

**Aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie  
Sektion Herzchirurgie  
der SHG-Kliniken Völklingen**

**Der Einfluss der extrakorporalen Zirkulation und des  
kardioplegischen Herzstillstandes auf die differentielle  
Genexpression im menschlichen Myokard**

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

2010

*Vorgelegt von Axel L. Brausch  
Geb.: 22.05.1970 in Völklingen/Saar*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
3.1	Ablauf der Genexpression .....	5
3.2	Regulationsmechanismen der Genexpression .....	7
3.3	Differentielle Genexpression.....	11
3.4	Genexpression und Herzchirurgie .....	12
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
4.1	Ausschlusskriterien .....	15
4.2	Demographische Daten/Patientencharakteristika.....	16
4.3	Operatives Vorgehen.....	17
4.4	Aufarbeitung der Gewebeproben .....	17
4.5	Faktoren zur erfolgreichen RNA-Amplifikation.....	18
4.6	Reverse Transkription zur Synthese einsträngiger cDNA .....	20
4.7	Synthese der zweisträngigen DNA.....	21
4.8	In vitro Transkription (IVT) zur Synthese von cRNA .....	22
4.9	cRNA Reinigung .....	23
4.10	Weiterverarbeitung der biotinylierten Proben-cRNA .....	25
4.11	Auswertung der Microarrays.....	27

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
5.1	Überexprimierte Gene des Vorhofmyokards Fold change >4 beim Vergleich vor vs. nach kardioplegischem Herzstillstand und Reperfusion .....	34
5.2	Funktion der überexprimierten Gene (Fold change >4).....	38
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
6.1	Diskussion der Literatur .....	69
6.1.1	Literaturvergleich .....	75
6.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse .....	78
6.2.1	Zytokine/Inflammation.....	79
6.2.2	Growth arrest/Apoptose .....	84
6.2.3	Transkriptionelle Regulation.....	87
6.2.4	Signaltransduktion.....	91
6.2.5	Extrazelluläre Matrix (ECM)/Remodelling .....	94
6.2.6	Immediate early genes.....	95
6.2.7	Top Ranking .....	97
6.2.8	Schlussfolgerungen .....	99
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>136</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>137</b>

## 1. Zusammenfassung

Der molekularbiologische Wissenszuwachs und die Weiterentwicklung der Microarraytechnologie haben in der letzten Dekade globale Expressionsanalysen auf RNA- oder Proteinebene mit hinreichender Auflösung möglich gemacht. Über die myokardiale Genexpression im menschlichen Herzen im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen gibt es bislang nur wenig und zum Teil widersprüchliche Literatur.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die differentielle Genexpression im menschlichen Myokard unter dem Einfluss des kardioplegischen Herzstillstandes und anschließender Reperfusion im Rahmen einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation zu untersuchen. Die Myokardbiopsien wurden auf einem Illumina® Human HT-12v3 Expression Beadchip (San Diego, CA, USA) hybridisiert und damit erstmals pangenomisch untersucht.

Es wurden 16 Proben aus dem rechten Vorhof von 8 männlichen Patienten im Rahmen einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation - unmittelbar vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation und nach Beenden der Reperfusion - entnommen und nach Zugabe von RNA-later (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) konserviert. Die RNA Verstärkungsprozedur erfolgte gemäß dem Illumina Total Prep Amplifikation Kit, Revision C (2009). Das mittlere Alter der Patienten betrug  $63,3 \pm 8,19$  Jahre. Relevante Komorbiditäten lagen nicht vor. Die Ischämiezeit betrug  $46,31 \pm 7,81$  Minuten, die Dauer der Reperfusion  $29,97 \pm 4,34$  Minuten.

Das Hybridisieren, Färben und Waschen der Microarrays erfolgte nach dem Gene Expression on Sentrix® Arrays Direct Hybridization System Manual der Firma Illumina®. Für die Hybridisierung auf Human HT-12v3 Expression BeadChips wurden 750 ng biotinylierte cRNA eingesetzt. Nach Normierung der Daten durch varianzstabilisierende Transformation nach Huber et al. (2002) wurde anhand eines gepaarten t-Testes überprüft, ob sich die Genexpression der Proben vor vs. nach Ischämie und Reperfusion signifikant voneinander unterscheiden. Zur Darstellung der differentiell exprimierten Gene wurden heatmaps verwendet, bei denen die Sonden anhand ihres Fold changes sortiert wurden.

Vom ca. 30000 Gene umfassenden menschlichen Genom konnten 413 differentielle exprimierte Gene detektiert werden. Dabei waren 50 Gene mit einem Fold change von  $> 4$  signifikant überexprimiert. Diese Gene wurden einer funktionellen Klassifizierung mittels der NCBI

RefSeq Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) und der NCBI Unigene Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) zugeordnet und in 5 Gruppen eingeteilt:

1. Zytokine /Inflammation (n=11)
2. Growth arrest/Apoptose (n=9)
3. Transkriptionelle Regulation (n=19)
4. Signaltransduktion (n=12)
5. Extrazelluläre Matrix/Remodelling (n=4)

Fünf dieser 50 überexprimierten Gene konnten aufgrund funktioneller Gesichtspunkte zwei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden.

Siebzehn der 50 hochregulierten Gene (Fold change > 4) werden als immediate early gene reguliert, sind also zu Beginn ihrer Transkription nicht von einer Proteinsynthese, sondern von präexistenten Transkriptionsfaktoren abhängig. Die Mehrzahl der immediate early genes ist mit den Molekularfunktionen der „transkriptionellen Regulation“ (n=12) assoziiert. Die anderen Gene lassen sich den funktionellen Gruppen „Growth arrest/Apoptose“ (n=3), „Signaltransduktion“ (n=2) und „extrazelluläre Matrix/Remodelling“ (n=1) zuordnen, wobei ein Gen funktionell zwei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden kann.

Bei 21 von 50 hochregulierten Genen wurde bislang kein Zusammenhang zwischen Ischämie/Reperfusion und einer differentiellen Genexpression beschrieben. Die meisten dieser Gene (n=10) sind mit der Molekularfunktion der „Signaltransduktion“ assoziiert. Die anderen Gene lassen sich den Gruppen „Zytokine/Inflammation“ (n=3), „Growth arrest/ Apoptose“ (n=3), „transkriptionelle Regulation“ (n=3) und „extrazelluläre Matrix/Remodelling“ (n=2) zuordnen.

Insgesamt kommt es nach einem kardioplegischen Herzstillstand und anschließender Reperfusion im Rahmen einer aortokoronaren Bypassoperation bereits innerhalb von Minuten zu einer ausgeprägten Reaktion des Myokards auf der Ebene der Genexpression. Dabei werden funktionelle Pfade aktiviert, die potentiell protektiv sind.

## 2. Abstract

### **The influence of cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest on the differential gene expression in human myocardium.**

Transcriptional profiling using high-density microarrays provides unique data about regulatory pathways and gene function by comparing the level of mRNA transcribed in cells. But there are just a few and partly contradictory human data describing the early genomic response to intraoperative myocardial ischemia and reperfusion.

Therefore, we investigated the differential gene expression associated with cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest in patients undergoing elective cardiac surgery by using the Illumina® Human HT-12v3 Expression BeadChip (San Diego, CA, USA), which - for the first time - represents a whole genomic approach.

Right atrial myocardium was harvested from 8 male patients undergoing coronary artery bypass grafting, before and after cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. The mean age of the patients was  $63,3 \pm 8,19$  years. The patients had no relevant comorbidities. Mean durations of aortic crossclamping and cardioplegic arrest were  $46,31 \pm 7,81$  and  $29,97 \pm 4,34$  minutes, respectively.

Samples of approximately 200 mg were conserved after addition of RNA-later (Quiagen®, Hamburg, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was isolated following the manufacturer's protocol (Illumina® Total Prep Amplifikation Kit, Revision C (2009)). A total of 17 hybridizations were performed on the Illumina® Human HT-12v3 Expression BeadChip including 1 reference tRNA as a universal control. Hybridized arrays were stained with  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Streptavidin-Cy3 (FluoroLink® Cy3, GE Biosciences), washed, dried, and scanned immediately on the Illumina® BeadArray Reader 500X. The obtained data were normalized using a variance stabilizing transformation. To analyze the effect of ischemia, gene expression of patients was compared gene by gene using a paired t-test regarding pre and post status. A so-called heatmap was computed to present the expression profiles of totally 413 differential expressed genes.

We found 50 significantly upregulated genes with a fold change  $> 4$ . These transcripts were grouped according to their function in 5 categories based on the Unigene or the NCBI RefSeq

database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq)), when Uni-gene classification was lacking:

1. cytokine/inflammatory response (n=11)
2. growth arrest/apoptosis (n=9)
3. transcriptional regulation (n= 19)
4. signal transduction (n=12)
5. extracellular matrix/remodelling (n=4).

Based on functional aspects, 5 of these 50 significantly upregulated genes were placed into 2 different groups.

17 of these upregulated genes were regulated as immediate early genes, whose initiation of transcription is not dependent on protein synthesis, but on preexistent transcription factors. The majority of the immediate early genes was found to be involved in the “transcriptional regulation” (n=12). The other genes were functionally associated to the groups “growth arrest/apoptosis” (n=3), “signal transduction” (n=2) and “extracellular matrix/remodelling” (n=1), whereas 1 gene was classified into 2 different groups.

Regarding 21 of these 50 upregulated genes, no direct link to ischemia/reperfusion and differential gene expression could be found in literature. Most of these genes (n=10) were functionally associated with “signal transduction”. The other genes belong to the groups “cytokine/inflammatory response” (n=3), “growth arrest/apoptosis” (n=3), “transcriptional regulation” (n= 3) and “extracellular matrix/remodelling” (n=2).

## **Conclusion**

Reversible myocardial ischemia/reperfusion during elective coronary bypass grafting is associated with an immediate genomic response. The gene expression profiles reveal functional pathways, which may be potentially protective.

### **3. Einleitung**

Grundlage vieler biologischer Prozesse in einer Zelle oder einem Organismus ist die Regulation der Genexpression. Viele Faktoren tragen an unterschiedlichen Orten zur Genregulation bei. Der Fluss der genetischen Information von DNA über RNA zu Polypeptiden wird als zentrales Dogma der Molekularbiologie bezeichnet (Strachan et al., 2004).

#### **3.1 Ablauf der Genexpression**

Die Expression der genetischen Information verläuft bei Prokaryoten und Eukaryoten in zwei Schritten: Transkription und Translation.

##### **3.1.1 Transkription**

Als DNA-Transkription bezeichnet man den Vorgang, durch den an einer DNA-Matrize ein RNA-Molekül gebildet wird. Dabei entstehen sowohl mRNA-Moleküle, welche die Information für die Proteinbiosynthese enthalten als auch RNA-Moleküle mit Struktur- und Katalysatorfunktion (Transfer-RNA, ribosomale RNA und andere).

Am Anfang der Transkription steht die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA (Initiationsschritt). Eukaryotische RNA-Polymerasen sind von sich aus nicht in der Lage, mit der Transkription zu beginnen. Hierfür werden sogenannte Transkriptionsfaktoren benötigt, spezielle Helfermoleküle, welche an die DNA binden und dort für die Rekrutierung von Polymerasen an den Promotor zuständig sind. Der Promotor ist eine DNA-Sequenz, die selbst nicht transkribiert wird und an der sich die allgemeinen Transkriptionsfaktoren und die Polymerase sammeln. Der wichtigste Bestandteil des Promotors ist die TATA-Box - eine kurze Sequenz von A/T- und T/A-Basenpaaren -, die von dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIID erkannt wird. Der Startpunkt der Transkription liegt etwa 25 Nukleotidpaare stromabwärts der TATA-Box (White et al., 1992).

Unter Zuhilfenahme einer Helicase trennt die RNA-Polymerase den helikalen Doppelstrang der DNA auf, so dass immer neue Abschnitte für die komplementäre Basenpaarung zur Verfügung stehen. Die RNA-Polymerase beginnt den Strang vom 5`Ende in Richtung 3`Ende zu synthetisieren (Elongationsschritt).



Bei 37°C läuft die Polymerisation mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 30 Nukleotiden pro Sekunde, so dass eine RNA-Kette aus 5000 Nukleotiden in etwa 3 Minuten fertiggestellt ist. Dieser Prozess des Kettenwachstums geht so lange weiter, bis die RNA-Polymerase auf eine zweite spezielle DNA-Sequenz, das Stopp- oder Terminationssignal, trifft (Proudfoot et al., 1989). Dort löst sich die Polymerase sowohl von der DNA als auch von der neu gebildeten RNA-Kette ab, so dass die Transkription abgeschlossen ist (Terminationsschritt). Das Resultat der Transkription bei Eukaryoten ist ein pre-mRNA (Precursor)-Transkript (Hickey et al., 1989). Die Ansammlung solcher Transkripte wurde ursprünglich wegen der großen Längen-Heterogenität der RNA als hnRNA (heterogenous nuclear RNA) bezeichnet, da sie im Gegensatz zu den einheitlicheren und kürzeren RNA-Sequenzen steht, die tatsächlich für die Kodierung eines Proteins benötigt werden. Für diese Diskrepanz sind nicht kodierende RNA-Sequenzen (sog. Intron-Sequenzen) verantwortlich, die in einem zusätzlichen Zwischenschritt, der RNA-Prozessierung, weiterverarbeitet werden. Unter RNA-Prozessierung versteht man das Herausschneiden (Spleißen) von RNA-Abschnitten, die keine proteinkodierende Information beinhalten (Crick et al., 1979).

Anschließend wird am 5`Ende eine 7-Methyl-Guanosin (5`Cap-Struktur) angehängt, welche eine Rolle bei der Initiation der Proteinbiosynthese spielt und das Transkript vor dem Abbau durch Exonukleasen schützt.

Am 3`Ende werden durch das Enzym Poly(A)-Polymerase Adenylreste unterschiedlicher Länge an die RNA angehängt. Dabei wird die RNA, vereinfacht gesagt, schneller abgebaut, je kürzer der Poly(A)-Schwanz ist. Die so prozessierte RNA wird danach über Kernporen aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert.

### 3.1.2 Translation (Proteinbiosynthese)

Die Translation erfolgt an Ribosomen und besteht ebenfalls aus Initiation, Elongation und Termination. Die Synthese der Polypeptidketten erfolgt von 5` in 3` Richtung. Die so erhaltenen Polypeptidketten können einer Reihe posttranslationaler Modifikationen unterworfen werden.

## 3.2 Regulationsmechanismen der Genexpression

Genregulation bezeichnet die Steuerung der Aktivität, genauer gesagt der Expression von Genen. Sie legt fest, in welcher Konzentration das von einem entsprechenden Gen kodierte Protein in der Zelle vorliegen soll. Eukaryotische Zellen sind weniger darauf angewiesen, auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren (z.B. vermindertes Sauerstoff- oder wechselndes Nährstoffangebot), haben dafür aber die schwierige Aufgabe, bei mehrzelligen Organismen die Entwicklung zu steuern, indem zum richtigen Zeitpunkt in den richtigen Zellen die notwendigen Gene aktiviert werden (Lucas et al., 1992). In den ausdifferenzierten Zellen hat das einmal festgelegte Expressionsprogramm dann deutlich weniger Regulationsbedarf.

Die Regulation der Genexpression kann auf mehreren Ebenen erfolgen (DNA, RNA oder Proteinebene), wobei die primäre Kontrolle bei der Initiation der Transkription erfolgt, da nur die Transkriptionskontrolle sicherstellt, dass keine überflüssigen Zwischenprodukte hergestellt werden (Strachan et al., 2004).

### 3.2.1 Initiation der Transkription, Histonmodifikation

Inaktive DNA liegt häufig aufgrund einer DNA-Methylierung, die zur Kondensation des Chromatins führt, in einer dicht gepackten Chromatinstruktur vor, wodurch eine Transkription nicht möglich ist. Erst durch Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer Änderung der Konformation des Chromatins, indem durch eine Acetylierung die Kondensation des Chromatins aufgehoben wird (Histonmodifikation) (De Lange und Smith, 1971).

Es können nun weitere Proteine, die basalen Transkriptionsfaktoren, an die DNA binden. Dabei gibt es verschiedene Mechanismen, die sicherstellen, dass die Gen-Regulatorproteine spezifische Nukleotidsequenzen erkennen. Transkriptionsfaktoren erkennen beispielsweise ein spezifisches Muster von Wasserstoffbrücken-Donatoren und -Akzeptoren im Bereich der „großen Furche“ an der Außenseite der DNA, ohne dass eine Öffnung der Doppelhelixstruktur, wie ursprünglich angenommen, stattfinden muss (Seeman et al., 1976). Darüber hinaus erkennen sequenzspezifische DNA-bindende Proteine geometrische Besonderheiten der DNA, wie deren Biegung oder helikalen Drehungswinkel, da diese Besonderheiten von der zugrundeliegenden Nukleotidsequenz abhängen (van der Vliet et al., 1993).

Obwohl jede Interaktion der Protein-DNA-Erkennung für sich im Detail einmalig ist, lassen sich doch Gruppen DNA-bindender Struktur motive unterscheiden. Zu diesen Motiven gehören unter anderem das Helix-Turn-Helix-Motiv (Harrison et al., 1990), das Zinkfinger-Motiv (Rhodes et al., 1993), das Leucin-Zipper-Motiv (Landschulz et al., 1988) sowie das Helix-Loop-Helix-Motiv (Garrell et al., 1991). Die spezifisch gebundenen basalen Transkriptionsfaktoren rekrutieren dann die RNA-Polymerase und die Transkription des Gens wird gestartet.

Eukaryotische Gen-Regulatorproteine können allerdings nicht nur aktivierend, sondern auch unterdrückend, als Gen-Repressorprotein wirken (Goodbourn, 1990). Dies kann durch direkte Konkurrenz von Aktivator und Repressor um die regulatorische Sequenz geschehen (kompetitiv) oder dadurch, dass der Repressor die aktivierende Oberfläche des Aktivators belegt und somit die Transkription blockiert (Jackson, 1991). Im dritten Fall tritt der Repressor mit einem frühen Stadium der allgemeinen Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung und verhindert damit die Ansammlung weiterer Faktoren (Herschbach und Johnson, 1993).

Eine andere Form der Repression ist die transkriptionelle Interferenz. Hierbei befindet sich vor dem Promotor des Gens ein zweiter Promotor. Eine Aktivierung dieser Region bewirkt die Synthese nicht kodierender RNA. Durch diese Transkription wird die Expression des eigentlichen Gens verhindert.

### 3.2.2 Termination der Transkription

Die Effizienz der Termination ist entscheidend dafür, wie viele mRNA Moleküle von einem Gen entstehen können. Dabei nutzen die drei eukaryotischen RNA-Polymerasen (I, II und III) unterschiedliche Terminationsmechanismen. Die RNA-Polymerase I benötigt einen speziellen Terminationsfaktor, der stromabwärts an die DNA bindet, während die RNA-Polymerase II die Transkription vermutlich erst beendet, wenn die Polyadenylierung erfolgt. Die RNA-Polymerase III beendet die Transkription nach dem Einbau einer Reihe von Uracil-Nukleotiden.

### 3.2.3 Capping

Die primären Transkripte werden noch während ihrer Synthese sowohl an ihrem 5`Ende als auch an ihrem 3`Ende kovalent so modifiziert, dass sie sich eindeutig von den Transkripten der anderen Polymerasen unterscheiden (Nevins et al., 1983).

Beim Capping wird 7-Methyl-Guanosin am 5`Ende der prä-mRNA synthetisiert (5`-Cap-Struktur), was deren Stabilität beeinflusst. Die 5`Cap-Struktur erleichtert außerdem die Initiation der Translation, d. h. die Anlagerung der fertigen mRNA an das Ribosom.

