossen, wovon 726 (31%) eine Atriumgröße von $> 4.5\text{ cm}$ vorwiesen. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein vergrößertes Atrium signifikant mehr Vorhofflimmerrezidive zur Folge hatte. (Olshansky, Heller et al. 2005) Aber auch in Zusammenhang mit einer Ablationstherapie konnte nachgewiesen werden, dass eine LA Vergrößerung ein schlechteres Outcome bedingt. Die Arbeitsgruppe um Miyazaki et al. bestätigte, dass die LA Volumengröße ein unabhängiger Prädiktor eines Rezidivs nach PVI darstellt. Sie gingen sogar so weit zu sagen, dass jeder Millimeter Vergrößerung des LA Diameters einen Anstieg der Rezidivrate um 7.2% zur Folge hat ($p = 0.0007$). (Miyazaki, Kuwahara et al. 2011) Eine weiterer interessanter Zusammenhang ergab sich bei einer detaillierteren Untersuchung der Vernarbung des linken Atriums und einer daraus folgenden

Vergrößerung des Atriums. Verma et al. wiesen nach, dass dies ebenfalls eine signifikant höhere Rezidivrate nach sich zieht (57% vs. 19%, $p = 0.003$). (Verma, Wazni et al. 2005)
Ältere Patienten weisen im allgemeinen häufiger zusätzliche Komorbiditäten auf und befinden sich zumeist in einem fortgeschrittenerem Stadium des VHF. Es ist daher wenig überraschend, dass sich in einer Analyse eines 5-Jahres-Follow-Ups nach Katheterablation ein höheres Patientenalter als negativer Einfluss auf den Outcome erweist (Bunch, May et al. 2016).

2.6 microRNA und ihre mögliche Bedeutung als Biomarker bei Vorhofflimmern

2.6.1 Synthese von microRNA

Bei microRNA (miRNA) handelt es sich um ca. 20-25 Nukleotide lange nicht-kodierende RNA-Moleküle, die eine bedeutende Rolle in der Regulation der Proteinbiosynthese spielen (Claus, Sinner et al. 2015).

Durch gezielte Bindung an die komplementären 3'-UTR-Sequenzen der jeweiligen Ziel-messengerRNA (mRNA) können miRNA als Feinregulatoren direkt in die post-transkriptionalen Prozesse eingreifen. Funktionell gesehen wirken miRNA dabei inhibierend und unterbinden die Umschreibung der mRNA zum Protein, wodurch die Expression des betroffenen Zielproteins reduziert wird (Wakili, Claus et al. 2012). Die Transkription der reifen miRNA aus dem Genom ist ein komplexer Syntheseprozess, dessen einzelne Syntheseschritte sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma der Zelle stattfinden (sog. Kompartimentierung) (Lee, Jeon et al. 2002). Im Zellkern beginnend bildet in einem ersten Schritt eine RNA-Polymerase (RNA-Polymerase II/III) die sog. pri-miRNA mit ca. 1000 Basenpaaren (bp) (Lee, Jeon et al. 2002) (Lee, Kim et al. 2004). Durch den sog. Mikroprozessorkomplex, bestehend aus dem RNase-III-Enzym Drosha und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR-8 (DiGeorge syndrome critical region 8) als Kofaktor (Lee, Ahn et al. 2003) (Bartel 2004), wird die ca. 70 bp lange precursor-miRNA (pre-miRNA) prozessiert (Lee, Jeon et al. 2002) (Zeng and Cullen 2003). Über die Kernporen in der Zellkernmembran wird über Exportin-5 und den Kofaktor Ran-GTP die pre-miRNA aktiv ausgeschleust und ins Cytoplasma exportiert (Yi, Qin et al. 2003) (Lund, Guttinger et al. 2004) (Melo, Moutinho et al. 2010) (Bohnsack, Czaplinski et al. 2004). Dort wird die pre-miRNA von dem RNase-III-Enzym Dicer durch die Abspaltung der terminalen Haarnadelschleife zunächst in 17-24 bp lange Doppelstrang-miRNA geschnitten (Ketting, Fischer et al. 2001) (Grishok, Pasquinelli et al. 2001, Hutvagner, McLachlan et al. 2001). Die Kofaktoren TRBP (TAR RNA binding protein) und PACT (PKR activation protein) sorgen danach für die Entwindung der Doppelhelix und die Trennung der ds-miRNA in Einzelstränge, sodass eine reife miRNA mit einem 5'-Ende entsteht. Die Bindungsspezifität einer miRNA hängt ab von der ca. 7 Nukleotid langen komplementären Basenabfolge am 5'-Ende, das korrespondiert mit dem 3'-untranslatierten Ende der mRNA (Divakaran and Mann 2008). Diese reife miRNA wird in den sog. RISC-

Komplex (RNA-induced silencing complex) aufgenommen (Hammond, Bernstein et al. 2000) (Martinez, Patkaniowska et al. 2002). Dieser miRNA-RISC-Komplex bestehend aus TRBP und Argonaut-Proteinen Ago1,2,3 und 4 kann die komplementäre Ziel-mRNA auf zwei Arten regulieren (Gregory, Chendrimada et al. 2005) (Wang, Noland et al. 2009). Zum einen kann bei teilweiser Übereinstimmung die weitere Translation der mRNA gehemmt werden. Zusätzlich kann bei hoher Komplementarität der Abbau der mRNA eingeleitet werden (Hutvagner 2005) (Bartel 2009). Neben dem Grad der Übereinstimmung spielt dabei auch der Einfluss von RNA-Bindeproteinen der Argonaut-Familie eine wichtige Rolle (Bartel 2004).

2.6.2 Rolle der miRNA in der Pathophysiologie von Vorhofflimmern

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits dargestellt wurde, spielt für die Entwicklung von VHF das atriale Remodeling eine bedeutende Rolle. Verschiedenste Untersuchungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass miRNA aufgrund ihrer Fähigkeit die Genexpression zu regulieren sowohl auf strukturelle als auch auf elektrische Modifikationen im Atrium einen potentiellen Einfluss haben (Divakaran and Mann 2008).

Eine der wichtigsten kardialen miRNA stellt die microRNA-1 (miR-1) dar, welche als muskelspezifische miRNA hauptsächlich in kardialen und Skelettmuskelzellen exprimiert wird (Jia, Zheng et al. 2013).

Verschiedenste Untersuchungen konnten zeigen, dass sie über unterschiedliche Regulierungsmechanismen Einfluss auf die elektrischen Leitungseigenschaften des Myokards nimmt (Wakili, Clauss et al. 2012).

Die miR-1 reguliert die mRNA des Genes GJA1, welches für den Gap Junction Channel Connexin-43 codiert und somit die Erregungsweiterleitung durch direkte Zell-zu-Zell-Kommunikation im Atrium steuert. Eine Überexpression von miR-1 führt zu einer reduzierten Expression des Connexin-43 und somit zu einer Verzögerung in der atrialen Erregungsausbreitung (Vicenczova, Szeiffova Bacova et al. 2016) (Yang, Lin et al. 2007).

Gleichzeitig supprimiert die miR-1 durch Down-Regulation das Gen KCNJ2, welches das Protein Kir2.1, eine Untereinheit des I_{K1} codiert. Somit kommt es zu einer Verlängerung der Repolarisation. Girmatsion et al. konnte zeigen, dass die miR-1 in atrialem Gewebe von Patienten mit persistierendem VHF signifikant reduziert ist und somit eine erhöhte Expression von Kir2.1 und damit eine erhöhte Expression des I_{K1} bedingt. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe in ihren ex vivo-Experimenten zeigen, dass durch tachykarde Stimulation eine miR-1-Reduktion und damit eine höhere Kir2.1-Expression ausgelöst werden kann (Girmatsion, Biliczki et al. 2009).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Jia et al., dass atriales Tachypacing eine erhöhte miR-1 Konzentration zur Folge hat. Als miR-1 Zielgene identifizierte die Arbeitsgruppe KCNE1 und KCNB2, die für den Kaliumkanal I_{Ks} codieren. Ihren Ergebnissen zufolge kommt es durch

die vermehrte miR-1 Konzentration zu einer vermehrten Expression von I_{Ks} und damit zu einer Verlängerung der Repolarisation (Jia, Zheng et al. 2013).

Durch eine Veränderung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration in kardialen Myozyten durch miR-1 kommt es zu vermehrten späten Nachdepolarisationen. Den Ergebnissen von Terentyev et al. zufolge bedingt miR-1 durch Inhibition der Translation der $B56\alpha$ -Untereinheit der Protein-Phosphatase PP2A eine Hyperphosphorylierung des Ryanodinrezeptors RyR2 durch Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen. Die Fehlfunktion des Ryanodinrezeptors RyR2 führt zu einem ungeordneten Fluss von Ca^{2+} -Ionen und manifestiert sich als spontane extrasystolische Ca^{2+} -Ausschüttungen. Dies hat pro-arrhythmogene Auswirkungen und führt gehäuft zu späten Nachdepolarisationen als Trigger für Arrhythmien wie das VHF (Terentyev, Belevych et al. 2009).

Die miR-21, deren Funktion vor allem als pro-onkogene miRNA in verschiedenen Gewebetumoren (Selcuklu, Donoghue et al. 2009) (Krichevsky and Gabriely 2009) oder auch als pro-fibrotische miRNA bei pulmonaler Fibrose untersucht wurde (Liu, Friggeri et al. 2010), ist aber auch in allen Typen der kardialen Zellen, d.h. kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten überexprimiert. (Cheng and Zhang 2010)

Funktionell spielt die miR-21 sowohl in der Proliferation als auch dem Zelltod von Gefäßmuskelzellen sowie Kardiomyozyten eine Rolle. In Zusammenhang mit der Entstehung des VHF steht jedoch vor allem die pro-fibrotische Funktion der miR-21 im Vordergrund (Cheng and Zhang 2010). Entsprechend dieser Funktion scheint es sehr passend, dass eine Expression der miR-21 zwar in verschiedenen kardialen Zelltypen vorherrscht, die Expression dieser miRNA in Fibroblasten jedoch ca. viermal höher zu sein scheint als in Kardiomyozyten (Chen, Wakili et al. 2014). So reguliert die miR-21 in diesen Zellen über den ERK-MAP-Kinase Signalweg durch Inhibition des Gens SPRY1 codierend für das Protein Sprouty-homologue-1 (Spry-1) deren Fibrosierungsrate (Thum, Gross et al. 2008). Spry-1 gilt als Antagonist des Fibroblast growth factors und verhindert physiologisch fibrotische Umbauprozesse, so dass es durch vermehrte Aktivität der miR-21 konsekutiv zu vermehrter Fibrosierung kommt (Cardin, Guasch et al. 2012). Zusätzlich erbrachte die Arbeitsgruppe um Adam et al. 2012 den Nachweis eines Zusammenhangs zwischen der vermehrten Expression von miR-21 bei Patienten mit bekanntem VHF und der veränderten Konzentration von SPRY1. So zeigten vergleichende PCR-Analysen von Gewebeproben von Patienten mit SR bzw. VHF, dass die Expression der miR-21 bei VHF-Patienten um das 2.5fache erhöht ist (Adam, Lohfelme et al. 2012). Das Protein sprouty homolog 1 (Spry-1), das ausgehend vom Gen SPRY1 translatiert wird, gilt als Antagonist des Fibroblast growth factors

Ähnlich der Funktion der miR-1 als Regulator der I_{K1} -Untereinheit (UE) Kir2.1 sollen auch die beiden Isoformen miR-26a und miR-26b Einfluss auf die Funktion dieses Ionenkanals nehmen. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass eine Suppression der miR-26-Expression durch Verwendung eines antagomiR die kardiale Vulnerabilität steigert. Eine verringerte miR-26-Expression führt konsekutiv zu einer Erhöhung der Expression der I_{K1} -UE, was wiederum eine Akzeleration der Repolarisation zur Folge hat. Somit kommt es zu einem vermehrten Auftreten von VHF (Wakili, Clauss et al. 2012) (Wang, Lu et al. 2011).

Neben diesem Einfluss auf elektrische Remodelling-Vorgänge zeigen Studien, dass die miR-26 auch das funktionelle Remodelling beeinflusst. So ist nachweislich die Expression der Isoformen miR-26a und miR-26b in isolierten linksatrialen Fibroblasten von Mäusen verringert, was auf eine Suppression dieser durch den nuclear factor of activated T cells NFATc3 zurückzuführen ist. Durch die verringerte Expression der miR26 fehlt ihr inhibierender Einfluss auf den sog. Ca^{2+} -permeable transient receptor potential canonical-3 (TRPC3). Dieser reguliert die Angiotensin-II assoziierte Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten und trägt damit zur Fibrosierung des Atriums bei. (Harada, Luo et al. 2012)

Eine miRNA, welche vor allem im Rahmen des strukturellen Remodeling eine Rolle spielt, scheint die miR29b zu sein. Als grundsätzlich anti-fibrotische miRNA sorgt sie durch eine Inhibierung der sog. ECM Gene Kollagen 1A1 (Col1A1), Kollagen 3A1 (Col3A1) sowie Fibrillin (FBN) für eine geringe Fibrose im Atrium. Durch verminderte Expression der miR-29b kommt es konsekutiv zu einer vermehrten Fibrosierung des Atriums, was ein Substrat für VHF darstellt (Dawson, Wakili et al. 2013).

Nachgewiesen werden konnte diese Expressionsminderung durch Chen et al., welche in einem Hundemodell nicht nur die Expression der miR-29b maßen, sondern auch der miR-133 und der miR-3, die ebenfalls vermindert exprimiert werden. Zusätzlich wies die Arbeitsgruppe nach, dass die pro-fibrotische miR-21 vermehrt exprimiert wird. (Chen, Wakili et al. 2014)

Die Arbeitsgruppe um Wakili et al. konnte diese Ergebnisse unterstützen. Zudem wiesen sie nach, dass eine Reduktion der miR-29b Konzentration direkt mit einer erhöhten Kollagenproduktion einhergeht. Zusätzlich gelang es jener Arbeitsgruppe, im Gewebe von Patienten mit bestehendem VHF eine verminderte Expression der miR-29b verglichen mit jener der Sinusrhythmuspatienten nachzuweisen (Wakili, Clauss et al. 2012).

Die Rolle der miR-144 bei arrhythmogenen Erkrankungen scheint bisher offen. Bis dato gilt die miR-144 als miRNA, welche vor allem in der Tumorgenese sowie der Synthese der Adipozyten eine Rolle einnimmt. So gilt das Cluster aus miR-144 und miR-451 als pro-onkogene Kombination. Durch frühe Apoptose, Hemmung von Zellmigration,- invasion sowie -proliferation und der Suppression von c-Myc und p-ERK bei gleichzeitiger Promotion des pro-

onkogenen Proteins p53 haben diese miRNA einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung ösophagealer Tumoren (Gao, Zhang et al. 2018). Im Gegensatz hierzu gilt die miR-144 durch Suppression der E-Cadherine Zinkfinger E-box-binding homebox 1 und 2 (ZEB₁ und ZEB₂) als Tumorsuppressor bei thyreoidalen Karzinomen (Guan, Liang et al. 2015).

Eine weitere miRNA, welche bei Patienten mit bekanntem VHF nachweislich verstärkt exprimiert wird, ist die miR-146. Als Inhibitor des Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 (TIMP-4), einer Peptidase der TIMP-Familie, bewirkt die miR-146 eine vermehrte Fibrosierung der extrazellulären Matrix (ECM). Durch die Inhibition von TIMP-4 kommt es zu einer verstärkten Synthese der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) sowie einem Anstieg des Kollagengehalts (van den Berg, Kawasaki et al. 2017). Diese insgesamt fibrotische Umstrukturierung spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Re-entry-Kreises des VHF (Wang, Wang et al. 2015). Gleichzeitig untersuchten Cooley et al. das atriale Gewebe von Patienten mit VHF und verglichen die Expressionsrate der miR-146 mit jener im atrialen Gewebe von Patienten mit einem bekannten SR. Hier zeigte sich ein signifikanter Expressionsunterschied im rechten Atrium. (Cooley, Cowley et al. 2012).

MiRNA der human lethal-7 (let-7) Familie spielen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese sowie der Regulation des Zellzyklus. Unter anderen sind die miRNA der let-7-Familie an der Regulation der RAS Proteine beteiligt. Sowohl K-RAS als auch N-RAS und H-RAS verfügen über let-7-Bindestelle, über welche ihre mRNA-Synthese reguliert wird. Die let-7d sorgt beispielsweise für eine Hemmung der mRNA des K-RAS-Proteins. Hierdurch erstarren die Zellen vermehrt in der G1-Phase des Zellzyklus und die Zellproliferation wird reduziert (Kolenda, Przybyla et al. 2014).

Eine gegenseitige negative Beeinflussung im Sinne einer sog. Double-negative feedback loop besteht zwischen den MYC-Proteinen und den let-7-miRNAs. Zum einen wird die MYC-Translation durch let-7-miRNA gehemmt. Gleichzeitig hemmen die MYC-Proteine einige der let-7-miRNAs. Diese Feedback-Schleife scheint vor allem im Rahmen der Tumorzellsynthese eine Rolle zu spielen (Kolenda, Przybyla et al. 2014).

Des Weiteren wurde bislang nachgewiesen, dass miRNA der let-7-Familie eine Rolle in der Entwicklung pulmonaler Fibrose spielen. So zeigt sich in mit TGF-β1 stimuliertem Lungengewebe eine Reduktion der let-7d-Expression während das entsprechende Zielgen HMGA2 vermehrt exprimiert wird (Li, Zhao et al. 2016). Da Untersuchungen von Liu et al. zeigten, dass die let7d in linksatrialem Gewebe verstärkt exprimiert wird (Liu, Qin et al. 2014), lässt sich vermuten, dass die let7d auch in diesem Gewebe durch veränderte Fibrosieraten ein Korrelat für die Entwicklung von VHF darstellt.

Die miRNA miR-374 gilt als miRNA, welche eine kardiale Hypertrophie bedingt. Der Grund hierfür liegt in einem Ungleichgewicht innerhalb des vascular endothelial growth factor pathways und den beteiligten Rezeptoren 1 und 2. Durch eine Überexpression der miR374 kommt es zu einer verstärkten Aktivität des VEGFR-2, da der VEGFR-1 durch die entsprechende miRNA inhibiert wird. Durch das Ungleichgewicht kommt es zur vermehrten Hypertrophie der Myozyten. Eine kardiale Vergrößerung geht häufig einher mit einer Dilatation des Atriums, was in engen Zusammenhang mit der Entwicklung von VHF gebracht wird (Lee, Song et al. 2017).

Bezüglich ihrer Plasmaspiegel bei Patienten mit VHF lässt sich die miR-374a von der miR-374b unterscheiden. Während die miR-374a bei Patienten mit VHF hochreguliert scheint, so ist die miR-374b im Plasma von kardial vorerkrankten Patienten runterreguliert (van den Berg, Kawasaki et al. 2017) (Condorelli, Latronico et al. 2010).

Neben vieler weiterer Funktionen gilt die miR-425 als negativer Regulator des atrialen natriuretischen Peptids (ANP). Durch eine miR-425-vermittelte Inhibition des Gens NPPA, welches für ANP codiert, kommt es zu einer Verringerung der Proteinbiosynthese für dieses Peptid (Vandenwijngaert, Ledsky et al. 2018) (Arora, Wu et al. 2013).

ANP, welches spezifisch im atrialen Gewebe exprimiert und von Kardiomyozyten sezerniert wird (Vandenwijngaert, Ledsky et al. 2018), hat zusätzlich Einfluss auf das atriale Remodeling und spielt daher auch bei atrialen Rhythmusstörungen eine entscheidende Rolle. Als eigentlich protektives Peptid scheint ANP ein sog. reversed atrial remodeling hervorzurufen (Daniels, Lee et al. 2016), da ANP – vor allem in Kombination mit einem Phosphodiesterase-5-Hemmer wie zum Beispiel Zaprinast – über eine Verringerung der cGMP -Aktivität die Kollagensynthese negativ beeinflusst (Redondo, Bishop et al. 1998). Ebenso kommt es durch die Kombination aus PDE-5-Inhibitor und ANP zur Verringerung der Konzentration von TGF- β 1 und Angiotensin-II, welche beide als pro-fibrotisch gelten (Redondo, Bishop et al. 1998). In-vivo Experimente an Mäusen zeigten, dass Mäuse mit normalem ANP-Gehalt im Vergleich zu Mäusen mit verringerter ANP-Synthese oder gar fehlendem ANP einen geringeren Anteil atrialer Fibrose aufwiesen (Wang, Gladysheva et al. 2014).

Bei kardialen Vorerkrankungen zeigt sich eine erhöhte Expression der miR-652 mit negativer Korrelation zur Herzfunktion im Sinne einer vermehrten Hypertrophie. Durch in-vivo Versuche an Mäusen konnte die Arbeitsgruppe um Bernardo et al. nachweisen, dass durch die Induktion einer kardialen Hypertrophie durch aortale Konstriktion und einer damit einhergehender Druck- sowie Volumenbelastung die Expressionsrate der miR-652 signifikant anstieg. Durch gezielte Inhibition der miR-652 durch eine locked nucleid acid (LNA) konnte die kardiale Funktion nach weiteren acht Wochen wieder verbessert werden, was sich zum einen in der Abnahme der

kardialen Fibrose zeigte, zum anderen durch verringerte Apoptose und geringere BNP-Genexpression auszeichnete. Als Zielgen von miR-652 konnte die Arbeitsgruppe Jagged1, einen Notch1-Liganden, ausmachen (Bernardo, Nguyen et al. 2014).

2.6.3 Rolle der miRNA als potentielle Therapieansätze bei Vorhofflimmern

Grundsätzlich besteht aufgrund der vielfältigen biologischen Wirkungen von miRNA die Hypothese durch Intervention an der miRNA-Protein-Interaktion therapeutische Effekte herbeizuführen.

Therapeutische Strategien verfolgen hierbei aktuell zwei Wege:

Zum einen wird versucht durch direkte Inhibition der miRNA-Funktion die Anbindung an mRNA zu verhindern und damit den Translationsprozess zu beeinflussen. Es kommt so zur Hemmung der Proteinbiosynthese. Ein zweiter Ansatz versucht in Form einer Replacement-Therapie endogene miRNA durch synthetisch hergestellte miRNA zu ersetzen (sog. miRNA mimics). Dies ermöglicht im Falle einer verminderten miRNA-Synthese bei Funktionsverlust der Zellen die Hemmung der Proteinbiosynthese durch die synthetisierten miRNA aufrechtzuerhalten. Zur Inhibition der Funktion von miRNA werden synthetisch hergestellte komplementäre Oligonukleotide von ca. 8-25 Nukleotiden (nt) Länge, sog. LNA oder antagomiR, verwendet. Die Auswirkung einer miRNA-Inhibition wurde bereits für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. In Bezug auf eine Entwicklung von VHF durch profibrotische Mechanismen stellt die Inhibition der miR-21 als profibrotische miRNA einen interessanten Ansatz dar. Im Mausmodell konnte durch in vivo silencing der miR-21 durch antagomiR die Aktivität des ERK-MAP-Kinase-Signalwegs reduziert werden und die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose vermindert werden. Auch Gewebe andere Organe wie Lunge und Nieren, deren pathologische Entwicklungen eng mit einer fibrotischen Umwandlung einhergeht, wurden durch Antagonisierung der miR-21 behandelt. Der nachweisliche Rückgang einer fibrotischen Umwandlung in diesen Geweben ist Hinweis dafür, dass die Inhibition der miR-21-Funktion einen generellen Ansatz zur Therapie der Fibrose in humanen Organen darstellt (Thum 2012).

Als doppelsträngige Oligonukleotidstränge, die in ihrer Struktur den miRNA ähneln, besitzen die sog. miRNA mimics einen sog. guided-strang, welcher in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingegliedert wird. Da diese guided-strang wie die endogene miRNA anerkannt werden, wird die Anbindung an die komplementäre mRNA nicht gehemmt und die Proteinbiosynthese funktional weitergeführt. So kann durch die exogene Zufuhr bestimmter miRNA mimics reguliert werden, welche Proteine weiter exprimiert werden sollen. Es ist somit möglich eine Überexpression bestimmter Proteine hervorzurufen und Erkrankungen, welche in Zusammenhang mit einer Down-Regulation von Proteinen und deren miRNA steht,

therapeutisch zu beeinflussen (van den Berg, Kawasaki et al. 2017). Die Arbeitsgruppe um Pan et al. konnte für die miR-101 eine erfolgreiche Anwendung von mimics nachweisen. Durch Provokation eines ischämischen Zustandes durch Ligatur der Koronararterien von Ratten kam es zu einer Reduktion der Expression der miR-101 und konsekutiv zu einer vermehrten Entwicklung von Fibrose durch Erhöhung der Expression des miR-101-Zielgens c-Fos und seinem Downstream-Protein TGF- β 1. Durch Hinzufügen eines miR-101-mimics konnten diese pro-fibrotischen Vorgänge gehemmt werden, was sich in einer echokardiographisch nachweisbaren Verbesserung der hämodynamischen Parameter objektivieren ließ (Pan, Sun et al. 2012).

