

Abschlussbericht zu 01KL2009

DEFIANCE - Bestimmung von Umweltfaktoren, welche die Entstehung von neonatalen Herzfehlern beeinflussen anhand einer Epigenomanalyse

1. Ziele

a. Gesamtziel des Vorhabens

Angeborene Herzfehler (AHF) sind eine der häufigsten Ursachen für Todesfälle bei Föten und Säuglingen. Neben genetischen Faktoren spielen auch nicht-genetische Faktoren wie Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung von AHF. Die Mechanismen, die diesen Umweltfaktoren zugrunde liegen, sind jedoch immer noch nicht verstanden, so dass geeignete präventive Maßnahmen aktuell nicht zur Verfügung stehen. In der vorgeschlagenen Studie sollte Diabetes bei Müttern als Ursache und modifizierenden Faktor für AHF untersucht werden. Ein erhöhter Blutzuckerspiegel stellt ein wichtiges Teratogen während der Schwangerschaft dar, indem erhöhte Blutzuckerwerte eine ungünstige Umgebung für die Embryonalentwicklung bedingen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Typ-1- und Typ-2-Diabetes der Mutter während der Schwangerschaft mit einer Zunahme von kardiovaskulären Fehlbildungen bei Säuglingen verbunden ist. Das Ziel des Vorhabens war es daher zu klären, welche Mechanismen zu diesem erhöhten Risiko führen sowie die Entwicklung eines diagnostischen Methylierungspanels, welches als prognostischer Test genutzt werden kann.

b. Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen

Das Vorhaben sollte einen Beitrag leisten zur Verbesserung der Diagnostik gesundheitsrelevanter kardiovaskulärer Probleme. Angeborene Herzfehler stellen zum einen die häufigste Ursache für Todesfälle bei Föten und Säuglingen dar und zum anderen zeigt sich ein zunehmender Anstieg an Spätfolgen durch eine verbesserte Versorgung im Kindesalter mit einer steigenden Zahl an Erwachsenen mit AHF und eine damit verbundene Belastung des Gesundheitssystems. Es ist bekannt, dass ein erhöhter Blutzucker während der Schwangerschaft zu einem erhöhten Risiko für ein AHF beim Feten führt. Aufgrund der Zunahme des metabolischen Syndroms in der Bevölkerung ist auch mit einem weiteren Anstieg der Zahlen an Frauen mit Schwangerschaftsdiabetes zu rechnen, was wiederum zu einer Zunahme der Kinder mit AHF führt. Aus diesem Grund ist eine Aufklärung des Mechanismus sowie die Etablierung eines diagnostischen Tests nicht nur aus wissenschaftlichen Gründen, sondern auch als gesundheitsökonomischer Sicht wichtig.

2. Stand der Wissenschaft und Technik

Angeborene Herzfehler (AHF) sind mit einer Inzidenzrate von bis zu 2% für alle Lebendgeburten eine der häufigsten Ursachen für Todesfälle bei Föten und Säuglingen¹. Aufgrund der Fortschritte auf dem Gebiet der chirurgischen, interventionellen und klinischen Intensivpflege ist die Überlebensrate in den letzten Jahren dramatisch angestiegen, was zu einer zunehmenden Zahl von Erwachsenen mit AHF, die an Spätfolgen leiden, führte². Zudem bewirkte dies einen erheblichen Anstieg der Gesundheitskosten². Ein großes Problem stellt die Tatsache dar, dass die Entstehung von AHF nur teilweise verstanden ist. Somit ist eine Vorhersage selbst bei bekannten genetischen Störungen, die einer bekannten Vererbungsregel folgen, hinsichtlich der Ausprägung des Herzfehlers schwierig. Dieser Sachverhalt macht insbesondere die Beratung in Bezug auf Wiederholungsrisiken und Präventionsstrategien problematisch. Zudem steigt der Bedarf an einer individuelleren Beratung und Diagnostik zunehmend. Durch groß angelegte Sequenzierungsstudien, die das menschliche Erbgut des Patienten auf genetische Veränderungen (Mutationen) untersuchen, konnte unsere Arbeitsgruppe sowie andere Arbeitsgruppen aus den USA die Auswirkung von neu entstandenen Mutationen sowie von Eltern vererbter Mutationen, die zu AHF führen, näher untersuchen^{3; 4}. Nichtsdestotrotz konnten in diesen Studien zwei der

schwierigsten Probleme nicht angegangen werden: die verminderte Penetranz (trotz genetischer Veränderung kommt es nicht zur Erkrankung) und die variable klinische Expressivität (die Erkrankung ist bei den Betroffenen mit gleicher Mutation unterschiedlich stark ausgeprägt). Diese Phänomene werden häufig sowohl in Familien als auch in Tiermodellen beobachtet. Diese Beobachtungen können nur bedingt durch eine genetische Variabilität der einzelnen Personen hinsichtlich ihrer Herkunft, sowie unterschiedlicher Vererbungsmuster (Einfluss von mehreren Genen) erklärt werden⁵. Entscheidend ist, dass bei den meisten Patienten, die lediglich einen AHF und keine weiteren Fehlbildungen aufweisen, auf genetischer Ebene keine abschließende Ursache gefunden werden kann. Auch nicht-genetische Faktoren tragen zu AHF bei. In einer Minderheit der Fälle sind Umweltfaktoren eindeutig ursächlich. Gut dokumentierte Beispiele umfassen die Entwicklung von AHF nach vorgeburtlicher Exposition gegenüber Teratogenen wie Alkohol oder Medikamenten für Krampfanfälle. Diese wurden von Jenkins und Kollegen ausgiebig untersucht^{6,7}. In einer begrenzten Anzahl von Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem Lebensstil von Müttern und dem Risiko für AHF untersucht⁸. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Zigarettenrauch bei Müttern, Diabetes, Fettleibigkeit und ein erhöhtes Alter mit einem erhöhten Risiko für ein Kind mit AHF einhergeht⁹⁻¹³. Die Mechanismen, die diesen Umweltfaktoren zugrunde liegen, sind jedoch immer noch nicht verstanden, so dass geeignete präventive Maßnahmen aktuell nicht zur Verfügung stehen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch Umweltveränderungen bedingte epigenetische Faktoren, die zu einer äußeren Veränderung des Erbguts führen, das Auftreten sowie das Krankheitsspektrum von AHF bei Menschen und Tiermodellen entscheidend beeinflussen¹⁴. Daher ist ein detailliertes Verständnis dieser Faktoren in Kombination mit den zugrunde liegenden genetischen Veränderungen von entscheidender Bedeutung. Nur auf diese Weise kann eine detaillierte Vorhersage hinsichtlich etwaiger Risikofaktoren getroffen werden und somit eine gezielte genetische Beratung hinsichtlich der Prognose sowie einer frühzeitigen Intervention bei Patienten mit AHF durchgeführt werden. Auch nach Abschluss des Projektes sind keine Veröffentlichungen bekannt, die den Mechanismus des erhöhten Risikos für AHF bei Müttern mit Diabetes erklären.

