

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

**MicroRNA-Analyse  
bei Zwillingen  
mit und ohne angeborenem Herzfehler**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin*

**der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2018

vorgelegt von: Josephin S. Weidinger

geb. am: 28.06.1994 in Herrenberg

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>6</b>
3.1	Deutsche Zusammenfassung .....	6
3.2	Abstract .....	7
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
4.1	Vorkommen und Entstehung angeborener Herzfehler .....	8
4.2	MicroRNAs – Definition, Synthese und Funktion.....	10
4.3	MicroRNA-Veränderung in Zusammenhang mit AHF.....	11
4.4	Bedeutung der Epigenetik.....	13
4.5	MicroRNAs und Epigenetik .....	15
4.6	Hypothese und Ziel der Arbeit.....	15
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>17</b>
5.1	Patientenpopulation .....	17
5.2	Materialien .....	21
5.3	Methodik.....	25
5.3.1	DNA-Analyse.....	25
5.3.2	Probengewinnung .....	26
5.3.3	Isolation von RNA, inklusive der microRNA .....	26

5.3.4	Validierung der Qualität und Quantität der RNA .....	27
5.3.5	Analyse des microRNA Microarray Assays.....	27
5.3.6	Reverse Transkription und qRT-PCR der signifikanten microRNAs verschiedener Vergleichsgruppen.....	28
5.3.7	Reverse Transkription und qRT-PCR der signifikanten microRNAs in monozygoten Zwillingen.....	30
5.3.8	Statistische Analyse .....	31
5.3.9	Prädiktion von Zielgenen und funktionelle Analyse .....	31
5.3.10	Analyse klinischer Daten .....	32
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
6.1	Klinische Daten.....	33
6.2	DNA-Analyse zum Nachweis der Zygotität.....	37
6.3	MicroRNA-Expressionsprofile .....	38
6.3.1	Ergebnisse der MicroArrays .....	38
6.3.2	Validierung der microRNAs durch qRT-PCR .....	46
6.3.2.1	Ergebnisse aller Vergleichsgruppen .....	46
6.3.2.2	Ergebnisse der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF .....	54
6.3.3	Signalweg-Analysen .....	59
6.3.3.1	Signalweg-Analysen aller Vergleichsgruppe.....	59
6.3.3.2	Signalweg-Analysen der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF.....	66
<b>7</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
7.1	Gestationsalter als Einfluss auf die Entstehung AHF mittels veränderter microRNA-Expression.....	70
7.2	IVF-Behandlung als Risikofaktor für AHF.....	73

7.3	Bedeutung der Zygotität im Rahmen Entstehung von AHF .....	76
7.4	Zusammenfassung der Studienergebnisse .....	79
7.5	Limitationen dieser Forschungsergebnisse .....	79
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>95</b>

## 2 Abkürzungsverzeichnis

AHF	-	Angeborener Herzfehler
AS	-	Aortenstenose
ASD	-	Vorhofseptumdefekt
AVSD	-	Atrioventrikulärer Septumdefekt
CoA	-	Koarktation der Aorta
IVF	-	In-vitro Fertilisation
MI	-	Mitralklappeninsuffizienz
miR, miRNA	-	MicroRNA
nm	-	Nanometer
nt	-	Nukleotide
PCR	-	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDA	-	Persistierender Ductus Arteriosus Botalli
PS	-	Pulmonalarterienstenose
qRT - PCR	-	Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten- Reaktion
RVOT	-	Rechtsventrikulärer Ausflusstrakt
SD	-	Standardabweichung
TGA	-	Transposition der großen Arterien
TOF	-	Fallot'sche Tetralogie
UVH	-	Univentrikuläres Herz
VSD	-	Ventrikelseptumdefekt

## 3 Zusammenfassung

### 3.1 Deutsche Zusammenfassung

Angeborene Herzfehler (AHF) gehören zu den häufigsten angeborenen Organfehlbildungen des Neugeborenen. Ihre Pathogenese ist bisher weitestgehend ungeklärt. Neben der bereits bekannten genetischen Prädisposition sind dabei in den letzten Jahren die Bedeutung von miRNAs und des gesamten Bereichs der Epigenetik in den Fokus der Forschung gerückt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, spezifische microRNAs (miRNAs) im Blut von Zwillingen mit AHF zu bestimmen, die im Vergleich zu den herzgesunden Zwillingkindern verändert exprimiert werden. Zwillinge stellen hierfür aufgrund ihrer gleichen oder ähnlichen Genetik eine optimale Untersuchungsgruppe dar. Dabei wurden verschiedene Einflussgrößen wie Art der Schwangerschaftsentstehung, Zygotität und Reife der Zwillinge bei Geburt näher betrachtet.

Es handelt sich um eine Pilotstudie, in der im Blut von 19 Zwillingspaaren miRNA-Analysen mithilfe von MicroArrays durchgeführt wurden, die anschließend mittels qRT-PCR validiert wurden. Zusätzlich wurden somatische Daten der Zwillinge und pränatale Daten gesammelt.

Die Auswertung zeigte, dass zahlreiche miRNAs in den verschiedenen Vergleichsgruppen signifikant verändert exprimiert werden. Dabei konnten sowohl miRNAs bestimmt werden, die bereits in der Literatur mit dem Vorkommen von AHF assoziiert sind, als auch solche, die in diesem Zusammenhang noch weitestgehend unbeschrieben sind. Bei diesen miRNAs konnten wir neben ihrer Bedeutung bei der Entstehung von AHF auch einen Zusammenhang mit den Risikofaktoren der Frühgeburt, der Schwangerschaftsentstehung durch IVF-Behandlung und der Monozygotität feststellen.

In der Zukunft müssen epigenetische Faktoren mittels Genomsequenzierung im Blut der Zwillinge untersucht werden und mit dem miRNA-Expressionsprofil korreliert werden, um mögliche diagnostische Angriffspunkte bestimmen zu können.

### 3.2 Abstract

Congenital heart diseases (CHD) are one of the most common congenital malformations. Their development is not totally understood up to now. In addition to the already known genetic predisposition, microRNAs (miRNAs) and the whole field of epigenetics have become the focus of research in the last years. The purpose of this study was to determine specific miRNAs in the blood of twins with CHD which are expressed differently compared to their healthy co-twins. Because of their identical or similar genetics, twins represent an optimal study group.

Different contributing factors like the way of conception, the maturity of the twins at birth and their zygosity were examined.

This is a pilot study in which miRNA expression-levels in the blood of 19 twin pairs were analysed using MicroArray and were validated using qRT-PCR.

In addition, somatic data of the twins and prenatal data were collected.

We could find numerous miRNAs expressed significantly different in the various collectives. Some of them are already known to be associated with CHD, whereas some were largely unknown in the development of CHD.

In addition to the meaning of these miRNAs in the development of CHD, we could observe a connection between the risk factors premature, monozygosity and In-vitro fertilisation and the increased occurrence of CHD.

In the future, epigenetics need to be investigated in the blood of the twins by genome sequencing and correlation with the expression profiles of miRNAs in order to determine diagnostic targets.

## 4 Einleitung

### 4.1 Vorkommen und Entstehung angeborener Herzfehler

Angeborene Herzfehler (AHF) gehören mit einer Prävalenz von 0,8 - 1 % aller Lebendgeburten zu den häufigsten kongenitalen Malformationen im Neugeborenenalter.<sup>1</sup> Herzfehlerbildungen manifestieren sich bereits in der frühen fetalen Entwicklung und treten in unterschiedlich starker morphologischer Ausprägung auf. Das Kompetenznetz Angeborene Herzfehler erfasste während einer einjährigen prospektiven Studie deutschlandweit alle Lebendgeburten mit AHF.<sup>2</sup> Am häufigsten lag dabei ein Ventrikelseptumdefekt (VSD) vor (48,9 %).<sup>2,3</sup> Hierbei handelt es sich um einen Defekt im Septum zwischen den beiden Herzkammern. Die klinische Relevanz solcher septaler Anomalien beruht auf der Tatsache, dass das Herz aus einem rechtskardialen Niederdruck- und einem linkskardialen Hochdrucksystem besteht.<sup>4</sup> Bei Vorliegen einer Verbindung der beiden Herzhälften, fließt Blut dem Druckgradienten folgend zunächst von der linken in die rechte Herzhälfte, wodurch ein sogenannter Links-Rechts-Shunt entsteht.<sup>4</sup> Dieser kann entweder auf Kammerebene (VSD) oder aber auf Vorhofebene, wo er als Atriumseptumdefekt (ASD) (17,0 %) bezeichnet wird, vorliegen.<sup>2,3</sup> Dieser pathologische Blutfluss erfordert eine Mehrarbeit des Herzens, die zu einer Herzinsuffizienz führen kann und mit einer entsprechenden Klinik einhergeht.<sup>4</sup> Langfristig gesehen führt die damit einhergehende vermehrte Lungendurchblutung zu einer Vasokonstriktion und einem irreversiblen Umbau kleinster Lungengefäße und kann somit eine pulmonale Hypertonie zur Folge haben.<sup>4</sup> Die daraus resultierende Mehrarbeit der rechten Herzhälfte kann zu einer Druckerhöhung und damit einhergehenden Shuntumkehr (Rechts-Links-Shunt) führen, was als Eisenmenger-Syndrom bezeichnet wird.<sup>5</sup> Ein solcher Blutfluss fördert folglich sauerstoffarmes, venöses Blut vor Anreicherung mit Sauerstoff direkt in den Körperkreislauf, sodass trotz ausreichender Durchblutung keine adäquate Sauerstoffversorgung erreicht wird. Dies äußert sich klinisch in einer Zyanose. Darauf basierend werden AHF in zyanotische und azyanotische AHF eingeteilt.<sup>5</sup>

Obwohl zyanotische Herzfehler seltener auftreten, spielen sie aufgrund ihrer lebensbedrohlichen Pathogenese eine wichtige Rolle in der pädiatrischen Kardiologie. Zu den primär zyanotischen Herzvitien zählen beispielsweise die Fallot'sche Tetralogie

(TOF) (2,5 %), die Transposition der großen Gefäße (TGA) (2,2 %) und das univentrikuläre Herz (UVH) (2,8 %).<sup>2,3</sup>

Zu den wesentlich häufiger auftretenden, azyanotischen AHF zählen neben dem VSD und ASD unter anderem der persistierende Ductus arteriosus Botalli (PDA) (4,3 %), die Pulmonalstenose (PS) (6,1 %), der Atrioventrikuläre Septumdefekt (AVSD) (2,5 %), die Aortenklappenstenose (AS) (2,2 %), die Aortenisthmusstenose (CoA) (3,6 %), die Mitralklappeninsuffizienz (MI), die Koronarfistel und die bikuspidale Aortenklappe (insgesamt 6,8%).<sup>2,3</sup>

Mit einem 73% erhöhten relativen Risiko an einem AHF zu leiden sind vor allem Zwillinge gegenüber Einlingen häufig von solchen vorgeburtlich entstandenen Fehlbildungen betroffen.<sup>6</sup> Dabei haben monozygote Zwillinge, die stets von nur einer Plazenta versorgt werden, mit einem 82% höheren relativen Risiko im Vergleich zu dizygoten Zwillingen, die jeweils über eine eigene Fruchthöhle und Plazenta verfügen, das höchste Risiko.<sup>6-8</sup> Ebenso konnte beobachtet werden, dass in 81 % der Zwillingsschwangerschaften mit kongenitalen Malformationen lediglich ein Zwilling von einer solchen Fehlbildung betroffen ist.<sup>9</sup>

Das Vorkommen von Mehrlingsschwangerschaften ist heutzutage aufgrund der vermehrten erfolgreichen Durchführung von In-vitro Fertilisationen, bei welchen stets mehrere Embryos implantiert werden, deutlich angestiegen.<sup>7,10</sup> Obwohl hierbei meist dizygot - also dichoriale und diamniale - Zwillingspaare entstehen, konnte ebenso ein Zusammenhang zwischen der künstlichen Befruchtung und dem erhöhten Vorkommen von monozygoten Zwillingspaaren nachgewiesen werden.<sup>11</sup> Das Auftreten von kongenitalen Malformationen bei künstlicher Befruchtung ist dabei unabhängig von der Chorionizität erhöht.<sup>10-13</sup>

Außerdem bekannt ist der Zusammenhang der Frühgeburtlichkeit, also der Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) und dem vermehrtem Vorkommen von AHF.<sup>14</sup> *Taksande et al.* konnten ein beinahe 3-fach erhöhtes Vorkommen von angeborenen Fehlbildungen jeglicher Art bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen feststellen.<sup>14</sup> Das Schwangerschaftsalter bei Geburt spielt demnach eine entscheidende Rolle bei jeder Art von angeborenen Anomalien.<sup>9,14</sup>

Der molekulare Mechanismus der Entstehung der AHF ist nicht gänzlich geklärt. Häufig kommen AHF bei Kindern mit chromosomalen Anomalien wie beispielsweise

Trisomie 21 vor.<sup>15</sup> Auch Kinder mit Trisomie 13 und 18 leiden mit 80% und 90% häufig an einem AHF.<sup>16</sup> Eine weitere Rolle bei der Entstehung von AHF spielt die familiäre Häufung. Kinder von Eltern mit AHF tragen ein um 3 bis 9% erhöhtes Risiko an einem AHF zu leiden als Kinder von Eltern ohne AHF.<sup>17–20</sup>

## 4.2 MicroRNAs – Definition, Synthese und Funktion

Der Bedeutung der microRNAs (miRNAs) wurde lange Zeit wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Mittlerweile sind sie als Regulatoren der Genexpression bekannt und haben an Wichtigkeit in der medizinischen Forschung gewonnen.<sup>21,22</sup> Bei miRNAs handelt es sich um kleine, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 22 bis 24 Nukleotiden (nt).<sup>23</sup> Sie regulieren die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene, indem sie an komplementäre Sequenzen ihrer jeweiligen Ziel-mRNA binden, die im Rahmen der Proteinbiosynthese bei der Translation eine entscheidende Rolle spielt.<sup>23</sup> Dieser als RNA-Interferenz bezeichnete Vorgang kann die Translation einzelner Gene zum entsprechenden Protein induzierend bzw. reprimierend beeinflussen.<sup>23</sup>

Gegenwärtig konnten bereits >2000 verschiedene miRNAs im Menschen identifiziert werden.<sup>24</sup> In den letzten Jahren ist die miRNA zudem vermehrt in den Blickpunkt zahlreicher Studien gerückt und wird dabei mithilfe von Microarrays analysiert.<sup>24</sup> Obwohl bisweilen noch kein vollständiges Verständnis vieler Funktionen der miRNAs vorliegt, sind ihre entscheidenden Aufgaben als Regulatoren und Modulatoren zellulärer Prozesse wie Zellentwicklung, Wachstum und Proliferation bereits bekannt.<sup>25</sup> So gewinnen miRNAs seit einiger Zeit in der medizinischen Forschung besondere Bedeutung in der Diagnostik als mögliche Biomarker bei Krebs- und Herzerkrankungen, Autoimmunkrankheiten, Alterungsprozessen, etc. Auch ihre Rolle im Rahmen der therapeutischen Intervention wird in Betracht gezogen.<sup>26</sup>

Die Synthese reifer miRNAs ist ein mehrere Schritte umfassender Prozess, welcher in verschiedenen Kompartimenten der Zelle abläuft.<sup>27,28</sup> Als Teil des menschlichen Genoms liegen die miRNA-Sequenzen als einzelne Transkriptionseinheiten oder in Form größerer Cluster vor.<sup>28</sup> Diese werden zunächst von der RNA-Polymerase II zu den mehr als tausend Basen umfassenden primary miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert.<sup>27</sup> Anschließend werden die pri-miRNAs im Zellkern durch den Mikroprozessor-

Komplex, welcher aus dem RNase-III-Enzym Drosha und dem doppelsträngigen RNA-Bindeprotein DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) besteht, zu sogenannten precursor-miRNAs (pre-miRNAs) mit einer Länge von 70 bis 80 nt prozessiert.<sup>28</sup> Die charakteristisch haarnadelförmige pre-miRNA wird daraufhin mithilfe von Exportin-5 und dessen Kofaktor Ran-GTP aktiv vom Zellkern ins Zytoplasma befördert.<sup>28</sup>

Das dort vorhandene Polymerase-III-Enzym Dicer interagiert mit den doppelsträngigen RNA-Bindeproteinen TRBP (TAR RNA binding protein) und PACT (PKR activation protein) und setzt damit die Prozessierung der pre-miRNA fort.<sup>28,29</sup> Hierbei wird die miRNA-Duplex zunächst geschnitten und im Anschluss entwunden. So entstehen ~22 nt umfassende, einzelsträngige miRNAs.<sup>28</sup> Dieser Vorgang beginnt am Duplexende mit der geringeren thermodynamischen Aktivität.<sup>28</sup> Der miRNA-Strang, dessen 5'-Ende an jener Stelle liegt, bildet die reife miRNA, auch guide RNA genannt.<sup>28</sup> Die reifen miRNAs werden in einem Ribonucleoproteinkomplex (miRNP) aufgenommen.<sup>28</sup> Dieser ist dem RISC (RNA-induced silencing complex) des RNAi-Pathways (RNA interference pathway) sehr ähnlich. In Form des Effektor-Komplexes RISC kann die miRNA die Genaktivität auf zwei Weisen herunterregulieren: 1. durch translationale Hemmung und 2. durch die direkte Spaltung der mRNA des Ziel-Gens. Der Grad der Komplementarität der miRNA und der inhibierenden mRNA des Ziel-Gens in Kombination mit einem RNA-Bindeprotein der Argonaut-Familie bestimmt das Ausmaß des regulatorischen Einflusses des RISC.<sup>28</sup>

### 4.3 MicroRNA-Veränderung in Zusammenhang mit AHF

Die inhibierende Funktion der miRNAs spielt eine entscheidende Rolle für viele Prozesse in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers.<sup>30</sup> Auch zur Bedeutung der miRNA in der kongenitalen Entwicklung gibt es bereits einige Erkenntnisse.<sup>30</sup> In der embryonalen Entwicklung des Herzens und der Pathogenese kongenitaler Malformationen spielt das Verständnis der miRNA ebenfalls eine immer größer werdende Rolle.<sup>30,31</sup> Im Blut schwangerer Frauen konnten vier miRNAs (miR-19b, miR-22, miR-29c und miR-375) identifiziert werden, die mit fetalen AHF assoziiert werden konnten und damit als nicht-invasiver pränataler Diagnosemarker Verwendung finden könnten.<sup>32</sup>

*Li et al.* konzentrierten sich in ihrer Studie auf VSDs und konnten spezifische Expressionsveränderungen der miR-1-1 und miR-181c bei Patienten mit VSD beobachten.<sup>33</sup> Dabei zeigten sie den Zusammenhang der Herabregulation des Expressionsprofils der miR-1-1 und der Hochregulierung des Expressionsprofil der miR-181c mit der gesteigerten Expression der Gene GJA1 und SOX9 und der verminderten Expression von BMPR2 bei Patienten mit VSD.<sup>33</sup> GJA kodiert Connexin 43, den wichtigsten kardialen Leitungskanal zur synchronen Ventrikelkontraktion, während SOX9 eine wesentliche Rolle im Signalweg der Herzklappen- und Septumsynthese spielt.<sup>33</sup>

Zudem konnten im Vergleich der Patienten mit VSD zu einer gesunden Kontrollgruppe 15 hochregulierte und 21 herabregulierte miRNAs bestimmt werden, von denen acht miRNAs (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-379-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-433, hsa-miR-487b, hsa-miR-498) via qRT-PCR validiert wurden.<sup>34</sup>

Unsere Arbeitsgruppe um *Abu-Halima et al.* konnte bereits miRNAs identifizieren, die bei Patienten mit TOF nach einer Korrekturoperation im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe verändert exprimiert wurden.<sup>35</sup> Es wurde zudem eine Unterteilung der Patienten mit TOF nach Auftreten eines Rechtsherzversagens vollzogen. Hierbei fiel auf, dass miR-421, miR-1233-3p und miR-625-5p bei TOF-Patienten mit Rechtsherzversagen vermindert waren und somit als Marker für eine Progression der Erkrankung verstanden wurden.<sup>35</sup>

Studien von *O'Brien et al.* zeigten ein verändertes miRNA-Expressionsprofil im Herzmuskelgewebe des rechten Ventrikels bei Kindern, welche mit dem Krankheitsbild der TOF geboren wurden.<sup>36</sup> Dabei konnten 61 miRNAs bestimmt werden, welche ein signifikant verändertes Expressionslevel aufwiesen.<sup>36</sup> In einer weiterführenden Studie konnte in derselben Patientengruppe vor allem eine erhöhte Expression der miR-421 beobachtet werden, welcher daher eine direkte Wirkung bei der Entstehung der TOF zugesprochen wurde.<sup>37</sup> Im Herzmuskelgewebe des rechtsventrikulären Ausflusstrakts (RVOT) von Patienten mit TOF konnten *Liang et al.* 75 veränderte miRNAs benennen, von welchen miR-940 die deutlichste Herabregulation zeigte.<sup>38</sup> Wie bereits bekannt reguliert diese miRNA die Proliferation und Migration der menschlichen Kardiomyozyotenprogenitorzellen, welche Jumonji, AT rich interactive domain 2 (JARID2) als Zielprotein beeinflusst und somit an der Entstehung der TOF beteiligt sein könnte.<sup>38</sup> Ergänzend hierzu konnte *He et al.* die protektive Rolle der hochregulierten

miR-138 im RVOT im Rahmen der myokardialen Adaptation an eine chronische Hypoxie darstellen.<sup>39</sup>

Im Blut erwachsener Patienten mit Dyspnoe konnte die zirkulierende miR-423-5p als Biomarker identifiziert werden, welche eine Unterscheidung der Patienten mit Linksherzinsuffizienz von jenen mit anderen Ursachen für Dyspnoe ermöglicht.<sup>40</sup> Dieselbe miRNA stellte sich jedoch für die Einschätzung der funktionellen Herzleistung beim Vorliegen der TGA nach erfolgter arterieller Switch-Operation als Biomarker als unbrauchbar heraus.<sup>41</sup> Dafür konnten *Lai et al.* 23 miRNAs mit hochreguliertem Expressionsprofil im Blut von Patienten mit TGA benennen, von welchen elf miRNAs mithilfe einer qRT-PCR validiert wurden.<sup>42</sup> Das Vorkommen der miR-18a und miR-486-5p korreliert hierbei mit einer geringeren ventrikulären Kontraktionskraft.<sup>43</sup>

Neben der bereits genannten Studie bezüglich des miRNA-Expressionsprofils bei Patienten mit TOF konnte unsere Arbeitsgruppe in weiteren Patientengruppen ebenfalls veränderte miRNA-Expressionsprofile analysieren.<sup>44-46</sup>

Im Blut von Patienten mit Marfan-Syndrom konnten wir 28 verändert regulierte miRNA-Expressionsprofile detektieren, von welchen elf miRNAs mittels qRT-PCR validiert werden konnten.<sup>46</sup> Dabei konnten wir bereits die potentielle Rolle der miRNA als Biomarker in der Diagnostik und als Angriffspunkt in der Therapie beschreiben.<sup>46</sup>

Außerdem analysierten wir miRNA-Expressionsprofile im Myokardgewebe von Kindern mit AHF vor und nach Korrekturoperation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine.<sup>44</sup> Auch dabei fielen miRNA-Expressionsprofilveränderungen auf, welche zum Verständnis des häufiger auftretenden Myokardversagens nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine und der Entstehung von AHF beitragen könnten.<sup>44</sup>

#### 4.4 Bedeutung der Epigenetik

Zum Teil konnte die Entstehung angeborener Vitien bereits durch das wachsende Verständnis auf genetischer und molekularer Ebene erklärt werden.<sup>47,48</sup> Dennoch sind die Ursachen noch nicht hinreichend geklärt. Neben genetischer Faktoren scheinen sowohl epigenetische als auch umweltbedingte Einflüsse zur Entstehung solcher Fehlbildungen beizutragen.<sup>49,50</sup> Unter Epigenetik versteht man die veränderte Genex-

pression, welche nicht auf Mutationen der DNA-Sequenz durch äußerliche Umwelteinflüsse selbst beruht.<sup>51</sup> Vielmehr handelt es sich um Chromosomen-gebundene Mechanismen, welche die Aktivität ganzer Chromosomen oder Abschnitte derselben beeinflussen.<sup>51</sup> Dennoch können die dabei entstehenden Veränderungen an die Tochterzelle weitergegeben und somit vererbt werden.<sup>52</sup> Obwohl es bisweilen keine allgemeingültige Definition der Epigenetik gibt, zählen zu den zentralen Mechanismen Prozesse der DNA-Methylierung, der Histon-Modifikation, die Beschleunigung von Telomerabbauprozessen und die damit einhergehende mitotische Instabilität.<sup>52-57</sup>

Um diese epigenetischen und umweltbedingten Einflüsse zu untersuchen, eignen sich insbesondere monozygote, aber auch dizygote Zwillingspaare, welche denselben, bzw. ähnlichen Einflüssen unterliegen.<sup>58-60</sup> *Bell et al.* konnten diese Möglichkeit bereits in einer Rezension ausführen.<sup>59</sup> Eine diskutierte Ursache der erhöhten Inzidenz von AHF bei monozygoten Zwillingen ist beispielsweise das Feto-fetale Transfusionssyndrom (FFTS), welches bei 10 - 20 % der monochorialen, diamnioten Zwillingsschwangerschaften eine ernsthafte Komplikation darstellt.<sup>61</sup> Hierbei handelt es sich um Verbindungen der kindlichen Blutkreisläufe über Anastomosen. In schwerwiegenden Fällen kann es zu einer Unterversorgung mit Blut und Nährstoffen des einen (Donor) und einer Überversorgung des anderen Feten (Akzeptor) während der Schwangerschaft kommen.<sup>61</sup> Das Herz des Akzeptors kann dabei anatomische und funktionelle Veränderungen durchlaufen, die von der physiologischen Norm abweichen.<sup>61,62</sup> Die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) konnte ebenfalls anhand der Epigenetik näher erklärt werden. Dafür wurden Methylierungsprofile von Plazentas aus Zwillingsschwangerschaften mit IUGR eines Zwillings verglichen, bei welchen acht Gene mit unterschiedlicher Methylierung benannt werden konnten.<sup>63</sup>

Auch umweltbedingte Einflüsse während der Schwangerschaft, wie eine kurzzeitige Unterversorgung mit Sauerstoff, können zu Vitien führen, indem sie epigenetische Gegebenheiten mitbestimmen und verändern.<sup>64</sup>

## 4.5 MicroRNAs und Epigenetik

Es ist bereits bekannt, dass sich miRNAs und epigenetische Vorgänge wie Histon-Modifikation und DNA-Methylierung gegenseitig regulieren.<sup>65</sup> MiRNAs haben demzufolge sowohl in der Histon-Modifikation als auch im Rahmen der DNA-Methylierung eine essentielle Bedeutung.<sup>65</sup> Auch epigenetische Vorgänge regulieren viele Proteinkodierende Gene. Da miRNAs durch die Polymerase II transkribiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Epigenetik auch an der miRNA-Expression beteiligt ist.<sup>65</sup> Daher lassen sich die beiden Begriffe nur schwer voneinander trennen. In manchen Studien werden miRNAs sogar als Bestandteil der Epigenetik beschrieben.<sup>51</sup> Die ursprüngliche Definition der Epigenetik beschreibt lediglich vererbare, reversible Phänomene, die die Genexpression beeinflussen ohne Basenpaare zu verändern.<sup>51</sup>

## 4.6 Hypothese und Ziel der Arbeit

Unsere Hypothesen für diese Arbeit lauteten wie folgt:

- Gibt es spezifische miRNAs für Zwillinge mit AHF?
- Können pränatale mütterliche und fetale Risikofaktoren, die für die Entstehung von AHF verantwortlich sind, identifiziert werden?

Welchen Einfluss haben die Art der Schwangerschaftsentstehung, die Zygotität, die Reife bei Geburt und das Geschlecht auf die Entstehung von AHF und die dazugehörigen miRNA-Expressionsprofile?

Daher waren die Ziele dieser Arbeit in einem ersten Teil der Studie zunächst den Zusammenhang zwischen miRNAs und AHF näher zu betrachten und Daten, die möglicher Risikofaktoren betreffend, in diesem Zusammenhang zu erheben. Dafür stellen ein- und zweieiige Zwillingspaare eine ideale Studienpopulation dar.<sup>66</sup> Aufgrund nahezu oder komplett identischer Genetik und gleichen pränatalen Umweltfaktoren ist es möglich, die Unterschiede in der Genexpression eines Zwillingspaars durch epigenetische Einflüsse als Fall- und Kontrollgruppen zu betrachten. *Tan et al.* nutzten diese Möglichkeit bereits, um den Einfluss von miRNAs bei Vorkommen einer nichtalkoholischen Fettleber bei monzygoten Zwillingen zu erklären.<sup>67</sup> Trotzdem gibt

es bisher nur wenige Studien zur Genexpression, die diese hervorragende Möglichkeit der Zwillingspaare als Patientenpopulation nutzen.<sup>68–73</sup>

Eine Studie zur Untersuchung der miRNA-Expressionsprofile und der Epigenetik bei Zwillingen mit und ohne AHF gibt es bisher nicht.

Aufgrund unterschiedlicher Umwelteinflüsse verändert sich das miRNA-Expressionsprofil im Laufe des Lebens.<sup>74</sup> Daher stellen besonders junge Zwillingenkinder, die noch ähnlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind, eine gute Teilnehmergruppe dar, um die Unterschiede der miRNA-Expression in Bezug auf das Vorkommen von AHF zu näher zu betrachten. Da es bisher wenig Erkenntnisse über den Einfluss von miRNAs auf angeborene Herzfehler anhand von Zwillingen gibt, war das Ziel dieser Arbeit die Entstehung kongenitaler Malformationen des Herzens, die bisweilen weitgehend ungeklärt sind, anhand von Zwillingspaaren weiter zu ergründen.

