

Aus der Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie und
Angiologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

**Differenzierung physiologischer und pathologischer
Linksherzhypertrophieformen anhand einer miRNA-
Expressionsanalyse**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Nicolai Kräußlich

aus **Heidelberg**

Kiel (2019)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Müller
2. Berichterstatter: Dr. Matthias Lutz

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, der 07.02.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 17.12.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschuss für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Danksagung	IX

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie	Seite 1
1.2 Ätiologie	Seite 1
1.3 Herzhypertrophie	Seite 2
1.4 Linksherzhypertrophie	Seite 2
1.5 Aortenklappenstenose	Seite 4
1.6 Hypertensive Herzerkrankung	Seite 4
1.7 Hypertrophe Kardiomyopathie	Seite 5
1.8 Das Sportherz	Seite 7
1.9 MicroRNAs	Seite 8
1.10 Transkription und Prozessierung	Seite 8
1.11 Wirkmechanismen von miRNAs	Seite 10
1.12 Nomenklatur der miRNAs	Seite 10
1.13 MiRNAs in der Kardiologie	Seite 10
1.14 MiRNAs als Biomarker	Seite 11
1.15 Therapeutische Ansätze	Seite 12
1.16 Fragestellung der Arbeit	Seite 12

2 Probandenauswahl, Materialien und Methoden

2.1 Probandenauswahl	Seite 14
2.2 Erhobene Parameter	Seite 15
2.3 Einschlusskriterien	Seite 16
2.4 Ausschlusskriterien	Seite 19
2.5 Methoden	Seite 19
2.6 Methoden qRT-PCR	Seite 23

3 Ergebnisse	
3.1 Allgemein	Seite 25
3.2 Probandencharakterisierung	Seite 27
3.3 Charakterisierung der Gruppen	Seite 27
3.4 Vergleich der Gruppen	Seite 30
3.5 Exklusive Über- und Unterexpression	Seite 36
3.6 Größte miRNA-Mengen	Seite 37
3.7 Abgrenzung der Gruppen anhand der relativen Häufigkeit der miRNAs	Seite 38
3.8 Hypertensive Herzerkrankung vs. HNCM	Seite 54
3.9 HNCM vs. HOCM	Seite 56
3.10 HCM vs. Sporth Herzen	Seite 57
3.11 Bestätigung der differentiellen Regulation mittels PCR-Analyse	Seite 59
4 Diskussion	
4.1 Allgemein	Seite 61
4.2 Klinische Relevanz	Seite 61
4.3 Regulierungsstellen von miRNAs	Seite 70
4.4 Vorbeschriebene miRNAs	Seite 73
4.5 Stärken der Arbeit	Seite 73
4.6 Limitationen der Arbeit	Seite 75
4.7 Ausblick	Seite 76
5 Zusammenfassung	Seite 78
6 Literaturverzeichnis	Seite 80
7 Anhang	Datenträger

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der verschiedenen Linksherzhypertrophieformen.....	3
Abbildung 2: HCM.....	6
Abbildung 3: miRNA-Transkription und – Prozessierung.....	9
Abbildung 4: Calcineurin-Signalweg.....	11
Abbildung 5: Qualitätskontrolle IKMB.....	23
Abbildung 6: Veranschaulichung Expressionsunterschiede.....	26
Abbildung 7: Anzahl miRNAs mit signifikanten Expressionsunterschieden.....	26
Abbildung 8: Darstellung der Septumdicken.....	34
Abbildung 9: Darstellung des LV-Masse-Index.....	35
Abbildung 10-13: Größte Expressionsunterschiede mit Aortenklappenstenosen.....	40
Abbildung 14-17: Volcano plots mit Aortenklappenstenosen.....	41
Abbildung 18-21: Größte Expressionsunterschiede mit HHE.....	44
Abbildung 22-24: Volcano plots mit HHE.....	45
Abbildung 25-28: Größte Expressionsunterschiede mit HNCM.....	48
Abbildung 29-30: Volcano plots HNCM.....	49
Abbildung 31-34: Größte Expressionsunterschiede mit HOCCM.....	51

Abbildung 35: Volcano plot HOCM vs. AHS.....	52
Abbildung 36-39: Größte Expressionsunterschiede mit Sportherzen.....	54
Abbildung 40: HCM vs. AHS.....	58
Abbildung 41: PCR-Analyse von 5 miRNAs.....	60
Abbildung 42: mTOR-Signalweg.....	71
Abbildung 43: Signalweg mit hsa_miR_21_3p.....	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Normwerte linker Ventrikel.....	17
Tabelle 2: Biometrische Patientendaten.....	26
Tabelle 3: Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Laborwerte.....	31
Tabelle 4: Medikamenteneinnahme.....	32
Tabelle 5: Echokardiographie-Daten.....	33
Tabelle 6: Darstellung der Signifikanzen beim Vergleich der Septumdicken.....	34
Tabelle 7: Deskriptive Statistik Septumdicke.....	34
Tabelle 8: Darstellung der Signifikanzen beim Vergleich des LV-Masse-Index.....	36
Tabelle 9: Deskriptive Statistik LV-Masse-Index.....	36
Tabelle 10: Exklusiv exprimierte miRNAs.....	37

Tabelle 11: Die zehn höchstexprimierten miRNAs.....	38
Tabelle 12: Top 5 miRNAs Aortenklappenstenosen.....	42
Tabelle 13: Top 4 miRNAs HHE.....	46
Tabelle 14: miRNAs Sportherz.....	53
Tabelle 15: HHE vs. HNCM.....	55
Tabelle 16: HNCM vs. HOCM.....	56
Tabelle 17: HCM vs. AHS.....	57-58
Tabelle 18: Interessanteste miRNAs der Arbeit.....	79

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
3' UTR	3' untranslatierter Bereich
ACE Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer
Ago-2-Proteine	Argonauten-2-Proteine
AHS	Athletic heart syndrom
AKT	Protein Kinase B (Serin-/Threonin-Kinase)
As	Aortenklappenstenose
ASS	Acetylsalicylsäure
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
BiVAD	Biventricular Assist Device
BMI	Body Mass Index
C. elegans	Caenorhabditis elegans

Ca-Antagonisten	Calcium-Antagonisten
cm ²	Quadratcentimeter
Diab. Mell.	Diabetes mellitus
Diast. Dysf.	Diastolische Dysfunktion
DI	Deziliter
E/A	E/A-Welle (Diagnostik der diastolischen Dysfunktion)
E/E'	Füllungsindex linker Ventrikel
f	female
FC	Fold change
g	Gramm
G	g-Kraft
gm (in Abbildung 1)	Gramm
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDAC8	Histone Deacetylase 8
HDL	High-Density-Lipoprotein
HHE	Hypertensive Herzkrankheit
HNCM	Hypertroph nicht-obstruktive Kardiomyopathie
HOCM	Hypertroph-obstruktive Kardiomyopathie
Hs-TNT	Troponin T high sensitive
Hsa_miR	Homo sapiens microRNA
IKMB	Institut für Klinische Molekularbiologie
IVSd	Septumdicke diastolisch
Jarid2	AT-rich interaction domain 2
Kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KOF	Körperoberfläche
li. Atrium	Linkes Atrium
LKB1	Liver Kinase B1
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
Log	Logarithmus
LV-Mass-Index	Index der linksventrikulären Masse (Erläuterung Text)

LV-Masse	Linksventrikuläre Masse
LVAD	Left Ventricular Assist Device
LVEDD	Linksventrikulär enddiastolischer Durchmesser
m	male
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
Mi. Gradient	Mittlerer Gradient über der Aortenklappe
µl	Mikroliter
min	Minute
miRNAs	microRNAs
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilber (Druckeinheit)
MO25	Mouse protein-25
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MuRF1	Muscle RING-finger protein-1
n	Anzahl
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
Ng	Nanogramm
NT-proBNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
p-Wert	Signifikanzwert
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pos. Familienanamnese	Positive Familienanamnese
Pre-miRNA	precursor microRNA
Pri-miRNA	primary microRNA
PSA-Wert	Prostata-spezifischer Antigen-Wert
PWd	Hinterwanddicke diastolisch
RAN-GTP	Ras-related nuclear protein-Guanosintriphosphat
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure

Rpm	Revolutions per minute
RWT	Relative wall thickness
s	Sekunden
SAM	Systolic anterior movement
SD-Abweichung	Standardabweichung
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VO2 max.	Maximale Sauerstoffaufnahme
vs	versus
WHO	World Health Organisation
y	Jahre

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Norbert Frey für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter seiner Leitung absolvieren zu dürfen. Zudem danke ich ihm für seine Ratschläge und Anregungen, mit denen er zum Gelingen der Doktorarbeit beitrug.

Ich danke Herrn Dr. med. Matthias Lutz für die Betreuung der Arbeit, die zahlreichen Treffen und Austausche sowie die beruhigenden Worte bei Schwierigkeiten. Ich habe sehr geschätzt, die Arbeit mit seiner Betreuung zu absolvieren.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern des IKMBs in Kiel sowie den weiteren Mitgliedern der Forschungsgruppe am UKSH für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke meiner Familie und insbesondere meiner Ehefrau, die mich auf dem langen Weg der Doktorarbeit immer unterstützt haben und damit zu ihrem Gelingen beigetragen haben. Ohne ihre Begleitung wäre dies so nicht möglich gewesen.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind laut WHO (World Health Organisation) die führende Todesursache weltweit mit 17,5 Millionen Verstorbenen im Jahr 2012, was einem Anteil von 31% der insgesamt Verstorbenen entspricht. Dabei ist der ischämische Myokardinfarkt im Jahr 2016 mit 9,4 Millionen Toten auf Platz eins, der Apoplex mit 5,7 Millionen Toten auf Platz zwei und die Hypertensive Herzerkrankung im Jahr 2012 mit 1,1 Millionen Toten auf Platz zehn der Liste der Erkrankungen, die zum Tod führen (1,2). In den Staaten mit einem vergleichsweise hohen Einkommen in der Bevölkerung wie Deutschland sind der ischämische Myokardinfarkt und der Apoplex dabei noch deutlich häufiger als in Ländern mit niedrigeren Einkommen, wo infektiöse Erkrankungen eine entscheidendere Rolle einnehmen (1).

1.2 Ätiologie

In der Framingham-Studie wurde erstmals in einer großen klinischen repräsentativen Beobachtungsstudie herausgefunden, auf welche Ursachen kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen sind. Dabei wurden mehrere Hauptrisikofaktoren identifiziert, unter denen sich kardiovaskuläre Erkrankungen häufiger entwickeln: Zu diesen zählen Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Rauchen, Dyslipidämie und Diabetes mellitus (3). Neben diesen Risikofaktoren wurde bei anschließenden Followup-Untersuchungen der Framingham-Studie und der Framingham-Offspring-Studie ein weiterer wichtiger prognostischer Faktor gefunden, nämlich die Linksherzhypertrophie. Eine pathologische Erhöhung der linksventrikulären Masse erhöht signifikant das Risiko, an kardiovaskulären Krankheiten zu erkranken sowie an ihnen zu versterben (4). Auch in weiteren Studien wurde zuvor schon belegt, dass eine erhöhte LV-Masse (Linksventrikuläre Masse) zu Ventrikulären Arrhythmien, Apoplexen und Fällen von Koronarer Herzerkrankung führt (4–6). Daraus ergibt sich, dass der plötzliche Herztod signifikant häufiger bei Patienten mit einem hypertrophen Herz auftritt (7).

1.3 Herzhypertrophie

Herzhypertrophien entstehen bei dem Versuch des Herzens, eine vermehrte Druck- oder Volumenbelastung zu kompensieren. Dies kommt unter anderem im Rahmen einer arteriellen Hypertonie, bei Herzklappenfehlern oder auch im Anschluss an Myokardinfarkte vor, bei denen kontraktiles Gewebe untergegangen ist (8). Normalerweise wiegt das Herz des Mannes 300-350 g und jenes der Frau 250-300 g, von einem kritischen Herzgewicht wird ab $7-7,5$ g/kg Körpergewicht gesprochen.

Zu unterscheiden gilt es in diesem Zusammenhang die Art der Belastung auf den Ventrikel, da dies Auswirkungen auf die Hypertrophieform hat: Bei einer hohen Druckbelastung wie etwa bei einer Herzklappenstenose entwickelt sich eine konzentrische Herzhypertrophie, bei der sich die Ventrikelwand symmetrisch verdickt und das Ventrikelvolumen gleichbleibt. Davon abzugrenzen ist eine erhöhte Volumenbelastung, wie sie zum Beispiel bei einer Herzklappeninsuffizienz vorkommt, die zu einer exzentrischen Herzhypertrophie führt, bei der die Ventrikelwand verdickt ist und es zu einer Vergrößerung des Ventrikelvolumens kommt (9). Auch genetische Faktoren können bei der Entwicklung der Herzhypertrophie von Bedeutung sein, wie beispielsweise bei der Hypertrophen Kardiomyopathie (HCM).

1.4 Linksherzhypertrophie

Linksherzhypertrophien können physiologische und pathologische Grundlagen haben und lassen sich mit verschiedenen Verfahren diagnostizieren. Pathologische Ursachen für eine linksventrikuläre Hypertrophie können die Hypertensive Herzerkrankung, ein Aortenklappenvitium oder auch eine Hypertrophe Kardiomyopathie sein, die zu einer konzentrischen Hypertrophie führen. Häufiger Ausdauersport kann zu einer physiologischen Linksherzhypertrophie führen, die sich in einer eher exzentrischen Hypertrophie zeigt. Auch andere Ursachen wie zum Beispiel eine Schwangerschaft sind möglich.

Zur Diagnostik einer linksventrikulären Hypertrophie gehören verschiedene Verfahren: Das Elektrokardiogramm, in dem zum Beispiel der Sokolow-Lyon-Index einen Hinweis auf eine Linksherzhypertrophie geben kann, die Echokardiographie oder auch die Magnetresonanztomographie des Herzens (10).

In dieser Arbeit werden die Linksherzhypertrophien anhand der Echokardiographie beurteilt, weswegen deren Parameter näher erläutert werden. Verschiedene Werte in der Echokardiographie lassen den Schluss zu, dass eine Linksherzhypertrophie vorliegt. Dazu gehören die linksventrikuläre Masse (g), der LV-Masse-Index (g/m^2), die Septumdicke (mm), die Hinterwanddicke (mm) und die relative Wanddicke des Ventrikels. Ein Beispiel, eine linksventrikuläre Hypertrophie nachzuweisen, liefert die Canadian Society of Echocardiography: Aus der Höhe des berechneten LV-Masse-Index und der relativen Wanddicke des Ventrikels ergibt sich, ob eine Hypertrophie vorliegt. Des Weiteren lässt sich aus diesen beiden Werten ermitteln, welche Form einer Hypertrophie vorhanden ist: Konzentrisches Remodelling, konzentrische Hypertrophie oder exzentrische Hypertrophie, wie Abbildung 1 zu entnehmen ist.

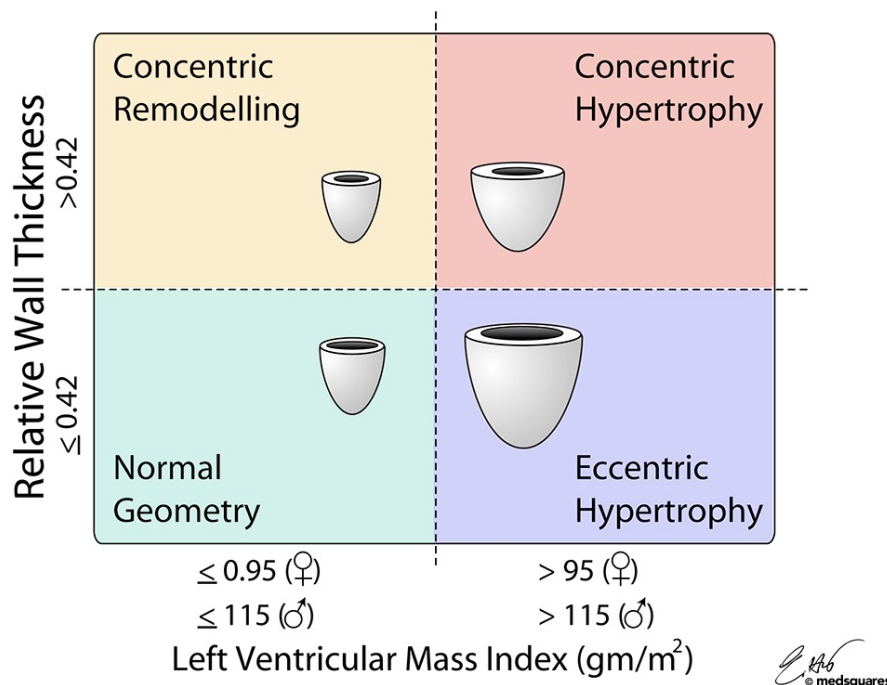


Abbildung 1: Einteilung der verschiedenen Linksherzhypertrophieformen: Diese erfolgte nach relativer Wanddicke und LV-Masse-Index in konzentrisches Remodelling, konzentrische Hypertrophie und exzentrische Hypertrophie. In dieser Abbildung: gm=gramm, m^2 =Quadratmeter (Abbildung entnommen der Internetseite der Canadian Society of Echocardiographie) (11).

Sind diese Werte im Normbereich, ist eine Linksherzhypertrophie allerdings noch nicht ausgeschlossen. Ist die linksventrikuläre Masse, die Septumdicke oder die Hinterwand über die Normwerte hinaus erhöht, kann nämlich ebenfalls eine Linksherzhypertrophie vorliegen (12).

1.5 Aortenklappenstenose (As)

Die Aortenklappenstenose ist der am häufigsten auftretende Herzklappenfehler in Europa und Nordamerika, wobei bei den meisten Erkrankungen die kalzifizierende Form zu beobachten ist, an der zwei bis sieben Prozent der über 65-Jährigen leiden und die eine Erkrankung des Alters darstellt (13,14). Definiert ist die hochgradige Aortenklappenstenose durch eine Klappenöffnungsfläche unter 1 cm^2 mit einem gemessenen mittleren Druckgradienten zwischen linker Herzkammer und Aorta von über 40 mmHg. Als kritisch wird eine Klappenöffnungsfläche von unter $0,8 \text{ cm}^2$ angesehen (15). Die Aortenklappenstenose hat mit einem 5-Jahresüberleben von 15-50 % eine schlechte Prognose (15), was vor allem die Folge der sich häufig entwickelnden kongestiven Herzinsuffizienz ist. Zunächst entsteht bei der Erkrankung durch die erhöhte Druckbelastung eine Linksherzhypertrophie, im Anschluss kommt es dann zu Apoptoseprozessen der Myozyten und der Fibroisierung des Ventrikels, was die Herzinsuffizienz bedingt (16,17).

Die diagnostische Methode der Wahl zur Detektion und Einschätzung einer Aortenklappenstenose ist die Doppler-Echokardiographie (15,18). In dieser sind neben KÖF (Klappenöffnungsfläche) und mittlerem Gradienten Komplikationen der Aortenklappenstenose wie eine Linksherzhypertrophie oder eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion feststellbar (19,20). Die Therapie der Wahl ist der Ersatz mittels biologischer oder mechanischer Klappenprothese. Das gängigste Verfahren ist hierfür momentan die offene Operation. Wird das operative Risiko als zu hoch für den Patienten erachtet, ist der Operation eine Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI) vorzuziehen (15,21,22).

1.6 Hypertensive Herzerkrankung (HHE)

Die Entstehung der Hypertensiven Herzerkrankung beruht sowohl auf genetischen als auch hämodynamischen Faktoren und geht im klinischen Bild mit einer Linksherzhypertrophie, einer diastolischen Dysfunktion, einer kongestiven Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen einher. 15-20% der Hypertoniker leiden unter einer Linksherzhypertrophie. Durch die Schädigung des Herzens haben Patienten ein erhöhtes Risiko, einen Myokardinfarkt, Apoplex oder plötzlichen Tod zu erleiden im Vergleich

zu Patienten mit isolierter arterieller Hypertonie (23).

Ursächlich für die Entwicklung einer HHE sind Adaptationsmechanismen des Herzens im Rahmen einer arteriellen Hypertonie und eine genetische Disposition. Wie beschrieben kommt es dabei durch eine erhöhte Druckbelastung zu einer Vergrößerung der einzelnen Myozyten, was sich auch in einer Vergrößerung des ganzen Organs und damit einer erst konzentrischen und später möglichen exzentrischen Hypertrophie niederschlägt (24). Einerseits resultiert daraus zwar zunächst eine gesteigerte Herzkraft, andererseits entsteht durch die Vergrößerung ein vermehrter Sauerstoffbedarf des Herzens und die in der Diastole stattfindende Versorgung des Herzens mit Blut wird durch Einengung der Koronararterien behindert (4).

Eine arterielle Hypertonie besteht bei einem systolischen Blutdruck ≥ 140 mmHg und/oder einem diastolischen Blutdruck ≥ 90 mmHg (25). Die beste und am einfachsten verfügbare diagnostische Methode zur Detektion einer Linksherzhypertrophie im Rahmen einer HHE ist die Echokardiographie (4,26). Durch sie lässt sich zudem eine diastolische Dysfunktion bestimmen, welche ein unabhängiger kardialer Risikofaktor ist (27). Alternativ kann auch durch eine kardiale MRT-Untersuchung die LV-Masse bestimmt werden. Die Therapie der HHE beinhaltet in erster Linie die Behandlung der arteriellen Hypertonie. Die Behandlung der arteriellen Hypertonie umfasst nach den Leitlinien der European Society of Cardiology von 2013 eine Lebensstiländerung und eine medikamentöse Therapie.

1.7 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Die Hypertrophe Kardiomyopathie ist eine genetische Erkrankung des Herzens mit einer Prävalenz von 0,2 % bei Erwachsenen (28–35). Die Erkrankung ist definiert als Verdickung der linksventrikulären Wand, welche nicht hinreichend durch einen erhöhten Belastungszustand wie eine arterielle Hypertonie oder eine Aortenklappenstenose erklärbar ist (10,36,37). Bei etwa 60% der Patienten folgt die HCM (Hypertrophe Kardiomyopathie) einem autosomal-dominanten Erbgang. Zur Erkrankung kommt es dabei durch Mutationen in für Sarkomer-Proteine zuständigen Genen (38–42). Nach heutigen Leitlinien wird von einer HCM gesprochen, wenn in einem oder mehreren Segmenten des linken Ventrikels eine Wanddicke von 15 mm oder mehr gemessen wird (10), wobei in 90 % der Fälle das Septum betroffen ist (siehe Abbildung

2) (43). Zentraler Bestandteil der Diagnostik ist wiederum die Echokardiographie, in welcher neben der erhöhten Wanddicke die verschiedenen Formen der HCM diagnostiziert werden, nämlich die Obstruktive Form (HOCM), die latent Obstruktive und die Nicht-Obstruktive (HNOCM). Bei einem Drittel der Patienten mit HCM ist in der Echokardiographie das SAM (Systolic Anterior Movement) der Mitralklappe nachweisbar, welches in Verbindung mit einer verdickten Ventrikelwand zur Einengung der Ausflussbahn des linken Ventrikels und damit der HOCM führt (10). Bei einem weiteren Drittel der Patienten lässt sich eine latente Obstruktion im Rahmen einer Stressechokardiographie nachweisen (44–47). Liegt keine Obstruktion vor, wird von der HNOCM gesprochen.

Komplikationen der HCM umfassen Herzinsuffizienz, systolische und diastolische Dysfunktion, Vorhofflimmern sowie ventrikuläre Arrhythmien im Rahmen des „Sudden cardiac death“. Patienten mit einer Obstruktion haben ein signifikant höheres Risiko am plötzlichen Herztod zu versterben als Patienten ohne Obstruktion (44,46,48).

Medikamentös werden symptomatische Patienten bei beiden Formen der HCM mit Beta-Blockern oder Calcium-Antagonisten vom Verapamil-Typ behandelt (10). Eine weitere Therapieoption der HOCM umfasst beispielsweise die Transaortale sub-valvuläre Myektomie nach Morrow (49). Bei der HNOCM stehen als Alternativen neben der medikamentösen Therapie bei stark eingeschränkter Herzfunktion unterstützende Systeme wie LVAD (Left Ventricular Assist Device) und BiVAD (Biventricular Assist Device) zur Verfügung (10).

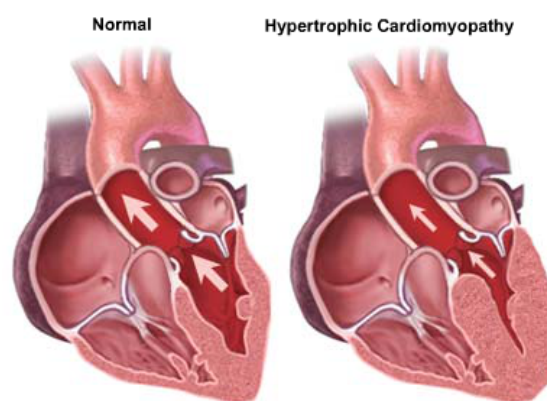


Abbildung 2: HCM: Links Darstellung einer normalen Herzgröße, rechts Darstellung der linksventrikulären Hypertrophie bei HCM. Abbildung entnommen der Internetseite BostonScientific.com.

1.8 Das Sportherz (AHS)

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Erkrankungen stellt das Sportherz eine physiologische Linksherzhypertrophie dar. Das Sportherz tritt bei Ausdauersportlern wie Langstreckenläufern, Schwimmern und Radfahrern auf und ist die Folge einer sportbedingten vermehrten Volumenbelastung des Herzens. Es geht mit gleichmäßig verdickten Herzkammerwänden und einer Dilatation der Herzkammern und des linken Vorhofs einher, was einer exzentrischen Linksherzhypertrophie entspricht (50).

Abhängig ist die Entwicklung des Sportherzens von Art, Intensität und Dauer des Trainings, auch ethnische und genetische Merkmale scheinen eine Rolle zu spielen (51,52). Es wird angenommen, dass mindestens fünf Stunden Ausdauertraining in der Woche mit erhöhter Intensität nötig sind, damit sich ein Sportherz bilden kann (50). Es entwickeln allerdings nur etwa 50 Prozent der Hochtrainierten ein physiologisches kardiales Remodeling, bei 15 Prozent ist dabei echokardiographisch ein LVEDD (Linksventrikulär enddiastolischer Durchmesser) von ≥ 60 mm aufzufinden und nur zwei Prozent haben eine Herzwanddicke zwischen 13 und 15 mm (53–55). Somit kommt es beim Sportherzen zu einer recht milden Hypertrophie, das Herzgewicht übersteigt normalerweise nicht 500 g und die systolische und diastolische Funktion sind nicht beeinträchtigt (50). Die Entwicklung eines Sportherzens hat als Resultat eine erhöhte Leistungsfähigkeit der Athleten, welche sich in einem erhöhten Herzschlagvolumen, einem niedrigeren peripheren Widerstand, einer niedrigeren Herzfrequenz in Ruhe, einem höheren maximalen Herzzeitvolumen und einer höheren maximalen Sauerstoffaufnahme ausdrückt (53). Die Zunahme und auch wieder mögliche Abnahme der linksventrikulären Masse ist ein dynamischer Prozess, der vom Trainingsumfang abhängig ist (56,57). In der Diagnostik des Sportherzens spielt die Echokardiographie eine wichtige Rolle, durch sie lassen sich Wanddicken, LVEDD und weitere Parameter wie die Größe des linken Atriums bestimmen (54,55,58). Dabei ist es wichtig, Differentialdiagnosen wie vor allem Kardiomyopathien auszuschließen. Die HCM ähnelt im klinischen Bild bei mildem Verlauf dem Sportherz (53,59). Im Unterschied zur HCM ist das Sportherz allerdings nicht ursächlich für kardiovaskuläre Erkrankungen, auch der plötzliche Herztod ist nach heutigem Stand nicht Folge des Sportherzens (50,53). Zwar ist bei Sportlern häufiger ein Vorhofflimmern festzustellen (60), dennoch zeigen Studien eine längere Überlebenszeit von Athleten im Vergleich

zur restlichen Bevölkerung (61,62). Der Grund für vermehrte Herztode bei Profisportlern wie Fußballern liegt vielmehr darin, dass die physiologische Belastung ein Trigger für Ventrikuläre Tachykardien ist, die dann auf dem Boden einer häufig unerkannten strukturellen Herzerkrankung wie einer HCM oder malformierten Koronararterien auftreten können (53,63,64). Daraus ergibt sich die Bedeutung der Unterscheidung des Sportherzens von pathologischen Herzhypertrophien.

