Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Evaluation of diagnostic and prognostic value of microRNAs	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. C. Liebetrau Dr. J. S. Wolter	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2019 6. Veröffentlichungsdatum -- 7. Form der Publikation --
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Kerckhoff-Klinik GmbH Abt. Kardiologie Benekestrasse 2-8 61231 Bad Nauheim	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -- 10. Förderkennzeichen 81X2200202 11. Seitenzahl 9
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung Kapelle-Ufer 1, 10117 Berlin Hessisches Ministerium für Wissenschaft und Kunst; Rheinstraße 23-25, 65185 Wiesbaden	13. Literaturangaben 16 14. Tabellen 0 15. Abbildungen 0
16. Zusätzliche Angaben --	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Fördermittelmanagement des DZHK am MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN IN DER HELMHOLTZ-GEMEINSCHAFT, Berlin,	

18. Kurzfassung

Die CTEPH ist eine Komplikation der Lungenembolie und ist mit einer schlechten Prognose verbunden. Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung der Welt und einer der häufigsten Gründe eines Schlaganfalls. In den vergangenen Jahren wurde für eine ganze Reihe spezifischer miRNAs eine Rolle in der Pathogenese unterschiedlichster Erkrankungen beschrieben. MiRNAs beeinflussen die Rhythmusstabilität sowie ein vaskuläres Remodelling. Ziel der Kooperation war die Suche nach miRNAs, die mit CTEPH oder Vorhofflimmern assoziiert sind.

Im ersten Teil erfolgte ein Array-Screening beim Kooperationspartner in Lübeck. In einem weiteren Schritt wurden diese Ergebnisse in jeweils größeren Kohorten validiert.

In der CTEPH-Kohorte konnten 4 miRNAs als relevant identifiziert werden (miR-155, miR-532-3p, miR-885-5p, rno-miR-7); miR-532-3p und miR-885-5p waren durch Behandlung modifizierbar. Eine genaue Einordnung der Funktion in den Krankheitsprozess ist aktuell noch nicht möglich und bedarf weiterer Forschung.

In der VHF-Kohorte wurden durch das Array-Screening 3 miRNAs als relevant identifiziert. Zur Validierung wurden diese in einer größeren Vorhofflimmerkohorte gemessen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich von paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern. Ebenso konnte die Rezidivfreiheit nach Pulmonalvenenisolation nicht valide vorhergesagt werden. Einen signifikanten Unterschied zeigte jedoch die miR-16 beim Vergleich von Patienten mit Vorhofflimmern gegenüber der Kontrollgruppe. Bisher wurde kein klinischer Zusammenhang der miR-16 mit Vorhofflimmern publiziert, weshalb weitere Studien notwendig sind. Wünschenswert wäre die Nutzung dieser miRNAs als Screeningtool, z.B. nach kryptogenem Schlaganfall.

19. Schlagwörter Atrial fibrillation, CTEPH, pulmonary embolism, screening, miRNA, microRNA	
20. Verlag Noch nicht publiziert	21. Preis Noch nicht publiziert

Bad Nauheim, den 27/2/20

Prof. Dr. C. Liebetrau

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger:	Kerckhoff-Klinik GmbH Bad Nauheim
Projektleiter:	Prof. Dr. C. Liebetrau
Co-Projektleiter:	Dr. J. S. Wolter
Projekttitel:	Evaluation of diagnostic and prognostic value of microRNAs
Säule B – SE	DZHK B17-030 SE
Förderkennzeichen:	81X2200202
Laufzeit des Projektes:	01.01.2017 – 31.12.2019