#### 3.2.4 Polyadenylierung

Das 3`Ende der meisten Polymerase-II-Transkripte wird dadurch definiert, dass das wachsende Transkript an einer bestimmten Stelle geschnitten und ein Poly-A-Schwanz aus 100 – 200 Adenylsäureresten an das neu geschaffene 3`Ende angehängt wird. Das Signal zum Schneiden ist das Auftreten einer AAUAAA RNA-Sequenz etwa 10-30 Nucleotide oberhalb der Schnittstelle (Wickens et al., 1990). Das Vervollständigen des primären RNA-Transkriptes durch Anheften eines Poly-A-Schwanzes unterschiedlicher Länge an die m-RNA wird als Polyadenylierung bezeichnet.

Der Poly-A-Schwanz hilft beim Export der reifen m-RNA aus dem Zellkern und trägt zur Stabilität der m-RNA im Cytoplasma bei. Außerdem scheint er als ein Erkennungssignal für die Ribosomen zu dienen, die in Kombination mit dem 5`Cap erkennen können, ob die mRNA intakt ist. Dieser Mechanismus erhöht die Effizienz der Translation, da keine Energie und Vorläufer verschwendet werden.

#### 3.2.5 RNA-Prozessierung / Splicing

Das primäre RNA-Transkript ist eine getreue Kopie des Gens und enthält sowohl kodierende Sequenzen (Exons) als auch nicht kodierende Sequenzen (Introns). Beim Splicing werden die nicht kodierenden Abschnitte aus der prä-mRNA entfernt und die verbleibenden Exons zusammengefügt (Crick et al., 1979). Da die meisten eukaryotischen Gene mehr Intron- als Exon-Sequenzen enthalten, ist das RNA-splicing der Grund für die Umwandlung der sehr langen Kern-hnRNA-Moleküle in die sehr viel kürzeren cytoplasmatischen m-RNA-Moleküle (Dreyfuss et al., 1993).

Alternatives Splicing kann außerdem zu verschiedenen Isoformen führen, was Auswirkungen auf die Funktion des kodierten Proteins hat. Regulatorische Faktoren können beeinflussen, welche Splicingvariante erzeugt werden soll.

### 3.2.6 Transport ins Zytoplasma

Fertig prozessierte mRNA wird mit dem 5`Ende voran durch Kernporen vom Zellkern in das Zytoplasma geschleust. Hierzu wird die mRNA mit verschiedenen Signalproteinen zu einem hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)-Komplex zusammengefügt. Beim Menschen sind mehr als 20 hnRN Proteine bekannt (Singh, 2001). Die Effizienz dieses Vorgangs bestimmt die Geschwindigkeit und die Menge an fertigen mRNAs, die in das Zytoplasma gelangen und kann ebenfalls von regulatorischen Faktoren beeinflusst werden.

### 3.2.6 Initiation der Translation

Nach Bildung eines sogenannten Präinitiationskomplexes aus verschiedenen Proteinen kann dieser mit einer kleinen Untereinheit des Ribosoms interagieren, um die Startstelle der Translation zu erkennen. Vielfältige Regulationsmöglichkeiten reichen von der Verwendung von spezifischen Initiationsfaktoren bis hin zu einer generellen Abschaltung der Initiation, indem ein Serinrest eines Proteins des Präinitiationskomplexes phosphoryliert wird.

Die Translation einiger mRNAs kann auch durch antisense-RNA blockiert werden, die sich komplementär an den 5`Bereich der RNA anlagert und dadurch die Bindung an die ribosomale Untereinheit verhindert.

Außerdem spielen microRNAs bei der Translationsregulation eine große Rolle. MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression negativ regulieren, indem sie die Translation der mRNA inhibieren oder eine Degradation der mRNA induzieren (Bartel, 2004). Beim Menschen werden mindestens ein Drittel aller Gene durch miRNAs reguliert (Berezikov et al., 2005).

### 3.2.7 Stabilität der mRNA

Die Konzentration einer mRNA hängt nicht nur davon ab, wie schnell sie produziert wird, sondern auch von der Halbwertszeit, das heißt der Geschwindigkeit, mit der sie wieder abgebaut wird. Wenn eine mRNA sehr stabil ist, kann die Proteinproduktion noch lange nach der Inaktivierung des Gens stattfinden. Ausdifferenzierte eukaryotische Zellen mit zum Teil geringem Regulationsbedarf erreichen Halbwertszeiten von mehreren Stunden, während Hormon oder Zytokin kodierende Gene nur sehr kurz exprimiert werden.

Die Stabilität einer mRNA wird unter anderem dadurch bestimmt, dass im untranslatierten 3` Bereich des Transkripts AUUUA-Sequenzen vorkommen. Je mehr davon vorhanden sind, desto schneller wird die RNA abgebaut. Ein bereits oben genannter Faktor ist die Länge des Poly(A)-Schwanzes, der die Halbwertszeit mit zunehmender Länge verlängert.

### 3.2.8 Posttranslationale Modifikation

Im Anschluss an die Proteinbiosynthese kann es zu enzymkatalysierten Veränderungen an den Proteinen kommen, wodurch diese vielfach modifiziert werden können. Es werden Teile entfernt, einige Aminosäuren verändert, Kohlenhydrate (Glykosylierung) oder Lipide an bestimmten Stellen angeheftet oder es erfolgt eine Aktivierung durch Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung. So ist zum Beispiel die reversible Protein-Phosphorylierung durch Proteinkinasen (Anlagern) bzw. Protein-Phosphatasen (Entfernen) eine herausragende Strategie, die Aktivität von Proteinen in eukaryoten Zellen zu kontrollieren. Eukaryote Zellen enthalten eine große Anzahl dieser Enzyme, die eine bedeutende Funktion bei der intrazellulären Signalübertragung haben (Johnson und Barford, 1993).

## 2.3 Differentielle Genexpression

Erst der molekularbiologische Wissenszuwachs und technische Entwicklungen der letzten Dekade auf molekularbiologischem und proteinbiochemischem Gebiet haben die notwendigen Voraussetzungen geschaffen, um globale Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene mit hinreichender Auflösung durchzuführen. Zu diesen Entwicklungen gehört die im Frühjahr 2003 abgeschlossene Sequenzierung des menschlichen Genoms, wo zur Überraschung vieler entdeckt wurde, dass das menschliche Genom relativ wenige Gene enthält. Mit ca. 30.000 Genen im haploiden Genom verfügt der Mensch über weniger Gene als die Reis-pflanze und nur unwesentlich mehr Gene als der Fadenwurm *Caenorhabditis* (Bennetzen et al., 2002).

Während die klassische Genetik bei der Untersuchung von Krankheiten einzelne Gene betrachtet, ist es das Ziel der funktionellen Genomik, die Gesamtheit des Genoms in einem spezifischen Funktions- oder Krankheitszustand einer Zelle zu analysieren. Erst die Verfügbarkeit der kompletten Sequenzinformation des menschlichen Genoms ermöglicht die En-bloc-Analyse dieser Parameter. Ein bedeutendes Werkzeug der funktionellen Genomik stellen

Microarrays dar, mit deren Hilfe die in einer Zelle vorhandenen RNAs bzw. Proteine quantitativ erfasst werden können (Baldi und Hatfield, 2002).

Durch Microarrays kann somit die differentielle Genexpression identifiziert werden, indem festgestellt werden kann, in welcher Zahl Transkripte oder Proteine in einer Zelle in einem definierten Funktions- oder Krankheitszustand vorhanden sind.

## **2.4 Genexpression und Herzchirurgie**

In Deutschland werden jährlich circa 100.000 Herzoperationen durchgeführt. Dabei kommt die Herzlungenmaschine in Verbindung mit einem kardioplegischem Herzstillstand bei etwa 90 % der koronaren Bypassoperationen und bei nahezu allen anderen Operationen der Erwachsenenherzchirurgie zur Anwendung. Obwohl sich sowohl die Kardiotechnik als auch die Kardioplegiestrategien in den letzten Jahren verbessert haben, sind beide mitverantwortlich für einen Großteil der Morbidität und Mortalität, die mit der Herzchirurgie assoziiert sind. So ist seit langem bekannt, dass nach einer Operation mit Herzlungenmaschine und kardioplegischem Herzstillstand eine variable systolische und diastolische Dysfunktion des Herzens auftreten kann (Ellis et al., 1983; Patel et al., 1988). Dieser Zustand, der definitionsgemäß ohne Nekrosen von Herzmuskelzellen entsteht, wird „myocardial stunning“ genannt (Braunwald und Kloner, 1983) und kann mitunter prolongiert bis zu Tagen andauern (Braunwald, 1990). Demgegenüber beschreibt das sogenannte „myocardial hibernation“ einen reversiblen Zustand von regional minderperfundiertem Myocard, dessen Funktionseinschränkung nach erfolgreicher Reperfusion rückgängig zu machen ist (Rahimtoola, 1997). Neben „stunning“ und „hibernation“ wird das „preconditioning“ als drittes ischämisches Syndrom bezeichnet (Katz, 2001). Hierbei handelt es sich um Reaktionen des Myokards auf kurze ischämische Episoden, die nicht ausreichen, um einen Zelltod zu verursachen, aber die Widerstandsfähigkeit des Myokards für folgende, schwerere Ischämien erhöhen (Murray et al., 1986). Der kardioplegische Herzstillstand stellt eine Form der ischämischen Präkonditionierung dar (Hausenloy et al., 2005; Arab et al., 2007).

Zahlreiche klinische und experimentelle Studien haben außerdem gezeigt, dass Operationen mit Herzlungenmaschine (HLM) zu einer systemischen Entzündungsreaktion führen können, die durch die Bioinkompatibilität von Oberflächen mit Blutkontakt, das chirurgische Trauma an sich, Ischämie und Reperfusion, sowie eine Endotoxinämie getriggert werden (Levy et al., 2003). Auch dies kann nach der extrakorporalen Zirkulation zu einer kardiovaskulären Dys-

funktion, einschließlich des myokardialen Stunning, der Myokardischämie und der  $\beta$ -adrenergen Desensibilisierung, führen (Hennein et al., 1994).

Doch neben den gut untersuchten Plasmaspiegeln proinflammatorischer Mediatoren, zeigte sich bald, dass das Herz selbst an der inflammatorischen Antwort auf herzchirurgische Eingriffe beteiligt ist (Wan et al., 1996). Kardiomyocyten und Endothelzellen wurden durch immunhistochemische Zusatzuntersuchungen als Zellen mit erhöhter Genexpression für die Protooncogene c-fos und c-jun identifiziert (Aebert et al., 1997), wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen erst mit Hilfe der Microarraytechnologie in den Folgejahren beleuchtet wurden. Es hat sich dabei herausgestellt, dass das Erstellen von Transkriptionsprofilen bei der Einordnung komplexer Muster gewebespezifischer Genexpression als Reaktion auf unterschiedlich schwere Stimuli hilfreich sein kann (Sehl et al., 2000).

Erste Genexpressionsprofile von Patienten, die sich einer elektiven koronaren Bypassoperation unterziehen mussten, wurden 2003 veröffentlicht (Ruel et al., 2003). Hierbei wurde bei 5 Patienten eine Microarray basierte Analyse von 12625 Genen durchgeführt, um den Unterschied der globalen Genexpression von Vorhofmyocard im Vergleich zu Skelettmuskulatur unter dem Einfluss der Herzlungenmaschine und dem kardioplegischem Herzstillstand zu erfassen.

Im darauffolgenden Jahr wurden dann Unterschiede in der Genexpression von Typ II Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern, ebenfalls im Rahmen einer elektiven Bypassoperation mit kardioplegischem Herzstillstand, untersucht (Voisine et al., 2004). Bei beiden Untersuchungsreihen kam das Affymetrix® U95 GeneChip System (Affymetrix®, Santa Clara, CA, USA) zum Einsatz.

Der alleinige Einfluss der Herzlungenmaschine auf die differentielle kardiale Genexpression wurde tierexperimentell an Ratten untersucht (Podgoreanu et al., 2005). Durch cDNA Microarrays von 2343 Genen konnten eine Reihe proinflammatorische Gene identifiziert werden, die auch ohne einen kardioplegischen Herzstillstand, also als alleinige Reaktion auf die HLM, überexprimiert wurden.

Um die frühe myokardiale Genexpression am Menschen während eines kardioplegischen Herzstillstandes zu untersuchen, wurden erstmals 2007 Genexpressionsprofile nach durchschnittlich 56-minütigem kardioplegischen Herzstillstand unmittelbar vor Beenden der Ischämie erstellt (Arab et al., 2007). Untersucht wurden Proben aus dem rechtsventrikulären Ausflusstrakt (RVOT) von 5 Kleinkindern (durchschnittliches Alter 25 Monate), bei denen ein operationsbedürftiger Ventrikelseptumdefekt (VSD) mit zusätzlicher Obstruktion des RVOT



vorlag. Hierbei konnte eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren IGF1 (insulin-like growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), EGR1 (early growth response 1) nachgewiesen werden, die einerseits einen kardioprotektiven Effekt haben (Hausenloy et al., 2004; Mc Mullen et al., 2004) und andererseits eine bedeutende Rolle beim Erholen des postischämischen Myokards spielen (Bellomo et al., 2000). Zusätzlich wurden Gene der Phosphoinositid 3-kinase/Proteinkinase B (PI3K/PKB)-Kaskade aktiviert, denen zumindest im Tiermodell eine positive Rolle bei der ischämischen Präkonditionierung zugesprochen wird (Teoh et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die differentielle Genexpression am menschlichen Myocard bei Patienten, die sich einer elektiven koronaren Bypassoperation unterziehen mussten, zu untersuchen. Dabei kam durch Verwenden des Illumina® Human HT-12v3 Expression Beadchip (San Diego, CA, USA) erstmals eine Microarraytechnologie zum Einsatz, die es ermöglichte, pangenomisch zu analysieren, also das komplette Genom abzubilden.

## 4. Material und Methoden

Der klinische Teil der vorliegenden prospektiven und nicht randomisierten Studie wurde in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der SHG-Kliniken in Völklingen in der Zeit von Oktober 2007 bis April 2008 durchgeführt. Untersucht wurden 8 männliche Patienten mit koronarer Dreifäßerkrankung im Alter zwischen 58 und 79 Jahren (mittleres Lebensalter  $63,3 \pm 8,19$  Jahre), die sich einer elektiven koronaren Bypassoperation unterziehen mussten. Das Körpergewicht betrug  $85,10 \pm 9,14$  kg. Bei einer Körpergröße von  $171 \pm 4,13$  cm ergab sich ein Body-Mass-Index (BMI) von  $29,11 \pm 3,29$  kg/m<sup>2</sup>.

Präoperativ wurden nicht steroidale Antiphlogistika (z.B. Ibuprofen®, Diclofenac®) für 7 Tage pausiert. Ebenso wurden die Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (Hemmung der Prostaglandin- und Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthese durch irreversible Hemmung der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2, z.B. ASS®, Aspirin®) und Dipyridamol (Hemmung der Phosphodiesterase in Thrombozyten, z.B. Persantin®, Aggrenox®) sowie die Thrombozytenfunktionshemmer Clopidogrel (Blockierung des ADP-Rezeptors P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>, z.B. Plavix®, Iscover®) abgesetzt und gegebenenfalls durch niedermolekulare Heparine ersetzt. Eine notwendige Therapie mit Phenprocoumon (Vitamin-K-Antagonist, z.B. Marcumar®, Pheno-pro®) wurde bei einem Patienten präoperativ für 7 Tage durch ein niedermolekulares Heparin ersetzt.

Die Patienten wurden über den geplanten Zusatzeingriff (Entnahme von Gewebeproben aus dem rechten Vorhof) aufgeklärt und waren damit einverstanden. Für die Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes vor (Kenn-Nr. 154/05).

### 4.1 Ausschlusskriterien

- akutes Koronarsyndrom
- begleitende Herzklappenvitien
- Ejektionsfraktion < 40 %
- stattgehabte Koronarintervention innerhalb von 6 Wochen vor der Operation
- LAD (RIVA) - Verschluss

- Linksventrikuläre Hypertrophie
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit Stadium III oder IV nach Fontaine
- Maligne Erkrankungen
- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus (IDDM)
- Leberparenchymschaden mit laborchemisch erniedrigter Cholinesterase
- Niereninsuffizienz mit Creatinin > 1,5 mg/100ml
- Thrombozytenzahl < 100.000 / nl
- Venöse Thrombembolien oder hämorrhagische Diathesen in der Eigenanamnese
- Anämie mit einem Hämatokrit < 30 %

#### 4.2 Demographische Daten / Patientencharakteristika

	<b>Einheit</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Alter</b>	Jahre	63,86	8,19
<b>Größe</b>	Zentimeter	170,89	4,13
<b>Gewicht</b>	Kilogramm	85,10	9,14
<b>Body-Mass-Index (BMI)</b>	Kg/m <sup>2</sup>	29,11	3,29
<b>Schnitt-Naht-Zeit</b>	Minuten	184,21	19,27
<b>Anzahl der Bypasses</b>		3,82	0,84
<b>Dauer der Ischämie</b>	Minuten	46,31	7,81
<b>Dauer der Reperfusion</b>	Minuten	29,79	4,34

**Tabelle 1:** Patientencharakteristika, n= 8 Patienten

### **4.3 Operatives Vorgehen**

Zum Ausschluss zirkadianer Schwankungen wurden alle Operationen vormittags durchgeführt. Nach Präoxygenierung erfolgte eine standardisierte Narkoseeinleitung mit Sufentanil (25-50 µg) sowie die Applikation von Propofol (1mg/kg Körpergewicht via Perfusor). Anschließend wurden die Patienten nach Relaxierung mit Pancuroniumbromid (0,1 mg/kg KG) oral intubiert.

Bei allen Patienten wurde die mediane Sternotomie als operativer Zugang gewählt und im Anschluss zunächst die Arteria thoracica interna (L-IMA) präpariert. Vor dem distalen Absetzen der L-IMA erfolgte die Heparinisierung mit 300 IE/kg Körpergewicht und einer Ziel-ACT > 450 sec. Das Primingvolumen der Herzlungenmaschine bestand ausschließlich aus kristallinen Lösungen (Ringer Laktat sowie isotonische Natriumlösungen). Zum Anschluss der extrakorporalen Zirkulation wurde die Aorta ascendens kanüliert und eine Tabaksbeutelnaht im Bereich des rechten Herzohres vorgelegt. Innerhalb dieser Naht erfolgte unmittelbar vor Einführen der Zwei-Stufen-Kanüle die atraumatische Entnahme einer Gewebeprobe von ca. 5x3x2 mm. Nach Klemmen der Aorta ascendens und antegrader Infusion von normothermer Kardioplegielösung nach Calafiore in die Aortenwurzel erfolgte die Perfusion des Patienten mit einer Flussrate von 2,4 l/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Nach dem Anlegen der distalen Koronaranastomosen und der Beendigung des kardioplegischen Herzstillstandes durch Öffnen der Aortenklemme konnten in der Reperfusionsphase die proximalen Anastomosen im Bereich der Aorta ascendens angefertigt werden. Unmittelbar nach Beenden der extrakorporalen Zirkulation wurde dann ein zweites, gleich großes Gewebestück von ca. 5x3x2 mm ebenfalls im Bereich des rechten Herzohres, aber außerhalb der vorgelegten Tabaksbeutelnaht (ehemalige venöse Kanülierungsstelle), entnommen.

### **4.4 Aufarbeitung der Gewebeproben**

Die umgehende Verarbeitung des intraoperativ entnommenen Vorhofmyokards ist eine absolute Voraussetzung für verlässliche Genexpressionsanalysen. Die Stabilisierung der RNA im Gewebe nach der Entnahme ist notwendig, um Veränderungen des Expressionsmusters durch RNA-Zerfall oder durch Einleitung der Transkription zu vermeiden. Dabei ist im Allgemeinen auf das richtige Mischungsverhältnis von Gewebe zu Reagenz (RNA-later) sowie auf eine komplette Umfließung des Gewebes zu achten.