## 5 Material und Methodik

Die Evaluation der Rolle der miRNA bei Zwillingen wurde als prospektive Pilotstudie von August 2015 bis April 2017 am Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführt. Die Arbeit wurde durch das *Kompetenznetz Angeborene Herzfehler* und das *Institut für Rechtsmedizin der Humboldt-Universität (Charité)* in Berlin unterstützt. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig und bedurfte einer schriftlichen Zustimmung der Studienteilnehmer bzw. derer Erziehungsberechtigten, welche durch vorherige ärztliche Aufklärung über das Ziel der Studie und mögliche Risiken der Probengewinnung informiert worden sind (Anlage 1). Der Datenschutz wurde gewährleistet, indem alle Teilnehmer mit einem Code (HOAZ\_10xx) pseudonymisiert wurden.

Das Ethikvotum für die Blutentnahmen wurde von der saarländischen Ethikkommission erteilt (Nr. 178/14).

### 5.1 Patientenpopulation

Eingeschlossen wurden alle Zwillingspaare von 2 bis 20 Jahren, von denen jeweils nur ein Zwilling an einem AHF erkrankt war und die sich in o.g. Zeitraum in unserer kinder-kardiologischen Ambulanz vorgestellt hatten, sofern die Erziehungsberechtigten in die Teilnahme einwilligten. Ausgeschlossen wurden alle Zwillingspaare bei denen beide bzw. keiner an einem AHF erkrankt war oder bei Vorliegen eines PDA oder persistierenden Foramen ovale im Rahmen einer Frühgeburt. Die fehlende Einwilligung bzw. Entzug der Einwilligung seitens der Eltern für die genetische und epigenetische Untersuchung oder fehlende Einwilligung zur Blutentnahme bei einem der Geschwisterkinder führte ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie.

Auf der Klassifikation des Ausschusses der europäischen pädiatrischen Kardiologie (EPC-Code) basierend wurden die Herzfehler nach *Schwedler et al.* ihrem Schweregrad und ihrer hämodynamischen Relevanz entsprechend in drei Gruppen eingeteilt, welche in Tabelle 1 aufgeführt sind.<sup>3,75</sup> Bei kombinierten AHF erfolgte die Zuteilung zu jener Fehlbildung, welche von größter hämodynamischer Bedeutung war, bzw. eine Intervention am dringlichsten erforderlich machte. Dem Schweregrad entspre-

chend gestaltete sich der Krankheitsverlauf und die klinische Vorgehensweise, welche von spontaner Remission bis hin zu einer lebenslangen medikamentösen Therapie mit interventionellen oder chirurgischen Eingriffen reichen konnte.<sup>3</sup>

Schweregrad der AHF	AHF
Mild	VSD (klein oder muskulär) ASD PDA PS
Moderat	VSD (alle anderen) AVSD AS CoA Partielle Anomalie der pulmonal-venösen Verbindung
Schwer	UVH (alle Typen) TOF Pulmonalatresie mit VSD Pulmonalatresie ohne VSD Double outlet right ventricle (DORV) Vollständige TGA Pränatal korrigierte TGA Truncus arteriosus communis Unterbrochener Aortenbogen Vollständige Anomalie der pulmonal-venösen Verbindung Ebstein-Anomalie

**Tabelle 1:** Einteilung der AHF nach Schweregrad entsprechend Lindinger et al.<sup>3</sup>

Allen Studienteilnehmern wurde nach erfolgter Aufklärung durch einen Arzt und der erfolgten schriftlichen Einwilligung eine Blutprobe entnommen. Der genaue Ablauf ist dem Methodikteil zu entnehmen. Zudem wurden Daten der somatischen Entwicklung seit Geburt und den Schwangerschaftsverlauf betreffend erhoben. Dabei wurden die im Folgenden genannten Daten der Zwillinge durch Recherche vorliegender Patientenakten oder durch telefonische Auskunft der Eltern erfasst:

- Geburtsdatum
- Geschlecht
- Geburtsgewicht
- Geburtslänge
- Kopfumfang bei Geburt
- aktuelles Gewicht
- aktuelle Größe
- Gestationsalter bei Geburt
- Entstehung der Schwangerschaft durch In-vitro Fertilisation oder spontane Konzeption
- pränatale mütterliche Risikofaktoren (Nikotin, Hypertonie, Gestationsdiabetes, HELLP)
- fetale Risiken (FFTS, singuläre Umbilikalarterie, Plazentainsuffizienz)
- sonstige Schwangerschaftsauffälligkeiten

Aus den erfassten somatischen Daten wie Geburtsgewicht, Geburtslänge, Kopfumfang bei Geburt, aktuelles Gewicht und aktuelle Größe wurden die jeweiligen Perzentilen bestimmt. Die Geburtsperzentilen wurden anhand der Perzentilen nach *Voigt et al.*<sup>76,77</sup>, die aktuellen Perzentilen gemäß der *KiGGS-Perzentilen*<sup>77,78</sup> ermittelt.

In Zusammenarbeit mit dem *Institut für Rechtsmedizin der Humboldt-Universität (Charité)* in Berlin konnte außerdem die Frage der Zygotität anhand einer DNA-Analyse im Rahmen der Arbeit des *Kompetenznetz Angeborene Herzfehler e.V.* sicherstellend geklärt werden. Auch hierfür wurden die Zwillinge, bzw. deren Erziehungsberechtigten ärztlich aufgeklärt und es erfolgte eine schriftliche Einwilligung. Die Einverständniserklärungen liegen dem *Kompetenznetz Angeborene Herzfehler e.V.* vor. Die Proben wurden anonymisiert bearbeitet. Dabei wurden monozygote von

dizygoten Zwillingen unterschieden. Von dizygoten Zwillingen spricht man, wenn Zwillinge aus einer diamnioten, dichorialen Schwangerschaft hervorgehen, was bedeutet, dass jeder Embryo seine eigene Fruchthöhle und Plazenta besitzt. Diamniote, dichoriale Schwangerschaften, welche 76 % aller Zwillingsschwangerschaften ausmachen, können aber ebenfalls aus einer Eizelle entstehen und machen damit 20 % aller monozygoten Zwillingsschwangerschaften aus.<sup>79</sup> Von Monozygotie spricht man beim Auftreten nur einer gemeinsamen Fruchthöhle und Plazenta (monoamniot, monochorial) und einer jeweils eigenen Fruchthöhle beim Vorkommen einer gemeinsamer Plazenta (diamniot, monochorial). Diamniote, monochoriale Zwillingsschwangerschaften stellen dabei mit 70 - 75 % den größten Anteil der Monozygotie dar.<sup>80,81</sup>

## 5.2 Materialien

Alle Materialien, die für diese Studie an der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg/Saarland verwendet wurden sind in den unten stehenden Tabellen aufgelistet.

Set	Hersteller
RNase - Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
PAXgene Blood miRNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer Assay	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Reverse Transkriptase Kit	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
SensiSMART™ SYBR Green Master Mix	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
<i>mi</i> Script Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>mi</i> Script Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>mi</i> Script SYBR Green Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
SurePrint G3 Human r21 miRNA microarray	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Hyb labeling Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

**Tabelle 2:** Übersicht über die verwendeten Sets

Einwegmaterialien	Hersteller
PAXgene blood RNA tubes	PreAnalytiX, A QIAGEN / BD, Schweiz
Flügelvenenpunktionskanülen	
Eppendorf PCR tubes 0.2ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf PCR tubes 1.5ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf PCR tubes 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 filtertips 10 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA
Sterile filtertips 1000 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA
Sterile filtertips 20 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA
Sterile filtertips 200 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA
QIAcube reagent bottles, 30 ml	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube reagent bottle rack	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube rotor adapters (10 x 24)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube sample tubes RB (2 ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube filtertips 200µl	Qiagen, Hilden, Deutschland
Genexpression Wasch-Paket	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Pack of 5 Backings, 8 HD Arrays/Slide	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

**Tabelle 3:** Übersicht über verwendete Einwegmaterialien

Apparaturen	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Bench-top Zentrifuge	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Bench-top refrigerated Zentrifuge	Eppendorf GmbH, Hamburg
Gefrierschrank - 20°C	Sanyo, Osaka, Japan
Gefrierschrank -70°C	Sanyo, Osaka, Japan
Hybridisationskammer	Agilent Technologies, Waldbronn
Hybridizationovenandrotator	Agilent Technologies, Waldbronn
Microarray Scanner	Agilent Technologies, Waldbronn
NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Computer	DELL, USA
PipetmanGilson	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Life Technologies, Darmstadt
TProfessionalbasicgradient 96 thermocycler	Biometra GmbH, Goettingen
Vacuumzentrifuge	Uniequip, Martinsried, Deutschland
QIAcuberobot	Qiagen, Hilden, Deutschland Uniequip, Martinsried
QIAgility	Qiagen, Hilden, Deutschland Uniequip, Martinsried

**Tabelle 4:** Übersicht über verwendete Apparaturen

Software	Herausgeber
Agilent 2100 Expert softwareversionB.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 2.2.2	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 5:** Übersicht über verwendete Softwares

miRNAqRT-PCR Primer	miRNA Sequenz: 5'
hsa-miR-432-3p	CUGGAUGGCUCCUCCAUGUCU
hsa-miR-764	GCAGGUGCUCACUUGUCCUCCU
hsa-miR-134-3p	CCUGUGGGCCACCUAGUCACCAA
hsa-miR-627-5p	GUGAGUCUCUAAGAAAAGAGGA
hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
hsa-miR-454-5p	ACCCUAUCAAUUUGUCUCUGC
hsa-miR-340-3p	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC
hsa-miR-766-3p	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
hsa-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
hsa-miR-374b-5p	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG
hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-7-1-3p	CAACAAAUCACAGUCUGCCAUA
hsa-miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
hsa-miR-361-3p	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU

miRNAqRT-PCR Primer	miRNA Sequenz: 5'
hsa-miR-197-3p	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC
hsa-miR-328-3p	CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU
hsa-miR-625-5p	AGGGGGAAAGUUCUAUAGUCC
hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
hsa-miR-144-5p	GGAUAUCAUCAUAUACUGUAAG
U6 snRNA	Endogene Kontrolle

**Tabelle 6:** Übersicht über verwendete miRNA-Primer für die qRT-PCR

## 5.3 Methodik

### 5.3.1 DNA-Analyse

Am *Institut für Rechtsmedizin der Humboldt-Universität (Charité)* in Berlin wurde von 16 Zwillingspaaren unter Verwendung des AmpFISTR Identifier/NGMSelect PCR-Kits (Fa. Applied Biosystems, Forster City, California, USA) und dem Amelogenin-System die Zygotität geklärt. Hierfür erfolgte die Extraktion der DNA aus Probandenblut unter Verwendung des ReliaPrep™ Large Volume HAT gDNA-Isolierungssystems (Promega, Mannheim, Deutschland). Die Integrität, Reinheit und Konzentration der DNA wurde durch eine 0,8%ige-Agarosegel-Elektrophorese und eine anschließende Spektrophotometrie bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bewertet. Anschließend wurde die Zygotität mittels der 22 short tandem repeat (STR) Loci D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S11, D1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33, D7S820, CSF1PO, D13S317, TPOX und D5S818 bestätigt. Die PCR-Produkte wurden durch einen ABI capillary sequenzer aufgetrennt und mithilfe der GeneMapper ID Software (Applied Biosystems) bestimmt.

Von drei Zwillingspaaren, die an der Studie teilnahmen, lagen keine entsprechenden Blutproben zur DNA-Analyse vor.

### 5.3.2 Probengewinnung

Zur Bestimmung der microRNA (miRNA) wurde den Zwillingen jeweils 2,5 ml Vollblut mithilfe einer Flügelvenenpunktionskanüle in eine Einmalspritze entnommen und in ein PAXgene™ Blood RNA Tube von PreAnalytiX GmbH gegeben. Anschließend wurde das PAXgene Blood RNA Tube exakt nach Herstelleranweisungen unter Verwendung des PAXgene Blood miRNA Kits weiterverarbeitet. Das PAXgene Blood RNA Tube enthält eine Lösung zur Stabilisierung und Aufreinigung qualitativ-hochwertiger RNA bestehend aus >18 Nukleotiden, zu welchen auch die miRNA zählt. So konnte der Abbau von RNA-Molekülen durch RNasen verhindert und die ex-vivo-Veränderungen der Genexpression minimiert werden. Nach der Blutentnahme wurde das PAXgene RNA Tube 10 x geschwenkt, um die Stabilisierungslösung mit dem Probandenblut zu vermischen. Die Proben wurden aufrechtstehend 24 - 72 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, um eine vollständige Lyse der Blutzellen sicherzustellen, bevor sie bei -20 °C eingefroren wurden, wodurch die zelluläre RNA bis zu acht Jahre verfügbar gemacht wird.

### 5.3.3 Isolation von RNA, inklusive der microRNA

Für die Isolierung der RNA wurden die Proben zunächst wie empfohlen bei Raumtemperatur für 16 Stunden aufgetaut, um bessere Ergebnisse zu erhalten. Anschließend wurden die Proben bei 3000 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert, bevor 4 ml RNase-freies Wasser auf die Pellets pipettiert wurde. Die vollständige Auflösung der Pellets erfolgte mithilfe des Vortexmixers. Im Folgenden wurde nach erneutem Zentrifugieren bei 3000 x g der entstehende Überstand entfernt. Nach Zugabe von 350 µl Resuspendierungspuffer und erneuter Durchmischung mithilfe des Vortexers wurde die nun gelöste Probe in ein 2 ml Reaktionsröhrchen pipettiert und im QIAcube™ Roboter (Qiagen, Hilden) platziert. Der weitere Vorgang der RNA Isolation wurde entsprechend der Herstellerangaben, die im PAXgene miRNA Blood Kit zu finden sind, durchgeführt. Der QIAcube™ Roboter (Qiagen, Hilden) übernahm dabei die vollautomatisierte Filtration und Pipettierung. Die Mikrozentrifugenröhrchen mit der aufgereinigten RNA wurden nach Abschluss der Isolierung umgehend auf Eis gelagert.

#### 5.3.4 Validierung der Qualität und Quantität der RNA

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde beurteilt, um sicherzustellen, dass die isolierte RNA über eine ausreichende Qualität und Quantität zum späteren Labeling und zur Hybridisierung im Rahmen der miRNA-Profilanalyse und der anschließend folgenden qRT-PCR-Validierungsanalyse verfügte. Dies erfolgte unter Verwendung des NanoDrop-2000/2000c Spectrophotometers (ThermoScientific). Dabei wurde die Absorption der Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen und das photospektrometrische Verhältnis detektiert. Im ersten Schritt erfolgte hierbei die Eichung des Geräts anhand einer ersten Messung mit RNase-freiem Wasser. Die Bestimmung der RNA-Konzentration folgte in einer zweiten Messung in der Einheit ng/µl. Zudem wurde mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers die Qualität der RNA validiert. Auch hier wurde entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen, die im Folgenden zusammengefasst sind. Die Gesamt-RNA wurde zunächst auf eine Konzentration von 1 ng/µl mit Nuklease-freiem Wasser angepasst. 1 µl der entstandenen Probe wurde auf einen RNA-Nano-Chip pipettiert. Mittels gelgefüllter Mikrokapilarelektrophorese wurde die RNA-Qualität anschließend anhand der laserinduzierten Fluoreszenz mit dem Agilent-2100-Bioanalyzer analysiert. Die Analyse der RNA-Integrität wurde unter Verwendung der 2100 Expert Software Version B.02.02 durchgeführt. Nach etwa 30 Minuten wurden die RNA-Konzentration und die RNA-Integritätszahl (RIN) für jede Probe angezeigt. Die RIN wurde von 1 bis 10 quantifiziert und zeigte das Ausmaß der RNA-Fragmentierung.

#### 5.3.5 Analyse des microRNA Microarray Assays

Die Expressionsprofile von 2549 miRNAs wurden mithilfe des SurePrint G3 Human miRNA r21 MicroArray Kits von Agilent gemäß den Empfehlungen des Herstellers in den folgenden Analysen gemessen.

Es wurden in allen Vergleichen allein die miRNAs aufgeführt, die einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert <0,05 und einem Fold Change (FC) >1,5 aufwiesen.

Das Hyb Labeling Kit generierte fluoreszenzmarkierte miRNA aus 100 ng Gesamt-RNA. Diese Methode beinhaltet die Ligation eines Cyanin-3-pCp-Moleküls an das 3'-Ende eines RNA-Moleküls und wird im Folgenden kurz erläutert.

Zunächst erfolgte die Dephosphorylierung von 100 ng RNA durch Zugabe von 2 µl 100 %iger Dimethylsulfoxid (DMSO) und 2 µl der MasterMix-Lösung. Anschließend wurde die Probe im Thermocycler bei 37 °C inkubiert und es wurde erneut 2,8 µl DMSO hinzugefügt. Für die Denaturierung der RNA wurde die Temperatur im Thermocycler auf 99 °C erhöht. Zur denaturierten RNA wurde ein Ligations-Master-Mix gegeben, welcher RNA Ligase Puffer, Cyanin3-pCp und RNA Ligase enthielt. Nach Trocknung der Proben in der Vacuumzentrifuge wurden die Proben mit 1 µl Hyb-Spike-In Lösung, 17 µl Nuklease-freiem Wasser, 4,5 µl Blocking Agent und 22,5 µl Hi-RPM Hybridisationspuffer versetzt, um sie auf die Hybridisation vorzubereiten. Die Proben wurden für 20 Stunden in der Hybridisierungskammer bei 55 °C inkubiert, bevor die Arrays verschiedene Waschgänge nach Herstellerangaben durchliefen. Anschließend wurden sie getrocknet und im Agilent G2565BA Scanner gescannt. Die Erhebung der Daten wurde mit der Agilent AGW Feature Extraction Software Version 10.10.11 durchgeführt.

### 5.3.6 Reverse Transkription und qRT-PCR der signifikanten microRNAs verschiedener Vergleichsgruppen

Die Validierung der Ergebnisse der MicroArray Analyse erfolgte durch die qRT-PCR (= quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion) im StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Hierfür wurden solche miRNAs ausgewählt, die im MicroArray signifikante Ergebnisse zeigten oder deren Bedeutung in der kongenitalen Herzentwicklung bereits bekannt ist.

Da DNA das Substrat der Polymerasekettenreaktion darstellt, wurde die extrahierte RNA erst in komplementäre cDNA-Sequenzen umgeschrieben. Dieser Vorgang wurde durch die Reverse Transkription ermöglicht, bei der das Enzym Reverse Transkriptase als Katalysator dient. Hierzu wurde die isolierte RNA zunächst aufgetaut und die erforderliche RNA-Konzentration durch erneute Messung mithilfe des Nano-Drop ND-2000c Spectrophotometers bestätigt. Anschließend wurden je 125 µg Template-RNA zu 4 µl EPIK 5x RT Puffer, je 0,4 µl der Reverse Transcriptase Primer Assays und 1 µl EPIK RT Enzyme gegeben und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl verdünnt. Die Reagenzien wurden durch Vortexen gemischt, anschließend zentrifugiert und für 30 Minuten bei 42 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine

5-minütige Temperaturerhöhung auf 90 °C, bevor die synthetisierte cDNA (complementary DNA) bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert wurde.

Ziel der anschließend folgenden qRT-PCR war es wie bei allen Polymerasekettenreaktionen durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide (= Primer, Sonden) genau definierte Genabschnitte durch Amplifikation dieser nachzuweisen. In dieser Studie wurden die Primer der folgenden miRNAs zur Validierung der entsprechenden microArray-Ergebnisse verwendet: miR-432-3p, miR-764, miR-134-3p, miR-627-5p, miR-30a-5p, miR-454-5p, miR-340-3p, miR-766-3p, miR-27a-3p, miR-148b-3p, miR-374b-5p, miR-29b-3p, miR-7-1-3p, miR-148a-3p, miR-99a-5p, miR-361-3p, miR-197-3p, miR-328-3p, miR-625-5p, miR-183-5p und miR-144-5p. U6 snRNA wurde als Kontrolle verwendet.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde die cDNA zunächst aufgetaut und mit DEPC-Wasser 1:10 verdünnt. Mithilfe des Systems QIAgility, das der automatischen Pipettierung dient, wurden 10 µl 2x SensiSMART™ PCR MasterMix, 5 µl verdünnte cDNA, 2 µl PCR Primers und 3 µl Nuklease-freies Wasser auf die Reaktionsplatten pipettiert. Anschließend wurde die Reaktionsplatte bei 200 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und im StepOnePlus™ Real-Time PCR System platziert.

Der Mastermix enthielt das Agenz SYBR Green, welches in ungebundener Form in der Reaktionslösung nur eine sehr schwache Fluoreszenz aufweist, die sich jedoch bei Interaktion mit doppelsträngiger DNA im Laufe der Amplifikation deutlich verstärkt. Das dabei fluoreszierende Signal, welches eine bestimmte Wellenlänge emittiert wurde registriert. Das Agenz SYBR Green besitzt sein Emissionsmaximum zwischen 494 und 521 nm.

Die PCR startete mit einem Aktivierungszyklus, bei welchem die Reagenzien erst auf 95 °C für 10 min erhitzt wurden und anschließend auf 40 °C für 5 min abgekühlt wurden. Die anschließenden 40 Zyklen umfassten jeweils folgende Schritte: Denaturierung (95 °C für 10 Sekunden), Anlagerung und Extension (60 °C für 30 Sekunden).

Die Signaldetektion der dabei emittierten Fluoreszenz konnte bei jeder PCR in vier Phasen unterteilt werden. Bei der ersten Phase handelt es sich um die baseline, in welcher noch keine fluoreszierenden Signale wahrgenommen werden können. Der Anfang der exponentiellen Wachstumsphase wird als C<sub>T</sub> (cycle threshold) bezeichnet.

Ab diesem theoretisch festgelegten Startpunkt kann ein deutlicher Fluoreszenzsignalanstieg detektiert werden, welcher in der folgenden linearen Phase durch Mangel an verbleibenden Reagenzien schwächer wird und in der Plateauphase schließlich stagniert. Die Besonderheit der qRT-PCR besteht darin, dass die Quantifizierung der dabei entstehenden DNA durch Einsatz der fluoreszierenden Farbstoffe bereits während der exponentiellen Phase ermöglicht wird und damit in Echtzeit erfolgt. Herkömmliche PCRs lassen diese Messung erst nach Abschluss der Amplifikation anhand einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente zu, welche im Rahmen der qRT-PCR bei Bedarf ebenfalls durchgeführt werden kann. Die Fluoreszenzmessungen, die bereits während der Amplifizierung durchgeführt werden, geben proportional zu Ihrer Intensität Aufschluss über die Anzahl der PCR-Produkte.

Die anschließende Analyse der Daten erfolgte mit der SDS Relative Quantification Software Version 2.3.

Bei gleicher Expressionsrichtung der miRNA in der qRT-PCR wie im MicroArray und signifikantem p-Wert und Fold Change ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) gilt die miRNA als signifikant validiert.

### 5.3.7 Reverse Transkription und qRT-PCR der signifikanten microRNAs in monozygoten Zwillingen

Die signifikanten Ergebnisse der monozygoten Zwillinge wurden aufgrund der großen Bedeutung der Zygotität beim Vorkommen von AHF separat unter Verwendung des *miScript* PCR Systems (Qiagen, Hilden) erneut validiert. Auch diese Validierung erfolgte durch die qRT-PCR im StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Zur reversen Transkription wurde das *miScript* Reverse Transcriptase Set nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde aus 200 ng RNA mithilfe des *miScript* RT II Kits komplementäre DNA (= cDNA) generiert. Dazu wurden 200 ng RNA, welche die miRNA enthielt, mit 4 µl HiSpec Puffer, 2 µl *miScript* Reverse Transcriptase Mix und RNase-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl vermischt. Die entstehende cDNA wurde 1:10 verdünnt und mit 10 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 µl *miScript* Universal Primer und 2 µl *miScript* Primer Assay für die elf ausgewählten miRNAs miR-511-3p, miR-1306-5p, miR-421, miR-134-3p, miR-4707-3p, miR-4732-3p, miR-1281, miR-6511a-3p, miR-5189-3p, miR-943, miR-890 und RNU6B snRNA

als endogene Kontrolle (Qiagen) und RNase-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Die genannten miRNAs wurden aufgrund ihres unterschiedlichen Expressionsniveaus im Vergleich monozygoter Zwillinge mit und ohne AHF ausgewählt.

Alle qRT-PCR-Experimente wurden unter Verwendung des QIAgility™ automatisierten PCR-Setup-Roboters (Qiagen) durchgeführt, bevor die qRT-PCR-Analyse mittels StepOnePlus™-Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems, Foster City, USA) erfolgt.

### 5.3.8 Statistische Analyse

Die Unterschiede der miRNA-Expression im Blut der verschiedenen Probandenkollektive wurden mit der frei erhältlichen R Software v.2.14.2 (R Development Core Team, 2010) analysiert. Dabei wurden Unterschiede in der microRNA-Expression der ausgewählten miRNAs mit der  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  Methode wie von *Livak et al.*<sup>82</sup> dargestellt, gemessen. Dabei wurde für alle Proben je der Ct-Wert (threshold cycle) ermittelt. Die Differenz  $\Delta C_t$  des Ct-Werts jeder miRNA und des Ct-Werts der endogenen Kontrolle (U6 snRNA) wurde berechnet, also:  $\Delta C_t = C_{t(\text{Ziel-miRNA})} - C_{t(\text{U6 snRNA})}$ . Im nächsten Schritt wurde von allen  $\Delta C_t$ -Werten der Mittelwert  $\bar{x}$  ermittelt. Der Wert  $\Delta\Delta C_t$  wurde anhand der folgenden Formel bestimmt:  $\Delta\Delta C_t = \bar{x}(\Delta C_{t(\text{Gruppe1})}) - \bar{x}(\Delta C_{t(\text{Gruppe2})})$ . Im Anschluss konnte der Fold Change (FC) aus  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  bestimmt werden. Lag der Fold Change bei  $>1,5$  wurde ein t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt, welcher die Signifikanz bei  $p < 0,05$  sicherte.

### 5.3.9 Prädiktion von Zielgenen und funktionelle Analyse

Unter Verwendung der DIANA-miRPath v.3.0 Software wurden KEGG-Pathway-Analysen durchgeführt, wodurch die Zielgene der miRNAs anhand des DIANAmicroT-CDS-Algorithmus vorhergesagt werden konnten (in CDS oder 3'-UTR-Regionen).<sup>83</sup> Zielgene mit einem threshold  $>0,8$  wurden ausgewählt. Nur KEGG-Pathways mit einem p-Wert  $<0,05$  und einer False discovery rate (FDR)  $<0,05$  wurden herangezogen. Die Wirkung der miRNAs auf ihre Zielgene wurde mit der miRTarget Link Software ausgewertet.<sup>84</sup>

### 5.3.10 Analyse klinischer Daten

Die Analyse der klinischen Daten erfolgte rein deskriptiv. Die Daten wurden mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics (IBM® Corp., Released 2016 IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp., USA) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als absolute Zahl, Mittelwert und Standardabweichung (SD) angegeben. Vergleiche zwischen Variablen erfolgten durch den t-Test für unabhängige Variablen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Klinische Daten

In den folgenden Tabellen 7 - 17 sind die klinischen Merkmale der Patientenpopulation aufgeführt.

#### Geschlecht

	Häufigkeit	Prozent
weiblich	22	57,9
männlich	16	42,1
Gesamt	38	100,0

**Tabelle 7:** Häufigkeit von weiblichen und männlichen Probanden

#### Altersklassen

	Häufigkeit	Prozent
Kleinkind	12	31,6
Kind	20	52,6
Jugendliche(r)	4	10,5
Erwachsene(r)	2	5,3
Gesamt	38	100,0

**Tabelle 8:** Einteilung in Altersklassen (Kleinkind: 1 bis 5 Jahre alt, Kind: 6 bis 13 Jahre alt, Jugendliche(r): 14 bis 17 Jahre alt, Erwachsene(r): ab 18 Jahren)

#### Schweregrade der AHF

	Häufigkeit	Prozent
kein AHF	19	50,0
milder AHF	7	18,4
moderater AHF	6	15,8
schwerer AHF	6	15,8
Gesamt	38	100,0

**Tabelle 9:** Häufigkeit der verschiedenen Schweregrade der AHF

Wie bereits im Methodikteil beschrieben wurden die AHF anhand des EPC-Codes nach *Schwedler et al.* eingeteilt.<sup>3,75</sup> Zur Gruppe der milden AHF zählten in unserer Studie neben PDA, ASD und PS zusätzlich die Koronarfistel und die bikuspidale Aortenklappe. Aus der Gruppe der moderaten AHF kamen in unserer Studie VSD, AVSD, CoA und AS vor und zudem die Mitralklappeninsuffizienz (MI). Als schwere AHF traten TOF, UVH und TGA auf.

### Konzeption

	Häufigkeit	Prozent
spontane Konzeption	26	68,4
In-vitro Fertilisation	12	31,6
Gesamt	38	100,0

**Tabelle 10:** Häufigkeit der Schwangerschaftsentstehung unterteilt in spontane Konzeption und in-vitro Fertilisation (IVF)

### Reife bei Geburt

	Häufigkeit	Prozent
Reifgeburt*	6	15,8
Frühgeburt*	32	84,2
Gesamt	38	100,0

**Tabelle 11:** Häufigkeit der Früh- und Reifgeburten (\*Reifgeburt: 37 + 0 bis 42 + 6 SSW; Frühgeburt: < 37 + 0 SSW)

Bei Betrachtung der Geburtsperzentilen fiel auf, dass mehr Kinder mit angeborenem Herzfehler dystroph (<10. Perzentile) geboren wurden als jene ohne angeborenen Herzfehler (Tabelle 12). Der Großteil der Kinder ohne angeborenen Herzfehler befand sich zwischen der 10. – 90. Perzentile sowohl das Geburtsgewicht als auch die Geburtslänge betreffend, während sich die Kinder mit angeborenem Herzfehler das Gewicht betreffend zu beinahe gleichen Teilen auf die dystrophe Gruppe (<10. Perzentile) und die im Mittelfeld liegende Gruppe (10. – 90. Perzentile) aufteilten.

Die Geburtslänge der Zwillinge mit angeborenen Herzfehler (Tabelle 13) teilte sich zu ¼ auf die dystrophe Gruppe (< 10. Perzentile) und zu ¾ auf die normotrophe Gruppe auf (10. – 90. Perzentile). Hier stellte sich der Unterschied weniger deutlich dar.