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung,

Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) stellt eine mögliche Komplikation nach Lungenembolie (LE) dar. Die Entwicklung einer CTEPH ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Diese ist führend durch eine gestörte pulmonale Hämodynamik mit erhöhtem pulmonalarteriellen Druck (PA) sowie pulmonalvaskulären Widerstand (PVR) und dem resultierenden chronischen Rechtsherzversagen bedingt. Als humanes Modell für rechtventrikuläres (RV) Remodelling sowie reverses RV Remodelling bietet das Krankheitsbild CTEPH ein einzigartiges System zur Identifikation und Untersuchung von pathophysiologischen Mechanismen wie der adaptiven rechtventrikulären Hypertrophie, maladaptivem RV-Versagen sowie RV-Erholung nach therapeutischer Entlastung. In diesem Kontext können nicht-invasive Biomarker als Monitoringparameter untersucht werden. Aktuell stehen drei Behandlungsmöglichkeiten bei CTEPH zur Verfügung: ein operatives Vorgehen, die pulmonale Endarteriektomie (PEA), die pulmonale Ballonangioplastie (BPA) sowie eine medikamentöse Therapie. Durch eine erfolgreiche Behandlung kommt es üblicherweise zu einer Verbesserung der pulmonalen Hämodynamik, konsekutiven Rechtsherzentlastung und entsprechendem reversen Remodelling und Besserung der klinischen Symptomatik. Ziel des Projektes ist die Untersuchung von CTEPH-Patienten im Hinblick auf das Potential eines reversen Remodellings des RV. In diesem Rahmen sollen Micro-RNAs (miRNAs) als Biomarker identifiziert werden mit prognostischer Bedeutung hinsichtlich eines reversen RV Remodellings. Geplant ist ein miRNA-Screening in Serumproben von Patienten mit CTEPH vor und nach BPA Therapie.

Zweites Ziel des Projektes ist das Krankheitsbild Vorhofflimmern (VHF). Aktuell leiden ca. 6 Millionen Menschen in Europa unter VHF mit steigender Tendenz. Grundsätzlich bestehen 2 Therapieansätze, Rhythmus vs. Frequenzkontrolle. Das Erreichen einer Rhythmuskontrolle ist medikamentös oder interventionell mittel Pulmonalvenenisolation (PVI) möglich. Die langfristige Erfolgsrate zur Rhythmuskontrolle ist mit 50-70% verbesserungsfähig. Das aktuelle Projekt möchte das Potential von miRNAs als Biomarker u.a. zur Risikostratifizierung bei Patienten mit VHF untersuchen. Hier sollen miRNAs, die mit VHF assoziiert sind, in einem Screening identifiziert werden. In einem folgenden Schritt soll dann das Potential dieser miRNA bei Patienten, die eine PVI erhalten untersucht werden im Hinblick auf einen Benefit durch den invasiven Eingriff.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Das Projekt wurde im Rahmen der Säule B („Präklinische Forschung") des DZHKs durchgeführt, bei der die Finanzierung durch die flexiblen Mittel des DZHKs bei Beteiligung von mindestens zwei DZHK-Partnerstandorten bzw. einem DZHK-Partnerstandort mit einem nicht-DZHK-Partner erfolgt. Die entsprechenden Vorgaben wurden beachtet und das Projekt in Kooperation mit dem DZHK Standort Lübeck bearbeitet.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Für verschiedene Krankheitsentitäten wie beispielsweise spezifische Neoplasien, Herzinsuffizienz oder das Akute Koronarsyndrom konnte bereits der mögliche Nutzen von miRNAs als Biomarker in der Diagnose, Therapieplanung oder Risikoabschätzung gezeigt werden. Die Rolle von miRNAs bei den Krankheitsbildern CTEPH und VHF ist bisher nicht ausreichend untersucht. Insbesondere sind keine spezifischen miRNAs beschrieben, die sich als Biomarker für die Diagnose oder Prognoseabschätzung bei CTPEH und VHF bzw. als Prädiktor für ein reverses kardiales Remodelling nach erfolgreicher Behandlung etablieren konnten. Microarray Analysen stellen ein valides Werkzeug zur Identifikation von spezifischen miRNAs mit diagnostischem oder prognostischem Potential bei CTEPH und VHF dar. Ziel des Projektes war die Identifikation von miRNAs, die Informationen über den möglichen Erfolg der Behandlung bei CTEPH, insbesondere mittels BPA, oder Vorhofflimmern liefern. Hierzu erfolgte der Einschluss von Patienten, die an der Kerckhoff-Klinik im Rahmen der Diagnose CTEPH behandelt wurden oder die eine PVI erhielten. Blutproben wurden primär venös sowie pulmonal-arteriell und aus der Aorta gewonnen. Nach Zentrifugation wurden diese bei -80°C eingefroren und aufbewahrt.

