

Aus dem Bereich Pädiatrische Kardiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung von microRNA-Profilen im Myokard von Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern vor und nach Herz-Lungen-Maschine**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2017

vorgelegt von: Janine Mark  
geb. am: 01.03.1994 in Saarbrücken

## **I. Inhaltsverzeichnis**

|       |                                     |    |
|-------|-------------------------------------|----|
| I.    | Inhaltsverzeichnis                  | 2  |
| II.   | Abkürzungsverzeichnis               | 4  |
| III.  | Zusammenfassung                     | 6  |
|       | 1. Deutsch                          | 6  |
|       | 2. Englisch                         | 8  |
| IV.   | Einleitung                          | 9  |
| V.    | Methodik                            | 11 |
|       | 1. Patientenpopulation              | 11 |
|       | 2. Durchführung und Probengewinnung | 13 |
|       | 2.1.1. Myokardproben                | 13 |
|       | 2.1.2. Anästhesie                   | 13 |
|       | 2.1.3. Herz-Lungen-Maschine         | 14 |
|       | 3. Materialien                      | 15 |
|       | 4. RNA-Isolation                    | 19 |
|       | 5. miRNA Microarray                 | 20 |
|       | 6. RT-qPCR                          | 20 |
|       | 7. Signalweganalyse                 | 21 |
|       | 8. Validierung der Signalweganalyse | 22 |
|       | 9. Statistische Analyse             | 22 |
| VI.   | Ergebnisse                          | 24 |
|       | 1. Ergebnisse miRNA Microarray      | 24 |
|       | 2. Ergebnisse RT-qPCR               | 28 |
|       | 3. Ergebnisse Signalweganalyse      | 32 |
|       | 4. Ergebnisse Signalweg Validierung | 34 |
| VII.  | Diskussion                          | 36 |
| VIII. | Literaturangaben                    | 41 |
| IX.   | Danksagung                          | 48 |

|    |                             |    |
|----|-----------------------------|----|
| X. | Anhang                      | 49 |
| 1. | Patienteninformation        | 49 |
| 2. | Einwilligungserklärung      | 51 |
| 3. | Probenbegleitschein Myokard | 52 |
| 4. | KEGG Signalweganalyse       | 53 |

## **II. Abkürzungsverzeichnis**

|            |   |  |
|------------|---|--|
| AHF        | - | Angeborene Herzfehler                                    |
| ASD        | - | Vorhofseptumdefekt                                       |
| BTS        | - | Blalock-Taussig-Shunt                                    |
| CDKN1A     | - | Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A                     |
| CIP        | - | Calf Intestinal Phosphatase                              |
| CLS        | - | Capillary Leak Syndrome                                  |
| c-Myc      | - | v-Myc Avin Myelocytomastosis Viral Oncogene<br>Homologue |
| DMSO       | - | Dimethyl Sulfoxide                                       |
| EK         | - | Erythrozytenkonzentrat                                   |
| Elk1       | - | ETS Transkriptionsfaktor                                 |
| ESR1       | - | Östrogenrezeptor 1                                       |
| ETS1       | - | ETS Protoonkogen 1                                       |
| FC         | - | Fold Change  |
| FDR        | - | False Discovery Rate                                     |
| g          | - | Fallbeschleunigung [ $m/s^2$ ]                           |
| HLHS       | - | Hypoplastisches Linksherzsyndrom                         |
| HLM        | - | Herz-Lungen-Maschine                                     |
| HNF4A      | - | Hepatozytärer Kernfaktor 4 alpha                         |
| KEGG       | - | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes                  |
| KHK        | - | Koronare Herzkrankheit                                   |
| KRAS       | - | KRAS Protoonkogen  |
| $\mu$ l    | - | Mikroliter   |
| MGMT       | - | O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase                   |
| min        | - | Minute(n)  |
| miR, miRNA | - | microRNA   |
| mRNA       | - | messenger RNA  |
| ng         | - | Nanogramm  |
| nt         | - | Nukleotide   |
| NT-proBNP  | - | N-terminales pro brain natriuretisches Peptid            |
| Pat.       | - | Patient  |
| PCR        | - | Polymerase-Ketten-Reaktion                               |

|         |   |  |
|---------|---|--|
| PTEN    | - | Phosphatase and Tensin Homolog   |
| rpm     | - | Umdrehungen pro Minute   |
| RT-qPCR | - | Real Time - quantitative PCR   |
| SD      | - | Standardabweichung   |
| SERCA2a | - | ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum<br>Ca <sup>2+</sup> Transporting 2 |
| SOD2    | - | Superoxid Dismutase 2  |
| TAPVD   | - | Totale Lungenvenenfehleimündung  |
| TGA     | - | Transposition der großen Arterien  |
| Tri21   | - | Trisomie 21  |
| VSD     | - | Ventrikelseptumdefekt  |
| 3'UTR   | - | Untranslatierter Bereich am 3' Ende  |

### **III. Zusammenfassung**

#### **1. Deutsch**

Bei Neugeborenen und Kindern, die aufgrund ihres angeborenen Herzfehlers einer kardiochirurgischen Operation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bedürfen, birgt der operative Eingriff das Risiko einer erhöhten Mortalität aufgrund eines Myokardversagens. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind bisher weitestgehend unbekannt. Die erheblichen physiologischen Veränderungen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bewirken jedoch eine signifikante Änderung vieler molekularer Prozesse im Myokard. MicroRNAs können Veränderungen in diesen molekulargenetischen Prozessen unmittelbar anzeigen. Neueste Studien schreiben microRNAs eine zunehmende Bedeutung bei der Entstehung kongenitaler und erworbener kardiovaskulärer Erkrankungen zu. Darüber hinaus sind diese nicht kodierenden Sequenzen auch an der myokardialen Adaptation und dem Remodeling beteiligt. Inwieweit die Expression von microRNAs im Myokard von Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern im Zusammenhang mit diesen Prozessen steht, ist jedoch unbekannt. Daher ist das Ziel dieser Studie, die microRNA-Expression im Myokard von Neugeborenen und Kindern vor und nach kardiochirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine zu charakterisieren und zu vergleichen.

Diese Studie wird an insgesamt 14 Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern am Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführt. Hierzu wird von jedem Studienteilnehmer eine Myokardprobe aus dem rechten Vorhof jeweils vor Anschluss und nach Dekonnektion der Herz-Lungen-Maschine entnommen, aus denen die microRNA-Expression mittels Microarray und RT-qPCR analysiert wird. Außerdem wird eine Signalweg Analyse durchgeführt, um Signalwege und Zielgene der verändert exprimierten microRNAs zu identifizieren.

Die Auswertung mittels Microarray ergibt 90 microRNAs im Myokard, die nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine verändert exprimiert werden. Von diesen 90 microRNAs werden nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine 29 microRNAs vermehrt und 61 microRNAs vermindert exprimiert. Diese Ergebnisse können für sieben microRNAs (miR-210, miR-423, miR-143, miR-564, miR-770, miR-874, miR-93) mittels RT-qPCR bestätigt werden. Die von uns identifizierten Signalwege werden

u.a. mit dem kardiovaskulären System sowie der Differenzierung und Proliferation von Kardiomyozyten assoziiert.

Die Ergebnisse unserer Studie stützen also die Vermutung, dass microRNAs, neben den bereits bekannten kardiovaskulären Pathologien, auch Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene in Form von Hoch- oder Herunterregulierung anzeigen. Aufgrund der jedoch nur geringen Teilnehmerzahl und der heterogenen Patientengruppe sind weitere Studien notwendig, um genauere Aussagen über Auswirkungen der microRNA-Expressionsänderung im Myokard nach Herz-Lungen-Maschine treffen zu können.

## 2. Englisch

### **Differential expression of microRNAs following cardiopulmonary bypass in children with congenital heart diseases**

“Children with congenital heart defects (CHDs) are at high risk for myocardial failure after operative procedures with cardiopulmonary bypass (CPB). Recent studies suggest that microRNAs (miRNA) are involved in the development of CHDs and myocardial failure. Therefore, the aim of this study was to determine alterations in the miRNA profile in heart tissue after cardiac surgery using CPB. In total, 14 tissue samples from right atrium were collected from patients before and after connection of the CPB. SurePrint™ 8 × 60K Human v21 miRNA array and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) were employed to determine the miRNA expression profile from three patients before and after connection of the CPB. Enrichment analyses of altered miRNA expression were predicted using bioinformatic tools. According to miRNA array, a total of 90 miRNAs were significantly altered including 29 miRNAs with increased and 61 miRNAs with decreased expression after de-connection of CPB (n = 3) compared to before CPB (n = 3). Seven miRNAs had been validated using RT-qPCR in an independent cohort of 11 patients. Enrichment analyses applying the KEGG database displayed the highest correlation for signaling pathways, cellular community, cardiovascular disease and circulatory system.

Our result identified the overall changes of the miRNome in right atrium tissue of patients with CHDs after CPB. The differentially altered miRNAs lay a good foundation for further understanding of the molecular function of changed miRNAs in regulating CHDs and after CPB in particular.”<sup>1</sup>

## **IV. Einleitung**

Angeborene Herzfehler (AHF) zählen mit einer Prävalenz von 1% zu den häufigsten Organfehlbildungen bei Neugeborenen.<sup>2-6</sup> Komplexe Vitien bedürfen dabei häufig bereits im Neugeborenen- bzw. Säuglingsalter einer korrektiven oder palliativen Operation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM). Zwar hat sich das Langzeitüberleben dieser Patienten durch Fortschritte in Diagnostik und Therapie deutlich verbessert<sup>7-10</sup>, aber dennoch ist die Mortalität bei Neugeborenen nach kardiochirurgischen Eingriffen deutlich höher als bei Säuglingen und Kindern jenseits der Neonatalperiode.<sup>11,12</sup> Kardiochirurgische Korrekturen von AHF gelten auch heute noch als einer der Hauptgründe für eine erhöhte Sterblichkeit von Neugeborenen.<sup>13</sup> Obwohl der Zeitpunkt des kardiochirurgischen Eingriffes wegen erhöhter Mortalität in der neonatalen Phase als kritisch betrachtet werden muss, konnte in dieser Phase aber eine ausgeprägte proliferative und regenerative Fähigkeit des neonatalen Myokards nach Ischämie und Stresssituationen nachgewiesen werden.<sup>14-21</sup> Im Tiermodell wurde gezeigt, dass sich das neonatale Myokard nach einer Apex-Teilresektion vollständig und mit normaler systolischer Pumpfunktion nachbilden kann. Diese Proliferationsfähigkeit beschränkt sich jedoch auf eine kurze postnatale Periode und geht danach verloren.<sup>17</sup>

Die mit dem Einsatz der HLM assoziierten Risiken und Morbiditäten sind sowohl für Erwachsene als auch für Neugeborene und Kinder in zahlreichen Studien dokumentiert.<sup>22-25</sup> Insbesondere Faktoren wie die nicht-pulsatile Zirkulation der HLM während des kardiochirurgischen Eingriffes, die Hypothermie und Perfusion der Koronararterien mit kardioplegischer Lösung, aber auch die durch den Eingriff bedingten Verletzungen am Herzen selbst bergen das Risiko eines postoperativen Myokardversagens.<sup>13,22-26</sup> Die pathophysiologischen Prozesse der Adaptation und des Remodelings des neonatalen und kindlichen Myokards nach Stresssituationen und Ischämie sind bisher weitgehend ungeklärt. Deren Kenntnisse und ein besseres Verständnis der molekularen und genetischen Mechanismen bei AHF sind jedoch grundlegend für eine Verbesserung des Überlebens nach kardiochirurgischen Eingriffen unter Einsatz der HLM.

Neuere Studien an Erwachsenen weisen microRNAs (miRNAs, miRs) eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen zu.<sup>27,28</sup> Unter miRNAs versteht man etwa 21-24 nt lange, nicht-kodierende RNAs,

welche die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene regulieren und somit Einfluss auf die Proteinsynthese nehmen.<sup>29</sup> Im Zellkern wird zunächst durch die RNA-Polymerase II die primary-microRNA (= pri-miRNA) transkribiert. Durch Abspaltung von Nukleotiden durch die Proteine Drosha und DGCR8 entsteht aus der pri-miRNA die 60-80 nt lange precursor-microRNA (= pre-miRNA), welche sich in einer charakteristischen Haarnadelstruktur anlagert und schließlich durch Exportin-5 und Ran-GTP aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. Im Zytoplasma wird die bisher noch doppelsträngige pre-miRNA mittels Dicer in zwei Einzelstränge zerlegt, wovon ein Strang degradiert wird (miRNA\*). Der reife miRNA-Strang wird in den sogenannten RNA-induced silencing-complex (RISC) eingeschleust und bindet an die 3' UTR der mRNA. Ist die miRNA nur teilweise komplementär zur mRNA, wird die Translation lediglich gehemmt. Ist die miRNA jedoch nahezu vollständig komplementär zur mRNA, wird die jeweilige mRNA degradiert und es findet keine weitere Translation bzw. Proteinbiosynthese mehr statt.<sup>29-31</sup>

Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre liefern einen Überblick über die Biogenese und Funktionen der miRNAs<sup>29</sup>, aber auch über ihre Beteiligung an der Entstehung kongenitaler Herzvitien und ihr Potential als diagnostische Biomarker.<sup>32-35</sup> Zudem konnte ihre Bedeutung für Prozesse im Myokard, wie Zellproliferation, Angiogenese, Fibrosierung, oder Apoptose nachgewiesen werden.<sup>19,36-41</sup> Diese miRNA-regulierten Prozesse sind essentiell für ein kardiales Remodeling nach Ischämie.

Dennoch ist die Bedeutung von miRNAs im Myokard von Neugeborenen und Kindern mit AHF unter den pathophysiologischen Bedingungen der HLM unbekannt. Das Ziel dieser Studie ist es daher, die miRNA-Expression im Myokard von Neugeborenen und Kindern mit AHF vor und nach Einsatz der HLM zu charakterisieren. Hierbei soll der Einfluss der HLM auf die miRNA-Expression im neonatalen und kindlichen Myokard erarbeitet werden.<sup>1</sup>

## **V. Methodik**

Die NEOMY-Studie wurde von Februar 2015 bis Oktober 2016 als single-center Studie am Universitätsklinikum des Saarlandes unter Zustimmung der saarländischen Ethikkommission (Nr. 156/14) durchgeführt. Unterstützt wurde diese Studie sowohl vom Kompetenznetz Angeborene Herzfehler als auch von der Fördergemeinschaft Deutsche Kinderherzzentren e.V.. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Die Erziehungsberechtigten können nach vorheriger Aufklärung über das Ziel der Studie, aber auch über mögliche Risiken bei der Probengewinnung, durch eine schriftliche Einwilligung der Teilnahme zustimmen (siehe Anhang). Um den Datenschutz zu gewährleisten, werden alle Teilnehmer mit einem Code (HO-NYxxxx) pseudonymisiert.

### **1. Patientenpopulation**

Teilnehmer der Studie sind alle Kinder zwischen 0 und 18 Jahren, die im Rahmen ihres angeborenen Herzfehlers eine korrektive oder palliative Operation unter Einsatz der HLM benötigen und deren Erziehungsberechtigten einer Teilnahme schriftlich zustimmen (*Tabelle 1*).

Ausschlusskriterien sind bereits vorausgegangene Herzoperationen, die fehlende Einwilligung der Erziehungsberechtigten, intraoperative Komplikationen oder ein mögliches Risiko bei der Probenentnahme.