Das genaue Procedere war wie folgt:

1. Atraumatische Entnahme von ca. 5x3x2 mm $\approx$ (200 mg) Vorhofmyokardgewebe zu den oben definierten Zeitpunkten.
2. Abpipettieren von RNA-later (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) in ein 5 ml Aliquot (Safe-Lock Reaktionsgefäß der Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Als Faustformel wurden 10  $\mu$ l Reagenz pro 1 mg Gewebe verwendet, mindestens aber soviel, bis die Gewebeprobe komplett von Flüssigkeit umflossen war.
3. Kühlung des Röhrchens für > 12 Stunden bei 4 °C.
4. Umlagerung zur dauerhaften Konservierung bei – 80 °C.
5. Nach Abschluss der Untersuchungsreihe Transport der Proben ins Labor (Institut für Experimentelle Anästhesie, Research Center Lobeda, Jena) in einer Polystyrolschaumstoffbox nach Lagerung auf Trockeneis.

Die Weiterverarbeitung erfolgte am Institut für Experimentelle Anästhesie, Research Center Lobeda, der Friedrich Schiller Universität Jena.

## **4.5 Faktoren zur erfolgreichen RNA-Amplifikation**

### **4.5.1 RNA Reinheit**

Die RNA Reinheit ist der bedeutendste Einzelfaktor bei der Benutzung des Illumina Total Prep RNA Amplifikation Kit (Illumina®, San Diego, CA, USA). Die Proben müssen frei sein von kontaminierenden Proteinen, DNA und anderen zellulären Bestandteilen, ebenso wie von Phenolen, Ethanol oder Salzen, die mit den RNA Isolationsprozeduren assoziiert sind. Ein effektives Maß der RNA Reinheit ist die ratio of absorbance readings bei 260 und 280 nm ( $A_{260}$  und  $A_{280}$ ), wobei das Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  im Bereich von 1,7 – 2,1 liegen soll. Bei unseren Untersuchungen kam zu diesem Zweck das NanoDrop 2000 Spectrophotometer der Firma Nanodrop-Technologies zum Einsatz. Unreinheiten reduzieren die Effektivität der reversen Transkription und in der Folge der RNA Amplifikation.

#### **4.5.2 RNA Integrität**

Die Integrität der RNA bzw. der Anteil der sogenannten full-length RNA ist ein weiterer bedeutender Faktor der RNA Qualität. Die reverse Transkription von partiell unterbrochener mRNA generiert typischerweise relativ kurze cDNA Stücke, so dass Teile der kodierenden Regionen verloren gehen können.

#### **4.5.3 Input RNA Qualität**

Für Experimente, bei denen der cRNA Ertrag aus verschiedenen Proben verglichen werden soll, ist es essentiell, die Menge an input RNA genau zu bestimmen. Wir verwendeten zur schnellen und akkuraten Quantifizierung das NanoDrop 1000A Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

#### **4.5.4 Reaktions- und Inkubationszeiten**

Die meisten Inkubationszeiten für enzymatische Reaktionen sind in Verbindung mit den Kitreagenzien bereits optimiert, um den maximalen Ertrag an Nukleinsäureprodukten sicherzustellen. Die einzige Ausnahme stellt die in vitro Transkriptionsreaktion (IVT) dar, bei der Inkubationszeiten von 4-14 Stunden möglich sind. Um allerdings einen vergleichbaren cRNA Ertrag aus verschiedenen Proben zu erhalten, wurde die Zeit im Verlauf der Experimente (in unserem Fall 8 Stunden) nicht verändert.

#### **4.5.5 Verwendung von Master Mixen**

Die Verwendung von vorgefertigten Master Mixen reduziert Pipettierfehler, spart Zeit und erhöht somit die Reproduzierbarkeit. Dies ist insbesondere wichtig, wenn der cRNA Ertrag aus verschiedenen Gewebeproben verglichen werden soll.

#### **4.5.6 Gründliches Durchmischen**

Das gründliche Mischen der einzelnen Kitkomponenten ist ebenfalls für die Reproduzierbarkeit wichtig. Jede Einzelkomponente wurde deshalb nach dem Auftauen gut geschüttelt und bis auf Raumtemperatur erwärmt. Die Master Mixturen mussten vorsichtig so lange gerührt

werden, bis eine homogene Masse entstand, um eine vorzeitige Enzyminaktivierung zu verhindern. Nach Zugabe der Reagentien wurden diese mindestens zwei- bis dreimal nachpipetiert, um auch Reagentienreste an der Spitze auszuspülen. Anschließend wurde das Röhrchen mehrfach geschüttelt und umgehend mit dem Zentrifugieren begonnen.

#### **4.5.7 Verwenden von Thermalzentrifugen**

Die gesamte Illumina® RNA Verstärkungsprozedur ist sehr temperaturempfindlich. Schwankende oder ungenaue Inkubationstemperaturen können die RNA Synthese stark limitieren. Die vorgesehene Temperatur sollte bereits erreicht sein, bevor die Reagenzröhrchen in den Inkubationsblock gesetzt werden. Zu hohe Temperaturen behindern die Reaktionen, während zu niedrige Temperaturen Kondensation verursachen, was letztendlich das Mischungsverhältnis der Reagentien verändert und damit den Ertrag deutlich verringert.

#### **4.5.8 Präparation der Wasch-Puffer-Lösung**

Die Wasch-Puffer-Lösung wurde durch Hinzufügen von 24 ml 100% igem Ethanol fertiggestellt, anschließend gut geschüttelt und sofort markiert, um anzuzeigen, dass Ethanol bereits zugesetzt ist.

### **4.6 Reverse Transkription zur Synthese von einsträngiger cDNA**

**4.6.1** Der erste Schritt bestand im Einbringen von maximal 11 µl total-RNA in ein steriles, antihaftbeschichtetes und RNase freies 0,5 ml Mikrozentrifugalröhrchen. Gegebenenfalls wurden die Proben mit nukleasefreiem Wasser bis 11 µl aufgefüllt.

**4.6.2** Danach wurde bei Raumtemperatur der Reverse Transkription Master Mix in einem nukleasefreien Röhrchen vorbereitet. Dieser Master Mix enthielt 1µl T7 Oligo(dT) Primer, 2µl Puffer, 4µl dNTP Mix, 1µl RNase Inhibitor und 1µl ArrayScript. Der Inhalt wurde gut gemischt, anschließend kurz zentrifugiert (ca. 5 sec), um den Mix am Boden des Röhrchens zu sammeln und danach auf Eis zwischenzulagern.

Nun wurden 9 µl des Reverse Transkription Master Mix zu jeder RNA Probe hinzugefügt und durch mehrfaches Pipettieren durchmischt. Anschließend wurde die gesamte Probe in die Thermalzentrifuge gegeben.

**4.6.3** Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei 42 °C. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut für ca. 5 Sekunden zentrifugiert, um das gesamte Reaktionsgemisch am Boden des Röhrchens zu sammeln. Bis zur Synthese der zweisträngigen DNA konnten die Röhrchen auf Eis zwischengelagert werden.

## **4.7 Synthese der zweisträngigen DNA**

**4.7.1** Bei diesem Schritt musste zunächst der Second Strand Master Mix in nukleasefreiem Wasser vorbereitet werden. Dieser Mix enthielt 63 µl nukleasefreies Wasser, 10 µl 10x second strand buffer, 4 µl dNTP Mix, 2 µl DNA- Polymerase und 1 µl RNase H. Das Röhrchen wurde anschließend gut gemischt und für ca. 5 Sekunden zentrifugiert, um den Mix am Boden des Röhrchens sammeln zu können.

Nun wurden 80 µl des Second Strand Master Mix zu jeder Probe zugegeben, kräftig durch mehrfaches Pipettieren durchmischt und unverzüglich in die Thermalzentrifuge gegeben.

**4.7.2** In der Zwischenzeit wurde die Zentrifuge vorgekühlt, um die Proben bei einer Temperatur von 16°C für 2 Stunden zu inkubieren.

**4.7.3** Nach dieser Inkubation konnten die Proben entweder nach Lagerung auf Eis innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet oder bei -20°C tiefgefroren werden.

## **4.8 cDNA Reinigung**

**4.8.1** Zur Reinigung der cDNA wurde nun jeder Probe 250 µl cDNA binding buffer zugegeben, das Gemisch gründlich geschüttelt, mehrfach pipettiert und kurz anzentrifugiert, um das Reaktionsgemisch danach am Boden des Röhrchens aufnehmen zu können.



**4.8.2** Das so erzeugte cDNA Proben- cDNA binding buffer Gemisch wurde in die Mitte der Filterkartusche abpipettiert, anschließend für eine Minute, mindestens aber solange, bis das gesamte Gemisch den Filter passiert hatte, bei 10000 x g zentrifugiert.

**4.8.3** Nach diesem Filtrvorgang wurden 500 µl Waschpuffer in jede cDNA Filterkartusche gegeben und ebenfalls für mindestens eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert.

**4.8.4** Zum Abschluss der cDNA Reinigung wurden dann 20 µl nukleasefreies und auf 55°C erwärmtes Wasser auf den Filter der cDNA Filterkartusche aufgebracht. Nach einer Ruhezeit von 2 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Die zweisträngige DNA befand sich danach im Überstand (ca. 17,5 µl). Die so gereinigte cDNA konnte - wenn nötig - über Nacht bei -20°C gelagert werden.

#### **4.9 In vitro Transkription (IVT) zum Synthetisieren von cRNA**

**4.9.1** Zur in vitro Transkription von cRNA aus cDNA wurde ein Volumen von 17,5 µl cDNA in ein PCR-Röhrchen gefüllt. Anschließend bereiteten wir bei Raumtemperatur den IVT Master Mix in einem nukleasefreien Röhrchen vor. Für eine einzelne 25µl Reaktion wurden 2,5µl T7 10X Reaktionspuffer, 2,5µl T7 Enzym Mix sowie 2,5µl Biotin NTP Mix durch langsames Rühren vermischt, danach für maximal 5 Sekunden anzentrifugiert, so dass der fertige Master Mix am Boden des Röhrchens aufgenommen und auf Eis zwischengelagert werden konnte.

Jeder cDNA Probe wurden nun 7,5 µl IVT Master Mix zugesetzt, das Gemisch zwei- bis dreimal pipettiert, das Röhrchen geschüttelt, erneut kurz zentrifugiert, um das Reaktionsgemisch am Boden des Röhrchens aufzunehmen. Dieses Gemisch wurde umgehend in die Thermalzentrifuge gegeben und diese dann gestartet.

**4.9.2** Die empfohlene Inkubationszeit der IVT Reaktion ist abhängig von der Menge der input RNA, die bei der Verstärkungsreaktion benutzt wurde. Bei der von uns verwendeten input RNA Mengen von 200 ng wurde für 8 Stunden bei 37 °C inkubiert.

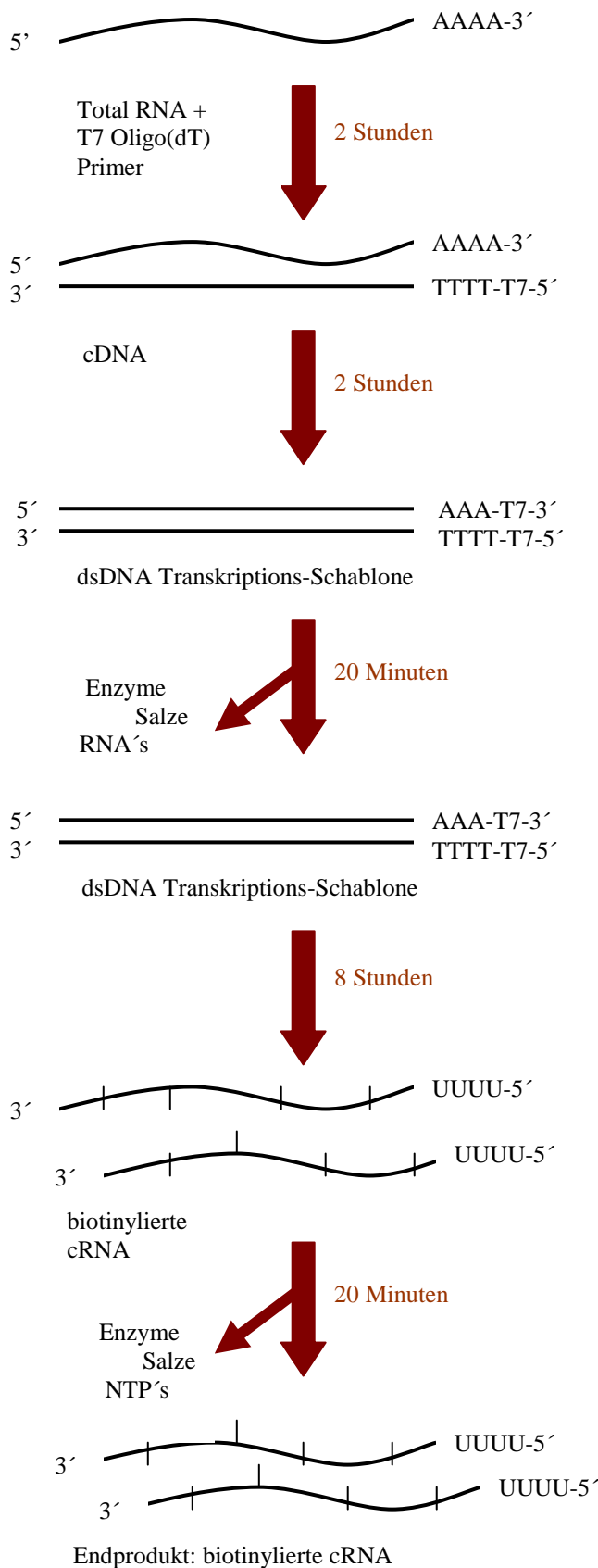
**4.9.3** Die Reaktion wurde nach 8 Stunden durch Hinzufügen von 75 µl nukleasefreiem Wasser zu jeder cRNA Probe gestoppt. Damit wurde ein Endvolumen von 100 µl erreicht. Wenn nötig, konnte das Produkt nach diesem Schritt bei -20°C gelagert werden.

## **4.10 cRNA Reinigung**

**4.10.1** Zu den 100 µl aus der IVT Reaktion wurden 350 µl binding buffer gefüllt, um anschließend 250 µl 100 %- iges Ethanol hinzuzufügen.

**4.10.2** Das so erzeugte Reaktionsgemisch wurde abpipettiert und in die Mitte der cRNA Filterkartusche gefüllt, um es dann für eine Minute, mindestens aber bis das Gemisch den Filter vollständig passierte, bei 10.000 x g zu zentrifugieren. Anschließend wurden 650 µl Wasch Puffer Lösung in jede cRNA Filterkartusche gefüllt und für mindestens eine Minute bei 10000 x g zentrifugiert.

**4.10.3** Die Proben wurden zum Abschluss bei 55°C für 10 Minuten inkubiert, nachdem 200 µl und auf 55°C vorgewärmtes nukleasefreies Wasser in das Zentrum der Filterkartusche gefüllt wurden. Nach der letzten Zentrifugation für mindestens 90 Sekunden bei 10000 x g befand sich die cRNA dann im cRNA-Sammelröhrchen in ca. 200 µl nukleasefreiem Wasser.



### Reverse Transkription zur Synthese von einsträngiger cDNA

1. RNA Proben in 11 µl nukleasefreies Wasser geben.
2. 9 µl Reverse Transcription Master Mix zusetzen.
3. 2 Stunden bei 42°C inkubieren.

### Synthese der zweisträngigen cDNA

1. Jeder Probe 80 µl Second Strand Master Mix zusetzen.
2. 2 Stunden bei 16°C inkubieren.

### cDNA Reinigung

1. Jeder Probe 250 µg cDNA binding Puffer hinzufügen.
2. Filtern der Mixtur durch die cDNA Filterkartusche
3. Waschen mit 500 µl Wasch Puffer
4. Auswaschen der cDNA mit 20 µl mit 55°C warmem nukleasefreiem Wasser

### In vitro Transkription zur Synthese von cRNA

1. Zugabe von IVT Master Mix zu jeder Probe – gut mischen.
2. 8 Stunden bei 37°C inkubieren
3. Jeder Probe 75 µl nukleasefreies Wasser zusetzen.

### cRNA Reinigung

1. Zugabe von 350 µl binding Puffer zu jeder Probe
2. Zugabe von 250 µl Ethanol – 3-maliges Pipettieren zum Mischen
3. Einbringen in cRNA Filter
4. Waschen mit 650 µl Waschlösung
5. Auswaschen der cRNA mit 200 µl und 55°C warmem nukleasefreiem Wasser

**Abbildung 1:** Überblick über die RNA Verstärkungsprozedur (modifiziert nach: Illumina® Total Prep Amplification Kit, Revision C, 2009)

## **4.11 Weiterverarbeitung der biotinylierten Proben – cRNA**

### **4.11.1 Allgemeine Vorbemerkungen**

Das Hybridisieren, Färben und Waschen der Microarrays erfolgte nach dem Gene Expression on Sentrix® Arrays Direct Hybridization System Manual der Firma Illumina® (San Diego, CA, USA). Für die Hybridisierung auf Human HT-12v3 Expression BeadChips (Illumina®, San Diego, CA, USA) wurden 750 ng biotinylierte cRNA eingesetzt. Dieser Chip besteht aus 12 Arrays mit jeweils mehr als 48000 Transkripten. Die Hybridisierung fand unter vorsichtigem Wippen für 16 h bei 58°C im Hybridisierungssofen der Firma Illumina® statt. Nach Wegwaschen ungebundener cRNA wurde in der anschließenden Färbung der an Streptavidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (FluoroLink® Cy3, GE Biosciences) über Streptavidin am Biotin der hybridisierten cRNA gebunden. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Bead Chips getrocknet und das Fluoreszenzsignal über den BeadArray Reader 500 X (Illumina®, San Diego, CA, USA) gescannt. Bei der Durchführung wurde im Einzelnen wie folgt verfahren:

### **4.11.2 Hybridisierung der Microarrays**

Zunächst wurden 1,5µg der biotinylierten Proben -cRNA mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt (bereits voraliquotiert). Dann wurden 20µl HYB Hybridisierungspuffer zu jeder Probe pipettiert, das Gemisch gevortext und dieser Ansatz bei 65°C für 5 Minuten im Thermomixer comfort der Firma Eppendorf® (Hamburg, Deutschland) zur maximalen Entfaltung der cRNA inkubiert. Währenddessen wurden die Hybridisierungskammern durch Einlegen der Chip-Halterungen sowie Zugabe von jeweils 100 µl des HCB-Befeuchtungspuffers in die vorgesehenen Befeuchtungskammern vorbereitet. Nach Inkubation der Proben erfolgten erneut kurzes Vortexen und eine kurze Zentrifugation sowie nach Abkühlung auf Raumtemperatur die Befüllung der jeweiligen Arraytasche mit 30µl der vorbereiteten Probe. Es wurden jeweils 6 Proben in einem Durchgang bearbeitet und nach Beladung aller Arrays die Hybridisierungskammer dicht und sicher verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 58°C für 16 h unter gleichmäßigem Wippen auf mittlerer Geschwindigkeitsstufe (Stufe 5) im Hybridisierungssofen der Firma Illumina®.