Im therapeutischen Ansatz stellt die Replacement-Therapie durch miRNA-mimics eine größere Herausforderung dar als die reine Inhibition durch antagomiR. Durch die Überladung des Organismus mit miRNA-mimics kann es zur Interferenz mit Signalwegen in weiteren Organen kommen, welche nicht das primäre Ziel darstellten oder auch andere Signalwege im eigentlichen Zielgewebe beeinflussen als primär gewollt. Aber auch antagomiR können durch Inhibition von systemisch vorkommenden miRNA Nebeneffekte erzielen, welche nicht dem primären Therapieziel entsprachen.

Insgesamt gilt es also als ein ausgemachtes Ziel der aktuellen Grundlagenforschung Gewebespezifische antagomiR oder zielgerichtete Lieferung von miR-mimics zu entwickeln (van den Berg, Kawasaki et al. 2017).

Zudem muss kritisch betrachtet werden, dass die Herstellung von sowohl antagomiR als auch miRNA-mimics aufwendig und kostenintensiv sind, sodass sich zum aktuellen Zeitpunkt keine positive Kosten-Nutzen-Relation ergibt.

Es ist daher insgesamt aktuell noch offen, wann eine miRNA-orientierte Therapie Einzug in den klinischen Alltag hält.

2.6.4 Rolle der miRNA als Biomarker

Das Potential der miRNA als nicht-invasiver, prognostischer und prädiktiver Biomarker zu fungieren ergibt sich aus ihrer Eigenschaft, im Blut nachweisbar und mittels PCR quantifizierbar zu sein. Dies ist möglich, da sie in Vesikeln geschützt im Blut zirkulieren und daher nicht degradiert oder abgebaut werden können (Weckbach, Grabmaier et al. 2016).

Laut aktueller Literatur sind der Nachweis und die Quantifizierung sowohl im Plasma, im Serum als auch in Vollblut möglich. Einzig Proberöhrchen mit Lithium-Heparin-Beschichtung gelten als unbrauchbar für die Messung. Ein Vorteil der Vollblutproben ist eine Konzentrationskonstanz über 24h, welche bei separierten Proben bereits Änderungen zeigte. Bei Messungen nach über 72h zeigte sich jedoch auch in den Vollblutproben signifikante Differenzen in den einzelnen miRNA-Konzentrationen. Eine Verbesserung der Konsistenz zeigte sich durch eine Lagerung bei -80°C. Bei diesen Lagerbedingungen zeigte sich bei einer

Langzeitlagerung von miRNA-Proben über mehr als neun Monate eine Stabilität der miRNA-Konzentrationen bei Plasmaproben, während Vollblutproben Abweichungen aufwiesen.

Somit gilt bei Messungen innerhalb der ersten 24h nach Entnahme eine Empfehlung zur Verwendung von Vollblutproben, während eine Langzeitlagerung bei -80°C besser in Plasmaproben erfolgt. (Glinge, Clauss et al. 2017)

MiRNA Expressionsmuster sind gewebe-spezifisch und definieren physiologische Abläufe in den Zellen. Da sie hierbei biologische Prozesse wie Zellteilung, Apoptose, zellulären Metabolismus, intrazelluläre Signalwege, Immunität und Zellbewegungen beeinflussen, können sie auf verschiedenen Ebenen in zelluläres Geschehen eingreifen. Es liegt also nahe, dass es auch krankheitsspezifische miRNA-Muster gibt und eine Charakterisierung des miRNA-Profiles durch Quantifizierung der miRNA Konzentration im Blut möglich ist (Chen, Ba et al. 2008). So wurden vielversprechende Ansätze durch den Nachweis zirkulierender miRNA bei verschiedenen Karzinomen wie Prostatakarzinom oder Lungenkarzinom gefunden (Li and Kowdley 2012). Auch für VHF konnten bereits miRNA-Konzentrationsveränderungen nachgewiesen werden. So zeigten Dawson et al am Beispiel der miR-29b verringerte Plasmalevel bei durch tachypacing-provoziertem VHF (Dawson, Wakili et al. 2013).

3 Fragestellung

Ziel der hier zugrundeliegenden Promotion ist es Plasmaproben von Patienten mit VHF vor einer Ablationstherapie auf bestimmte miRNA zu untersuchen und ihre mögliche Assoziation zum Therapieerfolg der Ablation zu korrelieren, wodurch spezifische miRNA identifiziert werden könnten mit Hilfe derer eine Stratifikation des Therapieerfolgs möglich wäre.

Somit stehen folgende Fragestellungen im Zentrum der Arbeit:

1. Sind die untersuchten miRNA bei dem ausgewählten Patientenkollektiv konzentriert und im Blut (Plasma) nachweisbar?
2. Wenn ja, sind diese erhöht oder vermindert bei paroxysmalen oder persistierenden VHF konzentriert?
3. Inwieweit ist eine veränderte Konzentration der miRNA im Blutplasma mit einer Erfolgsrate nach einer Ablationstherapie assoziiert?
4. Ist es in Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse möglich für zukünftige Ablationspatienten eine Risikostratifikation für paroxysmales oder persistierendes VHF zu erstellen?

Nach Analyse des miRNA-Profiles der beiden Patientengruppen und der Korrelation dessen mit den jeweiligen Outcomeraten, lässt sich prädiktiv abschätzen, ob sich eventuell anhand einer bestimmten miRNA Abschätzungen über den jeweiligen Therapieerfolg der Katheterablation machen lassen. Somit könnte eine präinterventionelle Bestimmung einer miRNA einen prädiktiven Wert haben und die Therapiestratifizierung vor Katheterablation erleichtern.

4 Material und Methodik

4.1 Molekularbiologie

4.1.1 Materialien

Allgemeine Materialien

Produkt	Firma	Produktnummer
Pipettenspitzen, 10 Racks à 96 Tips 0,1-10 ul	peqlab	81-1031
Pipettenspitzen, 10 Racks à 96 Tips 2-20 ul	peqlab	81-1020
Pipettenspitzen, 10 Racks à 96 Tips 2-200 ul	peqlab	81-1040
Pipettenspitzen, 10 Racks à 96 Tips 50-1000 ul	peqlab	81-1050
Pipette PeqPette 0,1-2µl	peqlab	91-P3960-2
Pipette PeqPette 2-20µl	peqlab	91-P3960-20
Pipette PeqPette 20-200µl	peqlab	91-P3960-200
Pipette PeqPette 100-1000µl	peqlab	91-P3960-1000
5430 R Kühlzentrifuge	Eppendorf	5430 R
Vortex Genie 2	Scientific Industries	??
Nitrilhandschuhe vasco Nitril Blue M	Braun	9209825
Zentrifuge EBA 20	Hettich	??

Tab. 4.1-1: Allgemeine Materialien

Gewinnung der Plasmaproben

Produkt	Firma	Produktnummer
Cryovials, 2ml, Außengewinde	Biozym	710513
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert	Roth	EA65.1
Cryoboxen, neonpink, 9x9	Kisker	R034-NPI
S-Monovette 9ml K3E	Sarstedt	02.1066.001

Tab. 4.1-2: Gewinnung der Plasmaproben

miRNA Isolation

Produkt	Firma	Produktnummer
NucleoSpin miRNA Plasma	Macherey-Nagel	740981.250
Cryoboxen, neonorange, 8x8	Kisker	R034-8-NOR

Produkt	Firma	Produktnummer
Reagiergefäß 1.5ml Easy Cap	Sarstedt	72.690.550
50 mL Polypropylene Conical Tube	Corning Science Mexico	352070
Röhre 15ml, 120x17mm	Sarstedt	62.554.502

Tab. 4.1-3: miRNA Isolation

Reverse Transkription

Produkt	Firma	Produktnummer	MiR	Kennung
TaqMan MicroRNA Reverse Transcriptase Kit	Life Technologies	4366597		
TaqMan MicroRNA Assay	Life Technologies	4427975	miR1	000385
			miR21	000397
			miR26a	000405
			miR144	002148
			miR146a	000468
			cel-miR-39	000200
			let-7d	002283
			miR374a-5p	000563
			miR374b-5p	001319
			miR425-5p	001516
			miR652-3p	002352
0.2ml flat cap tubes	Thermo	AB-0622		
Cryoboxen, 0.2ml, 12x12	Kisker	R035-natural		

Tab. 4.1-4: Reverse Transkription

Real Time PCR

Produkt	Firma	Produktnummer
TaqMan Gene Expression MasterMix	Life Technologies	4369542
Strips of 12 Flat Caps	Thermo	AB-0851
ThermoFast 96 Plate Skirted	Thermo	AB-0800
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	BioRad	
Nucleasefreies Wasser	Qiagen	129114
Reagiergefäß 1.5ml Easy Cap	Sarstedt	72.690.550

Tab. 4.1-5: Real Time PCR

4.1.2 Methodik

Zur Quantifizierung der miRNA-Expression führten wir eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durch, die durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide, sog. Primer, definierte Genabschnitte nachweisen kann.

Zur Durchführung der PCR muss in einem ersten Schritt die in den Plasmaproben vorhandene miRNA möglichst sauber isoliert werden. Durch eine Reverse Transkription wird die so gewonnene miRNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche für die eigentliche PCR genutzt wird. Die doppelsträngige cDNA wird durch kontrolliertes Erhitzen aufgetrennt und die entstehenden Einzelstränge bilden die Matrizen für die Primer der Gene, welche nachgewiesen werden sollen. Nach der Anlagerung der Primer an die jeweiligen Einzelstränge wird der gewünschte Genabschnitt durch DNA-Polymerasen repliziert, wodurch wiederum doppelsträngige Hybridisierungsprodukte entstehen. Durch ein zyklisches Erhitzen und Abkühlen der Proben kommt es zu einer vielfachen Wiederholung dieser Reaktion, sodass sich die zu untersuchende Gene exponentiell vermehren und somit quantifiziert werden können.

4.1.2.1 Plasmagewinnung

Zur Gewinnung der Plasmaproben wurden den Patienten jeweils vor Beginn der Ablationstherapie Vollblut entnommen. Dieses wurde unverzüglich über 20 min zentrifugiert und das gewonnene Blutplasma nach Abpipettierung in Cryotubes bei -80°C gelagert.

4.1.2.2 miRNA-Isolation

Zur Gewinnung der miRNA aus den gesammelten Plasmaproben nutzten wir NucleoSpin miRNA Plasma von Macherey-Nagel.

In einem ersten Schritt werden 900µl des Blutplasmas des Patienten in ein 1.5ml Tube pipettiert. Nach Zugabe von 270µl MLP-Puffer wird das Gemisch für 5sec auf dem Vortexmischer geschüttelt. Es werden zur Mischung 4µl einer 5fmol/µl Lösung des Housekeeping-Gens cel-mir39 gegeben und danach nochmals 5sec geschüttelt. Das Gemisch sollte danach 3min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Nach 3min werden 90µl MPP Puffer zugegeben und das einzelne Tube sofort 5sec auf dem Vortexmischer gemischt. Nach 1min Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert man die Tubes für 3min bei 11 000 x g. Je 500µl des Überstands werden auf zwei 2ml Tubes aufgeteilt, so dass man nun pro Patientenplasma zwei Tubes hat. In jede Tube werden anschließend 600µl Isopropanol gegeben und erneut 5sec durch den Vortexschüttler gemischt. 700µl des Gemischs wird nun in ein NucleoSpin miRNA Säulchen pipettiert. Dies sollte nun 2min bei Raumtemperatur inkubieren. Danach wird es für 30sec bei 11 000 x g zentrifugiert. Den Durchfluss wegkippen

und das Säulchen wieder im Tube platzieren. Die nächsten 700µl durch das Filtersäulchen zentrifugieren und abermals den Durchfluss wegkippen. Dieser Schritt wird ein drittes Mal wiederholt bis die ganze Flüssigkeit durch das Säulchen gelaufen ist.

Zum Schluss folgen einige Waschschriffe zum Auswaschen der miRNA.

Es werden 100µl des MW1 in die Tube pipettiert. Danach für 30sec bei 11 000x g zentrifugiert. Im zweiten Waschschriffe werden 700µl MW2 Puffer zu pipettiert und nochmals 30sec bei 11 000x g zentrifugiert. Ein zweites Mal mit 250µl MW2 Puffer waschen und dieses Mal für 2min bei 11 000x g zentrifugieren.

Um im letzten Schriffe die isolierte miRNA aus dem Säulchen in einer Tube zu schwemmen, gibt man 90µl RNA-free H₂O dazu. Nach 1min Inkubation bei Raumtemperatur wird erneut 1min bei 11 000x g zentrifugiert. Die gewonnene miRNA sofort auf Eis lagern und anschließend bei -80°C lagern.

4.1.2.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription beschreibt die Synthese von cDNA (= complementary DNA) aus vorhandener einzelsträngiger RNA (hier miRNA). Synthetisiert wird diese Reaktion durch das Enzym Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase.

In einem ersten Schriffe muss ein sog. MasterMix hergestellt werden. Dieser besteht aus 0.1µl dNTP-Mix, 0.66µl MultiScribe-Reverse-Transkriptase-Enzym, 1.0µl 10x Reverse Transkription Puffer, 0.14µl RNase Inhibitor, 0.6µl Nuclease-freies Wasser und 2.0µl eines miRNA-spezifischen Primer Mix. Im Anschluss werden je 4.5µl des MasterMix mit 5.5µl der bereits gewonnenen miRNA gemischt. Das Gesamtvolumen von 10µl wird denn entsprechend des Transkriptionsprotokolls im Cyclor bearbeitet:

1. Schriffe	16°C	30min
2. Schriffe	42°C	30min
3. Schriffe	85°C	5min
4. Schriffe	4 °C	HOLD

4.1.2.4 Real-Time-PCR

Ziel der qRT-PCR ist es die vorhandene Menge cDNA zu quantifizieren. Hierzu nutzt man die Kinetik einer PCR-Reaktion. Nachdem sich zu Beginn der Reaktion eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente zeigt, entwickelt sich durch verschiedene Faktoren (z.B. zunehmender Verbrauch von Primern und Nucleotiden, Reaktionshemmung durch Akkumulation von Produkten) ein linearer Anstieg. Als Richtwert verwendet man daher den sog. CT-Wert (= cycle threshold), d.h. die Zykluszahl bei der sich ein Fluoreszenzsignal noch deutlich vom Hintergrund abnimmt.

Zur Durchführung einer qRT-PCR stellt man ebenfalls einen MasterMix her. Dieser besteht aus einem der miRNA-spezifischen Micro RNA Assay (TaqMan Micro RNA Assay), dem Gene Expression MasterMix und Nuklease-freiem Wasser. Von diesem MasterMix pipettiert man 9µl in eine Tube und fügt jeweils 1µl der cDNA hinzu. Das Gesamtvolumen von 10µl gibt man dann in das PCR-Gerät. Dieser führt folgendes Protokoll durch:

1. Schritt 95° 10min
2. Schritt 95° 15sec
3. Schritt 60° 60sec

Wiederholung von Schritt 2 und 3 für 44 Zyklen

4.2 Auswertung und Statistik

Der Einschluss der Patienten erfolgte nach entsprechender Aufklärung des Patienten durch die Studiengruppe und nur bei schriftlichem Einverständnis des Patienten. Zudem wurde die Studie nach den Richtlinien des Ethikkomitees der Universität München durchgeführt. Alle in dieser Studie veröffentlichte Daten wurden anonym analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel®. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt mittels Mittelwertes \pm Standardabweichung. Zur Ermittlung der Signifikanz wurden ein ungepaarter t-Test für unverbundene Stichproben und die Varianzanalyse benutzt (eine Normalverteilung vorausgesetzt). Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte durch die Ermittlung des CT_{Mean} (threshold cycle) der den Patientennummern zugeordneten CT Werte CT_1 - CT_3 . Das jeweilige ΔCT wurde durch eine Subtraktion des CT_{Mean} -Wertes der Referenz-Micro-RNA *syn-cel-miR-39* und des CT_{Mean} der miRNA der zugehörigen Patientenprobe berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Daten der Studiengruppe

5.1.1 Patientenkollektiv und Einteilung der Vergleichsgruppen

Es handelt sich bei der vorliegenden Studie um eine prospektive single-center Langzeitstudie. Kriterium für den Einschluss in die zugrundeliegende Studie war das Bestehen eines symptomatischen paroxysmalen oder persistierenden VHF, welches sogleich die Einteilung in die Vergleichsgruppen definierte.

5.1.2 Allgemeine Patientencharakteristika

In der Zeit vom 2012 bis 2016 entnahmen wir Plasmaproben von insgesamt 418 Patienten, welche aufgrund der Form ihres VHF (I = paroxysmal vs. II = persistierend) in zwei möglichst homogene Gruppen eingeteilt wurden.

Bei einem mittleren Durchschnittsalter von 64 ± 11 Jahren waren in beiden Gruppen zwei Drittel der Patienten männlich (60,9% bei paroxysmale VHF mit $n=208$ vs. 61,2% bei persistierendem VHF mit $n=210$).

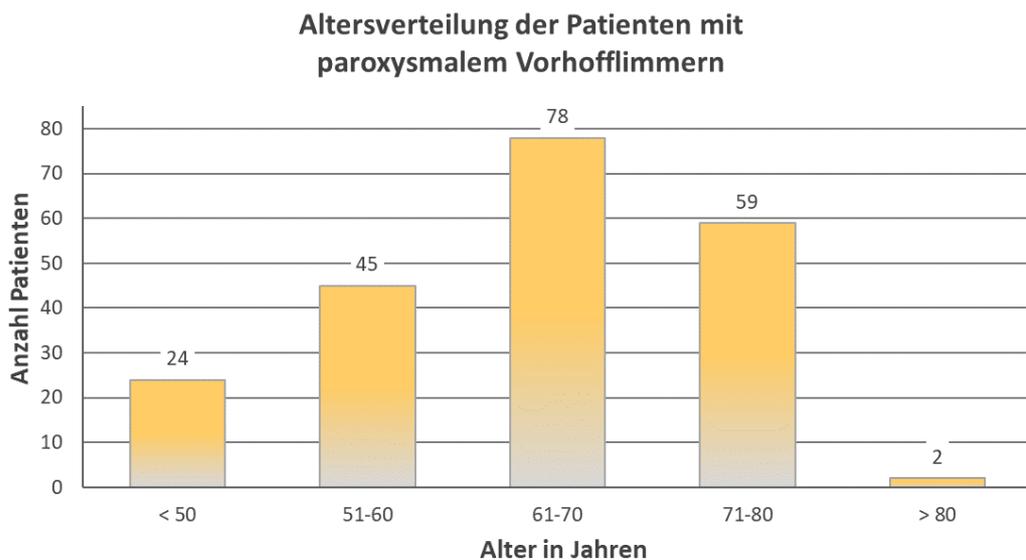


Abb. 5.1-1: Altersverteilung der Patienten mit paroxysmale VHF

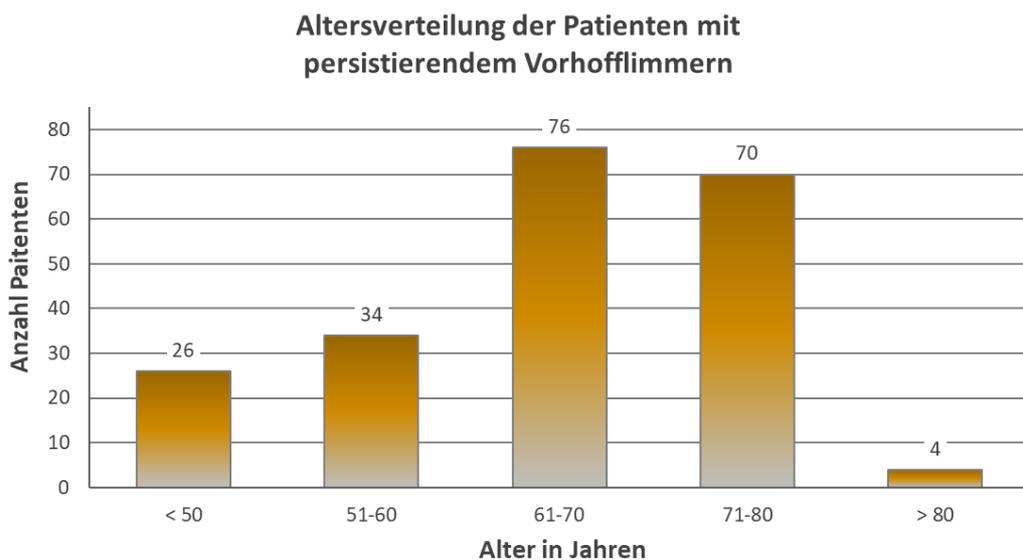


Abb. 5.1-2: Altersverteilung der Patienten mit persistierendem VHF

Geschlechterverteilung der Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern

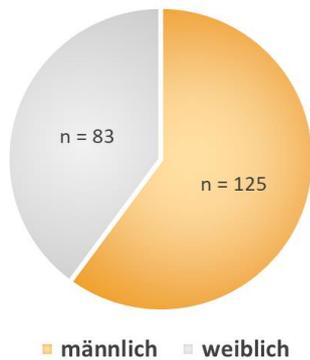


Abb. 5.1-3: Geschlechterverteilung der Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern

Geschlechterverteilung der Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern

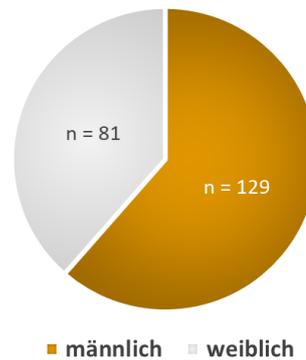


Abb. 5.1-4: Geschlechterverteilung der Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme bestand bei den Patienten der Gruppe I eine Vorhofflimmersymptomatik entsprechend einem EHRA Score von $2 \pm 0,8$. Zusätzlich fanden sich in dieser Gruppe Komorbiditäten wie eine arterielle Hypertonie (69%), chronisch arterielle Erkrankungen (CAD) (21%) und ein Diabetes mellitus (13%) sowie ein durchschnittlicher BMI von $27 \pm 4 \text{ kg/m}^2$. Die Koexistenz einer Herzinsuffizienz wurde durch die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) objektiviert und erreichte einen Durchschnittswert von $61 \pm 11\%$. Als Zeichen einer strukturellen Veränderung am linken Vorhof wurde bei allen Patienten der linksatriale Durchmesser gemessen, welcher im Mittel $40 \pm 7\text{mm}$ betrug.

Als Vergleichsgruppe fungierten Patienten mit persistierendem VHF (Gruppe II), welche ebenfalls auf Komorbiditäten wie arterielle Hypertonie (73%), CAD (24%) und Diabetes mellitus (15%) untersucht wurden. In dieser Gruppe zeigte sich ein durchschnittlicher BMI von $28 \pm 5 \text{ kg/m}^2$. Die LVEF betrug im Mittel $58 \pm 10\%$ und der LA Diameter $42 \pm 6\text{mm}$.