Tabelle 1: Übersicht über die klinischen Daten der Studienteilnehmer

| Pat. | Ge-<br>schlecht | Alter bei OP | Gewicht | Diagnose            | OP-Verfahren                          | Kranken-<br>haus-<br>aufenthalt |
|------|-----------------|--------------|---------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1    | m               | 0,5 Jahre    | 5,5 kg  | ASD II              | ASD-Verschluss                        | 12 Tage                         |
| 2    | w               | 0,9 Jahre    | 8,5 kg  | VSD                 | VSD-Verschluss                        | 10 Tage                         |
| 3    | w               | 10,4 Jahre   | 33,0 kg | VSD                 | VSD-Verschluss                        | 10 Tage                         |
| 4    | m               | 0,5 Jahre    | 5,2 kg  | Tri21, ASD II, VSD  | ASD-Verschluss                        | 11 Tage                         |
| 5    | w               | 2,0 Jahre    | 11,0 kg | ASD II              | ASD-Verschluss                        | 9 Tage                          |
| 6    | m               | 1,1 Jahre    | 9,4 kg  | Tri21, ASD I        | ASD-Verschluss                        | 12 Tage                         |
| 7    | w               | 1,0 Jahre    | 6,2 kg  | Tri21, VSD          | VSD-Verschluss                        | 13 Tage                         |
| 8    | m               | 5 Tage       | 3,3 kg  | HLHS                | Norwood-I mit BTS rechts              | 25 Tage                         |
| 9    | m               | 7 Tage       | 4,1 kg  | TGA                 | Switch-OP, ASD- und Ductus-Verschluss | 24 Tage                         |
| 10   | m               | 11 Tage      | 2,1 kg  | infrakardiale TAPVD | Korrektur der TAPVD                   | 54 Tage                         |
| 11   | m               | 1,2 Jahre    | 7,6 kg  | ASD II              | ASD-Verschluss                        | 8 Tage                          |
| 12   | m               | 1,7 Jahre    | 10,1 kg | ASD I mit MI II°    | ASD-Verschluss, Mitralklappenraffung  | 8 Tage                          |
| 13   | w               | 3,5 Jahre    | 13,0 kg | ASD II              | ASD-Verschluss                        | 7 Tage                          |
| 14   | w               | 1,4 Jahre    | 10,6 kg | ASD II              | ASD-Verschluss                        | 8 Tage                          |

Abkürzungen: m: männlich, w: weiblich, ASD II: Vorhofseptumdefekt vom Sekundum-Typ, VSD: Ventrikelseptumdefekt, Tri21: Trisomie 21, ASD I: Vorhofseptumdefekt vom Primum-Typ, HLHS: Hypoplastisches Linksherzsyndrom, BTS: Blalock-Taussig-Shunt, TGA: Transposition der großen Arterien, TAPVD: Totale Lungenvenenfehleimündung, MI II°: Mitralklappeninsuffizienz zweiten Grades

## **2. Durchführung und Probengewinnung**

### **2.1.1. Myokardproben**

Die Myokardproben werden jeweils aus dem rechten Vorhof bzw. aus dem rechten Herzhohr entnommen. Die erste Myokardprobe („vor HLM“) wird bei Anschluss der HLM, unmittelbar vor Kanülierung des rechten Vorhofes, asserviert. Hierzu wird ein kleines Stück Myokard mit einem Durchmesser von ca. 2 mm vom Operateur mit dem Skalpell abgetrennt. Die zweite Probe („nach HLM“) wird nach der Dekanülierung des Vorhofes in gleicher Vorgehensweise gewonnen.

Die Vorhofmyokardproben werden nach den Richtlinien der Biomaterialbank des Kompetenznetzes Angeborene Herzfehler e.V. für Asservierung von Myokardproben entnommen (<http://www.kompetenznetz-ahf.de/forschung/register-biobank/daten-und-proben/>) und dementsprechend innerhalb von 3 Minuten in ein extra dafür vorgesehenes Gefäß gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff (-180°C) gelagert. Für jede Myokardprobe wird ein zugehöriger Probenbegleitschein ausgefüllt (siehe Anhang).

### **2.1.2. Anästhesie**

Alle Patienten erhalten unmittelbar vor Narkoseeinleitung 0,1 mg/kg KG Midazolam über eine periphere Verweilkanüle. Nach Präoxygenierung mit 100% Sauerstoff wird die Anästhesie mit Fentanyl und Thiopental in titrierten Dosen eingeleitet und mit kontinuierlichen Gaben von Fentanyl und Midazolam aufrechterhalten. Zur Erleichterung der nasotrachealen Intubation mit einem Manschettentubus wird das Muskelrelaxans Atracurium verabreicht. Während der Anästhesie werden kontinuierlich Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), zentralvenöser Druck (ZVD), rektale Körpertemperatur und Urinausscheidung gemessen sowie ein EKG abgeleitet. Nach systemischer Heparinisierung durch intravenöse Bolusgabe werden die Aorta und der rechte Vorhof kanüliert.

### 2.1.3. Herz-Lungen-Maschine

Alle in der Studie berücksichtigten kinder-kardi-chirurgischen Eingriffe werden mit dem gleichen HLM-Model, Jostra HL20 von MAQUET, durchgeführt. Vor Kanülierung der Aorta und des Vorhofs wird die HLM mit einem für die Operation angeforderten Erythrozytenkonzentrat (EK) und einer Priming Solution aus Sterofundin ISO, Gelafundin, Ringer-Laktat und Tranexamsäure befüllt. Die Kardioplegie erfolgt nach Calafiore,<sup>42</sup> wobei die kardioplegische Lösung auf 8-10°C temperiert wird. Der Input, also die Substanzen, die intraoperativ in die HLM und damit auch in das Patientenblut gegeben werden, variiert von Patient zu Patient und hängt jeweils vom Operationsverfahren, als auch vom Operationsverlauf ab. *Tabelle 2* veranschaulicht die jeweiligen Perfusionsprotokolle.

*Tabelle 2: Übersicht über die Perfusionsprotokolle*

| Pat. | Perfusionszeit | Reperfusionszeit | Ischämie | Kreislaufstillstand | Niedrigste Körperkern-temperatur | Kardioplegie Gesamtvolumen |
|------|----------------|------------------|----------|---------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 1    | 45 min         | 23 min           | 14 min   | 0 min               | 35,1°C                           | 1,44 l                     |
| 2    | 41 min         | 0 min            | 24 min   | 0 min               | 34,4°C                           | 0,33 l                     |
| 3    | 82 min         | 27 min           | 51 min   | 0 min               | 34,0°C                           | 0,46 l                     |
| 4    | 79 min         | 35 min           | 40 min   | 0 min               | 29,4°C                           | 0,42 l                     |
| 5    | 32 min         | 0 min            | 14 min   | 0 min               | 34,8°C                           | 0,22 l                     |
| 6    | 63 min         | 20 min           | 32 min   | 0 min               | 33,9°C                           | 0,29 l                     |
| 7    | 87 min         | 26 min           | 54 min   | 4 min               | 31,8°C                           | 0,47 l                     |
| 8    | 136 min        | 72 min           | 38 min   | 20 min              | 24,2°C                           | 0,1 l                      |
| 9    | 112 min        | 50 min           | 51 min   | 13 min              | 24,0°C                           | 1,20 l                     |
| 10   | 124 min        | 58 min           | 49 min   | 13 min              | 22,7°C                           | 0,1 l                      |
| 11   | 34 min         | 9 min            | 17 min   | 0 min               | 34,5°C                           | 0,15 l                     |
| 12   | 41 min         | 11 min           | 28 min   | 0 min               | 32,8°C                           | 0,16 l                     |
| 13   | 24 min         | 7 min            | 10 min   | 0 min               | 34,8°C                           | 0,24 l                     |
| 14   | 23 min         | 11 min           | 8 min    | 0 min               | 35,0°C                           | 0,37 l                     |

*Abkürzungen: min: Minuten*

### **3. Materialien**

Alle für die Studie verwendeten Materialien sind in den untenstehenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Sets

| Set   | Hersteller                                   |
|---|--|
| Ambion® TURBO DNA-free™ DNase Set                             | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland    |
| Gene Expression Waschpuffer Set                               | Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland |
| RNA 6000 Nano Set   | Agilent Technologies, California, USA        |
| miRNeasy Mini Set   | Qiagen, Hilden, Deutschland                  |
| miScript miRNA Primer Assays<br>QuantiTect mRNA Primer Assays | Qiagen, Hilden, Deutschland                  |
| miScript II Reverse Transkriptase Set                         | Qiagen, Hilden, Deutschland                  |
| miScript SYBR Green PCR Set                                   | Qiagen, Hilden, Deutschland                  |
| SurePrint G3 Human V21 miRNA microarray                       | Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland |

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Einwegmaterialien

| Einwegmaterialien                             | Hersteller                                |
|---|---|
| Eppendorf PCR Gefäße 0.2ml                    | Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland      |
| Eppendorf PCR Gefäße 1.5ml                    | Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland      |
| Eppendorf PCR Gefäße 2.0ml                    | Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland      |
| MicroAmp™ 96-well optical adhesive film       | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| MicroAmp™ fast 8-tube strip                   | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| MicroAmp™ fast optical 96-well reaction plate | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| MicroAmp™ optical 8-cap strip                 | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Sterile Filterspitzen 10 µl                   | Sorenson BioScience, Inc, UT, USA         |
| Sterile Filterspitzen 1000 µ                  | Sorenson BioScience, Inc, UT, USA         |
| Sterile Filterspitzen 20 µl                   | Sorenson BioScience, Inc, UT, USA         |
| Sterile Filterspitzen 200µl                   | Sorenson BioScience, Inc, UT, USA         |
| QIAcube Reagenzgefäße 30ml                    | Qiagen, Hilden, Deutschland               |
| QIAcube Gestell für Reagenzgefäße             | Qiagen, Hilden, Deutschland               |
| QIAcube Rotoradapter (10 x 24)                | Qiagen, Hilden, Deutschland               |
| QIAcube Probengefäße 2 ml                     | Qiagen, Hilden, Deutschland               |
| QIAcube Filterspitzen 200µl                   | Qiagen, Hilden, Deutschland               |

Table 5: Übersicht über verwendete Apparaturen

| Apparaturen                                | Hersteller                                     |
|--|--|
| 2100 Bioanalyzer                           | Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland   |
| Bench-top Zentrifuge                       | Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland           |
| Bench-top Gefrierzentrifuge                | Eppendorf GmbH, Hamburg                        |
| Gefrierschrank - 20°C                      | Sanyo, Osaka, Japan                            |
| Gefrierschrank -70°C                       | Sanyo, Osaka, Japan                            |
| Hybridisationskammer                       | Agilent Technologies, Waldbronn                |
| Hybridisationsofen und Rotator             | Agilent Technologies, Waldbronn                |
| Microarray Scanner                         | Agilent Technologies, Waldbronn                |
| NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer         | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA   |
| Computer                                   | DELL, USA                                      |
| PipetmanGilson                             | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| StepOnePlus™ Real-Time PCR System          | Life Technologies, Darmstadt                   |
| TProfessionalbasicgradient 96 Thermocycler | Biometra GmbH, Göttingen                       |
| Tissue-Lyzer                               | Qiagen, Hilden, Deutschland                    |
| VacuumKonzentrator                         | Uniequip, Martinsried, Deutschland             |
| QIAcube Roboter                            | Qiagen, Hilden, Deutschland                    |
| QIAgility™                                 | Qiagen, Hilden, Deutschland                    |

Table 6: Übersicht über verwendete Softwares

| Software  | Herausgeber                               |
|---|---|
| Agilent 2100 Expert Software Version B.02.02              | Agilent Technologies, Inc., USA           |
| Agilent AGW Feature Extraction Software Version 10.10.1.1 | Agilent Technologies, Inc., USA           |
| Agilent Scan Control Software Version 8.5.1               | Agilent Technologies, Inc., USA           |
| R Software  | R Development Core Team                   |
| StepOnePlus™ Software Version 2.2.3                       | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |

Tabelle 7: Übersicht über verwendete online Softwares

| Online tools                 | Website   |
|------------------------------|---|
| DIANA-mirPath v.3.0 Software | <a href="http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/">http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/</a> <sup>43</sup>         |
| miRTargetLink Software       | <a href="https://mpd.bioinf.uni-sb.de/overview.html">https://mpd.bioinf.uni-sb.de/overview.html</a> <sup>44</sup> |

Tabelle 8: Übersicht über die im Rahmen der RT-qPCR verwendeten miScript Primersequenzen. Hersteller: Qiagen, Hilden, Deutschland.

| miRNA           | miScript Assay Sequenzen |
|-----------------|--------------------------|
| hsa-miR-328-5p  | GGGGGGGCAGGAGGGGCUCAGGG  |
| hsa-miR-4750-5p | CUCGGGCGGAGGUGGUUGAGUG   |
| hsa-miR-210-5p  | AGCCCCUGCCCACCGCACACUG   |
| hsa-miR-423-3p  | AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU  |
| hsa-miR-564     | AGGCACGGUGUCAGCAGGC      |
| hsa-miR-770-5p  | UCCAGUACCACGUGUCAGGGCCA  |
| hsa-miR-874-5p  | CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA   |
| hsa-miR-93-5p   | CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG  |
| hsa-miR-744-5p  | UGC GGGGCUAGGGCUAACAGCA  |
| hsa-miR-648     | AAGUGUGCAGGGCACUGGU      |
| hsa-miR-193b-3p | AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU   |
| hsa-miR-212-3p  | UACAGUCUCCAGUCACGGCC     |
| hsa-miR-143-3p  | UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC    |
| hsa-miR-222-3p  | AGCUACAUCUGGCUACUGGGU    |
| hsa-miR-423-3p  | AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU  |
| hsa-miR-766-3p  | ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC   |

*Tabelle 9: Übersicht über die im Rahmen der Signalwegvalidierung verwendeten QuantiTect Primersequenzen. Hersteller: Qiagen, Hilden, Deutschland.*

| <b>mRNA</b> | <b>QuantiTect Primer Assay Sequenzen</b> |
|-------------|--|
| Hs_CDKN1A   | QT00062090                               |
| Hs_MYC_1    | QT00035406                               |
| Hs_PTEN_1   | QT00086933                               |
| Hs_ESR1     | QT00044492                               |
| Hs_ETS1_1   | QT00049133                               |
| Hs_SOD2_1   | QT01008693                               |
| Hs_MGMT_1   | QT01004416                               |
| Hs_KRAS_1   | QT00083622                               |
| Hs_HNF4A    | QT00019411                               |
| Hs_GAPDH    | QT00079247                               |

#### **4. RNA-Isolation**

Die RNA aus den Vorhofmyokardproben wird mit Hilfe des miRNeasy mini Sets nach Herstellerangaben isoliert. Die zuvor im Stickstofftank gelagerten Myokardproben werden durch Schneiden zerkleinert, in 700 µl Qiazol überführt und mit Hilfe einer 5 mm Stahlkugel im Tissue-Lyzer bei einer Frequenz von 50 Hz für 5 Minuten homogenisiert. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur werden 140 µl Chloroform hinzugefügt und das Gemisch 15 Sekunden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt. Zur Phasentrennung wird die Lösung bei 4°C zentrifugiert, wodurch sich 3 Phasen bilden: am Boden des Gefäßes die rötliche organische Phase, die die Proteine enthält, darüber die weißliche Interphase mit DNA und die klare wässrige Phase, welche die RNA enthält. Die wässrige Phase wird entnommen und die RNA daraus mittels QIAcube Roboter nach Herstellerangaben extrahiert. Konzentration und Reinheit der isolierten RNA werden mittels NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer gemessen. Die RNA Integrität wird mittels Agilent 2100 Bioanalyzer unter Verwendung des RNA 6000 Nano Sets von Agilent bewertet. Um eine Kontamination der Proben mit DNA auszuschließen, wird DNase I nach Herstellerangaben hinzugegeben.