Arbeitsplanung CTEPH:

Bei der geplanten Follow-up Untersuchung wurden hämodynamische Parameter und Informationen aus der Bildgebung genutzt, um den BPA-Therapieerfolg abzuschätzen mit besonderem Augenmerk auf einen Abfall des PA Druckes sowie Zeichen eines reversen RV Remodellings. Ein entsprechendes Ethikvotum für das Patientenregister lag bei Antragsstellung vor. Das Projekt wurde entsprechend der Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Patienten gaben nach entsprechender Aufklärung ein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

CTEPH-Patientenkohorte 1 – Identifikation: Um miRNA Profile zu identifizieren, die mit dem Vorliegen einer PA Hypertonie assoziiert sind, sollte ein miRNA-Screening in ausgewählten Patienten vor (n=20) und nach (n=20) erfolgreicher BPA Behandlung erfolgen.

Das Institut für Integrative und Experimentelle Genomik der Universität Lübeck stellte seine Expertise im Bereich der miRNA Messung im Rahmen einer DZHK *shared expertise* (SE063) zur Verfügung. Das geplante miRNA-Screening und die entsprechende Interpretation der Daten erfolgte im Labor des o.g. Institutes der Universität Lübeck. Die Blutproben wurden von der Kerckhoff-Klinik geliefert. Basierend auf publizierten Daten sollten neben dem hypothesenfreien Screening auch spezifische miRNAs (z.B. for Let-7b, miR-759, miR-1260, miR-602, miR-140-3p, miR-93, miR-133a, miR-21) in den Arraydaten evaluiert werden, die bereits im Zusammenhang z.B. mit CTEPH beschrieben wurden.

Hieraus folgt der *1. Meilenstein*: miRNA-Screening und Interpretation der Daten basierend auf der Patientenkohorte 1 – Identifikation.

CTEPH-Patientenkohorte 2 – Validierung: Nach Identifikation spezifischer differentiell regulierter miRNAs in der Patientenkohorte 1 sollten selektierte vielversprechende miRNAs hinsichtlich der Differenzierung und Vorhersage eines reversen RV Remodellings in 40 Patienten des Bad Nauheimer CTEPH Registers zu unterschiedlichen Zeitpunkten validiert werden.

Hieraus folgen der *2. Meilenstein* mit der Validierung der identifizierten miRNAs in der Patientenkohorte 2 sowie der *3. Meilenstein* mit der Korrelation dieser miRNA-Daten mit z.B. hämodynamischen Parametern.

Arbeitsplanung VHF:

Ein entsprechendes Ethikvotum für das Patientenregister lag bei Antragsstellung vor. Das Projekt wurde entsprechend der Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Patienten gaben nach entsprechender Aufklärung ein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

VHF Patientenkohorte 1 – Identifikation: Um spezifische miRNAs zu identifizieren, deren Expression mit VHF und möglicherweise einer erfolgreichen Behandlung mittels PVI assoziiert sind, sollte ein miRNA-Screening bei selektierten Patienten mit paroxysmalem oder persistierendem VHF erfolgen. Bei diesen Patienten sollte keine andere strukturelle Herzerkrankung vorliegen, beispielsweise durch Ausschluss einer relevanten Klappenerkrankung mittels Echokardiographie.

Das Institut für Integrative und Experimentelle Genomik der Universität Lübeck stellte seine Expertise im Bereich der miRNA Messung im Rahmen einer DZHK *shared expertise* (SE063) zur Verfügung. Das geplante miRNA-Screening und die entsprechende Interpretation der Daten erfolgte im Labor des o.g. Institutes der Universität Lübeck. Die Blutproben wurden von der Kerckhoff-Klinik geliefert. Basierend auf publizierten Daten sollten neben dem hypothesenfreien Screening auch spezifische miRNAs (z.B. für miR-1, miR 26, miR 29, miR 133, miR-150, miR 328, miR-429) in den Arraydaten evaluiert werden, die bereits im Zusammenhang mit VHF beschrieben wurden.

Hieraus folgt der *4. Meilenstein*: miRNA-Screening und Interpretation der Daten basierend auf der VHF Patientenkohorte 1 – Identifikation.

VHF Patientenkohorte 2 – Validierung: Nach Identifikation differentiell regulierter miRNAs im Kontext von VHF sollten spezifische miRNAs mit dem größten Potential in 200 Patienten des Bad Nauheimer PVI Registers validiert werden.