Bei Betrachtung des Kopfumfangs bei Geburt zeigte sich, dass Zwillinge mit AHF häufiger unter der 10. Perzentile liegen als die jene ohne AHF. (Tabelle 14)

### Perzentilen des Geburtsgewichts

			Anzahl
Kein AHF	Geburtsperzentile des Gewichts	< 10. Perzentile	2
		10. - 90. Perzentile	15
		> 90. Perzentile	1
AHF	Geburtsperzentile des Gewichts	< 10. Perzentile	8
		10. - 90. Perzentile	10
		> 90. Perzentile	1

**Tabelle 12:** Perzentilen des Geburtsgewichts der Zwillinge mit und ohne AHF

### Perzentilen der Geburtslänge

			Anzahl
Kein AHF	Geburtsperzentile der Länge	< 10. Perzentile	0
		10. - 90. Perzentile	18
		> 90. Perzentile	0
AHF	Geburtsperzentile der Länge	< 10. Perzentile	5
		10. - 90. Perzentile	14
		> 90. Perzentile	0

**Tabelle 13:** Perzentilen der Geburtslänge der Zwillinge mit und ohne AHF

### Perzentilen des Geburtskopfumfangs

			Anzahl
Kein AHF	Geburtsperzentile des Kopfumfangs	<10. Perzentile	2
		10. - 90. Perzentile	14
		>90. Perzentile	0
AHF	Geburtsperzentile des Kopfumfangs	<10. Perzentile	7
		10. - 90. Perzentile	10
		>90. Perzentile	0

**Tabelle 14:** Perzentilen des Geburtskopfumfangs der Zwillinge mit und ohne AHF

Zum Zeitpunkt der aktuellen Datenerhebung waren die Zwillinge unterschiedlich alt. Es fällt auf, dass sich die Verteilung im Vergleich zu den Geburtsperzentilen kaum geändert hat und Zwillinge mit AHF immer noch häufiger dystroph sind als jene ohne AHF.

**Perzentilen des aktuellen Gewichts**

			Anzahl
Kein AHF	aktuelle Perzentile des Gewichts	fehlende Angabe	1
		<10. Perzentile	3
		10. - 90. Perzentile	15
		>90. Perzentile	0
AHF	aktuelle Perzentile des Gewichts	fehlende Angabe	1
		<10. Perzentile	8
		10. - 90. Perzentile	10
		>90. Perzentile	0

**Tabelle 15:** Perzentilen des aktuellen Gewichts der Zwillinge mit und ohne AHF**Perzentilen der aktuellen Größe**

			Anzahl
Kein AHF	aktuelle Perzentilen der Größe	fehlende Angabe	1
		<10. Perzentile	3
		10. - 90. Perzentile	15
		>90. Perzentile	0
AHF	aktuelle Perzentilen der Größe	fehlende Angabe	1
		<10. Perzentile	7
		10. - 90. Perzentile	10
		>90. Perzentile	1

**Tabelle 16:** Perzentilen der aktuellen Größe der Zwillinge mit und ohne AHF

Bei Betrachtung des Auftretens von Risikofaktoren fiel auf, dass in 16 der 19 Schwangerschaften (84,2%) mindestens ein Risikofaktor oder eine pränatale Auffälligkeit auftrat. Meist waren auch mehrere solcher vorhanden. Neben der von uns speziell erfragten Daten wurden noch weitere Auffälligkeiten genannt. Dabei handelte es sich um aufgetretene Blutungen während der Schwangerschaft, Vorliegen eines Uterus myomatosus, Zervixinsuffizienz, mütterliche Hypothyreose, Wachstumsdiskrepanz der Feten ohne erinnerlichen Nachweis eines FFTS, vermehrte psychische Belastung und partieller oder kompletter Situs inversus eines Feten. Die aufgeführten Daten beruhen auf den Auskünften der Zwillingeltern. Da die Schwangerschaften teilweise schon länger zurückliegen, waren nicht alle Informationen erinnerlich. Daher können

wir nicht ausschließen, dass noch weitere Risiken oder pränatale Auffälligkeiten aufgetreten sind. Auch wenn es sich hierbei um ein breites Ausprägungsfeld handelt, wird deutlich, dass das Auftreten von AHF in Zwillingsschwangerschaften mit dem Vorliegen von anderen SS-Auffälligkeiten korreliert (Tabelle 17).

### Risikofaktoren und Auffälligkeiten in der Schwangerschaft

	Häufigkeit	Prozent
Nikotinabusus in der SS	4	21,1
Gestationsdiabetes	3	15,8
Hypertonus	2	10,5
Singuläre Umbilikalarterie	2	10,5
HELLP	0	0
FFTS	4	21,1
Plazentainsuffizienz	0	0
Sonstige Auffälligkeiten	10	52,6

**Tabelle 17:** Häufigkeit des Auftretens von Risikofaktoren und Auffälligkeiten in den Schwangerschaften

## 6.2 DNA-Analyse zum Nachweis der Zygotität

Von den in diese Pilotstudie eingeschlossenen 19 Zwillingspaaren konnten durch die Zusammenarbeit mit dem *Institut für Rechtsmedizin der Humboldt-Universität (Charité)* in Berlin zwölf Zwillingspaare als monozygot und vier als dizygot identifiziert werden. Obwohl von drei an der Studie teilnehmenden Zwillingspaaren keine entsprechenden Blutproben zur DNA-Analyse vorlagen, konnten sie aufgrund der unterschiedlichen Geschlechter eines Zwillingspaars sicher der dizygoten Gruppe zugeordnet werden (Tabelle 18). Die genauen Auswertungen der DNA-Analyse mittels STR-Analyse sind im Anhang zu finden (Anlage 4).

**Zygosität**

	Häufigkeit	Prozent
monozygot	24	63,2
dizygot	14	36,8
Gesamt	38	100,0

**Tabelle 18:** Häufigkeiten von monozygoten und dizygoten Zwillinge

## 6.3 MicroRNA-Expressionsprofile

### 6.3.1 Ergebnisse der MicroArrays

Es wurden in den meisten Vergleichen allein die miRNAs aufgeführt, die einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert  $<0,05$  und einem Fold Change (FC)  $>1,5$  aufwiesen. Lediglich beim Vergleich der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF wurden ebenfalls grenzwertig signifikante miRNAs aufgeführt ( $p <0,05$ ;  $FC >1,3$ ), da wir diesen Vergleich bei der anschließenden Validierung gesondert betrachteten. Die übrigen Ergebnisse des MicroArrays der monozygoten Zwillinge sind in Anlage 5 aufgeführt.

Die erste Analyse der miRNA-Expressionsprofile erfolgte anhand des Blutes der Zwillinge mit AHF zu jenen ohne AHF. Die miRNA-Expression der je 19 Blutproben ( $n_{\text{„ohne AHF“}} = 19$  und  $n_{\text{„AHF“}} = 19$ ) unterschied sich signifikant in vier miRNAs, von welchen miR-4669 und miR-890 bei den Kindern mit AHF vermehrt und miR-487b-5p und miR-4730 vermindert exprimiert wurden ( $p <0,05$ ,  $FC >1,5$ ) (Tabelle 19.1A).

Eine weitere miRNA-Analyse erfolgte im Blut der zwölf Zwillingspaare, die durch spontane Konzeption entstanden ( $n_{\text{„spontane Konzeption“}} = 24$ ) und der Zwillinge aus Schwangerschaften nach erfolgter IVF-Behandlung ( $n_{\text{„IVF“}} = 14$ ). Dabei konnten elf miRNAs ermittelt werden, die einen signifikanten Unterschied aufwiesen. Von den elf detektierten miRNAs wurden in der Gruppe der durch IVF entstandenen Schwangerschaften fünf miRNAs vermehrt und sechs vermindert exprimiert. Auch die Analyse der Expressionsprofile der miRNAs aller früh- und reifgeborenen Zwillinge wies deutliche Differenzen auf ( $p <0,05$ ,  $FC >1,5$ ) (Tabelle 19.1B). In der Kohorte der Frühgeborenen konnten 15 miRNAs bestimmt werden, die eine vermehrte Expression im Vergleich zu der Gruppe der Reifgeborenen aufwiesen ( $p <0,05$ ,  $FC >1,5$ ) (Tabelle 19.1C).

Auch in der Analyse der Zwillinge mit unterschiedlicher Zygotität konnten verschiedene miRNAs mit signifikant verändertem Expressionsniveau detektiert werden. Die Anzahl der veränderten miRNAs variierte abhängig vom Vorkommen eines AHFs. Dabei wiesen dizygoten Zwillinge mit AHF sechs vermindert exprimierte miRNAs im Vergleich zu monozygoten Zwillingen mit AHF auf ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) (Tabelle 19.1D), während dizygoten Zwillinge ohne AHF lediglich zwei herunterregulierte und ein hochreguliertes miRNA-Expressionsprofil im Vergleich zu monozygoten Zwillingen ohne AHF aufwiesen ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) (Tabelle 19.1E). Es handelte sich in den beiden genannten Vergleichen um unterschiedliche miRNAs. In der Analyse aller dizygoten zu allen monozygoten Zwillingen ohne Berücksichtigung des Vorhandenseins eines AHFs konnten sechs miRNAs bestimmt werden, die über ein signifikant verändertes Expressionsprofil verfügten ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) (Tabelle 19.1F). Vier dieser veränderten miRNAs konnten ebenfalls unter den verändert exprimierten miRNAs der bereits genannten Vergleiche der dizygoten Zwillingen mit AHF versus der monozygoten Zwillinge mit AHF und der dizygoten Zwillinge ohne AHF versus der monozygoten Zwillinge ohne AHF gefunden werden. Es handelte sich dabei um die vermehrt exprimierte miRNA miR-627-5p und die vermindert exprimierten miR-766-3p und miR-197-3p in der Analyse der Zwillinge ohne AHF mit unterschiedlicher Zygotität und um die verminderte Expression der miR-4323 im Vergleich der Zwillinge mit AHF mit unterschiedlicher Zygotität.

Ein weiterer Unterschied der miRNA-Expression konnte außerdem unter Berücksichtigung des Geschlechts beobachtet werden. In der Analyse aller weiblichen zu allen männlichen Kindern wurden sechs miRNAs identifiziert, von welchen eine miRNA signifikant vermehrt und fünf weitere miRNAs signifikant vermindert exprimiert wurden ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) (Tabelle 19.1G). Bei der Analyse der weiblichen Kinder mit AHF zu den weiblichen Kindern ohne AHF konnten mittels des MicroArrays fünf miRNAs detektiert werden, von welchen drei vermehrt und zwei vermindert exprimiert wurden ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) (Tabelle 19.1I). Ähnlich war die Anzahl signifikanter miRNAs beim Vergleich männlicher Kinder mit AHF zu männlichen Kindern ohne AHF, wobei zwei vermehrt und zwei vermindert exprimierte miRNAs detektiert werden konnten ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) (Tabelle 19.1H).

Zudem wurde die miRNA-Expressionsunterschiede der monozygoten Zwillinge ohne AHF zu den monozygoten Zwillingen ohne AHF bewertet. Dabei konnten vier signifikant vermindert exprimierte und vier signifikant vermehrt exprimierte miRNAs detektiert werden ( $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ) (Tabelle 19.2J). Weitere miRNAs wurden grenzwertig signifikant verändert exprimiert ( $p < 0,05$ ;  $FC > 1,3$ ).

Alle signifikanten miRNAs der genannten Vergleiche und einige grenzwertig signifikant exprimierten miRNAs des Vergleichs der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF sind in den Tabellen 19.1 und 19.2 mit ihren Expressionsrichtungen, Fold Changes und p-Werten aufgelistet.

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regulation	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------	-------------	-----------------	-------------	------------	-------------	--------

A) Vergleich aller Zwillinge mit AHF ( $n_{\text{mit AHF}} = 19$ ) (Gruppe 1) zu denen ohne AHF ( $n_{\text{ohne AHF}} = 19$ ) (Gruppe 2)

miR-4669	8,02	2,55	4,88	1,56	Up	1,64	0,0431
miR-890	1,25	0,17	0,82	0,25	Up	1,52	0,0022
miR-4730	2,72	0,49	5,27	2,57	Down	1,94	0,0159
miR-487b-5p	1,89	0,35	2,89	0,99	Down	1,53	0,0432

## Ergebnisse

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regula- tion	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------------	-------------------	-----------------------	-------------------	-----------------	----------------	--------

B) Vergleich der aus Schwangerschaften nach erfolgter IVF-Behandlung ( $n_{\text{IVF}} = 12$ ) (Gruppe 1) zu denen nach spontaner Konzeption ( $n_{\text{spontane Konzeption}} = 26$ ) (Gruppe 2) entstandenen Zwillingen

miR-627-5p	6,83	2,39	3,95	2,54	Up	1,72	0,0206
miR-30a-5p	15,53	6,58	9,18	6,64	Up	1,69	0,0460
miR-454-5p	9,04	3,82	5,40	4,46	Up	1,67	0,0230
miR-340-3p	25,67	9,31	16,55	12,58	Up	1,56	0,0325
miR-191-5p	19,97	5,37	13,12	7,07	Up	1,52	0,0270
miR-6739-5p	5,36	9,72	10,27	45,72	Down	1,92	0,0038
miR-1228-5p	0,71	0,31	1,14	0,97	Down	1,61	0,0067
miR-144-5p	5,41	2,87	8,67	10,58	Down	1,60	0,0090
miR-766-3p	35,50	11,78	54,70	23,05	Down	1,54	0,0078
miR-3135b	15,39	7,00	23,64	65,66	Down	1,54	0,0076
miR-4507	37,55	18,20	57,60	34,33	Down	1,53	0,0168

## Ergebnisse

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regula- tion	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------------	-------------------	-----------------------	-------------------	-----------------	----------------	--------

C) Vergleich aller frühgeborenen (n<sub>„Frühgeburt“</sub> = 32) (Gruppe 1) zu allen reifgeborenen Zwillingen (n<sub>„Reifgeburt“</sub> = 6) (Gruppe 2)

miR-27a-3p	12,03	10,14	5,81	4,01	Up	2,08	0,0052
miR-183-5p	44,20	27,57	22,91	16,56	Up	1,92	0,0171
miR-148b-3p	20,80	14,98	11,36	4,86	Up	1,82	0,0014
miR-374b-5p	23,19	25,29	12,96	10,97	Up	1,79	0,0327
miR-183-3p	5,60	2,53	3,24	0,80	Up	1,72	0,0002
miR-4291	3,86	1,67	2,24	0,96	Up	1,72	0,0155
miR-29b-3p	10,16	5,28	5,97	3,55	Up	1,69	0,0430
miR-3200-3p	6,57	3,45	3,97	1,53	Up	1,67	0,0047
miR-7-1-3p	7,47	6,70	4,56	1,22	Up	1,64	0,0005
miR-101-3p	8,58	6,17	5,28	3,17	Up	1,61	0,0296
miR-148a-3p	14,41	16,07	9,07	3,31	Up	1,59	0,0012
miR-99a-5p	9,85	8,63	6,24	2,88	Up	1,59	0,0229
miR-625-5p	62,76	35,95	39,98	15,19	Up	1,56	0,0037
miR-27b-3p	5,31	3,69	3,42	0,77	Up	1,56	0,0001
miR-550a-3-5p	47,40	19,45	30,45	10,88	Up	1,56	0,0112

## Ergebnisse

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regulation	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------	-------------	-----------------	-------------	------------	-------------	--------

D) Vergleich der dizygoten Zwillinge mit AHF ( $n_{\text{dizygot mit AHF}^+} = 7$ ) (Gruppe 1) zu den monozygoten Zwillingen mit AHF ( $n_{\text{monozygot mit AHF}^+} = 12$ ) (Gruppe 2)

miR-4323	12,31	5,28	22,74	6,94	Down	1,85	0,0259
miR-551b-5p	0,44	0,20	0,80	0,17	Down	1,85	0,0107
miR-532-3p	296,81	131,79	515,68	160,65	Down	1,74	0,0437
miR-361-3p	97,65	31,48	166,92	60,86	Down	1,71	0,0290
miR-125a-5p	19,34	8,08	31,11	11,86	Down	1,61	0,0478
miR-133b	4,30	1,25	6,43	4,34	Down	1,50	0,0478

E) Vergleich der dizygoten Zwillingen ohne AHF ( $n_{\text{dizygot ohne AHF}^+} = 7$ ) (Gruppe 1) zu den monozygoten Zwillingen ohne AHF ( $n_{\text{monozygot ohne AHF}^+} = 12$ ) (Gruppe 2)

miR-627-5p	7,76	2,65	4,20	2,16	Up	1,85	0,0435
miR-197-3p	71,02	17,58	122,26	45,11	Down	1,72	0,0084
miR-766-3p	35,24	7,07	55,09	27,93	Down	1,56	0,0206

F) Vergleich aller dizygoten ( $n_{\text{dizygot}^+} = 14$ ) (Gruppe 1) zu allen monozygoten Zwillingen ( $n_{\text{monozygot}^+} = 24$ ) (Gruppe 2)

miR-627-5p	7,09	2,99	4,35	2,08	Up	1,64	0,0211
miR-1231	0,16	0,11	0,32	0,18	Down	1,95	0,0233
miR-197-3p	72,53	40,94	117,53	42,45	Down	1,62	0,0237
miR-766-3p	35,24	12,12	56,92	22,75	Down	1,62	0,0022
miR-4323	13,62	4,42	21,76	6,34	Down	1,60	0,0021
miR-328-3p	12,14	4,76	18,76	9,05	Down	1,54	0,0340

## Ergebnisse

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regulation	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------	-------------	-----------------	-------------	------------	-------------	--------

G) Vergleich aller weiblichen ( $n_{\text{weiblich}} = 22$ ) (Gruppe 1) zu allen männlichen Zwillingen ( $n_{\text{männlich}} = 16$ ) (Gruppe 2)

miR-6803-5p	92,73	57,55	58,61	38,45	Up	1,59	0,0473
miR-144-5p	6,14	5,84	11,24	14,17	Down	1,83	0,0498
miR-363-3p	284,31	139,82	491,10	184,64	Down	1,73	0,0308
miR-130a-3p	79,50	42,43	132,40	38,87	Down	1,67	0,0024
miR-892b	4,24	1,83	6,72	2,02	Down	1,59	0,0432
miR-7854-3p	1,83	0,83	2,83	0,82	Down	1,55	0,0384

H) Vergleich aller männlichen Zwillinge mit AHF ( $n_{\text{männlich mit AHF}} = 7$ ) (Gruppe 1) zu allen männlichen Zwillingen ohne AHF ( $n_{\text{männlich ohne AHF}} = 9$ ) (Gruppe 2)

miR-4669	8,02	2,55	4,88	1,56	Up	1,64	0,0431
miR-890	1,25	0,17	0,82	0,25	Up	1,52	0,0022
miR-4730	2,72	0,49	5,27	2,57	Down	1,94	0,0159
miR-487b-5p	1,89	0,35	2,89	0,99	Down	1,53	0,0432

I) Vergleich aller weiblichen Zwillinge mit AHF ( $n_{\text{weiblich mit AHF}} = 12$ ) (Gruppe 1) zu allen weiblichen Zwillingen ohne AHF ( $n_{\text{weiblich ohne AHF}} = 10$ ) (Gruppe 2)

miR-5189-3p	9,11	4,33	3,97	3,17	Up	1,72	0,0294
miR-361-5p	66,20	24,87	41,84	16,97	Up	1,59	0,0447
miR-423-3p	12,23	4,03	7,97	2,75	Up	1,54	0,0479
miR-1291	1,36	0,60	2,21	0,55	Down	1,63	0,0384
miR-103a-3p	995,09	211,91	1498,33	372,59	Down	1,51	0,0061

**Tabelle 19.1:** Durch MicroArray ermittelte, signifikant verschiedene miRNAs (Fold Change >1,5, p-Wert <0,05)

## Ergebnisse

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regula- tion	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------------	-------------------	-----------------------	-------------------	-----------------	----------------	--------

J) Vergleich aller monozygoten Zwillinge ohne AHF ( $n_{\text{monozygot ohne AHF}} = 12$ ) (Gruppe 1) zu allen monozygoten Zwillingen mit AHF ( $n_{\text{monozygot mit AHF}} = 12$ ) (Gruppe 2)

miR-7109-3p	4.28	2.27	2.37	1.63	Up	1.80	0.0278
miR-943	2.07	0.64	1.28	0.42	Up	1.61	0.0038
miR-6511a-3p	4.38	4.38	2.76	1.52	Up	1.59	0.0323
miR-6735-3p	2.73	1.66	1.81	0.72	Up	1.50	0.0329
miR-6787-3p	3.15	2.37	2.12	1.41	Up	1.49	0.0133
miR-6877-3p	4.13	1.30	2.82	0.51	Up	1.46	0.0090
miR-4296	1.50	0.44	1.04	0.51	Up	1.45	0.0459
miR-1281	7.78	16.10	5.35	9.02	Up	1.45	0.0299
miR-3677-3p	1.18	0.40	0.84	0.19	Up	1.41	0.0083
miR-4763-5p	3.68	1.71	2.66	1.05	Up	1.38	0.0360
miR-7106-3p	2.40	0.96	1.76	0.50	Up	1.37	0.0086
miR-6789-3p	2.54	0.91	1.85	0.63	Up	1.37	0.0366
miR-1825	7.09	13.02	5.19	6.84	Up	1.37	0.0481
miR-134-3p	2.43	0.56	1.78	0.36	Up	1.36	0.0064
miR-1343-3p	2.42	0.89	1.80	0.71	Up	1.35	0.0307
miR-6727-3p	2.08	0.57	1.55	0.66	Up	1.34	0.0033
miR-6736-3p	3.14	0.84	2.34	0.56	Up	1.34	0.0083
miR-8075	1.59	0.57	1.20	0.29	Up	1.33	0.0241
miR-3714	2.66	1.02	2.02	0.63	Up	1.32	0.0043
miR-6879-3p	2.66	1.04	2.02	0.79	Up	1.32	0.0250
miR-675-3p	2.42	0.67	1.84	0.69	Up	1.32	0.0292
miR-6743-3p	5.02	13.28	3.81	8.08	Up	1.32	0.0312

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regulation	Fold Change	p-Wert
miR-4800-3p	2.24	0.60	1.72	0.43	Up	1,31	0.0158
miR-5189-3p	4.33	3.48	10.39	4.01	Down	2,38	0.0176
miR-4707-3p	2.64	1.37	4.42	1.81	Down	1,67	0.0208
miR-1306-5p	4.73	2.30	7.63	2.81	Down	1,61	0.0206
miR-4732-3p	34.81	25.02	53.13	36.38	Down	1,52	0.0102
miR-3605-3p	3.62	1.19	5.22	1.42	Down	1,45	0.0447
miR-550b-2-5p	5.62	2.22	7.69	2.15	Down	1,37	0.0228
miR-511-3p	0.83	0.23	1.13	0.29	Down	1,35	0.0329
miR-890	0.87	0.28	1.17	0.18	Down	1,35	0.0309
miR-671-5p	2.47	0.95	3.31	1.16	Down	1,33	0.0385
miR-128-1-5p	2.10	0.81	2.82	0.73	Down	1,35	0.0483
miR-421	2.54	0.76	3.35	0.67	Down	1,32	0.0193

**Tabelle 19.2:** Durch MicroArray ermittelte, signifikant verschiedene miRNAs (Fold Change >1,3, p-Wert <0,05)

### 6.3.2 Validierung der microRNAs durch qRT-PCR

#### 6.3.2.1 Ergebnisse aller Vergleichsgruppen

Um die Ergebnisse des MicroArrays zu bestätigen wurden mittels qRT-PCR die 21 folgenden miRNAs validiert: miR-432-3p, miR-764, miR-134-3p, miR-627-5p, miR-30a-5p, miR-454-5p, miR-340-3p, miR-766-3p, miR-27a-3p, miR-148b-3p, miR-374b-5p, miR-29b-3p, miR-7-1-3p, miR-148a-3p, miR-99a-5p, miR-361-3p, miR-197-3p, miR-328-3p, miR-625-5p, miR-183-5p und miR-144-5p. Diese miRNAs wurden aufgrund der im MicroArray beobachteten Signifikanz (FC <1,5 und p-Wert <0,05) und der in der Literatur bereits bekannten Beteiligung an kardiovaskulären Erkrankungs-

mechanismen, zur Validierung ausgewählt. In den im Folgenden aufgeführten Vergleichen wurden die miRNAs aufgeführt, die in der qRT-PCR die gleiche Expressionsrichtung wie im MicroArray zeigten.

Die erste zu validierende Analyse der miRNA-Expressionsprofile durch die qRT-PCR erfolgte anhand der zwölf Zwillingspaare, die durch spontane Konzeption entstanden ( $n_{\text{„spontane Konzeption“}} = 24$ ) und der Zwillinge aus Schwangerschaften nach erfolgter IVF-Behandlung ( $n_{\text{„IVF“}} = 14$ ). Dabei konnten die sieben miRNAs miR-134-3p, miR-328-3p, miR-432-3p, miR-764, miR-766-3p, miR-340-3p, miR-454-5p mit gleicher Expressionsrichtung wie im MicroArray detektiert werden (Tabelle 20A) (Abbildung 1). Von diesen zeigten fünf miRNAs, miR-134-3p (FC = 1,62,  $p = 0,0187$ ), miR-328-3p (FC = 1,68,  $p = 0,0090$ ), miR-432-3p (FC = 1,83,  $p = 0,0217$ ), miR-764 (FC = 2,30,  $p = 0,015$ ) und miR-766-3p (FC = 1,49,  $p = 0,0047$ ), eine signifikante Herabregulation in der Gruppe der durch IVF-entstandenen Schwangerschaften, während die beiden hochregulierten miRNAs keine signifikante Validierung aufwiesen.

Im Vergleich der frühgeborenen Zwillinge ( $n_{\text{„Frühgeburt“}} = 32$ ) zu den reifgeborenen ( $n_{\text{„Reifgeburt“}} = 6$ ) konnten die sechs miRNAs miR-148a-3p, miR-148b-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-374b-5p and miR-7-1-3p mit gleicher Expressionsrichtung detektiert werden, von denen lediglich miR-148-3b eine signifikante Validierung aufwies (FC = 1,78,  $p = 0,0242$ ) (Tabelle 20B) (Abbildung 2).

Die Analyse der dizygoten Zwillinge mit AHF ( $n_{\text{„AHF dizygot“}} = 7$ ) im Vergleich zu den monozygoten Zwillingen mit AHF ( $n_{\text{„AHF monozygot“}} = 12$ ) zeigte nur eine miRNA, miR-361-3p, die signifikant hochreguliert ist (FC = 1,73,  $p = 0,0130$ ) (Tabelle 20C) (Abbildung 3A).

Auch bei Betrachtung der dizygoten Zwillinge ohne AHF ( $n_{\text{„dizygot ohne AHF“}} = 7$ ) und der monozygoten Zwillinge ohne AHF ( $n_{\text{„monozygot ohne AHF“}} = 12$ ) wurden zwei signifikant hochregulierte miRNAs, miR-766-3p (FC = 1,73,  $p = 0,0063$ ) und miR-197-3p (FC = 1,97,  $p = 0,0390$ ), validiert (Tabelle 20D) (Abbildung 3B).

Im Vergleich aller dizygoten Zwillinge ( $n_{\text{„dizygot“}} = 14$ ) zu allen monozygoten Zwillingen ( $n_{\text{„monozygot“}} = 24$ ) konnten drei miRNAs, miR-328-3p (FC = 1,55,  $p = 0,104$ ), miR-766-3p (FC = 1,60,  $p = 0,001$ ) und miR-197-3p (FC = 1,64,  $p = 0,48$ ), signifikant als vermehrt exprimiert validiert werden (Tabelle 20E) (Abbildung 4).

Tabelle 20 zeigt alle mittels qRT-PCR validierten miRNAs mit ihren zugehörigen Expressionsrichtungen, p-Werten und Fold Change.