## 5. miRNA Microarray

Die Microarray Analyse wird mittels SurePrint G3 Human miRNA r21 Array Set von Agilent nach Herstellerangaben durchgeführt. Die miRNA-Expression wird in jeweils 3 Myokardproben vor Anschluss und nach Dekanülierung von der HLM analysiert. Hierfür werden zunächst 100 ng der zuvor isolierten RNA auf ein Volumen von 2 µl eingestellt und im Anschluss durch Zugabe von 2 µl des folgenden Ansatzes dephosphoryliert: 0,5 µl Calf Intestinal Phosphatase (CIP), 1,1 µl nucleasefreies Wasser und 0,4 µl Calf Intestinal Phosphatase Puffer.

Nach Inkubation im Thermocycler für 30 Minuten bei 37°C werden 2,8 µl DMSO hinzugefügt und die Temperatur im Thermocycler wird für 5 min auf 99°C erhöht, damit die CIP inaktiviert und die RNA denaturiert wird. Danach werden die Proben in ein Eis-Wasserbad transferiert. Ein Ligations-Master-Mix wird aus 1 µl RNA Ligase Puffer, 3 µl Cyanin3-pCp und 0,5 µl RNA Ligase hergestellt und dann zu der denaturierten RNA gegeben. Zur Ligation werden Proben für 2 Stunden bei 16°C inkubiert. Anschließend werden die Proben in einer Vakuumzentrifuge bei 45°C vollständig getrocknet und auf die Hybridisierung vorbereitet, indem 17 µl nucleasefreies Wasser, 1 µl Hyb-Spike-In Lösung, 4,5 µl Blocking Agent und 22,5 µl Hi-RPM Hybridisation Puffer zugegeben werden. Nach Inkubation bei 100°C für 5 min werden die Proben erneut in ein Eis-Wasserbad transferiert, anschließend auf die Arrays aufgetragen und zur Hybridisierung für 20 Stunden bei 55°C und 20 rpm in der Hybridisierungskammer gelagert. Im nächsten Schritt werden die Arrays gewaschen, nach Herstellerangaben getrocknet und im Agilent G2565BA Scanner gescannt. Die Daten werden mit der Agilent AGW Feature Extraction Software Version 10.10.11 erhoben.

## 6. RT-qPCR

Die Ergebnisse der Microarray Analyse werden durch RT-qPCR (= reverse Transkription – quantitative Polymerasekettenreaktion) im ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System validiert. Jeweils 200 ng der isolierten RNA werden mit miScript HiSpec Puffer, miScript Reverse Transcriptase Mix und RNase freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl vermischt und zur cDNA Synthese für 60 min bei

37°C inkubiert. Danach wird die Temperatur für 5 min auf 95°C erhöht und die synthetisierte cDNA kann bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert werden.

Für die RT-qPCR wird die cDNA 1:10 verdünnt. Das PCR-Reaktionsagensatz wird im QIAgility™, einem System zur automatischen Pipettierung, gemischt und enthält jeweils 2 µl cDNA, 10 µl SYBR Green PCR MasterMix, 2 µl miScript Universal Primer, 4 µl RNase freies Wasser und 2 µl miScript Primer Assay.

Zur Validierung der Microarray Analyse der Myokardproben werden miScript Primer Assays für folgende neun microRNAs gewählt: miR-328-5p, miR-4750-5p, miR-210-5p, miR-423-3p, miR-143-3p, miR-564, miR-770-5p, miR-874-5p und miR-93-5p. RNU6B dient als endogene Kontrolle. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in *Tabelle 8* aufgeführt.

Die RT-qPCR wird mit dem fluoreszierenden Agensatz SYBR Green durchgeführt. SYBR Green bindet an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle und emittiert ein fluoreszierendes Signal einer bestimmten Wellenlänge, welches dann während der cDNA-Amplifizierung registriert wird. Das Emissionsmaximum von SYBR Green liegt zwischen 494 und 521 nm. Die Reaktion besteht aus insgesamt 40 Zyklen, wobei ein Zyklus jeweils folgende Phasen umfasst: Denaturierung (94°C für 15 Sekunden), Anlagerung (55°C für 30 Sekunden) und Extension (70°C für 30 Sekunden). Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen.

Die Daten werden mit der SDS Relative Quantification Software Version 2.3 analysiert.

## 7. Signalweganalyse

Eine KEGG (= Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Analyse wird mittels DIANA-mirPath v.3.0 Software<sup>43</sup> durchgeführt und basiert auf Zielgenen der DIANA-microT-CDS.<sup>43</sup> Zielgene mit einem Score >0,8 werden gesammelt, wobei aber hier von nur Zielgenen mit einem P-Wert <0,05 und einer false discovery rate (FDR) <0,05 auch beibehalten werden. Mit Hilfe der miRTargetLink Software wird der Einfluss der miRNAs auf die Zielgene bewertet.<sup>44</sup>

## 8. Validierung der Signalweganalyse

Zur Validierung der Signalweg Analyse wird eine RT-qPCR mit miRNAs und mRNAs durchgeführt. Hierzu werden jeweils 9 miRNA-Primer (miR-744-5p, miR-648, miR-193-3p, miR-212-3p, miR-143-3p, miR-93-5p, miR-222-3p, miR-423-3p und miR-766-3p) und 9 QuantiTect Primer für Zielgene (CDKN1A, MYC, PTEN, ESR1, ETS1, SOD2, MGMT, KRAS und HNF4A) verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in *Tabelle 8* und *Tabelle 9* aufgelistet.

Zur cDNA-Synthese werden 350 ng der zuvor isolierten RNA mit miScript HiSpec Puffer, miScript Reverse Transcriptase Mix und RNase freiem Wasser (miScript II Reverse Transcriptase Set) nach Herstellerangaben vermischt. Die aus diesem Prozess resultierende cDNA wird auf eine miRNA-Konzentration von 1,5 ng/μl und eine mRNA-Konzentration von 5 ng/μl verdünnt. Das PCR-Reaktionsagensatz wird analog zur oben beschriebenen miRNA-RT-qPCR (siehe 6. miRNA-RT-qPCR) im QIAgility™ pipettiert und zur RT-qPCR in das StepOnePlus™ Real-Time PCR System überführt. GAPDH und RNU6B werden als Referenzgene verwendet. Außerdem werden eine no-template control (NTC) und eine no-reverse transcriptase control (NRT) zugefügt.

## 9. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wird in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Keller vom Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die miRNA-Expression im Myokard vor und nach HLM wird mit der frei erhältlichen R Software (R Development Core Team, 2010) analysiert. Für die statistische Analyse der Microarray Daten wird eine vom Zentrum für Bioinformatik entwickelte Software verwendet.<sup>45–47</sup>

Die Unterschiede der miRNA-Expression in der RT-qPCR werden mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode nach Livak und Schmittgen<sup>48</sup> bestimmt. Hierzu wird für jede Probe ein Ct-Wert ermittelt.  $\Delta Ct$  ist die Differenz aus dem Ct-Wert der jeweiligen miRNA und dem Ct-Wert der endogenen Kontrolle (RNU6B), also:  $\Delta Ct = Ct_{(miRNA)} - Ct_{(RNU6B)}$ . Von allen  $\Delta Ct$ -Werten vor bzw. nach HLM wird der Mittelwert  $\bar{x}$  bestimmt.  $\Delta\Delta Ct$  errechnet sich dementsprechend folgendermaßen:  $\Delta\Delta Ct = \bar{x} (\Delta Ct_{(vor\ HLM)}) - \bar{x} (\Delta Ct_{(nach\ HLM)})$ . Abschließend wird der Fold Change (FC) aus  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  berechnet.

Es wird ein t-test für verbundene Stichproben durchgeführt, wobei  $P$ -Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant definiert werden.

## VI. Ergebnisse

### 1. Ergebnisse miRNA Microarray

Die miRNA-Expression im Vorhofmyokard von Kindern und Neugeborenen mit AHF wird vor und nach HLM bei insgesamt drei Patienten (n „vor HLM“ = 3 und n „nach HLM“ = 3) charakterisiert. Hierzu wird mittels SurePrint G3 miRNA Microarray die Expression von 2549 miRNAs analysiert. Die Ergebnisse dieser Microarray Analyse zeigen, dass die miRNA-Profile im Myokard nach Einsatz der HLM verändert sind. Von den 2549 analysierten miRNAs weisen insgesamt 90 miRNAs (2,94%) nach HLM einen signifikanten Unterschied mit einem P-Wert <0,05 auf. Von diesen 90 miRNAs werden 29 miRNAs nach HLM vermehrt exprimiert, während 61 miRNAs nach HLM vermindert exprimiert werden (*Tabelle 10*). Einen Fold Change <1.5 weisen 24 miRNAs auf, davon 8 nach HLM hochregulierte miRNAs und 16 nach HLM herunterregulierte miRNAs. Insgesamt zeigen 49 miRNAs einen Fold Change zwischen 1.50 und 1.99 auf und weitere 17 miRNAs, davon 6 hochregulierte und 11 herunterregulierte miRNAs, haben einen Fold Change >2. Für die 50 miRNAs mit der größten Varianz wird ein hierarchisches Cluster aufgestellt (*Abbildung 1*).

*Tabelle 10: Mittels Microarray identifizierte, signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs (P-Wert <0,05) im Vorhofmyokard von Neugeborenen und Kindern mit AHF nach HLM im Vergleich zu vor HLM. Die miRNAs, die mittels RT-qPCR validiert werden, sind fett markiert.*

| miRNA              | $\bar{X}$ vor HLM | $\bar{X}$ nach HLM | SD vor HLM | SD nach HLM | Fold change | Regulation | P-Wert |
|--------------------|-------------------|--------------------|------------|-------------|-------------|------------|--------|
| <b>miR-4750-5p</b> | 1,67              | 8,60               | 2,59       | 4,24        | 5,26        | Hoch       | 0,0399 |
| miR-6134           | 1,00              | 3,08               | 0,46       | 0,78        | 3,03        | Hoch       | 0,0215 |
| miR-6873-3p        | 2,49              | 6,29               | 0,29       | 1,31        | 2,50        | Hoch       | 0,0441 |
| miR-4747-5p        | 1,07              | 2,38               | 0,78       | 1,05        | 2,22        | Hoch       | 0,0151 |
| miR-5195-5p        | 1,48              | 3,04               | 0,49       | 0,91        | 2,04        | Hoch       | 0,0213 |
| miR-6074           | 1,50              | 3,00               | 1,14       | 1,52        | 2,00        | Hoch       | 0,0252 |
| miR-6751-3p        | 2,89              | 5,68               | 0,33       | 1,12        | 1,96        | Hoch       | 0,0323 |
| <b>miR-328-5p</b>  | 15,50             | 28,90              | 4,82       | 3,56        | 1,85        | Hoch       | 0,0263 |

## Ergebnisse

| miRNA             | $\bar{x}$ vor HLM | $\bar{x}$ nach HLM | SD vor HLM | SD nach HLM | Fold change | Regulation | P-Wert |
|-------------------|-------------------|--------------------|------------|-------------|-------------|------------|--------|
| miR-6792-5p       | 2,42              | 4,40               | 0,56       | 1,34        | 1,82        | Hoch       | 0,0485 |
| miR-4514          | 1,65              | 2,93               | 0,80       | 0,61        | 1,79        | Hoch       | 0,0333 |
| miR-4538          | 3,31              | 5,83               | 1,60       | 1,37        | 1,75        | Hoch       | 0,0033 |
| miR-6870-5p       | 2,31              | 3,91               | 1,63       | 1,88        | 1,69        | Hoch       | 0,0102 |
| miR-7156-5p       | 1,25              | 2,12               | 0,61       | 0,61        | 1,69        | Hoch       | 0,0300 |
| miR-4447          | 1,64              | 2,73               | 0,44       | 0,19        | 1,67        | Hoch       | 0,0369 |
| miR-6769b-5p      | 20,56             | 33,29              | 3,95       | 4,51        | 1,61        | Hoch       | 0,0442 |
| miR-7846-3p       | 5,11              | 8,12               | 1,69       | 2,65        | 1,59        | Hoch       | 0,0398 |
| miR-1261          | 1,90              | 2,98               | 1,58       | 2,01        | 1,56        | Hoch       | 0,0353 |
| miR-6740-5p       | 39,53             | 61,77              | 6,38       | 14,38       | 1,56        | Hoch       | 0,0489 |
| miR-6746-5p       | 3,75              | 5,79               | 1,03       | 1,20        | 1,54        | Hoch       | 0,0265 |
| miR-645           | 1,56              | 2,42               | 0,93       | 0,70        | 1,54        | Hoch       | 0,0455 |
| miR-2113          | 1,46              | 2,20               | 0,47       | 0,74        | 1,52        | Hoch       | 0,0437 |
| miR-497-3p        | 1,46              | 2,14               | 0,29       | 0,51        | 1,47        | Hoch       | 0,0280 |
| miR-648           | 1,64              | 2,39               | 0,55       | 0,44        | 1,47        | Hoch       | 0,0497 |
| miR-5088-5p       | 9,24              | 13,26              | 1,59       | 2,19        | 1,43        | Hoch       | 0,0379 |
| miR-3945          | 3,43              | 4,81               | 0,97       | 0,98        | 1,41        | Hoch       | 0,0342 |
| miR-4468          | 2,07              | 2,84               | 0,55       | 0,62        | 1,37        | Hoch       | 0,0289 |
| miR-1471          | 6,69              | 9,07               | 2,16       | 2,11        | 1,35        | Hoch       | 0,0464 |
| miR-5006-5p       | 21,99             | 28,90              | 2,45       | 3,83        | 1,32        | Hoch       | 0,0108 |
| miR-198           | 3,59              | 4,49               | 1,04       | 1,32        | 1,25        | Hoch       | 0,0404 |
| <b>miR-770-5p</b> | 9,59              | 3,17               | 1,11       | 1,81        | 3,03        | Herunter   | 0,0095 |
| miR-4261          | 35,83             | 14,45              | 1,98       | 7,10        | 2,48        | Herunter   | 0,0183 |
| <b>miR-874-5p</b> | 15,30             | 6,57               | 1,76       | 3,12        | 2,33        | Herunter   | 0,0102 |
| miR-550a-5p       | 5,57              | 2,44               | 1,67       | 1,10        | 2,29        | Herunter   | 0,0114 |
| miR-3651          | 53,15             | 23,24              | 5,23       | 9,24        | 2,29        | Herunter   | 0,0455 |
| miR-6865-3p       | 8,00              | 3,55               | 1,51       | 1,76        | 2,26        | Herunter   | 0,0108 |
| miR-222-3p        | 14,15             | 6,51               | 1,03       | 2,80        | 2,17        | Herunter   | 0,0308 |
| miR-3607-3p       | 8,69              | 4,10               | 0,70       | 1,25        | 2,12        | Herunter   | 0,0424 |
| miR-1304-3p       | 9,97              | 4,71               | 1,98       | 0,36        | 2,12        | Herunter   | 0,0469 |