1.9 MicroRNAs (miRNAs)

Die Entdeckung der miRNAs geht in das Jahr 1993 zurück, als Rosalind Lee und Rhonda Feinbaum entdeckten, dass das *lin-4*-Gen, welchem die Kontrolle über die Larvalstadien in *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) zugesprochen wird, nicht für ein Protein kodiert, sondern zwei Transkripte mit einer Länge von 22 beziehungsweise 61 Nukleotiden entstehen, welche zunächst „small temporal RNAs“ genannt wurden (65). Später folgte die Bezeichnung miRNA für das kleinere der beiden Transkripte und pri-miRNA für das längere Vorläufertranskript. War diese RNA nicht vorhanden, ging dies mit einem Defekt im Übergang von einem zum nächsten Larvalstadium und dem Abbruch der Larvalentwicklung einher (66). Im Verlauf wurden viele physiologische und pathologische Signalwege in verschiedenen Organismen und auch dem Menschen entdeckt, an deren Ausprägung miRNAs beteiligt sind. Momentan wird von etwa 2000 humanen miRNAs ausgegangen (67).

1.10 Transkription und Prozessierung

Die Transkription der miRNA-Gene erfolgt meist als Cluster, eine Transkription von isolierten Genen ist allerdings ebenfalls möglich. Das entstandene Transkript verfügt neben der 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende und dem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende über mehrere Schleifen oder eine Schleife (poly- oder monocistronisch) (68). Zunächst werden die miRNA-Gene mittels der RNA-Polymerasen II bzw. III zu etwa 2 kb langen Molekülen, den sogenannten pri-miRNAs, transkribiert (siehe Abbildung 3). Diese werden noch im Nukleus durch das RNase III-Enzym Drosha zu pre-miRNAs geschnitten, welche eine Länge von 60-100 Nukleotiden aufweisen und eine Haarnadelstruktur besitzen. Auch das direkte Splicen von mRNA-Introns kann zu pre-

miRNAs führen, welche dann Mirtrons heißen (67). Beide Formen gelangen durch den Ran-GTP-abhängigen Transporter Exportin 5 in das Zytoplasma, wo sie mittels eines weiteren RNase III-Enzyms, genannt Dicer, nochmals geschnitten werden (69). Dabei entsteht der instabile, etwa 22 Nukleotide umfassende Doppelstrang-miRNA-Duplex, welcher anschließend durch eine Helikase entwunden wird. Einer der beiden Stränge ist der reife, etwa 22 Nukleotide lange Strang, welcher sich im RNA-induced-silencing-complex (RISC) mit Argonaute-Proteinen zusammenlagert. Der andere Strang geht meist unter oder kann die Zelle verlassen und ebenfalls eine Rolle in der Genregulierung einnehmen (67,70,71).

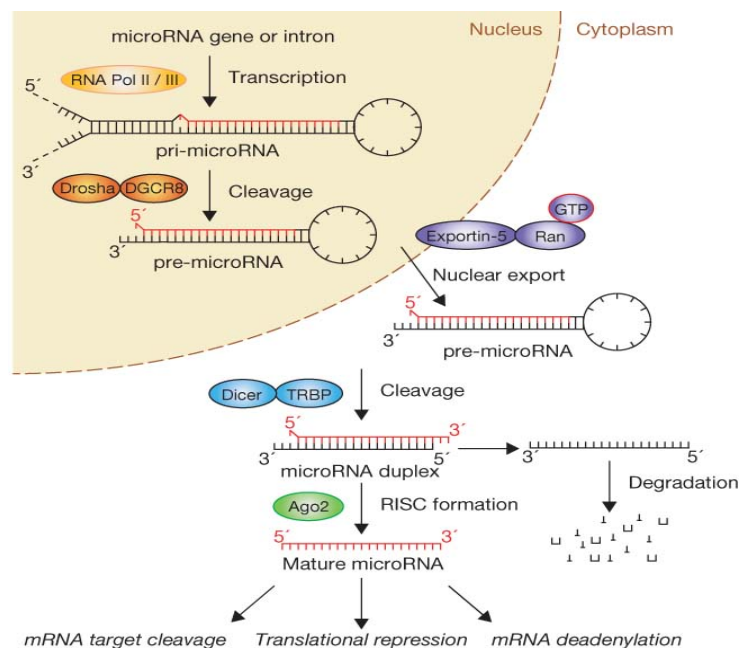


Abbildung 3: miRNA-Transkription und -Prozessierung: Nach Transkription durch die RNA-Polymerasen II und III erfolgt noch im Nucleus die Spaltung durch den Drosha-Komplex zur pre-miRNA, welche Exportin-5-abhängig in das Zytoplasma transportiert wird. Dort erfolgt eine weitere Spaltung durch das RNase-Enzym Dicer, welches auch die Haarnadelstruktur der pre-miRNA entfernt, wodurch miRNA-Duplexe entstehen. Nach Entwindung durch eine Helikase geht ein Strang meist unter während der mature Strang sich mit dem RISC assoziiert und die Translation durch Bindung an die Ziel-mRNA unterdrücken kann (Abbildung aus Winter et al. 2009) (72).

1.11 Wirkmechanismen von miRNAs

Der mit dem RISC assoziierte Strang kann an seine Ziel-mRNA binden, wobei eine miRNA in der Mehrzahl der Fälle mehrere Ziel-mRNAs aufweist. Die miRNAs binden meist an die 3' UTR der mRNA, wobei keine vollständige Bindung aller 22 Nukleotide notwendig ist und diese selten vorkommt. Im Falle einer kompletten Bindung führt dies zur Degradation der mRNA, bei inkompletter Bindung kommt es dagegen zur Inhibierung der Translation und damit der Proteinbiosynthese. Ein weiterer Faktor ist die Bindung der „Seed“-Sequenz an die mRNA, welche von Nukleotid 2-7 beziehungsweise 8 der jeweiligen miRNA reicht (67).

1.12 Nomenklatur der miRNAs

Gene, die für miRNAs kodieren, primäre Transkripte sowie auch die Vorläufer-miRNA pri-miRNA werden mit dem Kürzel „mir“ abgekürzt. Die reife Form der miRNAs wird mit „miR“ bezeichnet. Die dahinterstehende Zahl ergibt sich chronologisch nach der Entdeckung der jeweiligen miRNA. Bei sehr ähnlichen Sequenzen der miRNAs innerhalb einer Spezies folgt ein Buchstabe zur Unterscheidung, beispielsweise bei den miRNAs miR-33a und miR-33b. Entstehen aus einer pre-miRNA zwei reife miRNAs und es ist nicht klar, welche der beiden miRNAs die dominante miRNA ist, werden diese miR_xx_5p und miR_xx_3p genannt (73).

1.13 MiRNAs in der Kardiologie

MiRNAs sind an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen im Körper beteiligt und kommen in verschiedenen Gewebetypen des Menschen vor. 2008 konnte verifiziert werden, dass miRNAs nicht nur in ihrem ursprünglichen Gewebe verbleiben, sondern auch per Blutweg transportiert werden können. Dabei liegen sie in besonders stabiler Form vor, entweder gebunden an HDL-Proteine, Ago-2-Proteine oder auch eingeschlossen in Exosomen oder Mikrovesikel (71). Es konnten zudem Korrelationen zwischen miRNA-Expression und Herzhypertrophien festgestellt werden. So besteht zwischen der Ausprägung der kardialen Hypertrophie und der Höhe von miR-1 und miR-133 eine inverse Korrelation (74), diese beiden sind die bisher am besten

untersuchten miRNAs in Zusammenhang mit kardialen Hypertrophien. Ein beispielhafter Signalweg, der im Bereich der kardialen Hypertrophie von Bedeutung ist und bereits untersucht wurde, beinhaltet die Phosphatase Calcineurin, den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) und die miRNAs miR-23a und miR-133. So hemmt miR-23a das antihypertroph wirkende Protein MuRF1, nachdem es selbst mittels Calcineurin und NFATc3 induziert wurde. Gelegentlich wird die antihypertrophe miR-133 mittels NFAT gehemmt, was wiederum zu einer verstärkten Herzhypertrophie führt. Die Expression von miR-133 führt im Gegenzug zu einer Senkung von Calcineurin und NFAT (75).

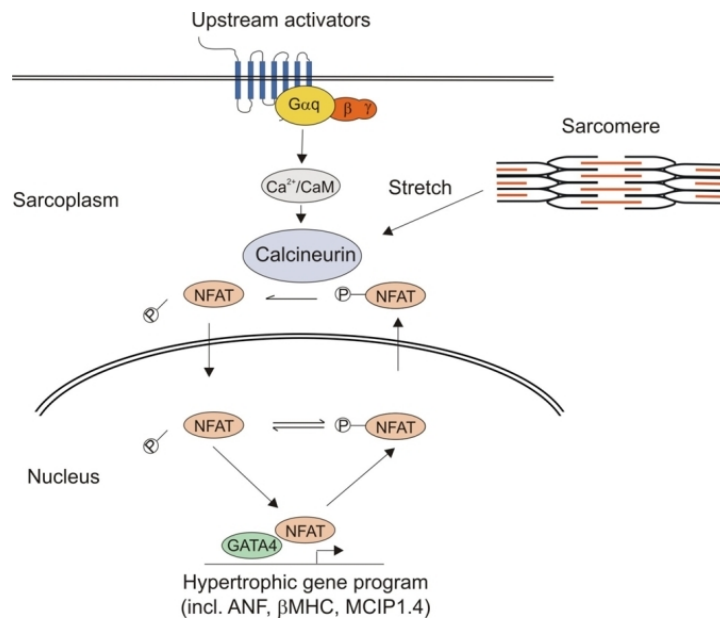


Abbildung 4: Calcineurin-Signalweg: Darstellung der Dephosphorylierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren durch Calcineurin, wodurch NFAT in den Nucleus eintritt und dort Zielgene aktiviert. Hierdurch wird eine hypertrophe Wirkung generiert (Abbildung entnommen der Internetseite des UKSH, Innere Medizin III).

1.14 MiRNAs als Biomarker

MiRNAs werden bisher bei keiner Erkrankung in der klinischen Praxis als Biomarker verwendet (67). Sie erfüllen allerdings eine Reihe von Kriterien, die wichtig sind, um als Biomarker fungieren zu können: Es konnte nachgewiesen werden, dass die

miRNA-Expression spezifisch für ein Gewebe, Organ oder eine Erkrankung sein kann (76). Die im Blut nachgewiesenen miRNAs sind zudem stabil, auch unter widrigen Verhältnissen. Außerdem lassen sie sich nach Blutabnahme einfach mittels realtime-PCR (Polymerasekettenreaktion) oder Microarray nachweisen (71,77). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei Erkrankungen eine Korrelation zwischen dem Schweregrad und der Prognose der Erkrankung und der miRNA-Expression besteht (78,79). Diese verschiedenen Merkmale von miRNAs führen dazu, dass sie weiterhin als potentielle Biomarker auch im Bereich der kardialen Hypertrophie gesehen werden.

1.15 Therapeutische Ansätze

AntagomiRs sind synthetisch hergestellte Antagonisten von miRNAs, die therapeutisch eingesetzt werden können (67). Es handelt sich dabei um synthetische RNA, welche eine vollständige Komplementarität zu einer miRNA besitzt und die diese funktionslos werden lässt (67). Am weitesten fortgeschritten ist ihre Erforschung im Bereich der Hepatitis C-Infektion, wo eine Phase-II-Studie zeigte, dass ein AntagomiR von miR-122 durch Inhibition von miR-122 zu einer dosisabhängigen Reduktion der HCV-RNA führte (80). Ein Beispiel aus dem kardiovaskulären Bereich ist die Antagonisierung der miRNAs miR-33a und 33-b, die bei nichthumanen Primaten zur Erhöhung von HDL und Senkung von VLDL führte, was einen Ansatz zur Therapie der Hypercholesterinämie darstellt (81).

1.16 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Formen der Linksherzhypertrophie anhand der miRNA-Expression im Serum von Patienten zu differenzieren und damit einen Schritt auf dem Weg zu miRNAs als Biomarkern in diesem Bereich zu gehen. Dafür werden jeweils 15 Probanden für die Gruppen der Aortenklappenstenosen, HHEs, HCMs und Sportherzen ausgesucht und mittels miRNA-Sequenzierung ihre jeweilige miRNA-Expression quantifiziert. Dabei werden erstmals in diesem Bereich nicht nur die pathologischen Formen der Linksherzhypertrophie, sondern auch mit dem Sportherz eine physiologische Linksherzhypertrophieform untersucht. Durch die scharfe Abgrenzung der Aortenklappenstenosen, HHEs, HNCMs, HOCMs und Sportherzen, welche im

Methodenteil weiter erläutert wird, erhoffen wir uns, einzelne miRNAs spezifisch einer Pathologie zuordnen zu können. Aber auch ganze Muster von miRNAs einem Krankheitstyp zuschreiben zu können, erscheint möglich. Gleichmaßen interessant zu klären ist die Frage, ob bei einer physiologischen Hypertrophieform wie dem Sportherz andere miRNAs eine Rolle spielen als bei pathologischen Formen und ob pathophysiologische Signalwege gefunden werden können, in denen für uns interessante miRNAs funktionelle Bedeutung besitzen.

2 Probandenauswahl, Materialien und Methoden

2.1 Probandenauswahl

Das Patientenkollektiv wurde teilweise prospektiv und teilweise retrospektiv zwischen den Jahren 2008 und 2015 rekrutiert und bestand aus vier Gruppen. Das für die Studie notwendige Votum erteilte die zuständige Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Kiel. Es wurden alle Patienten, die sich in diesem Zeitraum in der Inneren Medizin III des Universitätsklinikums Kiel mit der Diagnose einer Hypertrophen Kardiomyopathie, einer Hypertensiven Herzerkrankung oder einer hochgradigen Aortenklappenstenose vorstellten, nach den im Verlauf genannten Kriterien beurteilt. Die Patienten wurden meist im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung, teils auch bei anderen Untersuchungen wie der Echokardiographie, vollständig aufgeklärt. Bei vorliegendem schriftlichen Einverständnis erfolgte daraufhin die Abnahme von Blut-Plasma-Proben und die Aufnahme in das Patientenkollektiv. Die Patientendaten einschließlich der in der Klinik durchgeführten Untersuchungen wurden später über die Krankenhausinformationssysteme Orbis, Centricity Carddas und Optimal gesammelt. Zu den genannten drei Gruppen kam außerdem noch die Gruppe der Sportherzen. Für diese Gruppe wurden die notwendigen Daten von Minentauchern der Bundeswehr, deren schriftliches Einverständnis ebenfalls vorlag, während Leistungsuntersuchungen gewonnen. Dabei handelte es sich um eine Gruppengröße von 40 Athleten.

Für jede Gruppe wurden anhand bestimmter Kriterien wie der Septumdicke, der linksventrikulären Massen und möglichst wenig vorhandenen Begleiterkrankungen die für uns 15 passendsten Probanden herausgesucht, daraus ergab sich eine Gesamtgröße von 60 Patienten (siehe Tabellen 2-5). Die genauen Kriterien werden in den jeweiligen Abschnitten erwähnt.

2.2 Erhobene Parameter

1. Alter
2. Geschlecht
3. Septumdicke in mm (IVSd)
4. Hinterwanddicke in mm (PWd)
5. Linkes Atrium in mm
6. Linksventrikulär enddiastolischer Durchmesser in mm (LVEDD)
7. Vorliegen und Beurteilung einer Diastolischen Dysfunktion
8. Beurteilung der LV-Funktion
9. E/E'
10. E/A
11. Klappenöffnungsfläche der Aortenklappe in cm^2
12. Mittlerer Gradient über der Aortenklappe in mmHg
13. Größe
14. Gewicht
15. BMI (Kg/m^2)
16. Vorliegen einer Adipositas
17. Vorliegen eines Hypertonus
18. LV-Masse in Gramm
19. LV-Mass-Index (g/m^2)
20. Relative Wanddicke des linken Ventrikels
21. Ejektionsfraktion
22. Laborwerte (Creatinin in mg/dl, Hs-TNT in ng/l, NT-proBNP in pg/ml)
23. Vorliegen und Beurteilung einer KHK
24. Beurteilung einer Herzinsuffizienz mittels NYHA-Stadium
25. Vorliegen eines Vorhofflimmerns
26. Vorliegen einer pAVK
27. Vorliegen einer Nierenarterienstenose
28. Vorliegen einer Chronisch venösen Insuffizienz
29. Vorliegen eines Diabetes mellitus
30. Vorliegen eines Malignoms aktuell oder in der Vergangenheit
31. Vorliegen eines Nikotinabusus

32. Vorliegen einer positiven kardiologischen Familienanamnese
33. Medikation des Patienten (ASS, ACE-Hemmer, β -Blocker, Ca-Antagonisten, Marcumar, Clopidogrel, Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten, Sartane, Diuretika, Aldosteronantagonisten, Lipidsenker, Digitalis, Molsidomin, zentral wirkendes α -Sympatomimethikum, Monoxidin, α -Rezeptor-Blocker)
34. VO2 max in ml/min
35. Maximal in der Ergometrie erreichte Wattzahl

2.3 Einschlusskriterien

Da die entscheidenden Kriterien, nach denen in den unterschiedlichen Gruppen die Probanden ausgewählt wurden, durch die verschiedenen Erkrankungsmuster und damit auch differierenden Hypertrophieformen unterschiedlich waren, werden diese anhand der jeweiligen Gruppe erläutert.

Aortenklappenstenosen

In dieser Gruppe war insbesondere eine vorliegende hochgradige Aortenklappenstenose das definierende Kriterium. Zudem waren die Septumdicke, die LV-Masse und der LV-Masse-Index von Bedeutung.

Die LV-Masse wurde dabei folgendermaßen nach Devereux et al. berechnet (82), was den Leitlinien der Canadian Society of Echocardiography entspricht:

$$LV\text{-Masse (g)} = 0,8 (1,04 ([LVEDD + PWd + IVSd]^3 - [LVEDD]^3)) + 0,6g$$

Abkürzungen: LVEDD=Linksventrikulär enddiastolischer Durchmesser; PWd=Hinterwanddicke diastolisch; IVSd=Septumdicke diastolisch; g=Gramm

Um die LV-Masse in Relation zu den Körpermaßen des Patienten zu setzen, wurde diese Formel durch die errechnete Körperoberfläche des Patienten dividiert (12).

$$LV\text{-Masse-Index (g/m}^2\text{)} = 0,8((1,04 ([LVEDD + PWd + IVSd]^3 - [LVEDD]^3)) + 0,6g) / KOF$$

$$KOF = 0,01666667 * \text{Länge}^{0,5} * \text{Masse}^{0,5}$$

	Frauen				Männer			
	Referenz-Bereich	Leicht abweichend	Mittelgradig abweichend	Stark abweichend	Referenz-Bereich	Leicht abweichend	Mittelgradig abweichend	Stark abweichend
LV-Masse (g)	67-162	163-186	187-210	≥211	88-224	225-258	259-292	≥293
LV-Masse-Index (g/m ²)	43-95	96-108	109-121	≥122	49-115	116-131	132-148	≥149
PWd (cm)	0,6-0,9	1,0-1,2	1,3-1,5	≥1,6	0,6-1,0	1,1-1,3	1,4-1,6	≥1,7
IVSd (cm)	0,6-0,9	1,0-1,2	1,3-1,5	≥1,6	0,6-1,0	1,1-1,3	1,4-1,6	≥1,7
RWT	0,22-0,42	0,43-0,47	0,48-0,52	≥0,53	0,24-0,42	0,43-0,46	0,47-0,51	≥0,52

Tabelle 1: Normwerte linker Ventrikel: Darstellung der wichtigsten Werte zur Bestimmung einer Linksherzhypertrophie mit Angabe der Referenzwerte und Einteilung in Schweregrade bei Frauen und Männern. Normwerte entnommen „Praxis der Echokardiographie“; Flachskampf, Frank A.; 2007.

Die Normwerte für Septumdicke, LV-Masse und LV-Masse-Index variieren je nach Geschlecht und sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle Patienten der Gruppe hatten eine erhöhte linksventrikuläre Masse, eine erhöhte Septumdicke und einen erhöhten LV-Masse-Index.

Zudem hatten alle Patienten in der Gruppe eine hochgradige Aortenklappenstenose mit einer Klappenöffnungsfläche $\leq 1\text{cm}^2$ und einem mittleren Gradienten zwischen linkem Ventrikel und Aorta von $\geq 40\text{ mmHg}$.

Hypertensive Herzerkrankung

In dieser Gruppe lag das Augenmerk auf der Septumdicke, der linksventrikulären Masse und dem LV-Masse-Index in Verbindung mit einer bestehenden Hypertonie. Ein Charakteristikum der HHE ist außerdem wie in der Einleitung erwähnt eine diastolische Dysfunktion, die ebenfalls alle Patienten der Gruppe aufwiesen.

Um wie im vorherigen Abschnitt besprochen eine Überschneidung von HHE und HCM zu vermeiden, war die maximal in dieser Gruppe vorkommende Septumdicke 14 mm, da die HHE mit einer milderen Hypertrophieform assoziiert ist. Alle Patienten dieser Gruppe wiesen eine erhöhte Septumdicke auf.

Des Weiteren wurden auch in dieser Gruppe die linksventrikuläre Masse und der LV-Masse-Index berechnet, um die Linksherzhypertrophie weiter zu verifizieren.

Hypertrophe Kardiomyopathie

In dieser Gruppe wurde vor allem auf die Septumdicke, die linksventrikuläre Masse und den aus dieser abgeleiteten LV-Masse-Index geachtet.

Bei einer Septumdicke von ≥ 11 mm kann zwar schon von einer Linksherzhypertrophie ausgegangen werden, um allerdings die Patienten einer Hypertrophen Kardiomyopathie von anderen Erkrankungen wie vor allem der HHE und dem Sportherz abzugrenzen, wurden in diese Gruppe nur Patienten mit einer Septumdicke von ≥ 15 mm aufgenommen, da eine HCM mit einer stärker ausgeprägten linksventrikulären Hypertrophie einhergeht als beispielsweise die HHE. Diese Grenze wurde durch uns definiert und wird in der Diskussion weiter erörtert.

Bei allen Patienten der Gruppe war eine Linksherzhypertrophie durch erhöhte Werte bei der Septumdicke, der LV-Masse und dem LV-Masse-Index vorhanden.

Sportherzen

Da wie in der Einleitung skizziert das Sportherz mit einer milden Form der Linksherzhypertrophie einhergeht, wurde für diese Gruppe neben der Septumdicke, der linksventrikulären Masse und dem LV-Masse-Index die relative Wanddicke des Ventrikels bestimmt, um eine Hypertrophie zu detektieren. Die Formel für diese lautet:

$$\text{Relative Wanddicke} = 2 * PWd \text{ (mm)} / LVEDD \text{ (mm)}$$

Die Normwerte können Tabelle 1 entnommen werden. Alle Probanden der Gruppe hatten eine Linksherzhypertrophie, definiert über mindestens einen der Parameter Septumdicke, LV-Masse, LV-Masse-Index und Relative Wanddicke.

2.4 Ausschlusskriterien

Die Ausschlusskriterien galten für alle Gruppen:

- a. KHK (Koronare Herzkrankheit) mit höhergradigen Stenosen
- b. Aktuelles oder Zustand nach Malignom
- c. Nierenarterienstenose
- d. pAVK
- e. Hyper- und Hypothyreose
- f. Klappenvitien abseits der Aortenklappenstenose
- g. Höhergradige Niereninsuffizienz

2.5 Methoden

Bei allen 60 Probanden der Studie erfolgten die Blutentnahmen mittels PAXgene™ Blood RNA Systemen. Dabei war in den Blutentnahmeröhrchen ein Zusatz enthalten, wodurch es zur Stabilisierung der zellulären RNA kam. Es handelte sich ansonsten um normale Blutentnahmen mit Vakuumsystem, am Ende der Blutentnahme wurde das PAXgene-Röhrchen zehn Mal über dem Kopf geschwenkt, was laut Protokoll des Herstellers notwendig war. Die Proben wurden bei -70 °C gelagert.

Nach Sammlung aller Proben und Rekrutierung der für uns passenden Probanden erfolgte bei allen 60 Proben die Isolierung der RNA aus dem Vollblut. Dafür wurde jeweils das PAXgene Blood miRNA Kit von PreAnalytiX verwendet. Die einzelnen Isolierungsschritte wurden dem dazugehörigen Handbuch entnommen, die Isolierung der RNA aus dem Vollblut wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Die Proben wurden zunächst in Gefrierschränken bei Temperaturen von - 70 °C gelagert.
2. In den 2 Stunden vor Beginn der Isolierung wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert.
3. Zentrifugierung der Proben in den Zentrifugen Universal 320 R (Hettich Zentrifugen) / Biofuge Primo R (Thermo scientific) für 10 Minuten bei 5000 g.
4. Abpipettieren des Überstands und Hinzufügen von 4 ml RNase-freien Wassers.

5. Schütteln bis zum Auflösen des Rückstandes, danach wiederum Zentrifugierung für 10 Minuten in derselben Zentrifuge bei 5000 g. Anschließend Verwerfen des Überstands.
6. Hinzufügen von 350 µl des Puffers BM1 und Schütteln bis zum Auflösen des Rückstandes.
7. Pipettieren der Proben in Mikrozentrifugen-Röhrchen (Größe 1,5 ml). Hinzufügen von 300 µl des Puffers BM2 und 40 µl Proteinase K. Schütteln der Proben für 5 Sekunden. Anschließend Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 55°C im Schüttel-Inkubator bei 1200 rpm.
8. Pipettieren der Proben in PAXgene Shredder Spin columns, welche in 2 ml Bearbeitungsröhrchen steckten. Anschließend Zentrifugierung der Proben in der Zentrifuge Fresco 21 (Thermo scientific) bei 20000 g.
9. Überstand des Durchgeflossenen in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettieren und den Rückstand in den Bearbeitungsröhrchen dabei nicht tangieren.
10. 700 µl Isopropanolol (100 %Reinheitsgrad) hinzufügen und Schütteln der Proben.
11. Pipettieren von 700 µl der Proben in PAXgene RNA spin columns, welche in 2 ml Bearbeitungsröhrchen steckten. Zentrifugierung für eine Minute bei 20000 g in der Zentrifuge Fresco 21 (Thermo scientific). Danach Verwerfen der alten Bearbeitungsröhrchen und Verwenden von neuen.
12. Hinzufügen von 350 µl des Puffers BM3 (nach Zugabe von Ethanol zum Puffer) in PAXgene RNA spin columns, danach Zentrifugierung der Proben in der Zentrifuge Fresco 21 (Thermo scientific) für 15 Sekunden bei 20000 g. Anschließend entfernen der alten Bearbeitungsröhrchen mit Rückstand und Verwendung von neuen Röhrchen.
13. Hinzufügen von 10 µl Stammlösung DNase I zu 70 µl des Puffers RDD in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen. Zum Vermischen der Proben gegen die Röhrchen schnippen und wenige Sekunden zentrifugieren.
14. Pipettieren von 80 µl dieser Mischung direkt auf die Membran der PAXgene RNA spin columns, anschließend für 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.
15. Nach Inkubation Hinzufügen von 350 µl des Puffers BM3 zu den PAXgene RNA spin columns. Anschließend Zentrifugierung der Proben für 15 Sekunden bei

20000 g in der Zentrifuge. Die benutzten Bearbeitungsröhrchen wurden hier-nach mit Überstand gegen neue ausgetauscht und die alten verworfen.