#### 4.11.3 Waschen, Färben und Trocknen der hybridisierten Microarrays

Die Chips wurden einzeln aus der Hybridisierungskammer entnommen und in einer Küvette, welche mit 250 ml E1BC Waschpuffer befüllt wurde, mit der Arrayoberfläche nach oben untergetaucht. Anschließend wurde beim vollständig untergetauchten Chip die Folie abgezogen und der Chip in eine ebenfalls mit 250 ml E1BC Puffer befüllte Färbeküvette überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen der Chiphalterung wurde die ungebundene Probe abgespült. Dieser Vorgang wurde für alle Chips einer Hybridisierungskammer wiederholt. Es folgte zunächst eine Inkubation für 10 min mit 55°C vorgeheiztem High-Temperature Wash Buffer im SciGene Hybex™ Microsample Incubator (SciGene, Sunnyvale, CA, USA). Anschließend fand ein Waschvorgang in 250 ml frischem E1BC-Puffer auf dem Kreisschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instrumente GmbH, Schwabach, Deutschland) bei höchster Geschwindigkeitsstufe statt. Zur Präzipitation noch ungebundener Nukleinsäuren erfolgte ein Waschschrift in 250 ml 100% Ethanol für 10 min auf dem Kreisschüttler, welchem ein letzter E1BC-Waschschrift mit 2-minütiger Inkubation auf dem Kreisschüttler folgte. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde vor der Fluoreszenzfärbung ein Blockschrift durchgeführt. Hierzu wurden die Chips einzeln mit der Arrayoberfläche nach oben gerichtet, zusammen mit dem Blockpuffer E1 in kleine Plastikschälchen gegeben und auf dem Schüttler (Skyline Shaker DRS-12, ELMI, Rose Scientific Ltd., Cincinnati, Ohio, USA) bei mittlerer Stufe für 10 min hin und her gewippt. Dabei bedeckte der Puffer immer die Arrayoberfläche. Im nachfolgenden Färbeschrift wurden die Chips in gleicher Weise einzeln in neue Plastikschälchen, welche mit 2,5 ml Blockpuffer E1 und 2,5 µl Streptavidin Cy3 befüllt waren, überführt. Die zum Schutz vor Lichteinstrahlung abgedeckten Schälchen wurden für 5 min auf dem Schüttler bei mittlerer Stufe hin und her gewippt.

Nach diesem Färbeschrift wurde ungebundenes Streptavidin-Cy3 während eines erneuten gemeinsamen Waschschriftes in 250ml E1BC Waschpuffer für 5 min auf dem Kreisschüttler weggespült. Das Trocknen der Arrays erfolgte während einer Zentrifugation bei 280 x g für 4 Minuten. Anschließend wurden die Chips bis zur weiteren Auswertung im Dunkeln gelagert und innerhalb von 6 Stunden ausgelesen.

## 4.12 Auswertung der Microarrays

Diese Studie umfasst 16 RNA-Proben (8 Patienten) aus humanem Herzgewebe sowie eine interne RNA-Kontroll-Probe. Zur Identifizierung transkriptomischer Signaturen wurden die Proben auf zwei HumanHT-12v3 Expression BeadChips hybridisiert, wobei ein Chip aus 12 Arrays mit jeweils mehr als 48000 Transkripten besteht. Die Proben wurden basierend auf der NCBI RefSeq Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) und der Unigene Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) selektiert.

### 4.12.1 Einlesen der Daten

Nach dem Färben, Waschen und Trocknen wurden die Arrays mit einem Beadarray Reader 500X (Illumina®, San Diego, CA, USA) gemäß dem „Illumina® Whole Genome Gene Expression for BeadStation Manual v3.2, Revision A“ gescannt. Die Rohdaten wurden mittels des Bioconductor-Paketes lumi (Du et al., 2007) extrahiert. Dieses erlaubt, neben dem Einlesen der Rohdaten, auch die von Illumina® mitgelieferten Annotationsdaten einzufügen (BeadStudio Users Guide. Data Analysis Software for Use with Illumina® Gene Expression Products. Doc. #111 7 9632 Rev.B).

Array	Chip.ID	Probe	Gruppe	Amplifikation	Hybridisierung
1	4493594486_A	6	vor	11.12.2008	03.02.09
2	4493594486_B	6	nach	11.12.2008	03.02.09
3	4493594486_C	16	vor	11.12.2008	03.02.09
4	4493594486_D	16	nach	11.12.2008	03.02.09
5	4493594486_E	18	vor	11.12.2008	03.02.09
6	4493594486_F	18	nach	11.12.2008	03.02.09
7	4493594486_G	19	vor	11.12.2008	03.02.09
8	4493594486_H	19	nach	11.12.2008	03.02.09
9	4493594486_I	20	vor	11.12.2008	03.02.09
10	4493594486_J	20	nach	11.12.2008	03.02.09
11	4493594486_K	21	vor	11.12.2008	03.02.09
12	4493594486_L	21	nach	11.12.2008	03.02.09
13	4493594437_A	15	vor	11.12.2008	03.02.09
14	4493594437_B	15	nach	11.12.2008	03.02.09
15	4493594437_C	17	vor	11.12.2008	03.02.09
16	4493594437_D	17	nach	11.12.2008	03.02.09
17	4493594437_E	human uni-RNA		11.12.2008	03.02.09

**Tabelle 2:** Verteilung der Proben auf den BeadChips.

#### 4.12.2 Normierung

Aufgrund unterschiedlicher Farbstoffeffizienz und Variationen bei der Probenbearbeitung und Probenmarkierung können die Fluoreszenzintensitäten in der Regel nicht direkt miteinander verglichen werden. Durch geeignete Modelle wird dieser systemische Fehler korrigiert (Normierung). Wir wendeten eine Varianzstabilisierende Transformation an (Huber et al., 2002), womit eine Datei generiert wird, welche die normierten Daten, die detection p-Werte, Sondensequenzen und weitere Annotationsdaten (von Illumina® zum BeadChip mitgeliefert) enthält.

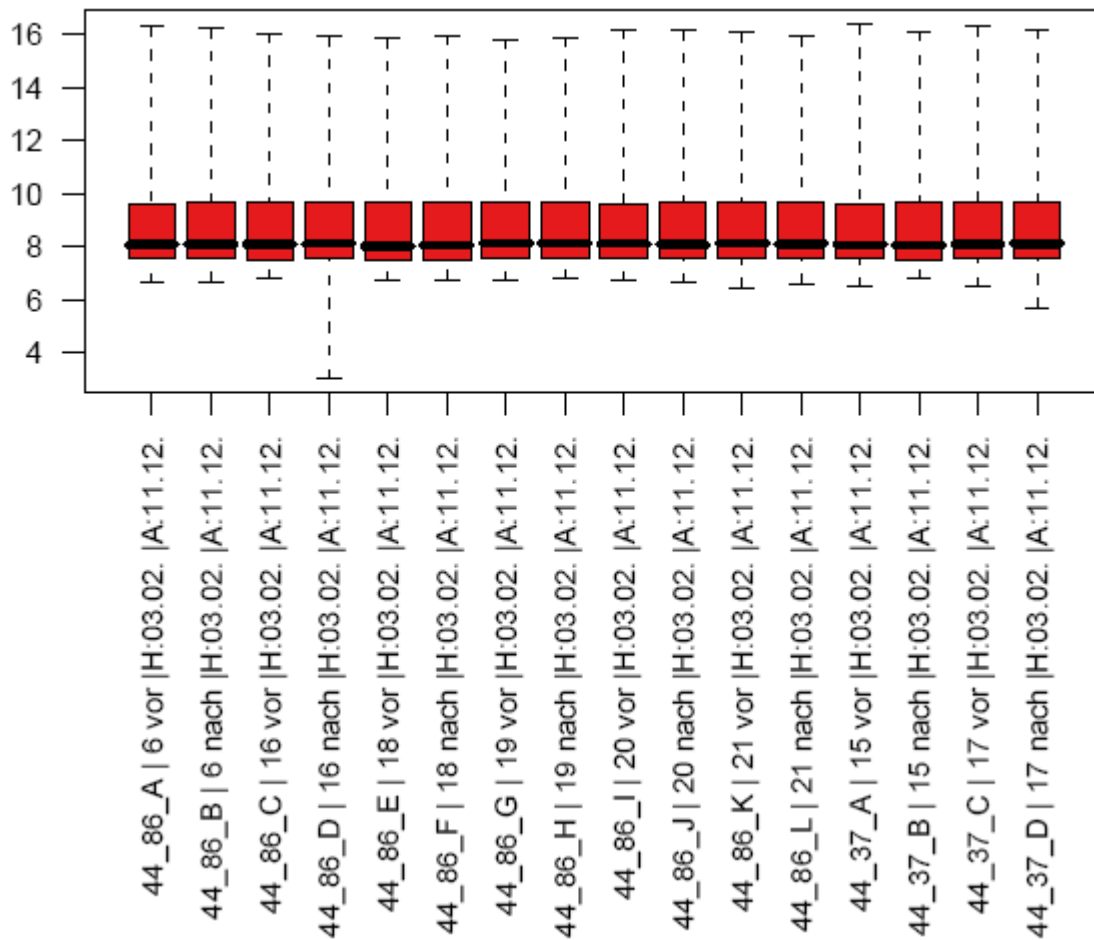
Desweiteren wurden die Mittelwerte für die beiden Gruppen sowie der Fold change zwischen den Gruppen berechnet. Der Fold change gibt eine relative Änderung der Genexpression zwischen 2 Gruppen an. Er berechnet sich durch: Mittelwert (Expression Gruppe 1)/Mittelwert (Expression Gruppe 2). Bei einem Fold change von 1 ist die Expression in beiden Gruppen gleich. Bei einem Fold change von 2 ist die Expression in Gruppe 1 doppelt so hoch wie in Gruppe 2, während die Expression von Gruppe 2 bei einem Fold change von -2 doppelt so hoch ist wie in Gruppe 1.

#### 4.12.3 Qualitätskontrolle der normierten Daten

##### 4.12.3.1 Box- und Whiskerplots

Zur Qualitätskontrolle der normierten Daten wurden Bead-Typen mit einem detection p-Wert von mindestens  $< 0,01$  selektiert. Der detection p-Wert wurde anhand negativer Kontrollen berechnet und weist darauf hin, ob ein detektiertes Signal signifikant höher als der Hintergrund ist (siehe Abschnitte 6.14 – 6.16 in Bead Studio Users Guide. Data Analysis Software for Use with Illumina Expression Products. Doc. # 11179632 Rev. B.14, Illumina® 2005).

Die Expression der normierten Daten kann dann mittels Box- und Whiskerplots dargestellt werden. Die nachfolgende Abbildung zeigt, dass die Signalvariation nach der Normierung zwischen den Arrays homogen ist.

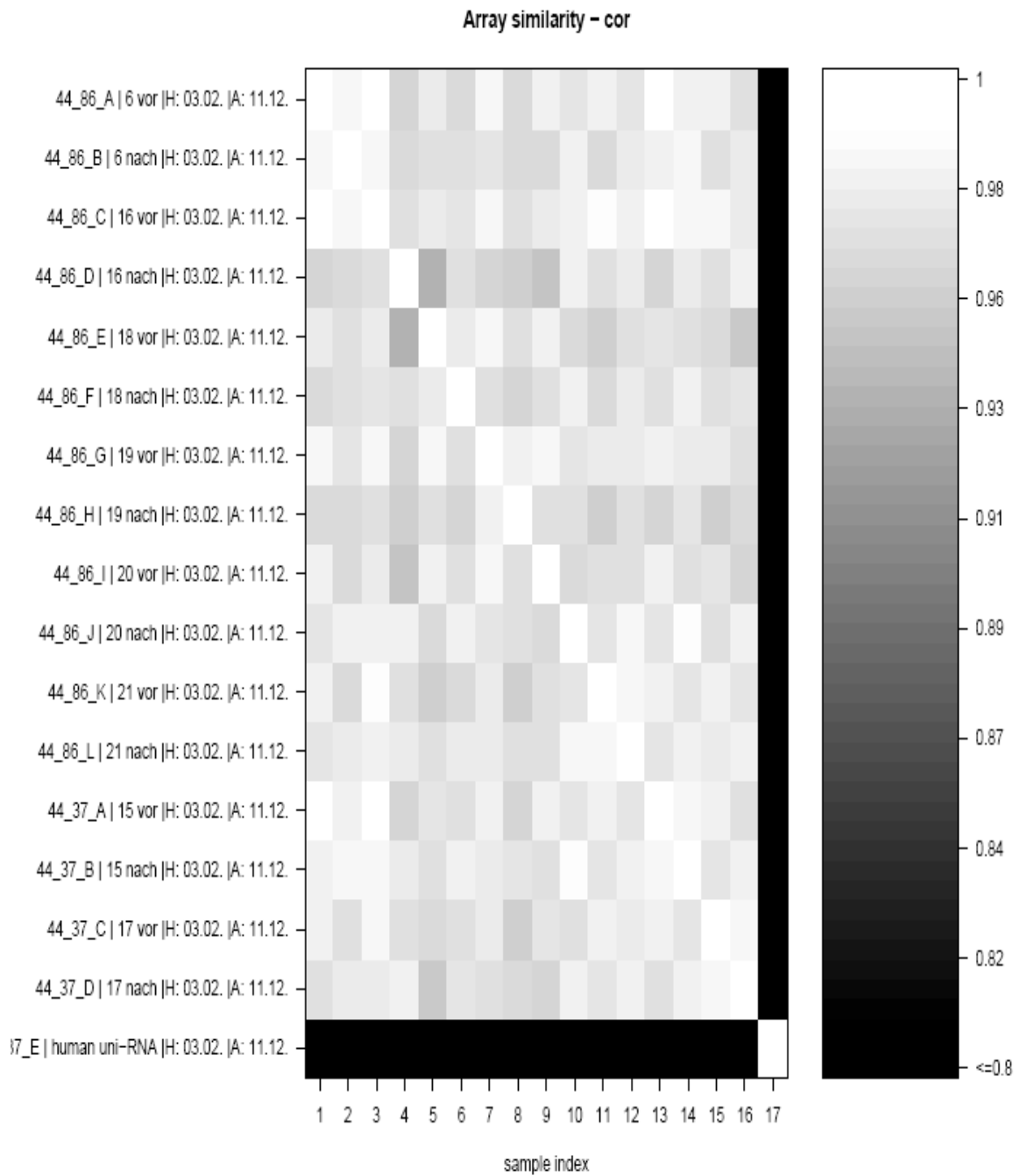


**Abbildung 2 :** Box- und Whiskerplots der Expression der normierten Arrays pro untersuchter Probe

#### 4.12.3.2 Ähnlichkeitsmatrix

Im nächsten Schritt wurde eine Ähnlichkeitsanalyse mit Hilfe einer Ähnlichkeitsmatrix generiert. In dieser wird die Ähnlichkeit der Arrays über ihre (paarweise) Korrelation dargestellt. Weiße Flächen indizieren eine hohe, schwarze Flächen eine niedrige Ähnlichkeit (Korrelation) zwischen den Arrays. Dunkle Streifen erscheinen, wenn einzelne Arrays von der Gruppe abweichen (Ausreißer). Für die Darstellung wurde die Funktion `corplot` des R-Paketes `SLmisc` (Kohl, 2007) verwendet.





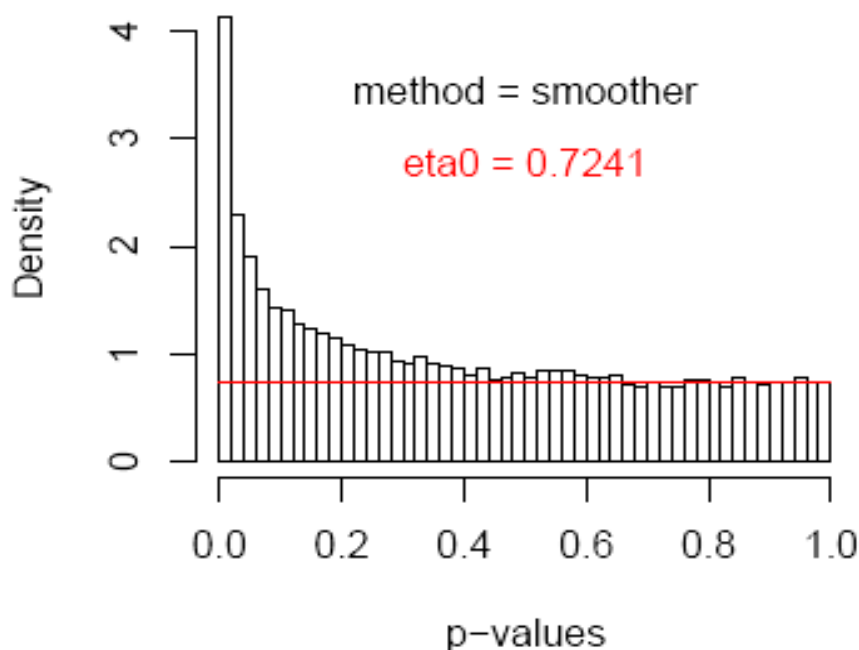
**Abbildung 3:** Ähnlichkeitsmatrix der normierten Daten

Die minimale Korrelation beträgt 0,959. Es sind keine Ausreißer oder technische Effekte zu erkennen.

#### 4.12.4 Statistische Analyse

Mit Hilfe eines gepaarten t-Testes wurde überprüft, ob sich die Proben vor der Ischämie gegenüber den Proben, die nach Ischämie und Reperfusion entnommen wurden, hinsichtlich der Expression signifikant voneinander unterscheiden. Der t-Test wurde für alle Sonden durchgeführt.

Das folgende Histogramm zeigt die Verteilung der p-Werte.

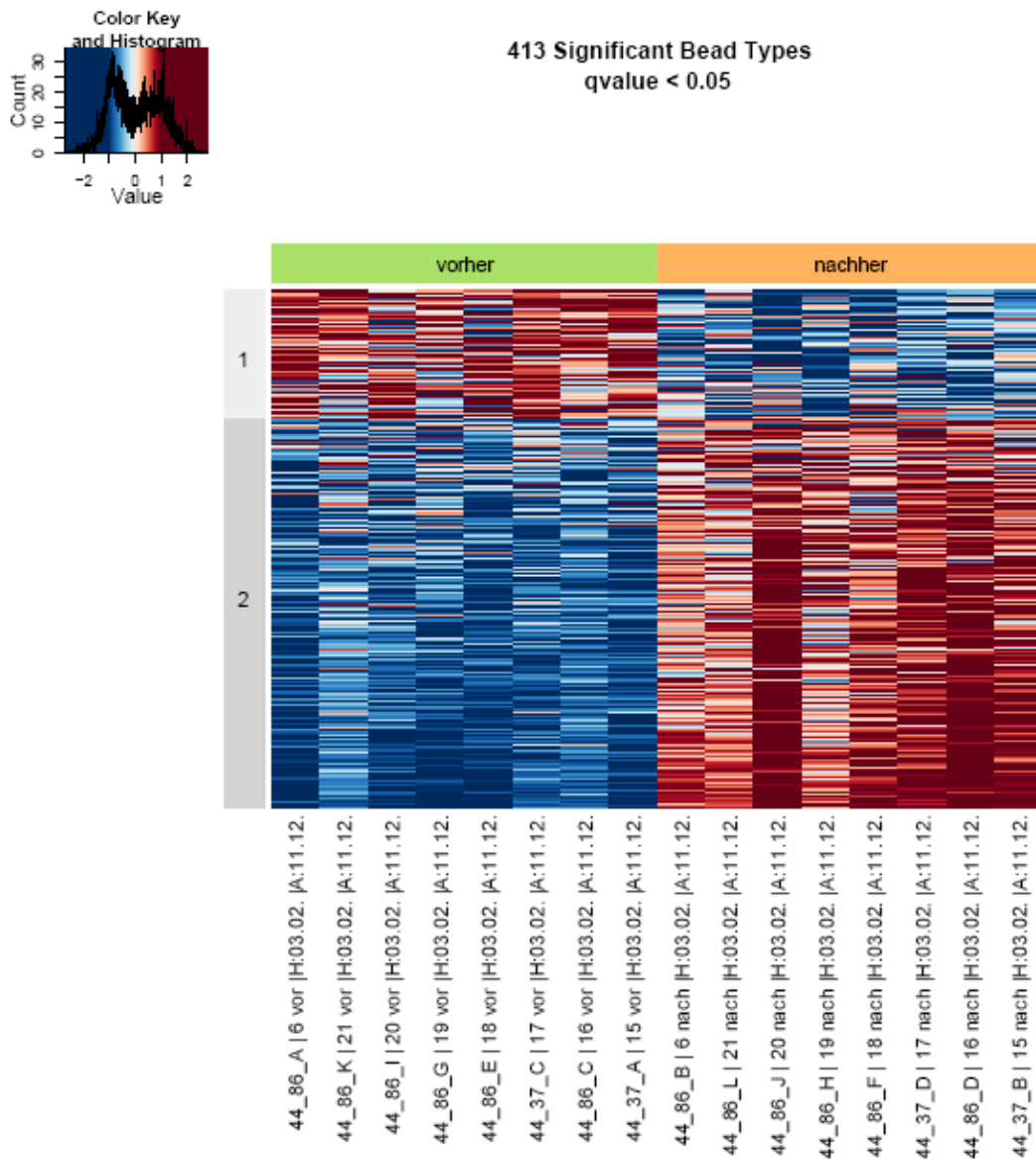


**Abbildung 4:** Verteilung der p-Werte

Es ist zu erkennen, dass es differentiell exprimierte Sonden gibt, da die Verteilung von der Gleichverteilung mit dem Intervall  $[0, 1]$  abweicht. Der Wert  $\eta_0$  (72,41 %) gibt den prozentualen Anteil der unveränderten Bead-Typen an.