## Ergebnisse

| miRNA             | $\bar{x}$ vor HLM | $\bar{x}$ nach HLM | SD vor HLM | SD nach HLM | Fold change | Regulation | P-Wert |
|-------------------|-------------------|--------------------|------------|-------------|-------------|------------|--------|
| miR-6508-5p       | 9,27              | 4,41               | 2,31       | 1,58        | 2,10        | Herunter   | 0,0358 |
| miR-6800-3p       | 10,18             | 5,06               | 2,12       | 2,07        | 2,01        | Herunter   | 0,0182 |
| miR-6861-3p       | 6,13              | 3,09               | 0,74       | 0,86        | 1,99        | Herunter   | 0,0139 |
| miR-212-3p        | 25,83             | 13,01              | 2,76       | 6,93        | 1,99        | Herunter   | 0,0294 |
| miR-6737-3p       | 11,31             | 5,76               | 2,96       | 1,67        | 1,96        | Herunter   | 0,0293 |
| miR-6820-5p       | 37,19             | 19,53              | 0,20       | 4,42        | 1,90        | Herunter   | 0,0238 |
| miR-6792-3p       | 6,60              | 3,47               | 1,06       | 1,47        | 1,90        | Herunter   | 0,0366 |
| miR-3616-3p       | 6,92              | 3,68               | 1,31       | 1,75        | 1,88        | Herunter   | 0,0082 |
| miR-3162-3p       | 10,75             | 5,79               | 2,89       | 2,53        | 1,86        | Herunter   | 0,0029 |
| <b>miR-423-3p</b> | 9,21              | 4,94               | 1,09       | 1,21        | 1,86        | Herunter   | 0,0056 |
| miR-5190          | 10,43             | 5,68               | 0,59       | 0,86        | 1,84        | Herunter   | 0,0172 |
| miR-4725-5p       | 8,95              | 4,90               | 1,35       | 2,34        | 1,83        | Herunter   | 0,0421 |
| miR-744-5p        | 9,67              | 5,32               | 1,56       | 1,98        | 1,82        | Herunter   | 0,0308 |
| miR-6829-5p       | 48,68             | 26,75              | 3,55       | 8,52        | 1,82        | Herunter   | 0,0360 |
| miR-6889-3p       | 8,18              | 4,51               | 1,73       | 1,02        | 1,82        | Herunter   | 0,0432 |
| miR-4433a-5p      | 8,38              | 4,62               | 2,04       | 1,02        | 1,81        | Herunter   | 0,0276 |
| miR-6813-3p       | 7,19              | 4,06               | 2,29       | 1,01        | 1,77        | Herunter   | 0,0343 |
| miR-4649-3p       | 9,50              | 5,47               | 3,12       | 2,42        | 1,74        | Herunter   | 0,0093 |
| miR-6763-3p       | 7,94              | 4,62               | 1,52       | 1,52        | 1,72        | Herunter   | 0,0434 |
| miR-532-3p        | 18,58             | 10,78              | 0,43       | 3,99        | 1,72        | Herunter   | 0,0487 |
| miR-6769a-5p      | 11,01             | 6,45               | 1,97       | 1,02        | 1,71        | Herunter   | 0,0219 |
| miR-193b-3p       | 74,91             | 43,92              | 26,81      | 34,56       | 1,71        | Herunter   | 0,0341 |
| miR-331-5p        | 2,64              | 1,58               | 0,28       | 0,62        | 1,67        | Herunter   | 0,0446 |
| miR-6858-3p       | 8,53              | 5,15               | 2,59       | 2,47        | 1,66        | Herunter   | 0,0017 |
| <b>miR-564</b>    | 17,68             | 10,75              | 2,27       | 3,32        | 1,65        | Herunter   | 0,0099 |
| miR-6723-5p       | 26,08             | 16,14              | 2,83       | 6,35        | 1,62        | Herunter   | 0,0352 |
| miR-28-3p         | 4,85              | 3,02               | 0,21       | 0,58        | 1,61        | Herunter   | 0,0187 |
| miR-339-3p        | 13,22             | 8,22               | 1,98       | 2,36        | 1,61        | Herunter   | 0,0275 |
| miR-23c           | 5,83              | 3,62               | 1,59       | 0,81        | 1,61        | Herunter   | 0,0378 |
| <b>miR-93-5p</b>  | 114,26            | 70,98              | 9,72       | 24,81       | 1,61        | Herunter   | 0,0488 |

## Ergebnisse

| miRNA             | $\bar{x}$ vor HLM | $\bar{x}$ nach HLM | SD vor HLM | SD nach HLM | Fold change | Regulation | P-Wert |
|-------------------|-------------------|--------------------|------------|-------------|-------------|------------|--------|
| miR-6752-3p       | 5,76              | 3,67               | 1,11       | 0,79        | 1,57        | Herunter   | 0,0329 |
| miR-766-3p        | 10,39             | 6,64               | 1,38       | 2,07        | 1,56        | Herunter   | 0,0125 |
| miR-1306-5p       | 4,68              | 3,05               | 0,44       | 0,67        | 1,54        | Herunter   | 0,0074 |
| miR-6798-3p       | 4,49              | 2,92               | 0,87       | 1,04        | 1,54        | Herunter   | 0,0141 |
| miR-664a-3p       | 17,21             | 11,20              | 1,39       | 3,72        | 1,54        | Herunter   | 0,0362 |
| miR-208a-5p       | 45,35             | 29,37              | 7,47       | 13,45       | 1,54        | Herunter   | 0,0450 |
| miR-6880-3p       | 6,55              | 4,43               | 2,43       | 1,74        | 1,48        | Herunter   | 0,0272 |
| <b>miR-143-3p</b> | 327,88            | 223,74             | 43,81      | 69,68       | 1,47        | Herunter   | 0,0425 |
| miR-624-5p        | 3,66              | 2,49               | 0,37       | 0,53        | 1,47        | Herunter   | 0,0447 |
| <b>miR-210-5p</b> | 4,05              | 2,86               | 0,41       | 0,39        | 1,42        | Herunter   | 0,0101 |
| miR-6073          | 5,18              | 3,67               | 1,17       | 1,43        | 1,41        | Herunter   | 0,0140 |
| miR-374c-5p       | 11,99             | 8,54               | 1,55       | 2,75        | 1,40        | Herunter   | 0,0378 |
| miR-4484          | 27,73             | 20,62              | 1,81       | 1,80        | 1,34        | Herunter   | 0,0000 |
| miR-4664-3p       | 5,01              | 3,75               | 0,50       | 0,61        | 1,34        | Herunter   | 0,0096 |
| miR-6731-3p       | 4,38              | 3,26               | 1,21       | 1,48        | 1,34        | Herunter   | 0,0399 |
| miR-4769-3p       | 6,46              | 5,11               | 1,50       | 1,35        | 1,26        | Herunter   | 0,0213 |
| miR-15a-3p        | 3,49              | 2,79               | 0,34       | 0,28        | 1,25        | Herunter   | 0,0114 |
| hsa-let-7a-3p     | 3,24              | 2,59               | 0,35       | 0,29        | 1,25        | Herunter   | 0,0172 |
| miR-26b-3p        | 3,15              | 2,54               | 0,72       | 0,55        | 1,24        | Herunter   | 0,0244 |
| miR-940           | 32,01             | 26,08              | 7,78       | 6,20        | 1,23        | Herunter   | 0,0218 |
| miR-3189-3p       | 3,61              | 3,01               | 0,44       | 0,33        | 1,20        | Herunter   | 0,0153 |
| miR-29a-5p        | 3,05              | 2,53               | 0,16       | 0,28        | 1,20        | Herunter   | 0,0166 |

Abkürzungen:  $\bar{x}$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung

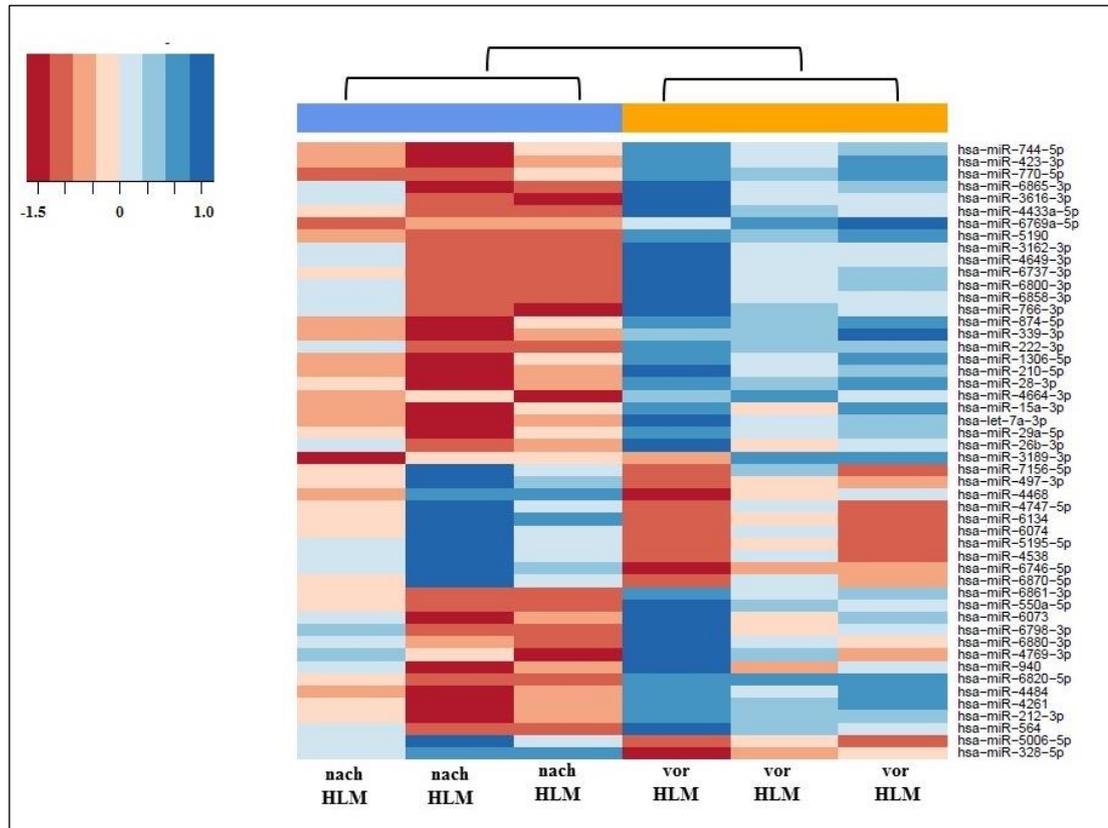
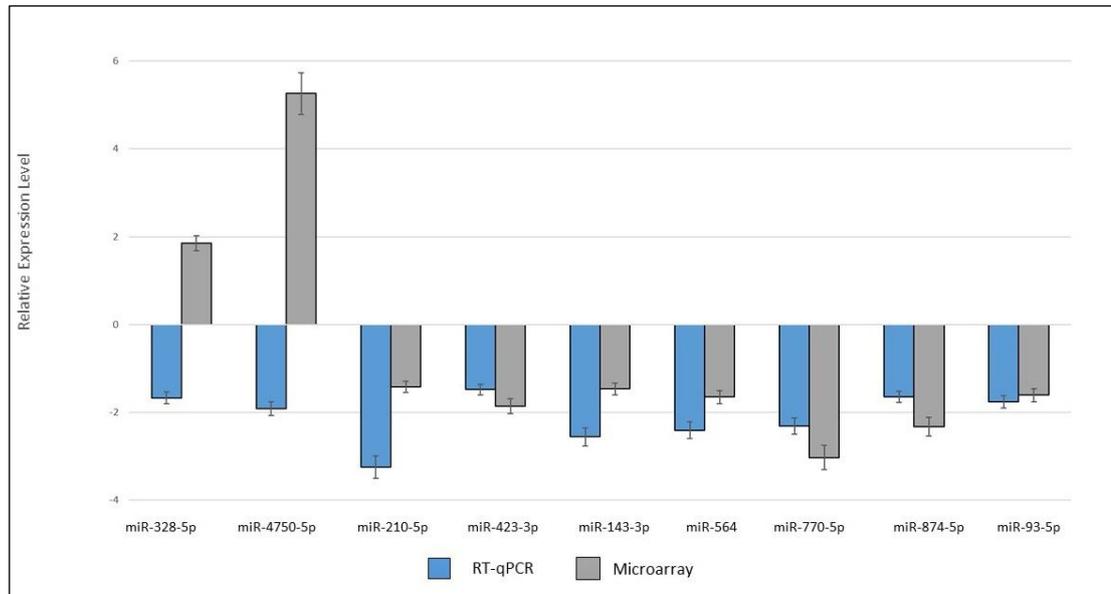


Abbildung 1: Cluster der mittels Microarray analysierten 50 miRNAs mit den größten Expressionsunterschieden nach HLM versus vor HLM ( $n_{\text{„vor HLM“}}=3$  und  $n_{\text{„nach HLM“}}=3$ ). Vermehrte Expression wird in Blau, verminderte Expression in Rot dargestellt.

## 2. Ergebnisse RT-qPCR

Um die Daten der Microarray Analyse zu bestätigen, werden insgesamt 9 miRNAs, miR-328-5p, miR-4750-5p, miR-210-5p, miR-423-3p, miR-143-3p, miR-564, miR-770-5p, miR-874-5p und miR-93-5p, mittels RT-qPCR validiert. Die RT-qPCR wird mit den Myokardproben von 11 neuen Studienteilnehmern durchgeführt ( $n_{\text{„vor HLM“}} = 11$  und  $n_{\text{„nach HLM“}} = 11$ ). Zur Validierung werden jeweils die miRNAs mit dem höchsten (miR-4750-5p bei den hochregulierten, miR-770-5p bei den herunter regulierten miRNAs) und einem mittleren (miR-328-5p bei den hochregulierten, miR-564 bei den herunter regulierten microRNAs) Fold Change ausgewählt. Außerdem werden sechs miRNAs (miR-328-5p, miR-210-5p, miR-423-3p, miR-143-3p, miR-874-5p und miR-93-5p) aufgrund ihrer bereits bekannten Assoziation zu kardiovaskulären

Erkrankungen zur Validierung ausgewählt.<sup>33,38,49–54</sup> Insgesamt zeigen sieben der oben genannten neun miRNAs die gleiche Expressionsrichtung wie im Microarray (miR-210-5p, miR-423-3p, miR-143-3p, miR-564, miR-770-5p, miR-874-5p und miR-93-5p, siehe *Abbildung 2*). Die Signifikanz dieser sieben miRNAs kann mit *P*-Werten <0,05 bestätigt werden (*Abbildung 3*).