Aus diesem Grund war die Untersuchung der Methylierung des Erbguts (epigenetische Faktoren) sowie eine Einzelzell-Sequenzierung unerlässlich, um den Einfluss der Umweltfaktoren auf bestimmte Zelltypen des Herzens zu bestimmen und das Krankheitsspektrum von AHF zu verstehen. Die Einzelzell-Sequenzierung ermöglichte es, einzelne Gewebe-Untergruppen zu analysieren und neue Netzwerke zu identifizieren. Jüngste Studien an Mausherzen erbachten neue Marker für zeitliche und kammer-spezifische Entwicklungsprogramme¹⁵ sowie umfangreiche Netzwerke interzellulärer Kommunikation¹⁶. Daher wurden bei unserem Projekt Mausmodelle, die Krankheitszustände in der Umwelt imitieren, zunächst verwendet, um die Auswirkungen nicht-genetischer Faktoren auf Einzelzell-Ebene zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag hierbei auf Diabetes als gut definierte Fallstudie. In einem zweiten Schritt haben wir versucht, diese Ergebnisse in menschlichem Herzgewebe von Patienten mit AHF zu wiederholen, deren Mütter aufgrund von Diabetes unkontrolliert hohe Glukosespiegel aufwiesen. Das übergeordnete Ziel des DEFIANCE-Forschungsprogramms bestand aus zwei Punkten: (1) ein besseres Verständnis der Prozesse, die die Herzentwicklung bei umweltbedingtem AHF beeinträchtigen, (2) die Entwicklung einer Methode zur Messung des Ausmaßes, inwiefern die vorgeburtliche Exposition mit hohem Blutzuckerspiegel zu einem Herzfehler führt.

Ausführliche Beschreibung des Arbeitsplans

a. Vorhabenbezogene Ressourcenplanung

Arbeitspaket 1: Untersuchung der Auswirkung von mütterlichem Diabetes auf Herz und Blut von Mäusen, die genetisch eine Neigung zur Entstehung von Herzfehlern haben (Prädisposition) (Leiter: S Stefanovic. Partner: B Thienpont)

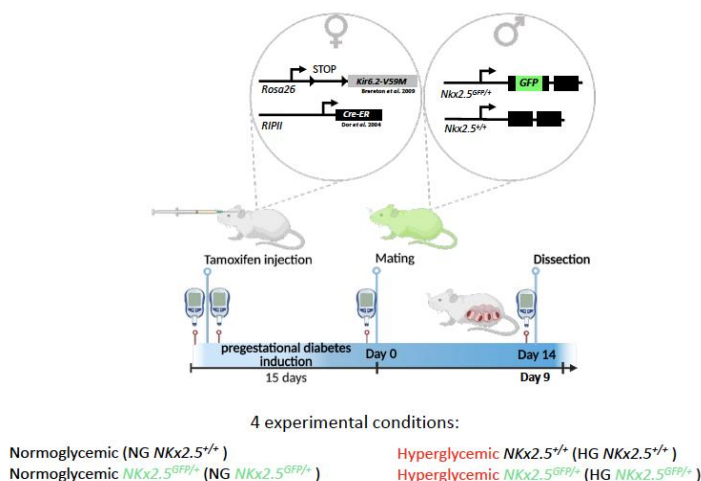
Aufgabe 1. 1. Erzeugung von Mausmodellen, die für Herzfehler prädisponiert sind, welche hohen Blutzuckerspiegeln ausgesetzt sind

Zur Bearbeitung dieser Teilaufgabe wurde ein Mausmodell, welchem das Gen *Nkx2.5* im heterozygoten Zustand fehlt, verwendet. Das Gen *Nkx2.5* ist sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen ein wichtiger Faktor bei der Herzentwicklung. Mutationen in *Nkx2.5* können beim Menschen zu verschiedenen Herzfehlern führen¹⁷⁻¹⁹. Mäuse, welche einen kompletten Verlust von *Nkx2.5* aufweisen, sterben bereits in der Embryonalphase²⁰.

Die heterozygote *Nkx2.5^{GFP/+}*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Richard Harvey (Australien) zur Verfügung gestellt.

Es war zunächst angedacht, die weiblichen Mäuse der heterozygoten *Nkx2.5^{GFP/+}*-Mauslinie mit Streptozotocin (STZ), einem Breitbandantibiotikum, das für die Insulin produzierenden β -Zellen von Pankreasinseln toxisch ist, zu behandeln und auf diesem Weg chemisch diabetisch machen.

Bereits vor Projektbeginn haben wir gemeinsam entschieden, dass das STZ-induzierte Diabetes-Modell zu viele Nachteile im Sinne einer erhöhten Toxizität und instabilen Induktion der Hyperglykämie im Vergleich zum genetischen Modell aufweist, so dass wir zum genetischen BV59M-Mausmodell gewechselt sind. Diese transgene Mauslinie exprimiert eine humane Neugeborenen-Diabetes-Mutation (*Kir6.2-V59M*), spezifisch in B-Zellen²⁶. Eine Kollaboration mit dem Labor von Frances Ashcroft des Oxford Centers für Diabetes, Endokrinologie und Stoffwechsel der Universität Oxford war bereits von Sonia Stefanovic etabliert. Da aufgrund der strengen Auflagen der Maus-Facility des INSERM in Marseille kein direkter Transfer der Mauslinien möglich war, mussten diese zunächst von Herrn Prof. Ashcroft an Charles River übersandt werden. Um das genetische BV59M-Mausmodell zu generieren, werden zwei Mauslinien benötigt: *Kir6.2-V59M-Lox*-Linie und *RIP11-Cre* Linie. Aufgrund der Coronakrise kam es zu erheblichen Verzögerungen hinsichtlich des Versands der Linien. Zusätzlich hat Charles River die beiden Mauslinien fehlerhaft bearbeitet. Bei der *Kir6.2-V59M-Lox*-Linie sah es zunächst aus, als ob das *Kir6.2-V59M*-Allel nicht mehr vorhanden wäre. Es konnte jedoch mit einigem Aufwand von Dr. Stefanovic wiederhergestellt werden. Hinsichtlich der *RIP11-Cre*-Linie wurden negative Mäuse versandt, wie sich später herausstellte, und die positiven getötet. Da auch die Muttertiere bereits getötet wurden bei Charles River, war ein erneuter Import aus Großbritannien vom Ashcroft-Lab notwendig.