Hieraus folgt der *5. Meilenstein* mit der Validierung der identifizierten miRNAs in der Patientenkohorte 2.

Es gab keine Änderungen in der Planung und im grundsätzlichen Ablauf des Vorhabens. Aufgrund einer zeitlichen Verlängerung der Probenanalysen und Datenauswertungen wurde eine Verlängerung der Projektlaufzeit bis zum 31.12.2019 zum Erreichen des *5. Meilensteins* beantragt und bewilligt.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden, Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,

Die Frequenz der akuten LE wird in den USA mit 63000 Fällen pro Jahr angegeben, wobei wahrscheinlich eine große Zahl unerkannt bleibt[1,2]. Normalerweise wird der Thrombus absorbiert, ohne ungünstige Folgen für den Patienten. In bis zu 9% der Patienten kommt es jedoch zu einer unvollständigen Resolution des Thrombus, welche zu fibrotischen Veränderungen und einem steigenden vaskulären Widerstand im pulmonalen Gefäßbett führen kann[3]. Darüber hinaus existieren weitere Remodellingprozesse einschließlich dem Verschluss distaler Gefäße, Inflammationsreaktion und vaskulärem Remodelling bedingt durch Proliferation verschiedener Zellen wie Endothelzellen oder glatter Muskelzellen[4,5].

CTEPH ist ohne Therapie mit einer schlechten Prognose verbunden. Die Prognose ist mit dem initial gemessenen PA Druck assoziiert. Während Patienten mit initialen Werten von 31-40mmHg eine 5-Jahres-Überlebensrate von 40% haben, ist diese Überlebensrate bei einem Gradienten von mehr als 50mmHg nur noch 10%[6,7]. Eine chirurgische Therapie mittels PEA ist mit einer Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate auf 90% verbunden[3,8,9]. Vielversprechende Daten aus Studien mit MRT-Bildgebung zeigen ein reverses RV Remodelling und eine Normalisierung des PA Druckes nach PEA[12,13]. Bedingt durch die distale Lokalisierung von Stenosen sind nahezu 30% der Patienten nicht durch dieses chirurgische Verfahren therapierbar[10]. Bei diesen Patienten erscheint das Verfahren der pulmonalen Ballonangioplastie (BPA) eine mögliche Alternative mit vergleichbaren Ergebnissen in Relation zu Patienten, die mittels PEA behandelt wurden[11]. Bisher existieren keine klaren Empfehlungen, welche Patienten interventionell behandelt werden sollten[3].

Aktuelle Studien konnten einen Zusammenhang zwischen miRNA Expression und der Pathogenese der PA Hypertonie aufzeigen[14,15]. So legen aktuelle Daten eine Rolle der miR-759 im Polymorphismus des fibrinogen alpha Genes nahe, welches mit CTEPH assoziiert ist[15]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass 17 spezifische miRNAs an der Pathogenese der CTEPH beteiligt sind; so ist auch die Beteiligung von Let-7b an der Regulation der Endothelin-1 Expression beschrieben[16].

VHF ist eine häufige kardiale Rhythmusstörung. Neben dem Verhindern thromboembolischer Ereignisse ist ein langfristiges Ziel, einen stabilen Sinusrhythmus zu erreichen[1]. Insbesondere bei persistierendem VHF kommt es sowohl elektrisch als auch strukturell zu einem atrialen Remodelling[3]. Es existieren verschiedene therapeutische Ansätze, um einen stabilen Herzrhythmus zu erreichen. Dies ist einerseits medikamentös und andererseits interventionell mittels PVI möglich[1]. Entsprechend der aktuellen Empfehlungen der Fachgesellschaften steht die medikamentöse Therapie an erster Stelle, falls dies nicht erfolgreich ist, sollte eine PVI erwogen werden[1,4]. Die 5-Jahres-Erfolgsrate nach PVI wird mit ca. 50% beschrieben[2]. Auch wenn die Komplikationsrate bei der Durchführung einer PVI niedrig ist, drohen schwere Komplikationen wie eine Perikardtamponade oder ein Schlaganfall, so dass eine präzise Patientenselektion entscheidend ist[2,5]. Es konnte bereits für klinische und echokardiographische Parameter sowie Laborwerte gezeigt werden, dass diese helfen können den Erfolg einer PVI abzuschätzen[6].