*Abbildung 2: Vergleich der Expression von neun miRNAs analysiert mittels RT-qPCR (blau) versus analysiert mittels Microarray (grau). Sieben der neun ausgewählten miRNAs zeigen im Microarray und in der RT-qPCR die gleiche Expressionsrichtung.*

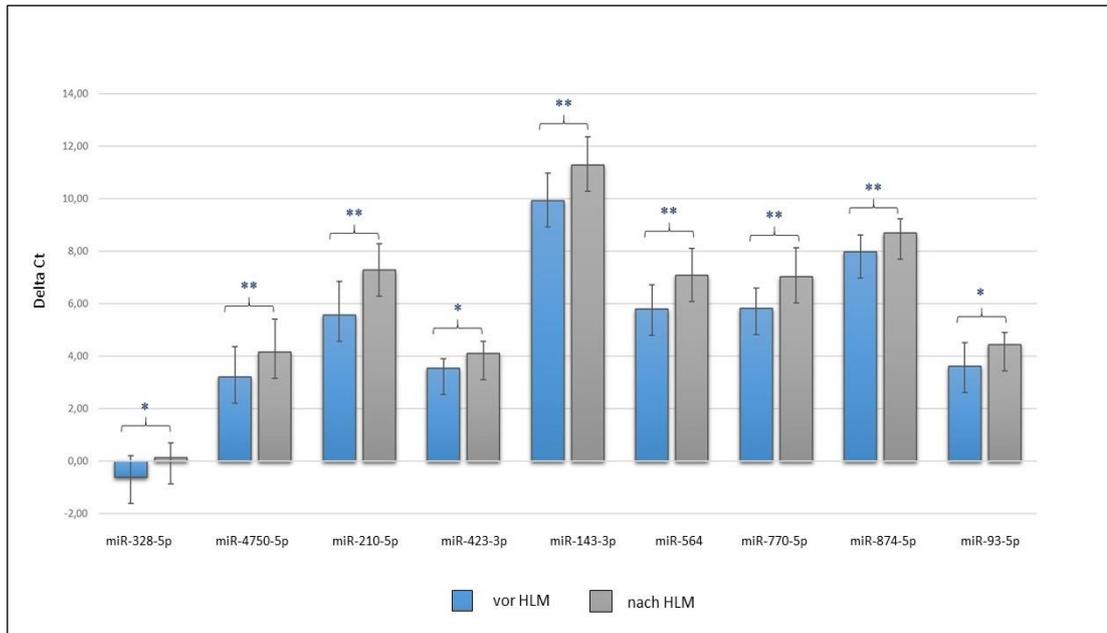


Abbildung 3: Vergleich der Expression von neun ausgewählten miRNAs im Myokard vor versus nach Einsatz der HLM analysiert mittels RT-qPCR. Zur Bestätigung der Signifikanz wird ein t-Test für verbundene Stichproben  $\pm$  SD durchgeführt. Für alle neun miRNAs kann ein signifikanter Unterschied mit P-Werten  $< 0.05$  bestätigt werden. Die Kennzeichnung \* zeigt einen signifikanten Unterschied an; \*\* bedeutet hochsignifikant.

In einem nächsten Schritt wird die Expression der oben genannten neun miRNAs bei Neugeborenen mit der Expression bei Kleinkindern und Kindern verglichen (Abbildung 4). Somit soll das Alter bei Korrekturoperation als möglicher Einflussfaktor auf die myokardiale miRNA-Expression erarbeitet werden.

Im neonatalen Myokard zeigt sich hierbei eine signifikant unterschiedliche Expression von miR-874-5p ( $P$ -Wert = 0,04) nach Einsatz der HLM. MiR-423-3p und miR-93-5p können mit  $P$ -Werten von 0,06 und 0,07 als grenzwertig beurteilt werden. Im Myokard von Kleinkindern und Kindern hingegen ist die Anzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs nach Einsatz der HLM deutlich höher. Insgesamt sechs miRNAs werden nach HLM verändert exprimiert, darunter miR-210-5p ( $P$ -Wert = 0,014), miR-423-3p ( $P$ -Wert = 0,034), miR-143-3p ( $P$ -Wert = 0,018), miR-564 ( $P$ -Wert = 0,024), miR-770-5p ( $P$ -Wert = 0,025) und miR-874-5p ( $P$ -Wert = 0,04). Abbildung 5 zeigt die relativen Expressionslevel ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) der neun analysierten miRNAs in Abhängigkeit vom Alter bei Operation.

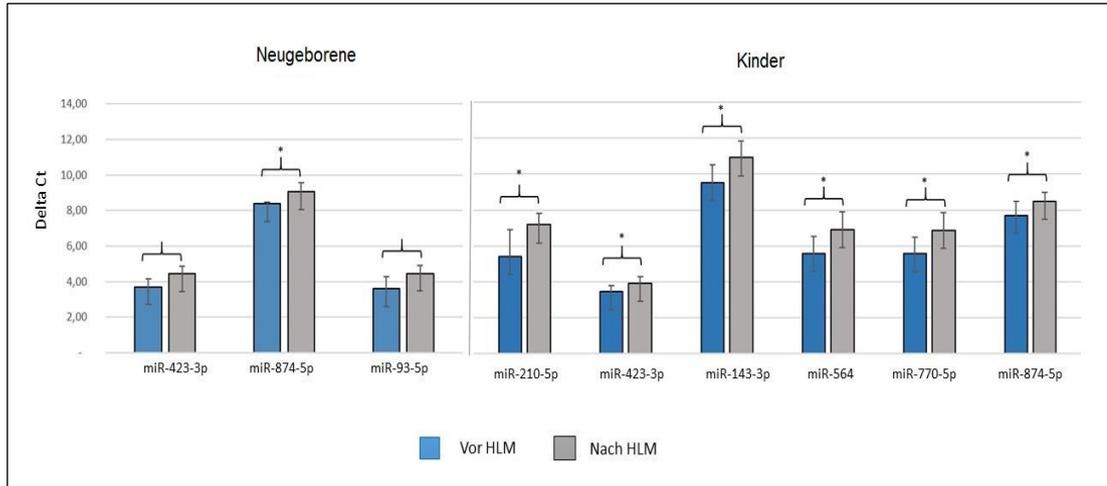


Abbildung 4: Vergleich der neonatalen und der kindlichen miRNA-Expression im Myokard nach Einsatz der HLM versus vor Einsatz der HLM. Die Kennzeichnung \* steht für eine signifikante miRNA-Expressionsänderung nach HLM (P-Wert <0.05). Zur statistischen Analyse wird ein t-Test für verbundene Stichproben  $\pm$  SD durchgeführt.

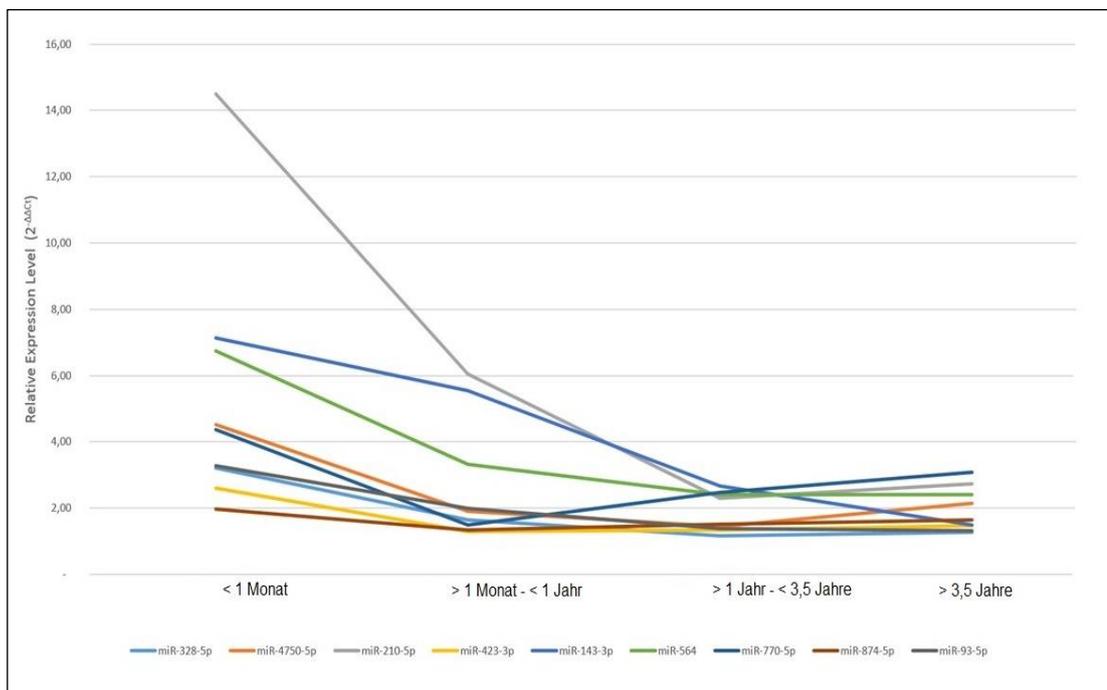


Abbildung 5: Einfluss des Alters bei Operation auf die Expression von neun ausgewählten miRNAs. Expressionslevel werden auf der y-Achse, das Alter zum Zeitpunkt der Operation auf der x-Achse dargestellt.

### 3. Ergebnisse Signalweganalyse

Mittels DIANA-mirPath algorithm wird eine Signalweganalyse durchgeführt, um Aussagen über die biologischen Funktionen und Signalwege der von uns analysierten miRNAs im Myokard von Neugeborenen und Kindern nach Einsatz der HLM treffen zu können. Hierfür werden die im Microarray herunterregulierten miRNAs ausgewählt. Für diese 61 miRNAs können 70 signifikant erhöhte KEGG Signalwege ( $P < 0,05$ ) mittels DIANA-mirPath algorithm identifiziert werden (siehe Anhang). Zielgene der im Myokard nach Einsatz der HLM herunterregulierten miRNAs werden u.a. mit Prozessen der Signaltransduktion und Zellinteraktion, aber auch mit dem Herz-Kreislauf-System und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (*Tabelle 11*). *Abbildung 6* zeigt die mittels miRTargetLink erstellte schematische Darstellung der Signalweganalyse.

*Tabelle 11: Signifikant erhöhte KEGG Signalwege für Zielgene der herunterregulierten miRNAs im Myokard nach Einsatz der HLM.*

|                           | KEGG Signalweg                 | P-Wert   | No. Zielgene | No. miRNAs |
|---------------------------|--------------------------------|----------|--------------|------------|
| <b>Signaltransduktion</b> | Hippo Signalweg                | 1,11E+05 | 114          | 70         |
|                           | Phosphatidylinositol Signalweg | 1,23E+06 | 66           | 63         |
|                           | TGF-beta Signalweg             | 3,29E+06 | 64           | 53         |
|                           | cGMP-PKG Signalweg             | 3,29E+06 | 128          | 74         |
|                           | FoxO Signalweg                 | 0,001    | 98           | 72         |
|                           | ErbB Signalweg                 | 0,0027   | 67           | 62         |
|                           | MAPK Signalweg                 | 0,003    | 179          | 77         |
|                           | Ras Signalweg                  | 0,0035   | 155          | 76         |
|                           | Sphingolipid Signalweg         | 0,0145   | 85           | 64         |
|                           | Calcium Signalweg              | 0,0174   | 124          | 71         |
|                           | AMPK Signalweg                 | 0,0189   | 86           | 67         |
|                           | cAMP Signalweg                 | 0,019    | 137          | 71         |
|                           | TNF Signalweg                  | 0,0229   | 76           | 63         |
|                           | Rap1 Signalweg                 | 0,0243   | 143          | 70         |

|   | KEGG Signalweg                                   | P-Wert   | No. Zielgene | No. miRNAs |
|---|--|----------|--------------|------------|
| <b>Kardiovaskuläre Erkrankungen und Herz-Kreislauf-System</b> | Adrenerger Signalweg in Kardiomyozyten           | 1,20E+06 | 112          | 71         |
|   | Dilatative Kardiomyopathie                       | 0,0154   | 65           | 57         |
|   | Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie | 0,0174   | 53           | 54         |
|   | Kontraktion glatter Gefäßmuskulzellen            | 0,0196   | 83           | 65         |
| <b>Cellular community</b>                                     | Adherens junction                                | 3,20E-03 | 56           | 58         |
|   | Fokale Adhäsion                                  | 0,0044   | 146          | 74         |
|   | Gap junction                                     | 0,0106   | 65           | 61         |
|   | Zelladhäsionsmoleküle                            | 0,0248   | 98           | 68         |

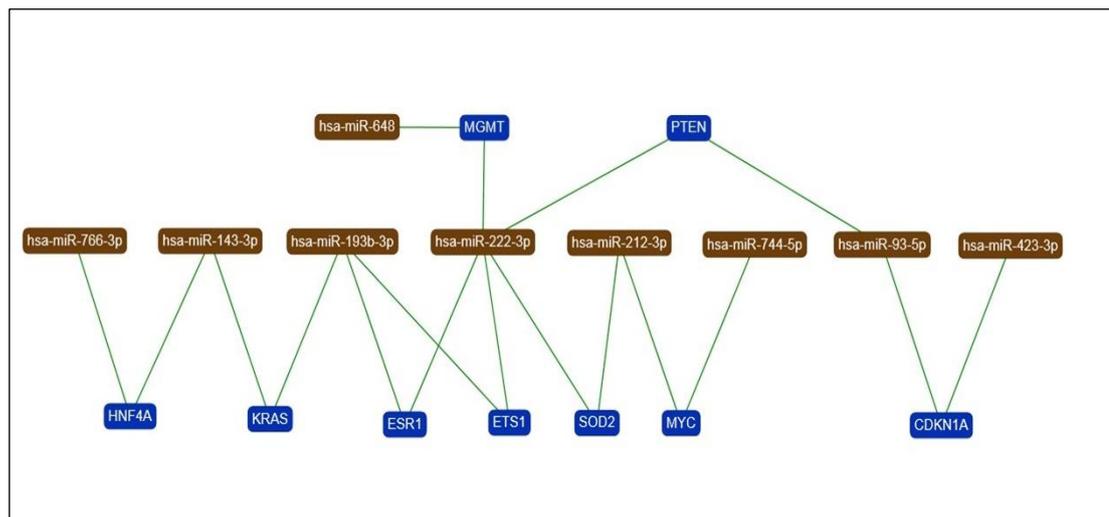


Abbildung 6: Netzwerk der nach Einsatz der HLM vermindert exprimierten miRNAs (braun) und deren zugehörige Zielgene (blau). Nur Zielgene zweier oder mehrerer miRNAs werden abgebildet. Die grüne Verbindungslinie zeigt eine starke Interaktion zwischen miRNAs und Zielgenen an.

#### 4. Ergebnisse Signalweg Validierung

Um die unterschiedliche Expression von miRNAs und deren Ziel-mRNAs im Myokard nach HLM im Vergleich zu vor HLM zu bestätigen, werden acht herunterregulierte miRNAs, eine hochregulierte miRNA sowie neun mRNAs mittels RT-qPCR validiert.

Mit Ausnahme von miR-222-3p zeigen alle miRNAs in der RT-qPCR die gleiche Expressionsänderung wie im Microarray (*Abbildung 7*). Von diesen insgesamt acht miRNAs mit gleicher Expressionsrichtung im Microarray und in der RT-qPCR wird nur eine miRNA, miR-648, nach HLM vermehrt exprimiert. Die restlichen sieben miRNAs (miR-744-5p, miR-193b-3p, miR-212-3p, miR-143-3p, miR93-5p, miR-423-3p und miR-766-3p) sind nach Einsatz der HLM herunterreguliert.

Die mRNA-RT-qPCR zeigt für sechs der neun analysierten mRNAs die zu erwartenden Expressionsänderungen. Für fünf herunterregulierte miRNAs werden die entsprechenden mRNAs vermehrt exprimiert, während die Ziel-mRNA für miR-222-3p (MGMT) herunterreguliert wird. Die Zielgene SOD2 und KRAS zeigen keine Expressionsänderung nach HLM im Vergleich zu vor HLM. Für HNF4A kann kein Fold Change ermittelt werden. Aufgrund der nur geringen Anzahl an Myokardproben kann die Signifikanz der von uns analysierten Expressionsänderungen nicht bestimmt werden.