16. Hinzufügen von 500 µl des Puffers BM4 (nach Zugabe von Ethanol zum Puffer) in die PAXgene RNA spin columns. Anschließend Zentrifugierung für 15 Sekunden bei 20000 g in der Zentrifuge Fresco 21 (Thermo scientific). Die benutzten Bearbeitungsröhrchen mit Durchgeflossenem wurden dann entsorgt und gegen neue ausgetauscht.
17. Nochmaliges Hinzufügen von 500 µl des Puffers BM4 zu den PAXgene RNA spin columns. Wiederum Zentrifugierung bei 20000 g für 15 s und Austausch der Bearbeitungsröhrchen.
18. Zentrifugierung der PAXgene RNA spin columns zum Trocknen der Membranen.
19. Verwerfen der Bearbeitungsröhrchen mit Durchfluss und Stecken der PAXgene RNA spin columns in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen. Danach wurden 40 µl des Puffers BR5 direkt auf die Membran der PAXgene RNA spin columns pipettiert. Anschließend Zentrifugierung der Proben bei 20000 g für 1 Minute in der Zentrifuge Fresco 21 (Thermo scientific) zum Zwecke der Eluierung der RNA.
20. Wiederholung von Schritt 19 mit 40 µl des Puffers BR5 und denselben Mikrozentrifugen-Röhrchen.
21. Inkubation des Eluats für 5 Minuten bei 65°C im Schüttel-Inkubator ohne Schütteln. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gelagert.
22. Anschließend Aufbewahren der Proben im Gefrierschrank bei -70°C.

Anschließend wurde eine Qualitätsüberprüfung der Proben mittels Nanospektromie durchgeführt, deren Ergebnisse dem Anhang entnommen werden können. Danach erfolgte die Übergabe der Proben (15 µl Aliquot) an die Mitarbeiter des IKMBs.

Die Produkte unterlagen Illumina's TruSeq Small RNA Sample Preparation protocol, um kleine RNA-Bibliotheken für jede Probe zu erstellen. Anschließend erfolgte die Sequenzierung mittels Illumina HiSeq 2500-Maschinen (24 Proben pro Linie, Single-end reads von 50 bp Länge).

Rohe small RNA-sequenzierte reads wurden unter Benutzung von cutadapt v1.3 (83) prozessiert, um Adapter, Basenabschnitte mit schlechter Qualität ($<Q20$) und reads kleiner 18 bp zu entfernen. Resultierende reads, die dem viralen Genom, viralen miRNA Precursoren und humanen non-miRNA short RNAs zugeordnet werden konnten, wurden herausgefiltert. Die verbleibenden reads wurden miRNA-Abschnitten der Plattform miRBase (release 21) (84) zugeordnet unter Benutzung des Quantifizierungsmoduls von miRDeep2 mit Standardeinstellungen (85).

Sequenzen, welche nicht mehr als 5 counts in über 50 % der Proben in einer der Gruppen aufwiesen, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das resultierende Datenset wurde normalisiert, indem eine varianzstabilisierende Transformation (VST) basierend auf parametrischen Dispersionsschätzungen wie im R Paket von DESeq2 vorhanden durchgeführt wurde (86). Anschließend wurden Proben, deren Medianwert von normalisierten counts unter $Q1-3 \times IQR$ oder über $Q3 + 3 \times IQR$ lagen als Ausreißer gewertet und ausgeschlossen. Nach der Renormalisierung wurden explorative Graphiken gebildet basierend auf multidimensionaler Skalierung der Daten unter Gebrauch von Spearman's Unähnlichkeiten. Zum Schluss wurde die differentielle Expressionsanalyse (mit adjustierten p-Werten wie bei Benjamini und Hochberg, $p_{adj} < 0,05$ und $\log_2FC > 2$) durchgeführt mittels negativ binomialen Test wie implementiert im R-Paket von DESeq2.

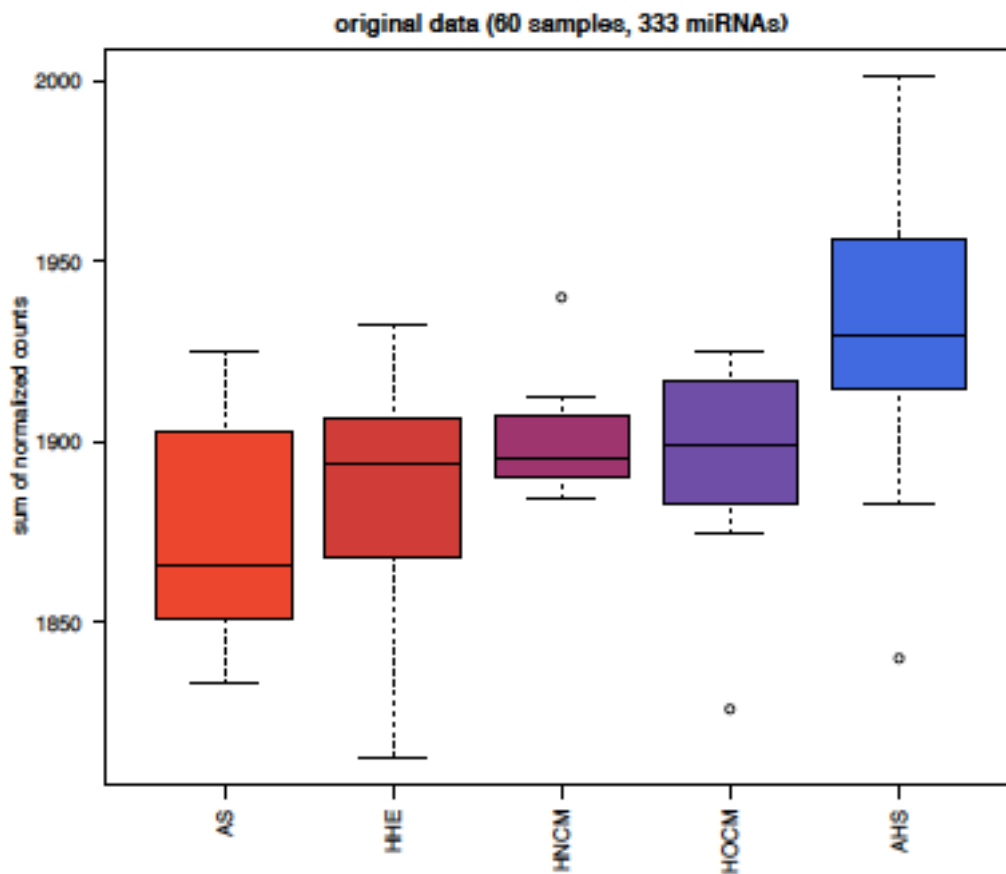


Abbildung 5: Qualitätskontrolle IKMB: Boxplots zur Darstellung der Gesamtheit der read counts pro Gruppe. Aus der Abbildung ergibt sich eine ähnliche Verteilung auf die verschiedenen Gruppen. (Mit freundlicher Unterstützung des IKMBs).

2.6 Methoden qRT-PCR

Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse wurde eine Analyse von fünf miRNAs mittels PCR durchgeführt. Es wurden dabei neun Vollblutproben von Patienten mit Aortenklappenstenosen mit einer Kontrollgruppe von fünf Vollblutproben aus den anderen Krankheitsgruppen verglichen. Zum Vergleich dienten die fünf miRNAs mit den in der Sequenzierung größten Expressionsunterschieden zwischen Aortenklappenstenosen und weiteren Patientengruppen. Die Analyse erfolgte nach folgendem Prozedere:

Die Vollblutproben wurden wie die Proben vor der Sequenzierung bei -70°C gelagert. Anschließend erfolgte die Isolierung mittels PAXgene Blood miRNA Kit nach den Herstellerangaben wie oben bei der Sequenzierung beschrieben.

Weiter erfolgte die Umschreibung der miRNAs in cDNA mittels Reverse Transkription unter Anleitung durch das miScript II RT Kit von Qiagen. Dabei wurden alle reifen miRNA-Sequenzen in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde mittels RNA-Ribose-Polymerase-Reaktion eine Poly-A-Sequenz an alle in dem Ansatz vorhandenen RNA-Moleküle addiert, im Anschluss dockte ein Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Sequenz und führte zur Synthese eines komplementären cDNA-Gegenstranges. Dieser funktionierte als DNA-Template bei der darauffolgenden PCR-Amplifikation.

Bei dieser kam dem verwendeten Oligo-dT-Primer eine wichtige Rolle zu, dieser enthielt eine artifizielle Sequenz (Universal Taq). Im Reaktionsgemisch waren dann ein Vorwärts-Primer, der an die zu amplifizierende miRNA-Sequenz bindet, und ein Rückwärts-Primer, der an Universal Taq bindet, vorhanden. Als Vorwärts-Primer wurden die jeweiligen miScript Primer Assays von Qiagen verwendet.

Die Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte erfolgte mittels Fluoreszenzmessung in Echtzeit. Das Programm wurde mit dem CFX96™ Real Time PCR Detection System von Bio-Rad Laboratories durchgeführt.

Anhand einer Fluoreszenzkurve wurde dann ein entsprechender Cycle-Threshold-Wert ermittelt, die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Anschließend erfolgten interne Kontrollen, hierfür wurden RNU6 sowie SNORD61 ausgewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemein

Mit Hilfe der MicroRNA-Sequenzierung zeigte sich bei 131 der insgesamt untersuchten 2589 miRNAs mindestens eine signifikante Über- beziehungsweise Unterexpression zwischen den verschiedenen Gruppen. Die größte Anzahl an miRNAs, die zwischen zwei verschiedenen Gruppen signifikante Unterschiede aufwies, zeigte sich zwischen der Gruppe der Aortenklappenstenosen und den Sportherzen (68), gefolgt von den Unterschieden zwischen HOCM, HNCM und HHE ebenfalls jeweils gegenüber den Sportherzen (65, 59, 56). Auch insgesamt bestanden in der Gruppe der Aortenklappenstenosen die größten Unterschiede in der miRNA-Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen (siehe Abbildung 6).

Zwischen Aortenklappenstenosen und HHE-Patienten ergaben sich 40 miRNAs, die Unterschiede in ihrer Expression aufzeigten, zwischen Aortenklappenstenosen und HNCM-Patienten 31 miRNAs und zwischen Aortenklappenstenosen und HOCMs 37 miRNAs.

Zwischen HHEs und HNCMs zeigten sich 43 miRNAs mit signifikanten Expressionsunterschieden und zwischen HHE-Patienten und HOCMs 29 miRNAs.

Zwischen HNCM-Patienten und HOCMs zeigte sich die niedrigste Anzahl an miRNAs, die zwischen den beiden Gruppen unterschiedlich exprimiert wurden, nämlich 12 miRNAs (siehe Abbildung 7).

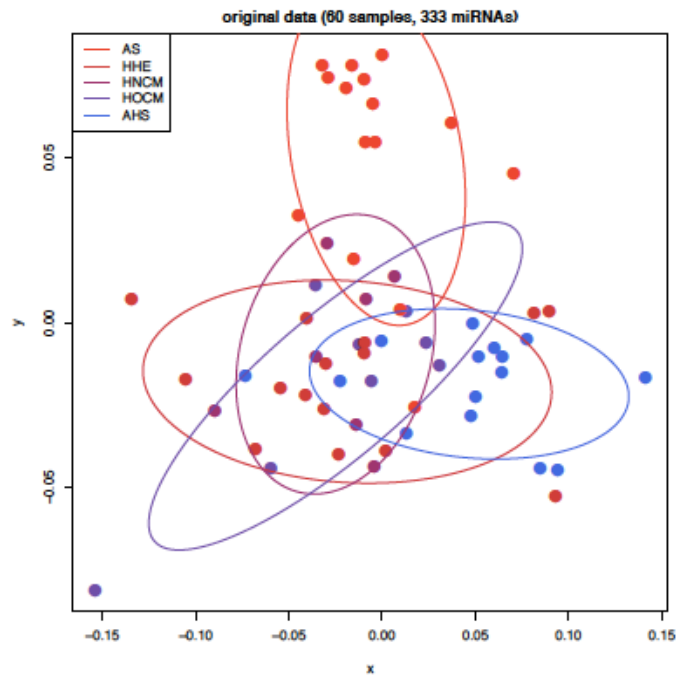


Abbildung 6: Veranschaulichung Expressionsunterschiede mit Hilfe multidimensionaler Skalierung. Jeder Punkt dieser Graphik stellt einen Patienten dar. Die Anordnung erfolgte im freien dreidimensionalen Raum. Die Kreise stellen jeweils Grenzen dar, in welchen sich 12 von 15 miRNAs einer Gruppe befinden. Auffallend sind die deutlichen Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen Aortenklappenstenosen und anderen Gruppen. (Mit freundlicher Unterstützung des IKMBs)

	AS_vs_HHE	AS_vs_HNCM	AS_vs_HOCCM	AS_vs_AHS	HHE_vs_HNCM	HHE_vs_HOCCM	HHE_vs_AHS	HNCM_vs_HOCCM	HNCM_vs_AHS	HOCCM_vs_AHS
AS_vs_HHE	40	16	18	19	15	9	10	4	11	14
AS_vs_HNCM		31	24	16	10	9	8	5	12	15
AS_vs_HOCCM			37	15	7	16	5	6	12	17
AS_vs_AHS				68	22	8	34	9	49	46
HHE_vs_HNCM					43	19	16	5	24	24
HHE_vs_HOCCM						29	3	5	11	16
HHE_vs_AHS							56	5	34	37
HNCM_vs_HOCCM								12	7	10
HNCM_vs_AHS									59	51
HOCCM_vs_AHS										65

Abbildung 7: Anzahl miRNAs mit signifikanten Expressionsunterschieden in paarweisen Vergleichen. Die mittige Diagonale zeigt die absolut zwischen zwei Gruppen unterschiedlich exprimierten miRNAs (bspw. 68 zwischen As und AHS), daran folgend wird jeweils dargestellt, wie viele dieser miRNAs auch in den weiteren paarweisen Vergleichen eine signifikante Über- oder Unterexpression aufwiesen. (Mit freundlicher Unterstützung des IKMBs)

3.2 Probandencharakterisierung

Von den Probanden in der Studie waren 41 männlich und 19 weiblich, nur in der Gruppe der Aortenklappenstenosen waren deutlich mehr Frauen als Männer. In der Gruppe der Sportherzen waren nur Männer. In den verschiedenen Gruppen zeigte sich eine unterschiedliche Alterstruktur, so waren Probanden in der Gruppe der Sportherzen deutlich am jüngsten und Patienten aus der Gruppe der Aortenklappenstenosen am ältesten. Patienten mit HHE und HCM lagen dazwischen (siehe Tabelle 2).

	As	HHE	Sportler	HCM
n	15 (m=3, f=12)	15 (m=12, f=3)	15 (m=15, f=0)	15 (m=11, f=4)
Alter (y)	80	69	26	59
Größe (cm)	164	176	185	178
Gewicht (kg)	75	91	82	89
BMI (kg/m²)	26,1	29	24,6	28,1

Tabelle 2: Biometrische Patientendaten der verschiedenen Gruppen (n=Anzahl Patienten in der Gruppe; y=Jahre; cm=Centimeter; kg=Kilogramm; m²=Quadratmeter; m=männlich; f=weiblich).

3.3 Charakterisierung der Gruppen

Es erfolgt zunächst eine einzelne Darstellung der Gruppen, welche im Anschluss miteinander verglichen werden. Im Freitext erfolgt die Konzentration auf die für die Auswahl wichtigen Werte, weitere Daten sind den zugehörigen Abbildungen zu entnehmen. Alle in diesem Abschnitt genannten Echokardiographiewerte, Herzkatheterwerte und Patientenmaße sind als Mediane zu verstehen.

Aortenklappenstenosen

Diese Gruppe bestand aus zwölf Frauen und drei Männern, der Median des Alters betrug 80 Jahre. Der Median der Septumdicke lag in dieser Gruppe bei 14 mm, der Median der Hinterwanddicke bei 13 mm. Der LVEDD betrug 43 mm und das linke

Atrium wurde mit 47 mm gemessen. Bei zwei Drittel der Patienten lag eine diastolische Dysfunktion vor, bei einem Drittel eine systolische linksventrikuläre Funktionseinschränkung. Für die linksventrikuläre Masse ergab sich ein Median von 247 g, aus der weiteren Berechnung folgte ein LV-Masse-Index von 138 g/m^2 und eine relative Wanddicke des linken Ventrikels von 0,57. In dieser Gruppe wurde außerdem echokardiographisch die Klappenöffnungsfläche der Aortenklappe mit $0,54 \text{ cm}^2$ und der mittlere Gradient über der Aortenklappe mit 52,5 mmHg ermittelt. Der Median des BMI in dieser Gruppe betrug $26,1 \text{ kg/m}^2$ bei einer Größe von 1,64 m und einem Gewicht von 75 kg.

93,3 % dieser Gruppe litten zusätzlich an einer arteriellen Hypertonie, 40 % an einer Adipositas und einem Vorhofflimmern und ein Drittel hatte einen Diabetes mellitus.

73,3 Prozent der Patienten wurden medikamentös mit einem Beta-Blocker therapiert, ebenso viele Patienten nahmen einen Lipidsenker ein. Außerdem wurden zwei Drittel der Gruppe mit ASS behandelt, 60% mit einem Diuretikum, ein Drittel mit Sartanen und Clopidogrel.

Hypertensive Herzerkrankung

Diese Gruppe setzte sich aus zwölf Männern und drei Frauen mit einem Alter von 69 Jahren zusammen. Der Median der Septumdicke und der Hinterwanddicke lagen in dieser Gruppe bei 13 mm, der LVEDD betrug 48 mm und die Messung des linken Atriums ergab 43 mm. Die LV-Masse in dieser Gruppe war 247 g, der LV-Masse-Index war 116 g/m^2 und die relative Wanddicke des linken Ventrikels war 0,53. Alle Patienten dieser Gruppe litten definitionsgemäß unter einer diastolischen Dysfunktion und einer arteriellen Hypertonie, bei jedem fünften Patienten war auch die systolische linksventrikuläre Funktion beeinträchtigt. Der Median des BMI in dieser Gruppe lag bei 29 kg/m^2 , was aus einem Gewicht von 91 kg und einer Größe von 1,76 m resultierte. Zwei Drittel der Patienten mit HHE hatten eine Adipositas, knapp die Hälfte berichtete über einen Nikotinabusus und bei 13,3 % der Patienten war ein Vorhofflimmern diagnostiziert worden. 46,7 Prozent nahmen einen Beta-Blocker ein, ein gutes Viertel wurde mit ASS, einem Diuretikum und einem ACE-Hemmer therapiert. 20 % wurde ein Lipidsenker verschrieben.

Hypertrophe Kardiomyopathie

In der Gruppe der Patienten mit Hypertropher Kardiomyopathie waren elf Männer und vier Frauen mit einem Alter von 59 Jahren. Der Median der Septumdicke lag bei 21 mm, der der Hinterwand bei 17 mm. Die linksventrikuläre Masse betrug im Median 354 g, die Indexanbindung über die Körperoberfläche ergab einen Wert von 177 g/m² und die relative Wanddicke des linken Ventrikels war 0,81. Das linke Atrium maß in der Echokardiographie 44 mm, der LVEDD betrug ebenfalls 44 mm.

Der Median des BMI in dieser Gruppe war 28,1 kg/m² bei einer Größe von 1,78 m und einem Gewicht von 89 kg. Demnach hatten 60 % dieser Gruppe eine Adipositas. Zwei Drittel der Patienten litten an arterieller Hypertonie und 26,7 % berichteten über eine positive kardiale Familienanamnese. Dies ist in dieser Gruppe durch die in der Einleitung genannte genetische Ätiologie der Hypertrophen Kardiomyopathie hervorzuheben.

Alle Patienten dieser Gruppe nahmen einen Beta-Blocker ein, 60 % einen ACE-Hemmer und etwa die Hälfte ASS und ein Diuretikum. Außerdem wurde über die Hälfte der Gruppe mit einem Lipidsenker therapiert.

Die Unterschiede in den Daten waren zwischen HOCM- und HNCM-Patienten gering bis auf folgende Ausnahmen: 75 % der Patienten mit einer HOCM litten an einer diastolischen Dysfunktion, bei der HNCM waren dies 57,1 % der Patienten. Hingegen war die linksventrikuläre Masse bei Patienten mit HNCM mit einem Median von 380 g im Vergleich zu Patienten mit einer HOCM mit einem Median von 332,5 g höher. Außerdem wurde bei Patienten mit HNCM häufiger eine arterielle Hypertonie, eine Adipositas und ein Vorhofflimmern festgestellt als bei Patienten mit HOCM, wobei Patienten mit HOCM jünger waren als Patienten mit HNCM. Auch nahmen in dieser Studie mehr Patienten mit HNCM als mit HOCM Medikamente wie ASS, ACE-Hemmer und Lipidsenker ein.

Sportherzen

Die Gruppe der Sportherzen umfasste 15 männliche Minentaucher der Bundeswehr, welche im Median 26 Jahre alt waren. Bei einer Größe von 1,85 m und einem Gewicht von 82 kg ergab sich für die Gruppe ein Median des BMIs von 24,6 kg/m². Der Median

der Septumdicke lag in dieser Gruppe bei 11,75 mm und der Median der Hinterwanddicke bei 11 mm. Die LV-Masse in dieser Gruppe betrug 212 g, der LV-Masse-Index 101 g/m^2 und die relative Wanddicke des linken Ventrikels lag bei 0,44. Der LVEDD wurde in dieser Gruppe mit 50,33 mm gemessen, das linke Atrium mit 34,67 mm. Keiner der Athleten hatte eine diastolische oder systolische Funktionsstörung des linken Ventrikels. Außerdem nahm keiner der Gruppe zugehörigen Sportler ein Medikament ein oder wies kardiale Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, einen Diabetes mellitus, ein Vorhofflimmern oder eine positive kardiale Familienanamnese auf. Die maximale Sauerstoffaufnahme VO_2max in der Ergospirometrie lag bei 3752 ml/min, die maximal leistbare Wattzahl bei 400 Watt.

3.4 Vergleich der Gruppen

Bei Patienten mit Aortenklappenstenose und HHE hatten fast alle Patienten einen arteriellen Hypertonus, während in der HCM-Gruppe etwa zwei Drittel davon betroffen waren (siehe Tabelle 3). Wie bei allen kardiovaskulären Risikofaktoren litt kein Proband aus der Gruppe der Sportherzen darunter. Der überwiegende Anteil der Patienten in der Studie hatte eine Adipositas, insbesondere bei HHE-Patienten sowie HNCMs lag dieser Risikofaktor vor. Eine positive Familienanamnese für die jeweilige Hypertrophieform bestand bei zwei Dritteln der HHE-Patienten und etwa einem Viertel der Patienten mit HNCM sowie HOCM, lediglich ein weiterer Patient aus den anderen Gruppen hatte ebenfalls eine positive Familienanamnese.

Ein Drittel der Patienten aus der Gruppe der Aortenklappenstenosen hatte einen Diabetes mellitus, was den größten Wert darstellt, in den anderen Gruppen war der Anteil deutlich geringer. In der Gruppe der HHEs bestand bei knapp der Hälfte ein Fumatorium, in der Gruppe der HCMs war es etwa ein Viertel und bei den Aortenklappenstenosen circa nur jeder Achte.

Der Anteil an Patienten mit einem bereits bestehenden Vorhofflimmern war bei Aortenklappenstenosen und HNCM-Patienten am größten und bei HOCMs und insbesondere HHEs geringer.

Bei den Laborwerten zeigten sich die höchsten Werte für Troponin T und NT-proBNP in der Gruppe der HOCMs.

	As	HHE	Sportler	HCM
Hypertonus (%)	93,3 (n=15)	100 (n=15)	0 (n=15)	66,7 (n=15)
Adipositas (%)	40 (n=15)	66,7 (n=15)	0 (n=15)	60 (n=15)
Diab. mell. (%)	33,3 (n=15)	6,7 (n=15)	0 (n=15)	13,3 (n=15)
Nikotin (%)	13,3 (n=15)	46,7 (n=15)	0 (n=15)	26,7 (n=15)
Vorhofflimmern (%)	40 (n=15)	13,3 (n=15)	0 (n=15)	33,3 (n=15)
Pos. Familienanamnese (%)	6,7 (n=15)	66 (n=15)	0 (n=15)	26,7 (n=15)
Kreatinin (mg/dl)	0,9 (n=15)	0,86 (n=15)	-	1,15 (n=14)
Hs-TNT (ng/l)	10 (n=15)	7 (n=6)	-	63,5 (n=12)
NT-proBNP (pg/ml)	657 (n=12)	26 (n=13)	-	1122 (n=8)

Tabelle 3: Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Laborwerte der Patientengruppen im Vergleich (n=Anzahl der Probanden; mg=Milligramm; dl=Deziliter).

Der Vergleich der Medikamenteneinnahme zwischen den verschiedenen Gruppen lässt sich Tabelle 4 entnehmen. In der Gruppe der Sportherzen nahm keiner der Patienten ein Medikament ein. In der Gruppe der Aortenklappenstenosen wurden insbesondere Beta-Blocker, ASS, Diuretika und Lipidsenker eingenommen. In der Gruppe der HHE-Patienten nahmen deutlich weniger Patienten Medikamente als in der Gruppe der Aortenklappenstenosen. Die in dieser Gruppe am häufigsten eingenommenen Medikamente waren Beta-Blocker, ASS, Diuretika, ACE-Hemmer sowie Calcium-Antagonisten. In der Gruppe der HCMs erfolgte bei allen Patienten die Einnahme von Beta-Blockern, zudem nahmen über die Hälfte der Patienten aus dieser Gruppe ASS, Diuretika, ACE-Hemmer und Lipidsenker ein.

Medikament	As	HHE	Sportler	HCM
Beta-Blocker (%)	73,3 (n=15)	46,7 (n=15)	0 (n=15)	100 (n=15)
ASS (%)	66,7 (n=15)	26,7 (n=15)	0 (n=15)	53,3 (n=15)
Diuretika (%)	60 (n=15)	26,7 (n=15)	0 (n=15)	53,3 (n=15)
ACE-Hemmer (%)	20 (n=15)	26,7 (n=15)	0 (n=15)	60 (n=15)
Sartane (%)	33,3 (n=15)	13,3 (n=15)	0 (n=15)	26,7 (n=15)
Marcumar (%)	26,7 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)	13,3 (n=15)
Clopidogrel (%)	33,3 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)	13,3 (n=15)
Ca-Antag. (%)	20 (n=15)	20 (n=15)	0 (n=15)	26,7 (n=15)
Lipidsenker (%)	73,3 (n=15)	20 (n=15)	0 (n=15)	53,3 (n=15)

Tabelle 4: Medikamenteneinnahme in den Gruppen in Prozent (n=Anzahl der Probanden in der Gruppe).

Neben dem im Anschluss folgenden ausführlichen Vergleich der Gruppen in Bezug zu Septumdicke und LV-Masse-Index sind in Tabelle 5 weitere echokardiographische Parameter aufgeführt, von denen manche auch hier erläutert werden.

Wie auch bei Septumdicke und LV-Masse zeigten sich die größten Durchmesser der Hinterwand und die größte relative Wanddicke des Ventrikels bei HNCMs und HOCMs, gefolgt von Aortenklappenstenosen und HHEs sowie Sportherzen, welche jeweils den geringsten Wert aufwiesen. Der LVEDD war in allen Gruppen recht ähnlich, wobei er in der Gruppe der Sportherzen am größten ausfiel. Anders war dies bei der Größe des linken Atriums, welches ebenfalls bei allen pathologischen Formen der Hypertrophie ähnliche Werte zeigte und bei den Sportherzen deutlich kleiner war.

Eine diastolische Dysfunktion bestand bei allen HHE-Patienten und bei zwei Dritteln der Aortenklappenstenosen und HCM-Patienten, wobei keiner der Sportler darunter litt. Auch bei der systolischen Funktion zeigten sich bis auf die Sportherzen ähnliche Werte bei den verschiedenen Pathologien, so bestand bei etwa einem Viertel der Patienten eine eingeschränkte systolische Pumpfunktion. Bei der Gruppe der Aortenklappenstenosen wurde zudem die Klappenöffnungsfläche der Aortenklappe und der mittlere Gradient über der Klappe gemessen, die Werte zeigen, dass bei den Patienten in der Gruppe eine hochgradige Aortenklappenstenose vorlag.