Allgemeine Patientencharakteristika		paroxysmal	persistierend
Anzahl n		208	210
Geschlecht	Männlich [%]	60.91	61.24
	Weiblich [%]	39.81	38.76
Alter	MEAN	63.64	65.14
	SD	10.86	10.22
	SEM	0.75	0.70
Art. Hypertonie	%	69.31	72.93
CAD	%	20.79	24.31
Diabetes mellitus	%	12.87	14.92
EHRA-Score	MEAN	2.00	2.00
	SD	0.80	0.77

Allgemeine Patientencharakteristika		paroxysmal	persistierend
BMI	SEM	0.08	0.11
	MEAN	27.00	28.00
	SD	4.29	4.85
	SEM	0.39	0.55
EF	MEAN	61.00	58.00
	SD	10.72	9.96
	SEM	0.88	1.11
LA-Durchmesser	MEAN	40.00	42.00
	SD	7.06	5.75
	SEM	0.60	0.65

Tab. 5.1-1: Allgemeine Patientencharakteristika (bitte Abkürzungen in den Tabellen, sowie MEAN, SD SM hier in der Legende erklären)

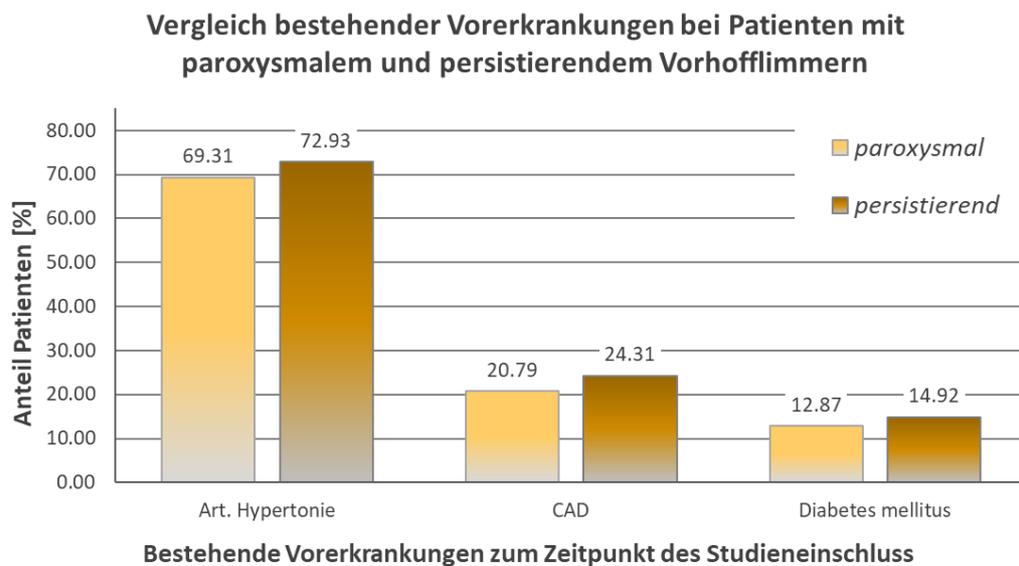


Abb. 5.1-5: Vergleich bestehender Vorerkrankungen bei Patienten mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern (CAD = Chron. Arterielle Erkrankungen)

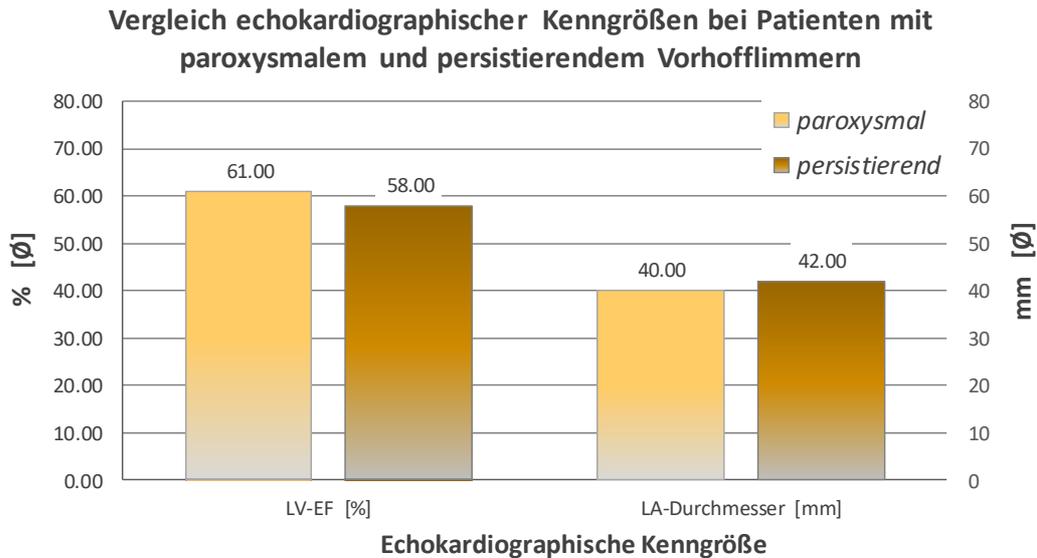


Abb. 5.1-6: Vergleich echokardiographischer Kenngrößen bei Patienten mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern (EF = Ejektionsfraktion, LA = Linkes Atrium)

5.2 Erfolgsraten der Ablationstherapie nach drei, sechs und 12 Monaten

Die Erfolgsrate der durchgeführten Ablationstherapie bemisst sich an der jeweiligen Rezidivfreiheit des Patienten. Zur Evaluation dieser führten wir regelmäßige Follow-up Untersuchungen nach drei, sechs und 12 Monaten durch. Als Rezidivfreiheit definierten wir die klinische Symptombefreiheit des Patienten sowie den aktuellen Nachweis eines Sinusrhythmus im Ruhe-EKG.

In der Erstuntersuchung nach drei Monaten zeigte sich bei insgesamt 98 Patienten ein VHF-Rezidiv, was einem Anteil von 23,44% entspricht. Hierbei traten 42,85 % der Rezidive bei Patienten mit einem als paroxysmal definierten VHF auf. 57,14 % der Rezidive entstanden hingegen bei Patienten mit einem persistierenden VHF.

Es gilt jedoch zu beachten, dass es in den ersten Wochen nach Ablationstherapie aufgrund der Invasivität des Eingriffs am Myokard häufig zu einer erneuten Symptomatik durch Rhythmusvariabilitäten kommt. Dies sollte als Zeichen der postinterventionellen myokardialen Vulnerabilität gewertet werden und bedarf keiner sofortigen Therapie.

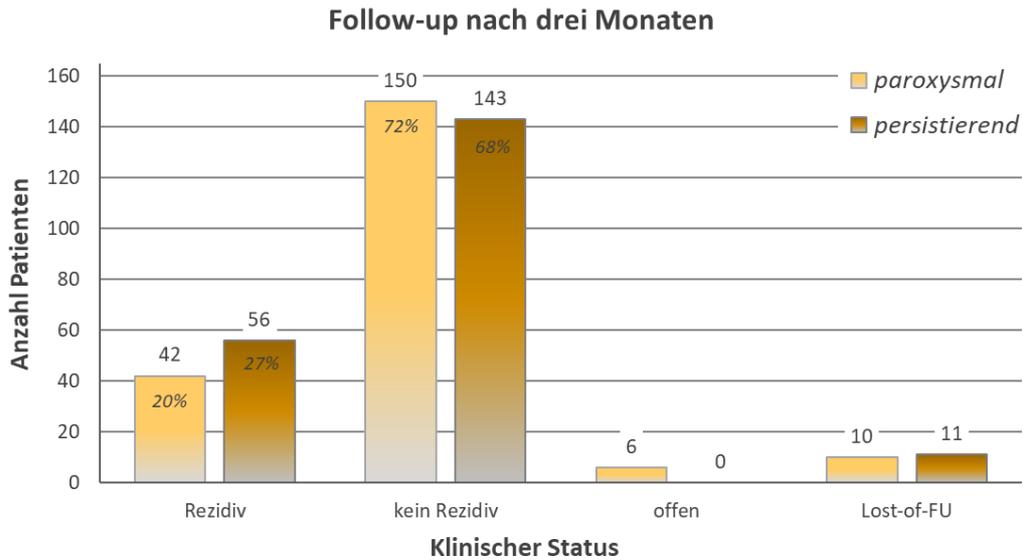


Abb. 5.2-1: Follow-up nach drei Monaten

Als Studienendpunkt war die Rezidivfreiheit nach 12 Monaten festgelegt. Es zeigte sich bei insgesamt 239 Patienten eine Rezidivfreiheit nach 12 Monaten, was 57,17% entspricht. Im Vergleich der beiden Kohorten konnte nachgewiesen werden, dass bei 61,6 % der Patienten mit einem paroxysmalen VHF Rezidivfreiheit über 12 Monaten bestand. Bei Patienten mit einem persistierenden VHF waren es lediglich 53,3 % der Teilnehmer, welche eine Rezidivfreiheit über diesen Zeitraum bestätigten.

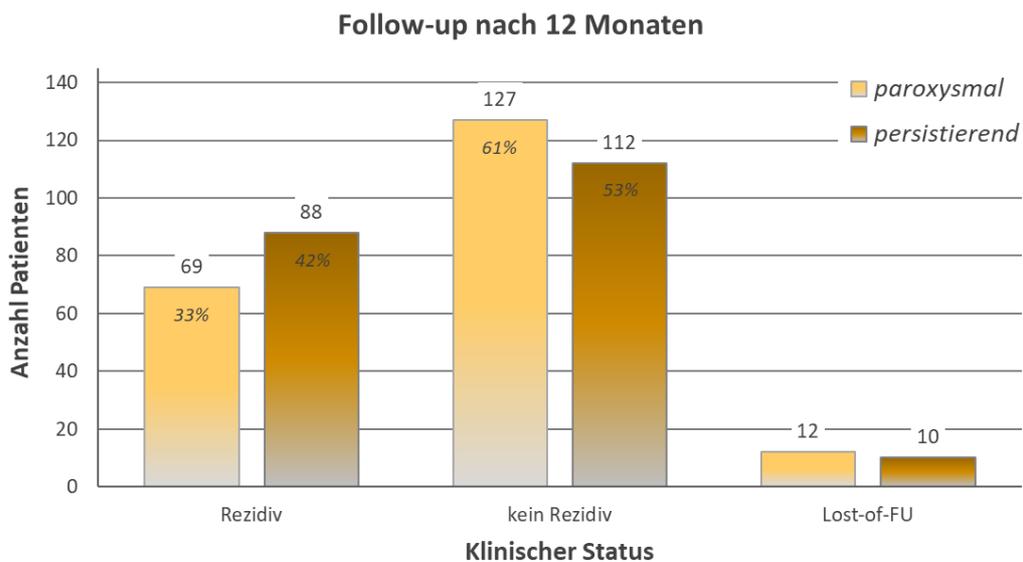


Abb. 5.2-2: Follow-up nach 12 Monaten

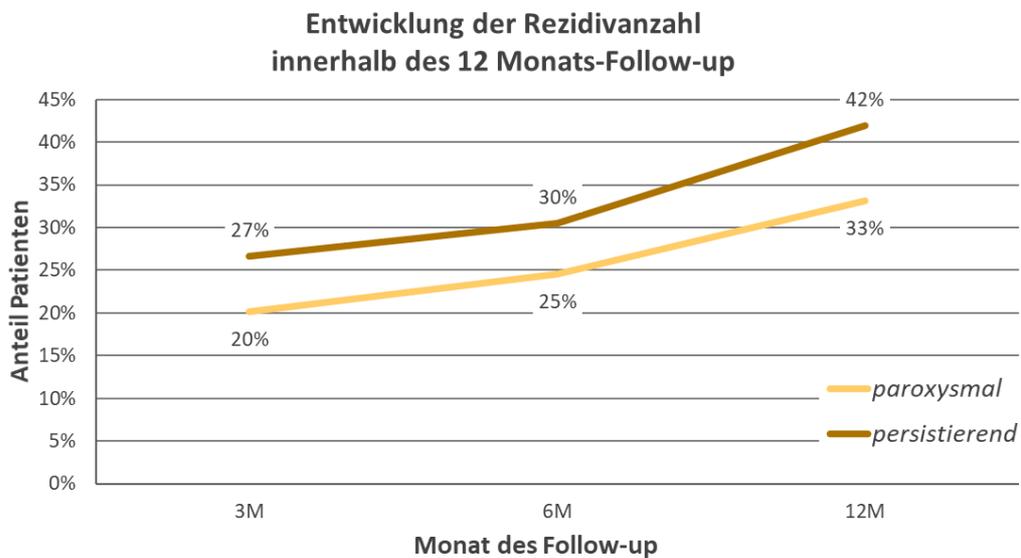


Abb. 5.2-3: Entwicklung der Rezidivanzahl innerhalb des 12 Monats-Follow-up

5.3 Übersicht über die Konzentrationsraten der miRNA

Für die gemessenen elf miRNA ergaben sich folgende Gesamtkonzentrationsraten:

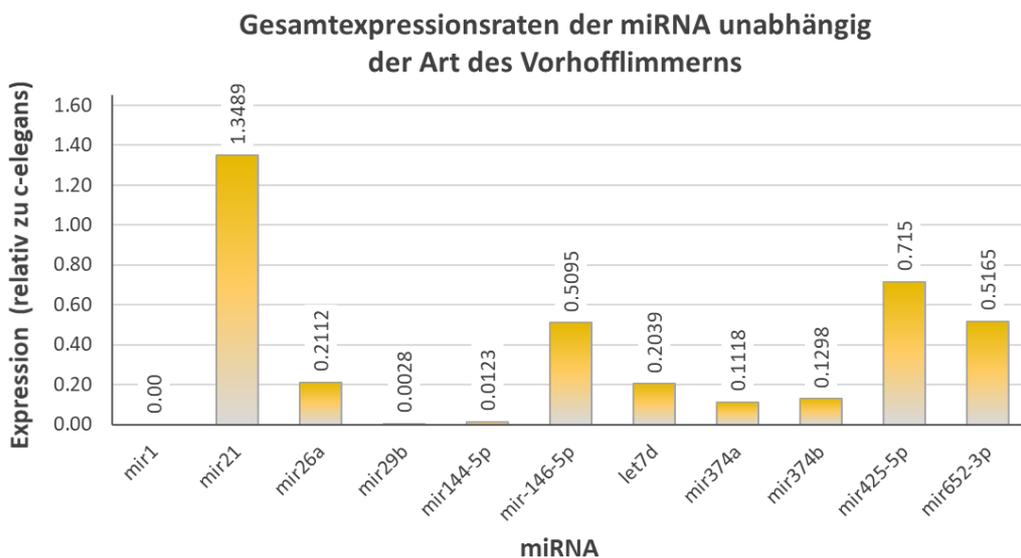


Abb. 5.3-1: Gesamtexpressionsraten der miRNA unabhängig der Art des Vorhofflimmerns

Die miRNA miR-21, miR146-5p, miR-425-3p sowie miR-653-5p sind im Vergleich durch Konzentrationsraten von > 0,5 gekennzeichnet. Alle anderen untersuchten miRNA wiesen Konzentrationsraten von < 0,25 auf.

Durch Separation nach der Art des bestehenden VHF ergeben sich folgende Konzentrationsraten für die elf miRNAs:

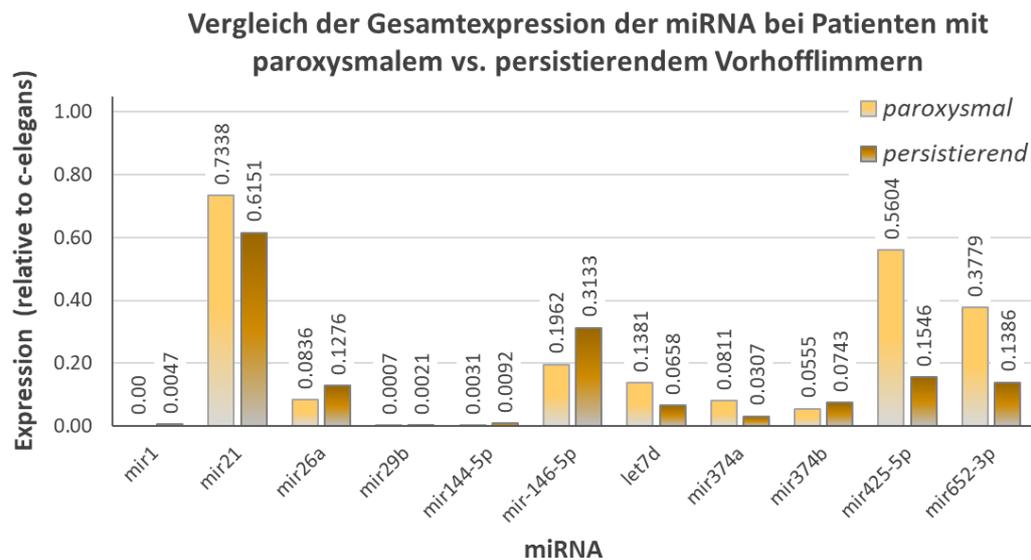


Abb. 5.3-2: Vergleich der Gesamtexpression der miRNA bei Patienten mit paroxysmalem vs. persistierendem Vorhofflimmern

Auch in dieser Darstellung kennzeichnen sich die vier oben beschriebenen miRNA durch hohe Konzentrationsraten von $> 0,1$. Hierbei fällt auf, dass für die miR-21, miR-425-5p sowie miR-652-3p die Konzentrationsrate der Patienten mit paroxysmalem VHF höher sind als bei Patienten mit persistierenden VHF. Einzig die miR-146-5p wird bei Patienten mit persistierendem VHF vermehrt konzentriert gemessen. Alle anderen sieben miRNA sind mit $< 0,15$ nur gering konzentriert.

5.4 Konzentration der untersuchten miRNA bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern

In der Kohorte der Patienten mit paroxysmalem VHF zeigten sich hohe Konzentrationsraten für die miR-21 (0,7338), miR-425-5p (0,5604) sowie die miR-652-3p (0,3779). Die miR-1, miR-29b sowie die miR-144-5p waren mit Konzentrationsraten $< 0,005$ hingegen in extrem geringen Konzentrationen messbar.

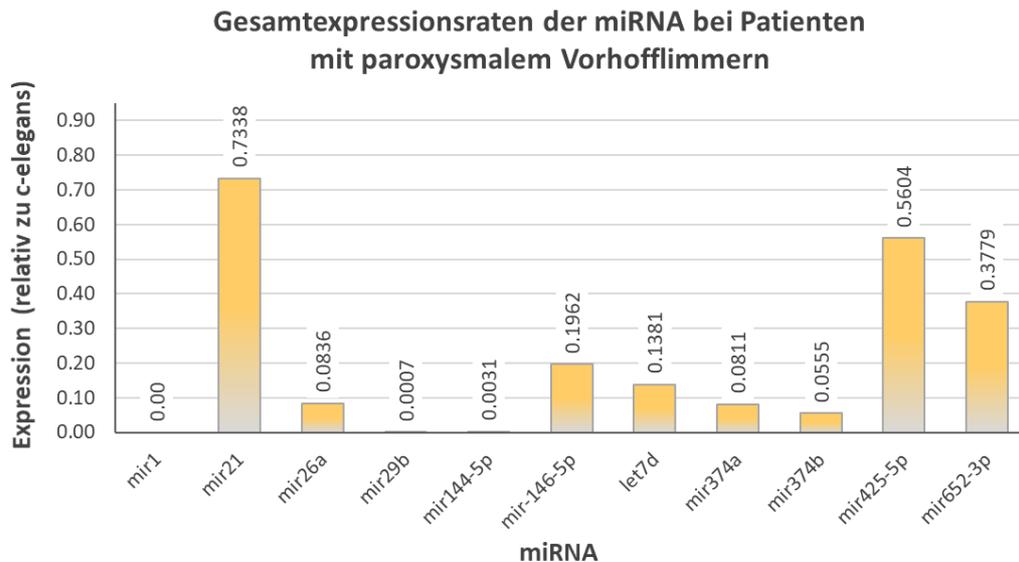


Abb. 5.4-1: Gesamtexpressionsraten der miRNA bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern

Bei der miR-1 handelt es sich um eine miRNA, welche in den untersuchten Plasmaproben nur gering konzentriert war. Bei einer Gesamtkonzentrationsrate von $< 0,001$ zeigte sich zudem kein signifikanter Unterschied in der Konzentrationsrate zwischen beiden Vergleichsgruppen ($< 0,00001$ vs. $0,00001$, p-Wert 0,09).

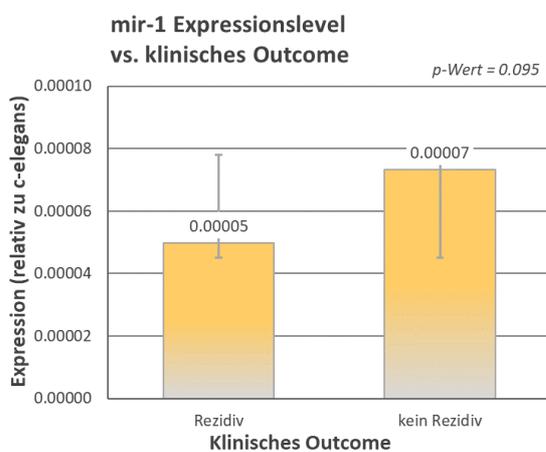


Abb. 5.4-2: miR-1 Expressionslevel vs. klinisches Outcome

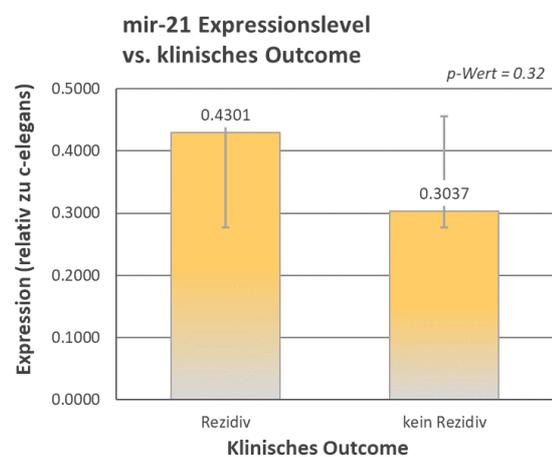


Abb. 5.4-3: miR-21 Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Für die miR-21 zeigte sich eine Gesamtexpressionsrate über beide Vergleichsgruppen von 0,7338. Hierbei bestand kein signifikanter Unterschied in der Expression der miR-21 bei Patienten mit oder ohne Rezidivneigung (0,43 vs. 0,30; p-Wert 0,32).

Mit 0,084 zeigte sich für die miR-26a eine insgesamt höhere Gesamtkonzentration. Dennoch war auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen nachweisbar (0,045 vs. 0,038; p-Wert 0,40).

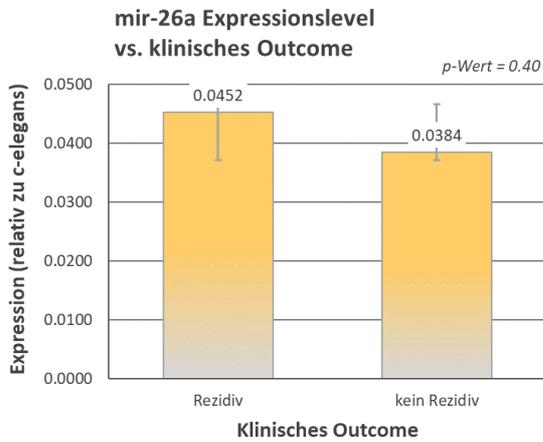


Abb. 5.4-4: miR-26a Expressionslevel vs. klinisches Outcome



Abb. 5.4-5: miR-29b Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Ein ebenfalls ein nicht signifikanter Unterschied zeigt sich in der Konzentrationsrate der miR-29b mit 0,0004 vs. 0,0003 (p-Wert 0,47).

Für die miR-144-5p stellte sich bei einer Gesamtkonzentration von 0,0031 kein signifikanter Hinweis auf eine Beeinflussung des Clinical Outcome heraus. Auch hier waren die Konzentrationsraten innerhalb der Vergleichsgruppen ohne signifikante Differenz (0,0017 vs. 0,0014, p-Wert 0,23).

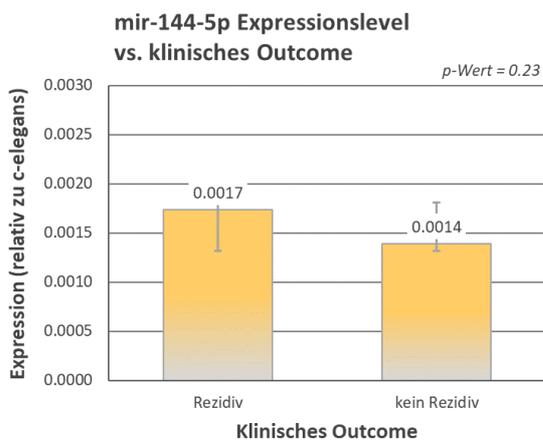


Abb. 5.4-6: miR-144-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome



Abb. 5.4-7: miR-146-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome

In höheren Konzentrationen nachweisbar zeigte sich hingegen die miR-146-5p. Bei einer Gesamtkonzentrationsrate von 0,196 ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen (0,084 vs. 0,11, p-Wert 0,18)

Bei einer Gesamtkonzentration von 0,14 erwiesen sich die Konzentrationen der beiden Vergleichsgruppen als überwiegend identisch. Eine signifikante Divergenz für die Vergleichsgruppen war nicht nachzuweisen (0,065 vs. 0,072, p-Wert 0,43).

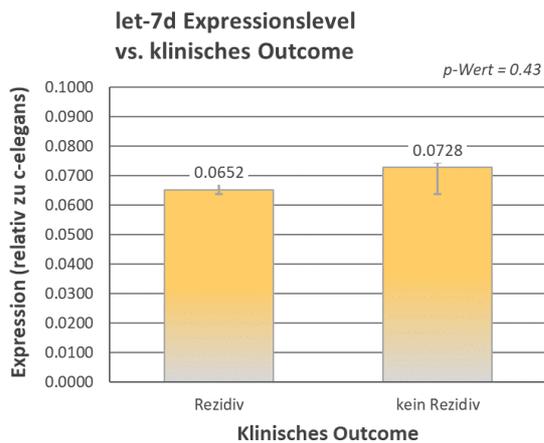


Abb. 5.4-8: let-7d Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Für die miR-374a ergab sich eine Gesamtkonzentration von 0,08. Bei einem p-Wert von 0,21 kann aber auch für diese miRNA kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. In der Messung der Konzentrationsraten der beiden Vergleichsgruppen wiesen beide Gruppen ähnliche Werte auf (0,05 vs. 0,03).



Abb. 5.4-9: miR-374a Expressionslevel vs. klinisches Outcome

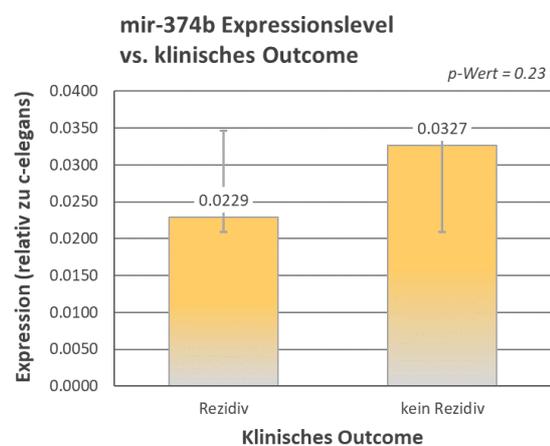


Abb. 5.4-10: miR-374b Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Die miR-374b kennzeichnet sich durch etwas geringere Konzentrationsraten als die miR-374a. Bei einer Gesamtkonzentration von 0,055 ließ sich zudem auch für diese miRNA keine signifikante Differenz beweisen. Bei einem p-Wert von 0,22 zeigten sich für die Vergleichsgruppen Konzentrationsraten von 0,023 sowie 0,033.