Um die Expressionsprofile der Sonden darzustellen, die signifikante Unterschiede im Expressionsleveln in Abhängigkeit von der Ischämie aufweisen, wurden sogenannte heatmaps verwendet. Ein Clustering der Sonden wurde nicht durchgeführt, da sich die Sonden bei 2 Gruppen maximal in 2 Cluster (Expression nach vs. vor Ischämie runter- oder hochreguliert) einordnen lassen. Deshalb wurden die Sonden anhand ihres Fold changes sortiert.

Die assoziierten Farben repräsentieren die varianznormierten Expressionswerte der gewählten Sonden. Während die Intensität der roten Farbe angibt, dass die relative Expression höher als die mittlere Expression ist, bedeutet blau eine geringere Expression im Vergleich zum Mittelwert.



**Abbildung 5:** Darstellung der Ergebnisse aller 413 Sonden in einem heatmap.

Die Gene sind in den Zeilen und die Proben in den Spalten angeordnet. Im ersten Cluster (102 Sonden) ist die Expression der Sonden nach der Ischämie gegenüber dem Ausgangszustand herunterreguliert. Im zweiten Cluster (311 Sonden) ist die Expression nach der Ischämie gegenüber dem Ausgangszustand hochreguliert.

## 5. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 16 Gewebeproben aus dem rechten Vorhof von 8 Patienten mit einer koronaren Dreifäßerkrankung im Rahmen einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation entnommen. Es handelte sich um männliche Patienten im Alter von  $63,86 \pm 8,19$  Jahren ohne relevante Komorbiditäten (siehe Ausschlusskriterien) und einem BMI (body mass index) von  $29,11 \pm 3,29$  kg/m<sup>2</sup>. Die Gesamtoperationsdauer (Schnitt-Naht) betrug  $184,21 \pm 19,27$  Minuten. Dem  $46,31 \pm 7,81$  Minuten dauernden kardioplegischen Herzstillstand schloss sich eine Reperusionszeit von  $29,29 \pm 4,34$  Minuten an. Es wurden  $3,82 \pm 0,84$  Bypasses pro Patient angelegt. Es traten keine perioperativen Infarkte oder postoperative Todesfälle auf.

Die Untersuchungen zur pangenomischen Genexpression wurde nach dem Gene Expression on Sentrix® Arrays Direct Hybridization System Manual der Firma Illumina® (San Diego, CA, USA) durchgeführt. Es konnten Genexpressionsprofile von insgesamt 413 differentiell exprimierten Genen erstellt werden.

Gemessen wurde der Fold change, der eine relative Änderung der Genexpression zwischen 2 Gruppen - in unserem Fall vor (Gruppe 1) vs. nach (Gruppe 2) Ischämie und Reperfusion - beschreibt. Die Expressionswerte wurden vsn-normiert und liegen logarithmiert vor. Der Fold change berechnet sich durch Division des Mittelwertes (Expression Gruppe 1) geteilt durch den Mittelwert (Expression Gruppe 2). Bei einem Zahlenwert von 1 ist die Expression in beiden Gruppen als gleich anzusehen. Bei einem Fold change von 2 ist die Expression in der Gruppe 1 gegenüber der Gruppe 2 um das 2-fache erhöht. Analog dazu ist die Expression bei einem Zahlenwert von -2 in der Gruppe 2 gegenüber Gruppe 1 um das 2-fache erhöht. Von einer statistisch signifikanten Überexpression ist ab einem Fold change  $>4$  auszugehen (Rajeevan et al., 2001; Ruel et al., 2003; Victor et al., 2005).

Bei unseren eigenen Untersuchungen konnten von den 413 differentiell exprimierten Genen 311 Gene mit einem Fold change  $>2$  detektiert werden. Davon waren 50 Gene mit einem Fold change von  $>4$  signifikant überexprimiert, während insgesamt 102 Gene mit negativem Fold change zwischen 0 und  $-1,85$  supprimiert waren.

**5.1 Überexprimierte Gene des Vorhofmyokards ( **Fold change** >4) beim Vergleich nach vs. vor kardioplegischem Herzstillstand und Reperfusion**

<b>Nr.</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>Symbol</b>	<b>Fold change</b>	<b>Funktion</b>
<b>1.1</b>	FBJ murine osteosarkoma viral oncogene homolog B	FOS B	62,78	Kodiert Zipperproteine, die mit Proteinen der JUN-familie dimerisieren und den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden
<b>1.2</b>	v-FOS FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	15,69	Proapoptotischer Transkriptionsfaktor
<b>2.1</b>	interleukin 6	IL 6	52,54	1.Leukozytenstimulierender Faktor 2.Aktivator der Akut-Phase-Proteine
<b>2.2</b>	interleukin 8	IL 8	50,74	Vermittelt neutrophile Chemotaxis und Migration
<b>2.3</b>	interleukin 1, beta	IL1B	7,01	Zytokin (Entzündungsmediator)
<b>3</b>	activating transcription factor 3	ATF 3	24,55	Transkriptionsfaktor (u.a. protektive Effekte bei Ischämie)
<b>4.1</b>	nuclear receptor subfamily 4 group A, member 2	NR4A 2	22,45	1.Transkriptionsfaktor 2.antiapoptotische Effekte
<b>4.2</b>	nuclear receptor subfamily 4 group A, member 3	NR4A3	10,45	1.Atheroprotektiv 2.Antiapoptotische Effekte
<b>4.3.</b>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NR4A1	4,76	1.Atheroprotektiv 2.Apoptoseinduktion
<b>5.1</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	16,29	1.Chemotaktischer Faktor für Monozyten 2.Angiogenesefaktor
<b>5.2</b>	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	8,25	Chemotaktischer Faktor für Monozyten
<b>5.3</b>	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	CCL3L3	4,58	Chemotaktischer Faktor für Monozyten

<b>Nr.</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>Symbol</b>	<b>Fold change</b>	<b>Funktion</b>
<b>5.4</b>	chemokine (C-C motif) ligand 8	CCL8	4,41	Zytokin
<b>6.1</b>	regulator of G-protein signalling 1	RGS1	13,97	Negative Regulation von G-Proteinen
<b>6.2</b>	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	RGS2	4,17	Kodiert G-Protein, Mutationen mit art. Hypertonie assoziiert
<b>7.1</b>	early growth response 2	EGR2	12,65	Proapoptotischer Transkriptionsfaktor (Typ C2H2 Zinkfinger)
<b>7.2</b>	early growth response 1	EGR1	11,23	1.Tumorsuppressor 2.Mitwirkung bei endothelialer Zellmigration und Proliferation
<b>7.3</b>	early growth response 3	EGR3	4,02	Vermittlung der VEGF-induzierten Angiogenese
<b>8.1</b>	zinc finger protein 36, C3H type, homolog	ZFP36	12,42	Interferiert mit TNF alpha Produktion - Bestandteil des negativen Feedback-Loops
<b>8.2</b>	zinc finger protein 331	ZNF331	4,78	Onkogen
<b>9</b>	apolipoprotein L domain containing 1	APOLD1	11,54	Verge (vascular early response gene)
<b>10</b>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	11,26	Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese
<b>11</b>	SNF1-like kinase	SNF1LK	10,77	Regulation (Suppression) der CREB-Aktivität
<b>12.1</b>	Jun B proto-oncogen	JUNB	9,95	Proapoptotischer Transkriptionsfaktor (Zusammenspiel mit FOS)
<b>12.2</b>	Jun oncogene	JUN	6,36	Transkriptionsfaktor
<b>13</b>	solute carrier family 2, member 3	SLC2A3	9,15	HIF-1 gesteuerter Glucose-transporter , Expression bei Hypoglykämie und Hypoxie
<b>14</b>	v-myc myelomatosis viral oncogene homolog	MYC	9,10	Protoonkogen (immediate early gene, Sofortreaktion auf Stress)

<b>Nr.</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>Symbol</b>	<b>Fold change</b>	<b>Funktion</b>
<b>15</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	CDKN1A	8,77	Tumorsuppressorgen
<b>16</b>	cysteine-rich, angiogenetic inducer, 61	CYR61	8,33	Regulation von 1. Angiogenese 2. ECM (extracellular matrix) - Remodelling
<b>17</b>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	8,32	1. Überexpression bei Hypoxie (immediate early gene) 2. prometastatische Effekte
<b>18</b>	BTG family, member 2	BTG2	8,27	APRO (anti proliferatives) - Gen
<b>19</b>	Krüppel-like factor 4	KLF4	8,24	Zink-Finger-Transkriptionsfaktor
<b>20</b>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarkoma oncogen homolog F	MAFF	7,53	bZip Transkriptionsfaktor, Onkogen
<b>21</b>	family with sequence similarity 148, member B	FAM148B	7,52	Rolle bei der Inflammation, durch IL1beta und TNF alpha stimulierbar
<b>22</b>	selectin E	SELE	7,19	Fördert die Adhäsion von Leukozyten an zytokin-stimulierten Endothelzellen
<b>23</b>	oxidized low density lipoprotein receptor 1	OLR1	6,80	Steuert die Aufnahme von oxidiertem LDL in Endothelzellen
<b>24</b>	dual specific phosphatase 5	DUSP5	6,77	Gegenspieler von MAPK, durch p53 stimulierbar
<b>25</b>	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	6,38	Antiapoptotischer Transkriptionsfaktor
<b>26</b>	suppressor of cytokine signalling 3	SOCS3	6,21	Tumorsuppressorgen
<b>27</b>	cholesterol 25- hydroxylase	CH25H	5,59	Regulation des Cholesterol- und Lipidmetabolismus
<b>28</b>	thrombospondin 1	THBS1	5,47	1. Angiogeneseinhibitor 2. verstärkte Migration koronarer glatter Muskelzellen

<b>Nr.</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>Symbol</b>	<b>Fold change</b>	<b>Funktion</b>
<b>29</b>	tumor necrosis factor, alpha induced protein 3	TNFAIP3	4,97	Terminierung der NF-kappaB- und TNF Wirkung
<b>30</b>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	SGK1	4,73	1. Regulation zell.Antwort auf Stress 2. Förderung des Zellüberlebens 3. Steuerung der zellulären Glucoseaufnahme
<b>31</b>	immediate early response 3	IER3	4,64	Regulation von Zellwachstum und Apoptose
<b>32</b>	CCAAT/enhancer binding protein, delta	CEBPD	4,54	1. Transkriptionsfaktor 2. Regulation von Zellwachstum und Differenzierung
<b>33</b>	G-protein-coupled receptor 183	GPR183	4,50	G-Protein Rezeptor (bei EBV-infektion überexprimiert)
<b>34</b>	Rho family GTPase 1	RND1	4,31	(Re)organisation des Aktinzytoskeletts
<b>35</b>	tribbles homolog 1	TRIB1	4,23	Modulator von MAPK
<b>36</b>	GTP-binding protein	GEM	4,13	Signaltransduktion (G-Protein abhängig)
<b>37</b>	Ankyrin repeat domain 37	ANKRD37	4,12	Reaktion der Zelle auf Hypoxie ( bildet HIF-1)

**Tabelle 3:** Überexprimierte Gene des Vorhofmyokards ( **Fold change >4**) beim Vergleich nach vs. vor kardioplegischem Herzstillstand und Reperfusion



## 5.2 Funktion der überexprimierten Gene mit einem Fold change >4

### 5.2.1.1 FOSB (Fold change: 62,8; Synonyme: GOS3, GOSB, FosB; Chromosom: 19, Lokalisation: 19q13.32)

Die Fos Genfamilie besteht aus vier Genen: FOS, FOSB, FOSL1, FOSL2, die zu den sogenannten „immediate early genes“ gehören.

Das FOSB Gen kodiert dabei Leukin Zipperproteine mit helix-loop-helix Motiv, die mit Proteinen der JUN - Familie dimerisieren und dadurch den Transkriptionsfaktor AP-1 (activator protein-1) bilden. AP-1 ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, einschließlich Proliferation, Differenzierung, Wachstum, Apoptose, Zellmigration und Transformation beteiligt. AP-1 bindet sich sequenzspezifisch an Promotorregionen der Zielgene. Die Entscheidung, ob AP-1 ein Gen positiv oder negativ reguliert, ist abhängig von der Anwesenheit und Menge von Dimerisationspartnern, deren Zusammensetzung und Interaktion mit akzessorischen Proteinen (Vesely et al., 2009).

Außerdem spielt FOSB eine Rolle bei der Differenzierung von Megakaryozyten. Eine Downregulation von FOSB durch Zugabe von spezifischer shRNA blockiert die Ausbildung von CD41, einem spezifischen Oberflächenmarker von Megakaryozyten (Limb et al., 2009).

### 5.2.1.2 FOS (Fold change: 15,69; Synonyme: C-FOS, c-Fos; Chromosom: 14, Lokalisation: 14q24.3)

FOS ist ein immediate early gene, das bereits 5 Minuten nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder Mitogene exprimiert wird und seine maximale Expression nach etwa 30 Minuten erreicht (Curran et al., 1995).

Tierexperimentell konnte an isolierten Herzen von Ratten ein schneller mRNA Anstieg von FOS, JUN und EGR1 nach kardioplegischem Herzstillstand durch kalte Bretschneider Lösung und anschließender Reperfusion festgestellt werden (Aebert et al., 1997). Beim Menschen bewirkt die extrakorporale Zirkulation mit kardioplegischem Herzstillstand ebenfalls die Induktion der immediate early genes JUN und FOS. Allerdings unterscheiden sich die Expressionsmuster in der in situ Hybridisierung. Während die myokardiale FOS Expression diffus und

homogen verteilt ist, werden bei JUN Areale mit deutlich erhöhter Expression gefunden (Nelson et al., 2002).

**5.2.2.1 IL6** (Fold change: 52,5; Synonyme: Interleukin 6, HGF, HSF, BSF2, IL-6; Chromosom: 7, Lokalisation: 7p21)

Interleukin 6 gehört zu den Zytokinen, welche die Entzündungsreaktionen des Organismus regulieren und ist in der Abfolge der Entzündungskaskade dem Tumor Nekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) untergeordnet. IL-6 wird auf dem Chromosomenabschnitt 7p21 kodiert. Transkribiert wird ein zunächst inaktives Propeptid aus 212 Aminosäuren, von dem das 184 Aminosäuren lange aktive IL-6 abgespalten wird. Posttranslational werden unterschiedliche Isoformen durch alternatives Spleißen oder Glykolisierung erzeugt, deren biologische Bedeutung bislang nicht geklärt ist (Fischer et al., 2006).

IL-6 wird traditionell als Aktivator der Akute-Phase-Proteine und als Lymphozyten stimulierender Faktor angesehen. Dabei kann IL-6 als aktivierender Ligand an zwei verschiedene Rezeptortypen binden, zum einen an einen ausschließlich auf Leberzellen und Leukozyten vorkommenden Membran gebundenen IL-6 Rezeptor (IL-6R). Dieser gibt seine Signale mit Hilfe des Signal transduzierenden Glykoproteins gp130 weiter. Zum anderen kann er an einen löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) binden. Der so entstandene IL-6/sIL-6R-Komplex kann an Zellmembranen vieler Zelltypen binden. Voraussetzung für die Bindung ist das Vorhandensein des Glykoproteins gp130 in der Zellmembran. Dieser Vorgang (das sog. IL-6 trans-signaling) ist demnach wichtig für die zahlreichen Zellen, die zwar Gp130 (welches ubiquitär vorkommt), nicht aber IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Bei einer akuten Entzündungsreaktion wird der Entzündungsherd zunächst durch neutrophile Granulozyten infiltriert, die nach relativ kurzer Zeit absterben und durch spezifischere Entzündungszellen wie Lymphozyten oder mononukleäre Zellen ersetzt werden. Dabei steigt mit dem Grad der Infiltration durch neutrophile Granulozyten die lokale Konzentration von sIL-6R, was das IL-6 trans-signaling im umgebenden Gewebe auslöst. Dies führt wiederum zu einer Begrenzung der Akkumulation neutrophiler Granulozyten im entzündeten Gewebe und zur Anlockung von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, was letztlich den Übergang der angeborenen zur erlernten Immunantwort markiert (Jones et al., 2005).

Im Weiteren ist IL-6 sowohl durch pro- als auch antiapoptotische Wirkmechanismen an der Apoptose der Leukozyten beteiligt. Auf aktivierte T-Lymphozyten wirkt IL-6 antiapoptotisch,

während es bei B-Lymphozyten die Differenzierung und Proliferation sowie die Sekretion von Immunglobulin G (IgG) reguliert.

Interleukin 6 steigert (in absteigender Reihenfolge) die Sekretion von Kortison, Somatotropin, Glucagon und Adrenalin (Fischer et al., 2006).

#### **5.2.2.2 IL-8** (Fold change: 50,74; Synonyme: interleukin 8, CXCL8, Chromosom: 4, Lokalisation: q13-21)

Das Protein, das durch dieses Gen kodiert wird, ist ein Mitglied der CXC Chemokin Familie. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 4 in der CXC-Chemokin-Clusterregion auf dem Genlocus q13-21. Nach Abspaltung einer Signalsequenz von einem Präcursorprotein und weiteren extrazellulären Modifikationen entstehen verschiedene funktionsfähige Isoformen aus 69 bis maximal 79 Aminosäuren.

IL-8 wird insbesondere von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Als Entzündungsmediator ist dieses Zytokin bei der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, in das entzündete Gewebe involviert. Die wesentlichen biologischen Wirkungen von IL-8 auf Granulozyten sind, neben der Förderung der Chemotaxis, die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Granula, die über die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 vermittelt werden.

Darüberhinaus ist IL-8 ein Angiogenesefaktor und als solcher an der Bildung und Neubildung von kapillären Blutgefäßen beteiligt (Brat et al., 2005). Dies geschieht durch die Förderung der Migration von Endothelzellen in die Extrazellulärmatrix des Gewebes. Gleichzeitig wirkt IL-8 antiapoptotisch auf Endothelzellen und fördert deren Proliferation unter Bildung von Kapillarstrukturen (Li et al., 2003).