In den vergangenen Jahren wurde für eine ganze Reihe spezifischer miRNAs eine Rolle in der Pathogenese unterschiedlichster Erkrankungen beschrieben[7-9]. MiRNAs beeinflussen die Rhythmusstabilität z.B. mittels Modulation von Ionenkanälen, Connexinen und Proteinen, die an entsprechenden Signalwegen beteiligt sind[10]. Beispielsweise zeigt die muskelassoziierte miR-1 eine relevante Relation zu dem Zielgen KCNJ2, welches einen Kaliumkanal codiert. Patienten mit persistierendem VHF zeigen eine geringe miR-1 Expression, während KCNJ2 hochreguliert ist und mit entsprechend höherer Dichte des Kaliumkanals und kürzerer Aktionspotentialzeit einhergeht[11]. Neben miR-1 ist auch für eine Reihe weiterer miRNAs wie

miR 26, miR 29, miR 133, miR-150, miR 328, miR-499 ein Zusammenhang mit dem Herzrhythmus beschrieben worden[12–16].

1. Jamieson S. Pulmonary Endaterectomy. *Curr Probl Surg.* 2000;36(3):165 – 252.
2. Sandler D a, Martin JF. Autopsy proven pulmonary embolism in hospital patients: are we detecting enough deep vein thrombosis? *J R Soc Med.* 1989;82:203–5.
3. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J.* 2015;37(1):67–119.
4. Yi ES, Kim H, Ahn H, et al. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(4 Pt 1):1577–86.
5. Galiè N, Kim NHS. Pulmonary microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(7):571–6.
6. Sutton GC, Hall RJ, Kerr IH. Clinical course and late prognosis of treated subacute massive, acute minor, and chronic pulmonary thromboembolism. *Br Heart J.* 1977;39:1135–42.
7. Tanabe N, Sugiura T, Tatsumi K. Recent progress in the diagnosis and management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Respir Investig.* 2013;51(3):134–46.
8. Mayer E, Jenkins D, Lindner J, et al. Surgical management and outcome of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: results from an international prospective registry. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;141:702–10.
9. Jamieson SW, Kapelanski DP, Sakakibara N, et al. Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1,500 cases. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(5):1457–62
10. Condliffe R, Kiely DG, Gibbs JSR, et al. Improved outcomes in medically and surgically treated chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(10):1122–7.
11. Inami T, Kataoka M, Shimura N, et al. Pressure-wire-guided percutaneous transluminal pulmonary angioplasty: a breakthrough in catheter-interventional therapy for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *JACC Cardiovasc Interv.* 2014;7(11):1297–306.
12. Rolf A, Rixe J, Kim WK, et al. Pulmonary vascular remodeling before and after pulmonary endarterectomy in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a cardiac magnetic resonance study. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2015;31:613–619..
13. Rolf A, Rixe J, Kim WK, et al. Right ventricular adaptation to pulmonary pressure load in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension before and after successful pulmonary endarterectomy--a cardiovascular magnetic resonance study. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2014;16(1):96.
14. Wang L, Guo L-J, Liu J, et al. MicroRNA expression profile of pulmonary artery smooth muscle cells and the effect of let-7d in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Pulm Circ.* 2013;3(3):654–64.
15. Chen Z, Nakajima T, Tanabe N, et al. Susceptibility to chronic thromboembolic pulmonary hypertension may be conferred by miR-759 via its targeted interaction with polymorphic fibrinogen alpha gene. *Hum Genet.* 2010;128(4):443–452.
16. Guo L, Yang Y, Liu J, et al. Differentially expressed plasma MicroRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *PLoS One.* 2014;9(6):1–11.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Eine Zusammenarbeit mit anderen Stellen erfolgte im Rahmen der *shared expertise* SE 063 mit dem Institut für Integrative und Experimentelle Genomik der Universität Lübeck wie im Text ausgeführt.