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regulation	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------	-------------	-----------------	-------------	------------	-------------	--------

A) Vergleich aus Schwangerschaften durch erfolgte IVF-Behandlung ( $n_{„IVF“} = 12$ ) (Gruppe 1) zu denen nach spontaner Konzeption ( $n_{„spontane Konzeption“} = 26$ ) (Gruppe 2) entstandenen Zwillinge

miR-340-3p	11,19	0,44	11,33	0,58	Up	1,10	0,4327
miR-454-5p	11,98	0,69	12,30	0,76	Up	1,45	0,2282
miR-134-3p	13,14	0,53	12,44	1,16	Down	1,62	0,0187
miR-328-3p	10,86	0,52	10,11	1,11	Down	1,68	0,0090
miR-432-3p	14,52	0,65	13,65	1,52	Down	1,83	0,0217
miR-764	18,76	0,77	17,56	1,03	Down	2,30	0,015
miR-766-3p	9,39	0,49	8,82	0,54	Down	1,49	0,0047

B) Vergleich aller frühgeborenen ( $n_{„Frühgeburt“} = 32$ ) (Gruppe 1) zu allen reifgeborenen Zwillingen ( $n_{„Reifgeburt“} = 6$ ) (Gruppe 2)

miR-148b-3p	11,12	0,60	11,95	0,60	Up	1,78	0,0242
miR-148a-3p	9,99	0,80	10,64	0,88	Up	1,56	0,1727
miR-27a-3p	14,73	0,71	14,84	1,28	Up	1,07	0,8658
miR-29b-3p	9,57	0,77	9,94	0,59	Up	1,29	0,2469
miR-374b-5p	9,35	1,27	10,23	1,31	Up	1,84	0,2061
miR-7-1-3p	10,77	0,88	10,96	0,70	Up	1,14	0,6053

C) Vergleich der dizygoten Zwillinge mit AHF ( $n_{„dizygot mit AHF“} = 7$ ) (Gruppe 1) zu den monozygoten Zwillingen mit AHF ( $n_{„monozygot mit AHF“} = 12$ ) (Gruppe 2)

miR-361-3p	9,21	0,86	8,42	0,48	Down	1,73	0,0130
------------	------	------	------	------	------	------	--------

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regula- tion	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------------	-------------------	-----------------------	-------------------	-----------------	----------------	--------

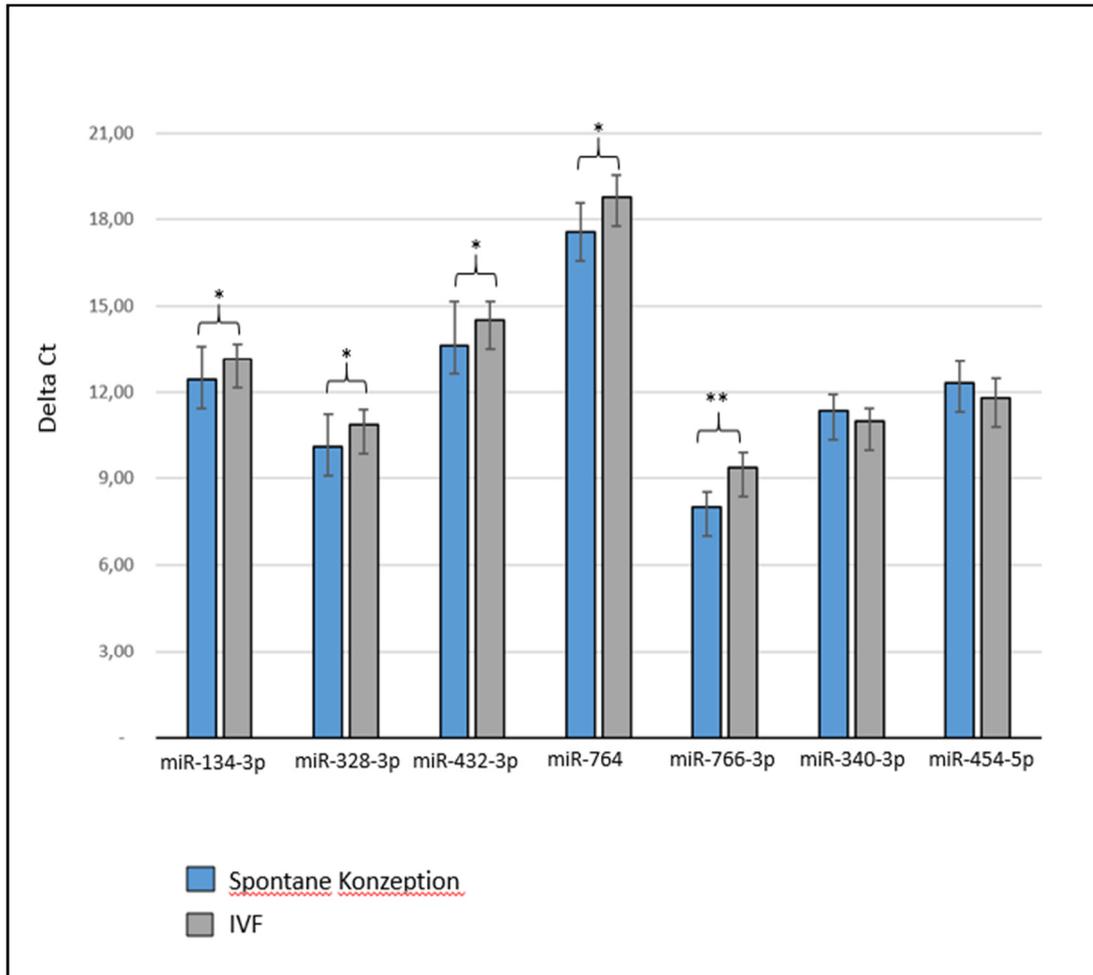
D) Vergleich der dizygoten Zwillinge ohne AHF ( $n_{\text{dizygot ohne AHF}} = 7$ ) (Gruppe 1) zu den monozygoten Zwillingen ohne AHF ( $n_{\text{monozygot ohne AHF}} = 12$ ) (Gruppe 2)

miR-766-3p	9,55	0,47	8,74	0,53	Down	1,73	0,0063
miR-197-3p	6,58	0,84	5,60	0,82	Down	1,97	0,0390

E) Vergleich aller dizygoten ( $n_{\text{dizygot}} = 14$ ) (Gruppe 1) zu allen monozygoten Zwillinge ( $n_{\text{monozygot}} = 24$ ) (Gruppe 2)

miR-328-3p	10,75	1,19	10,12	0,84	Down	1,55	0,104
miR-766-3p	9,43	0,56	8,75	0,45	Down	1,60	0,001
miR-197-3p	6,51	1,09	5,80	0,73	Down	1,64	0,048

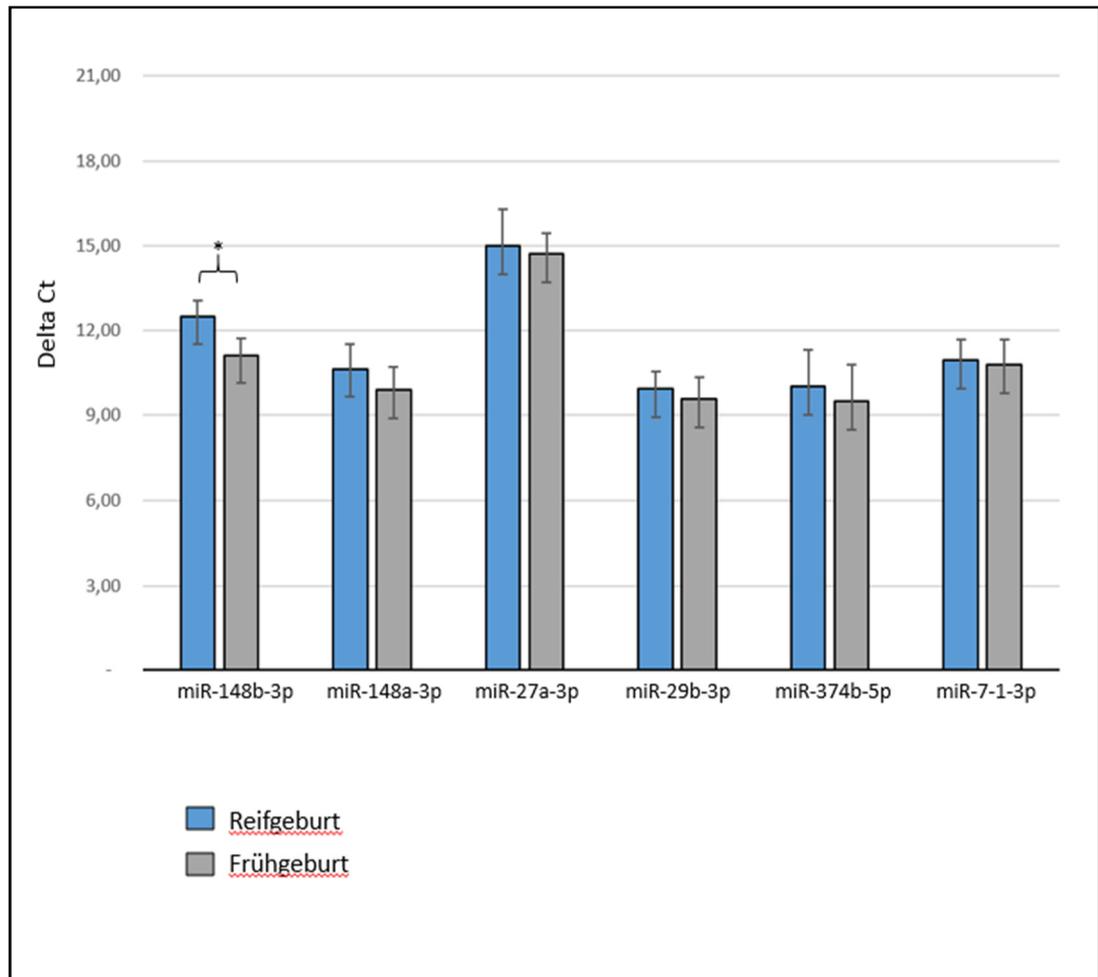
**Tabelle 20:** Durch qRT-PCR validierte miRNAs



**Abbildung 1:** Validierung der sieben verändert exprimierten miRNAs im Blut der aus Schwangerschaften nach erfolgter IVF-Behandlung entstandenen Zwillinge ( $n_{\text{IVF}} = 12$ ) verglichen zu den durch spontane Konzeption entstandenen Zwillingen ( $n_{\text{spontan}} = 26$ ) mittels qRT-PCR ( $P < 0.05$ ).

Bedeutung von  $\Delta\text{Ct}$  IVF und Spontane Konzeption (je niedriger  $\Delta\text{Ct}$ , desto höher das Expressionsprofil). RNAU6B als endogene Kontrolle, t-Test für unabhängige Stichproben und  $\pm$ Standardabweichung (SD) werden benutzt, um die Expressionsunterschiede zu bewerten.

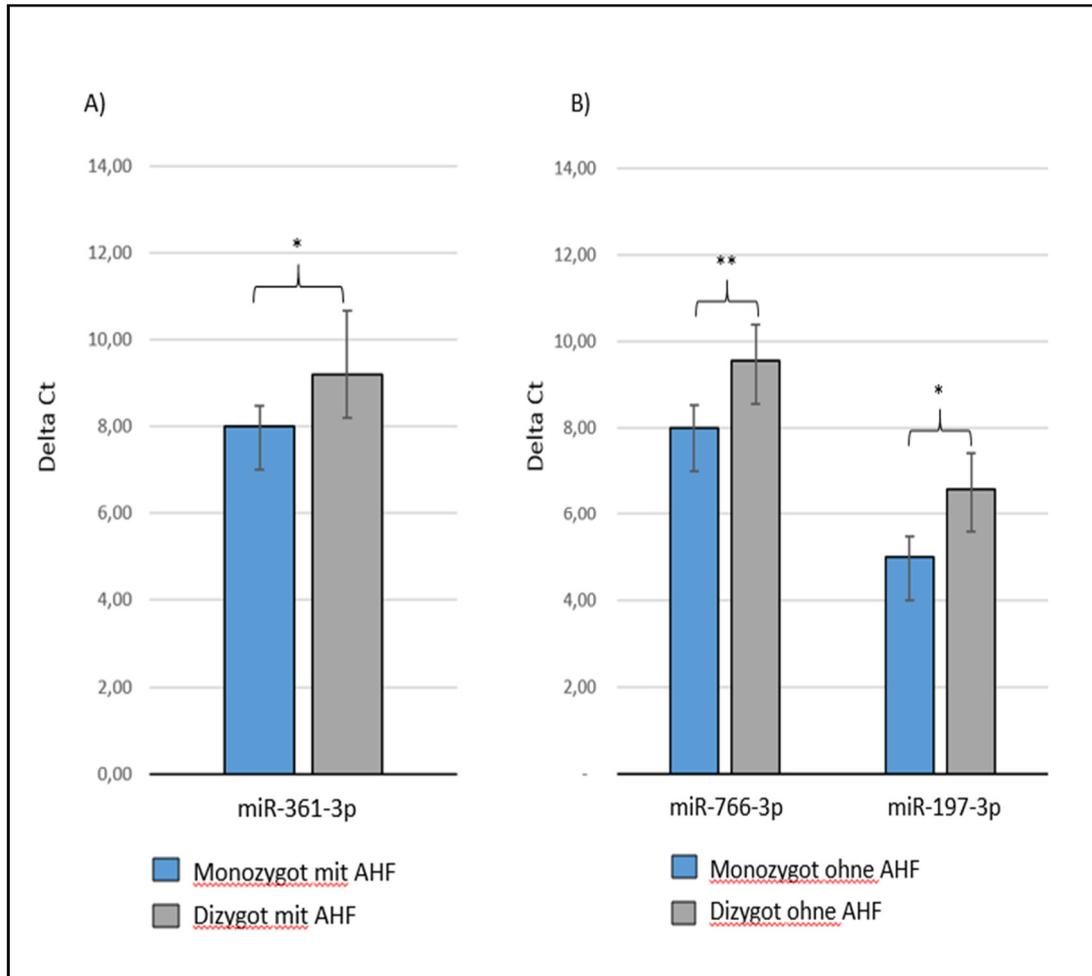
\*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$



**Abbildung 2:** Validierung der sechs verändert exprimierten miRNAs im Blut der frühgeborenen Zwillinge ( $n_{\text{Frühgeburt}} = 32$ ) verglichen zu den reifgeborenen Zwillingen ( $n_{\text{Reifgeburt}} = 6$ ) mittels qRT-PCR ( $P < 0.05$ ).

Bedeutung von  $\Delta Ct$  Frühgeburt und Reifgeburt (je niedriger  $\Delta Ct$ , desto höher das Expressionsprofil). RNAU6B als endogene Kontrolle, t-Test für unabhängige Stichproben und  $\pm$ Standardabweichung (SD) werden benutzt, um die Expressionsunterschiede zu bewerten.

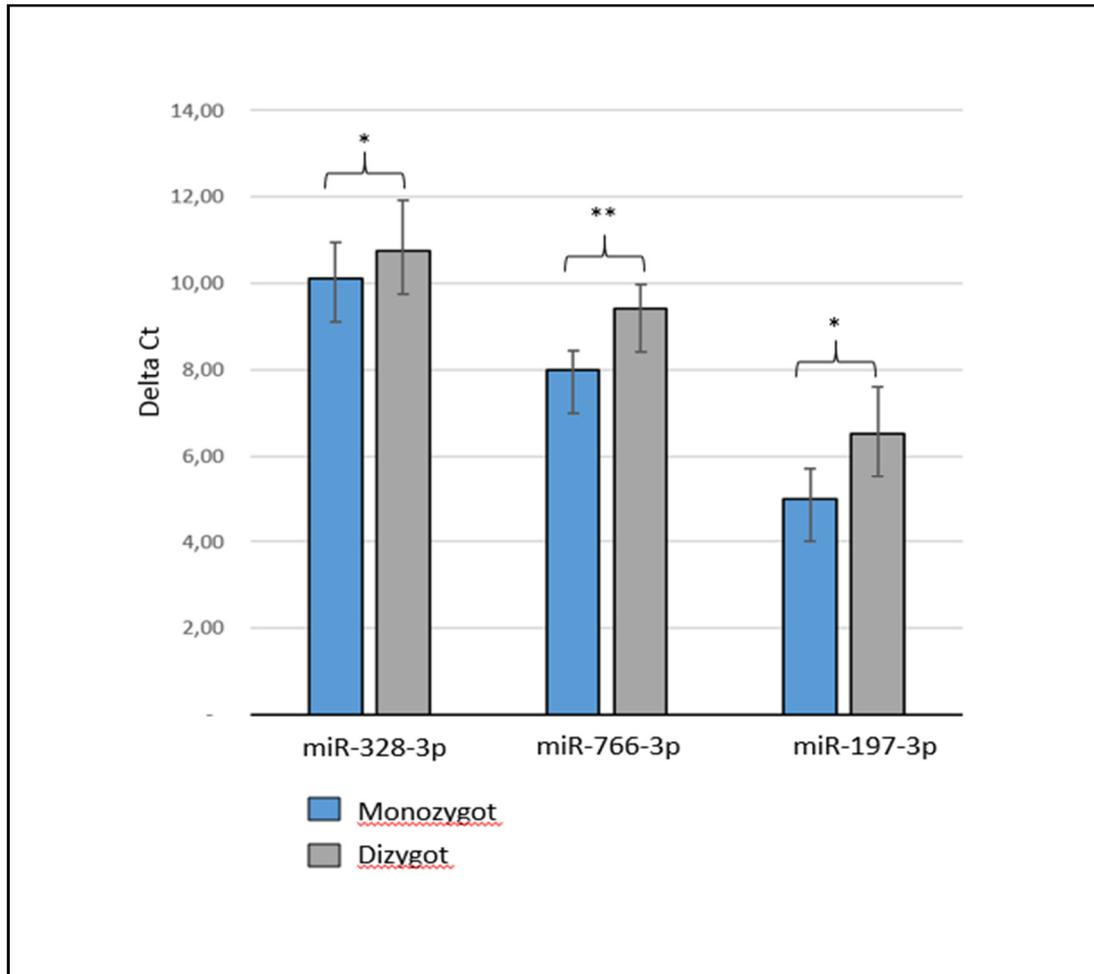
\*  $P \leq 0.05$



**Abbildung 3:** Validierung der verändert exprimierten miRNAs im Blut **(A)** dizygoter Zwillinge mit AHF ( $n_{\text{AHF dizygot}} = 7$ ) verglichen zu monozygoten Zwillingen mit AHF ( $n_{\text{AHF monozygot}} = 12$ ) und **(B)** dizygoter Zwillinge ohne AHF ( $n_{\text{dizygot ohne AHF}} = 7$ ) verglichen zu monozygoten Zwillingen ohne AHF ( $n_{\text{monozygot ohne AHF}} = 12$ ) mittels qRT-PCR ( $p < 0,05$ ).

Bedeutung von  $\Delta\text{Ct}$  Monozygot ohne AHF und Dizygot ohne AHF (je niedriger  $\Delta\text{Ct}$ , desto höher das Expressionsprofil). RNAU6B als endogene Kontrolle, t-Test für unabhängige Stichproben und  $\pm$ Standardabweichung (SD) werden benutzt, um die Expressionsunterschiede zu bewerten.

\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$



**Abbildung 4:** Validierung der drei verändert exprimierten miRNAs im Blut der dizygoten Zwillinge ( $n_{„dizygot“} = 14$ ) verglichen zu monozygoten Zwillingen ( $n_{„monozygot“} = 24$ ) mittels qRT-PCR ( $P < 0,05$ ).

Bedeutung von  $\Delta Ct$  Monozygot und Dizygot (je niedriger  $\Delta Ct$ , desto höher das Expressionsprofil). RNAU6B als endogene Kontrolle, t-Test für unabhängige Stichproben und  $\pm$ Standardabweichung (SD) werden benutzt, um die Expressionsunterschiede zu bewerten.

\*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$

### 6.3.2.2 Ergebnisse der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF

Zur Validierung der Ergebnisse der MicroArrays im Vergleich monozygoter Zwillinge ohne AHF ( $n_{\text{„monozygot ohne AHF“}} = 12$ ) zu monozygoten Zwillingen mit AHF ( $n_{\text{„monozygot mit AHF“}} = 12$ ) wurden elf miRNAs mittels qRT-PCR geprüft: miR-5189-3p, miR-4707-3p, miR-1306-5p, miR-4732-3p, miR-890, miR-511-3p, miR-421, miR-134-3p, miR-1281, miR-943 und miR-6511a-3p. Die Auswahl der miRNAs erfolgte aufgrund signifikanter Ergebnisse im MicroArray und der in der Literatur bereits bekannten Rolle der miRNAs in kardiovaskulären Erkrankungsmechanismen wie beispielsweise miR-1306-5p und miR-421.<sup>37,45,85,86</sup>

Fünf der ausgewählten elf miRNAs konnten in der Gruppe der monozygoten Zwillinge mit AHF im Vergleich zu den monozygoten Zwillingen ohne AHF mittels qRT-PCR als signifikant hochreguliert validiert werden (miR-5189-3p, miR-4707-3p, miR-1306-5p, miR-4732-3p, miR-890, miR-511-3p, miR-421;  $p < 0,05$ ) (Tabelle 20) (Abbildung 5), während bei zwei miRNAs keine signifikanten Werte ermittelt wurden (miR-6511a-3p,  $p = 0,1309$ ; miR-943,  $p = 0,1639$ ) und zwei miRNAs die gegensätzliche Expressionsrichtung zeigte als im Microarray (miR-134-3p,  $p = 0,0108$ , miR-1281,  $p = 0,0310$ ).

Im nächsten Schritt wurden die Altersgruppen  $<10$  Jahren ( $n_{\text{„<10 Jahre“}} = 5$ ) und  $\geq 10$  Jahren ( $n_{\text{„ $\geq 10$  Jahre“}} = 7$ ), getrennt betrachtet. In der Gruppe der jüngeren Kinder konnten fünf miRNAs als signifikant validiert werden, dabei handelte es sich um miR-511-3p, miR-1306-5p, miR-4732-3p, miR-5189-3p und miR-890 ( $p < 0,05$ ), während eine miRNA die entgegengesetzte Expressionsrichtung als im MicroArray zeigte (miR-1281,  $p = 0,0398$ ). (Abbildung 6). Im Blut älterer Kinder wurde eine miRNA, miR-5189-3p ( $p = 0,0863$ ) grenzwertig signifikant validiert.

miRNAs	Median Gruppe 1	SD Gruppe 1	Median Gruppe 2	SD Gruppe 2	Regula- tion	Fold Change	p-Wert
--------	-----------------------	-------------------	-----------------------	-------------------	-----------------	----------------	--------

A) Vergleich aller monozygoten Zwillinge ohne AHF ( $n_{\text{monozygot ohne AHF}} = 12$ ) (Gruppe 1) zu allen monozygoten Zwillingen mit AHF ( $n_{\text{monozygot mit AHF}} = 12$ ) (Gruppe 2)

miR-511-3p	7,78	1,19	6,31	0,62	Down	2,78	0,0049
miR-1306-5p	10,41	1,04	9,37	0,66	Down	2,06	0,0357
miR-421	3,56	0,86	2,52	1,02	Down	2,07	0,0264
miR-134-3p	7,09	0,61	6,43	1,00	Down	1,59	0,0108
miR-4707-3p	13,08	2,19	11,16	1,12	Down	3,78	0,0138
miR-4732-3p	2,73	0,83	1,48	0,87	Down	2,38	0,0075
miR-1281	17,65	1,47	16,72	1,05	Down	1,91	0,0310
miR-6511a-3p	10,18	0,82	9,53	1,59	Down	1,57	0,1309
miR-5189-3p	4,52	0,71	3,17	0,71	Down	2,55	0,0008
miR-943	-3,17	1,04	-3,78	1,69	Down	1,52	0,1639
miR-890	11,45	0,86	10,62	0,82	Down	1,78	0,0132

B) Vergleich aller monozygoten Zwillinge ohne AHF  $\geq 10$  Jahre ( $n_{\text{monozygot ohne AHF} \geq 10 \text{ Jahre}} = 7$ ) (Gruppe 1) zu allen monozygoten Zwillingen mit AHF  $\geq 10$  Jahre ( $n_{\text{monozygot mit AHF} \geq 10 \text{ Jahre}} = 7$ ) (Gruppe 2)

miR-511-3p	7,45	1,18	6,46	0,66	Down	2,00	0,1854
miR-1306-5p	10,10	1,04	9,59	0,41	Down	1,43	0,3221
miR-421	3,79	0,89	2,65	0,97	Down	2,22	0,1485
miR-134-3p	6,93	0,70	6,29	1,15	Down	1,56	0,2889
miR-4707-3p	12,98	1,93	11,22	1,19	Down	3,45	0,1376
miR-4732-3p	2,61	0,68	1,74	0,91	Down	1,82	0,1549
miR-1281	17,14	1,69	16,33	1,08	Down	1,75	0,3832
miR-6511a-3p	10,10	0,56	9,22	1,13	Down	1,85	0,1884
miR-5189-3p	4,33	0,56	3,35	0,73	Down	1,96	0,0863

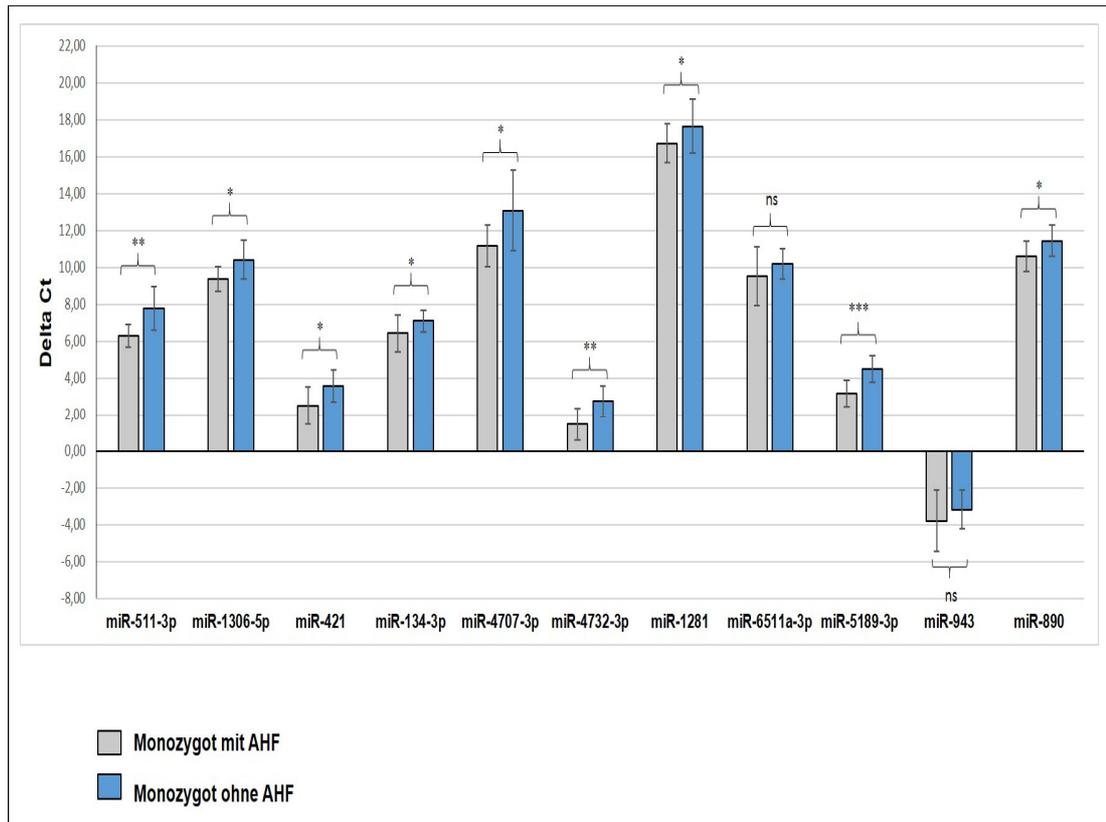
## Ergebnisse

miR-943	-3,39	0,99	-3,76	1,91	Down	1,30	0,7147
miR-890	11,03	0,85	10,57	0,84	Down	1,37	0,5004

C) Vergleich aller monozygoten Zwillinge ohne AHF <10 Jahre ( $n_{\text{monozygot ohne AHF <10 Jahre}} = 5$ ) (Gruppe 1) zu allen monozygoten Zwillingen mit AHF <10 Jahre ( $n_{\text{monozygot mit AHF <10 Jahre}} = 5$ ) (Gruppe 2)

miR-511-3p	8,25	1,05	6,09	0,48	Down	4,55	0,0023
miR-1306-5p	10,84	0,89	9,06	0,80	Down	3,45	0,0037
miR-421	3,24	0,71	2,32	1,06	Down	1,89	0,1554
miR-134-3p	7,32	0,34	6,62	0,71	Down	1,61	0,1791
miR-4707-3p	13,21	2,49	11,08	0,99	Down	4,35	0,2531
miR-4732-3p	2,91	0,97	1,12	0,66	Down	3,45	0,0374
miR-1281	18,37	0,55	17,27	0,70	Down	2,13	0,0398
miR-6511a-3p	10,29	1,07	9,98	2,00	Down	1,25	0,8377
miR-5189-3p	4,78	0,80	2,91	0,59	Down	3,70	0,0237
miR-943	-2,88	1,04	-3,82	1,31	Down	1,92	0,3177
miR-890	12,04	0,41	10,69	0,77	Down	2,56	0,0131

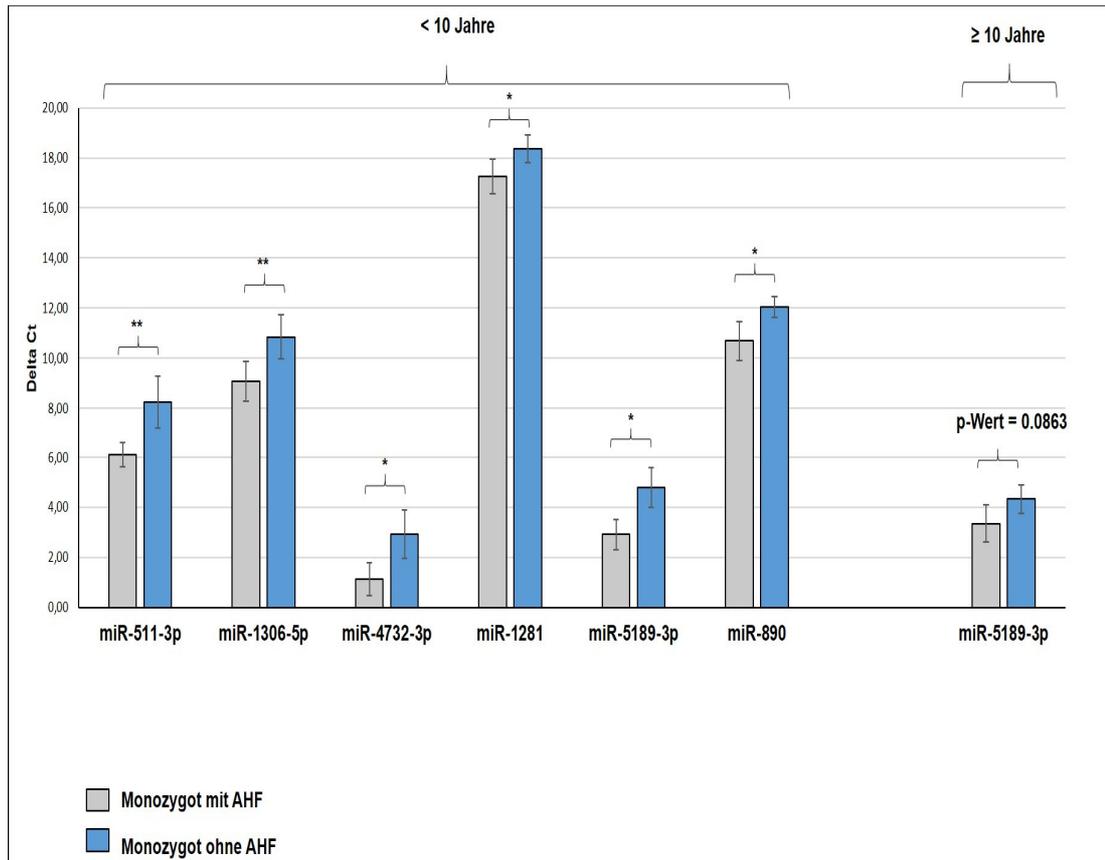
**Tabelle 20:** Vergleich der monozygoten Zwillinge ohne AHF zu den monozygoten Zwillingen mit AHF (Gruppe 2) mit und ohne Berücksichtigung der Altersklassen; durch qRT-PCR validierte miRNAs;



**Abbildung 5:** Validierung der elf vermehrt exprimierten miRNAs im Blut der monozygoten Zwillinge mit AHF ( $n_{\text{„AHF monozygot“}} = 12$ ) verglichen zu den monozygoten Zwillingen ohne AHF ( $n_{\text{„ohne AHF monozygot“}} = 12$ ) mittels qRT-PCR.