#### **5.2.2.3 IL1B** (Fold change: 7,01; Synonyme: interleukin 1 beta, IL-1, IL1F2, IL-1 BETA; Chromosom: 2, Lokalisation: 2q14)

IL1B gehört zur Interleukin-1-Familie und ist eines von vielen Interleukinen, welche insgesamt zu den Zytokinen (Entzündungsmediatoren) gezählt werden. Es wird zunächst ein durch Toll-like-Rezeptor-Agonisten stimuliertes, inaktives IL1B-Vorläuferprotein mit 266 Amino-

säuren transkribiert. Dieses Protein wird dann bei Bedarf in sekretorischen Lysosomen durch die Caspase-1 in seine aktive, 153 Aminosäuren starke Form prozessiert (Netea et al., 2009). IL1B wirkt auf 2 IL-1-Rezeptoren. Der Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (IL1R1) kommt auf allen Zellen vor und ist in seiner Expression kaum reguliert. Seine Aktivierung wird durch ein Gleichgewicht zwischen IL1B und dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL1Ra) reguliert. Erhöhte IL1Ra Level sind mit einem reduzierten koronaren Atheroskleroserisiko assoziiert (Olofsson et al., 2009). Der Interleukin-1-Rezeptor Typ 2 bindet ohne konsekutive Signaltransduktion an IL1B und trägt so ebenfalls dazu bei, die Interleukin-1 Wirkung zu begrenzen.

IL1B triggert über den aktivierten IL1R1 in Endothelzellen die Transduktion der COX (Cyclooxygenase)-2 und führt darüber zu einer vermehrten Bildung von Prostaglandin-E2. Außerdem wird die Ausschüttung Corticotroper Releasinghormone im Hypothalamus gefördert, was über eine ACTH-Stimulation eine Kortisonausschüttung in den Nebennieren bei Entzündungsreaktionen bewirkt (Rivest et al., 2000).

Beim kolorektalen Karzinom führt IL1B zur Induktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) (Jung et al., 2001).

### **5.2.3 ATF 3** (Fold Change: 24,552; activating transcription factor 3; Chromosom: 1, Lokalisation: 1q32.3)

ATF3 (activating transcription factor 3) ist Bestandteil der AFT/cAMP responsive element binding (CREB) – Proteinfamilie der Transkriptionsfaktoren und wird auf dem Chromosom 1 in der Lokalisation 1q32.3 kodiert.

Eukaryotische RNA-Polymerasen sind von sich aus nicht in der Lage, mit der Transkription zu beginnen (Stachan et al., 2004). Hierfür existieren Transkriptionsfaktoren, spezielle „Helfermoleküle“, die an die DNA binden, um Polymerasen an den Promotor zu rekrutieren. Der activating transcription factor 3 spielt eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf Stress unterschiedlicher Genese. Die Induktion korreliert hierbei mit dem Ausmaß des Zellchadens (Hai et al., 2001). Aktuell konnte gezeigt werden, dass die Repression des ATF 3 nach genotoxischem Stress (UV Strahlung) die DNA-Reparaturmechanismen beeinträchtigt, weshalb ATF 3 als neuer gatekeeper der genomischen Integrität nach UV-Stress bezeichnet wurde (Turchi et al., 2009).

Insgesamt wurden Änderungen der ATF 3 Genexpression als Reaktion auf mechanischen oder ischämischen Stress bereits mehrfach berichtet (Payson et al., 2009). In Tiermodellen konnte eine verstärkte Induktion als Reaktion auf Verletzungen der Haut, aber auch bei myokardialen, renalen oder hepatischen Ischämien nachgewiesen werden. Beim Menschen konnte zuletzt gezeigt werden, dass ATF 3 beim akuten Nierenversagen aufgrund einer renalen Ischämie einen protektiven Effekt hat (Yoshida et al., 2009).

Neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor fungiert AFT3 auch als Stabilisator des Tumorsuppressors p53. AFT3 schützt p53 gegen Ubiquitinierung und anschließende Degradierung, indem es an den lysinreichen Terminus - das Ziel der Ubiquitinierung - bindet und trägt damit zum Erhalt der DNA Integrität und dem Schutz vor Zelltransformation bei (Yan et al., 2005).

#### **5.2.4 NR4A - Gruppe** (durchschnittlicher Fold change: 8,33; Synonym: nuclear receptor subfamily 4 Gruppe A)

Die drei Mitglieder der nukleären Hormonrezeptor Familie ( NR4A1, NR4A2, NR4A3 ) werden der übergeordneten Gruppe der Steroidhormon Rezeptorfamilie zugerechnet. Sie sind strukturell ähnlich aufgebaut und spielen eine Rolle bei den komplexen Abläufen von Zellüberleben und Apoptose. Obwohl bei Expression dieser Gene mehrfach ein antiapoptotischer Effekt nachgewiesen werden konnte, wurde auch über einen proapoptotischen Effekt bei der Expression von NR4A1 berichtet (Li et al., 2006). Diese gegensätzlichen Effekte können über zwei Mechanismen erklärt werden, zum einen durch die transkriptionale Aktivierung von Genen, die für Zellüberleben oder Zelltod zuständig sind, zum anderen aber auch durch Translokation ins Zytoplasma, wo Mitochondrien angesteuert werden, die einen Zelluntergang über Bcl (B cell CLL/lymphoma)-2- Bindung induzieren (Li et al., 2006). Dieser zweite Mechanismus stellt gleichzeitig ein neues Paradigma der zellulären Apoptose dar.

Die NR4A Gruppe spielt außerdem durch die Reduktion der Lipidbeladung menschlicher Makrophagen sowie die Verringerung der Inflammation eine protektive Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen (Bonta et al., 2006).

**5.2.4.1 NR4A2** (Fold change: 22,4; Synonyme: nuclear receptor subfamily 4 group A member 2, NOT, Nurr 1, RNR 1, Chromosom: 2, Lokalisation: 2q22-q23)

Das kodierte Protein stellt höchstwahrscheinlich einen Transkriptionsfaktor dar. NR4A2 ist essentiell für die Entwicklung und das Überleben dopaminergener Neurone. Genmutationen dieses Gens sind mit dopaminergen Dysfunktionen (inklusive Parkinson-Syndrom) sowie Schizophrenien und manischen Depressionen assoziiert (Le et al., 2003).

Darüber hinaus hat NR4A2 antiapoptotische Effekte, zum einen durch Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53, zum anderen indem es die Expression von Bax (BCL2-associated X protein) vermindert (Zhang et al., 2009):

**5.2.4.2 NR4A3** (Fold change: 10,45; Synonyme: nuclear receptor subfamily 4 group A member 3, NOR-1, CHN, CSMF, Chromosom: 9, Lokalisation: 9q22)

Die Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung, bei der Aktivierung und Lipidbeladung von Makrophagen eine entscheidende Rolle spielt. Untersuchungen zur Expression und Funktion der NR4A Familie bei menschlichen Makrophagen konnten zeigen, dass eine lentivirale Überexpression von Nur77, Nurr1 und NOR-1 (NR4A3) die Expression und Produktion von Interleukin IL-1beta und IL-6 sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine und IL-8 signifikant reduziert. Zusätzlich wurde die Aufnahme oxidiertes LDL's ( low density lipoproteine ) verringert. Auf der anderen Seite resultierte aus der gezielten Unterdrückung von NR4 A3 eine gesteigerte Zyto- und Chemokinsynthese sowie eine erhöhte Lipidbeladung, so dass der NR4A3 Familie eine protektive Rolle bei der Atherogenese zugesprochen werden kann (Bonta et al., 2006).

Hypoxie induziert einerseits Apoptose, triggert auf der anderen Seite aber auch adaptive Mechanismen, die das Zellüberleben sichern sollen. Martorell et al. (2009) konnten erstmals zeigen, dass die positiven Effekte des HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) auf das Zellüberleben von Endothelzellen (Zellkultur) durch NR4A3 vermittelt werden. Die Hypoxie führte dabei zeit- und dosisabhängig zu erhöhten NR4A3 mRNA-Spiegeln, wobei die NR4A3 Überexpression die Rate der apoptotischen Endothelzellen deutlich verringerte (Martorell et al., 2009).

**5.2.4.3 NR4A1** (Fold change: 4,75; Synonyme: nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, TR3, HMR, NUR77, Chromosom: 12, Lokalisation: 12q13)

Das kodierte Protein stellt einen nukleären Transkriptionsfaktor dar, von dem bereits multiple, durch alternatives Spleißen entstandene Varianten, identifiziert werden konnten. Die Translokation des Proteins aus dem Zellkern zu den Mitochondrien ist Apoptose induzierend.

Im Tierversuch mit transgenen Mäusen, die eine dominant-negative Form von TR3 (NR4A1) exprimierten, konnten protektive Effekte von NR4A1 im Bezug auf die Atherosklerose gefunden werden. Die dominant-negative Form von TR3 bewirkt eine Suppression der transkriptionellen Aktivität von TR3, was sich letztlich in einer 3-fach verstärkten Neointimaproliferation im Bereich der Arteria carotis der transgenen Mäuse äußerte (Arkenbout et al., 2002).

Außerdem wird NR4A1 neben EGR3 (early growth response 3) eine Schlüsselrolle als Mediator von VEGF (vascular endothelial growth factor) - induzierten Endothelfunktionen zugeschrieben (Liu et al., 2003).

**5.2.5 Chemokin-Gruppe** ( CXCL2, CCL2, CCL3L3, CCL8, durchschnittlicher Fold change: 4,96)

Chemokine sind lösliche Polypeptide mit lokaler Wirkung und kurzer Halbwertszeit und gehören zur Gruppe der Zytokine. Die Nomenklatur der Chemokine orientiert sich an der N-terminalen Aminosäuresequenz. Bei C-C-Chemokinen befinden sich im N-terminalen Bereich zwei benachbarte Cysteinreste, während die Cysteinreste bei C-X-C-Chemokinen durch eine andere Aminosäure getrennt sind (Schütt und Bröker, 2006).

**5.2.5.1 CXCL2** (Fold change: 16,29; Synonyme: MIP2, GRO2, SCYB2, CINC2a; Chromosom: 4, Lokalisation: 4q21)

Ein wichtiger Schritt bei der Initiierung der Immunantwort ist die Synthese von Chemokinen, die eine Rekrutierung von Neutrophilen bewirken. Dabei nimmt das CXCL2-Gen eine Schlüsselposition ein. In einer in-vivo-Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass ortsständige Gewebemakrophagen die Hauptquelle für die Synthese von CXCL2 sind (De Filippo et al., 2008).

**5.2.5.2 CCL2**, (Fold change: 8,25; Synonyme: MCP1, HC11, MCAF, SCYA2; Chromosom: 17, Lokalisation: 17q11.2-q12)

Das Chemokin, das durch das CCL2- Gen kodiert wird, zeigt chemotaktische Aktivitäten für Monozyten und Basophile, nicht aber für Neutrophile und Eosinophile. Es ist an der Pathogenese von Erkrankungen mit Monozyteninfiltration, wie Psoriasis (Antonelli et al., 2009), rheumatoider Arthritis (Kragstrup et al., 2008) und der Atherosklerose (Wahlgren et al., 2009) beteiligt und bindet an die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR4. Die Serumkonzentration des CCL2-Chemokins steigt mit zunehmendem Alter an (Antonelli et al., 2006).

In einer prospektiven Beobachtungsstudie an 40 pädiatrischen kardiochirurgischen Patienten zeigte sich eine Korrelation von postoperativ erhöhten MCP1 (CCL2)-Spiegeln mit einem komplizierteren frühpostoperativen Verlauf. Es fand sich ein Zusammenhang zwischen einer postoperativ reduzierten linksventrikulären Funktion in Verbindung mit gesteigertem Katecholaminbedarf und erhöhten Chemokinkonzentrationen im Serum sowie einer verstärkten Aktivierung von Monozyten. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere bei Patienten mit zyanotischen Vitien und längerer extrakorporaler Zirkulation (Gessler et al., 2004).

MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) spielt eine wesentliche Rolle bei der Initiation und Progression der Atherosklerose. Es ist das einzige Zytokin, das in atherosklerotischen Plaques sowohl von Makrophagen als auch von glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen produziert wird. Hohe MCP1-Level sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert und erhöhen das Mortalitätsrisiko bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom unabhängig von anderen Risikofaktoren (Amasyali et al., 2009).

Zusätzlich gibt es Genpolymorphismen des CCL2-Gens, die mit einem deutlich erhöhten koronaren Atheroskleroserisiko bei asymptomatischen Patienten verbunden sind (Kim et al., 2007).

Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die keine Reperfusionstherapie innerhalb der ersten 24 Stunden erhalten, haben deutlich erhöhte Plasmaspiegel von MCP1. Dieser Effekt ist insbesondere bei guter koronarer Kollateralisation nachweisbar. Es wird angenommen, dass die durch Scherspannung induzierte Überexpression von MCP1 zu einer signifikant gesteigerten Ausbildung von Kollateralkreisläufen in der frühen Phase des akuten Myokardinfarktes führt (Park et al., 2008).



**5.2.5.3 CCL3L3** (Fold change: 4,58, Synonyme: LD78, SYCA3L1, 464.2; Chromosom: 17, Lokalisation: 17q21.1)

Das durch CCL3L3 kodierte Protein ist ein Mitglied der C-C Familie der Chemokine, wird von aktivierten T-Zellen und Makrophagen sezerniert und zeigt chemotaktische Aktivitäten für Leukozyten. Es scheint darüber hinaus inhibitorisch auf die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen zu wirken (Ritter et al., 1995).

Das CCL3L3 Protein bindet an unterschiedliche Chemokinrezeptoren, einschließlich des CCR 5-Rezeptors, der als Co-Rezeptor ein Eindringen des HIV-Virus blockieren kann.

**5.2.5.4 CCL8** (Fold change: 4,41, Synonyme: monocyte chemoattractant protein 2, MCP2, SCYA8, HC14; Chromosom: 17, Lokalisation: 17q11.2)

Das durch dieses Gen kodierte Protein ist strukturell mit der C-X-C-Familie der Chemokine verwandt. Das CCL8-Protein gilt als spezifischer Serummarker für die frühe Diagnose der Graft-versus-host Reaktion bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (Hori et al., 2008).

Untersuchungen an humanen, monozytären Zellreihen zeigen, dass Angiotensin II direkt die CCL8 Expression stimuliert. Dieser Effekt wird über den AT1-Rezeptor vermittelt und erklärt zumindest teilweise die vaskuloprotektive Wirkung von Angiotensin-II-Antagonisten, die auf antiinflammatorische makrophagenvermittelte Effekte zurückzuführen sind (Tone et al., 2007).

**5.2.6 RGS** (regulator of G-Protein signaling)-Gruppe: **RGS1, RGS2**, (durchschnittlicher Fold change: 6,69)

Die Gene der RGS-Gruppe kodieren Proteine der regulator of G-protein signaling Gruppe, die Signale über GTP-bindende Proteine (Guaninnucleotid-bindende Proteine, kurz G-Proteine) ins Zellinnere weiterleiten. G-Proteine besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und second messenger System. Man unterscheidet zwischen membranständigen heterotrimeren G-Proteinen und zytosolischen kleinen G-Proteinen. Diese entfalten ihre Wirkung an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G-protein-coupled receptor, GPCR), die eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen, der Chemotaxis, En-

do- und Exozytose sowie beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung haben. Darüber hinaus sind sie als Zielstrukturen für die Wirkung von Hormonen, wie Adrenalin oder Glucagon und Neurotransmittern, wie Serotonin oder Acetylcholin, verantwortlich (Nobles et al., 2005).

Der Hauptmechanismus, durch den RGS Proteine G-Proteine negativ regulieren, ist die GTP-ase aktivierende Aktivität ihrer RGS Domäne. Dabei tauscht die  $\alpha$ -Untereinheit ihr gebundenes GDP gegen GTP aus und dissoziiert dadurch von den Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$ . Die beiden freigesetzten G-Proteinuntereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta/\gamma$ ) können dann unterschiedliche Effektoren (z.B. Adenylcyclasen oder Phospholipasen) regulieren (De Vries et al., 2000).

#### **5.2.6.1 RGS1** (Fold change: 13,97; Synonyme: 1R20, BL34, IER1, immediate early response 1, IR20; Chromosom: 1, Lokalisation: 1q31)

Dieses Gen kodiert ein Mitglied der regulator of G-protein signaling – Familie und zählt zu den sogenannten „immediate early response“ Genen. Das Protein ist an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Es schwächt die Wirkung des G-Proteins ab und wirkt darüber hinaus als GTP-ase aktivierendes Protein (GAP), was die Konversionsrate von GTP zu GDP erhöht.

Es wird eine deutlich erhöhte Expressionsrate von RGS1 beim Nierenzellkarzinom gefunden, weswegen bei in vitro Studien RGS1 nach Transfektion monozytärer dendritischer Zellen als Tumor assoziiertes Antigen (TAA) identifiziert werden konnte (Grünebach et al., 2008).

Beim malignen Melanom kann RGS1 als prognostischer Marker verwendet werden, da hohe Expressionsraten sowohl mit der Tumordicke, der Mitoserate, als auch dem Ausmaß der Angiogenese korrelieren (Rangel et al., 2008).

#### **5.2.6.2 RGS2** (Fold change: 4,17; Synonym: GOS8q; Chromosom: 1, Lokalisation: 1q31)

In Studien an Tieren und Menschen konnte eine Beziehung zwischen RGS2 Mutationen und der Entstehung einer arteriellen Hypertonie gefunden werden (Gu et al., 2008). Eine des Öfteren postulierte ethnische und geschlechtsspezifische Assoziation des RGS2 Genotyps mit einem arteriellen Hypertonus konnte aktuell allerdings nicht bestätigt werden (Hahntow et al., 2009).

### **5.2.7 EGR (early growth response) - Gruppe (1-3)** (durchschnittlicher Fold change: 8,94)

Die Proteine, die durch diese Gene kodiert werden, sind nukleäre Transkriptionsfaktoren und gehören zur Familie der C2H2 Zinkfinger-Proteine.

#### **5.2.7.1 EGR2** (Fold change: 12,65; Synonyme: AT591, Egr2; Chromosom: 10, Lokalisation: 10q21.1)

Das durch dieses Gen kodierte Protein ist ein Transkriptionsfaktor vom Typ C2H2-Zinkfinger. Defekte des Gens sind mit der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (Numakura et al., 2003) sowie mit dem Dejerine-Sottas-Syndrom (Chung et al., 2005) assoziiert. Außerdem spielt EGR2 eine wichtige Rolle bei der PTEN (phosphatase and tensin homolog)-induzierten Apoptose. EGR2 wirkte in vitro an 39 Tumorzellreihen Apoptose induzierend durch Veränderung der Permeabilität der mitochondrialen Membran, der Freisetzung von cytochrome c, sowie der Aktivierung der Caspase 3, 8 und 9 (Unoki und Nakamura, 2003).

#### **5.2.7.2 EGR1** (Fold change: 11,23; Synonyme: TIS 8, AT 225, ZNF 225, Egr1; Chromosom: 5, Lokalisation: 5q31.1)

Die Expression von EGR1 (early growth response 1) ist bei verschiedenen malignen Tumoren vermindert (Shozu et al., 2004). Andererseits wird EGR1 eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugeschrieben. So konnten zum Beispiel wachstumshemmende Effekte beim hepatozellulären Karzinom (Hoa et al., 2002) und beim Ösophaguskarzinom (Wu et al., 2001) nachgewiesen werden.

Außerhalb onkologischer Studien konnte nachgewiesen werden, dass EGR1 entscheidend zur Angiopoetin-1 vermittelten endothelialen Zellmigration und Proliferation beiträgt (Abdel-Malak et al., 2009).

In Thrombus bedeckten Gefäßwänden bei Menschen, die sich einer abdominalen Bauchaortenaneurysma-Operation unterziehen mussten, wurde eine deutlich erhöhte EGR1 Expression gefunden. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche prothrombogene und proinflammatorische EGR1-vermittelte Aktivität in der Pathogenese des Bauchaortenaneurysmas hin (Shin et al., 2009).