II. Eingehende Darstellung zu

1. der Verwendung der Zuwendung und den erzielten wissenschaftlich-techn. Ergebnissen im Einzelnen, mit Gegenüberstellung zu den ursprünglichen Zielen,

Die Pathophysiologie der CTEPH beinhaltet neben der thromboembolischen auch eine inflammatorische, fibrotische und neuroendokrine Komponente. Auch bei VHF sind eine Reihe unterschiedlicher Pathomechanismen beteiligt. MiRNAs sind auf posttranskriptionaler Ebene ubiquitär an der intrazellulären Prozessmodulation beteiligt und können somit als Marker für zahlreiche Signalprozesse dienen.

Im beschriebenen Projekt wurde das miRNA-Profil von Patienten mit einer CTEPH sowie von Patienten mit VHF in zwei Stufen evaluiert.

Patientenselektion und miRNA-Screening

Sowohl bei CTEPH als auch bei VHF erfolgte die Patientenselektion nach Projektplan (*Meilenstein 1 und 4*), basierend auf vordefinierten klinischen Kriterien. Sowohl das miRNA-Screening als auch die konsekutive Validierung konnten aus methodisch-technischer Sicht entsprechend der Projektplanung durchgeführt werden.

Die miRNA-Screening-Analyse erfolgte mit Hilfe von Microarrays. Die miRNA Expressionsdaten wurden mittels Quantil-Normalisierung (Bolstad, Bioinformatics (2003)) normalisiert. Die differentiell exprimierten miRNAs zwischen den drei Klassen wurde mittels linearer Modellierung mit dem limma Bioconductor-Paket für R (Ritchie, Nucleic Acids Research (2015)) ermittelt. Die erhaltenen p-Werte wurden nach Benjamini-Hochberg adjustiert. Nach der Adjustierung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Klassen identifiziert. Nachfolgend beispielhaft für CTEPH beschrieben wurden daraufhin basierend auf dem Screening 4 signifikante miRNAs (ohne Adjustierung) selektiert: hsa-miR-885-5p-002296, hsa-miR-155-002623, hsa-miR-532-3p-002355 und miR-7-001338. Kriterium für die Selektion waren hier ein Unterschied ($p<0.05$) der jeweiligen miRNA in der Expression zwischen Kontrollen ohne vorliegende CTEPH (basierend auf der Bad Nauheimer BioProspective Kohorte) und Patienten mit CTEPH zum Zeitpunkt vor Therapie (n=32 miRNAs). Zweites Kriterium war eine Assoziation mit der Therapie in der Gruppe der CTEPH-Patienten mit einer entsprechenden Änderung in der Expression ($p<0.05$) vor und nach BPA (n=12 miRNAs). Ergänzend erfolgte eine Literaturrecherche. Basierend auf diesen 3 Aspekten erfolgte dann die Auswahl der o.g. 4 miRNAs. Im nächsten Schritt erfolgte eine Messung dieser miRNAs mittels RT PCR in 62 CTEPH-Patienten vor und nach BPA Therapie (Standort Bad Nauheim) (*Meilenstein 2 und 3*).

CTEPH - miRNA-Screening und Validierung

Bei CTEPH wurde in einem ersten Schritt an 10 Patienten mit einem ausgeprägten Krankheitsbild ein breit angelegtes miRNA-Screening vor und nach Therapie durchgeführt, um somit Auffälligkeiten im Gesamtexpressionsmuster zu erfassen. MiRNAs, welche hier eine auffällige Expression zeigten, wurden in einem nächsten Schritt in der zum aktuellen Stand 62 Patienten umfassenden Gesamtkohorte (Standort Bad Nauheim) validiert. Konkret erfolgten die Analysen bei Patienten mit einer CTEPH, welche eine Therapie mittels pulmonaler BPA erhalten hatten, vor der Therapie und 6 Monate nach der Therapie.

Die Zielsetzung des Projektes bestand im besseren Verständnis pathophysiologischer Prozesse der CTEPH und der Evaluation von miRNAs als mögliche peritherapeutische Monitoringparameter.

Nach durchgeführtem Screening wurden 4 miRNAs als mögliche Ziele selektiert (miR-155, miR-532-3p, miR-885-5p, rno-miR-7) (*Meilenstein 1*).