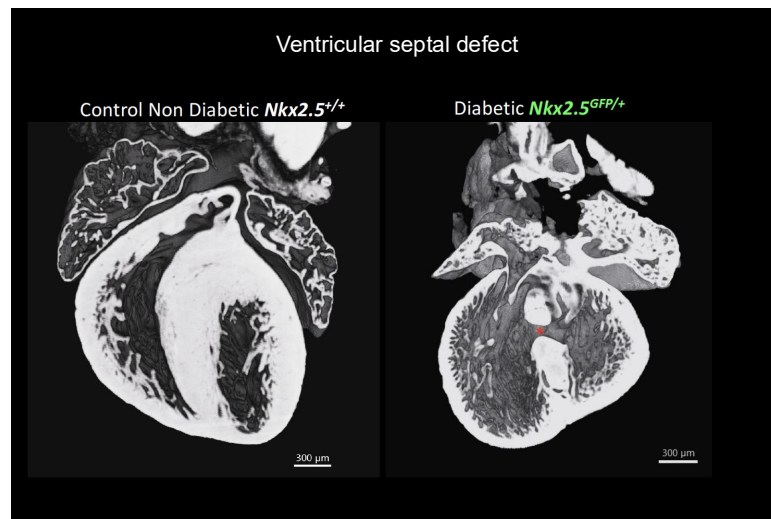


Aufgabe 1. 2: Morphologische Analyse von Herzen von Embryonen, Föten und Neugeborenen diabetischer *Nkx2.5^{GFP/+}*-Mäuse

Die Mausembryonen wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien geopfert. Das Entwicklungsstadium E13.5 entspricht 6 Schwangerschaftswochen beim Menschen²⁷. Eine

3D-Rekonstruktion von embryonalen Herzen aus 4 Gruppen (Gruppe 1: Wildtyp ohne erhöhten Blutzucker; Gruppe 2: Wildtyp mit Diabetes; Gruppe 3: $Nkx2.5^{GFP/+}$ ohne erhöhten Blutzucker; Gruppe 4: $Nkx2.5^{GFP/+}$ mit Diabetes) wurde mit der Imaris Imaging-Software durchgeführt. Während die Gruppen 1 und 2 keine Herzfehler aufwiesen, fand sich in Gruppe 3 in 80% der Herzen ein Herzfehler und in Gruppe 4 bei allen Herzen (100%). Es ist anzumerken, dass in Gruppe 4 schwerere Herzfehler beobachtet wurden als in Gruppe 3. Dies war jedoch auch eine Beobachtung, die wir erwartet hatten.

	Genotype	n	Abnormal	TGA	DOLV	DORV	VSD	ASD	AVSD	TOF	Hypertrophy	Underdeveloped ventricle	Wall thinning
Non diabetic	$Nkx2.5^{+/+}$	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Non diabetic	$Nkx2.5^{GFP/+}$	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diabetic	$Nkx2.5^{+/+}$	20	80%	0%	0%	5%	30%	15%	10%	0%	10%	0%	25%
Diabetic	$Nkx2.5^{GFP/+}$	24	100%	8%	8%	4%	58%	8%	0%	8%	8%	17%	63%



Aufgabe 1. 3: Einzelzell-Transkriptomanalyse von Herzzellen aus Mausembryonen und Neugeborenen von diabetischen und nicht-diabetischen weiblichen $Nkx2.5^{GFP/+}$ -Mäusen. S. Stefanovic hatte sich zunächst entschieden, da es Probleme mit der Einzelzell-Sequenzierung von embryonalen Maus-Herzzellen gab, eine Bulk-RNA-Sequenzierung an fetalen Herzen E15.5 durchzuführen. Für jeden Zustand wurden 3 biologische Replikate verwendet. Insgesamt werden 12 Proben zur Verfügung gestellt (4 Bedingungen in dreifacher Ausfertigung). Dabei zeigte sich Hochregulierung von 190 Genen und eine Herunterregulierung von 303 Genen in den fetalen Herzen von diabetischen weiblichen $Nkx2.5^{GFP/+}$ -Mäusen im Vergleich zu nicht-diabetischen $Nkx2.5^{+/+}$ -Mäusen. Es fiel dabei eine vermehrte Expression von zwei Troponin-Genen sowie eine verminderte Expression eines Troponin-Gens in den fetalen Herzen von diabetischen weiblichen $Nkx2.5^{GFP/+}$ -Mäusen im Vergleich zu nicht-diabetischen $Nkx2.5^{+/+}$ -Mäusen auf (da es sich um vertrauliche Daten handelt, die noch nicht veröffentlicht wurden, findet sich die genaue Bezeichnung der Marker und die entsprechende Abbildung im Erfolgskontrollbericht). Die Einzelzell-Transkriptomanalyse wurde von S. Stefanovic mit einem Gerät von 10X Genomics in Marseille durchgeführt. Für jeden Zustand wurden 3 biologische Replikate verwendet. Insgesamt werden 12 Proben zur Verfügung gestellt (4 Bedingungen in dreifacher Ausfertigung). Es wurde entschieden, die Analyse an fetalen Herzen bzw. dem kardialen Bereich von E9.5 Mausembryonen durchzuführen. Dabei zeigte sich im Kardiomyozyten-Cluster der fetalen Herzen von diabetischen weiblichen $Nkx2.5^{GFP/+}$ -

Mäusen im Vergleich zu nicht-diabetischen Nkx2.5^{+/+}-Mäusen eine vermehrte Expression eines Chromatinremodellers, der auch mit Nkx2.5 interagiert, sowie eine verminderte Expression eines interessanten Stoffwechselfgens (eine genaue Bezeichnung und Abbildung findet sich im Erfolgskontrollbericht). Angesichts der Dysregulierung von Genen, die an der Kontraktilität beteiligt sind, erwarten wir eine Auswirkung auf die Mitochondrien-Homöostase, die ROS-Produktion und eine epigenetische Veränderung durch ROS.

Aufgabe 1. 4: Identifizierung von Genexpressionsmustern in Mausembryonen und Neugeborenen von diabetischen und nicht-diabetischen weiblichen Nkx2.5^{GFP/+}-Mäusen
Die In-situ-Vollhybridisierung (ISH) ist ein sehr informativer Ansatz zur Visualisierung von Genexpressionsmustern über die gesamte 3D-Struktur des Embryos oder Gewebes. S. Stefanovic verwendet derzeit eine neuartige Multiplex-Technik für eine fluoreszierende In-situ-Hybridisierung an gewebslokalisierten mRNAs, welche sowohl am gesamten Embryo als auch an Schnitten durchgeführt werden kann. RNAscope (ACDBio) ist ein kürzlich entwickelter Ansatz zur gleichzeitigen Multiplexierung fluoreszierender RNA-FISH mit mehreren Sonden^{28; 29}. Dieser Ansatz ermöglichte es, räumliche Expressionsdomänen bei Einzelzellauflösung von Zelltyp-spezifischen Markern von Interesse zu definieren, die aus der Einzelzell-Expressionsanalyse (Aufg. 1.3) identifiziert wurden. Auf diesem Weg konnten die unterschiedlich regulierten Troponin-Gene in den Herzen der Stadien E14.5 und E15.5 visualisiert werden. Die Abbildung zeigt exemplarisch ein hochreguliertes Troponin-Gen.