Bedeutung von  $\Delta Ct$  monozygot mit AHF und monozygot ohne AHF (je niedriger  $\Delta Ct$ , desto höher das Expressionsprofil). RNAU6B als endogene Kontrolle, t-Test für unabhängige Stichproben und  $\pm$ Standardabweichung (SD) werden benutzt, um die Expressionsunterschiede zu bewerten.

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns = nicht signifikant



**Abbildung 6:** Validierung der exprimierten miRNAs im Blut der monozygoten Zwillinge mit AHF verglichen zu den monozygoten Zwillingen ohne AHF in Abhängigkeit von ihrem Alter mittels qRT-PCR; ( $n_{\geq 10 \text{ Jahre}} = 7$  Zwillingspaare;  $n_{< 10 \text{ Jahre}} = 5$  Zwillingspaare)

Bedeutung von  $\Delta Ct$  monozygot mit AHF und monozygot ohne AHF (je niedriger  $\Delta Ct$ , desto höher das Expressionsprofil). RNAU6B als endogene Kontrolle, t-Test für unabhängige Stichproben und  $\pm$ Standardabweichung (SD) werden benutzt, um die Expressionsunterschiede zu bewerten.

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns = nicht signifikant

### 6.3.3 Signalweg-Analysen

Um Einblicke in die biologischen Signalwege der miRNAs zu erhalten, welche in den verschiedenen Vergleichen unterschiedlich exprimiert wurden, wurde der DIANA-mirPath-Algorithmus verwendet.

#### 6.3.3.1 Signalweg-Analysen aller Vergleichsgruppe

Basierend auf acht durch qRT-PCR validierten miRNAs (miR-361-3p, miR-766-3p, miR-197-3p, miR-134-3p, miR-328-3p, miR-432-3p, miR-764, miR-148b-3p) konnten 17 KEEG-Signalwege identifiziert werden, die Zielgene signifikant durch die validierten miRNAs beeinflussen ( $P < 0,05$ , FDR-korrigiert). Wie in Tabelle 21 zu sehen, sind die Zielgene der veränderten miRNAs überwiegend an Signalübertragungswegen beteiligt. Jedoch stehen sie ebenso in direktem Zusammenhang mit Kardiomyopathie, zellulärer Interaktion und anderen Signalwegen. Unter Verwendung von miRTarget-Link wurden die resultierenden Verknüpfungen in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Die vier miRNAs miR-766-3p, miR-197-3p, miR-148b-3p und miR-328-3p interagieren dabei besonders stark mit je  $\geq 2$  Zielgenen. Zusätzlich konnten neun Gene identifiziert werden, die mit je  $\geq 2$  miRNAs der vier miRNAs miR-361-3p, miR-134-3p, miR-432-3p und miR-764 schwach interagieren. Diese stark und schwach beeinflussten miRNAs sind in Abbildung 7 mit den Farben „blau“ und „grün“ hinterlegt.

## Ergebnisse

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Glykanbiosynthese und -metabolismus	Glykosphingolipidbiosynthese – Lacto- und neoLactoserie	0,0004	4	FUT4, B3GALT1, FUT9, FUT6	3	miR-328-3p, miR-766-3p, miR-764
Metabolismus der Kofaktoren und Vitamine	Folatbiosynthese	0,0369	3	DHFR, GCH1, PTS	3	miR-148b-3p, miR-766-3p, miR-361-3p
Falten, Sortieren und Abbau	Ubiquitin-vermittelte Proteolyse	0,0333	29	UBE2Z, UBE2R2, UBE2E3, CBL, RFWD2, FBXW7, TRIM37, WWP1, HUWE1, DDB2, DET1, SKP1, TRIP12, UBA6, CBLB, BRCA1, CUL5, SKP2, UBE3A, HERC2, SMURF1, CUL7, UBE2N, UBA7, PIAS2, UBE2D3, HERC4, UBE2W, PPIL2	8	miR-134-3p, miR-197-3p, miR-766-3p, miR-764, miR-148b-3p, miR-328-3p, miR-361-3p, miR-432-3p
Signalmoleküle und Interaktion	ECM-Rezeptorinteraktion	0,0004	16	LAMB2, ITGB8, ITGA9, COL6A5, LAMB4, COL24A1, ITGB6, ITGA5, COL6A6, SV2A, ITGA11, COL2A1, DAG1, TNFR, COL4A1, LAMA4	5	miR-328-3p, miR-148b-3p, miR-134-3p, miR-766-3p, miR-197-3p

## Ergebnisse

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Signaltransduktion	Ras Signalweg	0,0161	41	RASAL1, FGF12, KSR2, PDGFRA, SOS2, NRAS, PIK3CB, PIK3R2, PIK3R5, ETS1, ANGPT2, FOXO4, RALBP1, RASGRP2, EGFR, MRAS, IKBKB, PIK3R3, PRKCG, FLT1, SOS1, KITLG, INSR, PAK6, NF1, PLD2, IGF1, PDGFC, PAK6, ANGPT1, PLCE1, SYNGAP1, RASSF1, HTR7, FGFR1, CSF1, GRIN2A, TEK, PLA2G4C, MAPK10, GRIN2B	7	miR-764, miR-148b-3p, miR-197-3p, miR-766-3p, miR-134-3p, miR-328-3p, miR-432-3p
	Phosphatidylinositol Signalsystem	0,0214	16	PLCD4, PIK3CB, PIK3R2, PIK3R5, SYNJ1, PIP5K1B, DGKZ, PIK3R3, PRKCG, ITPR1, PIK3C2A, PLCE1, DGKD, PTEN, PIP4K2C, PLCB2	6	miR-148b-3p, miR-197-3p, miR-766-3p, miR-432-3p, miR-328-3p, miR-764
	FoxO Signalweg	0,0238	29	FBXO32, SOS2, NRAS, PIK3CB, PIK3R2, PIK3R5, SMAD3, FOXO4, CDKN1B, EGFR, GADD45A, IKBKB, NLK, RAG2, PIK3R3, S1PR1, SKP2, SOS1, INSR, PRKAA1, IGF1, TGFB2, MAPK12, SOD2, HOMER1, USP7, PTEN, BCL2L11, MAPK10	7	miR-148b-3p, miR-134-3p, miR-766-3p, miR-197-3p, miR-764, miR-328-3p, miR-432-3p

## Ergebnisse

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Signaltransduktion	TGF-beta Signalweg	0,0333	16	ROCK1, INHBB, SMAD9, BMPR1B, SMAD3, CHR1, ACVR1, SKP1, RPS6KB2, SMURF1, SMAD5, GDF6, TGFB2, NOG, PPP2R1B, BMPR2	5	miR-432-3p, miR-148b-3p, miR-197-3p, miR-764, miR-328-3p
Zellmotilität	Regulation des Aktin-Zytoskeletts	0,0238	45	FGF12, PDGFRA, SSH3, CYFIP2, ROCK1, WASL, SOS2, ITGB8, ITGA9, NRAS, BAIAP2, APC, PIK3CB, PIK3R2, ARHGEF12, PIK3R5, PPP1CC, ITGB6, BDKRB2, TMSB4Y, ITGA5, MYH9, BCAR1, CHRM3, EGFR, MRAS, PPP1R12B, MSN, PIP5K1B, ABI2, ITGA11, MYH14, PPP1R12A, PIK3R3, NCKAP1L, SOS1, PAK6, PDGFC, MYLK3, PAK6, FGFR1, PIP4K2C, ENAH, MYLK, PPP1CB	7	miR-134-3p, miR-148b-3p, miR-197-3p, miR-766-3p, miR-764, miR-432-3p, miR-328-3p
Endokrines System	Schilddrüsenhormonsynthese	0,0333	10	GPX6, SLC26A4, CANX, LRP2, PRKCG, ITPR1, ATP1B4, TG, ADCY4, PLCB2	5	miR-148b-3p, miR-764, miR-766-3p, miR-328-3p, miR-432-3p

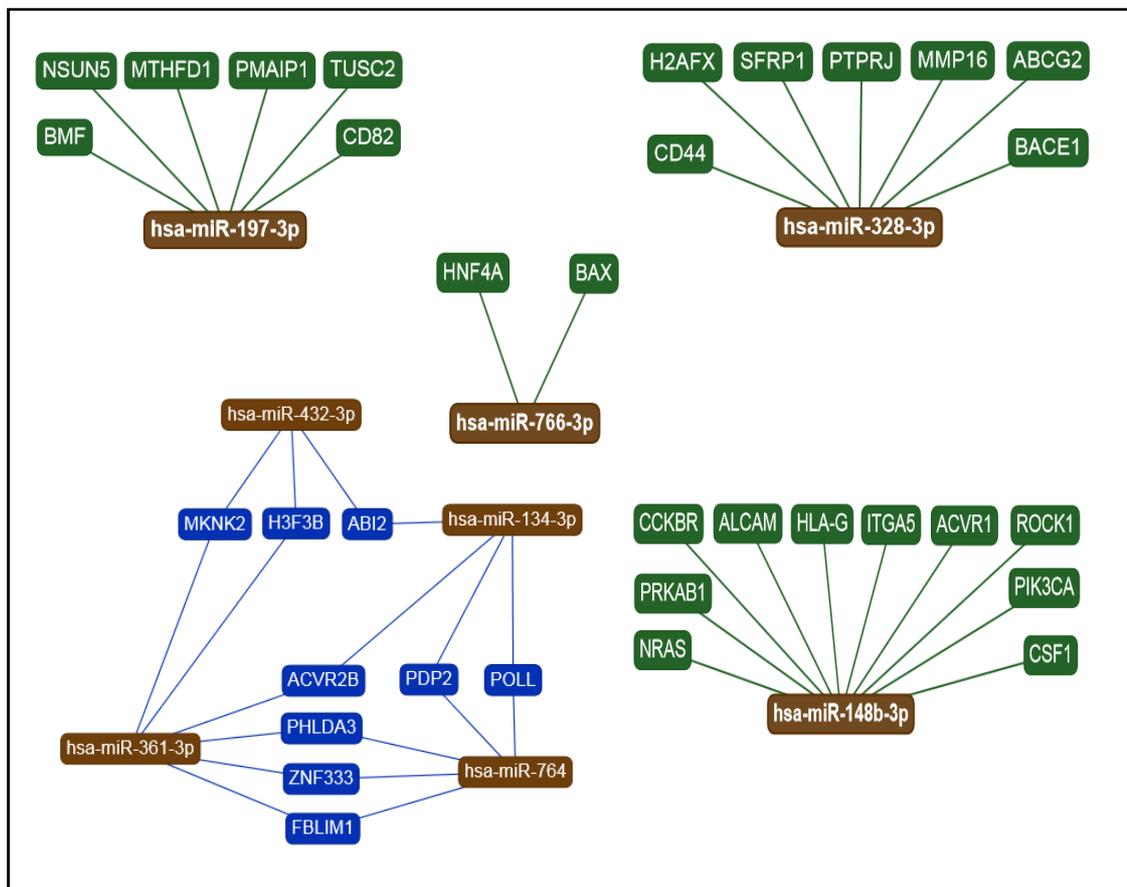
## Ergebnisse

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Zelluläre Kommunikation - Eukaryonten	Regulierende Signalwege der Stammzellpluripotenz	0,0333	28	JARID2, NRAS, INHBB, SMAD9, APC, PIK3CB, WNT10B, BMPR1B, PIK3R2, PIK3R5, FZD6, SMAD3, SMARCAD1, WNT2B, ZFHX3, FZD3, ACVR1, PIK3R3, ZIC3, SMAD5, IGF1, MAPK12, IL6ST, FGFR1, KLF4, WNT9A, MEIS1, BMPR2	7	miR-197-3p, miR-361-3p, miR-148b-3p, miR-328-3p, miR-766-3p, miR-432-3p, miR-764
Zelluläre Kommunikation - Eukaryonten	Fokale Adhäsion	0,0461	40	LAMB2, PDGFRA, ROCK1, SOS2, ITGB8, ITGA9, COL6A5, PIK3CB, LAMB4, PIK3R2, COL24A1, PIK3R5, PPP1CC, ITGB6, ITGA5, BCAR1, EGFR, PPP1R12B, COL6A6, ITGA11, COL2A1, PPP1R12A, PIK3R3, PRKCG, FLT1, FLNA, SOS1, PAK6, IGF1, PDGFC, MYLK3, PAK6, TNR, PTEN, MYLK, ILK, MAPK10, COL4A1, PPP1CB, LAMA4	7	miR-328-3p, miR-134-3p, miR-432-3p, miR-148b-3p, miR-764, miR-766-3p, miR-197-3p

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Krebs: Übersicht	Cholinmetabolismus in Krebs	0,0238	25	PDGFRA, SLC44A5, WASL, SOS2, NRAS, PIK3CB, PIK3R2, PIK3R5, EGFR, CHPT1, PIP5K1B, RPS6KB2, TSC2, DGKZ, PIK3R3, PRKCG, SOS1, PLD2, SLC44A1, PDGFC, PCYT1B, DGKD, PLA2G4C, MAPK10, SLC5A7	7	miR-764, miR-148b-3p, miR-432-3p, miR-766-3p, miR-328-3p, miR-197-3p, miR-134-3p
	Proteoglykane in Krebs	0,0333	37	ESR1, ROCK1, SOS2, CBL, NRAS, PIK3CB, WNT10B, PIK3R2, ARHGEF12, PIK3R5, PPP1CC, FZD6, ITGA5, WNT2B, EGFR, MRAS, PPP1R12B, FZD3, MSN, ANK2, RPS6KB2, CBLB, PPP1R12A, PIK3R3, PRKCG, FLNA, ITPR1, SOS1	8	miR-134-3p, miR-197-3p, miR-766-3p, miR-764, miR-148b-3p, miR-328-3p, miR-361-3p, miR-432-3p
Neurodegenerative Erkrankungen	Prionerkrankung	1,016 E-14	2	NCAM1, PRNP	2	miR-134-3p, miR-148b-3p
Krebs: Spezifische Arten	Prostatakrebs	0,0333	19	PDGFRA, SOS2, NRAS, PIK3CB, TCF7L2, TGFA, PIK3R2, PIK3R5, CDKN1B, EGFR, IKBKB, AR, PIK3R3, SOS1, IGF1, PDGFC, KLK3, PTEN, FGFR1	7	miR-764, miR-148b-3p, miR-432-3p, miR-328-3p, miR-197-3p, miR-766-3p, miR-134-3p

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)	0,0338	19	CACNG8, DES, CACNA2D3, MYH7, ITGB8, ITGA9, ITGB6, ITGA5, TPM3, TPM4, ITGA11, SLC8A1, DAG1, PRKAA1, IGF1, TGFB2, ATP2A2, MYH6, SGCB	6	miR-148b-3p, miR-766-3p, miR-197-3p, miR-328-3p, miR-134-3p, miR-432-3p

**Tabelle 21:** Beeinflusste KEGG-Signalwege der Zielgene der durch qRT-PCR validiert veränderten miRNAs



**Abbildung 7:** Vernetzung der Zielgene mit dysregulierten miRNAs (braun). Allein Zielgene, welche durch  $\geq 2$  miRNAs beeinflusst werden sind aufgeführt. Zielgene sind bei schwacher Interaktionen mit den genannten miRNAs blau hinterlegt, bei starker Interaktion grün.

### 6.3.3.2 Signalweg-Analysen der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF

Auch im durchgeführten Vergleich der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF wurden KEGG-Pathway-Analysen durchgeführt. Bei Betrachtung von sieben verändert exprimierten miRNAs ( $p < 0,05$ ) miR-511-3p, miR-4707-3p, miR-1306-5p, miR-890, miR-421, miR-5189 und miR-4723-3p konnten zehn KEGG-Signalwege detektiert werden, die von  $\geq 2$  miRNAs beeinflusst werden ( $P < 0,05$ , FDR-korrigiert).

Diese Zielgene spielen sowohl im menschlichen Metabolismus, zellulären Prozessen, im menschlichen Organismus, als auch der Entstehung von Erkrankungen eine Rolle. (Tabelle 22). Dabei fiel auf, dass die mit vielen Genen in Verbindung stehenden miR-421 vor allem das Gen ATM besonders stark beeinflusst (grün hinterlegt). Alle anderen Verbindungen sind von eher schwacher Ausprägung (blau hinterlegt) (Abbildung 8).

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Glykanbiosynthese und -metabolismus	Phosphatidylinositol-signalsystem	1,64E-02	16	PLCD4, CDS2, CALM1, PIK3CB, ITPKB, IPPK, INPP4B, CALM2, PIP4K2A, PLCB1, OCRL, DGKD, PTEN, PI4K2B, DGKI, DGKH	6	miR-890, miR-511-3p, miR-4732-3p, miR-1306-5p, miR-5189-3p, miR-421
Metabolismus der Kofaktoren und Vitamine	Biotinmetabolismus	4,47E-05	1	HLCS	1	miR-890

## Ergebnisse

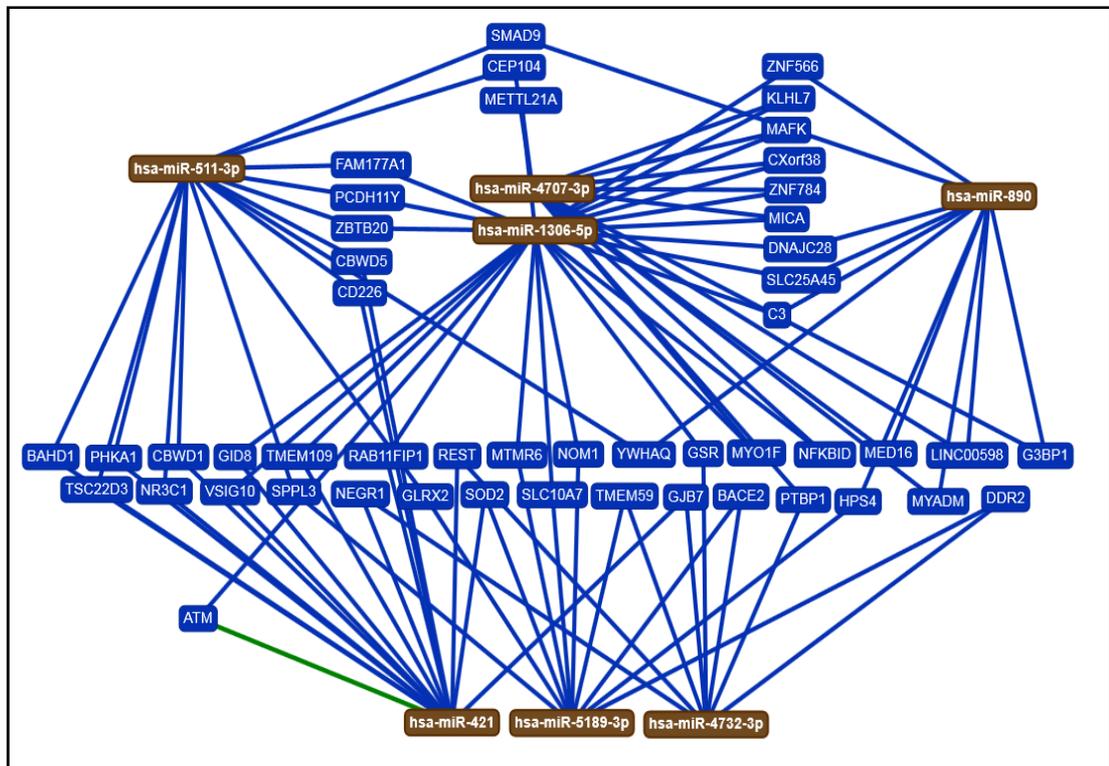
	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Zelluläre Kommunikation - Eukaryonten	Gap junction	4,05E-06	20	NRAS, TUBA1B, GRM5, TUBB6, EGFR, GNAI3, TJP1, PLCB1, TUBA1C, TUBB2A, PRKX, TUBB3, GUCY1A2, GJA1, MAP3K2, PRKG1, ADCY4, ADRB1, EGF, PDGFRB	5	miR-1306-5p, miR-890, miR-5189-3p, miR-421, miR-511-3p
Endokrines System	Oxytocinsignalweg	1,64E-02	27	CAMK2D, NRAS, PRKAA2, CALM1, PIK3CB, CACNB4, PPP1CC, ROCK2, PPP3R1, KCNJ14, CAMKK1, EGFR, PPP3CC, GNAI3, PPP1R12B, CALM2, CAMKK2, PLCB1, PRKAG1, PRKX, KCNJ6, GUCY1A2, KCNJ9, CACNB2, CAMK1D, ADCY4, MYLK	6	miR-511-3p, miR-421, miR-890, miR-1306-5p, miR-5189-3p, miR-4732-3p
	Schilddrüsenhormonbiosynthese	1,98E-02	7	ATF6B, GSR, CREB1, PLCB1, PRKX, TG, ADCY4	3	miR-421, miR-1306-5p, miR-890

## Ergebnisse

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Kreislaufsystem	Adrenerge Steuerung in Kardiomyozyten	1,33E-02	21	CAMK2D, PPP2R5E, CALM1, PIK3CB, ATF6B, CACNB4, PPP1CC, PPP2R5D, GNAI3, PPP2R2D, PPP2R5C, CALM2, ATP2B1, CREB1, PLCB1, SLC8A1, PRKX, CACNB2, ADCY4, ADRB1, KCNE1	5	miR-1306-5p, miR-421, miR-890, miR-511-3p, miR-4732-5p
Nervensystem	Dopaminerge Synapsen	1,54E-02	23	CAMK2D, GSK3B, PPP2R5E, CALM1, ATF6B, PPP1CC, PPP2R5D, PPP3CC, GNAI3, PPP2R2D, PPP2R5C, CALM2, CREB1, MAOB, PLCB1, GNB2, SCN1A, GNG7, PRKX, KCNJ6, KCNJ9, CLOCK, GRIN2B	6	miR-890, miR-1306-5p, miR-511-3p, miR-421, miR-4732-3p, miR-8189-3p
Krebs: Spezifische Arten	Gliom	1,30E-02	12	CAMK2D, NRAS, CALM1, PIK3CB, EGFR, CDK6, CALM2, IGF1, MTOR, PTEN, EGF, PDGFRB	5	miR-890, miR-511-3p, miR-421, miR-4732-3p, miR-1306-5p
Substanzabhängigkeit	Morphinabhängigkeit	1,30E-02	11	PDE10A, GNAI3, PDE1B, GABRB3, GNB2, GNG7, PRKX, KCNJ6, KCNJ9, GABRB2, ADCY4	5	miR-890, miR-421, miR-1306-5p, miR-4732-3p, miR-511-3p

	KEGG Signalweg	p-Wert	Anzahl der Gene	Gennamen	Anzahl der miRNAs	miRNA-Namen
Umweltanpassung	Circadiane Anpassung	3,62E-02	15	CAMK2D, CALM1, GNAI3, CALM2, CREB1, PLCB1, GNB2, GNG7, PRKX, KCNJ6, GUCY1A2, KCNJ9, PRKG1, ADCY4, GRIN2B	6	miR-421, miR-890, miR-1306-3p, miR-4732-3p, miR-511-3p, miR-5189-3p

**Tabelle 22:** Beeinflusste KEGG-Signalwege der Zielgene der durch qRT-PCR validiert veränderten miRNAs der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF.



**Abbildung 8:** Vernetzung der Zielgene mit dysregulierten miRNAs (braun). Allein Zielgene, welche durch  $\geq 2$  miRNAs beeinflusst werden, sind aufgeführt. Zielgene sind bei schwacher Interaktion mit den genannten miRNAs blau hinterlegt, bei starker Interaktion grün.

## 7 Diskussion

Angeborene Herzfehler gehören zu den häufigsten angeborenen Organfehlbildungen bei Neugeborenen. Die genauen Pathomechanismen zur Entstehung von AHF sind bisweilen noch weitestgehend unklar und bedürfen zur Weiterentwicklung der Diagnostik und zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten ein besseres Verständnis.

Vor allem monozygote, aber auch dizygote Zwillinge sind von solchen in unterschiedlicher Ausprägung auftretenden Malformationen betroffen.<sup>1,6,87</sup> Obwohl miRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren eine wichtige Rolle in der Genexpression spielen und bereits einen großen Bestandteil der Forschung bezüglich der Entstehung angeborener Herzfehler ausmachen, ist ihr Einfluss noch nicht vollständig geklärt.<sup>30,31</sup>

Die Analyse der miRNA-Expressionsprofile in Blutproben von Zwillingen mit und ohne angeborenen Herzfehler wurde in dieser Pilotstudie anhand verschiedener Vergleichskohorten mittels MicroArray durchgeführt. Dabei wurde ein spezielles Augenmerk auf die Reife der Zwillinge bei Geburt anhand des Gestationsalters, die Art der Schwangerschaftskonzeption und die Zygotität gelegt. Die resultierenden Expressionsmuster wurden anschließend durch qRT-PCR validiert.

### 7.1 Gestationsalter als Einfluss auf die Entstehung AHF mittels veränderter microRNA-Expression

Wie unsere Ergebnisse zeigen, spielt das Gestationsalter bei Geburt eine wesentliche Rolle auf die miRNA-Expressionsprofile und die Entstehung von AHF, welche auch bereits in anderen Studien benannt werden konnte.<sup>9,14,88</sup> Bereits die Vorkommenshäufigkeit, die aufgrund der geringen Fallzahl keiner statistischen Analyse unterzogen werden konnte, weist mit 16 frühgeborenen Zwillingspaaren und nur drei reifgeborenen Zwillingspaaren daraufhin, dass vor allem in der Gruppe der frühgeborenen Zwillinge mindestens ein Kind an einem AHF leidet. Dabei ist zu beachten, dass keine Zwillingspaare in unsere Studie eingeschlossen wurden, bei welchen beide Kinder mit einem AHF geboren wurden.

Bei Betrachtung der miRNAs konnten verschiedene dysregulierte miRNAs in der Gruppe der frühgeborenen Zwillinge detektiert werden, die bereits mit dem Vorkommen von AHF assoziiert wurden. Dies unterstützt unsere Annahme, dass Frühgeburtlichkeit und AHF direkt miteinander assoziiert sind.

Die signifikanten Ergebnisse des MicroArrays konnten unter dem Aspekt des Gestationsalters für eine miRNA, miR-148b-3p, signifikant und für weitere fünf miRNAs aufgrund der geringen Studienteilnehmerzahl grenzwertig signifikant bestätigt werden.

MiR-148b konnte im Blut der frühgeborenen Zwillinge im Vergleich zu reifgeborenen mittels signifikanter qRT-PCR validiert werden. Die Rolle von miR-148b in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Regulation ihrer Zielgene ist bereits bekannt. Diese Zielgene konnten in der KEGG-Signalweganalyse bestimmt werden. Es handelt sich dabei im Besonderen um die Zielgene *NRAS*, *PRKAB1*, *CCKBR*, *ALCAM*, *HLA-G*, *ITGA5*, *ACVR1*, *ROCK1*, *PIK3CA* und *CSF1*, bei welchen eine starke Interaktion mit miR-148b detektiert wurde und die mit dem Auftreten der hypertrophen Kardiomyopathie assoziiert werden konnte (Tabelle 21; Abbildung 7.) In der Literatur ist bisweilen nichts zur miR-148b im Rahmen der Entstehung von AHF zu finden. Aufgrund unserer signifikanten Ergebnisse, könnte dieser miRNA mithilfe einer größeren Studiengruppe eine entscheidende Bedeutung nachgewiesen werden.

Die in der Gruppe der frühgeborenen Zwillinge detektierten hochregulierten miR-183 und miR-625 konnten bereits in Blutproben von Patienten mit Fallot'scher Tetralogie (TOF) nach erfolgter Korrekturoperation gefunden werden. Dabei waren die genannten miRNAs im Vergleich der TOF-Patienten zu der gesunden Kontrollgruppe erhöht exprimiert.<sup>35</sup> Da es sich dabei ebenfalls um eine Studie der Forschungsgruppe der pädiatrischen Kardiologie in Homburg handelte, welche in demselben Labor wie die vorliegende Studie durchgeführt wurde und daher die gleiche Vorgehensweise stattgefunden hat, können die Resultate umso besser miteinander verglichen werden. Das erhöhte Vorkommen von miR-183 und miR-625 spielt daher mittlerweile eine entscheidende Rolle beim Vorhandensein eines AHF.

Die im Blut frühgeborener Zwillinge ebenfalls vermehrt exprimierte miR-29b-3p, welche auch in unserer qRT-PCR eine Hochregulierung aufwies, konnte in Blutproben

schwangerer Frauen, die später einen Fetus mit AHF gebären, nachgewiesen werden.<sup>32</sup> Die miR-29 wurde daher zur Nutzung als Biomarker für AHF in der Frühschwangerschaft im maternalem Blut vorgeschlagen und könnte damit direkt mit einem erhöhtem Risiko für Frühgeburtlichkeit korrelieren.<sup>32</sup> Unsere Ergebnisse bestärken den Verdacht, dass diese miRNA als Biomarker auch im kindlichen Blut denkbar wäre.