	As	HHE	Sportler	HCM
IVSd (mm)	14 (n=15)	13 (n=15)	11,75 (n=15)	21 (n=15)
Pwd (mm)	13 (n=15)	13 (n=15)	11 (n=15)	17 (n=15)
LVEDD (mm)	43 (n=15)	48 (n=15)	50,33 (n=15)	44 (n=15)
Li. Atrium (mm)	47 (n=15)	43 (n=15)	34,67 (n=15)	44 (n=15)
Diast. Dysf. (%)	66,7 (n=15)	100 (n=15)	0 (n=15)	66,7 (n=15)
Lv-Dysfunktion (%)	33,3 (n=15)	20 (n=15)	0 (n=15)	26,7 (n=15)
Lv-Masse (g)	247 (n=15)	247 (n=15)	212 (n=15)	354 (n=15)
LV-Masse-Index (g/m²)	138 (n=15)	116 (n=15)	101 (n=15)	177 (n=15)
RWT	0,57 (n=15)	0,53 (n=15)	0,44 (n=15)	0,81 (n=15)
KÖF (cm²)	0,54 (n=15)			
Mi. Gradient (mmHg)	52,5 (n=15)			

Tabelle 5: Echokardiographie-Daten der Probandengruppen im Vergleich.

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Charakteristika der vier Gruppen einander gegenübergestellt und verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit und Anschaulichkeit wurde das Programm Prism 7 verwendet. Um signifikante Unterschiede in Hinblick auf Septumdicke und linksventrikuläre Masse zu detektieren, erfolgten Anova-Tests.

Beim Vergleich der Septumdicken zeigte sich, dass die mit Abstand größten Durchmesser echokardiographisch in der Gruppe der HCMs gefunden wurden, dabei lag eine im Vergleich hohe Spannbreite vor (siehe Abbildung 8 und Tabelle 7). Auch in der Gruppe der Aortenklappenstenosen waren die Septen dicker als in den beiden anderen Gruppen, die wie in der Einleitung beschrieben mit eher milden Hypertrophieformen einhergehen. Die geringste Septumdicke zeigte sich bei der physiologischen Linksherzhypertrophieform, hier bestand aber eine wesentlich höhere Spannbreite als in der Gruppe der HHE-Patienten, bei denen diese am geringsten ausfiel. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (definiert als adjustierter p-Wert < 0,05) zeigten sich zwischen der Gruppe der HCMs und allen anderen Gruppen sowie zwischen der Gruppe der Aortenklappenstenosen und den Sportherzen (siehe Tabelle 6).

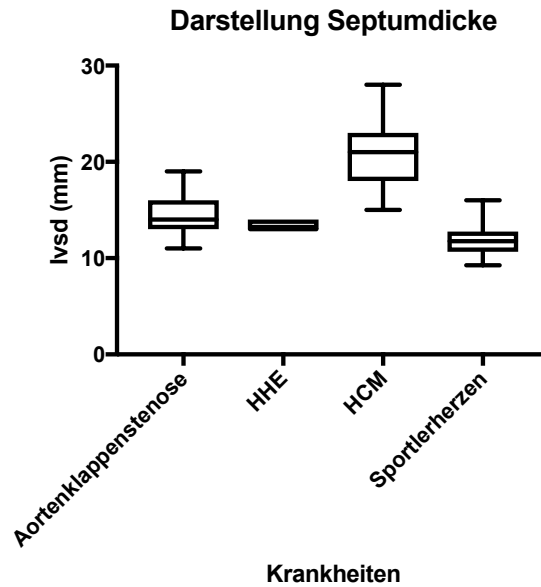


Abbildung 8: Darstellung der Septumdicken mittels Box-Whisker-Plots zum Vergleich der verschiedenen Gruppen. Hierfür erfolgte der besseren Übersicht und Vergleichbarkeit halber ein Zusammenschluss von HNCMs und HOCMs.

	Signifikanz	Adjustierter p-Wert
As vs. HHE	Nein	>0,9999
As vs. HCM	Ja	0,0139
As vs. AHS	Ja	0,0092
HHE vs. HCM	Ja	<0,0001
HHE vs. AHS	Nein	0,3464
HCM vs. AHS	Ja	<0,0001

Tabelle 6: Darstellung der Signifikanzen beim Vergleich der Septumdicken zwischen den vier verschiedenen Gruppen (AHS=Athletic heart syndrome=Sporthertz).

Probanden-Gruppe	Mittelwert	Median	SD-Abweichung	Maximum	Minimum
Aortenklappenstenosen	14,73	14	2,22	19	11
HHE	13,33	13	0,49	14	13
HCM	20,8	15	3,47	28	15
Sporthertzen	11,86	11,75	1,78	16	9,25

Tabelle 7: Deskriptive Statistik Septumdicke: Darstellung des Vergleichs der wichtigsten Werte der deskriptiven Statistik im Hinblick auf die Septumdicke (alle Werte in mm).

Ein ähnliches Bild wie beim Vergleich der Septumdicken zeigte sich auch bei der Gegenüberstellung der LV-Masse-Indizes der vier Gruppen. Nach Berechnung aus Septumdicke, Hinterwanddicke, LVEDD und Körperoberfläche ergaben sich die deutlich größten Werte in der Gruppe der HCM-Patienten, diese Gruppe zeigte zudem die größte Spannweite (siehe Abbildung 9 und Tabelle 9). Dahinter zeigte sich der größte LV-Masse-Index in der Gruppe der Aortenklappenstenosen gefolgt von HHE-Patienten und Sportherzen. Im Unterschied zum Vergleich der Septumdicken zeigte sich beim LV-Masse-Index, dass die Spannweite hier bei den Sportherzen geringer war als in der Gruppe der HHEs. Signifikante Unterschiede im LV-Masse-Index zeigten sich zwischen der Gruppe der HCMs und den Probandengruppen der HHEs und Sportherzen. Außerdem bestand ein signifikanter Unterschied beim Vergleich des LV-Masse-Index von Aortenklappenstenosen und Sportherzen (siehe Tabelle 8).

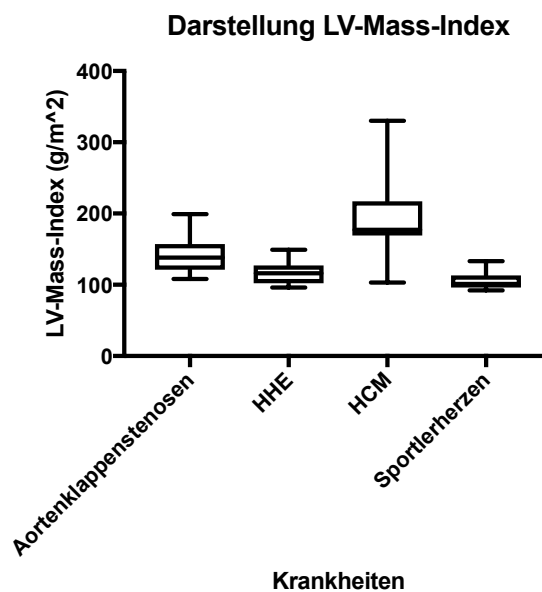


Abbildung 9: Darstellung des LV-Masse-Index mittels Box-Whisker-Plots zum Vergleich der verschiedenen Gruppen. Hierfür erfolgte der besseren Übersicht und Vergleichbarkeit halber ein Zusammenschluss von HNCMs und HOCMs.

	Signifikanz	Adjustierter p-Wert
As vs. HHE	Nein	0,1454
As vs. HCM	Nein	0,3675
As vs. AHS	Ja	0,0018
HHE vs. HCM	Ja	0,0002
HHE vs. AHS	Nein	> 0,9999
HCM vs. AHS	Ja	< 0,0001

Tabelle 8: Darstellung der Signifikanzen beim Vergleich des LV-Masse-Index zwischen den vier verschiedenen Gruppen.

	Mittelwert	Median	SD- Abweichung	Maximum	Minimum
Aortenklappenstenosen	142,5	138	25,32	199	108
HHE	116,6	116	16,48	149	96
HCM	191,1	177	53,83	330	103
Sportherzen	105,8	101	12,07	193	92

Tabelle 9: Deskriptive Statistik LV-Masse-Index: Darstellung des Vergleichs der wichtigsten Werte der deskriptiven Statistik im Hinblick auf den LV-Masse-Index (alle Werte in g/m²).

3.5 Exklusive Über- und Unterexpression

Insgesamt 25 der untersuchten miRNAs zeigten lediglich Unterschiede zwischen zwei Gruppen, es lag dementsprechend eine exklusive signifikante Über- oder Unterexpression in einer Gruppe gegenüber einer anderen vor.

Die größte Anzahl an miRNAs, die nur zwischen zwei Gruppen Unterschiede in unserer Studie aufwies, zeigte sich zwischen der Gruppe der HHEs und den Sportherzen (10) (siehe Tabelle 10). Zwischen Aortenklappenstenosen und HHE-Patienten gab es vier miRNAs, die eine exklusive Über- oder Unterexpression aufwiesen.

Zwischen Aortenklappenstenosen und der HNCM-Gruppe war eine miRNA exklusiv exprimiert (hsa_miR_4433b_5p), zwischen Aortenklappenstenosen und HOCMs zwei miRNAs (hsa_miR_22_5p und hsa_miR_501_3p).

Zwischen Aortenklappenstenosen und Sportherzen ergaben sich vier miRNAs, die nur zwischen den beiden Gruppen Unterschiede in der miRNA-Expression zeigten.

Zwischen der HHE-Gruppe und den HNCMs waren zwei miRNAs exklusiv über- oder unterexprimiert, dies waren hsa_miR_423_5p und hsa_miR_3173_5p.

Zwischen HHE-Patienten und HOCCM-Patienten war hsa_miR_1226_3p die einzige miRNA, die einen signifikanten Unterschied aufzeigte.

Zwischen HOCCM-Patienten und Sportherzen gab es mit hsa_miR_4286 ebenfalls eine miRNA, die einen exklusiven signifikanten Unterschied in der Expression zeigte.

Zwischen HNCMs und HOCCMs sowie Sportherzen zeigte keine miRNA einen exklusiven Expressionsunterschied. Die entsprechenden Fold changes, p-Werte sowie baseMeans lassen sich dem Anhang entnehmen.

Erkrankungen	miRNAs
HHE vs. AHS	hsa_miR_17_5p, hsa_miR_197_3p, hsa_miR_210_5p, hsa_miR_27b_3p, hsa_miR_324_3p, hsa_miR_486_5p, hsa_miR_532_3p, hsa_miR_6803_3p, hsa_miR_1229_3p und hsa_miR_181d_5p
As vs. HHE	hsa_miR_92a_3p, hsa_miR_181a_3p, hsa_miR_877_5p und hsa_miR_1180_3p
As vs. HNCM	hsa_miR_4433b_5p
As vs. HOCCM	hsa_miR_22_5p, hsa_miR_501_3p
As vs. AHS	hsa_miR_103a_3p, hsa_miR_107, hsa_miR_let_7i_5p und hsa_miR_106b_5p
HHE vs. HNCM	hsa_miR_423_5p, hsa_miR_3173_5p
HHE vs. HOCCM	hsa_miR_1226_3p
HOCCM vs. AHS	hsa_miR_4286

Tabelle 10: Exklusiv exprimierte miRNAs: Auflistung exklusiv über- oder unterexprimierter miRNAs mit Angabe der Erkrankungsgruppen, zwischen denen die Expression differierte.

3.6 Größte miRNA-Mengen

Von den 131 miRNAs, die signifikante Unterschiede aufzeigten, waren unterschiedliche Mengen in der Sequenzierung vorhanden. Die zehn miRNAs, von den die größte Menge in den Proben nachweisbar war, werden in Tabelle 11 mit dazugehörigem baseMean (Mengenangabe) dargestellt.

miRNA	baseMean
hsa_miR_103a_3p	9751,4711
hsa_miR_423_5p	9701,9928
hsa_let_7i_5p	5385,3348
hsa_miR_92b_3p	4160,1888
hsa_miR_107	3436,1046
hsa_miR_15a_5p	3221,4049
hsa_let_7g_5p	2725,7894
hsa_miR_144_5p	2416,4664
hsa_let_7b_5p	1775,2377
hsa_miR_320a	1136,5227

Tabelle 11: Die zehn höchstexprimierten miRNAs, die eine Signifikanz aufwiesen mit dazugehörigem baseMean (Mengenangabe).

3.7 Abgrenzung der Gruppen anhand der relativen Häufigkeit der miRNAs

Aortenklappenstenosen

Im Folgenden werden die miRNAs, durch die es in unserer Studie möglich war, die Gruppe der Aortenklappenstenosen von allen anderen Gruppen im direkten Vergleich zu unterscheiden, näher betrachtet. Dies bedeutet, dass bei diesen miRNAs jeweils im Vergleich von Aortenklappenstenose zu HHE, HNCM, HOCCM und AHS ein „Fold change“ (Maß für Über- und Unterexpression) > 2 beziehungsweise $< 0,5$ vorlag bei gleichzeitiger Signifikanz ($p_{adj} < 0,05$). Zu den miRNAs, die diese Kriterien erfüllten, zählten zwölf miRNAs, und zwar:

hsa_miR_9_5p
 hsa_miR_146a_5p
 hsa_miR_30a_5p
 hsa_miR_3158_3
 hsa_miR_155_5p
 hsa_miR_195_5p,
 hsa_miR_28_5
 hsa_miR_21_5p
 hsa_miR_320c

hsa_miR_378d
hsa_miR_320d
hsa_miR_133a_3p

Bis auf eine miRNA war das Ergebnis bei allen miRNAs zwischen Aortenklappenstenosen und anderen Gruppen hochsignifikant, was mit einem adjustierten p-Wert von kleiner 0,001 definiert war. Bei hsa_miRNA_204_5p (zwischen Aortenklappenstenosen und HHE-Patienten) war das Ergebnis sehr signifikant ($p < 0,01$).

Die höchsten beziehungsweise niedrigsten Fold changes bestanden, wie in den Abbildungen 10-17 in logarithmierter Form zu sehen ist, bei:

hsa_miR_9_5p
hsa_miR_146a_5p
hsa_miR_30a_5p
hsa_miR_320c
hsa_miR_195_5p.

Dies waren in unserer Arbeit auch die insgesamt höchsten Fold changes. Bei hsa_miR_9_5p zeigte sich zwischen der Gruppe der Aortenklappenstenosen und den HOCMs ein Fold change von 98, zwischen Aortenklappenstenosen und HNCMs von 76, zwischen Aortenklappenstenosen und HHEs von 66 und zwischen den Aortenklappenstenosen und Sportherzen von 59 bei einem baseMean von 14.

Bei hsa_miR_146a_5p zeigten sich ebenfalls zwischen den bei hsa_miR_9_5p genannten Gruppen große Fold changes. Der Fold change zwischen Aortenklappenstenosen und HHEs lag bei 11, zwischen Aortenklappenstenosen und HNCM-Patienten bei 8, zwischen Aortenklappenstenosen und HOCMs bei 8 und zwischen Aortenklappenstenosen und Sportherzen bei 7.

Besonders niedrige Fold changes fielen bei hsa_miR_30a_5p auf, dabei war diese bei Aortenklappenstenosen gegenüber allen anderen Gruppen unterexprimiert, am stärksten zwischen Aortenklappenstenosen und HNCMs bzw. HOCMs mit einem Fold change von 0,06. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die miRNAs hsa_miR_320c, bei der die stärkste Unterexpression zwischen Aortenklappenstenosen und HNCMs auftrat (FC: 0,06) und hsa_miR_195_5p, bei welcher die stärkste Unterexpression im Vergleich mit den HOCMs bestand (FC: 0,07).

Die weiteren genauen Fold changes lassen sich wie auch der p-Wert und der baseMean dem Anhang entnehmen.

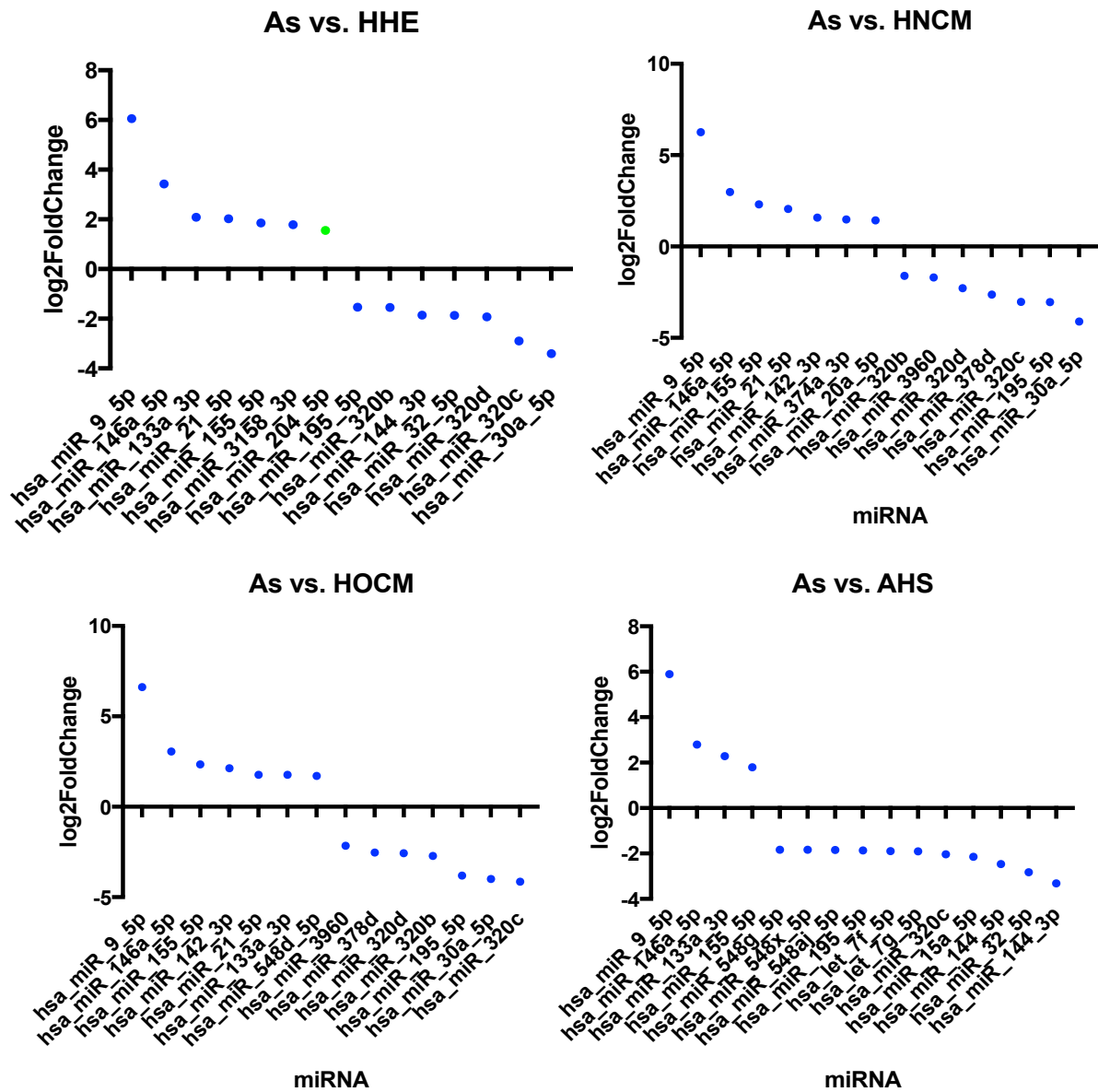


Abbildung 10-13: Größte Expressionsunterschiede mit Aortenklappenstenosen: In den Abbildungen sind jeweils auf der x-Achse die untersuchten miRNAs aufgeführt. Über der y-Achse erfolgt die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei zwischen Aortenklappenstenose und jeweiliger Gruppe (HHE, HNCM, HOCM und AHS). Die Farbe des Punkts der miRNAs ist grün, wenn die unterschiedliche Expression zwischen den beiden Gruppen signifikant war ($p < 0,05$), ist der Punkt blau war der Unterschied der Expression hoch signifikant ($p < 0,001$).

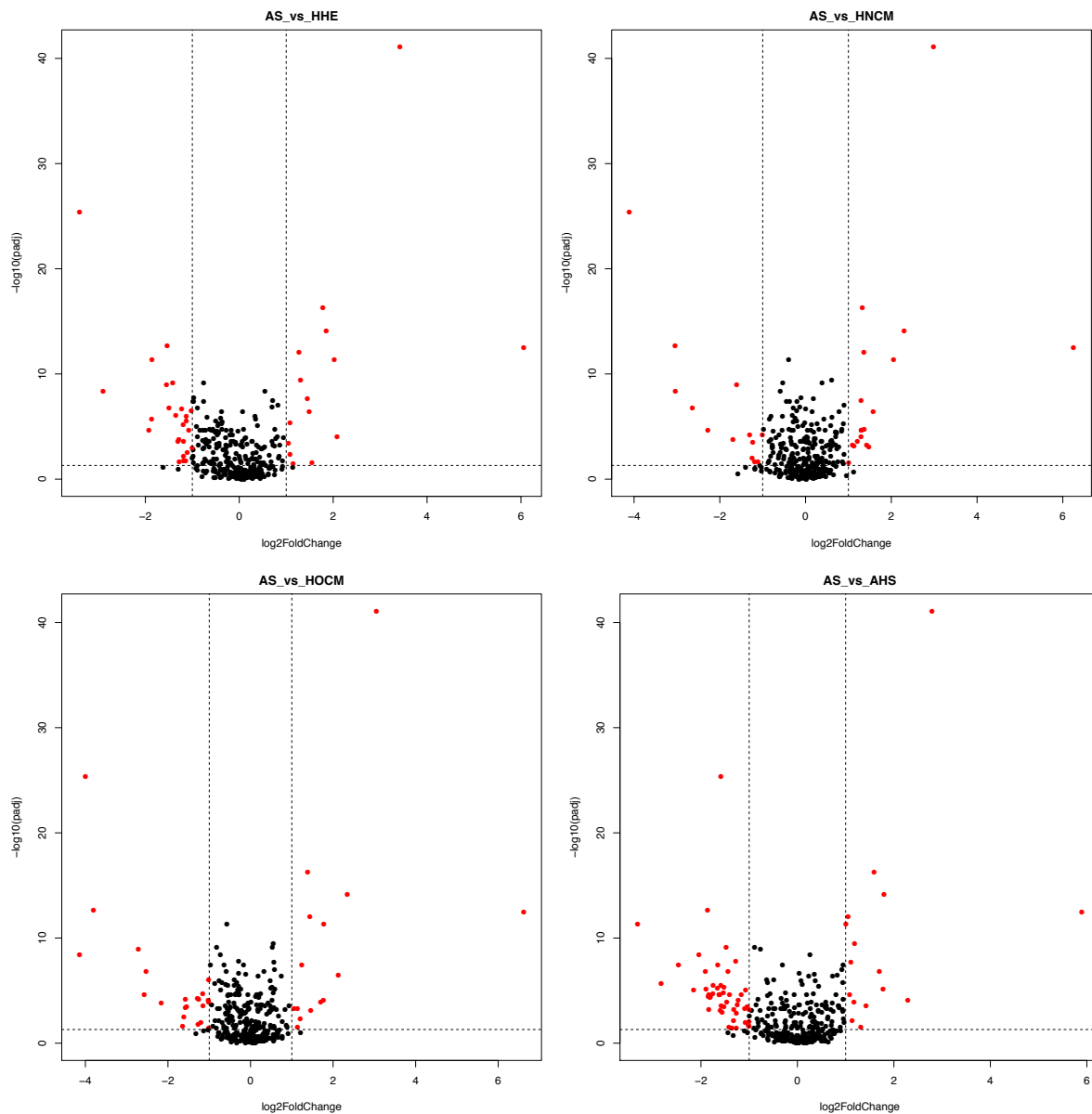


Abbildung 14-17: Volcano plots mit Aortenklappenstenosen: Volcano plots zur Illustration aller untersuchten miRNAs und ihrer unterschiedlichen Expression zwischen Aortenklappenstenosen und anderen Gruppen. Dabei ist auf der x-Achse die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei und auf der y-Achse der negativ logarithmierte adjustierte p-Wert eingetragen. Diese Darstellung enthält alle miRNAs, die untersucht wurden, nicht nur jene mit genügend hohen Fold changes und signifikantem p-Wert. (Mit freundlicher Unterstützung des IKMBs)

miRNA	baseMean	As vs HHE	As vs HNCM	As vs HOCM	As vs AHS
hsa_miR_9_5p	13,8	66,67	76,24	98,2	59,68
hsa_146a_5p	219,79	10,71	7,92	8,29	6,92
hsa_miR_30a_5p	379,08	0,09	0,06	0,06	0,33
hsa_miR_320c	258,52	0,13	0,12	0,06	0,24
hsa_miR_195_5p	46,21	0,35	0,12	0,07	0,28

Tabelle 12: Top 5 miRNAs Aortenklappenstenosen: Die fünf in Zusammenhang mit Aortenklappenstenosen auffälligsten miRNAs im Vergleich. Dargestellt ist dieser mittels der Fold changes zwischen Aortenklappenstenosen und anderen Gruppen. Außerdem ist die Menge der miRNAs in den Proben mittels baseMean dargestellt.

Hypertensive Herzerkrankung

Eine der untersuchten miRNAs unterschied sich in der Expression in der Gruppe der HHEs signifikant von allen anderen Gruppen, dies war hsa_miRNA_144_3p. Der baseMean der miRNA lag bei 105 und sie wurde in der Gruppe der HHEs gegenüber Aortenklappenstenosen, HNCMs und HOCMs vermehrt exprimiert, während sie gegenüber der Gruppe der Sporthertzen unterexprimiert wurde (siehe Abbildung 18-21). Die größten Fold changes, die in den Vergleichen mit der Gruppe der HHEs auffielen, waren die schon im Aortenklappenstenosen-Teil beschriebenen miRNAs

hsa_miRNA_9_5p

hsa_miRNA_146a_5p

hsa_miR_30a_5p

hsa_miR_320c (im Vergleich mit Aortenklappenstenosen).

Alle Unterschiede mit hohen und niedrigen Fold changes zwischen diesen beiden Gruppen waren hochsignifikant. Höhere Fold changes zwischen HHEs und HNCMs zeigten sich bei hsa_miR_32_5p und miRNAs, die zu hsa_miR_548 gehören (siehe Tabelle 13 und Abbildung 19). Unterexprimiert bei den HHEs im Vergleich zu HNCM-Patienten waren die miRNAs hsa_miR_145_5p und hsa_miR_195_5p. Lagen zwischen diesen beiden Gruppen größere Fold changes vor, waren diese Unterschiede bei allen miRNAs bis auf hsa_miR_486_3p (sehr signifikant) und hsa_miR_3173_5p (signifikant) hochsignifikant.

Die größten Unterschiede in der Expression zwischen HHEs und der HOCCM-Gruppe zeigten sich bei den miRNAs

hsa_miR_548d_5p

hsa_miR_195_5p

hsa_miR145_5

hsa_miR_5100 (siehe Abbildung 20).

Die 15 größten Expressionsunterschiede können der Abbildung entnommen werden, 11 der Unterschiede sind dabei hochsignifikant, zwei sehr signifikant und zwei signifikant.

Zwischen HHEs und Sportherzen waren alle größeren Expressionsunterschiede hochsignifikant, die größten Fold changes waren bei hsa_miR_30a_5p, hsa_miR_144_5p und hsa_miR_144_3p zu sehen (siehe Abbildung 21). Die weiteren genauen Fold changes, p-Werte und baseMeans lassen sich dem Anhang entnehmen.