EGR1 scheint extrazelluläre Signale durch Veränderung der Expression von Zielgenen in Langzeitantworten umzuwandeln (Thiel und Cibelli, 2002), wobei mehr als 300 Gene durch EGR1 in ihrer Expression signifikant beeinflusst werden (Fu et al., 2003).

Eine verstärkte Expression von EGR1 als Reaktion auf eine Hypoxie - im Tierversuch verursacht durch chronisches Aortenbanding - spielt eine Rolle in der Pathogenese der linksventrikulären Hypertrophie. EGR1-null Mäuse entwickelten nach chronischem Aortenbanding keine relevante linksventrikuläre Hypertrophie (Khachigian, 2006).

**5.2.7.3 EGR3** (Fold change: 4,02; Synonyme: PILOT, Egr3; Chromosom: 8, Lokalisation: 8p23-p21)

EGR3 ist das dominante Mitglied der EGR-Familie bei der Vermittlung der vascular endothelial growth factor (VEGF) induzierten Angiogenese (Liu et al., 2008). Die transkriptionelle Aktivierung wird dabei hauptsächlich über den VEGF Rezeptor2/KDR- und den Protein-Kinase C (PKC)-Pathway vermittelt. Somit spielt EGR3 eine wichtige Rolle bei der endothelialen Migration und Zellproliferation (Liu et al., 2008).

**5.2.8 Zink-Finger (ZNF)-Familie** (ZNF331, ZFP36; durchschnittlicher Fold change: 4,81)

Das Zink-Finger Motiv ist ein Struktur-Motiv, das in vielen DNA- Bindeproteinen vorkommt. Struktur motive sind Bestandteile von Gen-Regulatorproteinen, die spezifische DNA-Sequenzen lesen können, weil die Oberfläche des Proteins umfassend komplementär zu den speziellen Oberflächeneigenschaften der Doppelhelix in dieser Region ist (Harrison, 1991). Das Zink-Finger-Motiv ist aus einer Schlaufe in der Polypeptidkette aufgebaut, die in Haarnadel-form an ein Zink-Atom komplexiert ist (Alberts et al., 1997).

**5.2.8.1 ZFP36** (Fold change: 12,42; Synonyme: TTP, Tristetraprolin, TIS11, GOS24; Chromosom: 19, Lokalisation: 19q13.1)

ZFP36 gehört zur Gruppe der sogenannten CCCH Zink-Finger Proteine, die über einen beschleunigten Abbau des Poly(A)-Schwanzes von mRNA einen erhöhten mRNA-Umsatz bewirken (Brooks et al., 2002). Diese Aktivität wurde an ZFP36 defizienten Mäusen entdeckt, die in der Folge ein Autoimmunsyndrom entwickelten (Carrick et al., 2004).

Bei Untersuchungen an zirkulierenden Monozyten und wandständigen Makrophagen in atherosklerotischen Plaques, die durch inflammatorische Prozesse an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass ZFP36 deutlich überexprimiert war. Zusätzlich wurde ein Anstieg von Transkriptionregulatoren, die spezifisch mit ZFP36 interagieren, festgestellt, was zur Expression von Genen führte, die für die inflammatorische Aktivität von Makrophagen verantwortlich sind (Patino et al., 2006).

ZFP36 spielt im Bereich der Herzchirurgie eine Rolle bei der TNF- $\alpha$  vermittelten Reduktion von TLR4 (toll-like receptor 4) auf Monozyten während der extrakorporalen Zirkulation.

Durch Untersuchungen an humanen Monozyten konnte außerdem gezeigt werden, dass durch TNF- $\alpha$  die Expression von ZFP36 gesteigert wird (Tsai et al., 2009).

**5.2.8.2 ZNF331** (Fold change: 4,78; Synonyme: RITA, ZNF361, ZNF463; Chromosom: 19, Lokalisation: 19q13.42)

ZNF331 ist bislang nur als potentielles Onkogen in Erscheinung getreten. Translokationen im Bereich der Chromosomenregion 19q13, verbunden mit einer Veränderung der ZNF331 Expression, werden überdurchschnittlich häufig bei follikulären Adenomen der Schilddrüse gefunden (Meiboom et al., 2003).

**5.2.9 APOLD1** (Fold change: 11,54; Synonyme: Verge, FLJ25138, DKFZp434F0318; Chromosom: 12, Lokalisation: 12p13.1)

APOLD1 ist ein Gen, das selektiv in endothelialen Zellen exprimiert und das als immediate early gene reguliert wird. Aus diesem Grund wird es als Verge (vascular early response gene) bezeichnet (Regard et al., 2004). Eine Beeinträchtigung der endothelialen Barrierefunktion ist an der Pathogenese vieler Erkrankungen, einschließlich Sepsis und ARDS (acute respiratory distress syndrome), beteiligt (van Soeren et al., 2000).

Funktionelle Studien, die die Permeabilität einschichtiger Endothelzellen untersuchten, zeigten, dass Verge die endotheliale Zellantwort nach Aktivierung von Genen der PKC (protein kinase C)-familie veränderte (Dudek und Garcia, 2001). Es wird angenommen, dass die dynamisch regulierte PKC-abhängige Verge-Stimulation zu einer Reorganisation des Aktin Zytoskelettes und zu Veränderungen der vaskulären Permeabilität führt (Regard et al., 2004).

**5.2.10 PTGS2** (Fold change: 11,27; Synonyme: COX2, COX-2, Cyclooxygenase 2, PHS-2, PGHS-2, GRIPGHS; Chromosom: 1, Lokalisation: q25.2-25.3)

Die Cyclooxygenase 2 ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese, indem es die Konversion von Arachidonsäure in Prostaglandin H2 katalysiert (Smith et al., 1996). Im Tierversuch an Kaninchen konnten PTGS2 vermittelte kardioprotektive Effekte in der späten Phase der ischämischen Präkonditionierung nachgewiesen werden (Shinmura et al., 2000). Diese Effekte werden über die Proteinkinase C/MAPK (mitogen-activated-protein kinase) Signalkaskade vermittelt (Xuan et al., 2005).

Im Tierversuch wurden Mäuse durch wiederholte Zyklen von 6-minütiger Koronarokklusion und anschließender 4-minütiger Reperfusion ischämisch präkonditioniert. Hierbei bewirkte die Aktivierung der Raf1 mitogen-activated-protein kinase (MAPK) die Phosphorylierung von STAT 1 und 3 (signal transducers and activators of transcription1+3) und somit in der Folge eine signifikant erhöhte PTGS2 Expression (Xuan et al., 2005).

Die PTGS2 spielt außerdem, meist in Verbindung mit VEGF (vascular endothelial growth factor), eine Rolle bei der Angiogenese. Dies konnte überwiegend bei malignen Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom (Kobajashi et al., 2009) oder dem Magenkarzinom (Leung et al., 2003) und bei der ovariellen Endometriose (Ceyhan et al., 2008) festgestellt werden.

Die PTGS2 Expression spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Entstehung des Magenkarzinoms. Eine erhöhte PTGS2 Expression könnte dabei das Risiko von Lebermetastasen erhöhen (Yu et al., 2005).

Bei Patienten mit Diabetes mellitus und konsekutiv gestörter Mikrozirkulation ist die Synthese verschiedener PTGS2 abhängiger Prostanoiden erhöht (Bagi et al., 2006). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass PTGS2- Polymorphismen unabhängige Risikofaktoren bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sein können (Lee et al., 2008).

**5.2.11 SNF1LK** (Fold change: 10,77; Synonyme: SIK1, salt inducible kinase, MSK, SNF1-like kinase; Chromosom:21, Lokalisation: 21q22.3)

Die SIK1 (salt inducible kinase 1) hat ihren Namen, weil sie erstmalig in den Nebennieren von salzreich ernährten Ratten entdeckt wurde. SIK1 ist ein Membranprotein und unterdrückt die Aktivität von CREB (cAMP responsive element binding) durch Phosphorylierung des CREB-spezifischen Co-aktivators TORC (transducer of regulated CREB activity). Diese Er-

kenntnis sorgte für Bewegung im Bereich der CREB-Studien, da sie einen bis dato unbekanntes Mechanismus der Regulation der CREB-Aktivität darstellt (Takemori und Okamoto, 2008).

In adrenokortikalen Tumorzellen der Maus unterdrückt SIK 1 die CREB-abhängige Genexpression, z.B. von CYP11A und StAR, bereits in der Frühphase nach ACTH (adreno-corticotropes Hormon) – Stimulation (Takemori et al., 2003).

Außerdem ist eine reduzierte SIK1-Expression mit einer schlechten Prognose beim Mammakarzinom assoziiert (Shaw, 2009).

### **5.2.12 JUN-familie: JUN, JUN B (durchschnittlicher Fold change: 8,17)**

#### **5.2.13.1 JUNB (Fold change: 9,94; Synonym: AP-1; Chromosom: 19, Lokalisation: 19 p13.2)**

Experimente an transgenen- und Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass bei Mäusen mit Verlust oder Blockade der JUN B Expression eine höhere Rate an myeloproliferativen Syndromen auftrat (Weitzman, 2001). JUN B spielt eine wichtige Rolle bei der erythrozytären Differenzierung (Jacobs-Helber et al., 2002).

Bei Untersuchungen an Patienten mit Polycythämia vera bewirkte der JUN B Knockdown nicht nur eine Wachstumsreduktion humaner Erythroblasten durch Apoptoseinduktion, sondern auch eine Verringerung des proliferativen Potentials erythrozytärer Vorläuferzellen (Progenitoren) (Costa Reis et al., 2009).

#### **5.2.12.2 JUN (Fold change: 6,36; Synonyme: AP-1, c-Jun, JUN; Chromosom: 1, Lokalisation: 1p32-p31)**

Dieses Gen ist mutmaßlich eine Variante des avian sarcoma virus 17. Das kodierte Protein hat große Ähnlichkeiten mit dem viralen Protein und stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der direkt mit den DNA-Zielsequenzen interagiert. Das Gen besitzt keine Introns und befindet sich auf dem Chromosom 1 in einer Region, die sowohl an Translocationen als auch Deletionen und somit an der Entstehung von Malignomen beim Menschen beteiligt ist. Dies konnte z.B. für das Pankreaskarzinom (Shin et al., 2009), das Ösophaguskarzinom (Hussain et al., 2009) oder die Entstehung von Lebermetastasen beim Mammakarzinom (Zhang et al., 2007) nach-

gewiesen werden. Aus diesem Grund zählt JUN auch zur Gruppe der Protoonkogene (Katz, 2001). Protoonkogene sind zunächst „normale“ Gene, die allerdings in der Lage sind, im Falle von Mutationen Produkte zu generieren, die Malignom auslösend sein können.

Die Bezeichnung Protoonkogen wird häufig in Verbindung mit sogenannten „immediate early genes“ genannt, zu denen neben c-Jun auch c-fos und c-myc gehören. „Immediate early genes“ werden sehr schnell als Antwort auf Stress unterschiedlicher Art aktiviert (Katz, 2001).

JUN ist in der unverletzten Wand von Arterien nur sehr gering exprimiert. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Expression nach Gefäßverletzungen schnell zunimmt (Khachigian et al., 2002). Eine mögliche klinische Anwendbarkeit wurde in vitro (humane Zellkultur) und in vivo (Arteria carotis von Ratten) untersucht, wo eine gezielte Dz13 gesteuerte Inhibition der c-Jun-Expression positive Auswirkungen auf die Zellintegrität von glatten Muskelzellen nach Verletzungen des Gefäßes, sowie auf die Neointimaformation und Neointimadicke hatte (Khachigian et al., 2002).

Diese Erkenntnisse führten dazu, dass auch Genexpressionsanalysen im Bereich der interventionellen Kardiologie sowie der Herzchirurgie durchgeführt wurden, um ein größeres Verständnis für Bypassverschlussraten zu erlangen. Der Hauptgrund für postoperative Graftstenosen und -verschlüsse ist eine zunehmende Intimahyperplasie aufgrund einer gesteigerten Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (SMC, smooth muscle cells). Aus diesem Grund sind vor allem die Transkriptionsfaktoren von Interesse, die die SMC-Proliferation kontrollieren (Ehsan et al., 2001). So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine gezielte Inaktivierung von c-JUN das Intimawachstum nach Ligatur der A. carotis der Ratte (Khachigian et al., 2002) oder nach Angioplastie der A. carotis beim Kaninchen (Murrell et al., 2007) positiv beeinflusst.

Aktuell wurden Versuche mit menschlichem Graftmaterial (Vena saphena magna) durchgeführt, die unmittelbar nach der Entnahme für 14 Tage in einer Nährlösung kultiviert wurden. Die c-Jun Inhibition wurde durch Transfektion mit FuGENE 6 (DNAzyme, Dz13) an Tag 0 und 7 erreicht und mit einer randomisierten Kontrollgruppe verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Dz13 inkubierten Venensegmente eine deutlich abgeschwächte Neointimaproliferation aufwiesen, so dass man rückschließen kann, dass die c-Jun-Expression mit einer Intimahyperplasie bei humanen Venensegmenten assoziiert ist (Ni et al., 2010). In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass eine c-Jun Inhibition die venösen Graftstenosen nach autologer End-zu-Seit-Transplantation bei Kaninchen verringert (Ni et al., 2010).



**5.2.13 SLC2A3** (Fold change: 9,15; Synonyme: GLUT-3, glucose transporter 3; Chromosom: 12, Lokalisation: 12 p13.3)

GLUT-3 kodiert ein wichtiges Glucosetransportprotein und wird durch HIF- $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1  $\alpha$ ) gesteuert. GLUT-3 wird häufig als „gehirn-spezifisch“ bezeichnet, weil die Zunahme seiner Expression mit der Pathogenität von Gliomen korreliert (Liu et al., 2009). Es finden sich allerdings auch bei anderen Karzinomen im Kopf- und Halsbereich (HNC, head and neck carcinoma) deutlich erhöhte Genexpressionslevel für GLUT-3. Zusätzlich ist hier eine gesteigerte Expression mit einer höheren Inzidenz von Lymphknotenmetastasen assoziiert (Zhou et al., 2008).

Die GLUT -1,3 und 4 sind bei anhaltender Hypoglykämie in menschlichen Leukozyten unterschiedlich stark exprimiert. Diese unterschiedliche Antwort der verschiedenen Isoformen auf eine Hypoglykämie kann einen Mechanismus darstellen, um die Zellen vor dem Stress eines Glucoseentzuges zu schützen (Korgun et al., 2002). Auch andere Studien konnten zeigen, dass GLUT-3 beispielsweise in Chondrozyten, unter Vermittlung von HIF-1 $\alpha$ , als Reaktion auf niedrige Blutzuckerspiegel, aber auch auf Hypoxie, verstärkt exprimiert wird (Mobasher et al., 2005).

**5.2.14 MYC** (Fold change: 9,10; Synonyme: MRTL, c-Myc, bHLHe39; Chromosom: 8, Lokalisation: 8q24.21)

Das Protein, das durch MYC kodiert wird, ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, bei der Apoptose und bei zellulären Transformationen. Mutationen, Überexpressionen oder Translokationen sind assoziiert mit einer Vielzahl von hämatopoetischen Tumoren, Leukämien und Lymphomen inklusive des Burkitt Lymphoms (Ruf et al., 2001).

Insgesamt ist MYC das am häufigsten deregulierte Onkogen bei menschlichen Tumoren (Wahlström und Hendriksson, 2007). Überexpressionen konnten bislang unter anderem beim kolorektalen Karzinom (Dai et al., 2007), beim klarzelligem Nierenzellkarzinom (Tang et al., 2009) und beim Prostatakarzinom (Nagy et al., 2009) nachgewiesen werden.

Allerdings konnten auch protektive Effekte von MYC gefunden werden. Eine verstärkte MYC Expression im Rahmen von Cisplatin basierten Chemotherapien oder Bestrahlungen verhindert über die Induktion der Ornithin Decarboxylase (ODC) den Zelltod, so dass MYC

unter diesen Konditionen zytoprotektive Effekte zugesprochen werden können (Park et al., 2002).

MYC ist nach myokardialer Ischämie hochreguliert (Yao et al., 1995). Das kodierte Protein ist an Transformation, Apoptose und transkriptioneller Aktivierung von Genen beteiligt, kann seine Wirkung aber erst entfalten, nachdem es mit dem Protein Max dimerisiert (Fernandez et al., 2003).

**5.2.15 CDKN1A** (Fold change: 8,77; Synonyme: p21, SDI1, Cip1, WAF1, CAP20; Chromosom: 6, Lokalisation: 6p21.2)

CDKN1A kodiert ein Protein, das einen potenten Inhibitor der Cyclin abhängigen Kinase (cyclin- dependent kinase) darstellt. Es existieren 2 durch alternatives Spleißen entstandene Varianten. Die Proteine fungieren als Regulatoren des Zellzyklus in der G1-Phase, wobei die Expression des Gens eng mit dem Tumorsuppressorprotein p-53 verbunden ist, das als Reaktion auf unterschiedliche Stresstimuli einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus induziert.

**5.2.16 CYR61** (Fold change: 8,33; Synonyme: cysteine-rich angiogenetic inducer 61, CCN1, GIG1; Chromosom: 1, Lokalisation: 1p31-p22)

CYR61 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der durch Hypoxie induzierten Angiogenese und beim Remodelling der extrazellulären Matrix spielt. In Skelettmuskelbiopsien beim Menschen (*M. vastus lateralis*) konnte bereits 30 min nach starker muskulärer Belastung ein deutlicher Anstieg der CYR61-Expression gemessen werden. Auch 48 Stunden nach der Belastung waren die Werte noch deutlich erhöht, obwohl zu keiner Zeit erhöhte Werte von HIF-1 alpha oder VEGF gemessen wurden (Kivelä et al., 2007).

Auch in anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CYR61 unabhängig von HIF-1 alpha aktiviert wird (Meyuhas et al., 2008). Die Expression von CYR61 in hypoxischen Tumoregionen wird vielmehr CREB (cyclic AMP-responsive element binding)-abhängig verstärkt.

CYR61 wird in Gefäßen durch Gewebetrauma, Angiotensin II oder Stimulation durch Wachstumsfaktoren induziert. In Tierversuchen an Mäusen konnte zudem eine deutlich erhöhte Expression nach alpha1-adrenerger Stimulation in ventrikulären Myozyten sowie nach Infarkt-

induktion gemessen werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2004). Außerdem vermittelt CYR61 auch antiapoptotische Effekte und schützt kardiale Myozyten vor oxidativem Stress. Ein Unterdrücken des endogenen CYR61 (CCN1) Proteins verringerte die Anzahl von überlebenden Zellen unter oxidativem Stress deutlich, während die Vorbehandlung kardialer Myozyten mit rekombinantem CCN1 die Anzahl der überlebenden Zellen signifikant erhöhte (Yoshida et al., 2007).

**5.2.17 ADAMTS1** (Fold change: 8,32; Synonyme: A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs, METH1, KIAA 1346; Chromosom: 21, Lokalisation: 21q21.2)

ADAMTS1 gehört zur Gruppe der Matrix Metalloproteinasen. Diese sogenannten ECM (extracellular matrix)-degradierenden Enzyme spielen eine bedeutende Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix in infarziertem Herzmuskelgewebe und beeinflussen somit das ventrikuläre Remodelling nach einem Myokardinfarkt (Nakamura et al., 2004). Im normalen, nicht ischämischen Myokard findet man keine, in Endothelzellen nur geringe Mengen an detektierbarer ADAMTS1 mRNA. 3 Stunden nach Infarktinduktion durch Ligatur einer Koronararterie (Tierversuch an Ratten) fanden sich stark erhöhte ADAMTS1 mRNA Signale sowohl im Gefäßendothel, als auch im Infarktareal (Nakamura et al., 2004). Diese schnelle Hochregulation von ADAMTS1 unterschied sich deutlich von den regulatorischen Mustern anderer MMPs (matrix metalloproteases).