MiR-7-1-3p war im Blut von Frühgeborenen ebenfalls vermehrt exprimiert. Bisweilen ist noch keine Bedeutung dieser miRNA im Rahmen der Herzentwicklung beobachtet. Bisher konnte nur ihre Rolle in der Onkogenese als Tumorsuppressor-miRNA (anti-oncomir) durch Regulierung des EGFR in Tumorzellen bestätigt werden, wobei eine Herunterregulierung dieser miRNAs als Therapieziel in der Onkologie denkbar ist.<sup>89,90</sup>

Auch miR-27a wurde im Blut frühgeborener Zwillinge vermehrt exprimiert. Das veränderte Expressionsprofil dieser miRNA konnte auch in der qRT-PCR beobachtet werden. Eine Studie von *Yu et al.* konnte bereits zeigen, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen der miR-27a mit AHF wie ASD, VSD und PDA assoziiert sind; konnte allerdings nicht die Signifikanz dieses Ergebnisses nachweisen.<sup>91</sup> Eine weitere Rolle spielt die miR-27a zudem als Induktor der  $\beta$ -MHC-Gene des Herzens, womit sie die kardiale Kontraktilität reguliert. Außerdem stimuliert miR-27a den Schilddrüsenhormonrezeptor  $\beta 1$  (TR $\beta 1$ ), der die  $\beta$ -MHC-Transkription üblicherweise inhibiert und somit als Ziel von miR-27a negativ beeinflusst wird.<sup>92</sup> Die  $\beta$ -MHC-Proteine werden so vermindert exprimiert. miR-27a moduliert damit die  $\beta$ -MHC-Genexpression sowohl stimulierend als auch inhibierend.<sup>92</sup> Eine Überexpression konnte zudem mit einer Hypertrophie des Herzens assoziiert werden.<sup>92</sup>

Studien von *Velasco et al.* geben einen anderen Einblick in die Rolle der miR-27 im Rahmen der fetalen Herzentwicklung.<sup>93</sup> Dabei führt die Überexpression von miR-27 zu einer verminderten Expression von *Mstn* (Myostatin) und *Mdfi* (MyoD family Inhibitor) und zu einer erhöhten Expression von *Myocardin* (*Myocd*) in atrialen Kardiomyozyten. Alle genannten Gene haben Einfluss auf die Herzmuskelentwicklung. Somit ist es der miR-27 möglich in der Herzentwicklung vorkommende mRNAs sowohl herauf- als auch herabzuregulieren. Daraus lässt sich schließen, dass eine Überexpression von miR-27 die Myogenese stimuliert.<sup>93</sup> Diese miRNA ließ sich in unserer Studie im Blut frühgeborener Zwillinge vermehrt nachweisen.

Durch ihre bereits bekannte wichtige Rolle in der Herzmuskelentwicklung und unsere Ergebnisse können wir davon ausgehen, dass miR-27 an der Entstehung von AHF und anschließender Frühgeburt beteiligt ist.

Über die im Blut Frühgeborener ebenfalls hochregulierte miR-374 konnte bereits unter Verwendung von neonatalem Ventrikelgewebe von Ratten ein prohypertrophischer Effekt detektiert werden.<sup>94</sup> MiR-374 induziert dabei die kardiale Hypertrophie durch die Hemmung von VEGFR1-abhängigen Regressionswegen. VEGFR fungiert als Tyrosinkinaserzeptor für das Endothelzellenmitogen VEGF, welches eine entscheidende Rolle in der Angiogenese spielt. VEGFR2 ist in Kardiomyozyten an der Entstehung der Hypertrophie beteiligt, während VEGFR1 über Aktivierung der cGMP-abhängige-Proteinkinase-1 (PKG-1) die Regression der Hypertrophie induziert.<sup>94</sup> Bei Betrachtung unserer Ergebnisse wird deutlich, dass miR-374 nicht nur an der Hypertrophieentwicklung beteiligt ist, sondern bereits in der embryonalen Kardiogene einen negativen Einfluss innehat und zu einem AHF führen kann.

## 7.2 IVF-Behandlung als Risikofaktor für AHF

Ein vermehrtes Auftreten von AHF im Zusammenhang mit IVF-Behandlungen von bis zu 50 % wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.<sup>95,96</sup> In unserer Studie wurden lediglich sechs Zwillingspaare aus Schwangerschaften nach erfolgter IVF-Behandlung geboren. Auch die miRNAs der Zwillinge aus Schwangerschaften durch IVF-Behandlung wiesen vermehrt veränderte Expressionsniveaus auf.

Die in Blutproben der aus Schwangerschaften durch erfolgte IVF-Behandlung hervorgegangenen Zwillinge vermehrt exprimierte miR-30a inhibiert die Expression des Transkriptionsfaktors TBX5, der wie bereits bekannt, eine entscheidende Rolle in der fetalen Entwicklung des Herzens spielt. In der Studie von *Wang et al.* konnte ein erhöhtes Vorkommen der miR-30a im Herzgewebe von Patienten mit AHF nachgewiesen werden.<sup>97</sup> Diese inhibiert die Translation der TBX5-mRNA, indem sie mit der funktionellen Variante *TBX5c.\*1101C>T* (rs6489956) interagiert, welche den Transkriptionsfaktor TBX5 beeinflusst. Dadurch kann die miR-30a indirekt mit einer verminder-

ten TBX5-Proteinkonzentration korreliert werden.<sup>97</sup> In dieser Studie konnte das vermehrte Vorkommen der miR-30a im Blut der Zwillinge aus durch IVF entstandenen Schwangerschaften mittels qRT-PCR nicht bestätigt werden.

Die ebenfalls in Zwillingen aus IVF-Schwangerschaften überexprimierte miR-340, die auch in der qRT-PCR die gleiche Expressionsrichtung zeigte, ist als Regulator des Kardiomyozytenstrukturproteins DMD an der Entstehung der exzentrischen Hypertrophie des Herzens beteiligt. Zudem werden durch vermehrte Expression von miR-340 die Sekretion fetaler Gene der atrialen natriuretischen Faktoren A und B (Nppa, Nppb) und des Gens MYH7, welches für die MHC- $\beta$ -Ketten des Herzens kodiert, stimuliert.<sup>98</sup> Die Erhöhung der miR-340 wird durch Stimulation mit CT-1 herbeigeführt, welches zu den Interleukinen IL-6 zählt und einen bereits bekannten Einfluss auf die Myokardhypertrophie hat. MiR-340 bewirkt somit über das Zielgen Dystrophin das Auftreten und Fortschreiten der Herzinsuffizienz.<sup>99,100</sup> Das vermehrte Auftreten der miR-30a und miR-340 bei AHF und Schwangerschaften durch IVF stellen daher mögliche Ansatzpunkte dar, um das erhöhte Risiko für AHF im Rahmen von IVF-Behandlungen zu erklären.

MiR-134 hingegen wurde im Blut von Zwillinge aus Schwangerschaften, die durch IVF-Behandlung entstanden, signifikant vermindert exprimiert, was mittels qRT-PCR validiert werden konnte. MiR-134 konnte bereits im Rahmen der Herzentwicklung als Regulator der humanen Myozytenvorläuferzellen (hCMPCs), die eine entscheidene Rolle in der frühen Herzentwicklung spielen, detektiert werden. In Patienten mit AHF konnte bereits eine signifikante Herabregulation von miR-134 in Myokardgewebe beobachtet werden. Die Herabregulation der miR-134 bewirkt dabei über das Zielgen *Meis 2* die Steigerung der Proliferation von hCMPCs, während die Hochregulierung der miRNA den umgekehrten Effekt erzielt.<sup>101</sup> MiR-134 spielt somit eine entscheidende Rolle in der embryonalen Kardiogenese. Das vermehrte Vorkommen im Blut von Zwillingen mit AHF und die Ergebnisse dieser Studie stellen einen möglichen Zusammenhang der IVF mit AHF dar. Dabei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei den Zwillingen, die aus Schwangerschaften nach IVF-Behandlung hervorgingen zu gleichen Teilen um gesunde und um Patienten mit AHF handelte. Die getroffene Schlussfolgerung ist daher nur unter Betrachtung der bereits vorhandenen Literatur möglich.

Auch miR-432 konnte im Blut der Zwillinge, welche aus Schwangerschaften nach IVF-Behandlung entstanden als vermindert exprimiert validiert werden. Die Herabregulierung dieser miRNA wurde bereits als möglicher Biomarker für das Auftreten von Vorhofflimmern in Betracht gezogen. Dabei konnte nach erfolgter Katheterablation der Patienten eine Anpassung des miRNA-Levels an das gesunder Zwillinge beobachtet werden.<sup>102</sup> Zudem spielt miR-432 eine Rolle in der embryonalen Entwicklung der skeletalen Muskulatur, wobei sie die Proliferation und Differenzierung der Myoblasten via Myozenin1 reguliert. MiR-432 ist dabei in den Muskelzellen von Schweinen vermehrt in der frühen Embryonalperiode aufzufinden, während das Vorkommen beim ausgewachsenen Schwein sinkt.<sup>103</sup>

Über die validiert vermindert exprimierte miR-764 im Blut der Zwillinge aus durch IVF-entstandene Schwangerschaften ist bisher noch wenig bekannt. Über eines ihrer Zielgene RAF1 scheint sie eine positiv beeinflussende Funktion in der Angiogenese zu haben, worüber es bisweilen jedoch keine genaueren Studien gibt.<sup>104</sup> In einer Studie hingegen wurde die umgekehrte Rolle der miR-764 im Rahmen der Angiogenese bei Patienten mit bronchialem Adenokarzinom aufgezeigt. Hier konnte sie mit dem Vorkommen der Gefäßinvasion negativ signifikant korreliert werden.<sup>105</sup>

Auch miR-454 zeigte ein verändertes Expressionsprofil im Blut der aus Schwangerschaften durch IVF-Behandlung entstandenen Zwillinge. Im Vergleich zu jenen nach spontaner Konzeption konnte eine vermehrte Expressierung beobachtet werden. Die Hochregulierung dieser miRNA konnte bereits bei Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht (low birth weight,  $\leq 2500$  g) und ebenso bei makrosomen Neugeborenen (high birth weight  $\geq 4300$  g) im Vergleich zu normalgewichtigen Neugeborenen (normal birth weight 2501 – 4299 g) beobachtet werden. Da miR-454 sowohl in der neuronalen Gehirnentwicklung eine Rolle spielt als auch bei Entzündungsreaktionen, wurde anhand der Studienergebnisse auf eine mögliche Erklärung der molekularen Mechanismen der vermehrten Infektanfälligkeit und Lernschwierigkeiten mikrosomer Neugeborener hingewiesen.<sup>106</sup> In einer weiteren Studie wurde hingegen die verminderte Expression der miR-454 mit dem Vorkommen einer diastolischen Herzinsuffizienz assoziiert.<sup>107</sup>

MiR-766 konnte im Blut monozygoter Zwillinge als signifikant hochreguliert validiert werden, während sie bei den aus Schwangerschaften nach IVF-Behandlung entstandenen Zwillingen signifikant herunterreguliert war. Diese miRNA wurde bereits als

negativer Regulator der Gene der humanen Aldosteronsynthese beobachtet. Eine Herabregulation hat dabei eine erhöhte Aldosteronsynthese zur Folge, welche ein möglicher Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist. Der Einfluss von Aldosteron auf die kardiale Fibrosierung und das ventrikuläre Remodeling ist bereits bekannt.<sup>108</sup> Die Herabregulation der miR-766 in Blutproben von Zwillingen, welche aus Schwangerschaften nach erfolgter IVF-Behandlung entstanden, konnte dabei mit dem vermehrten Vorkommen von AHF assoziiert werden, während die vermehrte Expression bei monozygoten Zwillinge dadurch nicht erklärbar ist.

### 7.3 Bedeutung der Zygotität im Rahmen Entstehung von AHF

Von den eingeschlossenen Zwillingspaaren konnten zwölf als monozygot nachgewiesen werden, während nur sieben dizygot sind. Diese Häufigkeiten wiesen auf ein erhöhtes Risiko der Entstehung von AHF bei monozygoten Zwillingen hin. Die Werte sind jedoch nur als Tendenzen zu sehen, da keine statistische Analyse durchgeführt werden konnte.

In den Blutproben der monozygoten Zwillinge konnten gegenüber denen der dizygoten Zwillinge mittels Microarray mehrere signifikant verändert exprimierte miRNAs nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich verschiedene Ergebnisse bei Betrachtung der Zwillinge mit AHF und ohne AHF. Der Plasmaspiegel der miR-133 war bei monozygoten Zwillingen mit AHF höher als bei dizygoten Zwillingen mit AHF. Im Herzmuskelgewebe von Mäusen wurde miR-133 als möglicher Regulator identifiziert.<sup>109</sup> Eine vermehrte Expression korrelierte mit der Repression des Transkriptionsfaktors Myogenin, welcher an der Differenzierung des Muskelgewebes beteiligt ist und stimulierte die Proliferation von Myoblasten.<sup>110</sup> Die Differenzierung der Herzmuskelzellen ist demnach bei monozygoten Patienten mit AHF supprimiert, während die Myoblastenproliferation gesteigert ist.

In einer weiteren Studie konnte der Zusammenhang der Dysregulation von fünf miRNAs mit Trisomie 21, dem am häufigsten mit AHF assoziierten genetischen Syndrom, hergestellt werden, welche auf Chromosom 21 (Hsa21) überexprimiert waren. Trisomie 21 geht häufig mit AHF einher, wobei als häufigster AHF der AVSD gilt.<sup>111</sup> Auch miR-125 und miR-99, welche in monozygoten Zwillingen mit AHF und frühgeborenen

Zwillingen festgestellt werden konnten, wurden dabei detektiert. Die genauen Einflüsse der analysierten miRNAs oder deren Zielgene konnten in der genannten Studie jedoch nicht näher bestimmt werden.<sup>22</sup> Auch in unserer Studie wurde ein Zwilling mit Trisomie 21 und AHF (Mitralklappeninsuffizienz III<sup>o</sup>) eingeschlossen. Das Geschwisterkind hatte hingegen weder eine syndromale Erkrankung noch einen AHF.

MiR-125 reguliert den Transkriptionsfaktor Mef2d (Myocytes-Enhancer-factor 2D), der an der neuronalen und muskulären Zellentwicklung und –differenzierung beteiligt ist.<sup>93</sup> Wir konnten die vermehrte Expression von miR-125 im Blut monozygoter Zwillinge mit AHF im Vergleich zu dizygoten Zwillingen mit AHF anhand signifikanter Werte im MicroArray feststellen.

Die mittels qRT-PCR validiert signifikant erhöhte Expression der miR-328, die über Suppression von SERCA2 (ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Transporting 2) den Calcineurin/NFATc3-Signalweg aktiviert und so zur kardialen Hypertrophie führt, war ebenfalls im Blut monozygoter Zwillingen, aber auch im Blut der Zwillinge aus Schwangerschaften nach spontaner Konzeption zu finden.<sup>112</sup> Diese vermehrte Expression lag jeweils unabhängig vom Vorliegen eines AHFs vor. Auch der Zusammenhang der erhöhten Expression der miR-328 und dem vermehrtem Auftreten von Vorhofflimmern ist bekannt.<sup>113</sup> Eine Entstehung von AHF bei den betroffenen Zwillingen lässt sich anhand dieser miRNAs in unserer Studie nicht genau erklären.

Die mittels qRT-PCR validiert signifikant erhöhten miR-361-3p und miR-197 im Blut monozygoter Zwillinge tauchen in der Literatur bisweilen nicht in Zusammenhang mit der kongenitalen Herzentwicklung auf. Das vermehrte Vorkommen der miR-197 konnte jedoch als Biomarker für das Auftreten der koronaren Herzkrankheit und der Risikostratifikation eines darauf folgenden kardiovaskulären Todes identifiziert werden.<sup>114,115</sup> Eine verminderte Expression der miR-361-3p wurde als quantitativer Biomarker für das Vorkommen und den Malignitätsgrad von Bronchialkarzinomen nachgewiesen.<sup>116</sup>

In einer zweiten Auswertung der miRNA-Expressionsprofile der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF konnten sieben weitere signifikant vermehrt exprimierte miRNAs im Blut der monozygoten Zwillinge mit AHF mittels qRT-PCR validiert werden ( $p < 0.05$ ).

Die beiden miRNA miR-5189-3p und miR-4707-3p konnten bisher noch nicht mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. MiR-5189 wurde bisher nur in Zusammenhang mit der toxischen Wirkung von Methotrexat bei Behandlung von B-ALL beschrieben, während miR-4707-3p mit der Entstehung von Weitwinkelglaukomen assoziiert wird.<sup>117,118</sup>

Für miR-1306 hingegen wurde bereits eine kardiale Rolle durch ihr Vorkommen in Myokardgewebe beobachtet. Eine mögliche Funktion als Biomarker für das Auftreten und den Ausgang von akutem Herzversagen wurde dabei in Erwägung gezogen.<sup>85,86</sup> Anhand des vermehrten Vorkommens im Blut monozygoter Zwillinge mit AHF wird deutlich, dass miR-1306 ebenfalls eine Rolle in der embryonalen kardialen Pathogenese spielt. Eine mögliche Funktion als Biomarker müsste anhand größerer Studienteilnehmerzahlen geklärt werden.

Die ebenfalls hochregulierten miRNAs miR-4732, miR-890 und miR-511 sind im Zusammenhang mit AHF ebenfalls noch unbekannt. Während miR-4732 keinerlei Erwähnung in der medizinischen Forschung findet, ist miR-890 unter anderem mit dem Auftreten und der Therapie von Prostatakarzinomen assoziiert.<sup>119,120</sup>

In der Entstehung von Artherosklerose und dem damit verbundenen Lipoproteinmetabolismus ist miR-511 als eine regulierende miRNA bekannt.<sup>121</sup>

Die Bedeutung der miR-421 in Zusammenhang mit TOF konnte bereits von *Bittel et al.* gezeigt werden.<sup>37</sup> Dabei wurde ihr Einfluss auf den kardiovaskulären Regulationsweg und die Zellproliferation beschrieben. Im rechtsventrikulären Herzmuskelgewebe von Säuglingen mit TOF konnten *Bittel et al.* eine signifikante Überexpression der miR-421 beobachten.<sup>37</sup> Diese miRNA war auch in unserer Studie im Blut monozygoter Zwillinge mit AHF hochreguliert und zeigt dabei den Einfluss auf die kardiale Pathogenese in der Embryonalentwicklung.

Auch in einer von unserem Forschungsbereich bereits durchgeführten Studie wurde miR-421 im Zusammenhang mit TOF beschrieben.<sup>35</sup> miR-421 war hier im Blut von Patienten mit TOF und symptomatischem Rechtsherzversagen im Vergleich zu jenen ohne Rechtsherzversagen herunterreguliert.<sup>35</sup> Die Interpretation der Ergebnisse bei welcher ein vermindertes Expressionslevel von miR-421 mit einer Krankheitsprogression assoziiert wurde, wird jedoch durch unsere Ergebnisse nicht weiter gestützt. Da-

bei ist zu beachten, dass wir den Vergleich von Zwillingen mit und ohne AHF betrachteten, während in der Studie von *Abu-Halima et al.* die beide Vergleichsgruppen an einem AHF litten.<sup>35</sup>

Bei Betrachtung der beiden Altersklassen mit Zwillingen <10 Jahren und ≥10 Jahren konnten bei den jüngeren Zwillingen mit AHF dieselben signifikanten miRNAs gefunden werden wie in der Gesamtpopulation. Bei den Zwillingen ≥10 Jahren wies lediglich miR-5189-3p eine grenzwertige Signifikanz auf. Das Alter scheint daher ebenfalls eine entscheidende Rolle auf die miRNA-Expression zu spielen, was in unserer Pilotstudie noch zu großen Teilen unberücksichtigt blieb.

## 7.4 Zusammenfassung der Studienergebnisse

Bei der miRNA-Analyse einer heterogenen Gruppe von Zwillingspaaren mit und ohne AHF konnten verschiedene dysregulierte miRNAs detektiert werden. Die größten Veränderungen zeigten sich im Kollektiv der frühgeborenen Zwillinge und der Zwillinge aus Schwangerschaften nach erfolgter IVF-Behandlung. Ebenso im Vergleich der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF. Daraus kann man, wie in der Literatur bereits beschrieben, schließen, dass sowohl die IVF-Behandlung, als auch die Frühgeburt und Monozygotität direkt mit dem Auftreten von AHF korrelieren.<sup>14</sup> Mithilfe verschiedener Vergleiche konnten wir einige signifikante miRNAs identifizieren, die in Zusammenhang mit der Entstehung von AHF zu stehen scheinen, welche in diesem Kontext bisweilen Erwähnung fanden und in der weiteren Forschung von Bedeutung sein könnten.

## 7.5 Limitationen dieser Forschungsergebnisse

Da es sich bei dieser Arbeit um eine Pilotstudie handelte, war die Studienteilnehmerzahl mit nur 19 Zwillingspaaren relativ gering. Zudem stellte sich die Studienpopulation als sehr heterogen dar, da sich die Zwillingspaare sowohl in Alter, Art und Schwere der Herzfehler und der bereits durchgeführten Therapien stark unterschieden.

Der bereits bekannte Zusammenhang der Entstehung von AHF und Umweltfaktoren konnte in unserer Studie zwar beobachtet werden, sollte jedoch anhand einer größeren Studienteilnehmerzahl konkretisiert werden.<sup>61,122</sup> Dabei könnten für die Entstehung von AHF wichtige Risikofaktoren wie beispielsweise pränatale Mangelversorgung eines Zwillings im Rahmen eines Feto-fetalen Transfusionssyndrom oder weitere pränatale fetale und mütterliche Einflussgrößen untersucht werden und mit den miRNA-Expressionsprofilen korreliert werden. Dennoch konnten wir zahlreiche miRNAs detektieren, die in der Literatur bereits bekannte Einflüsse in der kardialen Pathogenese spielen und so mit von uns gewählten Faktoren wie Frühgeburt, Zygosität und Art der Schwangerschaftsentstehung korreliert werden konnten. Hierbei könnten spezifische miRNAs als mögliche Biomarker für AHF identifiziert werden, um eine neue Möglichkeit der Diagnostik zu schaffen.

Um neben der bekannten genetischen Prädisposition auch die Rolle der epigenetischen Faktoren in der frühen Entwicklung des Feten zu verstehen, sollte daher eine ausführliche epigenetische Analyse durch Genomsequenzierung im Blut von Zwillingen mit und ohne AHF folgen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Sifrim A, Hitz M-P, Wilsdon A, et al. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet.* 2016;48(9):1060-1065. doi:10.1038/ng.3627.
2. 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 Pädiatrie.* 2010;222(05):321-326. doi:10.1055/s-0030-1254155.
3. Schwedler G, Lindinger A, Lange PE, et al. Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in Germany. *Clin Res Cardiol.* 2011;100(12):1111-1117. doi:10.1007/s00392-011-0355-7.
4. Leitlinie Pädiatrische Kardiologie: Ventrikelseptumdefekt Autoren: S. Dittrich (Erlangen), P. Ewert (Berlin), T.-P. Lê (Hamburg), K. R. Schirmer (Hamburg), J. Hörer (München). Accessed 08 June, 2018.
5. Beghetti M, Galiè N. Eisenmenger Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(9):733-740. doi:10.1016/j.jacc.2008.11.025.
6. Best KE, Rankin J. Increased risk of congenital heart disease in twins in the North of England between 1998 and 2010. *Heart.* 2015;101(22):1807-1812. doi:10.1136/heartjnl-2015-307826.
7. Glinianaia SV, Rankin J, Wright C. Congenital anomalies in twins: a register-based study. *Hum Reprod.* 2008;23(6):1306-1311. doi:10.1093/humrep/den104.
8. Mastroiacovo P, Castilla EE, Arpino C, et al. Congenital malformations in twins: an international study. *Am J Med Genet.* 1999;83(2):117-124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10190482>. Accessed May 27, 2017.
9. Li S-J, Ford N, Meister K, Bodurtha J. Increased risk of birth defects among children from multiple births. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2003;67(10):879-885. doi:10.1002/bdra.10093.
10. Joy J, McClure N, Cooke IE. A comparison of spontaneously conceived twins

- and twins conceived by artificial reproductive technologies. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2008;28(6):580-585. doi:10.1080/01443610802311802.
11. Panagiotopoulou O, Fouzas S, Sinopidis X, Mantagos SP, Dimitriou G, Karatza AA. Congenital heart disease in twins: The contribution of type of conception and chorionicity. *Int J Cardiol*. 2016;218:144-149. doi:10.1016/j.ijcard.2016.05.029.
  12. Pinborg A. IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum Reprod Update*. 2005;11(6):575-593. doi:10.1093/humupd/dmi027.
  13. Heino A, Gissler M, Hindori-Mohangoo AD, et al. Variations in Multiple Birth Rates and Impact on Perinatal Outcomes in Europe. Baud O, ed. *PLoS One*. 2016;11(3):e0149252. doi:10.1371/journal.pone.0149252.
  14. Taksande A, Vilhekar K, Chaturvedi P, Jain M. Congenital malformations at birth in Central India: A rural medical college hospital based data. *Indian J Hum Genet*. 2010;16(3):159-163. doi:10.4103/0971-6866.73412.
  15. Hosokawa S, Vanderpool RR, Ishii T, Nishiyama M, Doi S. What Causes Pulmonary Arterial Hypertension in Down Syndrome With Congenital Heart Disease? *Circ J*. 2018;82(6):1513-1514. doi:10.1253/circj.CJ-18-0471.
  16. Kosiv KA, Gossett JM, Bai S, Collins RT. Congenital Heart Surgery on In-Hospital Mortality in Trisomy 13 and 18. *Pediatrics*. 2017;140(5):e20170772. doi:10.1542/peds.2017-0772.
  17. Rose V, Gold RJ, Lindsay G, Allen M. A possible increase in the incidence of congenital heart defects among the offspring of affected parents. *J Am Coll Cardiol*. 1985;6(2):376-382. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4019923>. Accessed June 8, 2018.
  18. Oyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PKA, Melbye M. Recurrence of Congenital Heart Defects in Families. *Circulation*. 2009;120(4):295-301. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.857987.
  19. Burn J, Brennan P, Little J, et al. Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet*. 1998;351(9099):311-316. doi:10.1016/S0140-6736(97)06486-6.
  20. Gill HK, Splitt M, Sharland GK, Simpson JM. Patterns of recurrence of

- congenital heart disease: An analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(5):923-929. doi:10.1016/S0735-1097(03)00853-2.
21. Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G, et al. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res.* 2007;101(12):1225-1236. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.163147.
  22. Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G. MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol Genomics.* 2008;34(June 2008):239-242. doi:10.1152/physiolgenomics.90254.2008.
  23. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409(6818):363-366. doi:10.1038/35053110.
  24. Franco D, Bonet F, Hernandez-Torres F, Lozano-Velasco E, Esteban FJ, Aranega AE. Analysis of microRNA Microarrays in Cardiogenesis. *Methods Mol Biol.* 2016;1375:207-221. doi:10.1007/7651\_2015\_247.
  25. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385.
  26. Wang Y, Liang Y, Lu Q. MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin Genet.* 2008;74(4):307-315. doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01075.x.
  27. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>. Accessed October 14, 2016.
  28. Wienholds E, Plasterk RHA. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 2005;579(26):5911-5922. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.070.
  29. Heyam A, Lagos D, Plevin M. Dissecting the roles of TRBP and PACT in double-stranded RNA recognition and processing of noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 6(3):271-289. doi:10.1002/wrna.1272.
  30. Philippen LE, Dirkx E, da Costa-Martins PA, De Windt LJ. Non-coding RNA in control of gene regulatory programs in cardiac development and disease. *J Mol*

- Cell Cardiol.* 2015;89(Pt A):51-58. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.03.014.
31. Xie W-Q, Zhou L, Chen Y, Ni B. Circulating microRNAs as potential biomarkers for diagnosis of congenital heart defects. *World J Emerg Med.* 2016;7(2):85-89. doi:10.5847/wjem.j.1920-8642.2016.02.001.
  32. Zhu S, Cao L, Zhu J, et al. Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clin Chim Acta.* 2013;424:66-72. doi:10.1016/j.cca.2013.05.010.
  33. Li J, Cao Y, Ma X, et al. Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):1441-1446. doi:10.1016/j.ijcard.2012.12.048.
  34. Li D, Ji L, Liu L, et al. Characterization of circulating microRNA expression in patients with a ventricular septal defect. *PLoS One.* 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0106318.
  35. Abu-Halima M, Meese E, Keller A, Abdul-Khaliq H, Rädle-Hurst T. Analysis of circulating microRNAs in patients with repaired Tetralogy of Fallot with and without heart failure. *J Transl Med.* 2017;15(1):156. doi:10.1186/s12967-017-1255-z.
  36. O'Brien JE, Kibiryeva N, Zhou X-G, et al. Noncoding RNA Expression in Myocardium From Infants With Tetralogy of Fallot. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(3):279-286. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.961474.
  37. Bittel DC, Kibiryeva N, Marshall JA, O'Brien JE. MicroRNA-421 Dysregulation is Associated with Tetralogy of Fallot. *Cells.* 2014;3(3):713-723. doi:10.3390/cells3030713.
  38. Liang D, Xu X, Deng F, et al. miRNA-940 reduction contributes to human Tetralogy of Fallot development. *J Cell Mol Med.* 2014;18(9):1830-1839. doi:10.1111/jcmm.12309.
  39. He S, Liu P, Jian Z, et al. miR-138 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis via MLK3/JNK/c-jun pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441(4):763-769. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.151.
  40. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106(6):1035-1039.

doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.218297.