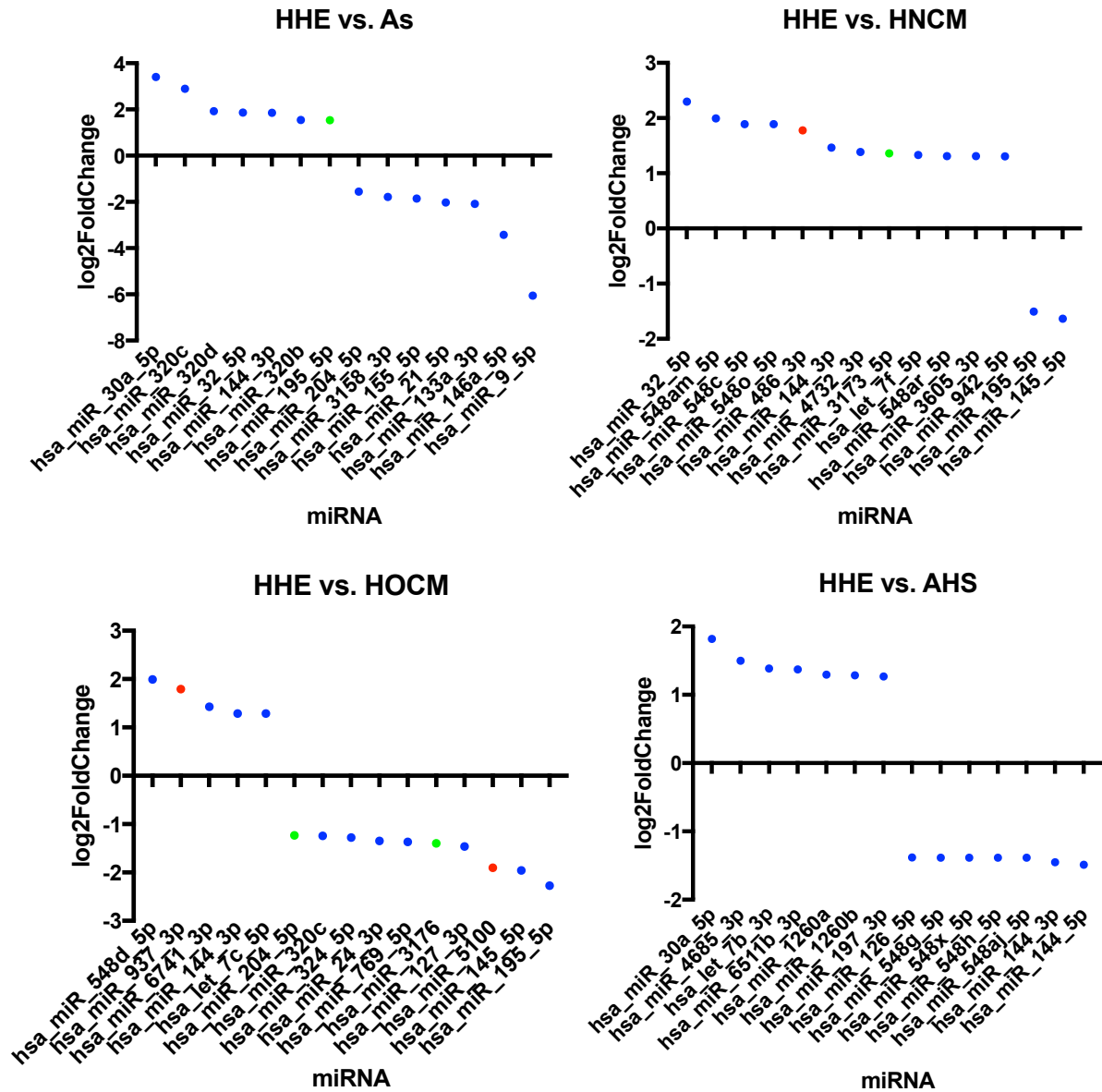


Abbildung 18-21: Größte Expressionsunterschiede mit HHE: In den Abbildungen sind jeweils auf der x-Achse die untersuchten miRNAs aufgeführt. Über die y-Achse erfolgt die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei zwischen HHE-Patienten und jeweiliger Gruppe (As, HNCM, HOCM und AHS). Die Farbe des Punkts der miRNAs ist grün, wenn die unterschiedliche Expression zwischen den beiden Gruppen signifikant war ($p < 0,05$). Ein roter Punkt bedeutet, der Unterschied war sehr signifikant ($p < 0,01$), ist der Punkt blau hoch signifikant ($p < 0,001$).

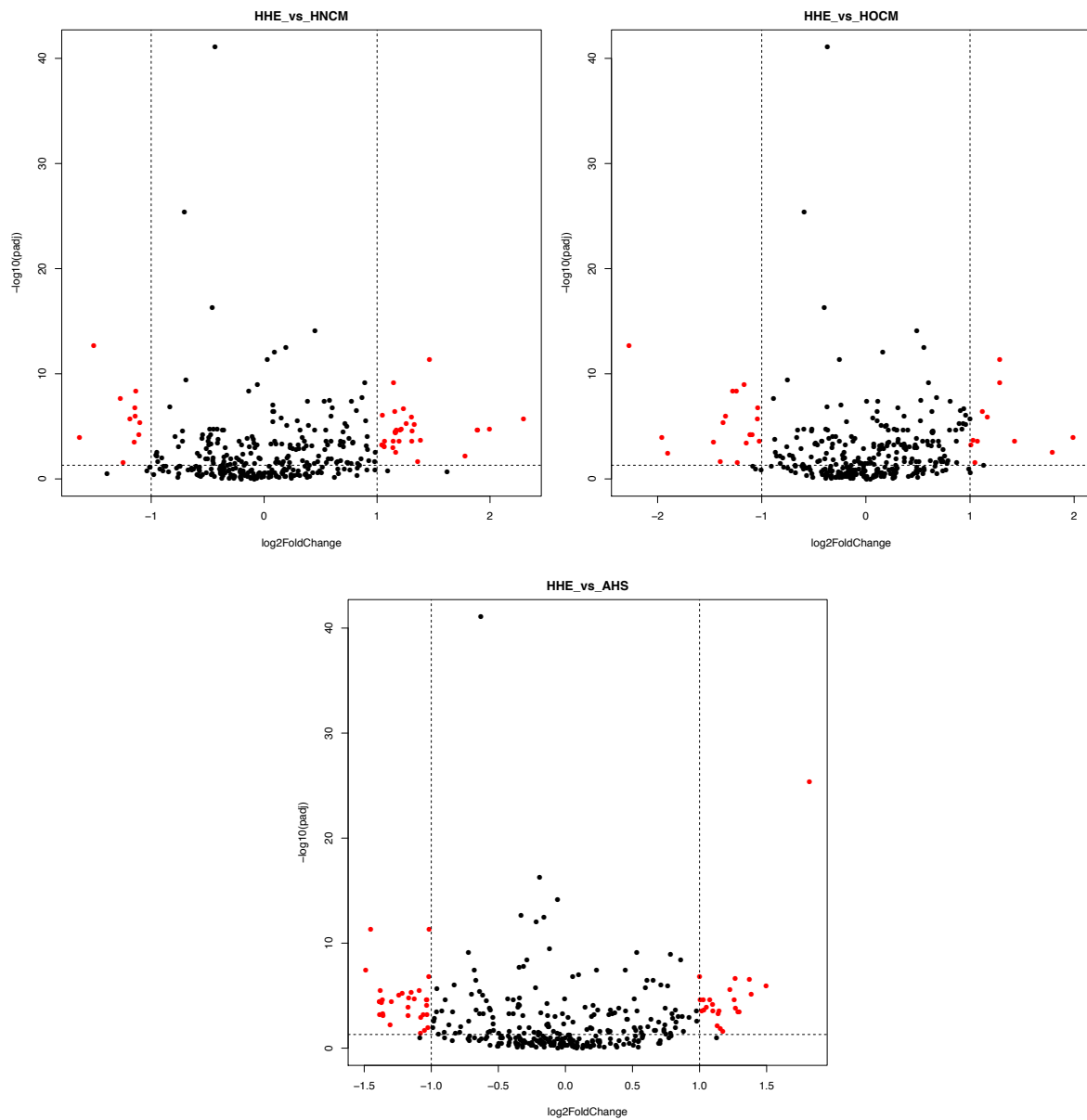


Abbildung 22-24: Volcano plots mit HHE: Volcano plots zur Illustration aller untersuchten miRNAs und ihrer unterschiedlichen Expression zwischen HHE-Patienten und anderen Gruppen. Dabei ist auf der x-Achse die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei und auf der y-Achse der negativ logarithmierte adjustierte p-Wert eingetragen. Diese Darstellung enthält alle miRNAs, die untersucht wurden, nicht nur jene mit genügend hohen Fold changes und signifikantem p-Wert. (Mit freundlicher Unterstützung des IKMBs)

miRNA	baseMean	HHE vs As	HHE vs HNCM	HHE vs HOCM	HHE vs AHS
hsa_miR_144_3p	105,12	3,63	2,76	2,44	0,37
hsa_miR_32_5p	5,66	3,65	4,91	2	0,52
hsa_miR_145_5p	8,22	0,52	0,32	0,26	0,78
hsa_miR_195_5p	46,21	2,89	0,35	0,21	0,8

Tabelle 13: Top 4 miRNAs HHE: Die vier in Zusammenhang mit Hypertensiv Herzerkrankten auffälligsten miRNAs im Vergleich. Dargestellt ist dieser mittels der Fold changes zwischen HHE-Patienten und anderen Gruppen. Außerdem ist die Menge der miRNAs in den Proben mittels baseMean dargestellt.

HNCM

Mittels drei miRNAs ließ sich in der Studie die Gruppe der HNCM-Erkrankten von allen anderen Gruppen in der Expression abgrenzen. Zu diesen zählten hsa_miR_548am_5p, hsa_miR_548c_5p und hsa_miR_548o_5p, welche alle zu hsa_miR_548 gehörig sind und in der Gruppe der HNCMs unterexprimiert waren im Vergleich zu den anderen Gruppen. Hingegen überexprimiert bei den HNCMs zeigte sich hsa_miR_195_5p, allerdings nicht gegenüber der Gruppe der HOCM-Patienten. Daher dient diese miRNA nur der Abgrenzung von HCM-Patienten gegenüber anderen Gruppen, eine Zuordnung zu einer der beiden Unterformen war nicht möglich, genauso wenig ihre Unterscheidung mittels hsa_miR_195_5p.

Die größten Fold changes zeigten sich auch in dieser Gruppe im Vergleich mit der Gruppe der Aortenklappenstenosen, dabei waren die Unterschiede in der Expression bei den schon genannten miRNAs

hsa_miR_9_5p

hsa_miR_146a_5p

hsa_30a_5p

und der eben beschriebenen hsa_miR_195_5p am größten. Die größeren Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen diesen beiden Patientengruppen, welche in Abbildung 25-28 dargestellt sind, waren alle hochsignifikant.

Gegenüber den anderen Gruppen zeigten sich in der Gruppe der HNCM-Patienten deutlich geringere Unterschiede in der Expression. Der Vergleich mit den HHE-

Patienten erfolgte bereits im HHE-Abschnitt. Zwischen HNCMs und HOCMs zeigten sich eher geringe Unterschiede in der Expression der miRNAs, lediglich hsa_miR_548d_5p zeigte eine deutlichere Überexpression bei HNCM-Patienten. Die elf miRNAs, die in der Gruppe der HOCM-Patienten stärker exprimiert wurden, sind in Tabelle 16 und Abbildung 27 dargestellt. Dazugehörig sind wiederum zu hsa_miR_548 gehörige miRNAs sowie hsa_miR_5100 und hsa_miR_32_5p. Die zwölf miRNAs, die zur Unterscheidung der beiden Gruppen dienen, sind wie beschrieben der bei Weitem niedrigste Wert zwischen allen Gruppen. Neun der zwölf Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen waren hochsignifikant und drei sehr signifikant. Zwischen HNCM-Patienten und der Gruppe der Sportherzen zeigten sich wiederum etwas größere Fold changes und die Unterschiede betrafen auch deutlich mehr miRNAs. Die deutlichste Überexpression gegenüber den Sportherzen lag bei hsa_miR_30a_5p und hsa_miR_378d_5p vor. Deutliche Unterexpressionen zeigten sich bei den zu hsa_miR_548 gehörigen miRNAs sowie hsa_miR_144_3p und hsa_miR_32_5p (Abbildung 28). Die Unterschiede bei den miRNAs mit größeren Fold changes waren alle hochsignifikant (siehe Abbildung 25-28).

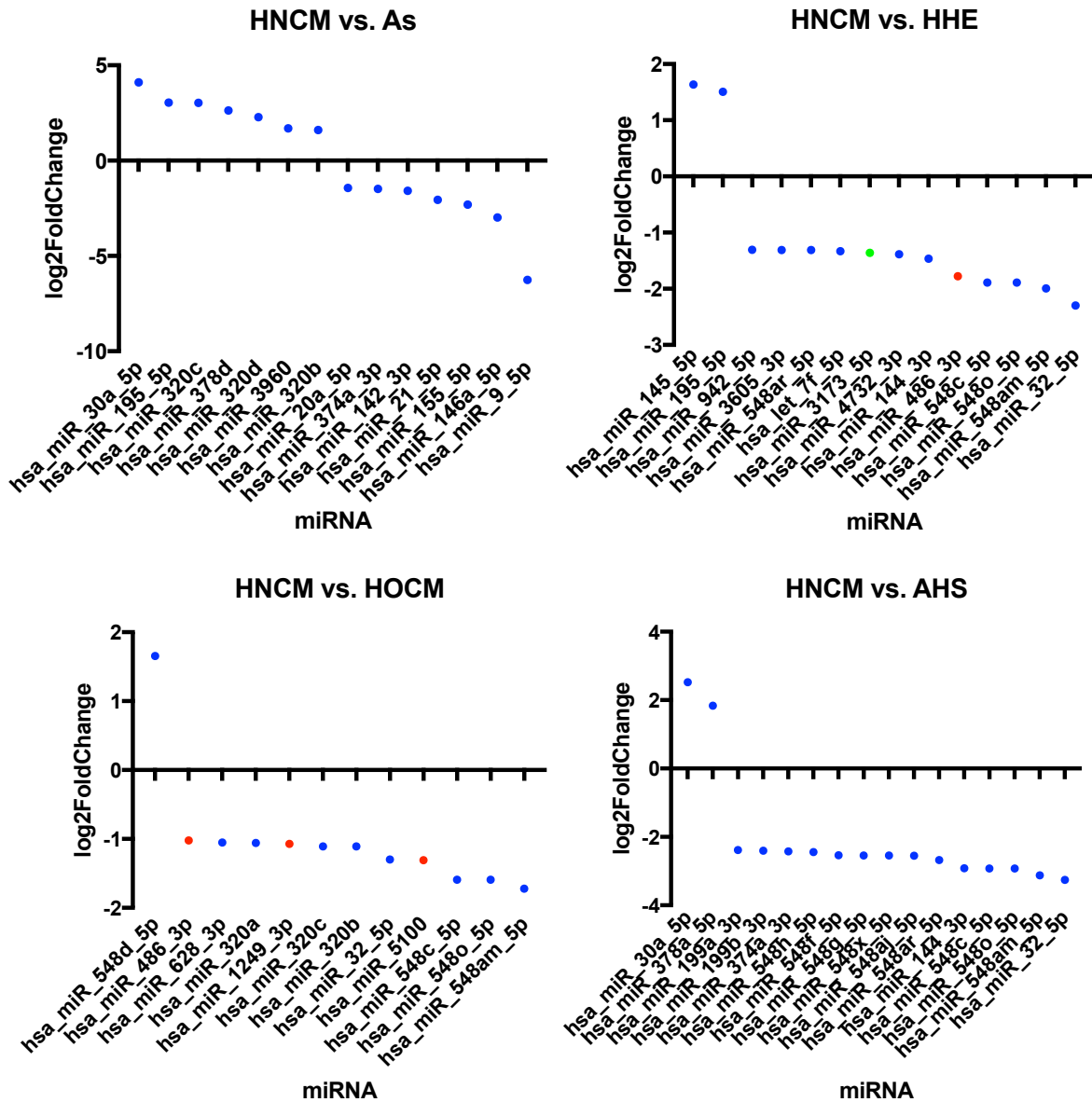


Abbildung 25-28: Größte Expressionsunterschiede mit HNCM: In den Abbildungen sind jeweils auf der x-Achse die untersuchten miRNAs aufgeführt. Über die y-Achse erfolgt die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei zwischen HNCMs und jeweiliger Gruppe (As, HHE, HOCM und AHS). Die Farbe des Punkts der miRNAs ist grün, wenn die unterschiedliche Expression zwischen den beiden Gruppen signifikant ist ($p < 0,05$). Ein roter Punkt bedeutet, der Unterschied ist sehr signifikant ($p < 0,01$), ist der Punkt blau hoch signifikant ($p < 0,001$).

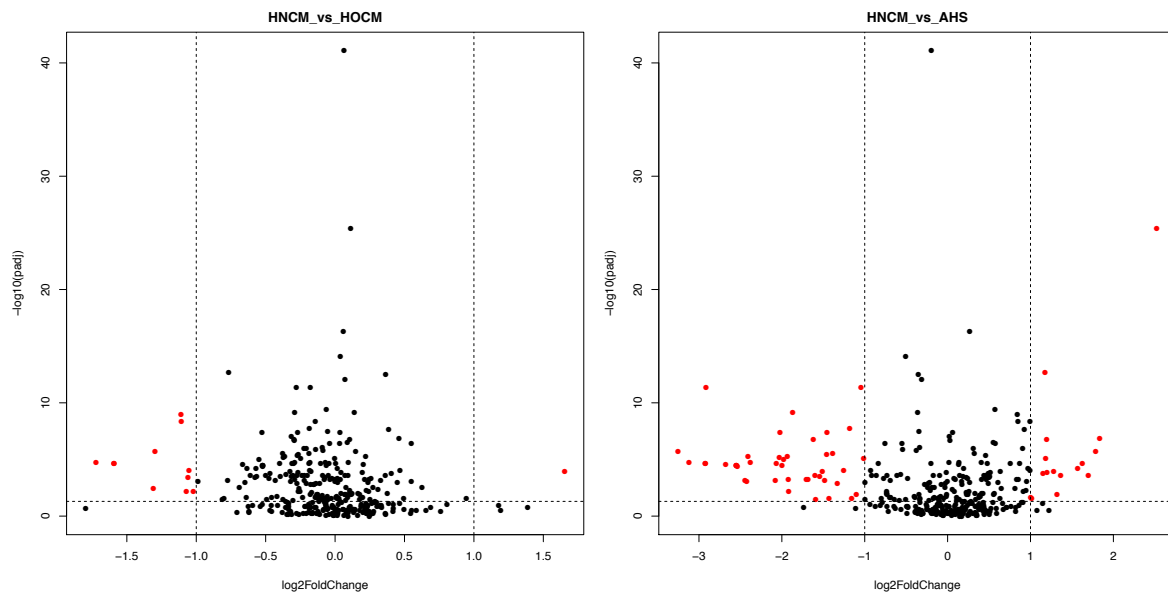


Abbildung 29-30: Volcano plots HNCM: Volcano plots zur Illustration aller untersuchten miRNAs und ihrer unterschiedlichen Expression bei HNCM-Patienten gegenüber HOCM-Patienten und der Gruppe der Sportherzen. Dabei ist auf der x-Achse die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei und auf der y-Achse der negativ logarithmierte adjustierte p-Wert eingetragen. Diese Darstellung enthält alle miRNAs, die untersucht wurden, nicht nur jene mit genügend hohen Fold changes und signifikantem p-Wert. (Mit freundlicher Unterstützung des IKMBs)

HOCM

Durch die Expression von zwei miRNAs ließ sich in der Studie die Gruppe der HOCM-Patienten von allen anderen Gruppen abgrenzen, dies waren hsa_miR_320a und hsa_miR_548d_5p. Während sich bei hsa_miR_320a eine Überexpression in der Gruppe der HOCMs gegenüber allen Gruppen zeigte, bestand bei hsa_miR_548d_5p jeweils eine Unterexpression. Zudem lässt sich hsa_miR_195_5p nennen, die wie im Abschnitt der HNCMs beschrieben eine andere Expression gegenüber den anderen Erkrankungsgruppen zeigte, allerdings nicht zwischen HNCMs und HOCMs unterschied. Gegenüber allen anderen Gruppen zeigte sich bei hsa_miR_195_5p eine deutliche Überexpression in der Gruppe der HOCM-Patienten.

Die größten Expressionsunterschiede und damit Fold changes zeigten sich auch hier wieder im Vergleich mit den Aortenklappenstenosen und den in diesem Zusammenhang bereits genannten miRNAs (siehe Abbildung 31-34).

Die größten Expressionsunterschiede zwischen HOcMs und HHEs wurden ebenfalls bereits im HHE-Teil besprochen, die größte Überexpression in der HOcM-Gruppe lag bei hsa_miR_195_5p vor, die größte Unterexpression bei hsa_miR_548d_5p.

Die nur 12 unterschiedlich exprimierten miRNAs zwischen HNCMs und HOcMs werden im Abschnitt dargestellt, in welchem die beiden Unterformen der HCM direkt verglichen werden.

Zwischen HOcM-Patienten und Sportherzen zeigte sich die stärkste miRNA-Überexpression in der HOcM-Gruppe bei hsa_miR_30a_5p, hsa_miR_3940_3p und hsa_miR_320c. Die stärkste Unterexpression war bei hsa_miR_548d_5p, hsa_miR_144_3p, hsa_miR_196b_5p und hsa_miR_199a_3p festzustellen (siehe Abbildung 34). Von den 15 größte Expressionsunterschieden zwischen den beiden Gruppen waren 13 hochsignifikant und zwei sehr signifikant.

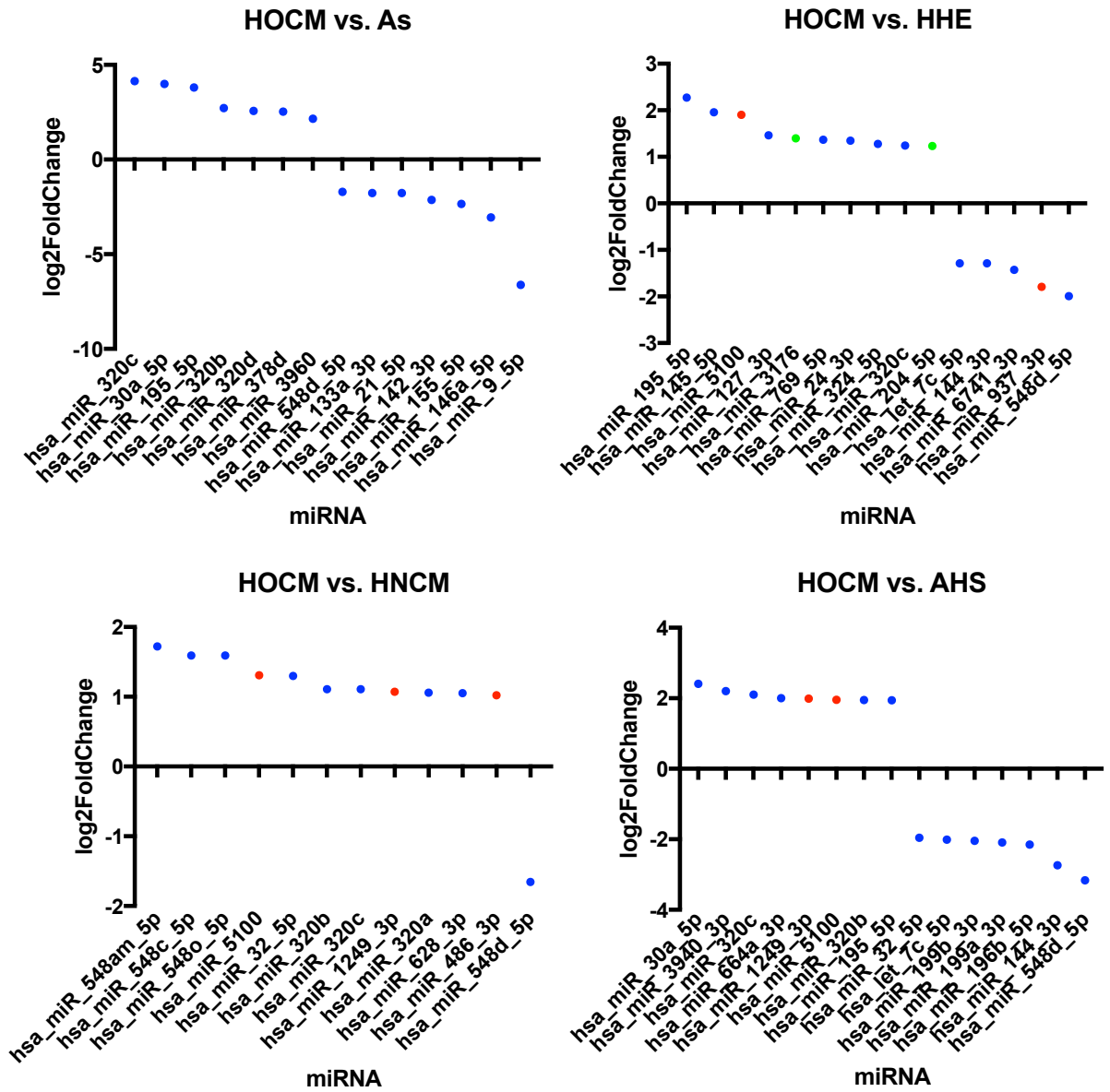


Abbildung 31-34: Größte Expressionsunterschiede mit HOCM: In den Abbildungen sind jeweils auf der x-Achse die untersuchten miRNAs aufgeführt. Über die y-Achse erfolgt die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei zwischen HOCMs und jeweiliger Gruppe (As, HHE, HNCM und AHS). Die Farbe des Punkts der miRNAs ist grün, wenn die unterschiedliche Expression zwischen den beiden Gruppen signifikant ist ($p < 0,05$). Ein roter Punkt bedeutet, der Unterschied ist sehr signifikant ($p < 0,01$), ist der Punkt blau hoch signifikant ($p < 0,001$).

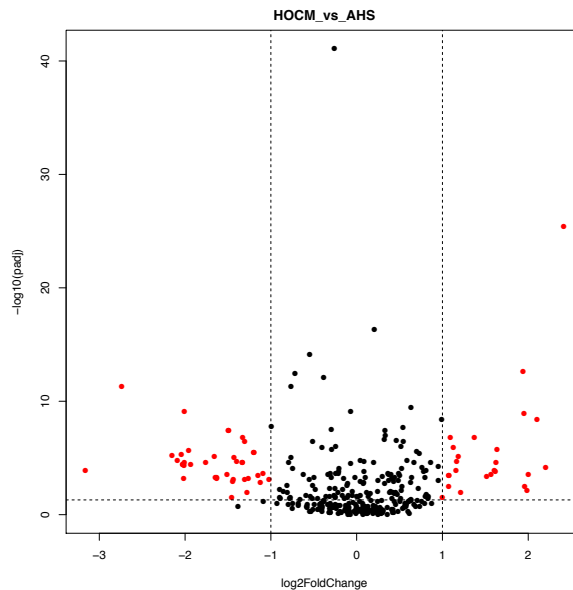


Abbildung 35: Volcano plot HOCM vs. AHS: Volcano plot zur Illustration aller untersuchten miRNAs und ihrer unterschiedlichen Expression bei HOCM-Patienten gegenüber Sportherzen. Dabei ist auf der x-Achse die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei und auf der y-Achse der negativ logarithmierte adjustierte p-Wert eingetragen. Diese Darstellung enthält alle miRNAs, die untersucht wurden, nicht nur jene mit genügend hohen Fold changes und signifikantem p-Wert. (Mit freundlicher Unterstützung des IKMBs)

Sportherzen

In der Gruppe der Sportherzen zeigten sich in den Ergebnissen 29 miRNAs, welche sich in ihrer Expression in dieser Gruppe zu allen anderen Gruppen unterschieden (siehe Tabelle 14). Dies war mit deutlichem Abstand zu den Aortenklappenstenosen der höchste Wert.

Die höchsten Fold changes in Verbindung mit den Sportherzen fielen wie bei den anderen Gruppen auch in Zusammenhang mit den Aortenklappenstenosen auf, es waren wiederum die bereits beschriebenen und in Abbildung 36-39 dargestellten miRNAs, welche die höchsten Fold changes zeigten.

Auch zwischen Sportherzen und HNCMs sowie HOCMs bestanden große Expressionsunterschiede, während diese im Vergleich mit der HHE-Gruppe eher gering waren.