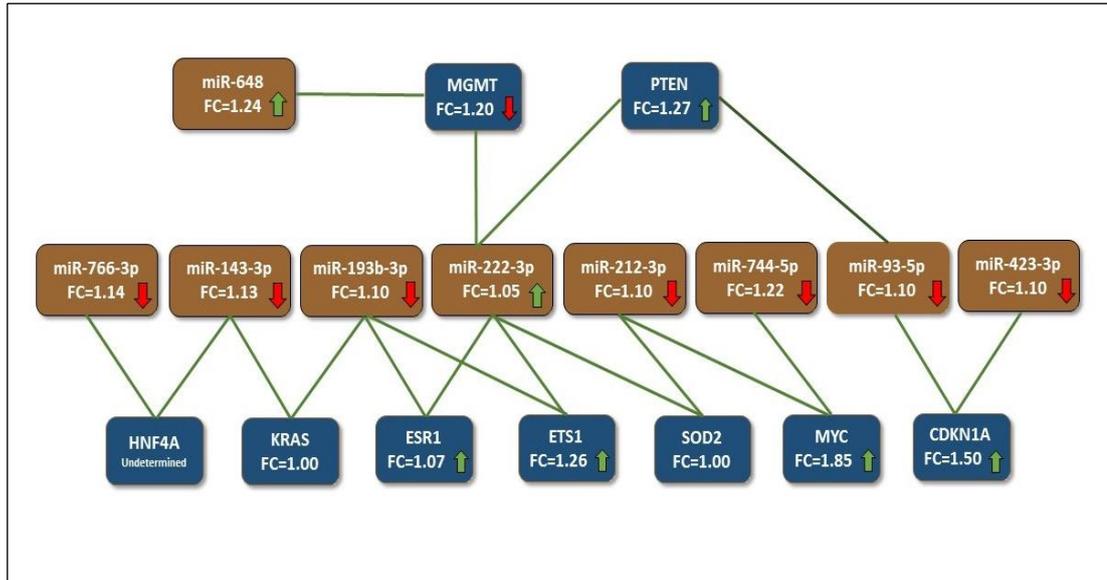


Abbildung 7: Validierung des Netzwerks aus miRNAs und Zielgenen mittels RT-qPCR. miRNAs werden in braun, Zielgene in blau dargestellt. Die grünen Pfeile zeigen eine vermehrte Expression nach HLM im Vergleich zu vor HLM, die roten Pfeile eine verminderte Expression. Zielgene ohne Kennzeichnung mittels Pfeil zeigen keine Expressionsänderung nach HLM im Vergleich zu vor HLM.

## **VII. Diskussion**

Diese Studie dient der Charakterisierung der miRNA-Expression im Myokard von Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern, die eines kardiochirurgischen Eingriffes unter Einsatz der HLM bedürfen. Die miRNA-Profile im Vorhofmyokard werden dazu vor und nach Einsatz der HLM charakterisiert und verglichen. Unsere Daten zeigen eine signifikante Veränderung der myokardialen miRNA-Expression nach Einsatz der HLM im Rahmen des kardiochirurgischen Eingriffes. Mittels Microarray können insgesamt 90 veränderte miRNAs nach HLM identifiziert werden. Von diesen 90 miRNAs werden 29 miRNAs vermehrt und 61 miRNAs vermindert exprimiert. Diese Ergebnisse werden für sieben miRNAs (miR-210-5p, miR-423-3p, miR-143-3p, miR-564, miR-770-5p, miR-874-5p und miR-93-5p) durch RT-qPCR validiert.

miRNAs, die in Kardiomyozyten oder glatten Muskelzellen exprimiert werden und Einfluss auf die physiologische Herzentwicklung und -funktion nehmen, werden als Myo-miRs bezeichnet.<sup>55</sup> Einige der von uns analysierten miRNAs und deren Zielgene sind in Prozesse wie kardiale Hypertrophie, Proliferation der Kardiomyozyten oder kardiale Kontraktilität involviert.<sup>33,56–58</sup> Zudem ist für einige miRNAs eine Beteiligung an der Entstehung angeborener Herzfehler bekannt.<sup>59</sup>

In unserer Studie wird miR-208a, ein Mitglied der miR-208-Familie, nach Einsatz der HLM vermindert im Vorhofmyokard exprimiert. Die gesamte miR-208-Familie ist essentiell für eine physiologische kardiale Erregungsleitung.<sup>55,60</sup> Sowohl eine vermehrte als auch eine verminderte Expression von miR-208 ist mit Arrhythmien<sup>61</sup> und mit Apoptose in ischämischen Kardiomyozyten assoziiert.<sup>62</sup> Herzrhythmusstörungen sind häufige Komplikationen nach kardiochirurgischen Eingriffen. Ob und inwiefern die Expressionsänderungen der miR-208-Familie dafür eine ursächliche Rolle spielen, ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu beurteilen.

MiR-143 reguliert die Morphologie der Kardiomyozyten und nimmt somit Einfluss auf die physiologische Formation und Funktion der Ventrikel.<sup>56</sup> Eine, wie auch in unserer Studie gezeigte, verminderte Expression von miR-143 kann sich demnach negativ auf die Zellmorphologie und Kontraktilität der Kardiomyozyten auswirken und ein Versagen der Ventrikel verursachen.<sup>56</sup> Als Zielgen für miR-143 kann der ETS Transkriptionsfaktor (Elk1) bestimmt werden, welcher die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen anregt.<sup>63</sup> Durch die Regulierung der Proliferation von glatten Gefäßmus-

kelzellen ist miR-143 auch mit der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie assoziiert.<sup>64</sup> Neben der Assoziation zu kardiovaskulären Pathologien kommt miR-143 auch noch eine Bedeutung als diagnostischer Biomarker, u.a. für Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, KHK oder Myokardinfarkt, zu.<sup>65</sup>

MiR-222 scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen zu nehmen.<sup>66</sup> Außerdem induziert miR-222 die Proliferation und Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten und inhibiert gleichzeitig die Einleitung von Apoptose nach Ischämie.<sup>57</sup> Eine Studie von Li *et al.* zeigt zudem eine verminderte Expression von miR-222 in Patienten mit ventrikulärem Septumdefekt im Vergleich zu gesunden Kontrollen.<sup>67</sup> Somit kann eine Beteiligung von miR-222 an der Entstehung kardialer Fehlbildungen diskutiert werden. Die Assoziation zu kardialen Pathologien kann auch in einer Studie von Zhang *et al.* bestätigt werden. MiR-222 wird im Myokard des rechtsventrikulären Ausflusstraktes von Patienten mit Trisomie 21 vermindert exprimiert.<sup>68</sup> Außerdem ist die Expression von miR-222 im Myokard von Patienten mit Mitralstenose aufgrund rheumatischen Fiebers verändert.<sup>69</sup> Neben miR-222 wird auch eine Vielzahl anderer, auch in unserer Studie identifizierter, miRNAs im Myokard von Patienten mit Mitralstenose aufgrund rheumatischen Fiebers verändert exprimiert, darunter miR-4484 und miR-940 im linken<sup>70</sup> sowie miR-23c und miR-5190 im rechten Herzohr.<sup>71</sup>

Bisherige Studien zeigen eher eine geringe Expression von miRNAs unter physiologischen Bedingungen und einen Anstieg der miRNA-Expression im Zusammenhang mit unterschiedlichen pathologischen Zuständen. Dementsprechend verhält sich auch die Expression der Kardiomyozyten-spezifischen miRNA miR-212. Diese miRNA wird bei Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert und induziert die Entstehung einer myokardialen Hypertrophie.<sup>58</sup> Zudem vermindert miR-212 die Expression des Transkriptionsfaktors FoxO3, der normalerweise in Kardiomyozyten antihypertroph und proautophagisch wirkt.<sup>58,70</sup> Eine, wie in unserer Studie gezeigte, verminderte Expression von miR-212 könnte demnach der Entstehung einer myokardialen Hypertrophie vorbeugen. MiR-212, miR-423 und miR-210 werden stark im fetalen Myokard exprimiert.<sup>70</sup> Darüber hinaus kann miR-423, neben miR-193b-3p und miR-550a-5p, als eine der veränderten miRNAs bei Herzinsuffizienz identifiziert<sup>72,73</sup> und als diagnostischer Biomarker bei Herzinsuffizienz suggeriert werden.<sup>74</sup> Außerdem korreliert die Expression von miR-423 mit dem Plasmaspiegel von NT-proBNP und

dem Schweregrad der Herzinsuffizienz bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie.<sup>74</sup>

Für miR-210 kann eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie zellulärer Hypoxie, Angiogenese und Apoptose erarbeitet werden<sup>72</sup> und auch miR-93 fördert die Angiogenese in ischämischem Gewebe über die Regulierung von Zellproliferation und Apoptose.<sup>75</sup>

Die Expression von miR-328 und miR-874 in Blutzellen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist signifikant höher als in gesunden Kontrollgruppen.<sup>76-78</sup> Die vermehrte Expression von miR-328 unterdrückt SERCA2a (ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Transporting 2) in den Kardiomyozyten und induziert die Entstehung kardialer Hypertrophie.<sup>33</sup> Eine miR-328-Antagonisierung kann also als Therapieansatz für die kardiale Hypertrophie diskutiert werden.<sup>33</sup> Darüber hinaus wird miR-328 im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern vermehrt exprimiert.<sup>79</sup>

Die Ergebnisse unsere Studie zeigen einen bemerkenswerten Unterschied zwischen der neonatalen und der kindlichen miRNA-Expression im Myokard nach Einsatz der HLM auf. Das Alter zum Zeitpunkt der Korrekturoperation scheint also Einfluss auf die myokardiale miRNA-Expression zu nehmen. Neonatale Kardiomyozyten besitzen eine ausgeprägte Proliferations- und Regenerationskapazität nach Ischämie.<sup>14-21</sup> Die Fähigkeit zur Regeneration beruht unter anderem auf einer, im Vergleich zum adulten Myokard, höheren Anzahl von Stammzellen und angiogenetischen Zytokinen.<sup>14,15</sup> Auch miRNAs spielen nachweislich eine wichtige Rolle bei der Regeneration des neonatalen Myokards.<sup>18</sup> Dies bestärkt die Annahme, dass auch die von uns identifizierten miRNAs im neonatalen Myokard, insb. miR-874, im Zusammenhang mit der Proliferations- und Regenerationskapazität neonataler Kardiomyozyten stehen könnten. Wie genau miRNAs Einfluss auf diese Prozesse nehmen und welche Rolle die Änderung der myokardialen miRNA-Expression nach Einsatz der HLM spielt, bleibt anhand der bisher erhobenen Daten jedoch noch ungeklärt.

Die durchgeführte DIANA-mirPath Analyse ergibt mehrere KEGG Signalwege für die im Myokard vermindert exprimierten miRNAs nach Einsatz der HLM. Die identifizierten Signalwege stehen in Beziehung zum kardiovaskulären System, zu glatten Gefäßmuskelzellen sowie zur Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Kardio-

myozyten.<sup>80–85</sup> Beispielsweise wird die Kardiomyozytenproliferation über den Hippo Signalweg reguliert.<sup>86,87</sup> Der ErbB Signalweg spielt in allen Stadien der Herzentwicklung eine wichtige Rolle und ist essentiell für die Entwicklung der physiologischen Herzmorphologie.<sup>88</sup> Die Ergebnisse der DIANA-miRPath Analyse bestärken unsere Annahme, dass miRNAs im Myokard, die nach Einsatz der HLM herunterreguliert sind, über die identifizierten Signalwege einen entscheidenden Einfluss auf die Herzfunktion nehmen. Auch die für die herunterregulierten miRNAs identifizierten Zielgene werden mit kardialen Pathologien assoziiert. Die Expression von MGMT und SOD2 ist bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz gesteigert.<sup>89,90</sup> Im Gegensatz dazu wirkt sich PTEN protektiv auf die Entstehung einer kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz aus und induziert die Regeneration von Kardiomyozyten.<sup>91–93</sup> Die Proliferation der Kardiomyozyten und Differenzierung während der fetalen Entwicklung wird außerdem von dem Transkriptionsfaktor c-Myc reguliert.<sup>94</sup>

### Limitation der Studie:

Limitierend muss angemerkt werden, dass die Anzahl der Studienteilnehmer gering ist und es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern handelt. Das Alter bei Korrekturoperation variiert von 5 Tagen bis 10,4 Jahre. Die angeborenen Herzfehler können nur schwer miteinander verglichen werden, weil deren Schwere von einem unkomplizierten ASD II bis hin zu einem komplexen HLHS reicht. Aufgrund der nur geringen Anzahl von 14 Studienteilnehmern erfolgt auch keine Unterscheidung hinsichtlich des Geschlechts. Trotzdem können in unserer Studie miRNAs identifiziert werden, die in dieser heterogenen Patientenpopulation eine veränderte myokardiale Expression aufweisen. Zudem sollte die Gewinnung der Myokardproben kritisch betrachtet werden. Alle für die Studie verwendeten Myokardproben stammen aus dem rechten Vorhof und werden unmittelbar vor Kanülierung und nach Dekanülierung des rechten Vorhofes asserviert. Zum Zeitpunkt der ersten Probengewinnung ist also bereits eine Sternotomie mit Eröffnung des Perikards erfolgt. Welchen Einfluss diese Manipulationen und die bereits im Rahmen der Anästhesie verabreichten Medikamente auf die miRNA-Expression im Myokard nehmen, bleibt ungeklärt. Das Myokard unterliegt während der Korrekturoperation unter Einsatz der HLM verschiedenen Stressfaktoren, wie Ischämie, Kühlung und Reperfusionsschädigung. Weitere Faktoren, wie die

durch den chirurgischen Eingriff bedingten Verletzungen am Herzen selbst, der Kontakt des Patientenblutes zu Fremdoberflächen, Spenderblut, und kardioplegischer Lösung, müssen neben dem Einfluss der HLM als Stressauslöser für die Veränderung der myokardialen miRNA-Expression bedacht werden. Eine Probengewinnung zu einem anderen Zeitpunkt des kardiochirurgischen Eingriffes oder aus den Ventrikeln oder dem linken Vorhof wurde nicht durchgeführt, da das Risiko für intraoperative Komplikationen als zu groß angesehen wurde.

Um präzisere Aussagen über die microRNA-Profile im Myokard von Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern vor und nach Einsatz der HLM treffen zu können, müssen zukünftig mehr Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Diese sollen dann je nach Alter, Diagnose und Geschlecht kategorisiert und miteinander verglichen werden. Hierzu soll die NEOMY-Studie in einer zweiten Phase auf weitere kinderherzchirurgische Zentren in Deutschland ausgeweitet werden. Trotz dieser Limitationen unterstreichen die Ergebnisse unserer Studie bereits jetzt die Vermutung, dass miRNAs im Zusammenhang mit Pathologien nach Einsatz der HLM stehen. Die Änderung der miRNA-Expression könnte demnach neue Einblicke in die molekularen Vorgänge und in die pathophysiologischen Bedingungen unter Einsatz der HLM liefern.

### Schlussfolgerung:

Der Einsatz der HLM bei kardiochirurgischen Korrekturingriffen angeborener Herzfehler bewirkt Änderungen der miRNA-Expression im Vorhofmyokard von Neugeborenen und Kindern. Die Ergebnisse dieser Studie bilden eine Grundlage für weitere Forschung bezüglich molekularer Funktionen der verändert exprimierten miRNAs sowie pathophysiologischer Veränderungen durch den Einsatz der HLM bei Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern.