41. Tutarel O, Dangwal S, Bretthauer J, et al. Circulating miR-423\_5p fails as a biomarker for systemic ventricular function in adults after atrial repair for transposition of the great arteries. *Int J Cardiol.* 2013;167(1):63-66. doi:10.1016/j.ijcard.2011.11.082.
42. Lai CTM, Ng EKO, Chow P, Kwong A, Cheung Y. Circulating microRNA expression profile and systemic right ventricular function in adults after atrial switch operation for complete transposition of the great arteries. *BMC Cardiovasc Disord.* 2013;13(1):73. doi:10.1186/1471-2261-13-73.
43. Lai CT, Ng EK, Chow P, Kwong A, Cheung Y. Circulating microRNA expression profile and systemic right ventricular function in adults after atrial switch operation for complete transposition of the great arteries. *BMC Cardiovasc Disord.* 2013;13(1):73. doi:10.1186/1471-2261-13-73.
44. Abu-Halima M, Poryo M, Ludwig N, et al. Differential expression of microRNAs following cardiopulmonary bypass in children with congenital heart diseases. *J Transl Med.* 2017;15(1):117. doi:10.1186/s12967-017-1213-9.
45. Abu-Halima M, Meese E, Keller A, Abdul-Khaliq H, Rädle-Hurst T. Analysis of circulating microRNAs in patients with repaired Tetralogy of Fallot with and without heart failure. *J Transl Med.* 2017;15(1):156. doi:10.1186/s12967-017-1255-z.
46. Abu-Halima M, Kahraman M, Henn D, et al. Deregulated microRNA and mRNA expression profiles in the peripheral blood of patients with Marfan syndrome. *J Transl Med.* 2018;16(1):60. doi:10.1186/s12967-018-1429-3.
47. Kloesel B, DiNardo JA, Body SC. Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease: A Primer for Anesthesiologists. *Anesth Analg.* 2016;123(3):551-569. doi:10.1213/ANE.0000000000001451.
48. Noh H-M, Lee SC, Park SW, Sung J, Song Y-M. Genetic influence on left ventricular structure and function: a Korean twin and family study. *Twin Res Hum Genet.* 2015;18(3):281-289. doi:10.1017/thg.2015.18.
49. Grunert M, Dorn C, Cui H, et al. Comparative DNA methylation and gene expression analysis identifies novel genes for structural congenital heart

- diseases. *Cardiovasc Res*. August 2016. doi:10.1093/cvr/cvw195.
50. AlRais F, Feldstein VA, Srivastava D, Gosnell K, Moon-Grady AJ. Monozygotic twins discordant for congenital heart disease: a referral center's experience and possible pathophysiologic mechanisms. *Prenat Diagn*. 2011;31(10):978-984. doi:10.1002/pd.2819.
51. Tammen SA, Friso S, Choi S-W. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol Aspects Med*. 2013;34(4):753-764. doi:10.1016/j.mam.2012.07.018.
52. Deans C, Maggert KA. What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*. 2015;199(4):887-896. doi:10.1534/genetics.114.173492.
53. Chamberlain AA, Lin M, Lister RL, et al. DNA methylation is developmentally regulated for genes essential for cardiogenesis. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):e000976. doi:10.1161/JAHA.114.000976.
54. Li N, Subrahmanyam L, Smith E, et al. Mutations in the Histone Modifier PRDM6 Are Associated with Isolated Nonsyndromic Patent Ductus Arteriosus. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1082-1091. doi:10.1016/j.ajhg.2016.03.022.
55. Ang S-Y, Uebersohn A, Spencer CI, et al. KMT2D regulates specific programs in heart development via histone H3 lysine 4 di-methylation. *Development*. 2016;143(5):810-821. doi:10.1242/dev.132688.
56. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):299-309. doi:10.1038/nrg2047.
57. Aslani S, Jafari N, Javan MR, Karami J, Ahmadi M, Jafarnejad M. Epigenetic Modifications and Therapy in Multiple Sclerosis. *Neuromolecular Med*. July 2016. doi:10.1007/s12017-016-8422-x.
58. Izumi K, Hayashi D, Grochowski CM, et al. Discordant clinical phenotype in monozygotic twins with Alagille syndrome: Possible influence of non-genetic factors. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(2):471-475. doi:10.1002/ajmg.a.37429.
59. Bell JT, Spector TD. A twin approach to unraveling epigenetics. *Trends Genet*. 2011;27(3):116-125. doi:10.1016/j.tig.2010.12.005.

60. Petronis A. Epigenetics and twins: three variations on the theme. *Trends Genet.* 2006;22(7):347-350. doi:10.1016/j.tig.2006.04.010.
61. Springer S, Mlczoch E, Krampfl-Bettelheim E, et al. Congenital heart disease in monozygotic twins with and without twin-to-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn.* 2014;34(10):994-999. doi:10.1002/pd.4411.
62. Michelfelder E, Tan X, Cnota J, et al. Prevalence, Spectrum, and Outcome of Right Ventricular Outflow Tract Abnormalities in Twin-twin Transfusion Syndrome: A Large, Single-center Experience. *Congenit Heart Dis.* 10(3):209-218. doi:10.1111/chd.12215.
63. Roifman M, Choufani S, Turinsky AL, et al. Genome-wide placental DNA methylation analysis of severely growth-discordant monozygotic twins reveals novel epigenetic targets for intrauterine growth restriction. *Clin Epigenetics.* 2016;8(1):70. doi:10.1186/s13148-016-0238-x.
64. Shi H, O'Reilly VC, Moreau JLM, et al. Gestational stress induces the unfolded protein response, resulting in heart defects. *Development.* 2016;143(14):2561-2572. doi:10.1242/dev.136820.
65. Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res.* 2007;61(5 Pt 2):24R-29R. doi:10.1203/pdr.0b013e3180457684.
66. Tan Q, Christiansen L, von Bornemann Hjelmberg J, Christensen K. Twin methodology in epigenetic studies. *J Exp Biol.* 2015;218(Pt 1):134-139. doi:10.1242/jeb.107151.
67. Zarrinpar A, Gupta S, Maurya MR, Subramaniam S, Loomba R. Serum microRNAs explain discordance of non-alcoholic fatty liver disease in monozygotic and dizygotic twins: a prospective study. *Gut.* 2016;65(9):1546-1554. doi:10.1136/gutjnl-2015-309456.
68. Mak YT, Hampson G, Beresford JN, Spector TD. Variations in genome-wide gene expression in identical twins – a study of primary osteoblast-like culture from female twins discordant for osteoporosis. *BMC Genet.* 2004;5(1):14. doi:10.1186/1471-2156-5-14.
69. Davey MP, Meyer MM, Bakke AC. T cell receptor V beta gene expression in monozygotic twins. Discordance in CD8 subset and in disease states. *J*

- Immunol.* 1994;152(1):315-321.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7902857>. Accessed May 11, 2017.
70. Vencovský J, Maini RN, Ollier WE, Mageed RA. Immunoglobulin variable region (IgV) gene expression in rheumatoid factors from monozygotic twins with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;815:324-326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186670>. Accessed May 11, 2017.
71. Wilson SB, Kent SC, Horton HF, et al. Multiple differences in gene expression in regulatory Valpha 24Jalpha Q T cells from identical twins discordant for type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7411-7416. doi:10.1073/pnas.120161297.
72. Munshi NC, Hideshima T, Carrasco D, et al. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood.* 2004;103(5). <http://www.bloodjournal.org/content/103/5/1799.short?sso-checked=true>. Accessed May 11, 2017.
73. Cheung VG, Conlin LK, Weber TM, et al. Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat Genet.* 2003;33(3):422-425. doi:10.1038/ng1094.
74. Thomas JM, Surendran S, Abraham M, Rajavelu A, Kartha CC. Genetic and epigenetic mechanisms in the development of arteriovenous malformations in the brain. *Clin Epigenetics.* 2016;8:78. doi:10.1186/s13148-016-0248-8.
75. Franklin RCG, Anderson RH, Daniëls O, et al. Report of the Coding Committee of the Association for European Paediatric Cardiology. *Cardiol Young.* 2002;12(S2):1. doi:10.1017/S1047951100012208.
76. Voigt M, Fusch C, Olbertz D, et al. Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2006;66(10):956-970. doi:10.1055/s-2006-924458.
77. Perzentilen Einzeichner. <https://www.pedz.de/de/perzentilen/index.php>. Accessed May 25, 2017.
78. Kohse KP, Thamm M. *KiGGS—the German Survey on Children’s Health as Data Base for Reference Intervals.* Vol 44.; 2011. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.02.016.

79. Merz E, Bahlmann F. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. Thieme; 2005. <https://radiopaedia.org/articles/dichorionic-diamniotic-twin-pregnancy>. Accessed May 18, 2017.
80. Cordero L, Franco A, Joy SD. Monochorionic monoamniotic twins: neonatal outcome. *J Perinatol*. 2006;26(3):170-175. doi:10.1038/sj.jp.7211457.
81. Nair M, Kumar G. Uncomplicated monochorionic diamniotic twin pregnancy. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2009;29(2):90-93. doi:10.1080/01443610802646793.
82. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
83. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W460-6. doi:10.1093/nar/gkv403.
84. Hamberg M, Backes C, Fehlmann T, et al. MiRTargetLink--miRNAs, Genes and Interaction Networks. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):564. doi:10.3390/ijms17040564.
85. van Boven N, Kardys I, van Vark LC, et al. Serially measured circulating microRNAs and adverse clinical outcomes in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2018;20(1):89-96. doi:10.1002/ejhf.950.
86. Bayés-Genis A, Lanfear DE, de Ronde MWJ, et al. Prognostic value of circulating microRNAs on heart failure-related morbidity and mortality in two large diverse cohorts of general heart failure patients. *Eur J Heart Fail*. 2018;20(1):67-75. doi:10.1002/ejhf.984.
87. Dawson AL, Tinker SC, Jamieson DJ, et al. Twinning and major birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2007. *J Epidemiol Community Health*. June 2016. doi:10.1136/jech-2015-206302.
88. Ribeiro de Andrade Ramos B, da Silva MG. The Burden of Genetic and Epigenetic Traits in Prematurity. *Reprod Sci*. 2018;25(4):471-479. doi:10.1177/1933719117718270.
89. Higuchi T, Todaka H, Sugiyama Y, et al. Suppression of MicroRNA-7 (miR-7)

- Biogenesis by Nuclear Factor 90-Nuclear Factor 45 Complex (NF90-NF45) Controls Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. *J Biol Chem.* 2016;291(40):21074-21084. doi:10.1074/jbc.M116.748210.
90. Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem.* 2009;284(9):5731-5741. doi:10.1074/jbc.M804280200.
91. Yu K, Ji Y, Wang H, et al. Association of miR-196a2, miR-27a, and miR-499 polymorphisms with isolated congenital heart disease in a Chinese population. *Genet Mol Res.* 2016;15(4). doi:10.4238/gmr15048929.
92. Nishi H, Ono K, Horie T, et al. MicroRNA-27a Regulates Beta Cardiac Myosin Heavy Chain Gene Expression by Targeting Thyroid Hormone Receptor 1 in Neonatal Rat Ventricular Myocytes. *Mol Cell Biol.* 2011;31(4):744-755. doi:10.1128/MCB.00581-10.
93. Lozano-Velasco E, Galiano-Torres J, Jodar-Garcia A, Aranega AE, Franco D. miR-27 and miR-125 Distinctly Regulate Muscle-Enriched Transcription Factors in Cardiac and Skeletal Myocytes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-6. doi:10.1155/2015/391306.
94. Lee JS, Song DW, Park JH, Kim JO, Cho C, Kim DH. miR-374 promotes myocardial hypertrophy by negatively regulating vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling. *BMB Rep.* 2017;50(4):208-213. doi:10.5483/BMBREP.2017.50.4.165.
95. Panagiotopoulou O, Fouzas S, Sinopidis X, Mantagos SP, Dimitriou G, Karatza AA. Congenital heart disease in twins: The contribution of type of conception and chorionicity. *Int J Cardiol.* 2016;218:144-149. doi:10.1016/j.ijcard.2016.05.029.
96. Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, et al. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Hum Reprod.* 2009;24(2):360-366. doi:10.1093/humrep/den387.
97. Wang F, Liu D, Zhang R-R, et al. A TBX5 3'UTR variant increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Cell Discov.*

- 2017;3:17026. doi:10.1038/celldisc.2017.26.
98. Zhou J, Gao J, Zhang X, et al. microRNA-340-5p Functions Downstream of Cardiotrophin-1 to Regulate Cardiac Eccentric Hypertrophy and Heart Failure via Target Gene Dystrophin. *Int Heart J.* 2015;56(4):454-458. doi:10.1536/ihj.14-386.
99. Zhou J, Gao J, Zhang X, et al. microRNA-340-5p Functions Downstream of Cardiotrophin-1 to Regulate Cardiac Eccentric Hypertrophy and Heart Failure via Target Gene Dystrophin. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/ihj/56/4/56\\_14-386/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ihj/56/4/56_14-386/_pdf). Accessed October 11, 2017.
100. Zhu X, Wang H, Liu F, et al. Identification of micro-RNA networks in end-stage heart failure because of dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med.* 2013;17(9):n/a-n/a. doi:10.1111/jcmm.12096.
101. Wu Y-H, Zhao H, Zhou L-P, et al. miR-134 Modulates the Proliferation of Human Cardiomyocyte Progenitor Cells by Targeting Meis2. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25199-25213. doi:10.3390/ijms161025199.
102. Liu T, Zhong S, Rao F, Xue Y, Qi Z, Wu S. Catheter ablation restores decreased plasma miR-409-3p and miR-432 in atrial fibrillation patients. *Europace.* 2016;18(1):92-99. doi:10.1093/europace/euu366.
103. Ren RM, Liu H, Zhao SH, Cao JH. Targeting of miR-432 to myozenin1 to regulate myoblast proliferation and differentiation. *Genet Mol Res Genet Mol Res.* 2016;15(154). doi:10.4238/gmr15049313.
104. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA Targets. James C. Carrington, ed. *PLoS Biol.* 2004;2(11):e363. doi:10.1371/journal.pbio.0020363.
105. Kim H, Yang JM, Jin Y, et al. MicroRNA expression profiles and clinicopathological implications in lung adenocarcinoma according to EGFR, KRAS, and ALK status. *Oncotarget.* 2017;8(5):8484. doi:10.18632/ONCOTARGET.14298.
106. Rodil-Garcia P, Arellanes-Licea EDC, Montoya-Contreras A, Salazar-Olivo LA. Analysis of MicroRNA Expression in Newborns with Differential Birth Weight Using Newborn Screening Cards. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).

doi:10.3390/ijms18122552.

107. Nair N, Kumar S, Gongora E, Gupta S. Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem.* 2013;376(1-2):33-40. doi:10.1007/s11010-012-1546-x.
108. Lai CTM, Ng EKO, Chow P, Kwong A, Cheung Y. Circulating MicroRNA in patients with repaired tetralogy of Fallot. *Eur J Clin Invest.* 2017;47(8):574-582. doi:10.1111/eci.12778.
109. Yu P, Wang H, Xie Y, Zhou J, Yao J, Che L. Deregulated Cardiac Specific MicroRNAs in Postnatal Heart Growth. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1-6. doi:10.1155/2016/6241763.
110. Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006;38(2):228-233. doi:10.1038/ng1725.
111. Morlando M, Bhide A, Familiari A, et al. The association between prenatal atrioventricular septal defects and chromosomal abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;208:31-35. doi:10.1016/j.ejogrb.2016.10.039.
112. Li C, Li X, Gao X, et al. MicroRNA-328 as a regulator of cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol.* 2014;173(2):268-276. doi:10.1016/j.ijcard.2014.02.035.
113. McManus DD, Lin H, Tanriverdi K, et al. Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: data from the Framingham Offspring Study. *Hear Rhythm.* 2014;11(4):663-669. doi:10.1016/j.hrthm.2014.01.018.
114. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, et al. Prospective Study on Circulating MicroRNAs and Risk of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(4):290-299. doi:10.1016/J.JACC.2012.03.056.
115. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145930. doi:10.1371/journal.pone.0145930.
116. Roth C, Stückrath I, Pantel K, Izbicki JR, Tachezy M, Schwarzenbach H. Low Levels of Cell-Free Circulating miR-361-3p and miR-625\* as Blood-Based Markers for Discriminating Malignant from Benign Lung Tumors. Lau KM, ed.

- PLoS One*. 2012;7(6):e38248. doi:10.1371/journal.pone.0038248.
117. Iparraguirre L, Gutierrez-Camino A, Umerez M, et al. MiR-pharmacogenetics of methotrexate in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2016;26(11):517-525. doi:10.1097/FPC.0000000000000245.
118. Ghanbari M, Iglesias AI, Springelkamp H, et al. A Genome-Wide Scan for MicroRNA-Related Genetic Variants Associated With Primary Open-Angle Glaucoma. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2017;58(12):5368. doi:10.1167/iovs.17-22410.
119. Pashaei E, Pashaei E, Ahmady M, Ozen M, Aydin N. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. Ahmad A, ed. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179543. doi:10.1371/journal.pone.0179543.
120. Hatano K, Kumar B, Zhang Y, et al. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(8):4075-4086. doi:10.1093/nar/gkv273.
121. Karagiannis GS, Weile J, Bader GD, Minta J. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013;13:4. doi:10.1186/1471-2261-13-4.
122. Begić H, Tahirović HF, Dinarević S, Ferković V, Pranjić N. [Risk factors for the development of congenital heart defects in children born in the Tuzla Canton]. *Med Arh*. 2002;56(2):73-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12014099>. Accessed May 31, 2018.

## 9 Danksagung

Mein Dank gilt besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und den reibungslosen Einstieg in meine erste wissenschaftliche Arbeit.

Ebenso möchte ich Dr. med. Martin Poryo für die zuverlässige Betreuung und Unterstützung in klinischen Fragen zu jeder Zeit danken. Deine hilfreichen Ratschläge haben mir das ein oder andere Mal neuen Mut gemacht und mich stets in meinem Weiterkommen bestärkt.

Danken möchte ich außerdem Dr. rer. nat. Masood Abu-Halima für die rasche Bearbeitung der Blutproben und die Auswertung der Ergebnisse. Die Hilfe beim naturwissenschaftlichen Teil meiner Arbeit und die gute Einführung in das laboratorische Vorgehen hat das gute Voranschreiten erst möglich gemacht.

Auch Prof. Dr. rer. nat Eckart Meese gebührt großer Dank für die Bereitstellung der laboratorischen Mittel und Hilfe in naturwissenschaftlichen Fragen.

Frau Ina Marsollek möchte ich herzlich für die Bearbeitung der Blutproben im Labor danken.

Ein Dank gilt auch den Chefsekretärinnen Frau Christa Franzen und Frau Sandra Pontius für die freundliche Auskunft bei jeglichen Fragen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Pickardt vom Kompetenznetz Angeborene Herzfehler möchte ich für die DNA-Analyse danken, ebenso Prof. Dr. med. Andreas Keller für die abschließenden Auswertungen.

Dank gilt auch den Krankenschwestern der kinderkardiologischen Ambulanz, die mich stets mit Informationen versorgt haben.

Zudem danken möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner Mutter, die mich nicht nur in meiner medizinischen Laufbahn mit Rat und Tat unterstützt und es stets schafft, mir auch in schwierigen Zeiten die Augen für das Gute zu öffnen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Partner Jonathan, der mich nicht nur im Rahmen meiner Dissertation mit seiner unvergleichbar liebevollen Art positiv beeinflusst und mir in jeder Situation zur Seite steht. Ich danke Dir von Herzen!

## 10 Anhang

**Universitätsklinikum des Saarlandes**  
Kliniken für Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Pädiatrische Kardiologie



Direktor: Prof. Dr. Hashim Abdul-Khalig

### **Patienteninformation**

#### ***TWIN-Studie – Molekulare Mechanismen angeborener Herzfehler***

Sehr geehrte Patienten, Eltern und Erziehungsberechtigte,

angeborene Herzfehler sind mit einer Prävalenz von 0,8 – 1% eine der häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Neugeborenenalters. Die genauen Ursachen der Entstehung von angeborenen Herz- und Gefäßmissbildungen sind weitgehend unbekannt. Neben genetischen sind möglicherweise zahlreiche Umweltfaktoren mit verantwortlich.

Viele Studien zeigen, dass bei Zwillingschwangerschaften ein erhöhtes Risiko (0,5 – 0,8% gegenüber der Normalbevölkerung) für Geburtsdefekte inklusive angeborener Herzfehler besteht. Hierbei spielen verschiedene Theorien eine Rolle wie beispielsweise die Anlage nur einer Plazenta mit Auftreten eines fetofetalen Transfusionsyndroms oder aber auch eine mögliche Unterversorgung der Feten mit Nährstoffen im Rahmen einer Mehrlingsschwangerschaft.

Eine andere Theorie für das vermehrte Auftreten angeborener Herzfehler im Rahmen von Zwillingschwangerschaften bezieht sich auf den Einsatz der künstlichen Befruchtung. In zahlreichen Studien wurde ein erhöhtes Vorkommen von angeborenen Herzfehlern im Rahmen von Zwillingschwangerschaften festgestellt, die durch künstliche Befruchtung zustande gekommen waren.

Die Ursache, warum es bei eineiigen Zwillingen trotz der identischen Erbanlage nur bei einem der Zwillinge zur Entstehung eines angeborenen Herzfehlers kommt, ist bisher weiterhin unklar. Es wird zunehmend eine Kombination von genetischen, epigenetischen und Umweltfaktoren bei der Entstehung solcher Herzfehler vermutet.

In den vergangenen Jahren ist die nicht codierende microRNA (kleine Erbträger) vermehrt in den Blickpunkt der Studien gerückt. Diese RNAs beeinflussen die Funktionsentfaltung von Genen und somit die Bildung von Proteinen. Störungen in diesem System führen zu verstärkter oder reduzierter Produktion entsprechender Proteine und spielen womöglich eine wichtige Rolle in der Entstehung von Herz- und Gefäßmissbildungen.

In einer Pilotstudie am Universitätsklinikum des Saarlandes, für die ein positives Votum von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes vorliegt, soll eine Gruppe von Zwillingen untersucht werden, um mögliche Unterschiede im Signalverhalten der microRNA zu erforschen. Dabei wird jeweils eine Blutprobe von beiden Zwillingsgeschwistern, dem herzkranken und dem gesunden Kind, entnommen und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum des Saarlandes (Prof. Dr. E. Meese) ausgewertet. In derselben Weise werden Nicht-Zwillingsgeschwister, die entsprechend der Krankheitskonstellation auf die Zwillingspaare abgestimmt ausgesucht werden, untersucht.

Diese Pilotstudie soll die Grundlage bilden, um in einer zweiten Phase eine multizentrische Studie durch Aufnahme anderer Kinderherzzentren, die im Kompetenznetz Angeborene Herzfehler organi-

Seite 1 von 3

siert sind, durchzuführen. Hier sollen dann, unter Vorkenntnis unserer Ergebnisse, insbesondere einige spezifischen Herzfehler unter Verwendung größerer Probandenzahlen untersucht werden.

## Teilnahme und 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** Sorgerechtigter notwendig. Liegt nur die Unterschrift eines Sorgerechtigten 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 pseudonymisiert 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 (auch in laufenden Studien) vernichtet und die gespeicherten persönlichen Angaben sowie der dazugehörige Schlüssel gelöscht.

## Blutentnahme

Zur Blutentnahme wird aus einer Vene in der Armbeuge oder dem Handrücken ca. 4 ml Blut entnommen. Außer einem kurzen Schmerz beim Einstich der Nadel, der durch eine Anwendung lokal-anästhetischer Salbe reduziert werden kann, kann es gelegentlich zu einer leichten Einblutung mit nachfolgendem Bluterguss kommen, der innerhalb weniger Tage verschwindet. Möglich sind auch Haut-/Gewebe-/Nervenschäden die zu Schmerzen, Entzündungen, Nekrosen, Narben, Empfindungs- und/oder Funktionsstörungen führen können. Infektionen der Einstichstelle können mittels Antibiotika und lokaler Kühlung gut behandelt werden. Extrem selten können Bakterien in die Blutbahn gelangen und zu einer allgemeinen Blutvergiftung (Sepsis) führen und ggf. intensivmedizinische Behandlung erfordert. In manchen Fällen reagieren Patienten bei Blutentnahmen mit einer Kreislaufreaktion. Selbstverständlich wird das anwesende Personal dann entsprechende Maßnahmen zur Gegenregulation ergreifen.

Mit freundlichen Grüßen



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



Dr. med. M. Poryo  
Studienbetreuer

Seite 2 von 3

## Anlage 1: Patienteninformation



## Anhang

Code	Geburtsdatum	AHF	Zygotität	Geschlecht	Schweregrad AHF	Reife bei Geburt	Konzeption	Gestationsalter
HOAZ_1003	05/2011	AVSD	Monozygot	Männlich	Moderat	Frühgeburt	Spontane Konzeption	30+2
HOAZ_1004	05/2011	Gesund	Monozygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	30+2
HOAZ_1005	01/2013	MI, LVOT, PDA, AS	Monozygot	Männlich	Moderat	Frühgeburt	Spontane Konzeption	30+0
HOAZ_1006	01/2013	Gesund	Monozygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	30+0
HOAZ_1014	11/2013	Gesund	Dizygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	34+4
HOAZ_1007	11/2013	TGA, ASD, VSD	Dizygot	Männlich	Schwer	Frühgeburt	Spontane Konzeption	34+4
HOAZ_1009	11/2004	TOF, VSD	Dizygot	Weiblich	Schwer	Reifgeburt	IVF	37+0
HOAZ_1008	11/2004	Gesund	Dizygot	Weiblich	Gesund	Reifgeburt	IVF	37+0
HOAZ_1011	02/2001	Gesund	Monozygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	34+3
HOAZ_1010	02/2001	PDA	Monozygot	Weiblich	Mild	Frühgeburt	Spontane Konzeption	34+3
HOAZ_1012	06/2007	DILV, VSD	Monozygot	Männlich	Schwer	Frühgeburt	Spontane Konzeption	33+3
HOAZ_1013	06/2007	Gesund	Monozygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	33+3
HOAZ_1015	03/2013	ISTA	Monozygot	Weiblich	Moderat	Frühgeburt	IVF	32+6
HOAZ_1016	03/2013	Gesund	Monozygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	IVF	32+6
HOAZ_1018	03/2006	ASD II	Dizygot	Weiblich	Mild	Frühgeburt	IVF	31+3
HOAZ_1017	03/2006	Gesund	Dizygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	IVF	31+3
HOAZ_1019	08/2013	LPA-Stenose	Monozygot	Weiblich	Mild	Reifgeburt	Spontane Konzeption	37+2
HOAZ_1020	08/2013	Gesund	Monozygot	Weiblich	Gesund	Reifgeburt	Spontane Konzeption	37+2
HOAZ_1021	01/2010	ASD, VSD, TGA	Dizygot	Weiblich	Schwer	Reifgeburt	Spontane Konzeption	38+5
HOAZ_1022	01/2010	Gesund	Dizygot	Männlich	Gesund	Reifgeburt	Spontane Konzeption	38+5
HOAZ_1023	11/2008	ASD II	Monozygot	Männlich	Mild	Frühgeburt	Spontane Konzeption	33+3
HOAZ_1024	11/2008	Gesund	Monozygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	33+3
HOAZ_1025	01/2016	ASD II, PS	Dizygot	Weiblich	Mild	Frühgeburt	IVF	33+3
HOAZ_1026	01/2016	Gesund	Dizygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	IVF	33+3
HOAZ_1028	09/1999	Koronarfstel	Monozygot	Weiblich	Mild	Frühgeburt	Spontane Konzeption	36+3
HOAZ_1027	09/1999	Gesund	Monozygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	36+3
HOAZ_1030	12/2013	TOF, VSD, PS	Dizygot	Männlich	Schwer	Frühgeburt	IVF	30+1
HOAZ_1029	12/2013	Gesund	Dizygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	IVF	30+1
HOAZ_1033	05/2006	TOF, VSD, ASD	Monozygot	Weiblich	Schwer	Frühgeburt	Spontane Konzeption	35+2
HOAZ_1034	05/2006	Gesund	Monozygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	35+2
HOAZ_1035	07/2009	VSD	Monozygot	Weiblich	Moderat	Frühgeburt	Spontane Konzeption	30+3
HOAZ_1036	07/2009	Gesund	Monozygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	30+3
HOAZ_1038	10/2004	MI	Dizygot	Weiblich	Moderat	Frühgeburt	IVF	33+3

Code	Geburtsdatum	AHF	Zygotität	Geschlecht	Schweregrad AHF	Reife bei Geburt	Konzeption	Gestationsalter
HOAZ_1037	10/2004	Gesund	Dizygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	IVF	33+3
HOAZ_1040	11/1996	mid-aortic Syndrom	Monozygot	Weiblich	Moderat	Frühgeburt	Spontane Konzeption	33+3
HOAZ_1039	11/1996	Gesund	Monozygot	Weiblich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	33+3
HOAZ_1041	04/2008	Bikuspide Aortenklappe	Monozygot	Männlich	Mild	Frühgeburt	Spontane Konzeption	35+3
HOAZ_1042	04/2008	Gesund	Monozygot	Männlich	Gesund	Frühgeburt	Spontane Konzeption	35+3

Code	Geburtsdatum	Geburtsgewicht (g)	Geburtslänge (cm)	Kopfumfang (cm)	Zeitpunkt der Datenerhebung	Gewicht (kg)	Größe (cm)
HOAZ_1003	05/2011	950	33.5	26.5	09/2016	14	107
HOAZ_1004	05/2011	1730	43	28.5	04/2017	22	116
HOAZ_1005	01/2013	1360	41	28	12/2016	12.5	97
HOAZ_1006	01/2013	1240	38	27.5	03/2016	10.4	84
HOAZ_1014	11/2013	1950	45	31.5	06/2017	16	99
HOAZ_1007	11/2013	2100	48.5	31	07/2016	12	87
HOAZ_1009	11/2004	1900	43	29	12/2016	36.8	149
HOAZ_1008	11/2004				05/2017	41	157
HOAZ_1011	02/2001	2220	45		04/2017	65	152
HOAZ_1010	02/2001	2400	46		04/2017	54	156
HOAZ_1012	06/2007	1930	44	31.5	01/2017	19.6	124
HOAZ_1013	06/2007	1940	44	32	04/2017	23	130
HOAZ_1015	03/2013	1400	40	29	07/2016	14.1	100
HOAZ_1016	03/2013	1965	43	30.5	04/2017	15	105
HOAZ_1018	03/2006	850	34	25.5	05/2017	24.8	134
HOAZ_1017	03/2006	1820	42	29.3	05/2017	29	150
HOAZ_1019	08/2013	1920	44	31	08/2016	12.4	91
HOAZ_1020	08/2013	2180	47	31	08/2016	12.4	91
HOAZ_1021	01/2010	2100	49	32	11/2016	21.3	126
HOAZ_1022	01/2010	3400	52	34	11/2016	20.5	117
HOAZ_1023	11/2008	2300	47	31	10/2016	26.3	130
HOAZ_1024	11/2008	1410	43	29.5	04/2016	22	124
HOAZ_1025	01/2016	2780	45	33	05/2017	10.9	80
HOAZ_1026	01/2016	2360	47	33	05/2017	10.8	80
HOAZ_1028	09/1999	1460	46	29	02/2017	47.5	159
HOAZ_1027	09/1999	2500	50	34	02/2017	50.4	163.5
HOAZ_1030	12/2013	1300	38	28	01/2017	15.9	102
HOAZ_1029	12/2013	1340	40	27	01/2017	16.7	98
HOAZ_1033	05/2006	2200	44	32	04/2017	29	142
HOAZ_1034	05/2006	2370	48	32	04/2017	39.5	153
HOAZ_1035	07/2009	580	32	23.5	10/2016	13.8	103.5
HOAZ_1036	07/2009	1240	38	28	04/2017	30.8	129
HOAZ_1038	10/2004	1920	41	29	03/2017	50.3	143
HOAZ_1037	10/2004	1715	44	29.5	03/2017	36	151
HOAZ_1040	11/1996	2550	46		04/2017	54	160
HOAZ_1039	11/1996	2670	46		04/2017	65	162
HOAZ_1041	04/2008	2050	45	32	05/2017	26	132
HOAZ_1042	04/2008	2490	49	33	05/2017	26.7	133