Die stärkste Überexpression zwischen Sportherzen und HNCMs bestand bei hsa_miR_32_5p, hsa_miR_548am_5p und hsa_miR_144_3p, die deutlichste Unterexpression lag bei hsa_miR_30a_5p und hsa_miR_378a_5p vor.

In Bezug zu den HOCMs zeigte sich die größte Überexpression in der Gruppe der Sportherzen bei hsa_miR_548d_5p und hsa_miR_144_3p, die stärkste Unterexpression war bei hsa_miR_30a_5p und hsa_miR_3940_3p erkennbar.

Alle größeren Fold changes zwischen Sportherzen und Aortenklappenstenosen, HHE-Patienten und HNCM-Patienten waren hochsignifikant, lediglich zwischen Sportherzen und HOCM-Patienten waren zwei Expressionsunterschiede nur sehr signifikant, der Rest ebenfalls hochsignifikant (siehe Abbildung 39).

miRNA	hsa_miR_30a_5p, hsa_miR_144_3p, hsa_miR_144_5p, hsa_miR_378a_5p, hsa_let_7g_5p, hsa_miR_126_3p, hsa_miR_126_5p, hsa_miR_199b_3p, hsa_miR_196b_5p, hsa_let_7b_3p, hsa_miR_15a_5p, hsa_miR_199a_3p, hsa_miR_548c_5p, hsa_miR_548o_5p, hsa_miR_548ar_5p, hsa_miR_548g_5p, hsa_miR_548x_5p, hsa_miR_548aj_5p, hsa_miR_374a_5p, hsa_miR_548f_5p, hsa_miR_548d_5p, hsa_miR_766_3p, hsa_miR_339_5p, hsa_miR_548k, hsa_miR_374b_5p, hsa_miR_548h_5p, hsa_miR_454_3p
-------	---

Tabelle 14: miRNAs Sportherz: miRNAs, die sich in ihrer Expression in der Gruppe der Sportherzen zu allen anderen Gruppen unterscheiden.

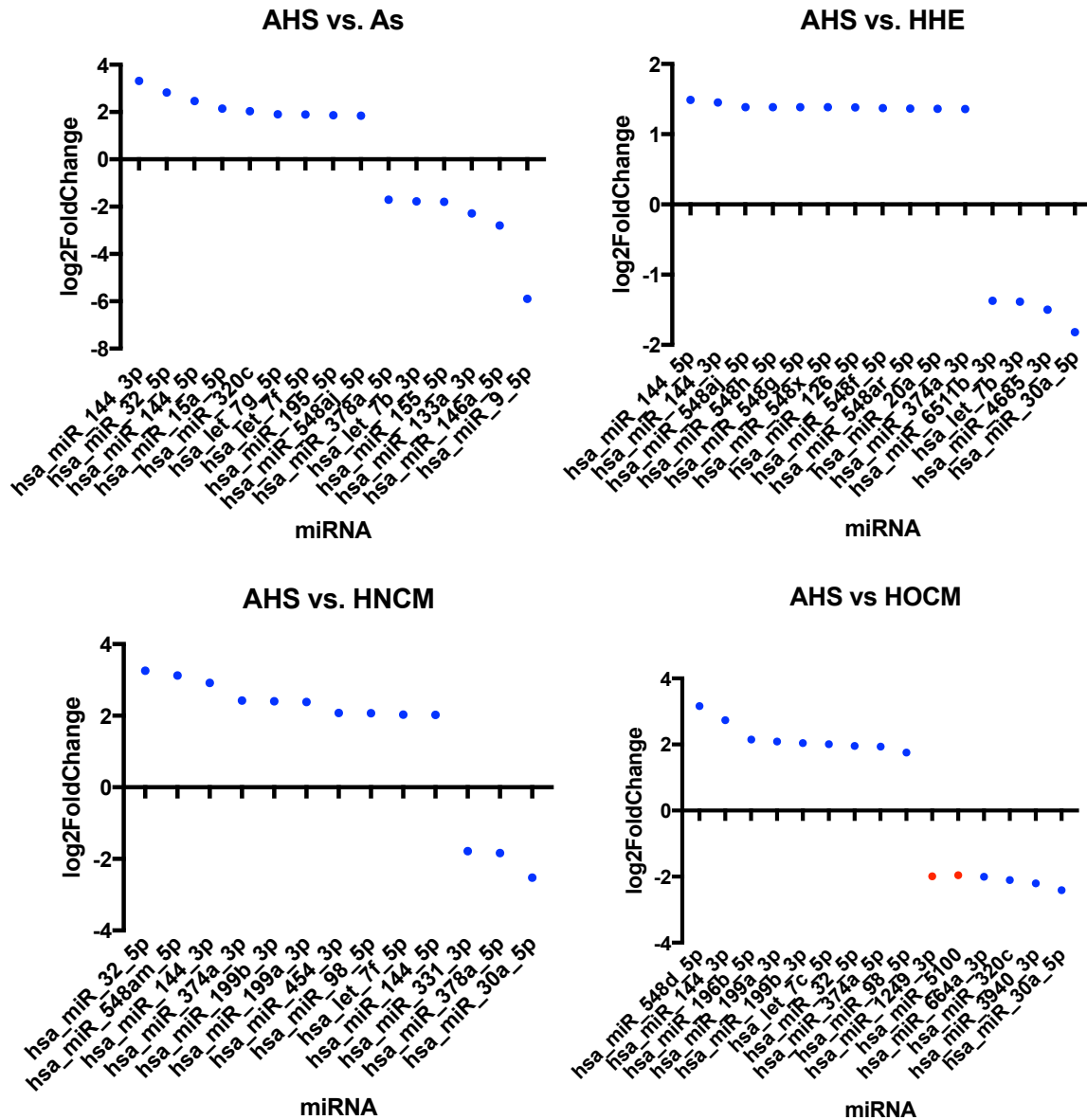


Abbildung 36-39: Größte Expressionsunterschiede mit Sportherzen: In den Abbildungen sind jeweils auf der x-Achse die untersuchten miRNAs aufgeführt. Über die y-Achse erfolgt die logarithmierte Darstellung des Fold changes zur Basis zwei zwischen Aortenklappenstenose und jeweiliger Gruppe (As, HHE, HNCM und HOCM). Die Farbe des Punkts der miRNAs ist rot, wenn die unterschiedliche Expression zwischen den beiden Gruppen sehr signifikant war ($p < 0,01$) und blau, wenn der Expressionsunterschied hoch signifikant ($p < 0,001$) war.

3.8 Hypertensive Herzerkrankung vs. HNCM

Zwischen den beiden Gruppen der HHE-Patienten und der HNCMs zeigten sich bei 43 miRNAs signifikante Unterschiede in der Expression. Die stärkste Überexpression von miRNAs bei HHE-Patienten gegenüber HNCM-Patienten bestand bei:

hsa_miR_32_5p
 hsa_miR_548am_5p
 hsa_miR_548c_5p
 hsa_miR_548o_5p
 hsa_miR_486_3p.

Hingegen zeigte sich die stärkste Überexpression bei HNCMs gegenüber HHEs bei:

hsa_miR_145_5p
 hsa_miR_195_5p
 hsa_miR_21_3p.

Die größten 20 Expressionsunterschiede mit jeweiligen Fold changes sind Tabelle 15 zu entnehmen.

miRNA	Fold change
hsa_miR_32_5p	4,91
hsa_miR_548am_5p	3,99
hsa_miR_548c_5p	3,70
hsa_miR_548o_5p	3,70
hsa_miR_486_3p	3,43
hsa_miR_144_3p	2,76
hsa_miR_4732_3p	2,61
hsa_miR_3173_5p	2,57
hsa_let_7f_5p	2,51
hsa_miR_548ar_5p	2,48
hsa_miR_3605_3p	2,48
hsa_miR_942_5p	2,47
hsa_miR_199b_3p	2,39
hsa_miR_378d	0,45
hsa_miR_127_3p	0,45
hsa_miR_331_3p	0,44
hsa_miR_204_5p	0,42
hsa_miR_21_3p	0,41
hsa_miR_195_5p	0,35
hsa_miR_145_5p	0,32

Tabelle 15: HHE vs. HNCM: Darstellung der 20 miRNAs mit den größten Expressionsunterschieden zwischen HHE-Patienten und HNCM-Patienten mit dazugehörigen Fold changes.

3.9 HNCM vs. HOCM

Zwischen HNCM- und HOCM-Patienten zeigten sich bei 12 miRNAs signifikante Unterschiede in der miRNA-Expression (siehe Tabelle 16). Dies war der niedrigste Wert zwischen den verschiedenen Gruppen.

Die einzige miRNA, die bei HNCMs gegenüber HOCMs überexprimiert war, war hsa_miR_548d_5p. Die im Vergleich bei HOCMs verstärkt exprimierten miRNAs waren:

hsa_miR_548am_5p

hsa_miR_548o_5p

hsa_miR_548c_5p

hsa_miR_5100

hsa_miR_32_5p.

miRNA	Fold change
hsa_miR_548d_5p	3,15
hsa_miR_486_3p	0,49
hsa_miR_628_3p	0,48
hsa_miR_320a	0,48
hsa_miR_1249_3p	0,48
hsa_miR_320c	0,46
hsa_miR_320b	0,46
hsa_miR_32_5p	0,41
hsa_miR_5100	0,40
hsa_miR_548c_5p	0,33
hsa_miR_548o_5p	0,33
hsa_miR_548am_5p	0,30

Tabelle 16: HNCM vs. HOCM: Darstellung aller miRNAs mit signifikanten Unterschieden in der Expression zwischen HNCM- und HOCM-Patienten.

3.10 HCM vs. Sportherzen

Zwischen HCM-Patienten und Sportherzen zeigten sich in unserer Studie bei 63 miRNAs signifikante Unterschiede in der Expression. Die 30 höchsten Fold changes zwischen den beiden Gruppen sind Tabelle 17 zu entnehmen. Die stärkste Überexpression bei HCM-Patienten bestand bei den miRNAs:

hsa_miR_30a_5p
hsa_miR_3940_3p
hsa_miR_664a_3p
hsa_miR_331_3p
hsa_miR_320.

Hingegen zeigte sich die stärkste Überexpression in der Gruppe der Sportherzen gegenüber den HCM-Patienten bei:

hsa_miR_144_3p
hsa_miR_32_5p
hsa_miR_548ar_5p (sowie weiteren Formen von hsa_miR_548)
hsa_miR_199a_3p
hsa_miR_199b_3p.

Alle großen Fold changes zwischen HCMs und Sportherzen bestanden bei hoch signifikantem adjustierten p-Wert (siehe Abbildung 40).

miRNA	Fold change
hsa_miR_30a_5p	5,52
hsa_miR_3940_3p	3,82
hsa_miR_664a_3p	3,64
hsa_miR_331_3p	3,27
hsa_miR_320c	3,22
hsa_miR_195_5p	3,10
hsa_miR_326	3,09
hsa_miR_378a_5p	3,07
hsa_miR_1249_3p	2,91

hsa_miR_20a_5p	0,30
hsa_let_7f_5p	0,28
hsa_miR_374a_3p	0,27
hsa_miR_98_5p	0,27
hsa_miR_548c_5p	0,26
hsa_miR_548o_5p	0,26
hsa_let_7c_5p	0,26
hsa_miR_374a_5p	0,26
hsa_miR_548am_5p	0,25
hsa_miR_196b_5p	0,24
hsa_miR_548d_5p	0,23
hsa_miR_548h_5p	0,22
hsa_miR_199b_3p	0,22
hsa_miR_199a_3p	0,22
hsa_miR_548f_5p	0,21
hsa_miR_548g_5p	0,21
hsa_miR_548x_5p	0,21
hsa_miR_548aj_5p	0,21
hsa_miR_548ar_5p	0,20
hsa_miR_32_5p	0,18
hsa_miR_144_3p	0,14

Tabelle 17: HCM vs. AHS: Darstellung der 30 miRNAs mit den größten Expressionsunterschieden zwischen HCM-Patienten und Sportherzen mit dazugehörigen Fold changes.

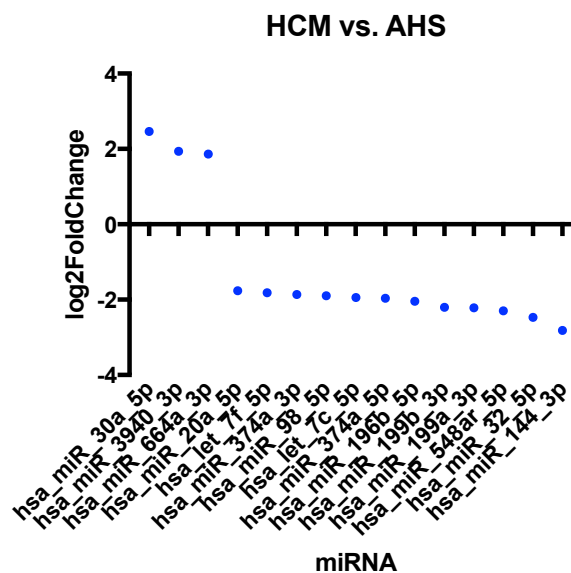


Abbildung 40: HCM vs. AHS: Darstellung der größten Fold changes zwischen HCMs und Sportherzen. x-Achse= miRNA, y-Achse: logarithmierter Fold change zur Basis zwei. Ein blauer Punkt bedeutet ein hochsignifikantes Ergebnis.

3.11 Bestätigung der differentiellen Regulation mittels PCR-Analyse

Um die Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung zu überprüfen, wurden die 5 miRNAs mit den größten Expressionsunterschieden zwischen Aortenklappenstenosen und den anderen Gruppen weitergehend mittels PCR-Analyse wie im Methodenteil erläutert untersucht. Hierbei wurden neun Serumproben von Patienten mit Aortenklappenstenose und fünf Serumproben einer Kontrollgruppe, die sich aus den anderen Gruppen zusammensetzte, miteinander verglichen.

Bei allen fünf verglichenen miRNAs (hsa_miR_9_5p, hsa_miR_146a_5p, hsa_miR_30a_5p, hsa_miR_155_5p und hsa_miR_320c) zeigten sich Regulationen der jeweiligen miRNA in den Aortenklappenstenosen in die gleiche Richtung wie in den Ergebnissen der Sequenzierung. Drei der miRNAs erreichten dabei auch ein statistisches Signifikanzniveau (siehe Abbildung 41).

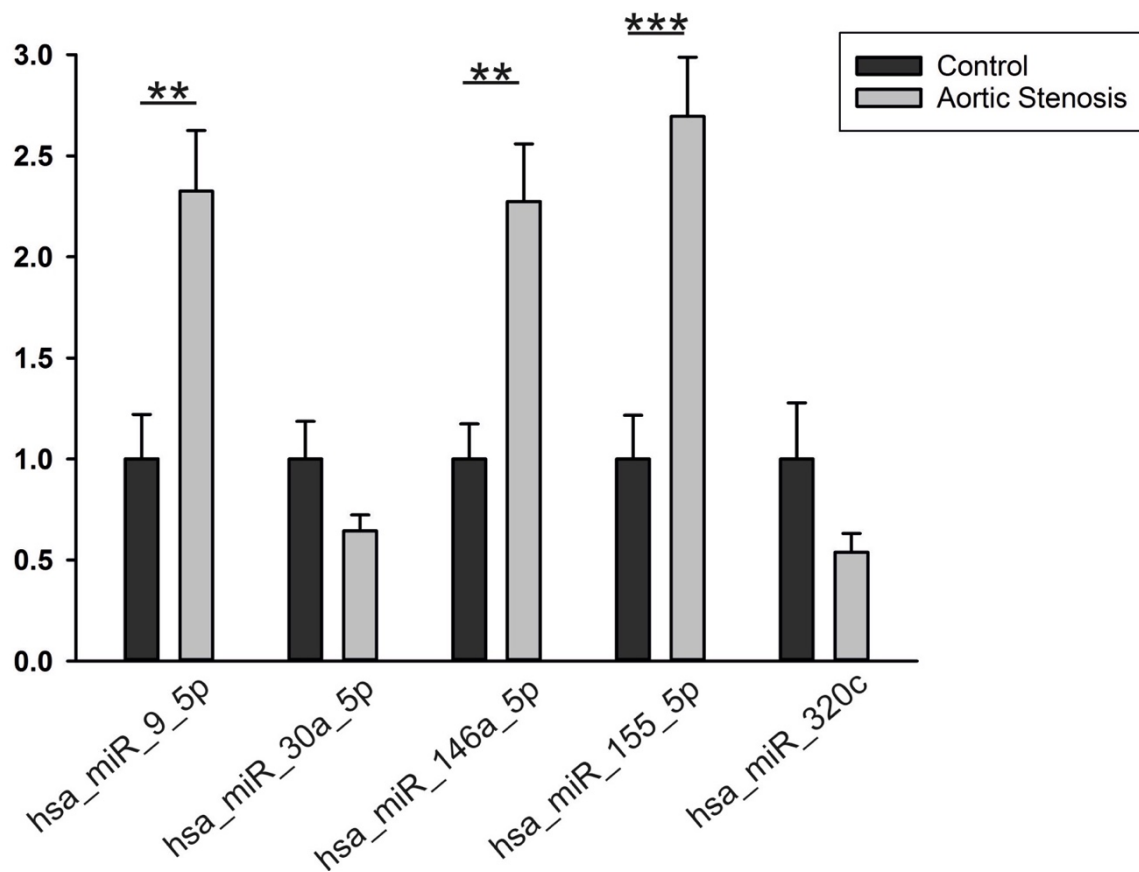


Abbildung 41: PCR-Analyse von 5 miRNAs: Es zeigten sich bei drei miRNAs signifikante Regulationsunterschiede wie in der Sequenzierung (hsa_miR_9_5p, hsa_146a_5p und hsa_miR_155_5p). Auch die beiden weiteren miRNAs waren wie in der Sequenzierung in der Gruppe der Aortenklappenstenosen herunterreguliert. Es wurden neun Patienten mit Aortenklappenstenose mit fünf Patienten einer Kontrollgruppe gegenübergestellt. Diese bestand aus Patienten mit den weiteren Linksherzhypertrophieformen der Arbeit.

4 Diskussion

4.1 Allgemein

Zielsetzung der Arbeit war es, miRNAs zu finden, die in Zukunft zur klinischen Differenzierung von verschiedenen Formen der Linksherzhypertrophie dienen können. Wie im Ergebnisteil dargestellt konnten die verschiedenen Formen der Linksherzhypertrophie anhand mehrerer Gesichtspunkte voneinander abgegrenzt werden, beispielsweise anhand sehr starker miRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen. Auch die zweite durchgeführte Methode zur Detektion von Unterschieden in der miRNA-Expression zwischen den Gruppen bestätigte die Ergebnisse der Sequenzierung mittels PCR-Analyse. Mit Hilfe dieser Kriterien werden im Anschluss die diagnostische Relevanz unserer Ergebnisse bezogen auf die einzelnen Gruppen beschrieben. Daran anschließend werden molekulare Signalwege aufgezeigt, in denen miRNAs, welche in unserer Arbeit interessante Ergebnisse lieferten, funktionelle Bedeutung besitzen und die damit ebenfalls von diagnostischer sowie therapeutischer Bedeutung sein könnten.

4.2 Klinische Relevanz

Aortenklappenstenosen

Die Gruppe der Aortenklappenstenosen lässt sich anhand unserer Ergebnisse neben den Sportherzen am besten von den anderen Formen der Linksherzhypertrophie unterscheiden. Im Vergleich mit den anderen Gruppen zeigten sich hinter der Gruppe der Sportherzen in dieser Gruppe die größte Anzahl an unterschiedlich exprimierten miRNAs. Die Expressionsunterscheide der miRNAs waren dabei deutlich größer als in allen anderen Vergleichen zwischen den Gruppen. Alle miRNAs mit deutlichen Expressionsunterschieden waren bei den Aortenklappenstenosen im Vergleich zu allen anderen Gruppen über- oder unterexprimiert.

Als erste miRNA ist hsa_miR_9_5p zu nennen, welche in der Gruppe der Aortenklappenstenosen eine deutliche Induktion zeigte. Zwar ist anzuführen, dass die Menge

der miRNA in den Proben als eher gering bezeichnet werden kann und dies schneller zu größeren Fold changes führt, dennoch sehen wir aufgrund unserer Ergebnisse eine weitere Untersuchung dieser miRNA als sinnvoll an, da ihre Expressionsunterschiede hervorstechen. Für hsa_miR_9 konnte zudem bereits beschrieben werden, dass sie in Patienten mit essentiellen Hypertonus vermehrt exprimiert wird und eine Korrelation mit dem LV-Masse-Index besteht (87). Ansonsten erfolgten Arbeiten hinsichtlich hsa_miR_9 vor allem im onkologischen Bereich.

Eine weitere aus unserer Sicht ähnlich interessante miRNA ist hsa_miR_146a_5p, welche zwar etwas geringere Fold changes aufwies, aber deren Menge in den Proben größer war. Zu dieser miRNA ist zudem bereits vorbeschrieben, dass sie in einer Studie mit HCM-Patienten mit dem Fibrosierungsgrad korrelierte (88). Dies könnte dafür sprechen, dass die miRNA-Expression bei dieser miRNA auch mit dem Schweregrad der jeweiligen Hypertrophieform zusammenhängt, was wiederum für die Schweregradeinteilung von Linksherzhypertrophieformen interessant ist.

Die dritte in der Gruppe der Aortenklappenstenosen sehr stark exprimierte miRNA war hsa_miR_155_5p. Gerade die starke Hochregulierung dieser miRNA bei Aortenklappenstenosen gegenüber beiden HCM-Formen erscheint interessant, da für hsa_miR_155_5p gezeigt wurde, dass ihr Target der AT1-Rezeptor ist und sie zu einer Vasokonstriktion und damit Hochdruckbelastung für das linke Herz führt, was insbesondere zu Beginn der Erkrankung mit einer zumindest ähnlichen Pathophysiologie der Hypertrophiebildung einhergeht wie bei der Aortenklappenstenose (89). Darüber hinaus konnte im Mausmodell dargestellt werden, dass hsa_miR_155 mit einer verstärkten druckinduzierten Herzhypertrophie einhergeht und ein Funktionsverlust der miRNA antihypertrophe Wirkung besitzt. Als Mechanismus konnte eine Regulierung von Jarid2/jumonj (AT-rich interaction domain 2) in Kardiomyozyten ausgemacht werden (90).

Von Interesse sind die drei zuvor genannten miRNAs ebenfalls, da bei ihnen auch in der PCR-Analyse signifikante Expressionsunterschiede zwischen der Gruppe der Aortenklappenstenosen und den anderen Patientengruppen auffindbar waren. Anhand der qRT-PCR-Analyse konnten die Ergebnisse der gesamten Studie und die Sequenzierungsergebnisse im Speziellen dieser drei miRNAs verifiziert werden.

Eine weitere miRNA mit interessanten Ergebnissen ist hsa_miR_21_5p, welche bei großer Menge in den Proben gegenüber allen anderen Gruppen eine erhöhte Expression bei den Aortenklappenstenosen aufwies. Schon in früheren Arbeiten zeigte sich, dass hsa_miR_21_5p als möglicher Marker für Aortenklappenstenosen dienen könnte. So konnte nachgewiesen werden, dass die miRNA bei Patienten mit Aortenklappenstenose und ohne signifikante KHK hochreguliert wird, bestand eine KHK, war dies nicht der Fall (91). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, da eine KHK mit Stenosen in unserer Arbeit ein Ausschlusskriterium war und somit eine erhöhte Expression von hsa_miR_21_5p mit den damaligen Ergebnissen in Einklang ist. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die wegen einer Stenose einen Aortenklappenersatz erhielten, post mortem hsa_miR_21_5p hochreguliert war (92). Diese Vorarbeiten und unser Ergebnis bezüglich der miRNA in Zusammenschau könnten Anlass sein, diese miRNA genauer im Hinblick auf Aortenklappenstenosen zu untersuchen und sie als möglichen Biomarker zu nutzen.

Zwei miRNAs, die in weiteren Untersuchungen ebenfalls von Interesse sein könnten, sind die miRNAs hsa_miR_30a_5p und hsa_miR_320c, welche in der Gruppe der Aortenklappenstenosen deutlich unterexprimiert waren im Vergleich zu den anderen Hypertrophieformen. Passend zu diesem Ergebnis ist, dass zu hsa_miR_30a_5p bereits vorbeschrieben wurde, dass es im Rahmen einer Herzinsuffizienz bei Patienten zu ihrer Herunterregulierung im Blut kommt und die miRNA bei uns zwischen Aortenklappenstenosen und physiologischer Hypertrophieform unterexprimiert war (93).

Dieses Muster von miRNAs ist für die gesamte Arbeit wie beschrieben als charakteristisch anzusehen, da auffällt, dass die deutlich größten Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen der Gruppe der Aortenklappenstenosen und den anderen Gruppen bestanden (siehe auch Abbildung 6). Die Fold Changes in den Vergleichen mit Aortenklappenstenosen waren deutlich höher als bei den Vergleichen zwischen den anderen Gruppen. Zudem gab es elf miRNAs, die in dieser Gruppe zu allen anderen Gruppen exklusiv unterschiedlich exprimiert waren. Plausibel erscheint dies vor dem Zusammenhang, dass bei dieser Form der Linksherzhypertrophie eine andere Pathophysiologie zu Grunde liegt als bei den anderen durch uns untersuchten pathologischen Linksherzhypertrophieformen, wie es im Einleitungsteil beschrieben wurde. Die ähnlichste Form der Erkrankung ist sicherlich die HHE, allerdings handelt

es sich bei dieser im Gegensatz zur Aortenklappenstenose um eine systemische Erkrankung und es kommt anders als bei der Aortenklappenstenose häufig zu einer exzentrischen und nicht konzentrischen Linksherzhypertrophie (94).

Die dargestellten Ergebnisse und die dazu passenden vorbeschriebenen Arbeiten geben in jedem Fall zu dem Ziel Anlass, die genannten miRNAs weiter zu untersuchen und sie in der Diagnostik von Aortenklappenstenosen zu verwenden. Auf der anderen Seite ist die Aortenklappenstenose mittels Echokardiographie relativ einfach von den anderen Formen der Linksherzhypertrophie abgrenzbar, sodass die klinische Praktikabilität und der klinische Nutzen fraglich erscheinen. Bei anderen Linksherzhypertrophieformen könnte dieser Nutzen deutlich größer ausfallen.

Hypertensive Herzerkrankung

Die Gruppe der HHE-Patienten lässt sich in unserer Studie bedeutend schlechter von den anderen Hypertrophieformen unterscheiden als die anderen Gruppen. Die Expressionsunterschiede zwischen HHEs und den anderen Gruppen waren eher gering und es zeigte sich zudem eine geringere Anzahl an unterschiedlich exprimierten miRNAs. Auf der anderen Seite fanden wir 17 miRNAs, die in dieser Gruppe exklusiv unterschiedlich exprimiert waren. Diese miRNAs sind besonders interessant, da bei ihnen genauer gesagt werden kann, durch welchen Einfluss sich ein Expressionsunterschied ergab. Dies ist bei miRNAs schwieriger, die zwischen mehreren Gruppen Unterschiede in der Expression zeigten, da bei diesen sich die verschiedenen Einflüsse überlagern könnten. Beispielhaft für unsere Studie zu nennen ist hsa_miR_197_3p, welche bei großer Menge in den Proben einen der höchsten Fold changes zwischen HHE-Patienten und Sportherzen aufwies und für die bereits vorbeschrieben ist, dass sie mit dem Vorhandensein von vier kardiovaskulären Risikofaktoren, die mit der HHE vergesellschaftet sind, assoziiert ist (95). Diese miRNA könnte in nachfolgenden Untersuchungen daher von Interesse sein, um die beiden Erkrankungen unterscheiden zu können.

Die einzige miRNA, deren Expression sich in der Gruppe der HHE-Patienten signifikant von allen anderen Gruppen in der Studie unterschied, war hsa_miR_144_3p. Die miRNA zeigte sich in dieser Gruppe gegenüber Aortenklappenstenosen und Sportherzen deutlich unterexprimiert und gegenüber beiden

HCM-Formen deutlich überexprimiert. Da wir in der Studie keine sonstigen miRNAs finden konnten, die ähnlich gut zwischen HHEs und allen anderen Gruppen differenzieren können und die miRNA auch insbesondere im Zusammenhang mit Sportherzen interessante Ergebnisse aufzeigte (siehe Abschnitt 4.3), ist diese miRNA eine der miRNAs, deren weitere Erforschung sinnvoll erscheint.