## VIII. Literaturangaben

1. Abu-Halima, M. *et al.* Differential expression of microRNAs following cardiopulmonary bypass in children with congenital heart diseases. *J. Transl. Med.* **15**, 117 (2017).
2. van der Linde, D. *et al.* Birth Prevalence of Congenital Heart Disease Worldwide. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 2241–2247 (2011).
3. Wren, C., Richmond, S. & Donaldson, L. Temporal variability in birth prevalence of cardiovascular malformations. *Heart* **83**, 414–419 (2000).
4. Schwedler, G. *et al.* Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in Germany: A study of the competence network for congenital heart defects. *Clin. Res. Cardiol.* **100**, 1111–1117 (2011).
5. Lindinger, A., Schwedler, G. & Hense, H.-W. Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007). *Klin. Padiatr.* **222**, 321–326 (2010).
6. Hoffman, J. I. E., Hoffman, J. I. E., Kaplan, S. & Kaplan, S. The Incidence of Congenital Heart Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1890–900 (2002).
7. Gilboa, S. M., Salemi, J. L., Nembhard, W. N., Fixler, D. E. & Correa, A. Mortality resulting from congenital heart disease among children and adults in the United States, 1999 to 2006. *Circulation* (2010).
8. Erikssen, G. *et al.* Achievements in congenital heart defect surgery: A prospective, 40-year study of 7038 patients. *Circulation* **131**, 337–346 (2015).
9. Jones, B., Muscara, F., Lloyd, O., McKinlay, L. & Justo, R. Neurodevelopmental outcome following open heart surgery in infancy: 6-year follow-up. *Cardiol. Young* 1–8 (2014).
10. Raissadati, A., Nieminen, H., Jokinen, E. & Sairanen, H. Progress in late results among pediatric cardiac surgery patients: A population-based 6-decade study with 98% follow-up. *Circulation* **131**, 347–353 (2015).
11. Kumar, T. K. S. *et al.* Timing of neonatal cardiac surgery is not associated with perioperative outcomes. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **147**, 1573–1579 (2014).
12. Dollat, C. *et al.* Critical Congenital Heart Diseases in Preterm Neonates: Is Early Cardiac Surgery Quite Reasonable? *Pediatr. Cardiol.* 1279–1286 (2015).
13. Ades, A. M. *et al.* Morbidity and mortality after surgery for congenital cardiac disease in the infant born with low weight. *Cardiol. Young* **20**, 8–17 (2010).

14. Simpson, D. L. *et al.* A Strong Regenerative Ability of Cardiac Stem Cells Derived From Neonatal Hearts. *Circulation* **126**, S46–S53 (2012).
15. Jesty, S. A. *et al.* c-kit<sup>+</sup> precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13380–5 (2012).
16. Mahmoud, A. I. & Porrello, E. R. Turning back the cardiac regenerative clock: lessons from the neonate. *Trends Cardiovasc. Med.* **22**, 128–33 (2012).
17. Porrello, E. R. *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331**, 1078–1080 (2011).
18. Porrello, E. R. *et al.* Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 187–192 (2013).
19. Porrello, E. R. microRNAs in cardiac development and regeneration. *Clin. Sci.* **125**, 151–166 (2013).
20. Eulalio, A. *et al.* Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* **492**, 376–381 (2012).
21. Kikuchi, K. & Poss, K. D. Cardiac regenerative capacity and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 719–41 (2012).
22. Cheng, H. H. *et al.* Cerebral blood flow velocity and neurodevelopmental outcome in infants undergoing surgery for congenital heart disease. *Ann. Thorac. Surg.* **98**, 125–32 (2014).
23. Kang, N., Cole, T., Tsang, V., Elliott, M. & de Leval, M. Risk stratification in paediatric open-heart surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **26**, 3–11 (2004).
24. Kussman, B. D. *et al.* Relationship of intraoperative cerebral oxygen saturation to neurodevelopmental outcome and brain magnetic resonance imaging at 1 year of age in infants undergoing biventricular repair. *Circulation* **122**, 245–254 (2010).
25. Wypij, D. *et al.* The effect of duration of deep hypothermic circulatory arrest in infant heart surgery on late neurodevelopment: The Boston Circulatory Arrest Trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **126**, 1397–1403 (2003).
26. De Hert, S. & Moerman, A. Myocardial injury and protection related to cardiopulmonary bypass. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **29**, 137–149 (2015).
27. Creemers, E. E., Tijssen, A. J. & Pinto, Y. M. Circulating MicroRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation Research* **110**, 483–495 (2012).

28. Mishra, P. K., Tyagi, N., Kumar, M. & Tyagi, S. C. MicroRNAs as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 778–789 (2009).
29. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–97 (2004).
30. Pasquinelli, A. E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 271–282 (2012).
31. Finnegan, E. F. & Pasquinelli, A. E. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 51–68 (2013).
32. Xing, H.-J. *et al.* Identification of microRNAs present in congenital heart disease associated copy number variants. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 2114–20 (2013).
33. Li, C. *et al.* MicroRNA-328 as a regulator of cardiac hypertrophy. *Int. J. Cardiol.* **173**, 268–276 (2014).
34. Li, D. *et al.* Characterization of circulating microRNA expression in patients with a ventricular septal defect. *PLoS One* **9**, (2014).
35. Li, Z., Lu, J., Luo, Y., Li, S. & Chen, M. High association between human circulating MicroRNA-497 and acute myocardial infarction. *Sci. World J.* **2014**, (2014).
36. Agarwal, U. *et al.* Experimental, systems, and computational approaches to understanding the MicroRNA-mediated reparative potential of cardiac progenitor cell-derived exosomes from pediatric patients. *Circ. Res.* **120**, 701–712 (2017).
37. Boettger, T. & Braun, T. A New Level of Complexity: The Role of MicroRNAs in Cardiovascular Development. *Circ. Res.* **110**, 1000–1013 (2012).
38. Latronico, M. V. G., Catalucci, D. & Condorelli, G. MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol. Genomics* **34**, 239–242 (2008).
39. Latronico, M. V. G. & Condorelli, G. MicroRNAs and cardiac conduction. *Curr. Drug Targets* **11**, 907–912 (2010).
40. Liu, N. & Olson, E. N. MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. *Developmental Cell* **18**, 510–525 (2010).
41. Hodgkinson, C. P., Kang, M. H., Dal-Pra, S., Mirotsov, M. & Dzau, V. J. MicroRNAs and cardiac regeneration. *Circulation Research* **116**, 1700–1711 (2015).
42. Calafiore, A. M. *et al.* Intermittent antegrade warm blood cardioplegia. *Ann. Thorac. Surg.* **59**, 398–402 (1995).

43. Vlachos, I. S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **43**, W460–W466 (2015).
44. Hamberg, M. *et al.* MiRTargetLink--miRNAs, genes and interaction networks. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
45. Backes, C. *et al.* Blood born miRNAs signatures that can serve as disease specific biomarkers are not significantly affected by overall fitness and exercise. *PLoS One* **9**, (2014).
46. Keller, A. *et al.* Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat. Methods* **8**, 841–843 (2011).
47. Keller, A. *et al.* Validating Alzheimer's disease micro RNAs using next-generation sequencing. *Alzheimer's Dement.* **12**, 565–576 (2016).
48. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
49. Contu, R., Latronico, M. V. G. & Condorelli, G. Circulating MicroRNAs as potential biomarkers of coronary artery disease: A promise to be fulfilled? *Circ. Res.* **107**, 573–574 (2010).
50. Dickinson, B. A. *et al.* Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **15**, 650–659 (2013).
51. Endo, K. *et al.* MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 48–54 (2013).
52. Goren, Y. *et al.* Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* (2011).
53. Tijssen, A. J. *et al.* MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ. Res.* **106**, 1035–1039 (2010).
54. Wang, K. *et al.* miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell Death Dis.* **4**, e709 (2013).
55. van Rooij, E. *et al.* A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. *Dev. Cell* **17**, 662–673 (2009).
56. Deacon, D. C. *et al.* The miR-143-adducin3 pathway is essential for cardiac chamber morphogenesis. *Development* **137**, 1887–1896 (2010).
57. Liu, X. *et al.* MiR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell Metab.* **21**, 584–595

- (2015).
58. Ucar, A. *et al.* The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat. Commun.* **3**, 1078 (2012).
  59. Wessels, M. W. & Willems, P. J. Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations. *Clinical Genetics* **78**, 103–123 (2010).
  60. Sayed, D. & Abdellatif, M. MicroRNAs in Development and Disease. *Physiol. Rev.* **91**, 827–887 (2011).
  61. Callis, T. E. *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2772–2786 (2009).
  62. Tony, H. *et al.* MicroRNA-208a Dysregulates Apoptosis Genes Expression and Promotes Cardiomyocyte Apoptosis during Ischemia and Its Silencing Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm.* **2015**, 1–11 (2015).
  63. Cordes, K. R. *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* (2009).
  64. Deng, L. *et al.* MicroRNA-143 Activation Regulates Smooth Muscle and Endothelial Cell Crosstalk in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ. Res.* **117**, 870–883 (2015).
  65. Zhao, W., Zhao, S.-P. & Zhao, Y.-H. MicroRNA-143/-145 in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res. Int.* **2015**, 531740 (2015).
  66. Liu, X. *et al.* A Necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ. Res.* **104**, 476–486 (2009).
  67. Li, D. *et al.* Characterization of circulating microRNA expression in patients with a ventricular septal defect. *PLoS One* **9**, e106318 (2014).
  68. Zhang, J. *et al.* MicroRNA deregulation in right ventricular outflow tract myocardium in nonsyndromic tetralogy of fallot. *Can. J. Cardiol.* **29**, 1695–1703 (2013).
  69. Liu, H. *et al.* Comparative expression profiles of microRNA in left and right atrial appendages from patients with rheumatic mitral valve disease exhibiting sinus rhythm or atrial fibrillation. *J Transl Med* **12**, 90 (2014).
  70. Thum, T. *et al.* MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* **116**, 258–267 (2007).
  71. Yu, Z., Raabe, T. & Hecht, N. B. MicroRNA Mirn122a Reduces Expression of the Posttranscriptionally Regulated Germ Cell Transition Protein 2 (Tnp2) Messenger RNA (mRNA) by mRNA Cleavage1. *Biol. Reprod.* **73**, 427–433

- (2005).
72. Huang, X. & Zuo, J. Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response Non-coding RNAs — Critical Regulators of Gene Function. *Acta Biochim Biophys Sin* **46**, 220–232 (2014).
  73. Wong, L. L. *et al.* Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* **17**, 393–404 (2015).
  74. Fan, K. L., Zhang, H. F., Shen, J., Zhang, Q. & Li, X. L. Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian Heart J.* **65**, 12–16 (2013).
  75. Hazarika, S. *et al.* MicroRNA-93 controls perfusion recovery after hindlimb ischemia by modulating expression of multiple genes in the cell cycle pathway. *Circulation* **127**, 1818–1828 (2013).
  76. He, F. *et al.* Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* **394**, 137–144 (2014).
  77. Wang, R., Li, N., Zhang, Y., Ran, Y. & Pu, J. Circulating MicroRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med* **50**, 1789–1795 (2011).
  78. Wang, K. *et al.* miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell Death Dis.* **4**, e709 (2013).
  79. McManus, D. D. *et al.* Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: Data from the Framingham Offspring Study. *Heart. Rhythm* **11**, 663–669 (2014).
  80. Communal, C. & Colucci, W. S. The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta-adrenergic signaling pathways. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **98**, 236–41 (2005).
  81. Galasso, G. *et al.* Myocardial expression of FOXO3a-Atrogin-1 pathway in human heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **12**, 1290–1296 (2010).
  82. Xin, M. *et al.* Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 13839–13844 (2013).
  83. Bruneau, B. G. Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, (2013).
  84. Holweg, C. T. *et al.* TGF-beta1 gene polymorphisms in patients with end-stage heart failure. *J. Heart Lung Transplant.* **20**, 979–84 (2001).
  85. Tsai, E. J. & Kass, D. A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics* **122**,

- 216–238 (2009).
86. Heallen, T. *et al.* Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size. *Science* (80-. ). **332**, 458–461 (2011).
  87. Xin, M. *et al.* Regulation of Insulin-Like Growth Factor Signaling by Yap Governs Cardiomyocyte Proliferation and Embryonic Heart Size. *Sci. Signal.* **4**, ra70-ra70 (2011).
  88. Sanchez-Soria, P. & Camenisch, T. D. ErbB signaling in cardiac development and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **21**, 929–935 (2010).
  89. Fritz, G. & Kaina, B. Stress factors affecting expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in rat hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1171**, 35–40 (1992).
  90. Siwik, D. A. *et al.* Inhibition of Copper-Zinc Superoxide Dismutase Induces Cell Growth, Hypertrophic Phenotype, and Apoptosis in Neonatal Rat Cardiac Myocytes In Vitro. *Circ. Res.* **85**, 147–153 (1999).
  91. Sun, F. *et al.* Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature* **480**, 372–375 (2011).
  92. Hassink, R. J. *et al.* Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **78**, 18–25 (2008).
  93. Chen, J. *et al.* Mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ. Res.* **112**, 1557–1566 (2013).
  94. Jackson, T. *et al.* The c-myc proto-oncogene regulates cardiac development in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **10**, 3709–3716 (1990).

## **IX. Danksagung**

Mein Dank gilt besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq und meinem Betreuer Dr. med. Martin Poryo für die Überlassung des Promotions-themas und für die zuverlässige und herzliche Betreuung sowie die Unterstützung im klinischen Bereich der Studie. Dieser Dank gilt auch den Chefsekretärinnen Frau Christa Franzen und Frau Sandra Pontius, sowie Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Pickardt vom Kompetenznetz Angeborene Herzfehler.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese und meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Masood Abu-Halima herzlich für die Unterstützung bei der Durch-führung der Microarray-, RT-qPCR- und Signalweganalysen, sowie für die Unter-stützung beim Verfassen meines Methodikteils und unseres Papers „Differential expression of microRNAs following cardiopulmonary bypass in children with conge-nital heart diseases“. An dieser Stelle danke ich auch Frau Dr. rer. nat. Nicole Lud-wig für das Korrigieren meiner Arbeit. Für die statistische Auswertung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Keller vom Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes bedanken. Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Frau Ina Marsollek für die Unterstützung bei der RNA-Isolation aus den Myokardproben und für die Organisation der Probenlagerung bedanken.

Dank gilt auch den Ärzten und Pflegerinnen und Pflegern der Stationen KK-03 und KK-01, den Kardiotechnikern und dem gesamten OP-Personal, insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schäfers und Herrn Dr. med. Christian Giebels für die Entnahme der Myokardproben.

Diese Forschungsarbeit wurde im Auftrag der Fördergemeinschaft Deutsche Kin-derherzzentren e.V. durchgeführt.

Diese Arbeit wurde vom Kompetenznetz Angeborene Herzfehler unterstützt, wel-ches Mittel vom Ministerium für Bildung und Forschung, Fördernummer 01GI0601 (bis 2014), und vom Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung, Fördernum-mer 81X2800112 (ab 2015) erhält.

## X. Anhang

### 1. Patienteninformation



Universitätsklinikum des Saarlandes  
Kliniken für Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Pädiatrische Kardiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khalik

#### **Aufklärung für Patienten und Eltern**

*zur Teilnahme an der NEOMY-Studie  
(Regenerative Fähigkeit des neonatalen Myokards)*

##### **Sehr geehrte Patienten, Eltern und Erziehungsberechtigte,**

angeborene Herzfehler sind mit einer Häufigkeit von 0,8 – 1% eine der häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Neugeborenenalters. Die Hälfte dieser angeborenen Herzfehler ist jedoch mild und bedarf keiner Korrektur im Neugeborenenalter. Im Falle einer Korrekturoperation komplexer angeborener Herzfehler stellt in der Folge auftretendes Herzmuskelversagen jedoch weiterhin ein Risiko für eine erhöhte Sterblichkeit dar.

Die besondere Struktur und regenerative Fähigkeit des Herzmuskels innerhalb der ersten 4 Lebenswochen beeinflusst den Verlauf nach Operation. Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass der unreife embryonale Herzmuskel im Gegensatz zum Herzmuskel des Erwachsenen eine ausgeprägte Fähigkeit besitzt sich zu erholen. Diese Fähigkeit scheint er über die Zeit im Mutterleib hinaus bis in die Neugeborenenphase bei zu behalten.