Aufgabe 1.5: Analyse des DNA-Methylierungsprofils von Herzgewebe aus Mausembryonen und Neugeborenen von diabetischen und nicht-diabetischen weiblichen Nkx2.5^{GFP/+}-Mäusen

Die DNA-Methylom-Analyse von Mausgeweben (Herz und Blut von Neugeborenen) erfolgte durch gezielte Bisulfit-Sequenzierung. Insbesondere wird die Bisulfitumwandlung unter Verwendung des EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo) durchgeführt. Zusätzlich werden ausgewählte Regionen mittels SeqCap Epi Choice L-Anreicherungs-kit abgefragt, welche mit Regionen übereinstimmen, die auf dem EPIC-Array sind, welcher für die menschlichen DNA-Proben in Arbeitspaket 2 verwendet wurde. Frühere Erfahrungen im Thienpont-Labor haben gezeigt, dass dieses Kit eine Übereinstimmung von nahezu 70% ermöglicht. Danach wurden die aufbereiteten Proben auf einem HiSeq4000 oder NextSeq (Illumina), welcher sich in der Core-Facility des Instituts von B. Thienpont befindet, sequenziert. Die bioinformatische Auswertung erfolgte durch B. Thienpont. Die Analyse ist leider noch nicht komplett abgeschlossen. Eine Voranalyse konnte jedoch bereits eine Hypomethylierung des Promotors der beiden hochregulierten Troponin-Gene zeigen.

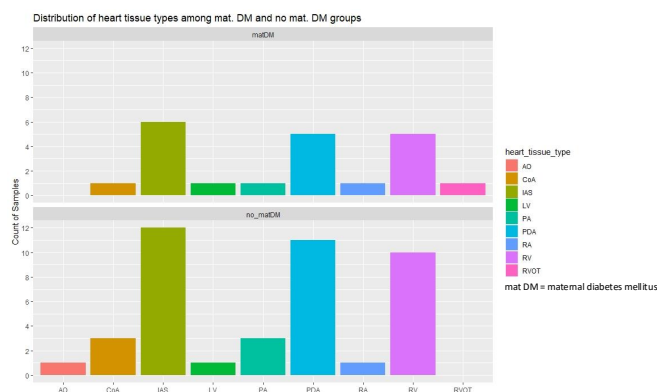
Arbeitspaket 2: Untersuchung der Auswirkung von Diabetes bei Müttern auf Neugeborene mit Herzfehlern (Leiter: AK Kahlert und B Thienpont)

Aufgabe 2.1: Sammlung von Herzgewebe- und Blut-DNA-Proben von Neugeborenen mit einem AHF aufgrund einer genetischen Mutation oder eines mütterlichen Schwangerschaftsdiabetes (AK Kahlert)

Ein Teil der Patientenproben waren bereits aus dem Kompetenznetz für angeborene Herzfehler (KNAHF) verfügbar³⁰. Derzeit werden in der Biomaterialbank des KNAHF ca. 4.200 DNA-Proben sowie 1.200 Herzgewebeproben von Patienten mit AHF aufbewahrt. Zusätzlich sollte eine prospektive Probensammlung veranlasst werden, um die Anzahl der altersangepassten Blut-DNA- und Gewebeproben für Neugeborene zu erhöhen. Ziel war es, mindestens 20 Blut-DNA- und Herzgewebeproben von Neugeborenen mit AHF und Schwangerschaftsdiabetes bei Müttern sowie die gleiche Anzahl an alters- und AHF-gleichgestellten Kontrollpatienten von nicht-diabetischen Müttern zu sammeln. Allerdings zeigte sich, dass nicht genügend Herzgewebeproben von Neugeborenen mit Herzfehler und diabetischen Müttern zur Verfügung standen, da teilweise die Herzfehler nicht so schwerwiegend waren, dass sie im Neugeborenenalter operiert werden mussten. Aus diesem Grund hatten wir die Altersgrenze bis auf das erste Lebensjahr erweitert. Wir hatten

zusätzlich die Sorge, dass das Methylierungssignal in Blutproben möglicherweise nicht so stark sein könnte wie im Herzgewebe und hatten aus diesem Grund vor, mindestens 80 zusätzliche Blutproben von Neugeborenen mit AHF von diabetischen und nicht-diabetischen Müttern zu sammeln, die zunächst in den ersten Lebenswochen keine Herzoperation benötigen. Hierbei war bereits eine Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Dresden (Prof. Dr. med. Cahit Birdir) etabliert, welche Nabelschnurblut von den Neugeborenen (mit/ohne AHF) von Müttern mit/ohne Diabetes sammelt. Zusätzlich wird die Sammlung von Fruchtwasserzellen nach Fruchtwaspunktion aufgrund von AHF mit/ohne Schwangerschaftsdiabetes angestrebt. Unglücklicherweise war das Nabelschnurblut in Serum-Röhrchen gelagert, was dem Leiter Prof. Birdir nicht bekannt war, so dass das Nabelschnurblut nicht verwendet werden konnte, da die DNA-Ausbeute aus Serum nur sehr gering ist und nicht genügend Ausgangsmaterial für eine DNA-Methylierung zur Verfügung steht. Da das Methylierungssignal in den Blutproben gut waren, konnten wir auf die Proben verzichten. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Zellbeschaffenheit, haben wir auch auf die Analyse der Fruchtwasserproben verzichtet.

Es wurden 63 Herzgewebe-Proben und 40 Blutproben von insgesamt 67 Patienten mit angeborenen Herzfehlern, von denen 22 eine Mutter mit Gestationsdiabetes und 45 ohne Gestationsdiabetes hatten, identifiziert und für die Analysen vorbereitet.