Unterscheidung HHE und HNCM

Bedingt durch die Wichtigkeit der Unterscheidung dieser Krankheitsbilder im klinischen Alltag werden die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen in diesem Abschnitt erörtert. Die Differenzierung von HHE und HCM ist in der heutigen Zeit weiterhin schwierig, auch wenn mittlerweile bei voranschreitender Sequenzierungstechnik vermehrt Gendiagnostik zur Detektion einer HCM-Erkrankung bei beispielsweise erstgradig Verwandten von Erkrankten durchgeführt wird. Dennoch erfolgt weiterhin in der Echokardiographie die auch von uns vorgenommene Unterscheidung der beiden Hypertrophieformen je nach der Septumdicke. Ab einer Septumdicke von 15 mm wird von einer HCM-Erkrankung ausgegangen, bei darunterliegenden Werten hingegen von einer HHE (96).

Um dieser Einteilung, bei der einzelne Patienten zunächst der falschen Gruppe zugeordnet werden und daher auch nicht die richtige Therapie erhalten, entgegenzuwirken, könnte eine unterschiedliche miRNA-Expression zwischen den beiden Gruppen und ein möglicher Biomarker zu ihrer Differenzierung einen großen Nutzen haben.

Auch bei diesem Vergleich spielen wieder die miRNAs mit möglichst großen Expressionsunterschieden eine wichtige Rolle. Für die miRNAs mit starker Überexpression bei Patienten mit HHE gegenüber Patienten mit HNCM ist bisher nichts in diesem Zusammenhang beschrieben, die Weiterverfolgung von hsa_miR_32_5p, die auch bei weiteren Vergleichen eine Rolle spielte und hier den deutlich größten Fold change zeigte, könnte daher sehr interessant sein.

Eine deutliche Überexpression in der Gruppe der HNCM-Patienten gegenüber den HHE-Patienten bestand bei hsa_miR_195_5p, für welche bekannt ist, dass sie in einem HCM-progressiven Signalweg funktionelle Bedeutung besitzt, was in Abschnitt 4.3 beschrieben wird.

Außerdem zeigte sich eine deutliche Überexpression bei hsa_miR_21_3p. Für diese miRNA konnte bereits gezeigt werden, dass eine verminderte Expression wie hier in der HHE-Gruppe bei einer Aortenkonstriktion und Angiotensin-II-Infusion in Mäusen auftrat (97), was der Pathophysiologie bei der HHE entspricht und damit unseren Ergebnissen. Der dahinterstehende pathophysiologische Signalweg wird ebenfalls in Abschnitt 4.3 erläutert und dargestellt. Die weitere Untersuchung von hsa_miR_21_3p könnte von Interesse sein, um erstens einen möglichen Biomarker zur Differenzierung von HHE und HNCM zu finden und zweitens einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt zu liefern, eine druckinduzierte Herzhypertrophie wie die HHE zu behandeln, möglicherweise mittels einer Induktion von hsa_miR_21_3p.

Eine weitere zur Unterscheidung der Gruppen führende miRNA in unserer Studie war hsa_miR_423_5p, welche in unseren Proben in großer Menge vorhanden war und in der Gruppe der HHEs gegenüber der Gruppe der HNCMs exklusiv überexprimiert war. Für diese miRNA ist vorbeschrieben, dass die hypertensionsinduzierte Herzhypertrophie mit ihrer Expressionshöhe im Blutplasma korreliert und sie nach ACE-Hemmergabe wieder in den Normbereich gelangt (98), was unseren Ergebnissen entspricht. Da nur 26,7 % unserer HHE-Patienten einen ACE-Hemmer einnahmen, ist die vorhandene Überexpression in dieser Gruppe in unserer Studie plausibel. Zudem zeigen Ergebnisse, dass die Expression von hsa_miR_423_5p in Blutplasma von Patienten ein Marker für Herzinsuffizienz sein könnte und mit NT-proBNP-Leveln korreliert (99).

Diese Ergebnisse konnten mittels dieser Studie nicht wiederholt werden. So lagen für unsere Studie nur bei wenigen Patienten die NT-proBNP-Level vor, wodurch nicht schlussendlich nachzuvollziehen ist, ob eine Korrelation zwischen miRNA- und NT-proBNP-Level vorlag. Neben diesem Aspekt könnte weiter untersucht werden, ob wie unsere Ergebnisse nahelegen nur im Falle einer HHE bei Herzinsuffizienz eine erhöhte Expression der miRNA vorkommt, oder ob dies auch im Falle von anderen Herzerkrankungen wie der KHK der Fall ist. In der genannten Arbeit erfolgte die Rekrutierung der Herzinsuffizienz-Probanden lediglich über NT-proBNP-Level, es wird nicht klar, welcher Genese die Herzinsuffizienz in der Studie war.

HCM

Die diagnostische Unterscheidung von HCM und anderen Linksherzhypertrophieformen spielt im klinischen Alltag eine wichtige Rolle, insbesondere bei der Differenzierung von HCM und HHE sowie Sportherz. Neben den genannten Schwierigkeiten im vorherigen Abschnitt gestaltet sich ebenfalls die Unterscheidung von HCM-Patienten und Sportherzen schwierig, da auch hier die vorhandenen diagnostischen Mittel kompliziert und invasiv sind. Daher wäre auch hier die Möglichkeit eines Biomarkers zur Unterscheidung wünschenswert.

Zur Differenzierung der HCM von allen anderen Hypertrophieformen eignet sich in unseren Ergebnissen hsa_miR_195_5p am besten, welche jeweils gegenüber den anderen Gruppen stark überexprimiert war. Anhand dieser miRNA kann allerdings keine Differenzierung zwischen HNCM und HOCM vorgenommen werden. Da für diese miRNA vorbeschrieben ist, dass sie zudem funktionelle Bedeutung in einem HCM-progressiven Signalweg besitzt (siehe Abschnitt 4.3), ist es eine der miRNAs, die aufgrund unserer Ergebnisse Anhalt dazu gibt, sie weiter zu erforschen.

Zudem fanden wir sieben miRNAs, die zwischen HCM-Patienten und den anderen Gruppen exklusiv unterschiedlich exprimiert waren.

Zwischen HNCM- und HOCM-Patienten zeigten sich in der Studie die geringsten Unterschiede in der miRNA-Expression. Dies erscheint vor dem Hintergrund der Ähnlichkeit der Erkrankungen in ihrer Pathophysiologie und insbesondere Entstehung verständlich. Außerdem ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass miRNAs bei der Ausbildung der jeweiligen Linksherzhypertrophieform funktionelle Bedeutung besitzen. Aus der Studie ergab sich kein Expressionsunterschied, der verfolgenswert scheint. So traten lediglich größere Fold changes bei den verschiedenen Varianten von hsa_miR_548 auf, allerdings lag dabei teilweise eine Über- und teilweise eine Unterexpression bei HNCM im Vergleich zu HOCM vor. Vor diesem Hintergrund wirken die einzelnen Ergebnisse eher als Zufallsbefunde, die auch durch die Aufteilung der Gruppe in zwei Unterformen und die damit einhergehende sehr kleine Gruppengröße bedingt sein könnten.

Damit ist dies der einzige Vergleich zwischen unterschiedlichen Formen der Linksherzhypertrophie, bei welchem eine Differenzierung von zwei Linksherzhypertrophieformen mittels miRNA-Expressionsanalyse unwahrscheinlich erscheint.

Die in der klinischen Diagnostik wichtigen Vergleiche mit HHE-Patienten und Sportherzen erfolgen in den jeweiligen Abschnitten.

Unterscheidung HCM und Sportherz

Wie beschrieben sind beide Krankheitsbilder als sehr unterschiedlich anzusehen und dennoch nicht immer leicht in der Diagnostik voneinander zu unterscheiden. Dabei steht eine genetische Erkrankung einer physiologisch erworbenen Hypertrophie gegenüber und die ausgeprägteste Form der Linksherzhypertrophie der mildesten Form der Linksherzhypertrophie in unserer Studie. Daher verwundert es nicht, dass es eine große Anzahl an miRNAs in der Studie gibt, die eine deutlich unterschiedliche Expression zwischen den beiden Gruppen zeigen. Von den 63 miRNAs, welche nach unseren Kriterien signifikante Unterschiede in der Expression zeigten, sind für die Zukunft sicher wieder jene von Interesse, die die größten Expressionsunterschiede aufwiesen. Die größte Überexpression zwischen HCMs und Sportherzen bestand bei hsa_miR_30a_5p, welche schon betreffend Aortenklappenstenosen erwähnt wurde. Für hsa_miR_30a zeigte sich in einer vorherigen Studie eine Induktion bei Patienten mit HCM im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe (100). Sie ist aufgrund der Werte sicherlich eine der interessantesten der gesamten Studie, weil es möglich erscheint, mit ihrer Hilfe mehrere Linksherzhypertrophieformen voneinander unterscheiden zu können. Neben den ebenfalls deutlich überexprimierten hsa_miR_3940_3p, hsa_miR_664_3p, hsa_miR_331_3p und hsa_miR_320c, für welche im Zusammenhang dieser Erkrankungen nichts vorbeschrieben ist, lässt sich noch hsa_miR_195_5p nennen (siehe Abschnitt 4.3)

Die stärkste miRNA-Überexpression zwischen Sportherzen und HCMs und den interessantesten wissenschaftlichen Hintergrund hat hsa_miR_144_3p (siehe auch Abschnitt 4.3). Weitere starke Überexpressionen bestanden bei hsa_miR_32_5p und Unterformen von hsa_miR_548 und hsa_miR_199.

Sportherz

Die Sportherzen lassen sich mittels der Ergebnisse unserer Studie neben den Aortenklappenstenosen am besten von den anderen Gruppen hinsichtlich der miRNA-

Expression abgrenzen. So fanden wir in den Vergleichen mit den anderen Gruppen die meisten miRNAs mit unterschiedlicher Expression, allerdings waren die Expressionsunterschiede nicht so groß wie bei den Aortenklappenstenosen. Zudem waren 15 der insgesamt detektierten 25 miRNAs mit exklusiv unterschiedlicher Expression zwischen der einzigen physiologischen Hypertrophieform und den pathologischen Hypertrophieformen vorhanden.

Zur Unterscheidung zwischen der einzigen physiologischen Linksherzhypertrophieform, dem Sporthertz, und allen pathologischen Herzhypertrophieformen, bieten sich am ehesten hsa_miR_144_3p und hsa_miR_144_5p an, welche beide in der Gruppe der Sporthertzen eine besonders starke Induktion zeigten. Für hsa_miR_144 konnte dabei bereits nachgewiesen werden, dass sie zu den durch Schwimmen induzierten miRNAs gehört (101). Da wir wie beschrieben Minentaucher für die Gruppe der Sporthertzen verwendeten, ist dies passend. Ein Anknüpfungspunkt an unsere Arbeit könnte nun sein, zu sehen, ob die miRNA auch bei anderen Ausdauersportarten, die mit einer Linksherzhypertrophie einhergehen, erhöht exprimiert wird. Wäre dies der Fall, hätte man in hsa_miR_144 eine miRNA gefunden, die zwischen physiologischen und pathologischen Linksherzhypertrophien eine unterschiedliche Expression zeigt und die als Marker für die physiologische Form dienen könnte. Da für hsa_miR_144_3p zudem eine funktionelle Bedeutung in der physiologischen Hypertrophiebildung vorbeschrieben ist (siehe Abschnitt 4.3), ist sie neben hsa_miR_9_5p und hsa_miR_195_5p die interessanteste dieser Arbeit.

Drei weitere miRNAs, die in diesem Vergleich ebenfalls Expressionsunterschiede aufwiesen, sind hsa_miR_126_3p, hsa_miR_126_5p und hsa_miR_766_3p. Für letztere konnte gezeigt werden, dass die miRNA nach 12 Wochen Ausdauertraining eine geringere Expression zeigte (102). Auch bei uns zeigte sie in der Gruppe der Sporthertzen gegenüber allen anderen Gruppen eine verminderte Expression.

Hingegen zeigten sich bei hsa_miR_126_3p und hsa_miR_126_5p bei der physiologischen Linksherzhypertrophie eine Überexpression allen anderen Gruppen gegenüber. Ähnlich wie bei hsa_miR_144 konnte auch bei hsa_miR_126 bereits gezeigt werden, dass es sich um eine durch Schwimmen regulierte miRNA handelt, die nach Ausdauertraining durch Schwimmen vermehrt exprimiert wurde (101). Zudem führten auch andere Arten von Ausdauertraining zu einer Induktion (103), weshalb auch die weitere Erforschung dieser miRNA aufgrund der Ergebnisse sinnvoll scheint.

4.3 Regulierungsstellen von miRNAs

Neben der diagnostischen Relevanz von Unterschieden in der miRNA-Expression zwischen den verschiedenen Varianten der Linksherzhypertrophie ist ebenfalls von Bedeutung, die Pathophysiologie der jeweiligen Hypertrophiebildung zu verstehen. Dabei ist interessant herauszufinden, ob und in welchen Signalkaskaden miRNAs funktionelle Bedeutung besitzen. Wie in der Einleitung beschrieben sind miRNAs an der Regulierung der Genexpression beteiligt und können demnach hypertroph oder antihypertroph wirksam werden. Neben dem besseren Verständnis der Erkrankung könnte das Wissen von Angriffspunkten von miRNAs auch therapeutische Konsequenz besitzen, indem mittels einer Induktion oder Hemmung von miRNAs eine bestehende Hypertrophie behandelt werden könnte. Zudem ist bislang noch nicht genug über die hinter den Hypertrophieformen stehenden Signalwege bekannt, sodass miRNAs auch hier hilfreich sein könnten, diese besser zu erforschen.

In der Studie fielen drei miRNAs auf, die in Vorarbeiten im Zusammenhang mit Signalkaskaden bei Herzhypertrophieformen in Verbindung gebracht wurden, dabei handelt es sich um hsa_miR_195_5p, hsa_miR_144_3p bzw. hsa_miR_144_5p und hsa_miR_21_3p.

Hsa_miR_195, bei welcher eine deutliche Induktion bei beiden HCM-Formen auffiel, und hsa_miR_144, bei der eine solche Induktion bei den Sporthertzen vorlag, besitzen beide über verschiedene Wege funktionelle Bedeutung im mTOR-Signalweg (siehe Abbildung 42). Für hsa_miR_195 konnte im Mausmodell in Kardiomyozyten nachgewiesen werden, dass es im Rahmen einer HCM-Erkrankung zu erhöhten Expressionsleveln kommt. Zudem wird beschrieben, dass hsa_miR_195 an MO25 bindet, welche eine Untereinheit der Serin-/Threonin-Kinase LKB1 darstellt (siehe Abbildung 42). Durch diese Hemmung folgt eine Verminderung der Aktivierung des LKB1/AMPK-Signalwegs und es kommt folglich zu einer Enthemmung und somit vermehrten Bildung der Serin-/Threonin-Kinase mTOR. Damit einhergehend kam es in diesem Modell zur Hypertrophiebildung. Auch in weiteren Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen kardialer Hypertrophiebildung und dem LKB1/AMPK-Signalweg aufgezeigt werden (104,105).

Hsa_miR_144 hingegen zeigte sich im Modell an der Ratte in den Kardiomyozyten deutlich verstärkt exprimiert, nachdem diese Ausdauertraining absolviert hatten.

Zudem kam es dabei zu einer vermehrten Expression des PI3K-AKT-Signalwegs, der in einer Induktion von mTOR mündet (106).

Beide Signalkaskaden zusammen legen nahe, dass wie auch schon in anderen Arbeiten beschrieben (107–110) der Bildung der Serin-/Threonin-Kinase mTOR eine wichtige Bedeutung an der Ausbildung von linksventrikulären Hypertrophieformen, seien sie physiologischer oder pathologischer Genese, zukommen könnte. Zudem könnte die Supprimierung der Signalwege antihypertrophe Wirkung besitzen.

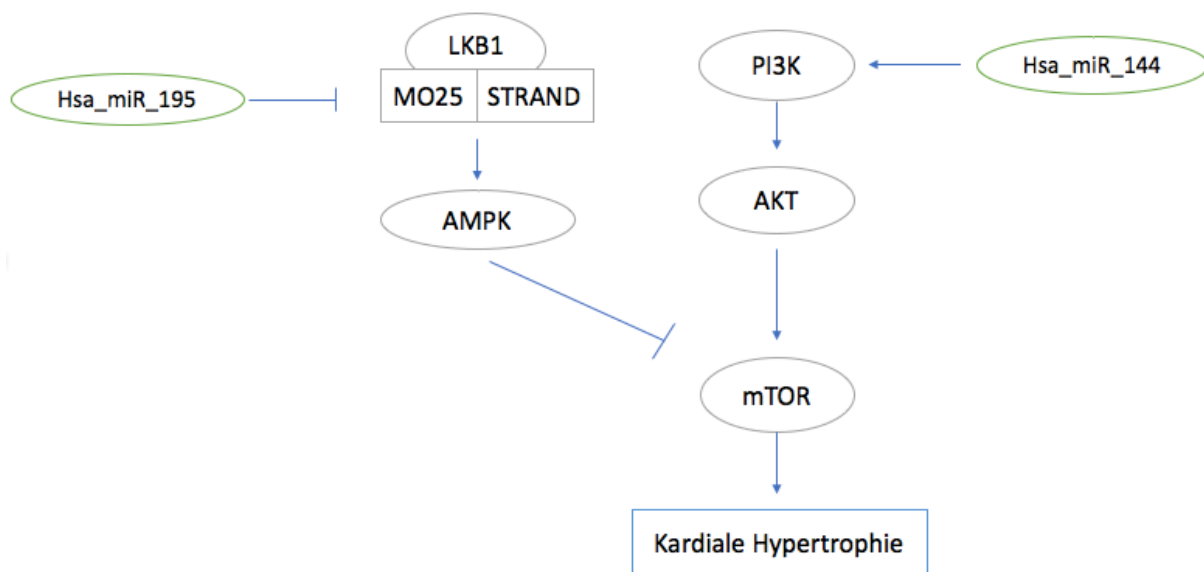


Abbildung 42: mTOR-Signalweg: Darstellung von pathophysiologischen Signalkaskaden mit Induktion und Hemmung von miRNAs, die in unserer Studie auffällige Ergebnisse bezugnehmend HCM und Sportherz zeigten.

Die dritte miRNA, die vorher beschrieben in pathophysiologischen Signalwegen funktionelle Bedeutung besitzt, ist hsa_miR_21_3p. Dabei ist zu beachten, dass für hsa_miR_21 bekannt ist, dass diese eine Rolle bei kardialen Hypertrophien besitzt (111,112) und auch hsa_miR_21_5p in unserer Studie eine deutliche Induktion bei Aortenklappenstenosen zeigte. Hsa_miR_21_3p zeigte in dieser Studie eine verminderte Expression in der Gruppe der HHE-Patienten im Vergleich mit Aortenklappenstenosen und HNCM-Patienten. In Vorarbeiten konnte dargestellt werden, dass im Mausmodell ebenfalls eine verminderte Expression von hsa_miR_21_3p bei Aortenkonstriktion und Angiotensin-II-Infusion entsteht (97). Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es in humanen Kardiomyozyten zu einer Induktion von hsa_miR_21_3p bei dilatativer Kardiomyopathie kommt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigten Ergebnisse, dass eine verminderte Expression von hsa_miR_21_3p zu einer Entthemmung von HDAC8 und im Folgenden des AKT/GSK3 β -Signalwegs führt. Dies resultierte in einer hypertrophen kardialen Wirkung (siehe Abbildung 43). Diese konnte auch in einer weiteren Arbeit für die Aktivierung des AKT/GSK3 β gezeigt werden (113). Bei erhöhtem Expressionslevel von hsa_miR_21_3p konnte die entstandene Hypertrophie zurückgebildet werden (97). In Zusammenschau der Ergebnisse ist hsa_miR_21 eine weitere miRNA, deren Erforschung hinsichtlich kardialer Hypertrophien sinnvoll scheint. Einerseits zur Differenzierung insbesondere von HHE und den anderen Linksherzhypertrophieformen, andererseits zur weiteren Verifizierung der dahinterstehenden Pathophysiologie und eventueller therapeutischer Konsequenzen.

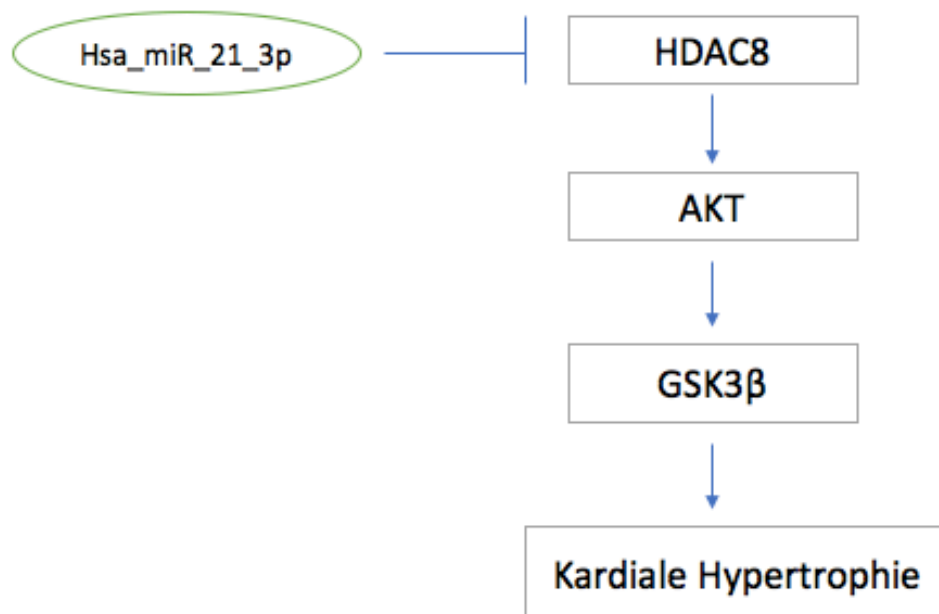


Abbildung 43: Signalweg mit hsa_miR_21_3p: Darstellung der Signalkaskade mit Regulierung durch hsa_miR_21_3p.

4.4 Vorbeschriebene miRNAs

In diesem Abschnitt wird Bezug auf miRNAs genommen, die in bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten bei einer der Linksherzhypertrophieformen über- oder unterexprimiert waren, was in unserer Studie hingegen im Verlauf nicht nachgewiesen werden konnte. Beispielsweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bei Patienten mit HOCM miR-29-a erhöht ist und die Höhe mit der Ausprägung der Ventrikelhypertrophie korreliert. MiR-29c hingegen war bei Patienten mit Aortenklappenstenose erhöht (114).

Zudem konnten wir keine Über- beziehungsweise Unterexpression von hsa_miR_1 sowie hsa_miR_133 finden, welche im Einleitungsteil erwähnt wurden und die bekanntesten miRNAs im Zusammenhang mit kardialen Hypertrophieformen darstellen. Für beide miRNAs konnte gezeigt werden, dass sie bei kardialen Hypertrophieformen unterexprimiert sind (74). Unsere Arbeit legt nahe, dass bei diesen miRNAs allerdings keine Unterschiede in der Expression zwischen den verschiedenen Erkrankungen vorliegen. Da in unserer Studie eine nicht erkrankte Kontrollgruppe fehlt, konnte nicht bestimmt werden, ob auch bei uns eine Unterexpression der miRNAs gegenüber dieser vorgelegen hätte.

4.5 Stärken der Arbeit

Positiv ist an dieser Arbeit zu bewerten, dass es gelungen ist, nur Patienten für die Studie zuzulassen, die an einer deutlichen Linksherzhypertrophie leiden. Während dies in den Gruppen der Aortenklappenstenosen, hypertensiv Herzerkrankten und Hypertrophen Kardiomyopathien recht leicht gelang, gestaltete sich dies in der Gruppe der Sportherzen deutlich schwerer, da Menschen mit Sportherz in den meisten Fällen lediglich eine sehr milde Linksherzhypertrophie aufweisen. Indem wir in dieser Gruppe Minentaucher der Bundeswehr als Probanden gewannen, konnten wir erreichen, dass selbst in dieser Gruppe jeder Proband eine Linksherzhypertrophie aufwies und wir damit sichergehen konnten, dass unsere Patienten eine physiologische Form der Linksherzhypertrophie aufwiesen.

Zudem ist als weiterer Punkt erwähnenswert, dass erreicht wurde, die verschiedenen Gruppen sehr gut voneinander abzugrenzen. So wurden in der Gruppe der Aorten-

klappenstenosen nur Patienten mit einer hochgradigen Aortenklappenstenose zugelassen, leichtere Formen der Stenose waren ein Ausschlusskriterium. So konnten wir zeigen, dass die Hypertrophie der Patienten wirklich durch ihre Aortenklappenstenose hervorgerufen wurde und nicht durch einen anderen Pathomechanismus.

Eine weitere wichtige Abgrenzung zwischen den Gruppen lag bei den hypertensiv Herzerkrankten und HCM-Patienten vor. Gelungen ist uns diese, indem wir in der Gruppe der HHE-Patienten nur Probanden zur Studie zuließen, die höchstens eine Septumdicke von 14 mm aufwiesen und nur HCM-Patienten zuließen, die mindestens eine Septumdicke von 15 mm in der Echokardiographie zeigten.

Patienten mit einem für die Hypertrophie ursächlichen Hypertonus neigen zu mildereren Hypertrophieformen und HCM-Patienten zu stark ausgeprägten Hypertrophieformen, so konnten wir sichergehen, die jeweilige Gruppe von der anderen Erkrankungsform frei zu halten.

Zudem erfolgte in der Studie eine strikte Trennung zwischen pathologischer und physiologischer Form der Linksherzhypertrophie. Die Probanden in der Gruppe der Sportherzen durften somit keine Erkrankung aufweisen und keine Medikamente einnehmen.

An diesen Beispielen lässt sich sehen, dass wir erreichen wollten, eine klare Abgrenzung zwischen den verschiedenen Gruppen herzustellen und uns dies gelungen ist. Unsere Ergebnisse sind vor diesem Hintergrund glaubwürdig, zudem konnte ich in der Diskussion viele Verweise auf andere Forschungsarbeiten geben, deren Ergebnisse sich mit Teilen unserer Ergebnisse decken. Auch dies ist ein positiv zu bemerkender Punkt. Unsere Übereinstimmungen mit anderen Arbeiten deuten auf die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse hin, was gerade für jene unserer Ergebnisse von Bedeutung ist, die noch nicht vorbeschrieben sind.

Auch konnten mittels der PCR-Analyse als probatorischer Methode größtenteils die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigt werden. Alle miRNA-Expressionsunterschiede in der Sequenzierung konnten in der PCR-Analyse ebenfalls dargestellt werden, drei von fünf mit statistischem Signifikanzniveau. Dies erhöht insgesamt die Aussagekraft der Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung.

Ein weiterer positiver Aspekt der Arbeit ist, dass wir nicht nur wie in bisherigen Arbeiten üblich miRNAs untersucht haben, die im Kontext der Herzhypertrophien bereits untersucht wurden, sondern das gesamte Genom „unbiased“ nach miRNAs durchsucht haben. Offensichtlich wird dies durch unsere Ergebnisse, in denen zum Beispiel

nicht hsa_miR_1 oder hsa_miR_133 auftauchen, zu welchen bereits dokumentiert ist, dass sie bei Hypertrophien eine Rolle spielen. In unserer Arbeit zeigte sich allerdings, dass mittels dieser miRNAs keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Formen der Hypertrophie möglich ist. Dafür fanden wir viele neue miRNAs als Ansatzpunkte, bei denen dies möglich erscheint.