Bei einer hohen Gesamtkonzentrationsrate von 0,56 kennzeichnet sich auch die miR-425-5p durch einen nicht signifikanten Unterschied im Clinical Outcome. Bei einem p-Wert von 0,26 weisen die beiden Vergleichsgruppen similäre Konzentrationsraten auf (0,33 vs. 0,23).



Abb. 5.4-11: miR-425-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome



Abb. 5.4-12: miR-652-3p Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Einen signifikanten Unterschied weist hingegen die miR-652-5p auf. Bei einem p-Wert von 0,03 zeigen sich hier Konzentrationsraten von 0,29 vs. 0,09 in den beiden Vergleichsgruppen. Bei einer Gesamtkonzentrationsrate von 0,38 scheint diese miRNA insgesamt jedoch nicht verstärkter konzentriert zu werden als die bisher genannten.

5.5 Konzentration der untersuchten miRNA bei Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern

Bei Patienten mit persistierendem VHF zeigen sich vor allem für die miRNA miR-21 (0,61), miR-26a (0,13), miR146-5p (0,31) sowie miR-425-3p (0,15) und miR-652-3p (0,14) erhöht messbare Konzentrationsraten. Für die anderen untersuchten miRNA zeigten sich Konzentrationsraten von < 0,08.

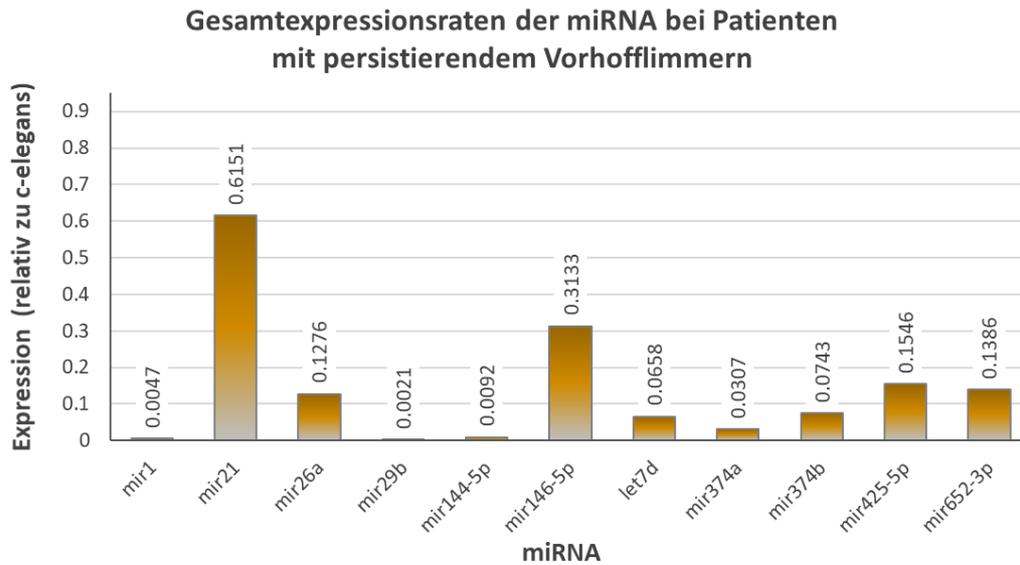


Abb. 5.5-1: Gesamtexpressionsraten der miRNA bei Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern

Die miR-1 kennzeichnet sich durch eine geringe Gesamtkonzentration bei jedoch signifikanten Differenzwerten in den Vergleichsgruppen (0,001 vs. 0,003; p-Wert 0,01). Somit zeigen sich signifikant höhere Konzentrationsraten der miR-1 bei Patienten ohne Rezidivneigung.

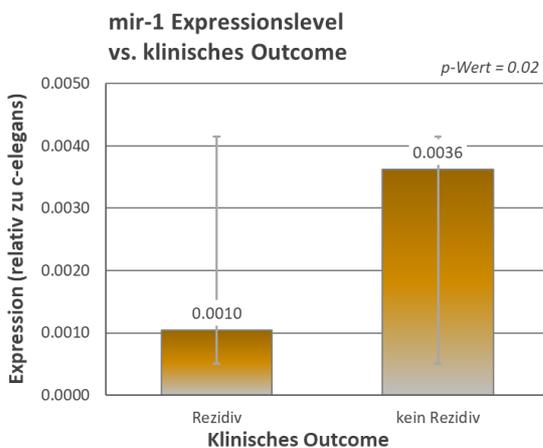


Abb. 5.5-2: miR-1 Expressionslevel vs. klinisches Outcome

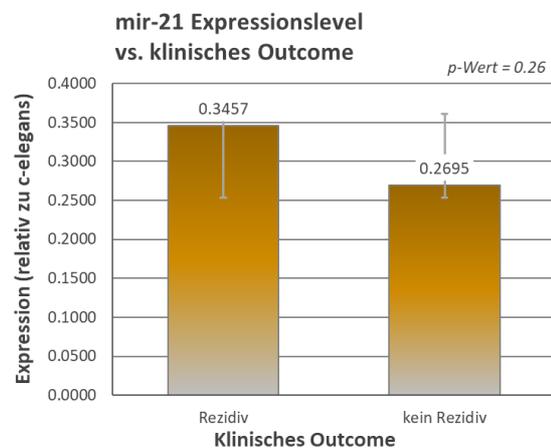


Abb. 5.5-3: miR-21 Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Bei einem p-Wert von 0,23 zeigt sich für die miR-21 keine signifikante Differenz in den Konzentrationswerten bei Patienten mit oder ohne Rezidivneigung. Bei einer Gesamtkonzentration von 0,62 war die miR-21 jedoch insgesamt am stärksten exprimiert.

Bei einer deutlich geringeren Gesamtkonzentration (0,13) weist die miR-26a keinerlei signifikante Unterschiede in den Konzentrationsraten der beiden Vergleichsgruppen auf (0,060 vs. 0,067, p-Wert 0,39).

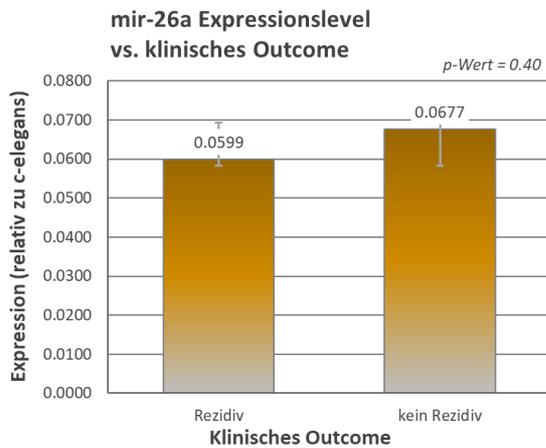


Abb. 5.5-4: miR-26a Expressionslevel vs. klinisches Outcome



Abb. 5.5-5: miR-29b Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Trotz einer Differenz in den Konzentrationsleveln der Patienten mit und ohne Rezidivneigung (0,0006 vs. 0,0015) erweist sich dieser Unterschied der miR-29b als nicht signifikant. Insgesamt ist die miR-29b mit 0,0021 auch nur mäßig im Plasma der Patienten konzentriert.

Bei einer Gesamtkonzentration von 0,0092 zeigen sich vergleichbare Werte für die beiden Vergleichsgruppen (0,0048 vs. 0,0044) für die miR-144-5p. Diese sind als nicht signifikant anzusehen (p-Wert 0,41).

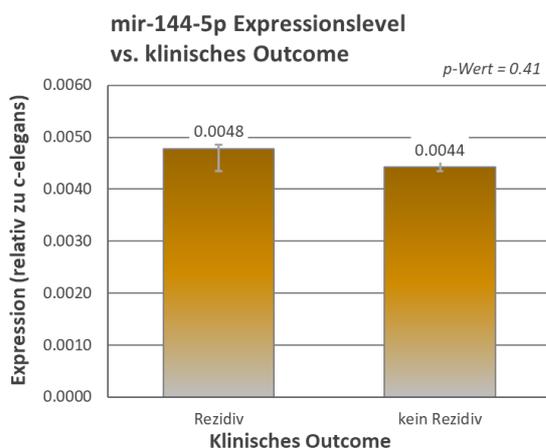


Abb. 5.5-6: miR-144-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome

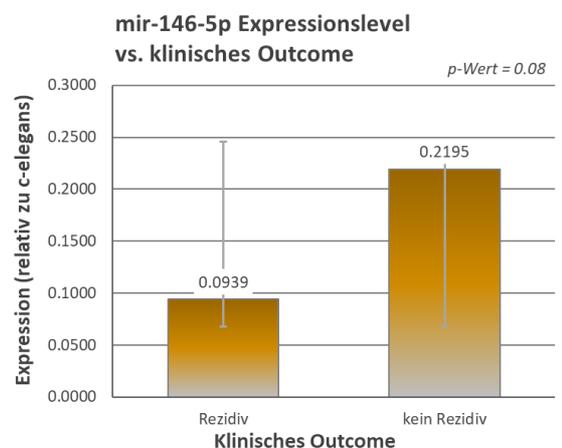


Abb. 5.5-7: miR-146-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Einen klaren Trend in den komperativen Kohorten zeigt sich diese bei einem p-Wert von 0,08 für die miR-146-5p 0,094 für Rezidivpatienten vs. bei 0,22 rezidivfreie Patienten.

Für die let-7d erweisen sich bei einer insgesamt eher mäßigen Konzentrationsrate von 0,066 auch die Konzentrationsraten der einzelnen Kohorten in einem Vergleich als nicht signifikant unterschiedlich (p-Wert 0,29). Die konkurrierenden Kohorten weisen Werte von 0,03 vs. 0,037 auf.

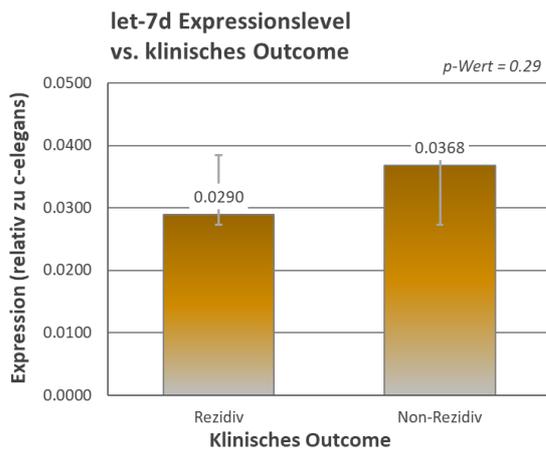


Abb. 5.5-8: let-7d Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Die miR-374a kennzeichnet sich durch ähnliche Konzentrationsraten in den Vergleichsgruppen (0,015 vs. 0,016, p-Wert 0,4) bei einer Gesamtkonzentrationsrate von 0,03.

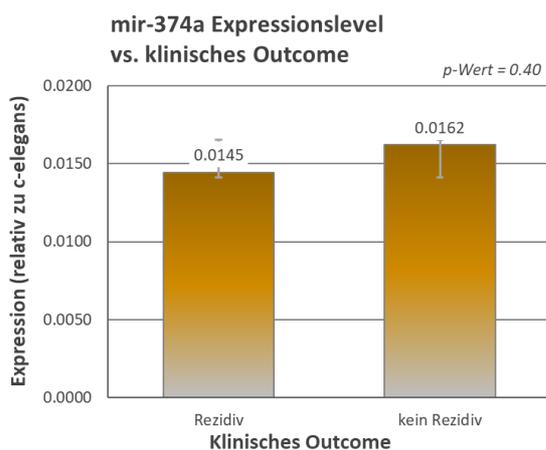


Abb. 5.5-9: miR-374a Expressionslevel vs. klinisches Outcome



Abb. 5.5-10: miR-374b Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Die miR-374b hingegen weist eine höhere Gesamtkonzentrationsrate von 0,074 auf. Dennoch erweisen sich die Differenzen zwischen den Kohorten Rezidiv vs. Non-Rezidiv (0,045 vs. 0,03) bei einem p-Wert von 0,23 als nicht signifikant.

Bei einer hohen Gesamtexpressionsrate von 0,15 kennzeichnet sich die miR-425-5p durch signifikante Konzentrationsdifferenzen bei den untersuchten Kohorten. Einer Konzentrationsrate von 0,10 der Patienten mit Rezidivneigung steht eine Rate von 0,055 bei Patienten ohne Rezidivneigung gegenüber. Dies erweist sich bei einem p-Wert von 0,04 als signifikante Differenz mit niedrigerer Konzentration der miR-425-5p bei den rezidivfreien Patienten.

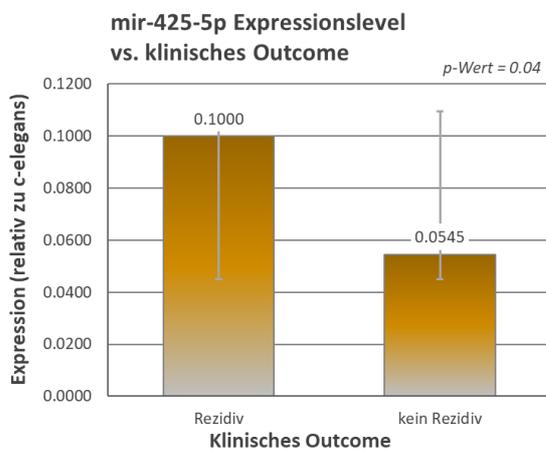


Abb. 5.5-11: miR-425-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome

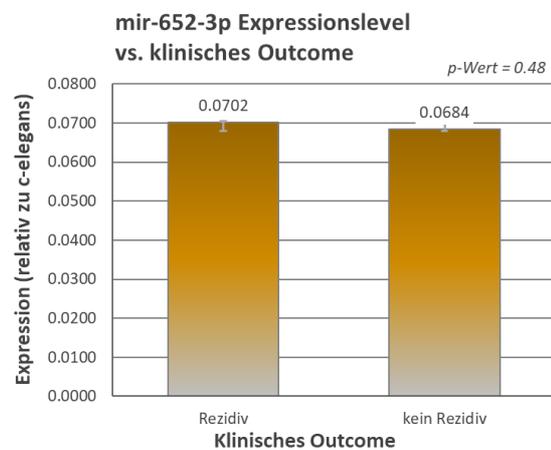


Abb. 5.5-12: miR-652-3p Expressionslevel vs. klinisches Outcome

Trotz einer mäßig hohen Gesamtkonzentrationsrate von 0,14 zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Konzentrationsraten der Vergleichsgruppen für die miR-652-3p. Bei Konzentrationswerten von 0,070 vs. 0,068 ist kein signifikanter Unterscheid darstellbar.

6 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es das miRNA-Profil von Patienten mit paroxysmalem bzw. persistierendem VHF, welche sich einer Katheterablation unterziehen zu untersuchen und mit dem Erfolg der Ablation zu korrelieren. Diese Ergebnisse könnten dann gegebenenfalls einer Therapie- bzw. Erfolgsstratifizierung vor Einleitung interventioneller Therapiemaßnahmen dienen.

6.1 Diskussion methodischer Aspekte

6.1.1 Plasmagewinnung

Die Isolation der miRNA zur Bestimmung der jeweiligen Expression erfolgte in der vorliegenden Studie aus Plasmaproben. Bisher gibt es grundsätzlich jedoch noch keine Einigkeit darüber, ob sich Plasma- oder Serumproben zum Nachweis zirkulierender miRNA besser eignen.

Ergebnisse von Wang et al. (Wang, Yuan et al. 2012) sowie Mitchell et al. (Mitchell, Parkin et al. 2008) nach denen sich im Serum eine höhere miRNA Konzentration nachweisen lässt, stehen hierbei im Kontrast zu Ergebnissen von McDonald et al. (McDonald, Milosevic et al. 2011), nach denen die miRNA Konzentration im Plasma höher sei.

Der Nachweis, dass weiße und rote Blutzellen als potenzielle Kontributoren den Anteil zirkulierender miRNA erhöhen (Pritchard, Kroh et al. 2012) könnte eine Erklärung dafür sein, dass durch Kontamination während des Koagulationsprozess der miRNA-Anteil im Serum erhöht wird. Zudem erfolgt die Separation von Plasma und Serum vom Vollblut durch verschiedene Methoden, welche zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Kontamination der Flüssigkeiten mit Blutzellen führen kann.

So führen Unterschiede in Zentrifugationsprotokollen zu Thrombozyten reichem oder armem Plasma (Mitchell, Parkin et al. 2008), sodass Empfehlungen bestehen durch doppelte Zentrifugationen (mit geringen Unterschieden in der Zeitdauer sowie der Umdrehungsgeschwindigkeit) diese Thrombozytenkontamination zu limitieren. (Cheng, Yi et al. 2013) (Moret, Sanchez-Izquierdo et al. 2013) (Fortunato, Boeri et al. 2014)

Grundsätzlich zeichnen sich sowohl EDTA als auch Citratröhrchen durch ihre mögliche Verwendbarkeit zur Gerinnungshemmung während der vorliegende Probesammlung aus (Kim, Linnstaedt et al. 2012). Dennoch sollten EDTA Röhrchen bevorzugt werden, da die Möglichkeit besteht, dass Citrat als Hämolysetrigger fungiert und somit wieder eine miRNA Konzentrationserhöhung durch Ausschüttung von miRNA aus hämolysierenden Zellen erfolgt. Eine Verwendung von Heparin zur Gerinnungshemmung wird aufgrund seiner Interferenz mit Calcium und Magnesium aus dem MasterMix der PCR Reaktion (siehe Kapitel 4.1.2.4) nicht empfohlen (Cui, Ma et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Plasmaproben bei -80°C gefroren. Diese Form der Probenlagerung nutzen auch Glinge et al. und konnten keine Minderung der Probenqualität durch eine Kühlung feststellen. (Glinge, Clauss et al. 2017)

Den Effekt der Kühlung auf die Stabilität der einzelnen miRNA sowie die Menge der Gesamt-miRNA im Serum analysierte die Arbeitsgruppe um Grasedieck et al. Neben unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur (RT), -20°C und -80°C) untersuchten sie ebenso die Auswirkung der Zeitdauer der Kühlung (short term = 10 Tage, intermediate-term = 20 Monate,

long-term = ca. 10 Jahre). Bei einer kurzzeitigen Lagerung konnte unabhängig der Lagerung bei -20°C oder -80°C keine signifikante Veränderung der Stabilität und Gesamtmenge der miRNA festgestellt werden. Lediglich die Lagerung bei RT zeigte eine Abnahme der miRNA-Konzentration. Dennoch waren alle untersuchten miRNA auch bei RT noch messbar. Im Rahmen der genannten Studie fanden sich auch bei der mittelfristig langen Lagerung nach 20 Monaten bei -20°C sowie bei -80°C keine Differenzen bezüglich der miRNA-Stabilität. Einzig die miR-93 zeigte eine signifikante Abnahme in ihrer Gesamtkonzentration bei einer Lagerung bei nur -20°C. Dies zeigt somit, dass sich zwar grundsätzlich keine großen Einflüsse der Lagerungstemperatur nachweisen lassen. Dennoch sollte zur vergleichenden Analyse die miRNA alle unter den identischen Bedingungen gewonnen und gelagert werden, um kleine Differenzen zu minimieren.

All dies war bei der vorliegenden Arbeit der Fall, so dass hier nicht von einem Bias durch die Probeverarbeitung bzw. -lagerung ausgegangen werden kann.

6.1.2 miRNA-Isolation

Aktuell gibt es zwei verschiedene Ansätze, welche als Standard für die miRNA Isolation gelten. Zum einen kann mit einem auf Guanidine/Phenol/Chloroform basierenden Protokoll gearbeitet werden zum anderen bieten mittlerweile verschiedene Hersteller sog. Column-based Kits an, bei denen die Isolation der miRNA über einen in der Tube integrierten Filter erfolgt. (Tiberio, Callari et al. 2015)

McDonald et al. (McDonald, Milosevic et al. 2011) sowie Sourvinou et al. (Sourvinou, Markou et al. 2013) erzielten mit kommerziellen Kits von Quiagen (miRNeasy Mini Kit) und Life Technologies (mirVana PARIS Kit) die höchste miRNA Ausbeute. Laut Kroh et al. (Kroh, Parkin et al. 2010) ist hierbei das Kit des Herstellers Quiagen nochmals etwas effizienter. Moret et al. (Moret, Sanchez-Izquierdo et al. 2013) gingen sogar so weit, dass sie drei verschiedene Hersteller-Kits mit einem konventionellen Trizol-Protokoll verglichen und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Column-based Variante eine höhere miRNA Ausbeute liefert. McAlexander et al. untersuchten zusätzlich zu den bereits genannten Kits das von Exiqon bereitgestellte miRNA Isolations-Kit. Sie konnten für diesen Hersteller eine nochmals höhere Effizienz nachweisen. Dies könnte unter anderem an den im Versuchsprotokoll angegebenen kürzeren Versuchszeiten liegen, da durch fehlende Phasenseparation eine deutlich zeitliche Ersparnis erzielt werden kann. (McAlexander, Phillips et al. 2013)

Entsprechend der dargestellten Studien entschieden wir uns für das Column-based Kit NucleoSpin miRNA Plasma von Macherey-Nagel. Ein direkter Vergleich dieses Produkts mit jenen von Quiagen oder Norgen zeigte vor allem in der Reinheit der RNA bessere Ergebnisse. Zudem war die direkte miRNA Ausbeute aus dem Serum bei Verwendung des NucleoSpin

miRNA Plasma Kits von Macherey-Nagel effektiver als jene der anderen Hersteller. (Monleau, Bonnel et al. 2014)

In Anbetracht dieser Daten ist davon auszugehen, dass die in der Arbeit verwendeten Techniken ein geeignetes und repräsentatives Verfahren zum qualitativen Vergleich darstellen und die Vergleichbarkeit zwischen den Patientenproben gegeben ist.

6.1.3 Reverse Transkription

Transkriptomische Messungen beinhalten beinahe ausnahmslos alle eine Reverse Transkription, welche dem vereinfachten quantitativen Nachweis durch die folgende qRT-PCR dient. Da somit nicht direkt die tatsächliche Menge miRNA gemessen wird, sondern die Menge der erfolgreich transkribierten cDNA, ist das Gesamtergebnis maßgeblich von der Effektivität der reversen Transkription abhängig.

Leider stellt die reverse Transkription ein sehr sensibles Verfahren da, welches verschiedene modifizierbare Faktoren beinhaltet. Hierbei sind die richtige Auswahl der Reversen Transkriptase sowie der PCR priming site, die Konzentration der Ziel- sowie sog. Hintergrund-RNA und die RNA Qualität zu nennen. All diese Faktoren beeinflussen den Erfolg der Reversen Transkription und sind grundsätzlich nicht einheitlich standardisiert. So wurde die Effizienz der Reversen Transkription bereits sehr variabel beschrieben mit Werten zwischen 0-102% (Levesque-Sergerie, Duquette et al. 2007) oder auch 39-65% (Schwaber, Andersen et al. 2019). Zudem ist es zur Vergleichbarkeit der einzelnen Proben relevant diese durch Verwendung einer sog. Spiked-in Kontrolle zu adjustieren. Weiteres hierzu siehe Kapitel 6.1.4.

6.1.4 Real-Time PCR

Die von uns angewandte qRT-PCR zur quantitativen Bestimmung der Expression der einzelnen miRNA gilt als sensitives Verfahren und wird als valides Standardverfahren regelmäßig eingesetzt. (Tiberio, Callari et al. 2015)

Zur komparativen Analyse verschiedener Plasmaproben müssen diese daher normalisiert und damit erst vergleichbar gemacht werden. Diese Normalisierung dient dazu technische Variabilitäten in der Aufarbeitung der Isolation auszugleichen.

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten:

Zum einen können exogen eingebrachte Referenzgene mit optimalerweise stabilen Expressionen zur Herstellung einer Ratio genutzt werden. Zumeist handelt es sich hierbei um synthetische, non-mammalian miRNA (z.B. der Spezies *Caenorhabditis elegans*, wie auch in der zugrundeliegenden Studie), deren Zugabe nach Addition der Denaturierungslösung während der RNA Extraktion erfolgt.

Zum anderen können endogene miRNA wie small non-coding RNAs oder eine bestimmte endogene miRNA genutzt werden. Außerdem ist es möglich den CT Durchschnittswert der

gemessenen miRNA als Referenz zu nutzen. Aufgrund fehlender einheitlicher Standards handelt es sich hierbei um ein kritisches Thema. (Zampetaki and Mayr 2012) Auch wenn die Errechnung einer Ratio mit einem Referenzgen eigentlich eine Vergleichbarkeit gewähren sollte, konnten Wotschofsky et al. nachweisen, dass dennoch Unterschiede feststellbar waren, was bei Komparation verschiedener Studien beachtet werden sollte. (Wotschofsky, Meyer et al. 2011)

In unserer Arbeit zeigten sich durch die die Anwendung des Referenzgens syn-cel-miR-39, durch welche die Bedingungen vergleichbar gemacht wurde, valide und reproduzierbare Ergebnisse, sodass von einer repräsentativen Ergebnisermittlung ausgegangen werden kann. Die Vergleichbarkeit von Studien untereinander ist jedoch aufgrund der fehlenden Uniformität der Methoden sehr kritisch zu sehen.