Aufgabe 2.2: Exomsequenzierung von Blut-DNA-Proben zur Beurteilung genetischer Keimbahnmutationen (AK Kahlert)

Die Probenvorbereitung wurde im Labor der Antragstellerin durchgeführt. Da bei nur 40 Patienten eine Blutprobe vorhanden war, wurde bei den restlichen Patienten das Herzgewebe sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Hitz aus Oldenburg. Die bioinformatische Auswertung wurde in Kooperation mit der SeqIT in Kaiserlautern und der Auswertesoftware Congenica durch die Antragstellerin durchgeführt. Ein bioinformatischer Algorithmus ist dort bereits etabliert. Die Bewertung der genetischen Varianten wurde anhand der ACMG-Kriterien vorgenommen. Es gab dabei bei allen 67 Patienten keinen Hinweis auf eine genetische Ursache für den Herzfehler.

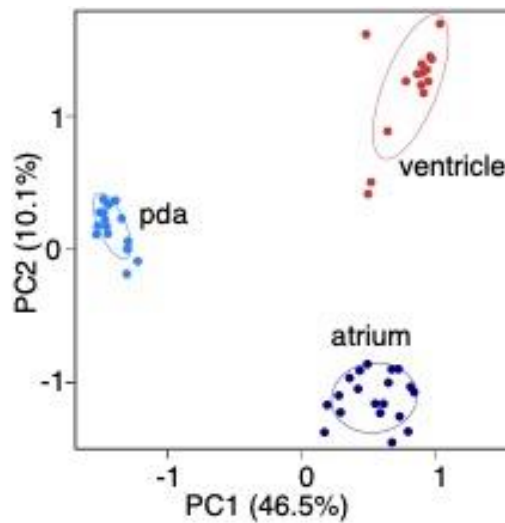
Aufgabe 2.3: Einzelkerntranskriptomanalyse (sn-RNA-Seq) von Herzgewebe von Patienten mit AHF aufgrund einer genetischen Mutation oder eines mütterlichen Schwangerschaftsdiabetes (B Thienpont)

Die Einzelkern-Sequenzierung von menschlichem Herzgewebe wurde von B. Thienpont in Leuven (Leuven Single Cell Center) mit Hilfe des Gerätes von 10X Genomics durchgeführt. Die Zellsuspension wurde ebenfalls von B. Thienpont durchgeführt, da er mittlerweile die meiste Expertise in der Isolation von Nuclei aus dem Herzgewebe hat und es sich zu dem um sehr wertvolle Proben handelt, deren Ausgangsmaterial teilweise sehr gering ist. Die weitere Probenaufbereitung erfolgte durch die Core Facility des Leuven Single Cell Centers. Die Hauptvorteile der Einzelkern-RNA-Sequenzierung gegenüber der Einzelzell-RNA-Sequenzierung sind die Möglichkeit der retrospektiven Analyse von Proben und die Beseitigung von Artefakten im Transkriptom und in der Zelldarstellung aufgrund von Dissoziation. Es wurden insgesamt 25 Proben untersucht. Da keine Proben mit einer genetischen Mutation identifiziert werden konnten, wurden 15 Proben mit AHF von nicht-diabetischen Müttern und 10 Proben von diabetischen Müttern untersucht. Es wurde zudem auf die Art der Herzfehler bei der Auswahl der Proben geachtet, dass diese in den beiden Gruppen gleichermaßen repräsentiert sind. Die Datenanalyse wurde auf den Hochleistungsclustern des flämischen Supercomputers durchgeführt. Es konnte dabei in den Kardiomyozyten-Clustern eine Hochregulierung von 140 Genen und eine Herunterregulierung von 18 Genen nachgewiesen werden. Die Gene betreffen vorwiegend die Zelldifferenzierung und die Zellentwicklung. Bei den Smooth muscle Cells zeigte sich eine Hochregulierung von 13 Genen und eine Herunterregulierung von 4 Genen. Bei den Fibroblasten waren 194 hochreguliert und 200 herunterreguliert. Die betroffenen Gene sind ebenfalls bei Entwicklungsprozessen sowie Prozessen der Zellkommunikation involviert.

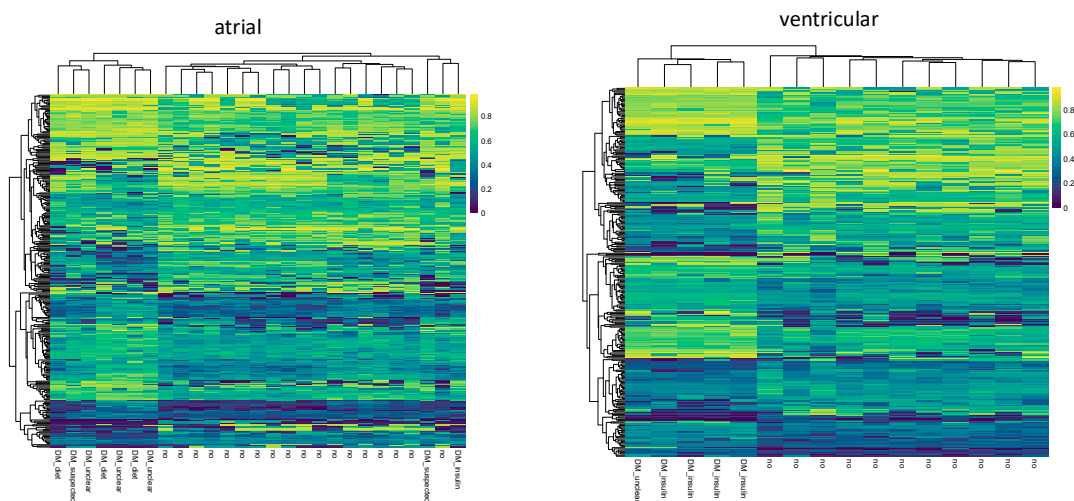
Aufgabe 2.4: Analyse des DNA-Methylierungsprofils von Herzgewebe und Blut von Patienten mit AHF aufgrund einer genetischen Mutation oder aufgrund eines mütterlichen Schwangerschaftsdiabetes (B Thienpont und AK Kahlert)

Die DNA-Methylom-Analyse von AHF-Patientengeweben (Herz und Blut) wurde unter Verwendung der EPIC-Arrays von Illumina nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. In Bezug auf Herzgewebe werden dieselben Gewebeproben analysiert, die in Aufgabe 2.3 analysiert wurden. Insgesamt wurden 63 Herzgewebe-Proben und 40 Blutproben von insgesamt 67 Patienten mit angeborenen Herzfehlern, von denen 22 eine Mutter mit Gestationsdiabetes und 45 ohne Gestationsdiabetes hatten, analysiert. Die Probenaufbereitung erfolgte im Labor der Antragstellerin. Die Analyse anhand des Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina), das den Methylierungsstatus von 850.000 Regionen im Erbgut abfragt, wurde von „Life and Brain“ in Bonn durchgeführt, da sie aktuell die beste Expertise besitzen. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgt mit Hilfe der GenomeStudio™ Software (Version 2011.1, Methylierungsanalysemodul Version 1.9.0, Illumina). Die Proben wurden nach Alter, Gewebeart und Blut eingeteilt und miteinander verglichen. Dabei zeigte zunächst ein eindeutiges Methylierungsmuster hinsichtlich der unterschiedlichen Gewebearten, was uns schon aus den Vorarbeiten erahnen ließ.