In der Literatur wird eine Rolle der miRNA miR-155 im Bereich des kardialen Remodellings bzw. der Reaktion des Herzens auf Ischämie und intrakardiale Druckerhöhung beschrieben. Eine Minderexpression soll ein Remodelling, basierend auf Inflammation und Fibrose, reduzieren. Darüber hinaus ist eine prognostische Relevanz bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie beschrieben. Bei der CTEPH unterliegen insbesondere die rechtsseitigen Herzanteile einer deutlichen Druckbelastung und sowohl kardiales als auch vaskuläres Remodelling spielen eine zentrale Rolle. In unseren Messungen zeigte sich miR-

155 herunterreguliert. Dies erscheint als mögliche kardiale Reaktion auf die gestörte pulmonale Hämodynamik.

Die miRNA miR-532-3p wird als Promotor maligner Metastasierung bei hepatozellulären Karzinomen und Regulator (pro-)apoptotischer Prozesse beschrieben. Es existieren keine Daten zur Einordnung bei kardialen Erkrankungen.

Die miRNA miR-885-5p wird ebenfalls als Promotor für Zellproliferation bei malignen Erkrankungen beschrieben. In einer singulären Arbeit wurde eine veränderte Expression von miR-885-5p bei CTEPH-Patienten detektiert.

Für die miRNA miR-7 wird sowohl bei myokardialer Ischämie als auch bei anderen Kardiomyopathien eine veränderte Expression beschrieben. Eine Überexpression der miRNA scheint Schutzmechanismen des Herzens gegen pathologisches Myokardremodelling zu fördern. Die Rolle bei CTEPH ist bisher nicht untersucht. Eine veränderte Expression bei CTEPH erscheint jedoch als eine Folge der rechtskardialen Belastung bei gestörter pulmonaler Hämodynamik möglich.

Insgesamt beobachteten wir in unserer Kohorte eine Minderexpression der vier oben genannten miRNAs vor der BPA-Therapie. Wir interpretieren diese Veränderung als Reaktion auf die kardiale Belastung unter der CTEPH. Im Gegensatz zur miR-7 und miR-155 wurde die Expression von miR-532-3p und miR-885-5p durch die Behandlung modifiziert und war im Follow-up höher als vor der BPA-Therapie. In den Analysen zeigte sich keine klare Korrelation der miRNA-Expression mit den etablierten peritherapeutischen Monitoringparametern. Allerdings ist die Funktion der miRNAs als zelluläre Signalmodulatoren womöglich nicht unmittelbar in eine direkte Veränderung klinischer Parameter zu übersetzen und es bedarf weiterführender Analysen der dezidierten Signaltransduktionsmechanismen.

VHF - miRNA-Screening und Validierung

Bei VHF wurde bzgl. des Screenings nach möglichen spezifischen miRNAs ein analoges Vorgehen zu CTEPH gewählt (*Meilenstein 4*). Hier fand in einem ersten Schritt das miRNA-Screening an 35 Patienten (29 VHF-Patienten, 6 Kontrollpatienten) statt.

Im Microarray-Screening waren zu viele der microRNAs signifikant verändert. Daher erfolgte die Patienteneinteilung zum einen anhand des Krankheitsfortschritts (Kontrollgruppe vs. VHF, paroxysmales Vorhofflimmern vs. persistierendes Vorhofflimmern) sowie andererseits anhand des aktuellen Herzrhythmus (Sinusrhythmus vs. Vorhofflimmern). Nach der Patienteneinteilung in die genannten Gruppen zeigten sich zwischen 31 und 56 miRNAs signifikant verändert. Wenn sich ein signifikanter Unterschied einer spezifischen miRNA in mindestens zwei Vergleichen zeigte, wurde diese miRNA weiter analysiert. Insgesamt waren 17 miRNAs in mindestens 2 Vergleichen signifikant unterschiedlich. Zur weiteren Einschränkung wurden miRNAs, die CT-Werte über 45 aufwiesen, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Folglich wurden insgesamt 9 miRNAs (miR-16, miR-101, miR-130b, miR-181c, miR-181, miR-338, miR-432, miR-597, miR-642, miR-744) für eine weitere Laboranalyse ausgewählt.

Diese 9 miRNAs wurden technisch in den ursprünglichen 35 Patienten validiert (29 VHF-Patienten, 6 Kontrollpatienten). Hierbei zeigten sich insbesondere 3 miRNAs (miR-16, miR-101, miR-130) statistisch signifikant differentiell exprimiert und wurden selektiert. Anschließend erfolgte die klinische Validierung in der BioPVI-Kohorte.