6.2 Diskussion des Patientenkollektivs

Bei einer Gesamtzahl von 418 eingeschlossenen Patienten lässt sich von quantitativ einem repräsentativen Kollektiv sprechen. Eine notwendige Anzahl an Studienteilnehmern ermöglicht es, dass ein Abbild einer heterogenen Grundgesamtheit an VHF-Erkrankten mit all ihren Merkmalsausprägungen - wie beispielsweise Begleiterkrankungen - Einzug in die Stichprobe erhält. Zudem werden die errechneten Ergebnisse durch eine möglichst große Studienpopulation genauer.

Insgesamt zeigt sich die demographische Verteilung der Studienpopulation äquivalent zur Demographie der Erkrankten innerhalb der Gesamtbevölkerung. Auch hier lässt sich nachweisen, dass VHF grundsätzlich eine Erkrankung des höheren Alters ist und seine Prävalenz mit steigendem Alter zunimmt. Auch dies unterstreicht nochmals den repräsentativen Charakter der gewählten Studienpopulation. In einer aktuellen deskriptiven Analyse von 2014 wurden die Baseline Charakteristika von 3049 Patienten mit bestehendem VHF erhoben, welche mit denen unseres Kollektivs vergleichbar sind. Zeigte sich in unserem Kollektiv ein mittleres Durchschnittsalter von 64 ± 11 Jahren waren die Patienten dieses Kollektivs durchschnittlich 68,8 Jahre alt. (Lip, Laroche et al. 2014)

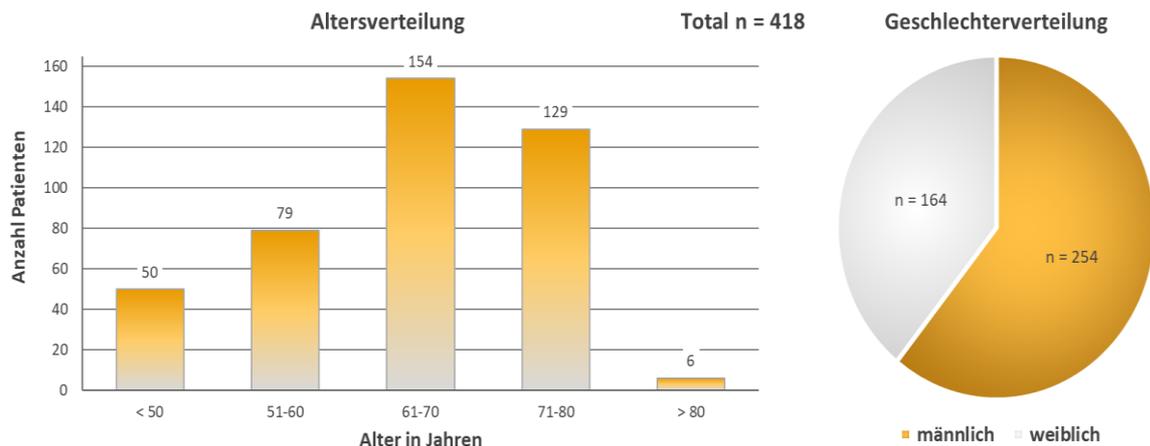


Abb. 6.2-1: Alters- und Geschlechterverteilung aller Patienten der Studie

Auch das vermehrte Auftreten der Rhythmusstörung beim männlichen Geschlecht entspricht den bisherigen epidemiologischen Untersuchungen von VHF-Patienten (Andrade, Deyell et al. 2018). Waren in unserer Studie 2/3 der Teilnehmer männlich, so zeigten sich in der oben erwähnten Studie ca. 59,6% der Patienten männlich (Lip, Laroche et al. 2014).

Im sogenannten EURObservational Research Programme Atrial Fibrillation (EORP-AF) Pilot General Registry (AFG) wurden die Baseline Charakteristika von Patienten mit VHF zusammengefasst. Auch in dieser Analyse war die am Häufigsten assoziierte Komorbidität die arterielle Hypertonie (70,9 %), welche in unserem Kollektiv zu 69% bestand. Die chronischen arteriellen Erkrankungen kamen mit 36,4% in dieser Studie häufiger vor als in unserem Kollektiv (21%) und auch ein Diabetes mellitus war mit 20,6% etwas häufiger als in unserer Kohorte errechnet (13%). (Lip, Laroche et al. 2014)

Im ESC-EHRA atrial fibrillation ablation long-term registry (AFA) untersuchten Arbelo et al (Arbelo, Brugada et al. 2017) speziell Patienten mit VHF und einer gleichzeitigen Ablationstherapie und arbeiteten deren Baseline Charakteristika heraus. Im Vergleich zum allgemeineren Kollektiv der Studie von 2014 wiesen auch diese Patienten als häufigste assoziierte Begleiterkrankung eine arterielle Hypertonie auf (54,6 %). Mit 18,9 % chronische arterielle Erkrankungen und 9,7 % an Patienten mit einem Diabetes mellitus waren diese Vorerkrankungen in dieser Subgruppenanalyse noch etwas geringer vorhanden als in unserem Kollektiv. Interessanterweise unterscheiden sich beide Kohorten in den echokardiographischen Kenngrößen deutlich weniger. Die durchschnittliche links-ventrikuläre Ejektionsfraktion betrug 52,4 % (AFG) bzw. 59,5 % (AFA). Der durchschnittliche Durchmesser des linken Atriums war 45,5 mm (AFG) bzw. 42,6 mm (AFA). Insgesamt lässt sich aus unseren Daten mit einer etwas höheren mittleren links-ventrikulären Ejektionsfraktion von $61 \pm 11\%$ und einem geringeren LA-Volumendiameter von $40 \pm 7\text{mm}$ spekulieren, dass es sich eventuell um ein etwas gesünderes Kollektiv handelt.

6.3 Diskussion der Ablationstherapie sowie der ermittelten Rezidivraten

Nach den aktuellen ESC Leitlinien gilt für die Rhythmuskontrolle eine Therapie mit antiarrhythmischen Medikamenten (anti arrhythmic drugs = AAD) als First-Line-Therapie.

Mit einer Klasse IIa Empfehlung gilt die Ablation damit noch nicht als Methode der ersten Wahl und kommt vor allem bei Therapieversagen oder Intoleranz gegenüber der medikamentösen Therapie sowohl bei paroxysmalen als auch persistierenden Formen zu tragen.

Im Hinblick auf aktuelle Studienergebnisse gilt es jedoch zu diskutieren, inwieweit diese Empfehlung noch seine Berechtigung hat und ob der Ablationstherapie nicht ein höherer Stellenwert im Rahmen einer langfristigen Rhythmuskontrolle zugestanden werden sollte. Insbesondere, wenn es gelingt, eine Erfolgsstratifizierung anhand von verschiedenen Prädiktoren durchzuführen.

Schon in der MANTRA-PAF Studie von 2012 zeigte sich, dass es keinen signifikanten Vorteil für die antiarrhythmische medikamentöse Therapie im Vergleich zur Ablationstherapie gab (p -Wert = 0,1). Verglichen wurden in der Studie beide Therapieformen als primäre Ansätze zur langfristigen Rhythmuskontrolle bei Patienten mit paroxysmalem VHF. Als primären Endpunkt der Studie definierte man das prozentuale Auftreten von VHF in einem Follow-up-Zeitraum von 2 Jahren. (Calkins, Hindricks et al. 2017) Diese Daten unterstütze auch die RAAFT-2 Studie von Morillo et al. aus dem Jahr 2014, welche sich mit dem Rezidivrisiko für atriale Tachykardien beschäftigte. Den primären Endpunkt, welcher in diesem Studiendesign als die Detektion einer mindestens 30 Sekunden anhaltenden atrialen Tachyarrhythmie definiert war, erreichten Patienten mit einer pharmakologischen Therapie sogar signifikant häufiger als Patienten mit einer Katheterablation (72,1% vs. 54,5%, p -Wert = 0,02). (Morillo, Verma et al. 2014)

So zeigt sich bei uns, verglichen mit den Daten von Morillo et al., bei Patienten mit paroxysmalem VHF eine nochmals geringere Rezidivrate nach Katheterablation (33,2% vs. 54,5%). Man muss jedoch relativierend anmerken, dass der Follow-up-Zeitraum der Studie von Morillo et al. mit 24 Monaten deutlich länger war als unsere Erhebung. Dennoch untersuchten wir hingegen deutlich mehr Patienten (208 Patienten mit paroxysmalen VHF vs. 127 Patienten), was eine stärkere Aussagekraft bedingt. Ergänzend kommt hinzu, dass es sich bei dem Kollektiv, welches Morillo et al. untersuchte um ein deutlich gesünderes Patientenkollektiv handelt. Ausschlusskriterien waren in deren Studie beispielsweise das Vorliegen einer Herzinsuffizienz oder einer arteriellen Hypertonie. Patienten mit diesen Vorerkrankungen waren hingegen in unserem Patientenkollektiv durchaus vertreten, was gerade in Hinsicht auf eine Erfolgs- und Therapiestratifizierung wichtig ist.

Um ein dem klinischen Alltag ähnliches Patientenkollektiv zu untersuchen, wählte die CASTLE-AF Studie ebenfalls ein Patientenkollektiv, in dem die Patienten zusätzlich zur Rhythmusstörung an einer Herzinsuffizienz litten. Als primären kombinierten Endpunkt legte

man sowohl die Gesamtmortalität als auch die Rehospitalisierung aufgrund einer progredienten Herzinsuffizienz fest. Hierbei zeigte sich, dass Patienten, die rein pharmakologisch behandelt wurden, den primären Endpunkt signifikant häufiger erreichten als Patienten nach einer Ablationstherapie (44,6% vs. 28,5%; $p= 0,006$). (Marrouche, Kheirkhahan et al. 2018) Es lässt sich also vermuten, dass Patienten mit VHF und einer Herzinsuffizienz von einer frühzeitigen interventionellen Therapie profitieren können.

6.4 Diskussion der Konzentration der einzelnen miRNA sowie ihre Korrelation zum VHF-Typ und Rezidiv nach Ablation

Als insgesamt pro-arrhythmogene miRNA mit Einfluss auf die elektrische Leitfähigkeit war die miR-1 in unseren Untersuchungen sehr gering konzentriert. So war die miR-1 bei Patienten mit paroxysmalem VHF im Blut nicht nachweisbar. Und auch bei Patienten mit persistierendem VHF war sie lediglich mit einer Konzentration von 0,0047 nachweisbar. Interessant ist aber, dass sie bei Patienten mit persistierendem VHF dann signifikant erhöht konzentriert vorkommt, wenn Patienten keine Rezidivneigung aufweisen.

Auf zellulärer Ebene werden der miR-1 verschiedene Funktionsmechanismen zugeordnet. Alle Mechanismen beeinflussen die elektrische Leitfähigkeit und bedingen durch Veränderung des Ablaufs der Herzaktion Arrhythmien (Wakili, Clauss et al. 2012).

In verschiedenen Untersuchungen war die miR-1 bei VHF jedoch unterschiedlich stark konzentriert, sodass sich auch die Untersuchungen auf zellulärer Ebene nicht immer erklären lassen. Zum einen scheint die miR-1 das Gen GJA1 und somit die direkte Zell-Zell-Verbindung durch Connexin-43 zu regulieren und führt so zu einer Verkürzung der atrialen Erregungsausbreitung (Vicenczova, Szeiffova Bacova et al. 2016) (Yang, Lin et al. 2007). Zum anderen beeinflusst die miR-1 die Gene KCNE1 und KCNB2, welche für den Kaliumkanal I_{Ks} codieren, und verlängert so die Repolarisationszeit (Jia, Zheng et al. 2013). Durch Inhibition der Translation der $B56\alpha$ -Untereinheit von PP2A sorgt die miR-1 für eine Hyperphosphorylierung des Ryanodinrezeptors und der dadurch entstehende ungeordnete Fluss der Kalziumionen mit einer spontanen diastolischen Ca^{2+} -Ausschüttung sorgt für späte Nachdepolarisationen (Terentyev, Belevych et al. 2009). All diese Einflüsse auf zellulärer Ebene und ihre Auswirkungen auf die Rhythmusentstehung können durch eine Überexpression von miR-1 erklärt werden.

Demgegenüber stehen Ergebnisse von Girtmatsion et al. Die Arbeitsgruppe untersuchte das linksatriale Gewebe von 31 Patienten mit VHF und verglich es mit Gewebe von Patienten ohne VHF. Es zeigte sich eine miR-1-Expressionsreduktion von ca. 86% bei Patienten mit VHF. Sie wiesen also nach, dass die miR-1 durch atriales Tachypaching supprimiert wird. Pathophysiologisch erklären sich die Autoren die Entstehung von VHF durch eine Suppression der miR-1 dadurch, dass der eigentlich inhibierende Einfluss auf das Gen KCNJ2 und sein

Protein Kir2.1 wegfällt und es zum vermehrten Einbau des Kanals I_{K1} mit einer konsekutiven Verlängerung der Repolarisation kommt. (Girmatsion, Biliczki et al. 2009) In unseren Untersuchungen zeigt sich die miR-1 in nur sehr geringer Konzentration nachweisbar und weist bei Patienten mit persistierendem VHF dann eine signifikant erhöhte Konzentration auf, wenn diese keine Rezidivneigung aufweisen. Somit sind unsere Ergebnisse vergleichbar mit denen von Girmatsion et al.

Somit gilt für die miR-1, dass weitere Untersuchungen zur Funktion auf zellulärer Ebene ebenso wichtig sind wie die Messung ihrer Konzentration im Blut von VHF-Patienten. In Bezug auf unsere Daten gilt es zu beachten, dass kein direkter Vergleich zur miR-1 Expression bei Patienten mit stabilem Sinusrhythmus erfolgte. Sprechen wir also von einer geringen miR-1 Expression ist nicht klar, ob diese nicht im Vergleich zu rhythmusstabilen Patienten dennoch erhöht ist.

Als ebenfalls pro-fibrotische miRNA gilt die miR-21. Pathophysiologisch schränkt diese durch Inhibition des Gens *SPRY1* die Funktion des Proteins *Spry-1* als Antagonist des Fibrosierungsfaktors ein und führt so zu atrialer Fibrosierung als strukturelles Korrelat von VHF. (Thum, Gross et al. 2008) (Cardin, Guasch et al. 2012) Diese These unterstützend konnten Chen et al. nachweisen, dass die Expression dieser miRNA in Fibroblasten ca. viermal höher war als in Kardiomyozyten (Chen, Wakili et al. 2014).

Entsprechend dieser pathophysiologischen Grundlagen wies die miR-21 in unseren Analysen die höchste Konzentration auf. Wir konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied bei Patienten mit paroxysmalem oder persistierendem VHF nachweisen. Auch innerhalb der Kohorten zeigt sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied für Patienten mit oder ohne Rezidivneigung. Anders war dies in einer Studie von Zhou et al. Die Arbeitsgruppe untersuchte speziell das miR-21-Konzentrationslevel im Rahmen einer Katheterablation und wies nach, dass Patienten, welche sechs Monate nach Ablation weiter im stabilen Sinusrhythmus waren, eine deutliche geringe miR-21-Konzentration zeigten, als jene, welche ein Rezidiv erlitten. Laut deren Daten zeigten 94,1% der Patienten, welche vor Ablation ein geringes miR-21-Level aufwiesen nach Ablation einen stabilen Sinusrhythmus. War die miR-21-Konzentration vor Ablation bereits deutlich erhöht, so lag die Wahrscheinlichkeit ein VHF-Rezidiv zu erleiden bei 87,5%. Auch dies scheint mit der pathophysiologisch pro-fibrotischen Funktion der miR-21 erklärbar zu sein. (Zhou, Maleck et al. 2018) Dass die miR-21 bei Patienten mit VHF verstärkt exprimiert wird, bestätigen auch Tao et al. In ihren Analysen verglichen sie die Expressionsrate der miR-21 bei Patienten mit VHF und einem stabilen Sinusrhythmus und konnten zeigen, dass die miR-21 bei Rhythmuspatienten erhöht exprimiert wird. (Tao, Zhang et al. 2018). Darüber hinaus konnten Da Silva et al. sogar einen Unterschied in der miR-21-Expressionsrate bei akutem neu-aufgetretenem VHF und einem bestehenden stabilen VHF feststellen: Bei stabilem VHF war die miR-21 0,6-fach geringer exprimiert als im akuten Auftreten. (da Silva,

de Araujo et al. 2018) Diese Studie ist besonders interessant, da sie eine Dynamik in der Ausschüttung der miR-21 während des Auftretens einer Arrhythmie aufzeigt.

Dem gegenüber stehen aktuelle Daten der miRhythm-Studie von McManus et al. Entgegen der bisherigen Veröffentlichungen war die miR-21-Expressionsrate in dieser Studie bei Patienten mit VHF um das Zweifache geringer exprimiert. Zusätzlich wiesen hier Patienten mit persistierendem VHF eine nochmals geringe Expressionsrate der miR-21 auf als Patienten mit paroxysmalem VHF. Es stellt sich also die ganz grundlegende Frage, ob die pro-fibrotische Funktion der miR-21, welche die Entstehung von VHF begünstigen würde, tatsächlich die einzige Funktion ist, welche bei der Genese eine Rolle spielt.

Während Studien wie die von Cardin et al. (Cardin, Guasch et al. 2012) oder Cheng et al. (Cheng and Zhang 2010) eben vor allem auf die pro-fibrotische Funktion der miR-21 hinweisen, ist es laut der miRhythm-Study ebenfalls möglich, dass die miR-21 verschiedene Kollagene beeinflusst und eine geringere miR-21-Expressionsrate eine vermehrte Kollagenproduktion nach sich zieht.

Ein weiterer interessanter Aspekt der miRhythm-Studie ist, dass es vier Wochen nach einer Ablationstherapie zu einem Anstieg des miR-21-Expressionslevels kam. Insofern könnte die miR-21 ein Rezidiv der Rhythmusstörung begünstigen. Hierbei wäre jedoch wieder eher die pro-fibrotische Funktion der miR-21 ein möglicher Triggerfaktor. (McManus, Tanriverdi et al. 2015)

Über zwei verschiedene Mechanismen kommt es durch eine verringerte Expression von miR-26a zu Arrhythmien.

Zum einen wird durch geringe miR-26a Expression die I_{K1} -UE vermehrt exprimiert, sodass es ähnlich wie bei der miR-1 zu einer Akzeleration der Repolarisationszeit kommt (Luo, Pan et al. 2013). Zudem fällt durch die Suppression der miR-26a durch NFATc3 ihr inhibierender Einfluss auf den Ca^{2+} -Kanal TRPC3 weg, wodurch die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zunimmt (Harada, Luo et al. 2012).

Das ist konsistent zu unseren Daten. In unserer Analyse war die miR-26 sowohl bei Patienten mit paroxysmalem als auch persistierenden VHF in nur geringer Konzentration vorhanden (0,084 bei paroxysmalem VHF und 0,123 bei persistierendem VHF). Dass ein geringes Konzentrationslevel dieser miR einen potenziellen Einfluss auf die Genese der Rhythmusstörung hat, zeigen auch aktuelle Daten von Feldman et al. Die Arbeitsgruppe untersuchte speziell die Konzentrationsrate zirkulierender miRNA bei Patienten, welche nach einer Herzoperation ein VHF entwickelten. Präoperative Messungen zeigten keinen Unterschied im Konzentrationslevel der miR-26 unabhängig davon, ob die Patienten postoperativ die Rhythmusstörung entwickelten oder nicht. Bei Patienten, welche postoperativ VHF entwickelten, zeigte sich jedoch ein Abfall der miR-26-Expression (p-Wert 0,01). Insofern

bestätigen auch diese Daten, dass eine geringe Expressionsrate der miR-26 die Entstehung von VHF begünstigt. Leider konnten wir jedoch keinen signifikanten Unterschied bei Patienten mit oder ohne Rezidivneigung nachweisen. Dennoch könnte man analog zur Untersuchung von Feldman et al. in einer erneuten Studie das miR-26-Level postinterventionell messen und so herausfinden, ob auch die Ablationstherapie einen Einfluss auf die miR-26-Expressionsrate nimmt und eventuell dadurch direkten Einfluss auf die Rezidivrate hat. (Feldman, Moreira et al. 2017)

Die These, dass ein geringes miR-26 Expressionslevel die Entstehung von VHF begünstigen könnte unterstützt auch die sog. miRathon-Studie von Clauss et al. Sie untersuchten das miR-Expressionslevel von 30 Marathonläufer, welche ein zehn wöchiges Trainingsprogramm absolvierten. Eingeteilt in zwei Gruppen je nach Trainingsstatus (Läufer mit > 55km/Woche oder < 40km/Woche) konnten sie nachweisen, dass das miR-26-Expressionslevel direkt nach Absolvierung des Marathons sowie 24h danach supprimiert war im Vergleich zum Expressionslevel zum Einschlusszeitpunkt. (Clauss, Wakili et al. 2016) Somit entspricht auch dieser Trend den von uns dargestellten Daten, dass ein geringes miR-26-Expressionslevel die Entstehung von VHF begünstigt.

Dieselbe Studie (miRathon-Studie) zeigte auch für die miR-29b den Trend einer verringerten Konzentration im Rahmen der sportlichen Aktivität. So war auch das Expressionslevel dieser miR direkt nach Absolvieren der Laufstrecke supprimiert. (Clauss, Wakili et al. 2016) In Untersuchungen von Dawson et al. (Dawson, Wakili et al. 2013) sowie Chen et al. (Chen, Wakili et al. 2014) konnte zudem ebenfalls gezeigt werden, dass die miR-29b bei Patienten mit VHF im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus geringer konzentriert ist. Durch die Suppression der miR-29b fehlt ihre inhibierende Wirkung auf die ECM-Gene bzw. deren Kollagene Col1A1 und Col3A1 sowie FBN. Insgesamt wird somit die Kollagenproduktion und die Fibrosierungsrate potenziell stimuliert.

Auch in unseren Messungen war die miR-29b mit einer Gesamtkonzentration von 0,0091 nur sehr gering konzentriert. Somit könnte auch aus unserer Sicht die pro-fibrotische Funktion der miR-29b einen Einfluss auf die Entstehung von VHF haben. Leider ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression der miR-29b zwischen beiden untersuchten Kohorten feststellen. Es konnte weder eine signifikante Konzentrationsdifferenz zwischen Patienten mit paroxysmale VHF oder persistierendem VHF gemessen werden noch zeigte sich innerhalb der Gruppen eine Tendenz bezüglich der Entwicklung von Rezidiven. Somit kann die miR-29b zwar funktionell mit der Entwicklung von VHF in Verbindung gebracht werden. Eine Therapiestratifizierung durch Messung von miR-29b-Expressionen scheint jedoch nicht vielversprechend. Es müsste zur weiteren Analyse genauere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv durchgeführt werden.

Die miR-146 war eine der vier am stärksten exprimierten miRNA in unserer Analyse. Zudem zeigte sich eine klare Tendenz der verstärkten Expression bei Patienten mit persistierendem VHF. Dies korreliert zum einen durchaus mit der pathophysiologisch beschriebenen Funktion der miR-146 als pro-fibrotische miRNA durch Inhibition des TIMP-4 und einer dadurch vermehrten Kollagenproduktion durch MMP-9 (van den Berg, Kawasaki et al. 2017). Darüber hinaus war die miR-146 unter anderem in einer Analyse von Cooley et al. die miRNA mit der höchsten Expressionsrate bei Patienten mit VHF (Cooley, Cowley et al. 2012). Wang et al. verglichen das miR-146-Expressionslevel in Gewebe des linken Atriums von Patienten mit VHF und jenen mit Sinusrhythmus. Auch hier zeigte sich ein erhöhtes Expressionslevel bei Patienten mit VHF. Zudem konnten sie eine Korrelation zwischen einem erhöhten miR-146-Expressionslevel und der Dauer des VHF herstellen, so dass auch diese Analyse unsere Ergebnisse unterstützen, in denen Patienten mit persistierendem VHF eine nochmals erhöhte miR-146-Expression aufwiesen. (Wang, Song et al. 2015)

In einem Kollektiv von 112 Patienten mit VHF wiesen Lu et al. ebenfalls eine signifikant erhöhte Expressionsrate für die miR-146 nach. Auch wenn es sich hierbei um ein deutlich kleineres Kollektiv handelt als in unserer Studie, so verglichen die Autoren hier die Expressionsraten mit denen von Patienten mit Sinusrhythmus, so dass sich zumindest eine detailliertere Aussage über die Funktion der miR-146 als Biomarker für das Auftreten von VHF machen lässt. (Lu, Hou et al. 2015)

Einzig die Tatsache, dass sich bei uns eine Korrelation zwischen einem erhöhten miR-146-Expressionslevel und einem stabilem Sinusrhythmus nach Ablationstherapie in der Gruppe der Patienten mit persistierendem VHF zeigte, ist pathophysiologisch nicht erklärbar. Dennoch sollte man aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse diese miR in weiteren Studien detaillierter untersuchen und an einer größeren Kohorte durchaus nochmals eine Messung in Bezug auf ihre potenzielle Funktion als prädiktiver Biomarker für den Verlauf nach Ablationstherapie durchführend. Zumal sich die oben beschriebene Korrelation zwischen einem erhöhten miR-146-Expressionslevel und einer Rezidivfreiheit nach Ablationstherapie in unserer Analyse zwar als nicht signifikant erwies (p-Wert 0,08), jedoch einen deutlichen Trend zeigt.