Differential methylation in tissue



Des Weiteren zeigte sich ein unterschiedliches Methylierungsmuster zwischen den Herzgewebeproben von diabetischen Müttern versus nicht-diabetischen Müttern, sowohl in atrialen als auch in ventrikulären Proben. Eine differenzierte Analyse wird noch durchgeführt.



Arbeitspaket 3: Integration der Daten aus Arbeitspaket 1 und 2 und Entwicklung eines methylierungsbasierten Tests zur Abschätzung der Auswirkung von Diabetes bei Müttern für Neugeborene mit Herzfehlern (Leiter: B Thienpont)

Aufgabe 3.1: Vergleich der Einzelkern-RNA-Sequenzierung aus neugeborenen Herzgeweben, analysiert in Arbeitspaket 1 (Maus) und 2 (Mensch)

Methoden zur Zusammenführung einzelner Zelldatensätze aus verschiedenen Organismen wurden gerade erst entwickelt. Eine bemerkenswerte Erweiterung dieser Methoden stellt die kanonische Korrelationsanalyse (CCA) dar, die kürzlich vom Satija-Labor beschrieben und in das bioinformatische Auswerteprogramm Seurat R-Paket als RunCCA implementiert wurde³¹. Mit Hilfe der CCA können daher die Einzelkern-Analysen aus menschlichem und murinem Herzgewebe verglichen und beurteilt werden, inwieweit Diabetes gemeinsame

Signalwege beeinflusst. Die CCA ermöglicht es auch herauszufinden, inwieweit einzelne Zelltypen aufgrund von Diabetes angereichert sind. Zusätzlich können Gene, die aufgrund von Diabetes in den einzelnen Zelltypen unterschiedlich exprimiert werden, unter Verwendung der in Seurat implementierten modellbasierten Analyse der Einzelzell-Transkriptomik (MAST) -Pipeline identifiziert werden^{31; 32}. Entscheidend ist, dass MAST die Analyse der differentiellen Expression unter Verwendung eines verallgemeinerten linearen Modells unter Einbeziehung von Ko-Varianten (Diabetes ja / nein; AHF ja / nein; Mauszelle ja / oder) direkt ermöglicht. Die Analyse der differentiellen Expression wurde für jeden durch CCA identifizierten Zelltyp separat durchgeführt. Ergänzt wird dies durch die Gen-Set-Variationsanalyse, mit der unterschiedlich exprimierte Signalwege nachgewiesen werden können. Diese Methode war bereits im Labor von B. Thienpont etabliert³³. Es wurde bislang das Kardiomyozyten-Cluster untersucht, die anderen Cluster der verschiedenen Zelltypen werden auch nach Ablauf des Projektes weiter analysiert. Im Kardiomyozyten-Cluster fanden sich 8 überlappende Gene, die hochreguliert waren, sowie 6 Gene, die herunterreguliert waren (die entsprechende Abbildung befindet sich im Erfolgskontrollbericht).

Aufgabe 3.2: Vergleich der Methyloprofilen von neugeborenen Herzgeweben, die in Arbeitspaket 1 (Maus) und 2 (Mensch) gewonnen wurden

Das Epigenom stellt eine Verknüpfung aus Erbgut und Umwelt dar. Aus diesem Grund ist die Interpretation von Unterschieden bei epigenetischen Profilen oftmals kompliziert. Sie können direkte oder indirekte Folgen von Umweltunterschieden darstellen oder genetische Unterschiede widerspiegeln sowie eine Wechselwirkung zwischen Erbgut und Umgebung darstellen. Epigenetische Veränderungen spiegeln nicht nur das Ergebnis dieser Unterschiede wider, sondern können auch direkt zur unterschiedlichen Ausprägung des Phänotyps beitragen. Bei der Untersuchung von Biomarkern können diese Störfaktoren eine Menge Rauschen in Datensätze einbringen und somit die Aussagekraft verringern. Diese Tatsachen sind besonders problematisch, wenn menschliche Epigenotypen untersucht werden, da sowohl die Menschen hinsichtlich ihres Erbguts unterschiedlich sind als auch deren Umgebung. Im Gegensatz dazu sind die Mausexperimente, welche im Rahmen dieses Projektes durchgeführt werden, sehr homogen hinsichtlich der Einflussfaktoren von Umgebung und genetischem Hintergrund. Der integrierte Charakter dieses Projektvorschlags (mit sehr ähnlichen Probenentnahmestrategien für Mensch und Maus) sollte die einmalige Gelegenheit bieten zu testen, ob die Fokussierung auf epigenetische Veränderungen in einem homogenen Hintergrund (Maus) den Nachweis von Methylierungsveränderungen in einer heterogenen menschlichen Probensammlung erleichtern könnte.

Die humanen DNA-Methylierungsanalysen sollen sich daher speziell auf epigenetische Veränderungen bei Mäusen konzentrieren. Die Identifizierung differentiell methylierter Regionen wurde bereits in Aufgabe 1.5 beschrieben. Hierfür wird ein nicht allzu hoher Schwellenwert (20% FDR) verwendet, um die resultierende Liste von Regionen zu filtern, die zwischen den 4 beschriebenen Gruppen von Mäusen differentiell methyliert sind. Es soll dann getestet werden, ob dieselben Regionen in den humanen Daten eine unterschiedliche Methylierung aufweisen und ob sich die Methylierung in dieselbe Richtung verändert. Anschließend wird dieses Vorgehen mit der in Aufgabe 2.4 beschriebenen Strategie verglichen, bei der Methylierungsveränderungen für alle auf dem EPIC-Array vorhandenen Sonden getestet wurden.

Wichtig ist, dass CpG-Dinukleotide aufgrund der spontanen Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin einem starken Evolutionsdruck ausgesetzt sind. Die meisten im menschlichen Erbgut vorhandenen CpGs sind daher im murinen Erbgut nicht konserviert. Es besteht jedoch eine Übereinstimmung mit den Regionen, die CpGs flankieren. Das Kit, welches zum Nachweis der methylierten Regionen im Mausgenom verwendet wurde, enthält > 95% der Regionen, die eine Übereinstimmung zu den menschlichen Regionen des EPIC-Arrays aufweisen.