**Anlage 3: Klinische Daten der Studienpopulation**

Code	DNA-Analyse	D10S1248	vWA	D16S539	D2S1338	AmeI	D8S1779	D21S11	D16S51	D22S1045	D19S433	TH01	FGA	D5S411	D8S1388	D1S1656	D12S91	SE33	D7S820	CSF1PO	TPOX	D5S818	D13S317
HOAZ_1003	Monozygot	14	17,19	11,12	19,20	X,Y	14	30	14,18	15	13,15	7,8	20,23	10,11	15,16	11,17,3	18,3,21	21,28,2	10,12	11	8,12	11,12	8,14
HOAZ_1004	Monozygot	14	17,19	11,12	19,20	X,Y	14	30	14,18	15	13,15	7,8	20,23	10,11	15,16	11,17,3	18,3,21	21,23,2	10,12	11	8,12	11,12	8,14
HOAZ_1005	Monozygot	13,15	16,19	9,12	17,18	X,Y	10,16	28,32,2	14,15	11,15	13,14	9,3	17,23	10,11	14,15	13,16	18,19	28,2,29,2	8,11	10,11	8	12,14	9,13
HOAZ_1006	Monozygot	13,15	16,19	9,12	17,18	X,Y	10,16	28,32,2	14,15	11,15	13,14	9,3	17,23	10,11	14,15	13,16	18,19	28,2,29,2	8,11	10,11	8	12,14	9,13
HOAZ_1009	Dizygot	13,15	17,19	9,12	16,18	X	10,14	28,30	12,14	15,17	14	7,9	22,23	10	15,16	14,16	21,24	20,28,2	8,10	12,13	8	11,12	12,14
HOAZ_1008	Dizygot	14,15	16,19	9,12	20,25	X	13,15	28,29	14,17	16	14,15	7,9	23,24	10,11	15,16	14,16	21,24	15,19	8,9	11,12	8,11	11	11,12
HOAZ_1011	Monozygot	14,16	14,18	9,11	16,17	X	12	28,29	14,18	16	15,2,16	6,9,3	21,25	11,12	16,17	11,14	20,21	17,20	10,12	10	8	11,12	11,12
HOAZ_1010	Monozygot	14,16	14,18	9,11	16,17	X	12	28,29	14,18	16	15,2,16	6,9,3	21,25	11,12	16,17	11,14	20,21	17,20	10,12	10	8	11,12	11,12
HOAZ_1012	Monozygot	15,17	17,18	9,14	19,24	X,Y	12,16	27,29	12,14	15	13,2,15,2	9	20,24	11	15,16	15,17,3	17	28,2,29,2	8,9	12,13	8	10	8,10
HOAZ_1013	Monozygot	15,17	17,18	9,14	19,24	X,Y	12,16	27,29	12,14	15	13,2,15,2	9	20,24	11	15,16	15,17,3	17	28,2,29,2	8,9	12,13	8	10	8,10
HOAZ_1015	Monozygot	15,17	18	11	16,20	X	14,15	29,29,2	12	14,16	13	6,8	20	11,12	15,17	16,17,3	19	31,2,33,2	10	11,14	8,11	12	11,12
HOAZ_1016	Monozygot	15,17	18	11	16,20	X	14,15	29,29,2	12	14,16	13	6,8	20	11,12	15,17	16,17,3	19	31,2,33,2	10	11,14	8,11	12	11,12
HOAZ_1018	Dizygot	12,13	17,18	9,13	17,24	X	12,13	32	11,12	14,17	13,15	9,9,3	20,22	10,11	15,17	11,17,3	18,22	19,27,2	12	9,12	8	11,13	12
HOAZ_1017	Dizygot	13	17	9,13	19	X	12,13	28,32,2	11,12	11,15	14,14,2	9	20,22	10,11	15,17	11,17,3	20,22	19,27,2	12	12	8	11,13	12
HOAZ_1019	Monozygot	12,15	14,16	11,14	19,22	X	12,13	30,31	11,17	15,16	15,15,2	6,7	22	10,15	15	11,15	15,22	15,31,2	8,12	10,12	8,11	11,12	8,13
HOAZ_1020	Monozygot	12,15	16	11,14	19,22	X	12,13	30,31	11,17	15,16	15,15,2	6,7	22	10,15	15	11,15	15,22	15,31,2	8,12	10,12	8,11	11,12	8,13
HOAZ_1023	Monozygot	14,16	15,17	11,13	19,21	X,Y	10,14	28,30	13,16	14,16	14,15,2	6	23,2	11,14	14,15	15,15,3	18,3,23	22,2	9,10	11	8,11	11,13	10,11
HOAZ_1024	Monozygot	14,16	17	11,13	19,21	X,Y	10,14	28,30	13,16	14,16	14,15,2	6	23,2	11,14	14,15	15,15,3	18,3,23	22,2	9,10	11	8,11	11,13	10,11
HOAZ_1025	Dizygot	12,16	18	11,13	17,25	X	12	30	12,15	15,17	14	9,3	26	11,14	16,19	12,17,3	15,20	20,33,2	10,12	10,11	8,10	12,13	11,13
HOAZ_1026	Dizygot	13,14	17	11,13	17,25	X,Y	12,13	30	12,15	15,17	15	9,3	22	11,14	14,15	12,17,3	20,22	31,2	10	10,12	11	11,13	12,13
HOAZ_1028	Monozygot	14,15	16	11,12	17,19	X	12,13	29,30	13	11,15	14,16,2	9,3	25	10,11	16	16,16,3	18,19	15,17	9,11	12,13	9,11	12,13	11
HOAZ_1027	Monozygot	14,15	16	11,12	17,19	X	12,13	29,30	13	11,15	14,16,2	9,3	25	10,11	16	16,16,3	18,19	15,17	9,11	12,13	9,11	12,13	11
HOAZ_1030	Dizygot	14,16	17	12	19,23	X,Y	13,17	29,32,2	12,15	15,16	14,16	9,3	21	11,11,3	16,18	15,16	18,19	17,25,2	11	10,12	8	12,13	11,14
HOAZ_1029	Dizygot	14,16	15,16	11,12	17	X,Y	13,17	31,2,32,2	12	16,17	14,16	9,3	21	11,11,3	15,16	15,15,3	17,18	17,25,2	11	10,11	8	11,12	12,14
HOAZ_1033	Monozygot	13,16	18,19	9,11	16,23	X	12,13	27,32,2	15,19	11,15	14	6,7	22,24	11,12	17,18	14,16	24,25	24,2,26,2	9,12	11	8	12,13	9,12
HOAZ_1034	Monozygot	13,16	18,19	9,11	16,23	X	12,13	27,32,2	15,19	11,15	14	6,7	22,24	11,12	17,18	14,16	24,25	24,2,26,2	9,12	11	8	12,13	9,12
HOAZ_1035	Monozygot	13,15	17	11,13	17,21	X	10,14	29,30	12,16	15,16	15,16,2	9,3	25	11	15,17	13,17,3	18,22	16,20	8,10	11,12	8,9	11	11
HOAZ_1036	Monozygot	13,15	17	11,13	17,21	X	10,14	29,30	12,16	15,16	15,16,2	9,3	25	11	15,17	13,17,3	18,22	16,20	8,10	11,12	8,9	11	11
HOAZ_1040	Monozygot	14,15	14,18	10,12	20,23	X	10,12	30	12	11,16	13,14	7,9,3	25,27	11,14	17,18	14,17	22,23	16,25,2	11,12	11,12	8	12,13	11
HOAZ_1039	Monozygot	14,15	14,18	10,12	20,23	X	10,12	30	12	11,16	13,14	7,9,3	25,27	11,14	17,18	14,17	22,23	16,25,2	11,12	11,12	8	12,13	11
HOAZ_1041	Monozygot	13,16	14,16	11,12	18	X,Y	13	30,30,2	12,16	15,16	13,14	9	23	11,3,13,3	16	16,17	18	18,29,2	8,10	10	9,12	11,12	12,13
HOAZ_1042	Monozygot	13,16	14,16	11,12	18	X,Y	13	30,30,2	12,16	15,16	13,14	9	23	11,3,13,3	16	16,17	18	18,29,2	8,10	10	9,12	11,12	12,13

Anlage 4: DNA-Analyse der Zwillinge

miRNAs	Median ohne AHF	SD ohne AHF	Median mit AHF	SD mit AHF	FC	log(2) FC	p-Wert
hsa-miR-5189-3p	4,33	3,48	10,39	4,01	0,42	-1,26	0,0176
hsa-miR-4707-3p	2,64	1,37	4,42	1,81	0,60	-0,74	0,0208
hsa-miR-1306-5p	4,73	2,30	7,63	2,81	0,62	-0,69	0,0206
hsa-miR-4732-3p	34,81	25,02	53,13	36,38	0,66	-0,61	0,0102
hsa-miR-3605-3p	3,62	1,19	5,22	1,42	0,69	-0,53	0,0447
hsa-miR-550b-2-5p	5,62	2,22	7,69	2,15	0,73	-0,45	0,0228
hsa-miR-511-3p	0,83	0,23	1,13	0,29	0,74	-0,44	0,0329
hsa-miR-890	0,87	0,28	1,17	0,18	0,74	-0,43	0,0309
hsa-miR-671-5p	2,47	0,95	3,31	1,16	0,75	-0,42	0,0385
hsa-miR-128-1-5p	2,10	0,81	2,82	0,73	0,74	-0,42	0,0483
hsa-miR-421	2,54	0,76	3,35	0,67	0,76	-0,40	0,0193
hsa-miR-129-2-3p	4,04	1,10	5,27	1,00	0,77	-0,39	0,0102
hsa-miR-4420	2,56	0,72	3,34	0,71	0,77	-0,38	0,0263
hsa-miR-8088	0,87	0,20	1,12	0,22	0,78	-0,36	0,0139
hsa-miR-1270	2,17	1,32	2,78	1,58	0,78	-0,36	0,0151
hsa-miR-4499	3,92	0,92	5,02	1,04	0,78	-0,36	0,0367
hsa-miR-1178-5p	0,78	0,20	0,99	0,27	0,79	-0,34	0,0105
hsa-miR-6716-5p	0,74	0,19	0,94	0,19	0,79	-0,34	0,0219
hsa-miR-6888-5p	1,00	0,17	1,27	0,19	0,79	-0,33	0,0102
hsa-miR-3163	2,49	0,71	3,12	0,72	0,80	-0,33	0,0383
hsa-miR-320d	807,48	677,18	1013,03	938,12	0,80	-0,33	0,0454
hsa-miR-4451	1,22	0,22	1,52	0,27	0,80	-0,32	0,0138
hsa-miR-3923	2,10	0,36	2,60	0,36	0,81	-0,31	0,0189
hsa-miR-6882-5p	0,74	0,13	0,92	0,20	0,81	-0,31	0,0204
hsa-miR-4676-5p	2,07	0,68	2,55	0,62	0,81	-0,30	0,0017
hsa-miR-5009-3p	1,59	0,26	1,95	0,35	0,81	-0,30	0,0129
hsa-miR-744-5p	14,07	7,93	17,19	8,56	0,82	-0,29	0,0171
hsa-miR-3130-5p	1,59	0,30	1,95	0,33	0,82	-0,29	0,0207
hsa-miR-1237-5p	1,00	0,30	1,21	0,23	0,82	-0,28	0,0397
hsa-miR-4784	1,61	0,23	1,94	0,28	0,83	-0,27	0,0083
hsa-miR-5010-5p	2,11	1,29	2,55	1,64	0,83	-0,27	0,0125
hsa-miR-7515	1,00	0,27	1,20	0,22	0,83	-0,27	0,0265
hsa-miR-5584-5p	0,95	0,22	1,14	0,21	0,83	-0,27	0,0328
hsa-miR-3609	1,70	0,27	2,05	0,34	0,83	-0,27	0,0442
hsa-miR-139-3p	4,08	1,02	4,86	1,14	0,84	-0,25	0,0096
hsa-miR-186-3p	2,05	0,36	2,44	0,31	0,84	-0,25	0,0264
hsa-miR-3188	1,61	0,44	1,91	0,39	0,84	-0,25	0,0294
hsa-miR-6134	1,33	0,58	1,58	0,41	0,84	-0,25	0,0457
hsa-miR-3912-3p	1,81	0,41	2,14	0,41	0,84	-0,24	0,0301
hsa-miR-548ba	2,25	0,33	2,65	0,25	0,85	-0,24	0,0482
hsa-miR-4719	1,97	0,25	2,31	0,35	0,85	-0,23	0,0004

miRNAs	Median ohne AHF	SD ohne AHF	Median mit AHF	SD mit AHF	FC	log(2) FC	p-Wert
hsa-miR-3171	2,45	0,31	2,88	0,45	0,85	-0,23	0,0024
hsa-miR-448	1,96	0,24	2,30	0,33	0,85	-0,23	0,0147
hsa-miR-3919	1,04	0,27	1,22	0,24	0,85	-0,23	0,0243
hsa-miR-1827	1,14	0,21	1,34	0,17	0,85	-0,23	0,0466
hsa-miR-4253	1,59	0,22	1,85	0,22	0,86	-0,22	0,0086
hsa-miR-4753-5p	1,50	0,38	1,75	0,42	0,86	-0,22	0,0157
hsa-miR-4760-5p	1,23	0,26	1,44	0,28	0,86	-0,22	0,0162
hsa-miR-6761-5p	1,11	0,15	1,30	0,24	0,86	-0,22	0,0451
hsa-miR-8067	1,65	0,28	1,91	0,27	0,87	-0,21	0,0110
hsa-miR-5697	1,49	0,16	1,72	0,25	0,86	-0,21	0,0446
hsa-miR-181b-3p	1,32	0,19	1,52	0,13	0,87	-0,20	0,0078
hsa-miR-361-3p	145,98	51,24	166,92	60,86	0,87	-0,19	0,0151
hsa-miR-6844	2,60	0,37	2,95	0,41	0,88	-0,19	0,0199
hsa-miR-184	1,54	0,16	1,76	0,30	0,88	-0,19	0,0347
hsa-miR-92a-1-5p	1,40	0,14	1,59	0,17	0,88	-0,19	0,0477
hsa-miR-3610	1,34	0,27	1,52	0,32	0,88	-0,19	0,0479
hsa-miR-2053	2,90	0,38	3,30	0,41	0,88	-0,18	0,0068
hsa-miR-4480	1,83	0,23	2,08	0,33	0,88	-0,18	0,0075
hsa-miR-6880-5p	1,70	0,25	1,93	0,25	0,88	-0,18	0,0085
hsa-miR-1252-3p	2,80	0,34	3,16	0,42	0,88	-0,18	0,0327
hsa-miR-10b-3p	1,79	0,32	2,03	0,29	0,89	-0,18	0,0355
hsa-miR-219a-5p	2,27	0,29	2,56	0,29	0,89	-0,17	0,0001
hsa-miR-380-3p	2,55	0,35	2,87	0,26	0,89	-0,17	0,0082
hsa-miR-125a-3p	3,69	0,80	4,13	0,89	0,89	-0,16	0,0020
hsa-miR-1324	2,28	0,34	2,54	0,31	0,90	-0,16	0,0136
hsa-miR-3118	1,92	0,35	2,14	0,36	0,90	-0,16	0,0160
hsa-miR-539-3p	2,24	0,49	2,49	0,33	0,90	-0,15	0,0105
hsa-miR-6876-5p	2,54	0,39	2,83	0,35	0,90	-0,15	0,0283
hsa-miR-548f-3p	2,30	0,39	2,56	0,39	0,90	-0,15	0,0325
hsa-miR-3679-3p	3,48	0,40	3,84	0,50	0,91	-0,14	0,0043
hsa-miR-4696	1,76	0,20	1,95	0,30	0,91	-0,14	0,0149
hsa-miR-3202	1,73	0,31	1,92	0,32	0,90	-0,14	0,0221
hsa-miR-579-3p	1,81	0,29	2,00	0,30	0,91	-0,14	0,0242
hsa-miR-4670-3p	1,76	0,17	1,94	0,25	0,91	-0,14	0,0245
hsa-miR-5003-3p	1,85	0,28	2,03	0,21	0,91	-0,14	0,0316
hsa-miR-496	1,86	0,23	2,04	0,29	0,91	-0,14	0,0338
hsa-miR-376a-2-5p	2,43	0,27	2,66	0,33	0,91	-0,14	0,0449
hsa-miR-6507-5p	1,58	0,32	1,72	0,20	0,91	-0,13	0,0433
hsa-miR-501-3p	15,35	6,00	16,71	7,60	0,92	-0,12	0,0309
hsa-miR-4488	1,62	0,31	1,76	0,40	0,92	-0,12	0,0377
hsa-miR-548f-5p	1,86	0,42	2,01	0,41	0,92	-0,11	0,0029

miRNAs	Median ohne AHF	SD ohne AHF	Median mit AHF	SD mit AHF	FC	log(2) FC	p-Wert
hsa-miR-676-3p	1,44	0,19	1,54	0,24	0,93	-0,11	0,0056
hsa-miR-95-3p	1,85	0,25	1,99	0,16	0,93	-0,11	0,0103
hsa-miR-7106-5p	2,43	0,40	2,61	0,44	0,93	-0,11	0,0129
hsa-miR-497-5p	1,86	0,22	2,00	0,23	0,93	-0,11	0,0326
hsa-miR-6506-5p	1,56	0,17	1,67	0,19	0,93	-0,10	0,0028
hsa-miR-1256	2,27	0,29	2,43	0,14	0,93	-0,10	0,0057
hsa-miR-1323	2,47	0,27	2,64	0,39	0,93	-0,10	0,0131
hsa-miR-4638-5p	1,10	0,18	1,18	0,21	0,93	-0,10	0,0385
hsa-miR-155-3p	2,17	0,30	2,33	0,32	0,93	-0,10	0,0425
hsa-miR-3616-3p	3,49	0,73	3,75	0,77	0,93	-0,10	0,0442
hsa-miR-3606-5p	2,13	0,23	2,28	0,24	0,93	-0,10	0,0499
hsa-miR-19b-2-5p	2,37	0,25	2,52	0,30	0,94	-0,09	0,0095
hsa-miR-548at-5p	1,86	0,21	1,98	0,27	0,94	-0,09	0,0499
hsa-miR-3134	1,86	0,34	1,96	0,29	0,95	-0,08	0,0048
hsa-miR-4532	3,65	0,58	3,86	0,59	0,95	-0,08	0,0149
hsa-miR-1295a	1,22	0,37	1,27	0,46	0,96	-0,06	0,0237
hsa-miR-95-5p	2,01	0,31	2,08	0,25	0,97	-0,05	0,0215
hsa-miR-545-3p	2,49	0,30	2,57	0,22	0,97	-0,04	0,0282
hsa-miR-153-3p	1,23	0,21	1,27	0,29	0,98	-0,04	0,0284
hsa-miR-555	1,60	0,10	1,51	0,12	1,06	0,08	0,0107
hsa-miR-521	2,58	0,58	2,44	0,29	1,06	0,08	0,0309
hsa-miR-891a-5p	1,63	0,30	1,54	0,25	1,06	0,08	0,0433
hsa-miR-130a-5p	2,23	0,32	2,10	0,24	1,06	0,09	0,0138
hsa-miR-6849-3p	2,13	1,25	2,00	0,96	1,06	0,09	0,0455
hsa-miR-6890-3p	3,39	1,81	3,18	1,22	1,06	0,09	0,0456
hsa-miR-6854-3p	1,90	0,15	1,78	0,22	1,07	0,10	0,0126
hsa-miR-770-5p	1,80	0,28	1,68	0,21	1,07	0,10	0,0422
hsa-miR-429	1,70	0,16	1,58	0,22	1,07	0,10	0,0444
hsa-miR-548v	2,55	0,51	2,36	0,29	1,08	0,11	0,0067
hsa-miR-605-5p	2,74	0,79	2,55	0,25	1,08	0,11	0,0187
hsa-miR-4750-3p	3,18	0,41	2,93	0,34	1,09	0,12	0,0167
hsa-miR-7114-3p	3,78	4,18	3,48	2,06	1,09	0,12	0,0187
hsa-miR-143-5p	2,00	0,19	1,84	0,19	1,08	0,12	0,0363
hsa-miR-4697-3p	2,80	0,73	2,59	0,26	1,08	0,12	0,0417
hsa-miR-34b-3p	3,04	1,21	2,79	0,69	1,09	0,12	0,0446
hsa-miR-6843-3p	2,02	0,23	1,86	0,20	1,08	0,12	0,0464
hsa-miR-3689b-3p	1,51	0,28	1,37	0,25	1,10	0,14	0,0192
hsa-miR-6785-3p	4,35	5,18	3,95	2,97	1,10	0,14	0,0357
hsa-miR-6868-5p	1,19	0,30	1,07	0,30	1,10	0,14	0,0492
hsa-miR-432-3p	2,44	0,46	2,19	0,19	1,11	0,15	0,0102
hsa-miR-99b-3p	1,50	0,44	1,35	0,40	1,11	0,15	0,0351

miRNAs	Median ohne AHF	SD ohne AHF	Median mit AHF	SD mit AHF	FC	log(2) FC	p-Wert
hsa-miR-3972	1,51	0,29	1,36	0,24	1,11	0,16	0,0249
hsa-miR-6775-3p	4,08	9,55	3,65	7,70	1,12	0,16	0,0443
hsa-miR-6818-3p	2,19	0,45	1,94	0,32	1,13	0,17	0,0227
hsa-miR-5591-3p	2,42	0,59	2,15	0,29	1,12	0,17	0,0241
hsa-miR-4523	1,08	0,29	0,96	0,19	1,13	0,17	0,0295
hsa-miR-3650	1,72	0,35	1,53	0,24	1,12	0,17	0,0318
hsa-miR-6808-3p	1,51	0,47	1,35	0,26	1,12	0,17	0,0366
hsa-miR-6778-3p	2,04	0,31	1,82	0,25	1,12	0,17	0,0410
hsa-miR-764	2,95	0,76	2,60	0,48	1,13	0,18	0,0164
hsa-miR-1226-3p	1,68	0,54	1,48	0,18	1,14	0,18	0,0216
hsa-miR-92b-3p	4,14	0,86	3,65	0,84	1,14	0,18	0,0226
hsa-miR-4708-5p	1,88	0,81	1,66	0,27	1,13	0,18	0,0453
hsa-miR-1914-5p	2,03	0,46	1,78	0,20	1,14	0,18	0,0477
hsa-miR-6500-5p	2,13	0,32	1,87	0,28	1,14	0,19	0,0293
hsa-miR-1538	2,38	0,48	2,09	0,40	1,14	0,19	0,0317
hsa-miR-4649-3p	8,18	13,53	7,19	9,04	1,14	0,19	0,0342
hsa-miR-487b-5p	2,13	1,01	1,87	0,29	1,14	0,19	0,0354
hsa-miR-5001-3p	2,01	0,28	1,76	0,26	1,14	0,19	0,0479
hsa-miR-300	1,87	0,21	1,63	0,21	1,15	0,20	0,0081
hsa-miR-6852-3p	2,31	0,73	2,01	0,20	1,15	0,20	0,0208
hsa-miR-517c-3p	2,22	0,28	1,93	0,31	1,15	0,20	0,0308
hsa-miR-6839-5p	1,56	0,34	1,35	0,31	1,16	0,21	0,0049
hsa-miR-6822-3p	2,25	0,46	1,94	0,24	1,16	0,21	0,0106
hsa-miR-4745-3p	1,06	0,13	0,91	0,12	1,16	0,21	0,0107
hsa-miR-3160-5p	2,93	0,60	2,52	0,45	1,16	0,21	0,0119
hsa-miR-6827-3p	2,49	0,44	2,15	0,28	1,16	0,21	0,0213
hsa-miR-489-5p	1,80	0,23	1,55	0,24	1,16	0,21	0,0432
hsa-miR-2113	2,01	0,41	1,72	0,31	1,17	0,22	0,0262
hsa-miR-3691-3p	2,18	0,40	1,87	0,25	1,17	0,22	0,0280
hsa-miR-6810-3p	2,74	0,42	2,35	0,24	1,17	0,22	0,0351
hsa-miR-6793-3p	2,25	0,64	1,93	0,53	1,17	0,22	0,0388
hsa-miR-1250-5p	1,82	0,21	1,56	0,23	1,17	0,22	0,0400
hsa-miR-6809-3p	2,84	0,43	2,42	0,23	1,17	0,23	0,0062
hsa-miR-6762-3p	2,16	0,49	1,84	0,29	1,18	0,23	0,0120
hsa-miR-585-5p	1,53	0,26	1,30	0,37	1,18	0,23	0,0383
hsa-miR-4747-3p	2,00	0,40	1,71	0,32	1,17	0,23	0,0427
hsa-miR-3191-5p	2,23	0,48	1,89	0,21	1,18	0,24	0,0177
hsa-miR-676-5p	1,62	0,21	1,37	0,26	1,18	0,24	0,0205
hsa-miR-4751	0,90	0,14	0,76	0,11	1,19	0,25	0,0027
hsa-miR-4667-3p	3,00	1,16	2,53	0,91	1,19	0,25	0,0117
hsa-miR-4447	1,86	0,37	1,56	0,39	1,19	0,25	0,0489

miRNAs	Median ohne AHF	SD ohne AHF	Median mit AHF	SD mit AHF	FC	log(2) FC	p-Wert
hsa-miR-597-5p	1,65	0,24	1,37	0,24	1,20	0,26	0,0238
hsa-miR-1199-3p	1,36	0,47	1,13	0,27	1,21	0,27	0,0106
hsa-miR-619-3p	1,78	0,50	1,47	0,27	1,21	0,27	0,0143
hsa-miR-6868-3p	1,60	0,16	1,33	0,20	1,21	0,27	0,0170
hsa-miR-3158-3p	1,91	0,31	1,57	0,23	1,22	0,28	0,0272
hsa-miR-4297	2,37	0,76	1,95	0,23	1,21	0,28	0,0383
hsa-miR-4485-5p	32,31	10,71	26,49	12,48	1,22	0,29	0,0292
hsa-miR-889-5p	1,72	0,23	1,40	0,15	1,23	0,30	0,0017
hsa-miR-6729-5p	0,87	0,14	0,70	0,25	1,23	0,30	0,0170
hsa-miR-3619-3p	2,06	0,55	1,67	0,46	1,23	0,30	0,0294
hsa-miR-3944-3p	1,39	0,39	1,13	0,37	1,23	0,30	0,0314
hsa-miR-3192-3p	2,73	0,71	2,21	0,49	1,24	0,31	0,0368
hsa-miR-6730-3p	4,34	3,21	3,47	1,66	1,25	0,32	0,0306
hsa-miR-4701-5p	6,02	6,93	4,84	3,31	1,24	0,32	0,0470
hsa-miR-6085	29,49	22,96	23,47	14,27	1,26	0,33	0,0253
hsa-miR-8070	1,55	0,37	1,23	0,23	1,26	0,33	0,0295
hsa-miR-6804-5p	1,08	0,27	0,85	0,21	1,27	0,34	0,0041
hsa-miR-939-3p	3,25	1,26	2,57	0,79	1,26	0,34	0,0203
hsa-miR-4279	2,24	0,52	1,77	0,43	1,27	0,34	0,0449
hsa-miR-6886-3p	3,97	7,52	3,14	3,01	1,26	0,34	0,0467
hsa-miR-6814-3p	1,68	0,46	1,32	0,18	1,27	0,35	0,0222
hsa-miR-4800-3p	2,24	0,60	1,72	0,43	1,31	0,39	0,0158
hsa-miR-3714	2,66	1,02	2,02	0,63	1,32	0,40	0,0043
hsa-miR-6879-3p	2,66	1,04	2,02	0,79	1,32	0,40	0,0250
hsa-miR-675-3p	2,42	0,67	1,84	0,69	1,32	0,40	0,0292
hsa-miR-6743-3p	5,02	13,28	3,81	8,08	1,32	0,40	0,0312
hsa-miR-8075	1,59	0,57	1,20	0,29	1,33	0,41	0,0241
hsa-miR-6727-3p	2,08	0,57	1,55	0,66	1,34	0,42	0,0033
hsa-miR-6736-3p	3,14	0,84	2,34	0,56	1,34	0,42	0,0083
hsa-miR-1343-3p	2,42	0,89	1,80	0,71	1,35	0,43	0,0307
hsa-miR-134-3p	2,43	0,56	1,78	0,36	1,36	0,45	0,0064
hsa-miR-7106-3p	2,40	0,96	1,76	0,50	1,37	0,45	0,0086
hsa-miR-6789-3p	2,54	0,91	1,85	0,63	1,37	0,45	0,0366
hsa-miR-1825	7,09	13,02	5,19	6,84	1,37	0,45	0,0481
hsa-miR-4763-5p	3,68	1,71	2,66	1,05	1,38	0,47	0,0360
hsa-miR-3677-3p	1,18	0,40	0,84	0,19	1,41	0,50	0,0083
hsa-miR-4296	1,50	0,44	1,04	0,51	1,45	0,53	0,0459
hsa-miR-1281	7,78	16,10	5,35	9,02	1,45	0,54	0,0299
hsa-miR-6877-3p	4,13	1,30	2,82	0,51	1,46	0,55	0,0090
hsa-miR-6787-3p	3,15	2,37	2,12	1,41	1,49	0,57	0,0133
hsa-miR-6735-3p	2,73	1,66	1,81	0,72	1,50	0,59	0,0329

---

miRNAs	Median ohne AHF	SD ohne AHF	Median mit AHF	SD mit AHF	FC	log(2) FC	p-Wert
hsa-miR-6511a-3p	4,38	4,38	2,76	1,52	1,59	0,66	0,0323
hsa-miR-943	2,07	0,64	1,28	0,42	1,61	0,69	0,0038
hsa-miR-7109-3p	4,28	2,27	2,37	1,63	1,80	0,85	0,0278

**Anlage 5:** *MicroArray der monozygoten Zwillinge mit und ohne AHF*