4.6 Limitationen der Arbeit

Trotz bestmöglicher Auswahl der Patienten und der Methoden, gab es Schwierigkeiten, die nicht vollständig adressiert werden konnten. Zunächst ist dabei zu nennen, dass es sinnvoll wäre, eine nicht erkrankte Kontrollgruppe in weiterführenden Arbeiten zu etablieren. Die Problematik, die sich hierbei stellte, war eine Gruppe zu formen, die möglichst gut zu den verschiedenen Gruppen der Krankheitsbilder passt. Jedoch ist dies besonders bei unseren noch relativ kleinen Gruppengrößen schwierig vor dem Hintergrund, dass die Erkrankungen in unterschiedlichen Altersgruppen auftreten. So sind Patienten mit Sportherzen oder HCMs im Durchschnitt deutlich jünger als Patienten mit einer degenerativen Erkrankung wie der Aortenklappenstenose. Die unterschiedlichen Altersstufen führen natürlich auch dazu, dass die Zahl der Begleiterkrankungen bei den Patientengruppen differiert. Wir schafften es zwar mittels Ausschlusskriterien wie der KHK oder Malignomen, Begleitkrankheiten zu eliminieren, für die Änderungen in der miRNA-Expression bereits vorbeschrieben sind, natürlich können diese aber auf dem noch recht unerforschten Gebiet der miRNAs nicht für jede der bei uns vorkommenden Begleiterkrankungen ausgeschlossen werden. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass miRNAs in verschiedenen Altersstufen unterschiedlich exprimiert werden, was zu einer Veränderung unserer Ergebnisse beigetragen haben könnte. Es könnten also auch altersabhängige Expressionsunterschiede eine Rolle spielen, die nicht zwangsläufig durch die verschiedene Form der Linksherzhypertrophie hervorgerufen wurden. Ferner sind auch die in dieser Studie noch relativ kleinen Gruppengrößen als negativ zu vermerken. Für einen ersten Ansatz, die verschiedenen Formen der Linksherzhypertrophie voneinander abzugrenzen, war die gewählte Größe sicherlich sinnvoll, um zu sehen, ob wir überhaupt Ergebnisse erzielen, die zur weiteren Erforschung auf diesem Sektor ermutigen. Da dies in dieser Arbeit gezeigt wurde, müsste dies in größeren Patientengruppen in

Zukunft untersucht werden, um erstens eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und zweitens eine größere Aussagekraft zu erzielen.

Eine Schwierigkeit stellt dar, dass der Vergleich mit anderen publizierten Arbeiten der Problematik unterliegt, dass die jeweiligen Labore und das genutzte Equipment sehr verschieden sind. Dadurch kann es leicht zur Verfälschung von Ergebnissen kommen, selbst bei miRNA-Sequenzierungen, die in einem Labor durchgeführt wurden. Da die von uns verwendete Technik als sehr hochwertig anzusehen ist, geht es dabei weniger darum, an unseren Ergebnissen zu zweifeln. Die Sequenzierung wurde in einem renommierten Institut durchgeführt, welches bereits vielfach hochrangig publizierte (115–118). Vielmehr führt es zu dem Problem, die Ergebnisse mit jenen vorangegangener Arbeiten zu vergleichen. Dies ist ebenfalls dadurch bedingt, dass lange Zeit und teilweise auch heute in Arbeiten keine standardisierten Protokolle vorlagen, nach denen die RNA-Sequenzierung erfolgte. Auch dadurch können insbesondere frühere Ergebnisse, auf denen unsere Arbeit aufbaut, verfälscht worden sein. Beispiele hierfür sind die sehr unterschiedlichen Lagerungszeiten des Blutes bis zu Verwertung sowie die unterschiedlichen Herangehensweisen bei der Isolierung der RNA sowie ihrer Sequenzierung.

4.7 Ausblick

Das Thema miRNAs bleibt weiterhin ein in der Kardiologie sehr attraktives Forschungsgebiet, da gerade im klinischen Einsatz noch nicht viele Anwendungen etabliert sind. Obwohl bereits miRNAs bekannt sind, die eine Rolle bei Formen der Herzhypertrophie einnehmen, erscheint ihr Potential im diagnostischen und therapeutischen Bereich weitaus größer. Mit Hilfe dieser Arbeit konnten wie beschriebene miRNAs gefunden werden, durch deren Expression zwischen Aortenklappenstenosen, HHEs, HCMs und Sportherzen und der jeweils daraus resultierenden Linksherzhypertrophie unterschieden werden kann. Gerade die weitere Untersuchung von miRNAs wie hsa_miR_9_5p, hsa_miR_144_3p und hsa_miR_195_5p ist nach unserer Arbeit sinnvoll, um die Ergebnisse durch größere Probandenzahlen zu bestätigen. Zudem sollte der Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe erfolgen, um darzustellen, ob auch zu gesunden Menschen eine veränderte Expression dieser miRNAs vorliegt, wie es beispielsweise für miR-1 und

miR-133 vorbeschrieben ist. In weiterführenden Arbeiten wäre es zudem sinnvoll, im Sinne einer Multimarkerstrategie Signaturen von miRNAs zu erstellen, welche für die jeweilige Hypertrophieform spezifisch sind und diagnostisch genutzt werden können. Diese würden zu einem klaren Muster und einer deutlichen Abgrenzung unter verschiedenen Formen der Linksherzhypertrophie führen. In anderen Bereichen gelang dies bereits, zum Beispiel betreffend der frühen Diagnosestellung und Prognose bei Brustkrebskrankungen (119,120). Auch wurden bereits Studien durchgeführt, in denen miRNA-Signaturen für verschiedene Prognoseverläufe im Rahmen von akuten kardialen Dekompensationen erstellt wurden (121).

Die Angriffspunkte, an denen die jeweiligen miRNAs zu einer Regulierung der Genexpression führen und die dabei zu Grunde liegenden pathophysiologischen Signalwege sollten ebenso Schwerpunkt weiterer Forschung sein, um ein besseres Verständnis der miRNAs zu erlangen und zudem Ansatzpunkte zu haben, die bei der Entwicklung von AntagomiRs hilfreich sein könnten. Hierfür wären „Targetscans“ hilfreich, bei denen untersucht werden kann, an welcher Stelle es zur Regulierung durch miRNAs kommt, welche in unserer Arbeit Auffälligkeiten zeigten.

5 Zusammenfassung

In dieser Studie erfolgte eine serumbasierte miRNA-Sequenzierung zur diagnostischen Unterscheidung von vier verschiedenen Formen der Linksherzhypertrophie, nämlich Aortenklappenstenosen, Patienten mit HHE, HCM und Sportherzen. Dafür wurden über Jahre Patientendaten und Blutproben von Patienten des UKSH gesammelt. Anhand wichtiger Kriterien wie insbesondere der Septumdicke und der LV-Masse wurden für jede Gruppe 15 repräsentative Probanden selektiert. Im Anschluss erfolgte die Extraktion der RNA aus den Blutproben und die miRNA-Sequenzierung mittels Deep Sequencing. Insgesamt fanden sich 131 Expressionsunterschiede von miRNAs zwischen den Gruppen. Es gelang zudem, für alle Gruppen miRNAs zu finden, deren Expression sich in dieser Gruppe von allen anderen unterschied. Auch fanden wir miRNAs wie hsa_miR_9_5p, welche in der Gruppe der Aortenklappenstenosen deutlich vermehrt exprimiert wurde im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Es konnten deutliche Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen der einzigen physiologischen Linksherzhypertrophie, dem Sportherz, und allen pathologischen Formen der Linksherzhypertrophie dargestellt werden. Insgesamt 81 miRNAs zeigten in der Studie zwischen diesen Formen unterschiedliche Expressionslevel.

Ebenso konnten unsere Ergebnisse anhand schon bestehender Ergebnisse aus anderen Studien und Kollektiven verifiziert werden. Hervorzuheben ist hsa_miR_144_3p, welche für die Differenzierung der Sportherzen von den anderen Hypertrophieformen verwendet werden könnte und funktionelle Bedeutung in einem hypertrophvermittelnden Signalweg besitzt. Auch gelang dies bei der bei HCM vermehrt exprimierten hsa_miR_195_5p, für die bereits ebenfalls ein Signalweg bekannt ist, über den die miRNA hypertrophe Wirkung am Herz besitzt.

Eine weitere Bestätigung der Ergebnisse erfolgte anhand einer qRT-PCR-Analyse von miRNAs mit den größten Expressionsunterschieden zwischen den Patientengruppen. Hierbei konnten die Ergebnisse der Sequenzierung größtenteils verifiziert werden.

Anhand dieser Ergebnisse erscheint es sinnvoll, mit größerer Gruppengröße die Ergebnisse zu bestätigen und die in der Studie interessantesten miRNAs genauer zu erforschen, um sie möglicherweise in der Zukunft in der Diagnostik und Therapie von Linksherzhypertrophieformen einzusetzen.

miRNA	Klinische Implikation	Signalweg oder Besonderheit
hsa_miR_9_5p	Abgrenzung As	Höchster FC in der Arbeit
hsa_miR_144_3p	Abgrenzung AHS und HHE	PI3K/AKT-mTOR-Signalweg, sportreguliert
hsa_miR_195_5p	Abgrenzung HCM	LKB1/AMPK-mTor-Signalweg
hsa_miR_21_3p	Abgrenzung As, HHE vs. HNCM	AKT-GSK3 β -Signalweg
hsa_miR_146a_5p	Abgrenzung As	Hohe FC's und große Menge in Proben
hsa_30a_5p	Abgrenzung As, HCM vs. AHS	Besonders niedriger FC bei As, bekannte Herunterregulierung bei Herzinsuffizienz

Tabelle 18: Interessanteste miRNAs der Arbeit: Tabellarische Aufführung der aufgrund der miRNA-Sequenzierung interessantesten miRNAs. Stichwortartige Ergänzungen der dazugehörigen pathophysiologischen Signalwege und Besonderheiten.

6 Literaturverzeichnis

1. WHO. The top 10 causes of death: Fact sheet N°310 [Internet]. World Health Organisation. 2013. Available from:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
2. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) Fact Sheet No. 317. World Health Organization Media center. 2011.
3. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22(4 Suppl A):6A–13A.
4. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB CW. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990;322(22):1561–6.
5. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Balkus SA, Kannel WB, Castelli WP. Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. *Am J Cardiol*. 1987;60:560–5.
6. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Left ventricular mass and incidence of coronary heart disease in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*. 1989;110(2):101–7.
7. Laukkanen JA, Khan H, Kurl S, Willeit P, Karppi J, Ronkainen K, et al. Left ventricular mass and the risk of sudden cardiac death: a population-based study. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2014 Dec [cited 2015 Dec 2];3(6):e001285. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4338721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Frey N, Katus H a., Olson EN, Hill J a. Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? *Circulation*. 2004;109(13):1580–9.
9. Riede, Ursus-Nikolaus Werner M, Freudenberg N. *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009. 42,43,225.
10. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* [Internet]. 2014;35(39):2733–79. Available from:
<http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/35/39/2733.abstract>
11. Chi-Ming C, Ho E. No Title. Different types of left ventricular hypertrophy. 2017. p.
<http://csecho.ca/mdmath/?tag=lvm/vmi>.
12. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* [Internet]. 2006;7(2):79–108. Available from:
<http://ehjcm.oxfordjournals.org/content/7/2/79%5Cninternal->

- pdf://1274/79.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16458610
13. Iung B. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* [Internet]. 2003;24(13):1231–43. Available from: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/24/13/1231.long>
 14. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* [Internet]. 2006;368(9540):1005–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16980116>
 15. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J* [Internet]. 2012;33(19):2451–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922415%5Cnhttp://eurheartj.oxfordjournals.org/content/33/19/2451.short%5Cnpapers3://publication/uuid/D126C048-1F57-48B9-8457-68F223D9EC9B>
 16. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2012;60(19):1854–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109712041502>
 17. Hein S. Progression From Compensated Hypertrophy to Failure in the Pressure-Overloaded Human Heart: Structural Deterioration and Compensatory Mechanisms. *Circulation* [Internet]. 2003 Feb 10 [cited 2015 Dec 7];107(7):984–91. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/107/7/984.full>
 18. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr* [Internet]. 2009;10(1):1–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19130998>
 19. Cioffi G, Faggiano P, Vizzardi E, Tarantini L, Cramariuc D, Gerds E, et al. Prognostic effect of inappropriately high left ventricular mass in asymptomatic severe aortic stenosis. *Heart*. 2011;97(4):301–7.
 20. Lancellotti P, Moonen M, Magne J, O'Connor K, Cosyns B, Attenu E, et al. Prognostic Effect of Long-Axis Left Ventricular Dysfunction and B-Type Natriuretic Peptide Levels in Asymptomatic Aortic Stenosis. *Am J Cardiol* [Internet]. 2010;105(3):383–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.09.043>
 21. Smith CR, Leon MB, Mack MJ, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, et al. Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *N Engl J Med* [Internet]. 2011;364(23):2187–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21639811>

22. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, et al. Transcatheter Aortic-Valve Implantation for Aortic Stenosis in Patients Who Cannot Undergo Surgery. *N Engl J Med* [Internet]. 2010;363(17):1597–607. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1008232>
<http://www.nejm.org.ezp-prod1.hul.harvard.edu/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1008232>
23. Diamond J a, Phillips R a. Hypertensive heart disease. *Hypertens Res*. 2005;28(3):191–202.
24. Herold G. *Innere Medizin*. 2013. 303 p.
25. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Boehm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *BLOOD Press*. 2013;22:193–278.
26. Reichek N, Devereux RB. Left ventricular hypertrophy: relationship of anatomic, echocardiographic and electrocardiographic findings. *Circulation*. 1981;63:1391–8.
27. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2009;22:107–33.
28. Zou Y, Song L, Wang Z, Ma A, Liu T, Gu H, et al. Prevalence of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in China: A population-based echocardiographic analysis of 8080 adults. *Am J Med*. 2004;116:14–8.
29. Nistri S, Thiene G, Basso C, Corrado D, Vitolo A, Maron BJ. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in a young male military population. *Am J Cardiol* [Internet]. 2003;91(8):1021–3, A8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914903001322>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686356>
30. Ng CT, Chee TS, Ling LF, Lee YP, Ching CK, Chua TSJ, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy on an electrocardiogram-based pre-participation screening programme in a young male South-East Asian population: Results from the Singapore Armed Forces Electrocardiogram and Echocardiogram screening protocol. *Europace*. 2011;13(6):883–8.
31. Maron BJ, Mathenge R, Casey S a., Poliac LC, Longe TF. Clinical profile of hypertrophic cardiomyopathy identified de novo in rural communities. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(6):1590–5.
32. Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med*. 1998;339(6):364–9.
33. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*. 1989;80(3):564–72.

34. Maron BJ, Spirito P, Roman MJ, Paranicas M, Okin PM, Best LG, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a population-based sample of American Indians aged 51 to 77 years (the Strong Heart Study). *Am J Cardiol*. 2004;93(12):1510–4.
35. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults*. *Circulation* [Internet]. 1995;92(4):785–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641357> <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.92.4.785>
36. Wigle ED, Rakowski H, Kimball BP, Williams WG. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical spectrum and treatment. *Circulation*. 1995;92:1680–92.
37. Wigle ED. Cardiomyopathy: The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* [Internet]. 2001 Dec [cited 2015 Dec 2];86(6):709–14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1730029&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Van Driest SL, Ommen SR, Tajik a J, Gersh BJ, Ackerman MJ. Yield of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(6):739–44.
39. Morita H, Rehm HL, Menesses A, McDonough B, Roberts AE, Kucherlapati R, et al. Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;358(18):1899–908. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2752150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
40. Brito D, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Silva D, Diogo AN, Madeira H. Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: Genetic profile in a Portuguese population. *Rev Port Cardiol* [Internet]. 2012;31(9):577–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.repc.2011.12.020>
41. Lopes LR, Zekavati A, Syrris P, Hubank M, Giambartolomei C, Dalageorgou C, et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *J Med Genet*. 2013;50(4):228–39.
42. Kassem HS, Azer RS, Ayad MS, Moharem-Elgamal S, Magdy G, Elguindy A, et al. Early results of sarcomeric gene screening from the Egyptian national BA-HCM program. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(1):65–80.
43. Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Ruddy TD, Fulop J, Rakowski H, et al. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. *Prog Cardiovasc Dis* [Internet]. 1985 Jan [cited 2015 Dec 2];28(1):1–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3160067>

44. Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, Casey S a, Lesser JR, Losi M a, et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2003;348(4):295–303.
45. Maron MS, Olivotto I, Zenovich AG, Link MS, Pandian NG, Kuvin JT, et al. Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. *Circulation*. 2006;114(21):2232–9.
46. Elliott PM, Gimeno JR, Tomé MT, Shah J, Ward D, Thaman R, et al. Left ventricular outflow tract obstruction and sudden death risk in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2006;27(16):1933–41.
47. Shah JS, Esteban MTT, Thaman R, Sharma R, Mist B, Pantazis a, et al. Prevalence of exercise-induced left ventricular outflow tract obstruction in symptomatic patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 2008;94(10):1288–94.
48. O'Mahony C, Jichi F, Pavlou M, Monserrat L, Anastasakis A, Rapezzi C, et al. A novel clinical risk prediction model for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy (HCM risk-SCD). *Eur Heart J [Internet]*. 2014;35(30):2010–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126876>
49. Morrow a G, Reitz B a, Epstein SE, Henry WL, Conkle DM, Itscoitz SB, et al. Operative treatment in hypertrophic subaortic stenosis. Techniques, and the results of pre and postoperative assessments in 83 patients. *Circulation*. 1975;52(July):88–102.
50. Kindermann W, Scharhag J. Die physiologische Herzhypertrophie (Sportherz) [Internet]. *Deutsche zeitschrift für Sportmedizin*. 2014 [cited 2015 Dec 9]. p. 327–32. Available from: <http://www.zeitschrift-sportmedizin.de/en/articles-online/archiv-2014/heft-12/die-physiologische-herzhypertrophie-sportherz/>
51. Kindermann W, Dickhuth H, Nieß A, Röcker K, Urhausen A. Physiologische Anpassungen des Herz_Kreislauf-Systems an körperliche Belastung. 2. Auflage. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2007. 1-20 p.
52. Pelliccia A, Thompson PD. The genetics of left ventricular remodeling in competitive athletes. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2006;7(Lv):267–70.
53. Maron BJ, Pelliccia A. The heart of trained athletes: Cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation*. 2006;114(15):1633–44.
54. Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA, Spirito P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N Engl J Med*. 1991;324(5):295–301.
55. Pelliccia A, Culasso F, Di Paolo FM, Maron BJ. Physiologic left ventricular cavity dilatation in elite athletes. *Ann Intern Med*. 1999;130:23–31.
56. Ehsani AA, Hagberg JM, Hickson RC. Rapid changes in left ventricular dimensions and mass in response to physical conditioning and deconditioning. *Am J Cardiol*

- [Internet]. 1978;42(1):52–6. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T10-4C7V6WR-2JK/2/eca8332d50096a2a2c643a659b968d48>
57. Maron BJ, Pelliccia A, Spataro A, Granata M. Reduction in left ventricular wall thickness after deconditioning in highly trained Olympic athletes. *Br Heart J* [Internet]. 1993;69(2):125–8. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1024938&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 58. Pelliccia A, Maron BJ, Di Paolo FM, Biffi A, Quattrini FM, Pisicchio C, et al. Prevalence and clinical significance of left atrial remodeling in competitive athletes. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(4):690–6.
 59. Maron BJ, Pelliccia A, Spirito P. Cardiac disease in young trained athletes. Insights into methods for distinguishing athlete’s heart from structural heart disease, with particular emphasis on hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* [Internet]. 1995 Mar 1 [cited 2015 Dec 11];91(5):1596–601. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7867202>
 60. Abdulla J, Nielsen JR. Is the risk of atrial fibrillation higher in athletes than in the general population? A systematic review and meta-analysis. *Europace* [Internet]. 2009;11(9):1156–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633305>
 61. Teramoto M, Bungum TJ. Mortality and longevity of elite athletes. *J Sci Med Sport* [Internet]. 2010;13(4):410–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2009.04.010>
 62. Marijon E, Tafflet M, Antero-Jacquemin J, El Helou N, Berthelot G, Celermajer DS, et al. Mortality of French participants in the Tour de France (1947-2012). *Eur Heart J*. 2013;34(40):3145–50.
 63. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *JAMA* [Internet]. 1996;276(3):199–204. Available from:
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=405465%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8667563>
 64. Corrado D, Basso C, Rizzoli G, Schiavon M, Thiene G. Does Sports Activity Enhance the Risk of Sudden Death in Adolescents and Young Adults? *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(11):1959–63.
 65. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
 66. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.

67. Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* [Internet]. 2015 Jun [cited 2015 Aug 12];101(12):921–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4484262&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
68. Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014 Jun 3 [cited 2016 Mar 3];63(21):2177–87. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109714011085>
69. BARTEL D. MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* [Internet]. Elsevier; 2004 Jan 23 [cited 2014 Jul 22];116(2):281–97. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867404000455/fulltext>
70. Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, et al. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* [Internet]. 2009;10:413. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2751786&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
71. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* [Internet]. 2012 Feb 3 [cited 2016 Jan 8];110(3):483–95. Available from: <http://circres.ahajournals.org/content/110/3/483.long>
72. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;(11 (3)):228–34.
73. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006;34(suppl_1):D140–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381832>
74. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* [Internet]. 2007;13(5):613–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468766>
75. Wang J, Yang X. The function of miRNA in cardiac hypertrophy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012. p. 3561–70.
76. Zhou M, Hara H, Dai Y, Mou L, Cooper DKC, Wu C, et al. Circulating organ-specific microRNAs serve as biomarkers in organ-specific diseases: Implications for organ allo- and xeno-transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016.
77. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source

- of biomarkers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011. p. 85–90.
78. Liu H, Gao Y, Song D, Liu T, Feng Y. Correlation between microRNA-421 expression level and prognosis of gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):15128–32.
 79. Lai N, Zhu H, Chen Y, Zhang S, Zhao X, Lin Y. Differential expression of microRNA-210 in gliomas of variable cell origin and correlation between increased expression levels and disease progression in astrocytic tumours. *Folia Neuropathol*. 2014;52(1):79–85.
 80. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;368(18):1685–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23534542>
 81. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* [Internet]. 2011 Oct 20 [cited 2016 Mar 24];478(7369):404–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3235584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 82. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* [Internet]. 1986;57(6):450–8. Available from: [http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed](http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&Cnid=2936235&Cnretmode=ref&Cncmd=prlinks&Cnpapers2://publication/uuid/0055DAB9-4A74-4C36-8A47-74D1ED9223C2)
 83. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* [Internet]. 2011;17(1):10. Available from: <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>
 84. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1).
 85. Friedländer MR, MacKowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(1):37–52.
 86. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* [Internet]. 2014;15(12):550. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8>

87. Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE. MicroRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: Potential markers of target-organ damage. *J Am Soc Hypertens*. 2014;8(6):368–75.
88. Fang L, Ellims AH, Moore X, White DA, Taylor AJ, Chin-Dusting J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Transl Med*. 2015;13:314.
89. Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*. 2013. p. 1–12.
90. Seok HY, Chen J, Kataoka M, Huang ZP, Ding J, Yan J, et al. Loss of MicroRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2014;114(10):1585–95.
91. Coffey S, Williams MJ a, Phillips LV, Jones GT. Circulating microRNA Profiling Needs Further Refinement Before Clinical Use in Patients With Aortic Stenosis. *J Am Heart Assoc [Internet]*. 2015;4(8):e002150. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4599470&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
92. Coffey S, Williams MJA, Phillips LV, Galvin IF, Bunton RW, Jones GT. Integrated microRNA and messenger RNA analysis in aortic stenosis. *Sci Rep [Internet]*. 2016;6:36904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27876829%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5120312>
93. Marques FZ, Vizi D, Khammy O, Mariani JA, Kaye DM. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(8):1000–8.
94. Nadruz W. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens [Internet]*. 2015;29(1):1–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/jhh.2014.36>
95. McManus DD, Rong J, Huan T, Lacey S, Tanriverdi K, Munson PJ, et al. Messenger RNA and MicroRNA transcriptomic signatures of cardiometabolic risk factors. *BMC Genomics [Internet]*. 2017;18(1):139. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5299677/pdf/12864_2017_Article_3533.pdf%5Cnhttp://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3533-9
96. Frey N, Pieske B, Steven D, Tillmanns C, Baldus S. Kommentar zu den 2014 ESC-Guidelines zur Diagnostik und Therapie der hypertrophen Kardiomyopathie. *Kardiologie*. 2016;10:24–7.
97. Yan M, Chen C, Gong W, Yin Z, Zhou L, Chaugai S, et al. MiR-21-3p regulates cardiac hypertrophic response by targeting histone deacetylase-8. *Cardiovasc Res*. 2015;105(3):340–52.

98. Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, et al. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(6):650–9.
99. Luo P, He T, Jiang R, Li G. MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):1163–8.
100. Roncarati R, Viviani Anselmi C, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Da Costa Martins P, et al. Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(9):920–7.
101. Fernandes T, Baraúna VG, Negrão CE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(4):H543-52.
102. Nielsen S, Åkerström T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen BK, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One.* 2014;9(2).
103. Uhlemann M, Möbius-Winkler S, Fikenzer S, Adam J, Redlich M, Möhlenkamp S, et al. Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur J Prev Cardiol [Internet].* 2014;21(4):484–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150891>
104. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe S, Nishiga M, Usami S, et al. MicroRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. *Circ Res.* 2015;116(2):279–88.
105. Ikeda Y, Sato K, Pimentel DR, Sam F, Shaw RJ, Dyck JRB, et al. Cardiac-specific deletion of LKB1 leads to hypertrophy and dysfunction. *J Biol Chem.* 2009;284(51):35839–49.
106. Ma Z, Qi J, Meng S, Wen B, Zhang J. Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113(10):2473–86.
107. Ikeda M, Ide T, Fujino T, Matsuo Y, Arai S, Saku K, et al. The Akt-mTOR axis is a pivotal regulator of eccentric hypertrophy during volume overload. *Sci Rep.* 2015;5.
108. Yeh T-S, Hsu C-C, Yang S-C, Hsu M-C, Liu J-F. Angelica Sinensis promotes myotube hypertrophy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *BMC Complement Altern Med [Internet].* 2014;14(1):144. Available from: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-14-144>
109. Zhao QD, Viswanadhapalli S, Williams P, Shi Q, Tan C, Yi X, et al. NADPH oxidase 4

- induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NF- κ B signaling pathways. *Circulation*. 2015;131(7):643–55.
110. Xu L, Brink M. mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2016. p. 1894–903.
 111. Indolfi C, Curcio A. Stargazing microRNA maps a new miR-21 star for cardiac hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*. 2014. p. 1896–8.
 112. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2136–46.
 113. Huang Y, Wu D, Zhang X, Jiang M, Hu C, Lin J, et al. Cardiac-specific Traf2 overexpression enhances cardiac hypertrophy through activating AKT/GSK3 β signaling. *Gene*. 2014;536(2):225–31.
 114. Derda AA, Thum S, Lorenzen JM, Bavendiek U, Heineke J, Keyser B, et al. Blood-based microRNA signatures differentiate various forms of cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol*. 2015;196:115–22.
 115. Juzenas S, Venkatesh G, Hübenthal M, Hoepfner MP, Du ZG, Paulsen M, et al. A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(16):9290–301.
 116. Hübenthal M, Hemmrich-Stanisak G, Degenhardt F, Szymczak S, Du Z, Elsharawy A, et al. Sparse modeling reveals miRNA signatures for diagnostics of inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2015;10(10).
 117. Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F, Stähler C, Franke A, Hemmrich-Stanisak G, et al. Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Mult Scler J*. 2014;20(3):295–303.
 118. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39(2):207–11.
 119. Hironaka-Mitsubishi A, Matsuzaki J, Takahashi RU, Yoshida M, Nezu Y, Yamamoto Y, et al. A tissue microRNA signature that predicts the prognosis of breast cancer in young women. *PLoS One*. 2017;
 120. Xiong DD, Lv J, Wei KL, Feng ZB, Chen JT, Liu KC, et al. A nine-miRNA signature as a potential diagnostic marker for breast carcinoma: An integrated study of 1,110 cases. *Oncol Rep*. 2017;
 121. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Ter Maaten JM, Valente MAE, Liu LCY, et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2016;