Die Literatur legt nahe, dass die miR-374 durch fibrotischen Umbau oder Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit eine kardiale Hypertrophie begünstigt und damit potenziell das Auftreten von Arrhythmien begünstigt. (Lee, Song et al. 2017). Die Vergrößerung des Herzens bedingt eine atriale Dilatation, wodurch die Leitungsgeschwindigkeit beeinflusst wird.

Auch wenn Ergebnisse von Condorelli et al. (Condorelli, Latronico et al. 2010) zeigen, dass die miR-374a im Gegensatz zur miR-374b hochreguliert sein sollte, konnten wir in dieser Hinsicht keine Differenzen detektieren. Mit Gesamtexpressionen von 0,1118 für die miR-374a

und 0,1298 für die miR-374b waren beide miRNA ähnlich konzentriert im Plasma nachzuweisen. Auch innerhalb der beiden Vergleichsgruppen ließen sich kaum Unterschiede nachweisen.

Patienten mit paroxysmalem VHF hatten zwar eine ca. zweifach erhöhte Konzentration der miR-374a (0,0811 vs. 0,0307 bei Patienten mit persistierenden VHF), dennoch war dieses Ergebnis nicht signifikant. Bei p-Werten von 0,8 (paroxysmal) und 0,4 (persistierend) konnte auch kein Unterschied in der Rezidivhäufigkeit zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Die miR-425-5p gilt als negativer Regulator des ANP. Durch die miR-425-5p-vermittelte Inhibition von ANP kommt es zur vermehrten Synthese von cGMP, TGF- β_1 und Angiotensin-II. Somit fördert die miR-425-5p den fibrotischen Umbau in kardialen Zellen und wirkt über diesen Mechanismus potenziell pro-arrhythmisch. (Vandenwijngaert, Ledsky et al. 2018) (Redondo, Bishop et al. 1998)

Bei einer Gesamtexpression von 0,715 ist die miR-425-5p bei Patienten mit paroxysmalem VHF ca. 3,5fach erhöht exprimiert verglichen zu Patienten mit persistierendem VHF.

Dennoch kann für Patienten mit paroxysmalem VHF trotz grundsätzlich hoher miR-425-5p-Konzentration kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Rezidivneigung festgestellt werden.

Anders verhält sich dies für Patienten mit einem persistierenden VHF. Auch wenn die Gesamtexpression bei Patienten mit persistierendem VHF niedriger ist, so ist diese miRNA bei Patienten mit einer Rezidivneigung bei einem p-Wert von 0,04 signifikant höher exprimiert. In Zusammenschau der bisherigen Untersuchungen zu den physiologischen Einflüssen der miRNA auf die fibrotischen Umbauten im kardialen Gewebe bedingen diese bei Patienten mit persistierendem VHF die Rezidivneigung. Durch weiter entstehende fibrotische Areale aufgrund der vermehrten Kollagensynthese über cGMP und der Expression von TGF- β_1 und Angiotensin-II kommt es trotz der Ablationstherapie zu neuen Re-entry-Kreisen. Diese scheinen bei Patienten ohne Rezidivneigung durch geringere miR-425-5p-Konzentrationen geringer ausgeprägt zu sein. Insofern scheinen die pathophysiologischen Zusammenhänge durchaus schlüssig. Es gibt bisher aber keine weiteren Studien, welche speziell die Funktion der miR-425-5p in Bezug auf VHF untersuchten. Insofern sollte diese miRNA in weiteren Untersuchungen genauer analysiert werden.

Ähnlich der miR-374 wird auch die miR-652 mit der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie in Verbindung gebracht. Auch wenn die miRNA in unseren Messungen hoch exprimiert war, so zeigt sich leider kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit paroxysmalem oder persistierendem VHF. (Bernardo, Nguyen et al. 2014)

Für Patienten mit einem paroxysmalen VHF lässt sich dafür ein signifikanter Unterschied in der Expressionsrate der miR-652 innerhalb der Vergleichsgruppen nach ihrer Rezidivneigung nachweisen (Rezidiv 0,29 vs. Non-Rezidiv 0,09, p-Wert 0,03). Es zeigt sich hier eine signifikant höhere Konzentration bei Patienten, welche eine Rezidivneigung aufweisen. In Hinblick auf die physiologischen Einflüsse beeinflusst die miR-652-vermittelte kardiale Hypertrophie somit die Entwicklung eines Rezidivs nach Ablationstherapie. Insofern ist die miR-652 ein interessanter Kandidat zur Nutzung als Biomarker zur Therapiestratifizierung vor einer interventionellen Therapie.

Für Patienten mit persistierendem VHF ließ sich dieser Expressionsunterschied bei Patienten mit und ohne Rezidivneigung nicht signifikant replizieren. Bei einem p-Wert von 0,48 waren die Expressionswerte nicht signifikant unterschiedlich ausgeprägt.

Auch für die miR-652 gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine weiteren Untersuchungen an einem VHF Kollektiv. Insofern scheint die miR-652 besonders interessant zu sein und sollte für weitere Differenzierungen an einem größeren Kollektiv getestet werden. Vor allem da sie sich in Zusammenschau der hier untersuchten miRNA am ehesten zur Therapiestratifizierung und somit als prospektiver Biomarker eignet, ist es aus unserer Sicht vielversprechend diese miRNA weiter zu untersuchen.

6.5 Diskussion der Rolle der miRNA als Biomarker für die Ablationstherapie

In einem nächsten Schritt kamen wir zu der Frage, ob die von uns gemessenen miRNAs potenziell als prädiktive Biomarker für das langfristige erfolgreiche Anhalten eines Sinusrhythmus nach Ablation fungieren können. Insofern analysierten wir das erstellte miRNA-Expressionsprofil in Hinblick auf die erhobenen Follow-up-Daten und korrelierten die miRNA-Level mit den Rezidivraten der Patienten. Für die miR-1, miR-29b, miR-146, miR-425 und miR-652 gab es durchaus sichtbare Tendenzen für eine vermehrte Konzentration bei Patienten mit oder ohne Rezidivneigung.

Bei Patienten mit einem paroxysmalen VHF ist unseren Daten zufolge vor allem die miR-652 vielversprechend. Diese war bei Patienten, welche ein Rezidiv erlitten, besonders stark exprimiert. Gerade weil es wie oben bereits beschrieben zur miR-652 keine Daten in Bezug auf VHF gibt, stellt diese, unserer Ansicht nach, einen hoch interessanten Kandidaten für weitere Analysen dar.

Bei Probanden mit persistierendem VHF war die miR-1 bei Patienten ohne Rezidivneigung signifikant erhöht. Für die miR-29b und miR-146 zeigte sich hier ebenfalls eine Tendenz, welche sich aber leider als nicht signifikant erwies. Die miR-425 war besonders bei Patienten mit Rezidivneigung signifikant erhöht.

Bezüglich dieser detaillierten Fragestellung gibt es bisher keine weiteren Publikationen, welche die von uns untersuchten miRNA miteinschließt. Eine im März 2020 veröffentlichte Studie von Kiliszek et al. beschäftigte sich zwar mit genau der Fragestellung und der Suche nach einem Biomarker, welcher die Erfolgchancen einer Ablationstherapie quantifizieren könnte, doch wurden hier andere miRNA gemessen. Leider konnte insgesamt keine statistische Signifikanz für Unterschiede im Serum-Konzentrationslevel der miRNA bei Patienten mit und ohne VHF-Rezidiv nach Ablationstherapie detektiert werden. Auch die Autoren dieser Studie benennen die aktuelle miRhythm-Studie, welche eine Dynamik der miR-21 innerhalb eines Monats nach Ablationstherapie aufzeigte. Dennoch muss hier wie bereits beschrieben zuerst genauer identifiziert werden, ob nun eine erhöhte oder eine erniedrigte miR-21-Expression die Entstehung von VHF tatsächlich begünstigt. Zudem ist es zwar klinisch interessant zu sehen, dass sich eine grundsätzliche Dynamik innerhalb der miR-Ausschüttung zeigt, dennoch wäre ein Biomarker nur dann von Vorteil, wenn er bereits präinterventionell eine definitive Aussage über die langfristige Erfolgsrate der Ablation erlaubt. (Kiliszek, Maciak et al. 2020)

Aus den Daten der miRhythm-Studie heraus beschäftigten sich Vaze et al. detaillierter mit der Fragestellung eines möglichen Prädiktors einer erfolgreichen Ablationstherapie. Aus allen dort gemessenen miRNA zeigten sich fünf miRNA als statistisch relevant. Die miR-125a, miR-601, miR-30a, miR-199b, miR-10b konnten mit einem VHF-Rezidiv assoziiert werden. Leider gibt es auch hier keine Übereinstimmung mit den von uns gemessenen miRNAs. (McManus, Tanriverdi et al. 2015)

Insgesamt kann man also sagen, dass sich durchaus Tendenzen ergeben, die darauf hinweisen, dass sich miRNA als prädiktive Biomarker eignen. Es ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch noch nicht möglich eine miRNA zu benennen, welche die Funktion erfüllen könnte.

Es gilt somit, dass weitere Untersuchungen in Hinblick auf die prädiktive Funktion der miRNA durchgeführt werden sollten. Es ist sinnvoll miRNA wie beispielsweise die miR-1, miR-425 und miR-652, welche laut unseren Daten durchaus als prädiktive Marker genutzt werden können, um eine Aussage über die Erfolgsrate der Ablationstherapie zu geben, weiter an einem größeren Kollektiv zu testen.

Gleichzeitig muss für all diese miRNA immer bedacht werden, dass sie potenziell auch ubiquitär zirkulieren könnten und somit eine Ausschüttung aus anderen Organen die Werte durchaus beeinflussen könnten. Insofern ist eine Korrelation der gemessenen miRNA-Expressionen bei Patienten mit VHF zu Patienten mit einem stabilen Sinusrhythmus

essenziell. Nur so kann verhindert werden, hohe miRNA Werte aus dem Plasma fälschlicherweise als VHF-assoziiert zu betrachten.

In der onkologischen Medizin spielen Prädiktoren im Allgemeinen und miRNA als solche im speziellen seit langem eine große Rolle und beeinflussen maßgeblich die Therapiestratifizierung (Li and Kowdley 2012) (Shao, Yang et al. 2019) (Chhatriya, Mukherjee et al. 2019). So gilt beispielsweise die miR-21 als möglicher Biomarker bei Patienten mit Gliomen. Eine aktuelle Meta-Analyse von neun eingeschlossenen Studien zeigte, dass ein erhöhtes miR-21-Level mit einem schlechteren Outcome bei Gliompatienten korreliert. Insofern ist es aus Sicht der Autoren durchaus möglich die miR-21 als prognostischen Marker zu verwenden. Sie weisen jedoch auch deutlich darauf hin, dass es zuerst einmal nötig sein wird einen Standard-Cut-Off-Wert zu definieren. Zudem müsse die Bestimmung der miR-21-Expression standardisiert werden, um die Genauigkeit und vor allem Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten. (Jiang, Mu et al. 2020) Auch bei Patienten mit kolorektalem Karzinom gilt die miR-21 als potenzieller prognostischer Marker. Eine hohe miR-21-Expression zeigte eine starke Assoziation zu einem verminderten therapeutischen Ansprechen und einer insgesamt verringerten Überlebensrate. (Schetter, Leung et al. 2008)

Auch für das Auftreten kardiovaskuläre Erkrankungen wurden bereits Korrelationen zum Plasmaspiegel von miRNA hergestellt (Kaur, Mackin et al. 2019) . So zeigt beispielsweise eine aktuelle Studie von Wu et al., dass es eine deutliche Down-Regulation der miR-145 bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom verglichen mit gesunden Kontrollpatienten gibt. Auch wenn es sich bei der Studie mit insgesamt 160 Patienten (80 Patienten mit ACS und 80 Patienten der Kontrollgruppe) um ein eher kleines Kollektiv handelt, so konnte die Ergebnisse durch ein ergänzendes Tiermodell untermauert werden. Hinweise auf eine vermehrte inflammatorische Reaktion durch verringerte miR-145-Expressionslevel bei erhöhten Entzündungsparametern (z.B. erhöhter von-Willebrand-Faktor (vWF), erhöhtes IL-6 und erhöhter TNF- α) konnte durch gezielte Ligatur der Koronararterien von Ratten ausgelöst werden. (Wu, Sun et al. 2020)

6.6 Limitationen der Arbeit

Da es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine prospektive Langzeitstudie handelt, müssen die dafür vorgesehenen Voraussetzungen erfüllt werden.

Wie gefordert wählten wir ein prospektives Design mit mehreren Messzeitpunkten zur Erfassung des klinischen Outcomes im zeitlichen Verlauf sowie einen Mehrebenenansatz mit simultaner Erfassung von eventuellen Kofaktoren und deren Korrelation.

Zudem verwendeten wir reliable und valide Messmethoden. Das heißt, dass sich die Messmethoden in vorangegangenen Studien bereits als zuverlässig und reproduzierbar gezeigt hatten.

Grundlage dieser Untersuchung war die Frage, ob über die Expressionsrate der einzelnen miRNA eine prädiktive Aussage über das klinische Outcome nach Ablationstherapie getroffen werden kann. Die Auswahl des Patientenkollektivs erfolgte daher gezielt im Rahmen einer VHF-Behandlung und wir führten eine Subgruppenanalyse durch Einteilung nach Art des VHF durch. Man verglich somit lediglich die Expressionsraten von miRNA bei Patienten, die unter der Rhythmusstörung litten. Inwiefern die miRNA bei Patienten mit bestehendem Sinusrhythmus ausgeprägt sind bzw. ob die reine Präsenz der miRNA mit dem Auftreten einer Arrhythmie zusammenhängt war kein Untersuchungspunkt dieser Studie.

Eine große Problematik in Studien mit miRNA und ihrem klinischen Zusammenhang mit einer bestimmten Erkrankung ist, dass miRNA grundsätzlich ganz ubiquitär vorkommen und nachweislich in Prozessen verschiedener Organe eine Rolle spielen. Insofern ist es schwierig die absoluten Angaben einer miRNA-Expressionsrate direkt mit nur einer Grunderkrankung, in dieser Studie dem VHF, in Verbindung zu bringen. Man muss immer bedenken, dass bestimmte miRNA eventuell auch aufgrund einer zweiten Erkrankung eine veränderte Expressionsrate aufweist. Gerade deshalb wäre es wichtig, in einer erneuten Analyse die miRNA auch bei Patienten mit stabilen Sinusrhythmus zu bestimmen, um den direkten Zusammenhang mit dem Vorhandensein von VHF darstellen zu können.

7 Zusammenfassung

VHF ist die häufigste kardiale Arrhythmie. Mit dem demographischen Wandel steigt die Prävalenz dieser Erkrankung des höheren Alters zunehmend und ist somit im klinischen Alltag eine häufig gestellte Diagnose. Zudem ist es multifaktoriell beeinflusst und häufig assoziiert mit weiteren Risikofaktoren wie einem arteriellen Hypertonus, einer strukturellen Herzerkrankung oder Vitien ebenso wie mit extrakardialen Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Schilddrüsendysfunktionen. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es sowohl pharmakologische als auch invasive Therapieansätze, wobei gerade die interventionelle Ablationstherapie immer mehr in den Vordergrund rückt. Dennoch sind die Erfolgsraten eines langfristigen Therapieerfolgs bisher nicht zufriedenstellend. Gerade in Hinblick auf eine immer individualisiertere Medizin gilt es auch für die Therapie des VHF eine bessere Therapiestratifizierung zu etablieren, um somit die bestmögliche Therapie frühzeitig einleiten zu können. In den letzten Jahren werden daher immer mehr Untersuchungen durchgeführt, um mögliche prädiktive Marker zu eruieren und hierüber eine verbesserte prognostische Aussage über einen möglichen Therapieerfolg treffen zu können.

Ein wichtiger Ansatz ist hierbei die Forschung zu miRNA, welche als potenzielle prognostische Marker in der Therapiestratifizierung des VHF gelten.

In dieser Arbeit beschäftigen wir uns daher dezidiert mit der Frage nach einzelnen miRNA, welche bereits durch Bestimmung ihrer präinterventionellen Konzentration eine Aussage über den Therapieerfolg der invasiven Ablationstherapie geben könnten.

Wir untersuchten daher Plasmaproben von 418 Patienten mit paroxysmalem und persistierendem VHF und bestimmten die miRNA-Konzentration von elf ausgewählten miRNA. Hierfür verwendeten wir bereits etablierte Methoden wie miRNA-Isolation, reverse Transkription und Real-Time-PCR. Nach Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen miRNA erfolgte eine statistische Auswertung mit dem Vergleich der einzelnen miRNA-Konzentrationen je nach Art des VHF. Insbesondere erfolgte aber eine Korrelation der Rezidivneigung nach einer Ablation innerhalb einer Kohorte mit den miRNA-Konzentrationen. Hierzu wurde ein klinisches Follow-up erhoben, in welchem die Rezidivneigung der Patienten nach drei, sechs und zwölf Monaten festgehalten wurde. Ebenso wurden klinische Patientencharakteristika erhoben.

In Bezug auf die zugrundeliegende Fragestellung gab es insgesamt drei miRNA, welche signifikante Konzentrationsunterschiede aufwiesen, wenn Patienten im gewählten Follow-up-Zeitraum eine Rezidivneigung hatten oder im stabilem SR verblieben.

Für Patienten mit einem paroxysmalen VHF ist die miR-652 ein möglicher prognostischer Marker. Eine erhöhte Konzentration dieser miR war in unserer Studie ein signifikanter Hinweis auf eine bestehende Rezidivneigung. Bei einem persistierenden VHF waren die miR-1 sowie die miR-425 entscheidende miRNA. Die miR-1 war bei Patienten, welche im Follow-up-Zeitraum im stabilen SR verblieben, in einer erhöhten Konzentration nachweisbar. Die miR-425 hingegen war bei diesen Patienten vermindert exprimiert und ist damit eher ein prognostischer Marker für eine Rezidivneigung.

Da die miR-652 sowie die miR-425 bei Patienten mit erhöhter Rezidivrate vermehrt exprimiert waren, können sie als prädiktiver Marker für einen negativen Therapieverlauf hinzugezogen werden.

Insgesamt steht die Forschung der miRNA und ihre Rolle als potenzielle prognostische Biomarker noch ganz am Anfang und zukünftige Projekte werden zeigen, ob sie einen Weg in den klinischen Alltag finden werden.

8 Ausblick

In Bezug auf atriale Rhythmusstörungen liegt der Fokus der Forschung mit Sicherheit weiter auf der Entschlüsselung der zugrundeliegenden Pathophysiologie. Gleichzeitig wird aber auch

das Verständnis über die Struktur des Vorhofs als Ursprung atrialer Rhythmusstörungen immer bedeutender.

Aus klinischer Sicht rückt die Frage nach einer optimalen präinterventionellen Therapiestratifizierung durch geeignete Biomarker sowie eine Optimierung der Therapiestrategien durch verbesserte prozedurale Mechanismen in den Vordergrund.

In diesem Zusammenhang scheint die Rolle der miRNA immer weiter zu wachsen. Als wichtige pathophysiologische Einflussfaktoren können die miRNA als Ansatzpunkt für Therapeutika wie Antagomirs oder LNAs dienen. Auch wenn ein Einsatz in diesem Rahmen noch in der Zukunft liegt, scheint ihr Einsatz als Biomarker immer wahrscheinlicher.

Gerade im Zuge einer personalisierten Medizin ist eine optimierte Differenzierung des Therapieerfolgs anhand der miRNA als Biomarker von großer Bedeutung und wird in das Zentrum zukünftiger Forschungen rücken.

MiRNA kommen nachweislich nicht nur zirkulierend im Blut vor, sondern sind ebenso lokal im Gewebe messbar. Es scheint insofern interessant zu sein, ob die Erstellung eines miRNA Profils im atriale Gewebe von Patienten mit VHF dem aus Vollblut nahekommt. Eventuell lassen sich in lokalen Geweben detailliertere Aufstellungen nachweisen und somit eine genauere Aussage über die Expression von miRNA bei VHF treffen. Ebenso ist denkbar, dass man eine ähnliche Auswertung und Korrelation der miRNA Expression und des jeweiligen Outcomes nach einer interventionellen Therapie erstellt werden kann. In Kombination mit der peripheren Messung der miRNA Konzentration im Vollblut könnte somit eine verbesserte Vorhersage über das klinische Outcome nach Ablation getroffen werden. Dies könnte helfen, die optimale Therapie für den individuellen Patienten zu finden.

9 Literaturverzeichnis

- Adam, O., B. Lohfelm, T. Thum, S. K. Gupta, S. L. Puhl, H. J. Schafers, M. Bohm and U. Laufs (2012). "Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis." Basic Res Cardiol **107**(5): 278.
- Alonso, A., B. P. Krijthe, T. Aspelund, K. A. Stepas, M. J. Pencina, C. B. Moser, M. F. Sinner, N. Sotoodehnia, J. D. Fontes, A. C. Janssens, R. A. Kronmal, J. W. Magnani, J. C. Witteman, A. M. Chamberlain, S. A. Lubitz, R. B. Schnabel, S. K. Agarwal, D. D. McManus, P. T. Ellinor, M. G. Larson, G. L. Burke, L. J. Launer, A. Hofman, D. Levy, J. S. Gottdiener, S. Kaab, D. Couper, T. B. Harris, E. Z. Soliman, B. H. Stricker, V. Gudnason, S. R. Heckbert and E. J. Benjamin (2013). "Simple risk model predicts incidence of atrial fibrillation in a racially and geographically diverse population: the CHARGE-AF consortium." J Am Heart Assoc **2**(2): e000102.
- Andrade, J. G., M. W. Deyell, A. Y. K. Lee and L. Macle (2018). "Sex Differences in Atrial Fibrillation." Can J Cardiol **34**(4): 429-436.
- Arbelo, E., J. Brugada, C. Blomstrom-Lundqvist, C. Laroche, J. Kautzner, E. Pokushalov, P. Raatikainen, M. Efremidis, G. Hindricks, A. Barrera, A. Maggioni, L. Tavazzi, N. Dagres and E. S. C. E. A. F. A. L.-t. R. I. on the behalf of the (2017). "Contemporary management of patients undergoing atrial fibrillation ablation: in-hospital and 1-year follow-up findings from the ESC-EHRA atrial fibrillation ablation long-term registry." Eur Heart J **38**(17): 1303-1316.
- Arias, M. A., A. M. Sanchez, A. Alonso-Fernandez and F. Garcia-Rio (2007). "Atrial fibrillation, obesity, and obstructive sleep apnea." Arch Intern Med **167**(14): 1552-1553; author reply 1553.
- Arora, P., C. Wu, A. M. Khan, D. B. Bloch, B. N. Davis-Dusenbery, A. Ghorbani, E. Spagnolli, A. Martinez, A. Ryan, L. T. Tainsh, S. Kim, J. Rong, T. Huan, J. E. Freedman, D. Levy, K. K. Miller, A. Hata, F. Del Monte, S. Vandenwijngaert, M. Swinnen, S. Janssens, T. M. Holmes, E. S. Buys, K. D. Bloch, C. Newton-Cheh and T. J. Wang (2013). "Atrial natriuretic peptide is negatively regulated by microRNA-425." J Clin Invest **123**(8): 3378-3382.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.
- Benjamin, E. J., D. Levy, S. M. Vaziri, R. B. D'Agostino, A. J. Belanger and P. A. Wolf (1994). "Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study." JAMA **271**(11): 840-844.
- Benjamin, E. J., P. A. Wolf, R. B. D'Agostino, H. Silbershatz, W. B. Kannel and D. Levy (1998). "Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study." Circulation **98**(10): 946-952.
- Bernardo, B. C., S. S. Nguyen, C. E. Winbanks, X. M. Gao, E. J. Boey, Y. K. Tham, H. Kiriazis, J. Y. Ooi, E. R. Porrello, S. Igoor, C. J. Thomas, P. Gregorevic, R. C. Lin, X. J. Du and J. R. McMullen (2014). "Therapeutic silencing of miR-652 restores heart function and attenuates adverse remodeling in a setting of established pathological hypertrophy." FASEB J **28**(12): 5097-5110.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski and D. Gorlich (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA **10**(2): 185-191.
- Bunch, T. J., H. T. May, T. L. Bair, V. Jacobs, B. G. Crandall, M. Cutler, J. P. Weiss, C. Mallender, J. S. Osborn, J. L. Anderson and J. D. Day (2016). "The Impact of Age on 5-Year Outcomes After Atrial Fibrillation Catheter Ablation." J Cardiovasc Electrophysiol **27**(2): 141-146.
- Burstein, B. and S. Nattel (2008). "Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation." J Am Coll Cardiol **51**(8): 802-809.
- Cadby, G., N. McArdle, T. Briffa, D. R. Hillman, L. Simpson, M. Knuiman and J. Hung (2015). "Severity of OSA is an independent predictor of incident atrial fibrillation hospitalization in a large sleep-clinic cohort." Chest **148**(4): 945-952.
- Calkins, H., G. Hindricks, R. Cappato, Y. H. Kim, E. B. Saad, L. Aguinaga, J. G. Akar, V. Badhwar, J. Brugada, J. Camm, P. S. Chen, S. A. Chen, M. K. Chung, J. C. Nielsen, A. B.