Da die Auswertungen der Methylierungsanalysen in beiden Projektteilen noch nicht komplett abgeschlossen sind, kann und wird diese Teil-Aufgabe erst nach Beendigung des

Projektes durchgeführt. In B. Thienpontos Labor sind jedoch genügend Ressourcen vorhanden, dass dies Aufgabe auch nach Beendigung der Förderphase erfolgreich durchgeführt werden kann.

Aufgabe 3.3: Erstellung eines DNA-Methylierungsmarker-Panels auf Blutbasis und Validierung seines Potenzials zur Beurteilung der pränatalen Exposition gegenüber Schwangerschaftsdiabetes

Ein wichtiger nächster Schritt sollte die Erstellung von Vorhersagen auf der Grundlage der gemessenen CpG-Methylierungswerte sein. Dieses Aufgabenziel war sehr ambitioniert von uns gewählt worden und konnte leider im Förderzeitraum nicht adressiert werden. Die vorhandenen Ergebnisse sollten jedoch eine gute Grundlage bilden für eine Anschlussförderung und damit eine damit verbundene Durchführung der Ziele.

3. Verwertungsplan

a. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Kurz- oder mittelfristig ergibt sich aus wirtschaftlicher Sicht kein unmittelbarer Nutzen, da die Ergebnisse des Vorhabens zunächst eher der Grundlagenforschung dienen.

b. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

Die Erkenntnisse über die Krankheitsmechanismen von Schwangerschaftsdiabetes in Bezug auf AHF sollen nach Publikation der Daten nicht nur anderen Wissenschaftlern, sondern auch ggf. auch diagnostisch tätigem Personal zur Verfügung gestellt werden. Insbesondere Pränataldiagnostiker als auch Humangenetiker könnten mittelfristig durch eine verbesserte prognostische Einschätzung und Abschätzung des Wiederholungsrisikos im Rahmen der Beratung von Schwangeren oder Familien mit Kinderwunsch profitieren. Des Weiteren könnten die Ergebnisse zukünftig zur Entwicklung eines Tests führen, der auf den Markt gebracht werden könnte.

c. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die vorliegenden Ergebnisse könnten für die Entwicklung eines diagnostischen Tests dienen, der eigentlich unter 3.3. angedacht war, aber etwas zu ambitioniert wird, insbesondere durch die Zeitverzögerungen der Auswirkung der Coronakrise. Die Idee wäre neben der Sicherung eines Patents die Akquirierung eines diagnostischen Labors oder eines Pharmakonzerns, die bereit wären, den Test weiterzuentwickeln und marktreif zu machen. Hierfür sind die Antragstellerin, die bereits aufgrund ihrer Tätigkeit als Fachärztin für Humangenetik engen Kontakt zu diagnostischen Laboren und Unternehmen pflegt, sowie B Thienpont vorgesehen. In Zusammenarbeit sollen die Erkenntnisse übermittelt werden sowie eine Beraterfunktion wahrgenommen werden.

4. Veröffentlichung der Ergebnisse

Es ist eine Einreichung eines Manuskripts an eine Fachzeitschrift gegen Ende des Jahres geplant. Es muss noch entschieden werden, ob die Ergebnisse im Ganzen ins Manuskript aufgenommen werden sollen oder ob einzelne Teilergebnisse separat veröffentlicht werden sollen. Die Publikation soll auch Grundlage sein, um weitere Förderungen zu beantragen. Während des Projektes hat S. Stefanovic bereits mit ihrer Gruppe ein Review zum Thema Diabetes als Risikofaktor veröffentlicht („Maternal Pre-Existing Diabetes: A Non-Inherited Risk Factor for Congenital Cardiopathies“, Int J Mol Sci, 2023 Nov 13;24(22):16258.doi: 10.3390/ijms242216258.)

5. Notwendigkeit und Angemessenheit der Zuwendung

Das geplante Vorhaben diene zur Aufklärung der Mechanismen, welche bei Schwangerschaftsdiabetes zu einem erhöhten Risiko für Kinder mit AHF führen. Es ist den Antragstellern gelungen, Gene bzw. Marker zu identifizieren, die Hinweise auf den Mechanismus liefern können. Dies stellt den ersten Schritt weiterführender Untersuchungen dar. Da bislang noch keine weiteren Veröffentlichungen hinsichtlich einer

Erklärung für das erhöhte Risiko für AHF bei Diabetes vorhanden sind, stellen unsere Daten eine gute Möglichkeit dar, diese Fragestellung zu lösen und nehmen somit einen großen Stellenwert in der Erforschung von AHF ein. Die verschiedenen verwendeten Techniken, die neben einer speziellen Probenaufbereitung auch eine kostspielige Sequenzierung bedingen, sowie die zusätzlich damit verbundene sehr aufwendige bioinformatische Auswertung der Daten erforderte entsprechend qualifiziertes Personal. Die Kosten hierfür konnten nicht durch das Labor bzw. das Universitätsklinikum getragen werden, da sie den normalen Zuwendungsrahmen für Leistungsorientierte Mittel durch die Universität bei weitem überschreiten. Eine erfolgreiche Durchführung des Vorhabens war somit nur durch externe Fördermittel möglich.