Daten zu miR-16 sind zumeist zu Patienten mit einem B-Zell-Lymphom veröffentlicht. Bei dieser malignen Neubildung des lymphatischen Systems beeinflusst die miR-16 die Apoptose mittels BCL-2-Vermittlung. Zu kardialen Erkrankungen existieren bisher keine Veröffentlichungen.

Bisherige Veröffentlichungen zeigen eine Verbindung von Hypertrophie sowie kardialem Remodelling mit der miR-101. Eine Überexpression von miR-101 verhindert eine Hypertrophie sowie ein kardiales Remodelling.

Zu miR-131 existiert bisher nur eine sehr geringe Datenlage. Eine Verbindung zum Herzen konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

In der Auswertung aus der Validierungskohorte zeigte sich kein Unterschied der gemessenen miRNAs beim Vergleich von paroxysmalem gegenüber persistierendem Vorhofflimmern. Ebenso konnte die Rezidivfreiheit von Vorhofflimmern nicht vorhergesagt werden. Auffällig war jedoch ein signifikanter Unterschied für die miR-16 im Vergleich von Patienten mit Vorhofflimmern gegenüber der Kontrollgruppe.

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Laut Projektantrag umfasste die Förderung folgende Mittel: Personalausgaben, sächliche Verwaltungsausgaben. Die Mittel wurden entsprechend dem Budgetplan wie geplant eingesetzt.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Im Rahmen der präklinischen und klinischen Forschung werden ausgezeichnete wissenschaftliche Fähigkeiten, Fachkenntnisse und Infrastrukturen eines DZHK-Partners (z.B. als beteiligte *shared expertise*) bzw. eines nicht-DZHK-Partners zur Verfügung gestellt. In diesem Projekt wurde die *shared expertise* SE 063 des Institutes für Integrative und Experimentelle Genomik der Universität Lübeck im Rahmen des miRNA-Screenings genutzt. Die hierzu eingesetzten Bioproben wurden von der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim im Rahmen der entsprechenden Registerstudien beigetragen. Auch erfolgte die Validierung der entsprechend selektierten miRNAs via qPCR am Standort Bad Nauheim.

4. dem voraussichtlichen Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans mit Zeithorizont,

Die erzielten Ergebnisse sind die Grundlage für weitere (DZHK-) Projekte auf dem Gebiet der Krankheitsbilder CTEPH und VHF. Im Rahmen der bestehenden weitergeführten CTEPH- und VHF/PVI Patientenregister am Standort Bad Nauheim, die auch Teil des DZHK-Standortprojektes „Biomarker Research" sind, sind in einem nächsten Schritt weitere Validierungen in größeren Patientengruppen (Vergrößerung der Kontrollgruppe bei Vorhofflimmern) sowie der Transfer auf vergleichbare Patientengruppen vorgesehen, beispielsweise CTEPH-Patienten mit PEA-Behandlung.

Insbesondere die Ergebnisse der Vorhofflimmerkohorte könnten in neurologischen Patienten mit kryptogenem Schlaganfall re-evaluiert werden, um ein okkultes Vorhofflimmern zu

identifizieren. Dies könnte vor allem in Zusammenarbeit mit der AG Herz & Hirn der DGK erfolgen.

5. dem während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Es sind von dritter Seite keine Ergebnisse bekannt geworden, die wesentlichen Einfluss auf die Verwertung der Ergebnisse nehmen.

6. den erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses.

Die Publikation der Ergebnisse wird nach dezidierter Einordnung der Ergebnisse in den klinisch-wissenschaftlichen Gesamtkontext erfolgen. Es sind Vorstellungen der Daten auf internationalen Kongressen sowie mindestens eine gemeinschaftliche Publikation in einem internationalen begutachteten Journal vorgesehen. Erste Ergebnisse, basierend auf den identifizierten miRNAs bei CTEPH, wurden bei den DGK Herztagen 2019 der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vorgestellt (Kriechbaum et al., MicroRNA profile of patients undergoing balloon pulmonary angioplasty for inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Clin Res Cardiol 108, Suppl 2, Oct 2019*).

Bad Nauheim, den 27/2/20

Prof. Dr. C. Liebetrau