Curtis, D. W. Davies, J. D. Day, A. d'Avila, N. de Groot, L. Di Biase, M. Duytschaever, J. R. Edgerton, K. A. Ellenbogen, P. T. Ellinor, S. Ernst, G. Fenelon, E. P. Gerstenfeld, D. E. Haines, M. Haissaguerre, R. H. Helm, E. Hylek, W. M. Jackman, J. Jalife, J. M. Kalman, J. Kautzner, H. Kottkamp, K. H. Kuck, K. Kumagai, R. Lee, T. Lewalter, B. D. Lindsay, L. Macle, M. Mansour, F. E. Marchlinski, G. F. Michaud, H. Nakagawa, A. Natale, S. Nattel, K. Okumura, D. Packer, E. Pokushalov, M. R. Reynolds, P. Sanders, M. Scanavacca, R. Schilling, C. Tondo, H. M. Tsao, A. Verma, D. J. Wilber and T. Yamane (2017). "2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation." *Heart Rhythm* **14**(10): e275-e444.

Camm, A. J., P. Kirchhof, G. Y. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, R. De Caterina, J. De Sutter, A. Goette, B. Gorenek, M. Heldal, S. H. Hohloser, P. Kolh, J. Y. Le Heuzey, P. Ponikowski, F. H. Rutten and E. S. C. C. f. P. Guidelines (2010). "Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)." *Europace* **12**(10): 1360-1420.

Cappato, R., H. Calkins, S. A. Chen, W. Davies, Y. Iesaka, J. Kalman, Y. H. Kim, G. Klein, A. Natale, D. Packer, A. Skanes, F. Ambrogi and E. Biganzoli (2010). "Updated worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation." *Circ Arrhythm Electrophysiol* **3**(1): 32-38.

Cappato, R., F. E. Marchlinski, S. H. Hohnloser, G. V. Naccarelli, J. Xiang, D. J. Wilber, C. S. Ma, S. Hess, D. S. Wells, G. Juang, J. Vijgen, B. J. Hugl, R. Balasubramaniam, C. De Chillou, D. W. Davies, L. E. Fields, A. Natale and V.-A. Investigators (2015). "Uninterrupted rivaroxaban vs. uninterrupted vitamin K antagonists for catheter ablation in non-valvular atrial fibrillation." *Eur Heart J* **36**(28): 1805-1811.

Cardin, S., E. Guasch, X. Luo, P. Naud, K. Le Quang, Y. Shi, J. C. Tardif, P. Comtois and S. Nattel (2012). "Role for MicroRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure." *Circ Arrhythm Electrophysiol* **5**(5): 1027-1035.

Carver, W. and E. C. Goldsmith (2013). "Regulation of tissue fibrosis by the biomechanical environment." *Biomed Res Int* **2013**: 101979.

Chamberlain, A. M., S. K. Agarwal, A. R. Folsom, S. Duval, E. Z. Soliman, M. Ambrose, L. E. Eberly and A. Alonso (2011). "Smoking and incidence of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study." *Heart Rhythm* **8**(8): 1160-1166.

Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." *Cell Res* **18**(10): 997-1006.

Chen, Y., S. Surinkaew, P. Naud, X. Y. Qi, M. A. Gillis, Y. F. Shi, J. C. Tardif, D. Dobrev and S. Nattel (2017). "JAK-STAT signaling and the atrial fibrillation promoting fibrotic substrate." *Cardiovasc Res*.

Chen, Y., R. Wakili, J. Xiao, C. T. Wu, X. Luo, S. Clauss, K. Dawson, X. Qi, P. Naud, Y. F. Shi, J. C. Tardif, S. Kaab, D. Dobrev and S. Nattel (2014). "Detailed characterization of microRNA changes in a canine heart failure model: Relationship to arrhythmogenic structural remodeling." *J Mol Cell Cardiol* **77**: 113-124.

Cheng, H. H., H. S. Yi, Y. Kim, E. M. Kroh, J. W. Chien, K. D. Eaton, M. T. Goodman, J. F. Tait, M. Tewari and C. C. Pritchard (2013). "Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels." *PLoS One* **8**(6): e64795.

Cheng, Y. and C. Zhang (2010). "MicroRNA-21 in cardiovascular disease." *J Cardiovasc Transl Res* **3**(3): 251-255.

Chhatriya, B., M. Mukherjee, S. Ray, P. Sarkar, S. Chatterjee, D. Nath, K. Das and S. Goswami (2019). "Comparison of tumour and serum specific microRNA changes dissecting their role in pancreatic ductal adenocarcinoma: a meta-analysis." *BMC Cancer* **19**(1): 1175.

Clauss, S., M. F. Sinner, S. Kaab and R. Wakili (2015). "The Role of MicroRNAs in Antiarrhythmic Therapy for Atrial Fibrillation." *Arrhythm Electrophysiol Rev* **4**(3): 146-155.

Clauss, S., R. Wakili, B. Hildebrand, S. Kaab, E. Hoster, I. Klier, E. Martens, A. Hanley, H. Hanssen, M. Halle and T. Nickel (2016). "MicroRNAs as Biomarkers for Acute Atrial Remodeling in Marathon Runners (The miRathon Study--A Sub-Study of the Munich Marathon Study)." PLoS One **11**(2): e0148599.

Condorelli, G., M. V. Latronico and G. W. Dorn, 2nd (2010). "microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets?" Eur Heart J **31**(6): 649-658.

Cooley, N., M. J. Cowley, R. C. Lin, S. Marasco, C. Wong, D. M. Kaye, A. M. Dart and E. A. Woodcock (2012). "Influence of atrial fibrillation on microRNA expression profiles in left and right atria from patients with valvular heart disease." Physiol Genomics **44**(3): 211-219.

Cui, W., J. Ma, Y. Wang and S. Biswal (2011). "Plasma miRNA as biomarkers for assessment of total-body radiation exposure dosimetry." PLoS One **6**(8): e22988.

da Silva, A. M. G., J. N. G. de Araujo, K. M. de Oliveira, A. E. M. Novaes, M. B. Lopes, J. C. V. de Sousa, A. A. A. Filho, A. D. Luchessi, A. A. de Rezende, M. H. Hirata and V. N. Silbiger (2018). "Circulating miRNAs in acute new-onset atrial fibrillation and their target mRNA network." J Cardiovasc Electrophysiol **29**(8): 1159-1166.

Daniels, L. B., N. S. Lee and J. C. Hsu (2016). "Natriuretic Peptides for Predicting Left Atrial Reverse Remodeling After Atrial Fibrillation Ablation: Too Much of a Stretch?" JACC Clin Electrophysiol **2**(2): 159-161.

Dawson, K., R. Wakili, B. Ordog, S. Clauss, Y. Chen, Y. Iwasaki, N. Voigt, X. Y. Qi, M. F. Sinner, D. Dobrev, S. Kaab and S. Nattel (2013). "MicroRNA29: a mechanistic contributor and potential biomarker in atrial fibrillation." Circulation **127**(14): 1466-1475, 1475e1461-1428.

Deng, H., Y. Bai, A. Shantsila, L. Fauchier, T. S. Potpara and G. Y. H. Lip (2017). "Clinical scores for outcomes of rhythm control or arrhythmia progression in patients with atrial fibrillation: a systematic review." Clin Res Cardiol **106**(10): 813-823.

Di Biase, L., J. D. Burkhardt, P. Santangeli, P. Mohanty, J. E. Sanchez, R. Horton, G. J. Gallinghouse, S. Themistoclakis, A. Rossillo, D. Lakkireddy, M. Reddy, S. Hao, R. Hongo, S. Beheiry, J. Zagrodzky, B. Rong, S. Mohanty, C. S. Elayi, G. Forleo, G. Pelargonio, M. L. Narducci, A. Dello Russo, M. Casella, G. Fassini, C. Tondo, R. A. Schweikert and A. Natale (2014). "Periprocedural stroke and bleeding complications in patients undergoing catheter ablation of atrial fibrillation with different anticoagulation management: results from the Role of Coumadin in Preventing Thromboembolism in Atrial Fibrillation (AF) Patients Undergoing Catheter Ablation (COMPARE) randomized trial." Circulation **129**(25): 2638-2644.

Divakaran, V. and D. L. Mann (2008). "The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure." Circ Res **103**(10): 1072-1083.

Falk, R. H. (2001). "Atrial fibrillation." N Engl J Med **344**(14): 1067-1078.

Feldman, A., D. A. R. Moreira, C. Gun, H. L. Wang, M. H. Hirata, J. de Freitas Germano, G. G. S. Leite and P. Farsky (2017). "Analysis of Circulating miR-1, miR-23a, and miR-26a in Atrial Fibrillation Patients Undergoing Coronary Bypass Artery Grafting Surgery." Ann Hum Genet **81**(3): 99-105.

Fortunato, O., M. Boeri, C. Verri, D. Conte, M. Mensah, P. Suatoni, U. Pastorino and G. Sozzi (2014). "Assessment of circulating microRNAs in plasma of lung cancer patients." Molecules **19**(3): 3038-3054.

Gallagher, M. M. and A. J. Camm (1997). "Classification of atrial fibrillation." Pacing Clin Electrophysiol **20**(6): 1603-1605.

Gami, A. S., D. O. Hodge, R. M. Herges, E. J. Olson, J. Nykodym, T. Kara and V. K. Somers (2007). "Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation." J Am Coll Cardiol **49**(5): 565-571.

Ganesan, A. N., N. J. Shipp, A. G. Brooks, P. Kuklik, D. H. Lau, H. S. Lim, T. Sullivan, K. C. Roberts-Thomson and P. Sanders (2013). "Long-term outcomes of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis." J Am Heart Assoc **2**(2): e004549.

Gao, Z., P. Zhang, M. Xie, H. Gao, L. Yin and R. Liu (2018). "miR-144/451 cluster plays an oncogenic role in esophageal cancer by inhibiting cell invasion." Cancer Cell Int **18**: 184.

Girmatsion, Z., P. Biliczki, A. Bonauer, G. Wimmer-Greinecker, M. Scherer, A. Moritz, A. Bukowska, A. Goette, S. Nattel, S. H. Hohnloser and J. R. Ehrlich (2009). "Changes in

microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation." Heart Rhythm **6**(12): 1802-1809.

Glinge, C., S. Clauss, K. Boddum, R. Jabbari, J. Jabbari, B. Risgaard, P. Tomsits, B. Hildebrand, S. Kaab, R. Wakili, T. Jespersen and J. Tfelt-Hansen (2017). "Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations." PLoS One **12**(2): e0167969.

Go, A. S., E. M. Hylek, K. A. Phillips, Y. Chang, L. E. Henault, J. V. Selby and D. E. Singer (2001). "Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study." JAMA **285**(18): 2370-2375.

Gorenk Chair, B., A. Pelliccia Co-Chair, E. J. Benjamin, G. Boriani, H. J. Crijns, R. I. Fogel, I. C. Van Gelder, M. Halle, G. Kudaiberdieva, D. A. Lane, T. Bjerregaard Larsen, G. Y. Lip, M. L. Lochen, F. Marin, J. Niebauer, P. Sanders, L. Tokgozoglu, M. A. Vos, D. R. Van Wagoner, r. Document, L. Fauchier, I. Savelieva, A. Goette, S. Agewall, C. E. Chiang, M. Figueiredo, M. Stiles, T. Dickfeld, K. Patton, M. Piepoli, U. Corra, P. Manuel Marques-Vidal, P. Faggiano, J. P. Schmid and A. Abreu (2017). "European Heart Rhythm Association (EHRA)/European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation (EACPR) position paper on how to prevent atrial fibrillation endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS) and Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)." Eur J Prev Cardiol **24**(1): 4-40.

Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." Cell **123**(4): 631-640.

Grishok, A., A. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun and C. C. Mello (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing." Cell **106**(1): 23-34.

Groeneweld, H. F., H. J. Crijns, M. P. Van den Berg, E. Van Sonderen, A. M. Alings, J. G. Tijssen, H. L. Hillege, Y. S. Tuininga, D. J. Van Veldhuisen, A. V. Ranchor, I. C. Van Gelder and R. I. Investigators (2011). "The effect of rate control on quality of life in patients with permanent atrial fibrillation: data from the RACE II (Rate Control Efficacy in Permanent Atrial Fibrillation II) study." J Am Coll Cardiol **58**(17): 1795-1803.

Guan, H., W. Liang, Z. Xie, H. Li, J. Liu, L. Liu, L. Xiu and Y. Li (2015). "Down-regulation of miR-144 promotes thyroid cancer cell invasion by targeting ZEB1 and ZEB2." Endocrine **48**(2): 566-574.

Haissaguerre, M., P. Jais, D. C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. Le Mouroux, P. Le Metayer and J. Clementy (1998). "Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins." N Engl J Med **339**(10): 659-666.

Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature **404**(6775): 293-296.

Harada, M., X. Luo, X. Y. Qi, A. Tadevosyan, A. Maguy, B. Ordog, J. Ledoux, T. Kato, P. Naud, N. Voigt, Y. Shi, K. Kamiya, T. Murohara, I. Kodama, J. C. Tardif, U. Schotten, D. R. Van Wagoner, D. Dobrev and S. Nattel (2012). "Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation." Circulation **126**(17): 2051-2064.

Heeringa, J., D. A. van der Kuip, A. Hofman, J. A. Kors, G. van Herpen, B. H. Stricker, T. Stijnen, G. Y. Lip and J. C. Witteman (2006). "Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study." Eur Heart J **27**(8): 949-953.

Hutvagner, G. (2005). "Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation." FEBS Lett **579**(26): 5850-5857.

Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.

Iwasaki, Y. K., K. Nishida, T. Kato and S. Nattel (2011). "Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management." Circulation **124**(20): 2264-2274.

January, C. T., L. S. Wann, J. S. Alpert, H. Calkins, J. E. Cigarroa, J. C. Cleveland, Jr., J. B. Conti, P. T. Ellinor, M. D. Ezekowitz, M. E. Field, K. T. Murray, R. L. Sacco, W. G.

Stevenson, P. J. Tchou, C. M. Tracy, C. W. Yancy and G. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice (2014). "2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society." J Am Coll Cardiol **64**(21): e1-76.

January, C. T., L. S. Wann, J. S. Alpert, H. Calkins, J. E. Cigarroa, J. C. Cleveland, Jr., J. B. Conti, P. T. Ellinor, M. D. Ezekowitz, M. E. Field, K. T. Murray, R. L. Sacco, W. G. Stevenson, P. J. Tchou, C. M. Tracy, C. W. Yancy and A. A. T. F. Members (2014). "2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society." Circulation **130**(23): e199-267.

Jenkins, L. S., M. Brodsky, E. Schron, M. Chung, T. Rocco, Jr., E. Lader, M. Constantine, R. Sheppard, D. Holmes, D. Mateski, L. Floden, M. Prasun, H. L. Greene and L. Shemanski (2005). "Quality of life in atrial fibrillation: the Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) study." Am Heart J **149**(1): 112-120.

Jia, X., S. Zheng, X. Xie, Y. Zhang, W. Wang, Z. Wang, Y. Zhang, J. Wang, M. Gao and Y. Hou (2013). "MicroRNA-1 accelerates the shortening of atrial effective refractory period by regulating KCNE1 and KCNB2 expression: an atrial tachypacing rabbit model." PLoS One **8**(12): e85639.

Jiang, G., J. Mu, X. Liu, X. Peng, F. Zhong, W. Yuan, F. Deng, X. Peng, S. Peng and X. Zeng (2020). "Prognostic value of miR-21 in gliomas: comprehensive study based on meta-analysis and TCGA dataset validation." Sci Rep **10**(1): 4220.

Kaur, A., S. T. Mackin, K. Schlosser, F. L. Wong, M. Elharram, C. Delles, D. J. Stewart, N. Dayan, T. Landry and L. Pilote (2019). "Systematic Review of MicroRNA Biomarkers in Acute Coronary Syndrome and Stable Coronary Artery Disease." Cardiovasc Res.

Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon and R. H. Plasterk (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." Genes Dev **15**(20): 2654-2659.

Khaykin, Y., R. Oosthuizen, L. Zarnett, V. Essebag, R. Parkash, C. Seabrook, M. Beardsall, B. Tsang, Z. Wulffhart and A. Verma (2011). "Clinical predictors of arrhythmia recurrences following pulmonary vein antrum isolation for atrial fibrillation: predicting arrhythmia recurrence post-PVAI." J Cardiovasc Electrophysiol **22**(11): 1206-1214.

Kiliszek, M., K. Maciak, A. Maciejak, K. Krzyzanowski, R. Wierzbowski, M. Gora, B. Burzynska, A. Segiet and A. Skrobowski (2020). "Serum microRNA in patients undergoing atrial fibrillation ablation." Sci Rep **10**(1): 4424.

Kim, D. J., S. Linnstaedt, J. Palma, J. C. Park, E. Ntrivalas, J. Y. Kwak-Kim, A. Gilman-Sachs, K. Beaman, M. L. Hastings, J. N. Martin and D. M. Duelli (2012). "Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation." J Mol Diagn **14**(1): 71-80.

Kirchhof, P., S. Benussi, D. Kotecha, A. Ahlsson, D. Atar, B. Casadei, M. Castella, H. C. Diener, H. Heidbuchel, J. Hendriks, G. Hindricks, A. S. Manolis, J. Oldgren, B. A. Popescu, U. Schotten, B. Van Putte, P. Vardas, S. Agewall, J. Camm, G. Baron Esquivias, W. Budts, S. Carerj, F. Casselman, A. Coca, R. De Caterina, S. Deftereos, D. Dobrev, J. M. Ferro, G. Filippatos, D. Fitzsimons, B. Gorenek, M. Guenoun, S. H. Hohnloser, P. Kolh, G. Y. Lip, A. Manolis, J. McMurray, P. Ponikowski, R. Rosenhek, F. Ruschitzka, I. Savelieva, S. Sharma, P. Suwalski, J. L. Tamargo, C. J. Taylor, I. C. Van Gelder, A. A. Voors, S. Windecker, J. L. Zamorano and K. Zeppenfeld (2016). "2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS." Eur Heart J **37**(38): 2893-2962.

Kolenda, T., W. Przybyla, A. Teresiak, A. Mackiewicz and K. M. Lamperska (2014). "The mystery of let-7d - a small RNA with great power." Contemp Oncol (Pozn) **18**(5): 293-301.

Kornej, J., G. Hindricks, J. Kosiuk, A. Arya, P. Sommer, D. Husser, S. Rolf, S. Richter, Y. Huo, C. Piorkowski and A. Bollmann (2014). "Comparison of CHADS2, R2CHADS2, and CHA2DS2-VASc scores for the prediction of rhythm outcomes after catheter ablation of atrial fibrillation: the Leipzig Heart Center AF Ablation Registry." Circ Arrhythm Electrophysiol **7**(2): 281-287.

Kornej, J., G. Hindricks, M. B. Shoemaker, D. Husser, A. Arya, P. Sommer, S. Rolf, P. Saavedra, A. Kanagasundram, S. Patrick Whalen, J. Montgomery, C. R. Ellis, D. Darbar and A. Bollmann (2015). "The APPLE score: a novel and simple score for the prediction of rhythm outcomes after catheter ablation of atrial fibrillation." Clin Res Cardiol **104**(10): 871-876.

Krichevsky, A. M. and G. Gabriely (2009). "miR-21: a small multi-faceted RNA." J Cell Mol Med **13**(1): 39-53.

Kroh, E. M., R. K. Parkin, P. S. Mitchell and M. Tewari (2010). "Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)." Methods **50**(4): 298-301.

Kuck, K., J. Brugada and J. Albenque (2016). "Cryoballoon or Radiofrequency Ablation for Atrial Fibrillation." N Engl J Med **375**(11): 1100-1101.

Lau, D. H., S. Nattel, J. M. Kalman and P. Sanders (2017). "Modifiable Risk Factors and Atrial Fibrillation." Circulation **136**(6): 583-596.

Lee, J. S., D. W. Song, J. H. Park, J. O. Kim, C. Cho and D. H. Kim (2017). "miR-374 promotes myocardial hypertrophy by negatively regulating vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling." BMB Rep **50**(4): 208-213.

Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.

Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim and V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." EMBO J **21**(17): 4663-4670.

Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.

Letsas, K. P., M. Efremidis, G. Giannopoulos, S. Deftereos, L. Lioni, P. Korantzopoulos, K. Vlachos, S. Xydonas, C. Kossyvakis and A. Sideris (2014). "CHADS2 and CHA2DS2-VASc scores as predictors of left atrial ablation outcomes for paroxysmal atrial fibrillation." Europace **16**(2): 202-207.

Levesque-Sergerie, J. P., M. Duquette, C. Thibault, L. Delbecchi and N. Bissonnette (2007). "Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR." BMC Mol Biol **8**: 93.

Li, H., X. Zhao, H. Shan and H. Liang (2016). "MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis: involvement in pathogenesis and potential use in diagnosis and therapeutics." Acta Pharm Sin B **6**(6): 531-539.

Li, Y. and K. V. Kowdley (2012). "MicroRNAs in common human diseases." Genomics Proteomics Bioinformatics **10**(5): 246-253.

Liang, Y., A. Mente, S. Yusuf, P. Gao, P. Sleight, J. Zhu, R. Fagard, E. Lonn, K. K. Teo, Ontarget and T. Investigators (2012). "Alcohol consumption and the risk of incident atrial fibrillation among people with cardiovascular disease." CMAJ **184**(16): E857-866.

Lip, G. Y., C. Laroche, G. A. Dan, M. Santini, Z. Kalarus, L. H. Rasmussen, M. M. Oliveira, G. Mairesse, H. J. Crijns, E. Simantirakis, D. Atar, P. Kirchhof, P. Vardas, L. Tavazzi and A. P. Maggioni (2014). "A prospective survey in European Society of Cardiology member countries of atrial fibrillation management: baseline results of EURObservational Research Programme Atrial Fibrillation (EORP-AF) Pilot General Registry." Europace **16**(3): 308-319.

Liu, G., A. Friggeri, Y. Yang, J. Milosevic, Q. Ding, V. J. Thannickal, N. Kaminski and E. Abraham (2010). "miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis." J Exp Med **207**(8): 1589-1597.

Liu, H., H. Qin, G. X. Chen, M. Y. Liang, J. Rong, J. P. Yao and Z. K. Wu (2014). "Comparative expression profiles of microRNA in left and right atrial appendages from patients with rheumatic mitral valve disease exhibiting sinus rhythm or atrial fibrillation." J Transl Med **12**: 90.

Lloyd-Jones, D. M., T. J. Wang, E. P. Leip, M. G. Larson, D. Levy, R. S. Vasan, R. B. D'Agostino, J. M. Massaro, A. Beiser, P. A. Wolf and E. J. Benjamin (2004). "Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study." Circulation **110**(9): 1042-1046.

Lu, Y., S. Hou, D. Huang, X. Luo, J. Zhang, J. Chen and W. Xu (2015). "Expression profile analysis of circulating microRNAs and their effects on ion channels in Chinese atrial fibrillation patients." Int J Clin Exp Med **8**(1): 845-853.

Lubitz, S. A., E. J. Benjamin, J. N. Ruskin, V. Fuster and P. T. Ellinor (2010). "Challenges in the classification of atrial fibrillation." Nat Rev Cardiol **7**(8): 451-460.

Lubitz, S. A., B. A. Yi and P. T. Ellinor (2009). "Genetics of atrial fibrillation." Cardiol Clin **27**(1): 25-33, vii.

Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.

Luo, X., Z. Pan, H. Shan, J. Xiao, X. Sun, N. Wang, H. Lin, L. Xiao, A. Maguy, X. Y. Qi, Y. Li, X. Gao, D. Dong, Y. Zhang, Y. Bai, J. Ai, L. Sun, H. Lu, X. Y. Luo, Z. Wang, Y. Lu, B. Yang and S. Nattel (2013). "MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation." J Clin Invest **123**(5): 1939-1951.

Marrouche, N. F., M. Kheirikhahan and J. Brachmann (2018). "Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure." N Engl J Med **379**(5): 492.

Martinez, J., A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann and T. Tuschl (2002). "Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi." Cell **110**(5): 563-574.

McAlexander, M. A., M. J. Phillips and K. W. Witwer (2013). "Comparison of Methods for miRNA Extraction from Plasma and Quantitative Recovery of RNA from Cerebrospinal Fluid." Front Genet **4**: 83.

McDonald, J. S., D. Milosevic, H. V. Reddi, S. K. Grebe and A. Algeciras-Schimnich (2011). "Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges." Clin Chem **57**(6): 833-840.

McManus, D. D., K. Tanriverdi, H. Lin, N. Esa, M. Kinno, D. Mandapati, S. Tam, O. N. Okike, P. T. Ellinor, J. F. Keane, Jr., J. K. Donahue, E. J. Benjamin and J. E. Freedman (2015). "Plasma microRNAs are associated with atrial fibrillation and change after catheter ablation (the miRhythm study)." Heart Rhythm **12**(1): 3-10.