Literatur

1. van der Linde, D., Konings, E.E., Slager, M.A., Witsenburg, M., Helbing, W.A., Takkenberg, J.J., and Roos-Hesselink, J.W. (2011). Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 58, 2241-2247.
2. Mackie, A.S., Tran, D.T., Marelli, A.J., and Kaul, P. (2017). Cost of Congenital Heart Disease Hospitalizations in Canada: A Population-Based Study. *Can J Cardiol* 33, 792-798.
3. Homsy, J., Zaidi, S., Shen, Y., Ware, J.S., Samocha, K.E., Karczewski, K.J., DePalma, S.R., McKean, D., Wakimoto, H., Gorham, J., et al. (2015). De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science* 350, 1262-1266.
4. Sifrim, A., Hitz, M.P., Wilsdon, A., Breckpot, J., Turki, S.H., Thienpont, B., McRae, J., Fitzgerald, T.W., Singh, T., Swaminathan, G.J., et al. (2016). Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet* 48, 1060-1065.
5. Priest, J.R., Osoegawa, K., Mohammed, N., Nanda, V., Kundu, R., Schultz, K., Lammer, E.J., Girirajan, S., Scheetz, T., Waggott, D., et al. (2016). De Novo and Rare Variants at Multiple Loci Support the Oligogenic Origins of Atrioventricular Septal Heart Defects. *PLoS Genet* 12, e1005963.
6. Karunamuni, G., Gu, S., Doughman, Y.Q., Peterson, L.M., Mai, K., McHale, Q., Jenkins, M.W., Linask, K.K., Rollins, A.M., and Watanabe, M. (2014). Ethanol exposure alters early cardiac function in the looping heart: a mechanism for congenital heart defects? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H414-421.
7. Karunamuni, G.H., Ma, P., Gu, S., Rollins, A.M., Jenkins, M.W., and Watanabe, M. (2014). Connecting teratogen-induced congenital heart defects to neural crest cells and their effect on cardiac function. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102, 227-250.
8. Gong, W., Liang, Q., Zheng, D., Zhong, R., Wen, Y., and Wang, X. (2017). Congenital heart defects of fetus after maternal exposure to organic and inorganic environmental factors: a cohort study. *Oncotarget* 8, 100717-100723.
9. Alvarado-Terrones, E.G., Perea-Cabrera, M., Klunder-Klunder, M., Segura-Stanford, B., Erdmenger-Orellana, J.R., Lopez-Yanez Blanco, A., Hernandez-Carbajal, E., Granados Riveron, J.T., Mejia-Marin, L.J., Balderrabano-Saucedo, N.A., et al. (2018). Maternal Obesity as a Risk Factor for the Development of Total Anomalous Pulmonary Venous Connection in Their Offspring. *Arch Med Res* 49, 109-113.
10. Paige, S.L., Yang, W., Priest, J.R., Botto, L.D., Shaw, G.M., Collins, R.T., 2nd, and National Birth Defects Prevention, S. (2019). Risk factors associated with the development of double-inlet ventricle congenital heart disease. *Birth Defects Res*.
11. Schulkey, C.E., Regmi, S.D., Magnan, R.A., Danzo, M.T., Luther, H., Hutchinson, A.K., Panzer, A.A., Grady, M.M., Wilson, D.B., and Jay, P.Y. (2015). The maternal-age-associated risk of congenital heart disease is modifiable. *Nature* 520, 230-233.
12. Zhao, L., Chen, L., Yang, T., Wang, L., Wang, T., Zhang, S., Chen, L., Ye, Z., Zheng, Z., and Qin, J. (2019). Parental smoking and the risk of congenital heart defects in offspring: An updated meta-analysis of observational studies. *Eur J Prev Cardiol*, 2047487319831367.

13. Zhu, Y., Chen, Y., Feng, Y., Yu, D., and Mo, X. (2018). Association between maternal body mass index and congenital heart defects in infants: A meta-analysis. *Congenit Heart Dis* 13, 271-281.
14. Basu, M., and Garg, V. (2018). Maternal hyperglycemia and fetal cardiac development: Clinical impact and underlying mechanisms. *Birth Defects Res* 110, 1504-1516.
15. DeLaughter, D.M., Bick, A.G., Wakimoto, H., McKean, D., Gorham, J.M., Kathiriya, I.S., Hinson, J.T., Homsy, J., Gray, J., Pu, W., et al. (2016). Single-Cell Resolution of Temporal Gene Expression during Heart Development. *Dev Cell* 39, 480-490.
16. Skelly, D.A., Squiers, G.T., McLellan, M.A., Bolisetty, M.T., Robson, P., Rosenthal, N.A., and Pinto, A.R. (2018). Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Cellular Diversity and Intercommunication in the Mouse Heart. *Cell Rep* 22, 600-610.
17. Benson, D.W., Silberbach, G.M., Kavanaugh-McHugh, A., Cottrill, C., Zhang, Y., Riggs, S., Smalls, O., Johnson, M.C., Watson, M.S., Seidman, J.G., et al. (1999). Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 104, 1567-1573.
18. Reamon-Buettner, S.M., and Borlak, J. (2010). NKX2-5: an update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD). *Hum Mutat* 31, 1185-1194.
19. Takeuchi, J.K., Lou, X., Alexander, J.M., Sugizaki, H., Delgado-Olguin, P., Holloway, A.K., Mori, A.D., Wylie, J.N., Munson, C., Zhu, Y., et al. (2011). Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. *Nat Commun* 2, 187.
20. Prall, O.W., Menon, M.K., Solloway, M.J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., Biben, C., McBride, J.J., Robertson, B.R., Chaulet, H., et al. (2007). An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell* 128, 947-959.
21. Graham, M.L., Janecek, J.L., Kittredge, J.A., Hering, B.J., and Schuurman, H.J. (2011). The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med* 61, 356-360.
22. Basu, M., Zhu, J.Y., LaHaye, S., Majumdar, U., Jiao, K., Han, Z., and Garg, V. (2017). Epigenetic mechanisms underlying maternal diabetes-associated risk of congenital heart disease. *JCI Insight* 2.
23. Engineer, A., Saiyin, T., Lu, X., Kucey, A.S., Urquhart, B.L., Drysdale, T.A., Norozi, K., and Feng, Q. (2018). Sapropterin Treatment Prevents Congenital Heart Defects Induced by Pregestational Diabetes Mellitus in Mice. *J Am Heart Assoc* 7, e009624.
24. Kumar, S.D., Dheen, S.T., and Tay, S.S. (2007). Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovasc Diabetol* 6, 34.
25. Deeds, M.C., Anderson, J.M., Armstrong, A.S., Gastineau, D.A., Hiddinga, H.J., Jahangir, A., Eberhardt, N.L., and Kudva, Y.C. (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* 45, 131-140.
26. Brereton, M.F., Iberl, M., Shimomura, K., Zhang, Q., Adriaenssens, A.E., Proks, P., Spiliotis, I., Dace, W., Mattis, K.K., Ramracheya, R., et al. (2014). Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nat Commun* 5, 4639.
27. Krishnan, A., Samtani, R., Dhanantwari, P., Lee, E., Yamada, S., Shiota, K., Donofrio, M.T., Leatherbury, L., and Lo, C.W. (2014). A detailed comparison of mouse and human cardiac development. *Pediatr Res* 76, 500-507.
28. Battich, N., Stoeger, T., and Pelkmans, L. (2013). Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution. *Nat Methods* 10, 1127-1133.
29. Nagendran, M., Riordan, D.P., Harbury, P.B., and Desai, T.J. (2018). Automated cell-type classification in intact tissues by single-cell molecular profiling. *Elife* 7.
30. Pickardt, T., Niggemeyer, E., Bauer, U.M., Abdul-Khalik, H., and Competence Network for Congenital Heart Defects, I. (2016). A Biobank for Long-term and Sustainable

Research in the Field of Congenital Heart Disease in Germany. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14, 181-190.

31. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., and Satija, R. (2018). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 36, 411-420.
32. Finak, G., McDavid, A., Yajima, M., Deng, J., Gersuk, V., Shalek, A.K., Slichter, C.K., Miller, H.W., McElrath, M.J., Pric, M., et al. (2015). MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol* 16, 278.
33. Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwe, H., Pircher, A., Van den Eynde, K., et al. (2018). Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat Med* 24, 1277-1289.