Inwieweit auch die Unreife des Herzmuskels mit der dazugehörigen strukturellen und funktionellen Anpassung während der Übergangsphase von der Zeit im Mutterleib zur Neugeborenenphase eine erhöhte Verletzbarkeit und Risiko bei einer frühen Herzoperation darstellt, ist unklar. Daher könnten die neu gewonnenen Daten hinsichtlich der regenerativen Fähigkeit und Anpassungsprozesse während der Herzoperation mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine die Behandlung des Herzmuskelversagens bei diesen Kindern in der Zukunft positiv beeinflussen.

Im Gegensatz zur extensiven Forschung auf dem Bereich der koronaren Herzerkrankung und des Herzmuskelversagens beim Erwachsenen sind die Ursachen der Herzmuskelschwäche beim Neugeborenen und Kleinkindern mit angeborenen Herzfehlern noch nicht untersucht.

In einer Pilotstudie am Universitätsklinikum des Saarlandes, für die ein positives Votum von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes vorliegt, sollen kleine Herzmuskelproben (kleiner als eine Erbse) des rechten Herzhohes am rechten Vorhof zu Beginn des Einsatzes und Anschlusses an die Herz-Lungen-Maschine und nach Beendigung und Entfernung der Kanülen aus dem Vorhof entnommen werden. Diese Lokalisation hat sich als ausreichend repräsentativ für die Evaluation von Einflussfaktoren auf das Myokard bewährt. Parallel zur Gewebeprobenentnahme erfolgt zudem die Entnahme einer kleinen, an das Alter angepassten, Menge Blut (2-4 ml).

Sowohl die Myokardproben und Blutproben werden pseudonymisiert und zur weiteren Untersuchung mit Code versehen.

Die Herzmuskelproben werden hinsichtlich der regenerativen Fähigkeiten mit Hilfe histologischer Untersuchungen (Zellschädigung, Zellteilung, Ansiedlung von Stammzellen) und Zell-Signalveränderungen auf genetischer Ebene (DNA, microRNA) mit etablierten Methoden am Universitätsklinikum des Saarlandes untersucht. Um eine ausführliche und umfassende Untersuchung der gewonnenen Proben zu erreichen, werden ggf. Proben unter Beibehaltung der Datenschutzrichtlinien zu auswärtigen Labors versendet. In der Blutprobe werden ebenfalls Marker für Zellschädigung, Stress und Signalveränderungen ausführlich untersucht.

Diese Pilotstudie soll eine Vorlage für eine größere bundesweite multizentrische Studie unter Beteiligung anderer Kinderherzzentren im Rahmen des Kompetenznetzes für angeborene Herzfehler darstellen. Daher bitten wir Sie, der Nutzung von ggf. entstandenen wissenschaftlichen Daten und von Restmaterialien aus dieser Pilotstudie in zukünftigen Studien des Kompetenznetzes zusätzlich zuzustimmen (siehe außerdem die gesonderte Einwilligung für die Biomaterialbank im Kompetenznetz Angeborene Herzfehler).

**Ihre Teilnahme an der Studie ist selbstverständlich freiwillig. Sie können die Teilnahme ohne Angabe von Gründen ablehnen, oder Ihre Zustimmung auch später widerrufen, ohne dass Ihnen hierdurch Nachteile für Ihre weitere Behandlung entstehen.**

## Datenschutz

**Teilnahme:** Zur Teilnahme ist es notwendig für jede beteiligte Person einen entsprechenden Einwilligungsbogen zur Studienteilnahme vollständig auszufüllen und zu unterzeichnen. Bei minderjährigen Patienten: Grundsätzlich sind die Unterschriften **beider** Sorgerechthaber notwendig. Liegt nur die Unterschrift eines Sorgerechthabers vor, versichert dieser gleichzeitig, dass dieser im Einverständnis des anderen handelt oder das alleinige Sorgerecht innehat.

**Erzeugung eines Pseudonyms und Speicherung der Daten:** Aus den persönlichen Daten eines Patienten wird ein eindeutiges Pseudonym (PID) generiert. Die erhobenen Daten und gesammelten Proben werden unter Verwendung dieser PID in verschlüsselter Form gespeichert.

**Auswertung von Daten und Proben in der Forschung:** Die Proben werden ohne Kenntnis über die Identität der Probenspender ausgewertet. Die Veröffentlichung der Daten erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form; ein Bezug zu den Probenspendern kann nicht hergestellt werden.

**Löschen von Daten und Vernichtung von Proben:** Probenspender können jederzeit der Aufbewahrung und Nutzung ihrer Daten/Proben widersprechen. In diesem Fall werden keine neuen Daten mehr gesammelt, sämtliche Proben vernichtet und die gespeicherten persönlichen Angaben sowie der dazugehörige Schlüssel gelöscht.

## Probenentnahme

**Blutentnahme:** Es ist vorgesehen die notwendigen Blutproben (max. 4 ml) aus dem für die Operation notwendigen zentralen Venenkatheter (ZVK) zu entnehmen, sodass zur Probenentnahme keine gesonderte Punktion erfolgen muss. Während der Entnahme werden die für den Umgang mit zentralen Gefäßzugängen üblichen Hygiene- und Vorsichtsmaßnahmen verfolgt.

**Gewebeproben:** Im Falle einer Operation am Herzen müssen gelegentlich Gewebe-Anteile des rechten Vorhofs entfernt werden, die normalerweise entsorgt werden. Dieses Gewebe wird von uns zu Studienzwecken verwendet. Für die zweite Gewebeprobe nach Beendigung der Herz-Lungen-Maschine kann es notwendig sein, eine extra ganz kleine Gewebeprobe zu entnehmen, sollten nicht routinemäßig Gewebe-Anteile entfernt werden.

Wir hoffen, dass Sie uns in unserem Vorhaben, die regenerative Fähigkeit der Herzmuskeln bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern zu erforschen, unterstützen und an unserer Studie teilnehmen werden. Dafür möchten wir uns schon im Voraus herzlich bedanken. Für Rückfragen stehen wir gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. H. Abdul-Khalik  
Direktor der Klinik für  
Pädiatrische Kardiologie

Universitätsklinikum des Saarlandes  
Klinik für Pädiatrische Kardiologie  
Kirrberger Str., 66421 Homburg/Saar  
Tel 06841-162-8306, [abdul-khalik@uniklinikum-saarland.de](mailto:abdul-khalik@uniklinikum-saarland.de)

Dr. med. M. Poryo  
Studienbetreuer

Tel 06841-162-8390, [martin.poryo@uniklinikum-saarland.de](mailto:martin.poryo@uniklinikum-saarland.de)



### 3. Probenbegleitschein Myokard

|    |                            | <b>Probenbegleitschein Gewebe - HO</b><br><br>PBSNr 11352 |                  |   | Einwilligungs-Code:<br><div style="border: 1px solid black; height: 30px; width: 100%;"></div> |   | Patient Name bzw. Etikett<br><div style="border: 1px solid black; height: 40px; width: 100%;"></div> |   |   |   |   | PBSNr. 11352 |
|---|----------------------------|--|------------------|---|--|---|--|---|---|---|---|--------------|
| <b>Tube-Codes</b><br>● FR00630611<br>                                |                            | ● FR00630511<br>  |                  | ● FR00630458<br> |  | ● FR00629891<br> |  | ○ FR00630146<br> |   |   |   |              |
| OP <input type="checkbox"/> HK <input type="checkbox"/> Datum <input type="text"/>  |                            |  |                  |   |  |   |  |   |   |   |   |              |
| <b>Gewebetyp durch Ankreuzen der Farbe des verwendeten Röhrchens dokumentieren</b><br>(Wahl des Röhrchens bzw. der Farbe ist beliebig, max. 5 Proben) |                            |  |                  |   |  |   |  |   |   |   |   |              |
|   |                            | GEWEBETYP  | Entnahme Uhrzeit | Zeit bis N2 (min)   |  |   | Andere Fixierung   | 1   | 2 | 3 | 4 | 5            |
|   |                            |  |                  | <3  | 3 - 5  | >5  |  |   |   |   |   |              |
| 1   | SVC                        | Obere Hohlvene   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 2   | IVC                        | Untere Hohlvene  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 3   | RA                         | Rechter Vorhof   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 3a  | NEOMY: Rechter VH VOR HLM  |  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 3b  | NEOMY: Rechter VH NACH HLM |  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 4   | IAS                        | Interatriales Septum   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 5   | TVa                        | Trikuspidalklappe  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 6   | IVS                        | Interventr. Septum   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 7   | RV                         | Rechter Ventrikel  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 8   | RVOT                       | Rechtsventr. Ausflusstrakt   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 9   | PVa                        | Pulmonalklappe   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 10  | PA                         | Pulmonalart. Gefäße  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 11  | PV                         | Pulmonalvenen  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 12  | LA                         | Linker Vorhof  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 13  | MVa                        | Mitralklappe   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 14  | LV                         | Linker Ventrikel   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 15  | LVOT                       | Linksventr. Ausflusstrakt  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 16  | Tend                       | Sehnenfäden  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 17  | AVa                        | Aortenklappe   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 18  | CorArt                     | Koronarien & Ostium  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 19  | AO                         | Aorta  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 20  | DAO                        | Deszend. Aorta   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 21  | CoA                        | Isthmugewebe   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 22  | PDA                        | Ductusgewebe   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 23  | MAPCA                      | Aortopulm. Koll. Arterie   | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| 24  | Freitext                   |  | :                | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>  |  | ●   | ● | ● | ● | ○            |
| Überführung in L-Tank:  |                            | <input type="text"/>   | Bearbeiter       | Überführung in Histol.:   |  |   | <input type="text"/>   | Bearbeiter  |   |   |   |              |

Kompetenznetz Angeborene Herzfehler e. V. – Biomaterialbank – bei Rückfragen: PD Dr. Thomas Pickardt, Tel.: +49 30 4593 7279, pickardt@kompetenznetz-ahf.de

#### 4. KEGG Signalweganalyse

| KEGG Signalwege                        | P-Wert   | Zielgene | miRNAs |
|--|----------|----------|--------|
| Hippo Signalweg                        | 1,11E+05 | 114      | 70     |
| Glutamaterge Synapse                   | 2,62E+05 | 88       | 66     |
| Signalwege bei Malignomen              | 2,62E+05 | 286      | 79     |
| Adrenerger Signalweg in Kardiomyozyten | 1,20E+06 | 112      | 71     |
| Phosphatidylinositol Signalweg         | 1,23E+06 | 66       | 63     |
| Morphinabhängigkeit                    | 3,20E+06 | 72       | 62     |
| TGF-beta Signalweg                     | 3,29E+06 | 64       | 53     |
| cGMP-PKG Signalweg                     | 3,29E+06 | 128      | 74     |
| N-Glycan Biosynthese                   | 0,0001   | 35       | 37     |
| Proteoglycans in Malignomen            | 0,0001   | 142      | 71     |
| Chronisch myeloische Leukämie          | 0,0003   | 58       | 56     |
| Estrogen Signalweg                     | 0,0003   | 74       | 65     |
| Endozytose                             | 0,0003   | 147      | 70     |
| Gliome                                 | 0,0005   | 50       | 58     |
| Retrograder endocannabinoid Signalweg  | 0,0007   | 78       | 66     |
| axonale Wegfindung                     | 0,0009   | 95       | 70     |
| Kolorektales Karzinom                  | 0,0010   | 49       | 53     |
| FoxO Signalweg                         | 0,0010   | 98       | 72     |
| Mucin type O-Glycan Biosynthese        | 0,0018   | 22       | 36     |
| Nierenzellkarzinom                     | 0,0018   | 51       | 49     |
| Depression                             | 0,0027   | 47       | 54     |
| ErbB Signalweg                         | 0,0027   | 67       | 62     |
| Oxytocin Signalweg                     | 0,0029   | 115      | 72     |
| MAPK Signalweg                         | 0,0030   | 179      | 77     |
| Glycosaminoglycan Biosynthese          | 0,0032   | 15       | 24     |
| Adherens junctions                     | 0,0032   | 56       | 58     |
| HTLV-I Infektion                       | 0,0032   | 182      | 74     |
| Melanom                                | 0,0035   | 54       | 56     |

| <b>KEGG Signalwege</b>                           | <b>P-Wert</b> | <b>Zielgene</b> | <b>miRNAs</b> |
|--|---------------|-----------------|---------------|
| Schilddrüsenhormon Signalweg                     | 0,0035        | 86              | 67            |
| Ras Signalweg                                    | 0,0035        | 155             | 76            |
| Prostatakarzinom                                 | 0,0041        | 67              | 66            |
| Fokale Adhäsion                                  | 0,0044        | 146             | 74            |
| Zirkadianer Rhythmus                             | 0,0046        | 26              | 38            |
| Dopaminerge Synapsen                             | 0,0050        | 96              | 73            |
| Kleinzelliges Bronchialkarzinom                  | 0,0060        | 65              | 57            |
| Endokrine Calcium Reabsorption                   | 0,0061        | 35              | 54            |
| Amphetaminabhängigkeit                           | 0,0065        | 48              | 61            |
| Bakterielle Invasion der Epithelzellen           | 0,0074        | 58              | 55            |
| Ubiquitin abhängige Proteolyse                   | 0,0079        | 101             | 65            |
| Hepatitis B                                      | 0,0085        | 100             | 69            |
| Schilddrüsenhormon Synthese                      | 0,0086        | 51              | 51            |
| GABAerge Synapsen                                | 0,0089        | 67              | 62            |
| Gap junction                                     | 0,0106        | 65              | 61            |
| zirkadiane Einstellung                           | 0,0107        | 73              | 67            |
| Sphingolipid Signalweg                           | 0,0145        | 85              | 64            |
| Cholin Metabolismus in Malignomen                | 0,0151        | 74              | 69            |
| Insulinsekretion                                 | 0,0154        | 64              | 57            |
| Dilatative Kardiomyopathie                       | 0,0154        | 65              | 57            |
| Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie | 0,0174        | 53              | 54            |
| Calcium Signalweg                                | 0,0174        | 124             | 71            |
| GnRH Signalweg                                   | 0,0178        | 67              | 61            |
| Neurotrophin Signalweg                           | 0,0178        | 85              | 69            |
| AMPK Signalweg                                   | 0,0189        | 86              | 67            |
| cAMP Signalweg                                   | 0,0190        | 137             | 71            |
| Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen            | 0,0196        | 83              | 65            |
| Endometriumkarzinom                              | 0,0201        | 39              | 57            |
| Pankreaskarzinom                                 | 0,0211        | 51              | 57            |
| TNF Signalweg                                    | 0,0229        | 76              | 63            |

| <b>KEGG Signalwege</b>                     | <b>P-Wert</b> | <b>Zielgene</b> | <b>miRNAs</b> |
|--|---------------|-----------------|---------------|
| Nikotinabhängigkeit                        | 0,0242        | 27              | 55            |
| Rap1 Signalweg                             | 0,0243        | 143             | 70            |
| Langzeitpotenzierung                       | 0,0248        | 50              | 59            |
| Zelladhäsionsmoleküle                      | 0,0248        | 98              | 68            |
| Regulation des Aktinzytoskeletts           | 0,0248        | 144             | 73            |
| Thrombozytenaktivierung                    | 0,0297        | 88              | 62            |
| Regulation der Pluripotenz von Stammzellen | 0,0334        | 97              | 69            |
| Inositol phosphate Metabolismus            | 0,0369        | 44              | 49            |
| Regulation der TPR-Kanäle                  | 0,0399        | 70              | 59            |
| Shigellose                                 | 0,0458        | 46              | 49            |
| Kokainabhängigkeit                         | 0,0479        | 33              | 51            |
| Cholinerge Synapsen                        | 0,0479        | 80              | 61            |