Melo, S. A., C. Moutinho, S. Ropero, G. A. Calin, S. Rossi, R. Spizzo, A. F. Fernandez, V. Davalos, A. Villanueva, G. Montoya, H. Yamamoto, S. Schwartz, Jr. and M. Esteller (2010). "A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells." Cancer Cell **18**(4): 303-315.

Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanian, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-10518.

Miyazaki, S., T. Kuwahara, A. Kobori, Y. Takahashi, A. Takei, A. Sato, M. Isobe and A. Takahashi (2011). "Preprocedural predictors of atrial fibrillation recurrence following pulmonary vein antrum isolation in patients with paroxysmal atrial fibrillation: long-term follow-up results." J Cardiovasc Electrophysiol **22**(6): 621-625.

Monleau, M., S. Bonnel, T. Gostan, D. Blanchard, V. Courgnaud and C. H. Lecellier (2014). "Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells." BMC Genomics **15**: 395.

Moret, I., D. Sanchez-Izquierdo, M. Iborra, L. Tortosa, A. Navarro-Puche, P. Nos, J. Cervera and B. Beltran (2013). "Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction." PLoS One **8**(12): e82753.

Morillo, C. A., A. Verma, S. J. Connolly, K. H. Kuck, G. M. Nair, J. Champagne, L. D. Sterns, H. Beresh, J. S. Healey, A. Natale and R.-. Investigators (2014). "Radiofrequency ablation vs antiarrhythmic drugs as first-line treatment of paroxysmal atrial fibrillation (RAAFT-2): a randomized trial." JAMA **311**(7): 692-700.

Mukamal, K. J., J. S. Tolstrup, J. Friberg, G. Jensen and M. Gronbaek (2005). "Alcohol consumption and risk of atrial fibrillation in men and women: the Copenhagen City Heart Study." Circulation **112**(12): 1736-1742.

Nakajima, H., H. O. Nakajima, O. Salcher, A. S. Dittie, K. Dembowsky, S. Jing and L. J. Field (2000). "Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart." Circ Res **86**(5): 571-579.

Nattel, S. (2017). "Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation." JACC Clin Electrophysiol **3**(5): 425-435.

Nattel, S., B. Burstein and D. Dobrev (2008). "Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications." Circ Arrhythm Electrophysiol **1**(1): 62-73.

Olshansky, B., E. N. Heller, L. B. Mitchell, M. Chandler, W. Slater, M. Green, M. Brodsky, P. Barrell and H. L. Greene (2005). "Are transthoracic echocardiographic parameters associated with atrial fibrillation recurrence or stroke? Results from the Atrial Fibrillation Follow-Up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) study." J Am Coll Cardiol **45**(12): 2026-2033.

Pan, Z., X. Sun, H. Shan, N. Wang, J. Wang, J. Ren, S. Feng, L. Xie, C. Lu, Y. Yuan, Y. Zhang, Y. Wang, Y. Lu and B. Yang (2012). "MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor-beta1 pathway." Circulation **126**(7): 840-850.

Pritchard, C. C., E. Kroh, B. Wood, J. D. Arroyo, K. J. Dougherty, M. M. Miyaji, J. F. Tait and M. Tewari (2012). "Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies." Cancer Prev Res (Phila) **5**(3): 492-497.

Redondo, J., J. E. Bishop and M. R. Wilkins (1998). "Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts." Br J Pharmacol **124**(7): 1455-1462.

Ringborg, A., R. Nieuwlaat, P. Lindgren, B. Jonsson, D. Fidan, A. P. Maggioni, J. Lopez-Sendon, J. Stepinska, D. V. Cokkinos and H. J. Crijns (2008). "Costs of atrial fibrillation in five European countries: results from the Euro Heart Survey on atrial fibrillation." Europace **10**(4): 403-411.

Schetter, A. J., S. Y. Leung, J. J. Sohn, K. A. Zanetti, E. D. Bowman, N. Yanaihara, S. T. Yuen, T. L. Chan, D. L. Kwong, G. K. Au, C. G. Liu, G. A. Calin, C. M. Croce and C. C. Harris (2008). "MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma." JAMA **299**(4): 425-436.

Schnabel, R. B., L. M. Sullivan, D. Levy, M. J. Pencina, J. M. Massaro, R. B. D'Agostino, Sr., C. Newton-Cheh, J. F. Yamamoto, J. W. Magnani, T. M. Tadros, W. B. Kannel, T. J. Wang, P. T. Ellinor, P. A. Wolf, R. S. Vasan and E. J. Benjamin (2009). "Development of a risk score for atrial fibrillation (Framingham Heart Study): a community-based cohort study." Lancet **373**(9665): 739-745.

Schnabel, R. B., S. Wilde, P. S. Wild, T. Munzel and S. Blankenberg (2012). "Atrial fibrillation: its prevalence and risk factor profile in the German general population." Dtsch Arztebl Int **109**(16): 293-299.

Schnabel, R. B., X. Yin, P. Gona, M. G. Larson, A. S. Beiser, D. D. McManus, C. Newton-Cheh, S. A. Lubitz, J. W. Magnani, P. T. Ellinor, S. Seshadri, P. A. Wolf, R. S. Vasan, E. J. Benjamin and D. Levy (2015). "50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study." Lancet **386**(9989): 154-162.

Schwaber, J., S. Andersen and L. Nielsen (2019). "Shedding light: The importance of reverse transcription efficiency standards in data interpretation." Biomol Detect Quantif **17**: 100077.

Selcuklu, S. D., M. T. Donoghue and C. Spillane (2009). "miR-21 as a key regulator of oncogenic processes." Biochem Soc Trans **37**(Pt 4): 918-925.

Selmer, C., J. B. Olesen, M. L. Hansen, J. Lindhardsen, A. M. Olsen, J. C. Madsen, J. Faber, P. R. Hansen, O. D. Pedersen, C. Torp-Pedersen and G. H. Gislason (2012). "The spectrum of thyroid disease and risk of new onset atrial fibrillation: a large population cohort study." BMJ **345**: e7895.

Shao, C., F. Yang, Z. Qin, X. Jing, Y. Shu and H. Shen (2019). "The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: a systematic review with meta-analysis." BMC Cancer **19**(1): 1103.

Sourvinou, I. S., A. Markou and E. S. Lianidou (2013). "Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability." J Mol Diagn **15**(6): 827-834.

Stewart, S., C. L. Hart, D. J. Hole and J. J. McMurray (2002). "A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study." Am J Med **113**(5): 359-364.

Stewart, S., N. F. Murphy, A. Walker, A. McGuire and J. J. McMurray (2004). "Cost of an emerging epidemic: an economic analysis of atrial fibrillation in the UK." Heart **90**(3): 286-292.

Tao, H., M. Zhang, J. J. Yang and K. H. Shi (2018). "MicroRNA-21 via Dysregulation of WW Domain-Containing Protein 1 Regulate Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation." Heart Lung Circ **27**(1): 104-113.

Terentyev, D., A. E. Belevych, R. Terentyeva, M. M. Martin, G. E. Malana, D. E. Kuhn, M. Abdellatif, D. S. Feldman, T. S. Elton and S. Gyorke (2009). "miR-1 overexpression enhances Ca(2+) release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2." Circ Res **104**(4): 514-521.

Thrall, G., D. Lane, D. Carroll and G. Y. Lip (2006). "Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review." Am J Med **119**(5): 448 e441-419.

Thum, T. (2012). "MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine." EMBO Mol Med **4**(1): 3-14.

Thum, T., C. Gross, J. Fiedler, T. Fischer, S. Kissler, M. Bussen, P. Galuppo, S. Just, W. Rottbauer, S. Frantz, M. Castoldi, J. Soutschek, V. Koteliansky, A. Rosenwald, M. A. Basson, J. D. Licht, J. T. Pena, S. H. Rouhanifard, M. U. Muckenthaler, T. Tuschl, G. R. Martin, J. Bauersachs and S. Engelhardt (2008). "MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts." Nature **456**(7224): 980-984.

Tiberio, P., M. Callari, V. Angeloni, M. G. Daidone and V. Appierto (2015). "Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers." Biomed Res Int **2015**: 731479.

Travers, J. G., F. A. Kamal, J. Robbins, K. E. Yutzey and B. C. Blaxall (2016). "Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens." Circ Res **118**(6): 1021-1040.

van den Berg, N. W. E., M. Kawasaki, W. R. Berger, J. Neefs, E. Meulendijks, A. J. Tijssen and J. R. de Groot (2017). "MicroRNAs in Atrial Fibrillation: from Expression Signatures to Functional Implications." Cardiovasc Drugs Ther **31**(3): 345-365.

Van Gelder, I. C., H. F. Groeneweld, H. J. Crijns, Y. S. Tuininga, J. G. Tijssen, A. M. Alings, H. L. Hillege, J. A. Bergsma-Kadijk, J. H. Cornel, O. Kamp, R. Tukkier, H. A. Bosker, D. J. Van Veldhuisen, M. P. Van den Berg and R. I. Investigators (2010). "Lenient versus strict rate control in patients with atrial fibrillation." N Engl J Med **362**(15): 1363-1373.

Vandewijngaert, S., C. D. Ledsky, O. Agha, C. Wu, D. Hu, A. Bagchi, I. J. Domian, E. S. Buys, C. Newton-Cheh and D. B. Bloch (2018). "MicroRNA-425 and microRNA-155 cooperatively regulate atrial natriuretic peptide expression and cGMP production." PLoS One **13**(4): e0196697.

Verheule, S., T. Sato, T. t. Everett, S. K. Engle, D. Otten, M. Rubart-von der Lohe, H. O. Nakajima, H. Nakajima, L. J. Field and J. E. Olgin (2004). "Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1." Circ Res **94**(11): 1458-1465.

Verma, A., O. M. Wazni, N. F. Marrouche, D. O. Martin, F. Kilicaslan, S. Minor, R. A. Schweikert, W. Saliba, J. Cummings, J. D. Burkhardt, M. Bhargava, W. A. Belden, A. Abdul-Karim and A. Natale (2005). "Pre-existent left atrial scarring in patients undergoing pulmonary vein antrum isolation: an independent predictor of procedural failure." J Am Coll Cardiol **45**(2): 285-292.

Vicenczova, C., B. Szeiffova Bacova, T. Egan Benova, B. Kura, C. Yin, P. Weismann, R. Kukreja, J. Slezak and N. Tribulova (2016). "Myocardial connexin-43 and PKC signalling are involved in adaptation of the heart to irradiation-induced injury: Implication of miR-1 and miR-21." Gen Physiol Biophys **35**(2): 215-222.

Wakili, R., S. Clauss and S. Kaab (2012). "[Molecular mechanisms of atrial fibrillation: potential role of microRNAs as new therapeutic targets and potential biomarkers]." Herz **37**(2): 166-171.

Wakili, R., N. Voigt, S. Kaab, D. Dobrev and S. Nattel (2011). "Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation." J Clin Invest **121**(8): 2955-2968.

Wang, D., I. P. Gladysheva, T. H. Fan, R. Sullivan, A. K. Houg and G. L. Reed (2014). "Atrial natriuretic peptide affects cardiac remodeling, function, heart failure, and survival in a mouse model of dilated cardiomyopathy." *Hypertension* **63**(3): 514-519.

Wang, H. W., C. Noland, B. Siridechadilok, D. W. Taylor, E. Ma, K. Felderer, J. A. Doudna and E. Nogales (2009). "Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex." *Nat Struct Mol Biol* **16**(11): 1148-1153.

Wang, J., S. Song, C. Xie, J. Han, Y. Li, J. Shi, M. Xin, J. Wang, T. Luo, X. Meng and B. Yang (2015). "MicroRNA profiling in the left atrium in patients with non-valvular paroxysmal atrial fibrillation." *BMC Cardiovasc Disord* **15**: 97.

Wang, J., Y. Wang, J. Han, Y. Li, C. Xie, L. Xie, J. Shi, J. Zhang, B. Yang, D. Chen and X. Meng (2015). "Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in the left atrium of patients with nonvalvular paroxysmal atrial fibrillation: Role of miR-146b-5p in atrial fibrosis." *Heart Rhythm* **12**(5): 1018-1026.

Wang, K., Y. Yuan, J. H. Cho, S. McClarty, D. Baxter and D. J. Galas (2012). "Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma." *PLoS One* **7**(7): e41561.

Wang, T. J., M. G. Larson, D. Levy, R. S. Vasan, E. P. Leip, P. A. Wolf, R. B. D'Agostino, J. M. Murabito, W. B. Kannel and E. J. Benjamin (2003). "Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study." *Circulation* **107**(23): 2920-2925.

Wang, Z., Y. Lu and B. Yang (2011). "MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals." *Cardiovasc Res* **89**(4): 710-721.

Weckbach, L. T., U. Grabmaier, S. Clauss and R. Wakili (2016). "MicroRNAs as a diagnostic tool for heart failure and atrial fibrillation." *Curr Opin Pharmacol* **27**: 24-30.

Weng, L. C., K. L. Lunetta, M. Muller-Nurasyid, A. V. Smith, S. Theriault, P. E. Weeke, J. Barnard, J. C. Bis, L. P. Lyytikainen, M. E. Kleber, A. Martinsson, H. J. Lin, M. Rienstra, S. Trompet, B. P. Krijthe, M. Dorr, D. Klarin, D. I. Chasman, M. F. Sinner, M. Waldenberger, L. J. Launer, T. B. Harris, E. Z. Soliman, A. Alonso, G. Pare, P. L. Teixeira, J. C. Denny, M. B. Shoemaker, D. R. Van Wagener, J. D. Smith, B. M. Psaty, N. Sotoodehnia, K. D. Taylor, M. Kahonen, K. Nikus, G. E. Delgado, O. Melander, G. Engstrom, J. Yao, X. Guo, I. E. Christophersen, P. T. Ellinor, B. Geelhoed, N. Verweij, P. Macfarlane, I. Ford, J. Heeringa, O. H. Franco, A. G. Uitterlinden, U. Volker, A. Teumer, L. M. Rose, S. Kaab, V. Gudnason, D. E. Arking, D. Conen, D. M. Roden, M. K. Chung, S. R. Heckbert, E. J. Benjamin, T. Lehtimaki, W. Marz, J. G. Smith, J. I. Rotter, P. van der Harst, J. W. Jukema, B. H. Stricker, S. B. Felix, C. M. Albert and S. A. Lubitz (2017). "Genetic Interactions with Age, Sex, Body Mass Index, and Hypertension in Relation to Atrial Fibrillation: The AFGen Consortium." *Sci Rep* **7**(1): 11303.

Wolf, P. A., R. D. Abbott and W. B. Kannel (1991). "Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study." *Stroke* **22**(8): 983-988.

Wolf, P. A., T. R. Dawber, H. E. Thomas, Jr. and W. B. Kannel (1978). "Epidemiologic assessment of chronic atrial fibrillation and risk of stroke: the Framingham study." *Neurology* **28**(10): 973-977.

Wolf, P. A., J. B. Mitchell, C. S. Baker, W. B. Kannel and R. B. D'Agostino (1998). "Impact of atrial fibrillation on mortality, stroke, and medical costs." *Arch Intern Med* **158**(3): 229-234.

Wolowacz, S. E., M. Samuel, V. K. Brennan, J. G. Jasso-Mosqueda and I. C. Van Gelder (2011). "The cost of illness of atrial fibrillation: a systematic review of the recent literature." *Europace* **13**(10): 1375-1385.

Wotschovsky, Z., H. A. Meyer, M. Jung, A. Fendler, I. Wagner, C. Stephan, J. Busch, A. Erbersdobler, A. C. Disch, H. J. Mollenkopf and K. Jung (2011). "Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases." *Anal Biochem* **417**(2): 233-241.

Writing Group, M., D. Lloyd-Jones, R. J. Adams, T. M. Brown, M. Carnethon, S. Dai, G. De Simone, T. B. Ferguson, E. Ford, K. Furie, C. Gillespie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, P. M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, M. Mussolino, G. Nichol, V. L. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, V. L. Roger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. D. Wong, J. Wylie-Rosett, C. American Heart Association Statistics and S. Stroke Statistics (2010).

"Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association." Circulation **121**(7): e46-e215.

Wu, S., H. Sun and B. Sun (2020). "MicroRNA-145 is involved in endothelial cell dysfunction and acts as a promising biomarker of acute coronary syndrome." Eur J Med Res **25**(1): 2.

Wyse, D. G., A. L. Waldo, J. P. DiMarco, M. J. Domanski, Y. Rosenberg, E. B. Schron, J. C. Kellen, H. L. Greene, M. C. Mickel, J. E. Dalquist, S. D. Corley and I. Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (2002). "A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation." N Engl J Med **347**(23): 1825-1833.

Xiao, H. D., S. Fuchs, D. J. Campbell, W. Lewis, S. C. Dudley, Jr., V. S. Kasi, B. D. Hoit, G. Keshelava, H. Zhao, M. R. Capecchi and K. E. Bernstein (2004). "Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death." Am J Pathol **165**(3): 1019-1032.

Yang, B., H. Lin, J. Xiao, Y. Lu, X. Luo, B. Li, Y. Zhang, C. Xu, Y. Bai, H. Wang, G. Chen and Z. Wang (2007). "The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2." Nat Med **13**(4): 486-491.

Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.

Youn, J. Y., J. Zhang, Y. Zhang, H. Chen, D. Liu, P. Ping, J. N. Weiss and H. Cai (2013). "Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase." J Mol Cell Cardiol **62**: 72-79.

Zampetaki, A. and M. Mayr (2012). "Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs." Thromb Haemost **108**(4): 592-598.

Zeng, Y. and B. R. Cullen (2003). "Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells." RNA **9**(1): 112-123.

Zhao, T., W. Zhao, Y. Chen, V. S. Li, W. Meng and Y. Sun (2013). "Platelet-derived growth factor-D promotes fibrogenesis of cardiac fibroblasts." Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(12): H1719-1726.

Zhou, Q., C. Maleck, S. N. I. von Ungern-Sternberg, B. Neupane, D. Heinzmann, J. Marquardt, M. Duckheim, C. Scheckenbach, F. Stimpfle, M. Gawaz, J. Schreieck, P. Seizer and M. Gramlich (2018). "Circulating MicroRNA-21 Correlates With Left Atrial Low-Voltage Areas and Is Associated With Procedure Outcome in Patients Undergoing Atrial Fibrillation Ablation." Circ Arrhythm Electrophysiol **11**(6): e006242.

Zhuang, J., Y. Wang, K. Tang, X. Li, W. Peng, C. Liang and Y. Xu (2012). "Association between left atrial size and atrial fibrillation recurrence after single circumferential pulmonary vein isolation: a systematic review and meta-analysis of observational studies." Europace **14**(5): 638-645.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 5.1-1: Altersverteilung der Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern	39
Abb. 5.1-2: Altersverteilung der Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern.....	39
Abb. 5.1-3: Geschlechterverteilung der Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern	40
Abb. 5.1-4: Geschlechterverteilung der Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern	40
Abb. 5.1-5: Vergleich bestehender Vorerkrankungen bei Patienten mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern (CAD = Chron. Arterielle Erkrankungen).....	41
Abb. 5.1-6: Vergleich echokardiographischer Kenngrößen bei Patienten mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern (EF = Ejektionsfraktion, LA = Linkes Atrium).....	42
Abb. 5.2-1: Follow-up nach drei Monaten	43
Abb. 5.2-2: Follow-up nach 12 Monaten	44
Abb. 5.2-3: Entwicklung der Anzahl an Rezidiven innerhalb des 12 Monats-Follow-up.....	44
Abb. 5.3-1: Gesamtexpressionsraten der miRNA unabhängig der Art des Vorhofflimmerns	44
Abb. 5.3-2: Vergleich der Gesamtexpression der miRNA bei Patienten mit paroxysmalem vs. persistierendem Vorhofflimmern.....	45
Abb. 5.4-1: Gesamtexpressionsraten der miRNA bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern.....	46
Abb. 5.4-2: miR-1 Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	46
Abb. 5.4-3: miR-21 Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	46
Abb. 5.4-4: miR-26a Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	47
Abb. 5.4-5: miR-29b Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	47
Abb. 5.4-6: miR-1 44-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	47
Abb. 5.4-7: miR-146-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	47
Abb. 5.4-8: let-7d Expressionslevel vs. klinisches Outcome	48
Abb. 5.4-9: miR-374a Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	48
Abb. 5.4-10: miR-374b Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	48
Abb. 5.4-11: miR-425-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	49
Abb. 5.4-12: miR-652-3p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	49
Abb. 5.5-1: Gesamtexpressionsraten der miRNA bei Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern.....	50
Abb. 5.5-2: miR-1 Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	50
Abb. 5.5-3: miR-21 Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	50
Abb. 5.5-4: miR-26a Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	51
Abb. 5.5-5: miR-29b Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	51
Abb. 5.5-6: miR-144-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	51
Abb. 5.5-7: miR-146-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	51

Abb. 5.5-8: let-7d Expressionslevel vs. klinisches Outcome	52
Abb. 5.5-9: miR-374a Expressionslevel vs. klinisches Outcome	52
Abb. 5.5-10: miR-374b Expressionslevel vs. klinisches Outcome	52
Abb. 5.5-11: miR-425-5p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	53
Abb. 5.5-12: miR-652-3p Expressionslevel vs. klinisches Outcome.....	53
Abb. 6.2-1: Alters- und Geschlechterverteilung aller Patienten der Studie	58

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1-1: EHRA Score, modifiziert nach der European Heart Rhythm Society.....	11
Tab. 2.1-2: CHA2DS2-VASc-Score	12
Tab. 2.4-1: Medikamente zur Frequenzkontrolle bei VHF, modifiziert nach ESC-Leitlinien (Kirchhof, Benussi et al. 2016).....	20
Tab. 2.4-2: Antiarrhythmika	20
Tab. 4.1-1: Allgemeine Materialien	34
Tab. 4.1-2: Gewinnung der Plasmaproben	34
Tab. 4.1-3: miRNA Isolation.....	35
Tab. 4.1-4: Reverse Transkription	35
Tab. 4.1-5: Real Time PCR	35
Tab. 5.1-1: Allgemeine Patientencharakteristika.....	41

12 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Reza Wakili für die Überlassung dieses Themas und die damit entstandene Möglichkeit meine Promotionsarbeit im Bereich der Rhythmologie zu verfassen. Ich konnte mir seiner Unterstützung zu jederzeit sicher sein und er trug durch kritische Anmerkungen und konstruktive Diskussion maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation bei. Ich bedanke mich jedoch vor allem für das in mich gesetzte Vertrauen, durch das diese Arbeit im Grunde erst entstehen konnte.

Ebenso herzlich bedanken möchte ich mich bei der technischen Assistentin Bianca Hildebrand durch deren fachliche Unterstützung ich die nötigen wissenschaftlichen Grundlagen und die Methodik erlernen durfte. Ohne Ihre Hilfsbereitschaft, Motivation und letztendlich Geduld mit mir wäre diese Arbeit in dieser Form wohl nicht entstanden. Außerdem geht ein herzlicher Dank an Jeanette Hollaender, die mir durch ihre herzliche Art manch frustrierende Laborstunde erleichtert hat und zu jeder Zeit ein offenes Ohr hatte.

All meinen Kollegen und Freunden, die in irgendeiner Form dazu beigetragen haben, diese Promotionsarbeit fertigzustellen, gilt ebenfalls mein großer Dank. Durch ihre moralische Unterstützung konnte ich meine Dissertation allen Ermüdungsphasen zum Trotz abschließen. Ich bedanke mich ganz herzlich für jeden guten Rat und jeden hilfreichen Input.

Ganz besonders danken möchte ich meiner lieben Schwester Jeannine. Mit einer unermüdlichen Disziplin hat sie diese Arbeit immer und immer wieder Korrektur gelesen. Sie hat all meine Klagen geduldig ertragen und mich stets motiviert weiterzumachen. Ich weiß, dass sie nun unheimlich stolz auf mich ist, aber zu diesem Werk hat sie einen großen Teil beigetragen. Vermutlich ist jedoch keiner so stolz auf Ihre „Frau Doktor“ wie meine Großeltern. Sie haben mich auf meinem Weg stets begleitet und waren jederzeit für mich da. Durch ihre Lebenserfahrung konnte ich lernen und wachsen und sie haben mich geprägt wie kaum ein anderer. Ebenso gilt ein großes Dankeschön meinem Freund Patrick, der mir durch seine unbeschwerte Art und die oft sehr realistische Sicht auf die Dinge in so manchen Ermüdungsphasen ein Lächeln ins Gesicht zauberte.

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle jedoch meinen Eltern. Mit größter Zuwendung und einem unerschütterlichen Glauben an mich und mein Können haben sie mich in den letzten Jahren begleitet und standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Durch ihre stetige Unterstützung gaben sie mir auch in den schwierigen Phasen immer Sicherheit und sorgten dafür, dass ich mein Ziel nie aus den Augen verlor. Für all das bin ich ihnen unendlich dankbar!

Eidesstattliche Versicherung/Affidavit

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation *Role of microRNA in human blood plasma of patients with atrial fibrillation* selbstständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

I hereby confirm that the dissertation *Role of microRNA in human blood plasma of patients with atrial fibrillation* is the result of my own work and that I have only used sources or materials listed and specified in the dissertation.

Fabienne Risch

Waldshut-Tiengen, den 10.10.2020

Waldshut-Tiengen, date 10.10.2020