Interessanterweise ist die Induktion von ADAMTS1 mRNA bei Hypoxie vorübergehend, wohingegen die Hypoxie induzierte VEGF (vascular endothelial growth factor) – Expression zeitabhängig ansteigt. Die Initiation der Transkription von ADAMTS1 erfolgt unter Vermittlung des HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), wobei insgesamt 3 Bindungsstellen für HIF-1 an der Promotorregion von ADAMTS1 unter hypoxischen Bedingungen identifiziert werden konnten (Hatipoglu et al., 2009).

ADAMTS1 spielt darüber hinaus eine Rolle bei Tumorwachstum und Metastasierung. So hat eine aberrierende Methylierung von ADAMTS1 eine Bedeutung bei der Pathogenese des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) (Choi et al., 2008). Außerdem fördert eine ADAMTS1 Überexpression die pulmonale Metastasierung beim Mammakarzinom (Liu et al., 2006). Für diese prometastatische Komponente ist die Proteaseaktivität von ADAMTS1 verantwortlich, da protease-blockierte Mutationen (ADAMTS-1E/Q) eine Metastasierung verhierten (Liu et al., 2006).

Eine signifikant erhöhte ADAMTS1 Expression findet man auch in thrombosierten Hämodialysegrafts, so dass ein Zusammenhang zwischen der erhöhten ADAMTS1 Expression und einer Intimahyperplasie als Ursache von Graftverschlüssen bei Hämodialysepatienten postuliert wird (Misra et al., 2008).

Die Familie der ADAMTS Proteinasen ist am Reifungsprozess des Prokollagens und des von Willebrand Faktors sowie an der Proteolyse der extrazellulären Matrix beteiligt. Darüber hinaus werden einige Familienmitglieder –insbesondere ADAMTS1- als immediate early gene reguliert (Apte, 2009).

**5.2.18 BTG2** (Fold change: 8,27; Synonyme: BTG family member 2, PC3, TIS21; Chromosom: 1, Lokalisation: 1q32)

BTG2 ist ein Mitglied der BTG/Tob-Familie. BTG2 hat antiproliferative Effekte durch Blockade des G1/S Übergangs des Zellzyklus (Guardavaccaro et al., 2000). Die Regulation des Zellzyklus ist entscheidend für den Erhalt der genomischen Integrität. Durch die Kontrolle der Regulation des Zellzyklus spielt BTG2 eine Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schädigungen. Es handelt sich hierbei um einen p53-abhängigen Effekt, wobei das p53-Gen Transkriptionsfaktoren kodiert, die als Tumorsuppressor fungieren (Rouault et al., 1996).

BTG2 ist neben BTG1 und 3 sowie TOB und TOB2 eines von 5 APRO (anti-proliferativen) Genen und nimmt eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Leukämie ein. Eine gesteigerte BTG2-Expression nimmt zu einem sehr frühen Zeitpunkt Einfluss auf die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (Cho et al., 2008).

**5.2.19 KLF (Krüppel-like factor)-Familie:** KLF 2, 4 und 6 (durchschnittlicher Fold change: 5,91)

Bei der KLF-Familie handelt es sich um Zink-Finger Transkriptionsfaktoren. Bei unseren Untersuchungen wurden die KLF 2, 4 und 6 signifikant exprimiert.

**5.2.19.1 KLF 2** (Fold change: 3,59; Synonyme: LKLF, KLF-2; Chromosom: 19, Lokalisation: 19p13.13-p13.11)

Der antiinflammatorische Effekt von Simvastatin beruht nicht nur auf einer Downregulation von vielen proinflammatorischen Genen wie MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), IL2B (interleucin-2 receptor beta) oder Mitgliedern der TNF (tumor necrosis factor)-familie, sondern auch auf einer Überexpression des atheroprotektiven Transkriptionsfaktors KLF-2 (Tuomisto et al., 2009).

KLF-2 wird außerdem als Reaktion auf Hypoxie schnell in Endothelzellen exprimiert. Diese Überexpression inhibiert die ebenfalls Hypoxie-induzierte Expression von HIF-1  $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 alpha), was eine verminderte Genexpression von IL-8, AP-2 (angiopoetin-2) und VEGF (vascular endothelial growth factor) zur Folge hat. Umgekehrt bewirkt die Blockade von KLF-2 eine gesteigerte Expression von HIF-1 $\alpha$  und seiner Zielgene (Kawanami et al., 2009).

Auch Ang-1 (Angiopoetin-1) kann über eine PI3K/AKT-vermittelte Aktivierung des MEF2 (monocyte enhancer factor) die KLF-2 Expression induzieren und somit unter anderem der proinflammatorischen VEGF-vermittelten Antwort entgegenwirken (Sako et al., 2009).

**5.2.19.2 KLF4** (Fold change: 8,24; Synonyme: EZF, GKLF, KLF-4; Chromosom: 9, Lokalisation: 9q31)

Der KLF4 wird in Epithelien vieler Gewebe (z.B. Magen, Darm oder Haut) stark exprimiert. Er ist für die terminale Differenzierung essentiell und spielt eine Rolle während des Zellzyklus. Beim kolorektalen Karzinom wurde der KLF4 als Tumorsuppressorgen identifiziert (Zhao et al., 2004).

KLF4 ist in Gefäßendothelzellen nachweisbar und wird durch proinflammatorische Stimuli und Scherspannung stimuliert. Eine Überexpression von KLF4 induziert die Expression multipler antiinflammatorischer und antithrombotischer Faktoren einschließlich der endothelialen NO-Synthase und Thrombomodulin. Eine Blockade des KLF4 führt hingegen zur Verstärkung der TNF-alpha induzierten Expression von TF (tissue factor) und des VCAM1 (vascular cell adhesion molecule-1), was sich unter anderem in einer verlängerten clotting time bei entzündlichen Veränderungen äußert. KLF4 kann daher als Regulator der

endothelialen Aktivität als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli angesehen werden (Hamik et al., 2007).

KLF4 vermittelt außerdem die antiinflammatorische Aktivität von Kallistatin durch einen Anstieg der eNOS (endothelial nitric oxide synthase)- Expression in Endothelzellen (Shun et al., 2009).

**5.2.19.3 KLF6** (Fold change: 2,5; Synonyme: GBF, ZF9, BCD1, PAC1; Chromosom: 10, Lokalisation: 10p15)

KLF6 ist ein Tumorsuppressor Gen, das häufig durch Verlust der Heterozygotie oder durch somatische Mutationen inaktiviert wird (DiFeo et al., 2009). Die Spleißvariante 1 (KLF6-SV1) ist onkogen und unter anderem an der Entstehung des Magenkarzioms beteiligt (Sangodkar et al., 2009).

Beim kolorektalen Karzinom konnten bislang 5 Mutationen identifiziert werden, die mit der Pathogenese des Karzinoms sowie einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Cho et al., 2006).

**5.2.20 MAFF** (Fold change: 7,53; Synonyme: U-MAF, hMafF; Chromosom: 22, Lokalisation: 22q13.1)

Das MAFF (Proto) Onkogen ist ein Mitglied der bZip (basic-leucin zipper) Familie der Transkriptionsfaktoren, das zur Aktivierung seiner Target Gene das MIP (MafF interacting protein) Protein benötigt (Ye et al., 2009) und das als immediate early gene reguliert wird (Dijkmans et al., 2009). In vitro konnte an Uterusmyomzellen (PHM1-31) eine rasche Induktion von MAFF Transkripten durch die proinflammatorischen Zytokine IL1B (interleukin 1 beta) und TNF (tumor necrosis factor) innerhalb von 30 min detektiert werden (Massrieh et al., 2006).

**5.2.21 FAM 148B** (Fold change: 7,52; Synonyme: NFL2, C2CD4B; Chromosom: 15, Lokalisation: 15q22.2)

Die Expression von FAM 148B ist in humanen Endothelzellen nach Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin IL1B (Interleukin 1 beta) deutlich erhöht. Den gleichen Effekt

kann man, ebenfalls an humanen Endothelzellen, nach Gabe von TNF alpha (tumor necrosis factor alpha) beobachten. Aus diesem Grund wird FAM 148B eine Rolle bei der Reaktion auf inflammatorische Reize, speziell durch die, welche zur Zunahme der vaskulären Permeabilität führen, zugesprochen (Warton et al., 2004).

**5.2.22 SELE** (Fold change: 7,19; Synonyme: Selectin E, ELAM, ESEL, CD62E, LECAM; Chromosom: 1, Lokalisation: 1q22-q25)

SELE ist ein Marker der endothelialen Dysfunktion (Zak et al., 2008). Die endotheliale Dysfunktion spielt, neben den traditionellen koronaren Risikofaktoren, eine Schlüsselrolle bei der Progression der koronaren Herzerkrankung (KHK). Genpolymorphismen von SELE sind mit einem schwereren Verlauf der koronaren Herzerkrankung verbunden (Ghilardi et al., 2004). Zusätzlich konnten synergistische Effekte dieser Genpolymorphismen in Verbindung mit einer Hypercholesterinämie in Bezug auf das Fortschreiten der KHK gefunden werden (Zak et al., 2008), obwohl die Expression von SELE in humanen koronaratherosklerotischen Plaques niedrig ist (Merlini et al., 2004).

Das zirkulierende Genprodukt von SELE korreliert mit der Schwere der Gelenkerkrankung bei Rheumatoider Arthritis (Corona-Sanchez et al., 2009).

Eine erhöhte Expression von SELE (und IL-8) konnte in Hautbiopsien bereits nach minimalem Trauma festgestellt werden (Takeuchi et al., 2003).

**5.2.23 OLR1** (Fold change: 6,80; Synonyme: LOX1, oxidized low density lipoprotein receptor 1, LOXIN, SLOX1; Chromosom: 12; Lokalisation: 12p13.2-p12.3)

Die oxidierte Form des LDL (ox-LDL) bewirkt eine endotheliale Dysfunktion und ist somit ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose (Sakurai und Sawamura, 2003). OLR1 kodiert den zugehörigen Rezeptor (LOX-1), der hauptsächlich in Endothelzellen vorkommt und die Aufnahme von ox-LDL in die Endothelzellen steuert (Metha und Li, 2002). Der LOX-1 Rezeptor, der durch TNF-alpha, Angiotensin II, erhöhte Scherspannung und ox-LDL selbst vermehrt transkribiert wird, ist bei Patienten mit arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und Atherosklerose stark exprimiert (Metha, 2004).

Der LOX-1 Rezeptor greift auf mehreren Ebenen in die Pathogenese der Atherosklerose ein: durch die Aufnahme oxidierter LDL's in Endothelzellen, aber auch in glatte Muskelzellen und Makrophagen, durch eine abnehmende NO (Stickstoff Oxid)-Produktion, eine zunehmende Rekrutierung inflammatorischer Zellen sowie eine zunehmende Proliferation glatter Muskelzellen (Cilingiroglu und Ozer, 2005).

LOX-1 kann von der Zelloberfläche gespalten und als löslicher s-(soluble) LOX-1 freigegeben werden und somit ein Indikator für die atherosklerotische Plaqueinstabilität sein (Brinkley et al., 2008). Diese lösliche Form kann somit einen Hinweis auf die schwere der KHK (koronaren Herzerkrankung) liefern. Bei Patienten mit ausgeprägtem Koronarbefund (3 und mehr Gefäße betroffen) fanden sich neben erhöhten Werten von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, TNF-alpha), ox-LDL und CRP (C reaktives Protein) auch deutlich erhöhte Werte von sLOX-1 (Lubrano et al., 2008).

Aktuell konnte nachgewiesen werden, dass durch EGCG (epigallocatechin-3-gallate), dem wirksamsten Bestandteil von grünem Tee, Parameter der endothelialen Dysfunktion über LOX-1 regulierte Signalkaskaden herunterreguliert werden (Ou et al., 2010).

**5.2.24 DUSP5** (Fold change: 6,77; Synonyme: dual specific phosphatase 5, DUSP, HVH3; Chromosom: 10, Lokalisation: 10q25)

Das Protein, das durch DUSP5 kodiert wird, ist Mitglied der dual specificity protein phosphatase Familie. Phosphatasen spielen eine Rolle bei der zellulären Proliferation und Differenzierung, indem sie unter anderem als Gegenspieler der mitogen activated protein kinases (MAPK) durch Dephosphorylierung der Kinasen wirken. Die DUSP5 wird sowohl in Angioblasten als auch in differenzierten Gefäßzellen exprimiert und ist für eine normale Gefäßentwicklung wichtig. Bei Patienten mit vaskulären Anomalien werden gehäuft Mutationen von DUSP5 gefunden (Pramanik et al., 2009).

Die Aktivität von DUSP5 kann durch das Tumorsuppressorgen p53 deutlich gesteigert werden. Chromatin Immunopräzipitations (ChIP)- Analysen haben ergeben, dass das p53 Protein direkt an die Promotorregion des DUSP5 Gens bindet, so dass die negative Regulation der Progression des Zellzyklus auf die Downregulation der MAPK zurückzuführen ist (Ueda et al., 2003).



**5.2.25 GADD45B** (Fold change: 6,38; Synonyme: MYD118, GADD45BETA; Chromosom: 19, Lokalisation: 19p13.3)

Das GADD45B Gen ist Teil einer Gruppe von Genen, die bei der Regulation vieler zellulärer Funktionen beteiligt sind. Das GADD45 Protein ist entscheidend für die Konnektion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappaB) mit MAPK (mitogen activated protein kinase).

Dieser NF-kappaB – GADD45B – MAPK Signaltransduktionsweg wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli aktiviert und steuert dann unter anderem die Regulation des Zellwachstums, die Differenzierung, das Zellüberleben, die zelluläre Antwort auf DNA Schädigungen und den apoptotischen Zelltod (Yang et al., 2009). Eine erhöhte Expression von GADD45B schützt Zellen, die von vermehrten DNA- Schädigungen bedroht werden (Zhang et al., 2005). Defekte dieser Signalkaskade sind potentiell onkogen.

Die Induktion von GADD45B durch oxidativen Stress oder Zytokine (TNF alpha) benötigt die Anwesenheit von NF- $\kappa$ B (Jin et al., 2002; Zhang et al., 2005). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B antagonisiert die Apoptose und den beispielsweise durch TNF alpha induzierten programmierten Zelltod (De Smaele et al., 2001).

**5.2.26 SOCS3** (Fold change: 6,21; Synonyme: CIS3, SSI3, ATOD4; Chromosom: 17, Lokalisation: 17q25.3)

Das SOCS3 Gen kodiert ein Mitglied der SSI (STAT-induced STAT inhibitor)- Familie. STAT's (signal transducers and activators of transcription) sind vergleichbar mit Onkogenen und spielen eine Rolle auf mehreren Ebenen der Signaltransduktion.

Die SOCS mRNA Expression ist bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom und Lymphknotenbefall signifikant niedriger (Nakagawa et al., 2008). Eine SOCS3 Überexpression bewirkt demnach über eine STAT Suppression eine verminderte Proliferation von Mammakarzinomzellen (Barclay et al., 2009).

In vitro schwächt eine SOCS3 Überexpression die IL-6 induzierte Aktivierung von STAT3 in epithelialen Zellen der Lunge ab (Gao et al., 2006).

### **5.2.27 CH25H** (Fold change: 5,59; Synonym: C25H; Chromosom:10, Lokalisation:10q23)

Bei CH25H (cholesterol 25- hydroxylase) handelt es sich um ein Gen ohne Introns, das Teile des Cholesterol- und Lipidmetabolismus reguliert. SNP's (single nucleotide polymorphisms) dieses Gens sind mit der Pathogenese der senilen Form der Alzheimer Erkrankung assoziiert (Gruppe et al., 2006; Laumet et al., 2010).

### **5.2.28 THBS1** (Fold change: 5,47; Synonyme: thrombospondin 1, TSP, THBS, TSP-1; Chromosom: 15, Lokalisation: 15q15)

Das durch THBS1 (thrombospondin 1) kodierte Protein ist ein adhäsives Glykoprotein, das sowohl Zell zu Zell- als auch Zell zu Matrix- Interaktionen vermittelt. Es spielt eine Rolle bei der Thrombozytenaggregation, der Angiogenese und Tumorgenese.

THBS1 ist ein potenter Inhibitor der Angiogenese. Bei einer Down-Regulation von THBS1, z.B. durch Onkogene wie Myc und Ras, konnte bereits bei einer Vielzahl von Tumoren ein gesteigertes Tumorwachstum gefunden werden. Demgegenüber bewirkt eine verstärkte THBS1 Expression, die durch den Tumorsuppressor p53 vermittelt wird, eine Inhibition der Angiogenese durch Verlangsamung der endothelialen Zellmigration und –proliferation sowie durch Apoptose induzierende Mechanismen (Ren et al., 2006). Zusätzlich bewirkt die THBS1 induzierte Aktivierung von TGF-beta (transforming growth factor beta) eine Verlangsamung der Tumorprogression (Kazerounian et al., 2008).

In atherosklerotischen Läsionen herrschen hypoxische Bedingungen durch die Verdickung der Arterienwand, sowie die Abnahme der Diffusionskapazität. Diese Bedingungen stellen Schlüsselfunktionen in der Progression der Atherosklerose dar (Osada-Oka et al., 2008). Unter derartigen Bedingungen steigt die Expression von HIF-1alpha, beispielsweise in glatten Muskelzellen von Koronararterien, zeitabhängig an. Konsekutiv finden sich erhöhte mRNA- und Protein Level von THBS1 sowie erhöhte mRNA Level des THBS1 Rezeptors Integrin beta3, was sich in einer Beschleunigung der Migration glatter Muskelzellen äußert (Takahashi et al., 2008).

THBS1 spielt eine Rolle bei der Neointimahyperplasie, dem vaskulären Remodeling und der intrakoronaren Thrombose, die die Hauptgründe für Restenosen nach perkutener koronarer Stentimplantation darstellen. THBS1 ist das Gen, das bereits 90 Minuten nach Stentimplantation am stärksten hochreguliert wird (Hoffmann et al., 2005).

**5.2.29 TNFA1P3** (Fold change: 4,97; Synonyme: A20, OTUD7C, MGC10452; Chromosom: 6, Lokalisation: 6q23)

TNFA1P3 (tumor necrosis factor alpha induced protein 3) wird den immediate early genes zugerechnet und wird sehr schnell durch den tumor necrosis factor (TNF) exprimiert. Das kodierte Protein ist ein Zink-Finger Protein, das sowohl die NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappaB)-Aktivität über einen negativen Feedback Mechanismus als auch die TNF vermittelte Apoptose, inhibiert (Shembade et al., 2007).

Eine unangemessene NF- $\kappa$ B Aktivität ist mit einer Vielzahl von entzündlichen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen verbunden, obwohl einige Mechanismen die rechtzeitige Termination sicherstellen sollen. Das TNFA1P3 Protein ist ein Schlüsselprotein für die angemessene Beendigung der NF- $\kappa$ B Wirkung. Demzufolge sind verschiedene Mutationen des TNFA1P3 Gens mit Erkrankungen wie Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematosus oder Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert (Verecke et al., 2009).

Die TNF induzierte Apoptose kann ebenfalls durch TNFA1P3 inhibiert werden. TNFA1P3 wirkt neuroprotektiv durch Inhibition der TNF induzierten postischämischen Apoptose neuronaler Zellen. Durch eine TNFA1P3 Gentransfer an Ratten, denen eine fokale zerebrale Ischämie zugefügt wurde, kam es zu einer Reduktion des Infarktareals sowie zu einem verbesserten neurologischen Outcome (Yu et al., 2006).

Zusätzlich vermindert TNFA1P3 die Proliferation glatter Muskelzellen über eine gesteigerte Expression von Cyclin abhängigen Kinase Inhibitoren. In vivo konnte nach adenoviraler TNFA1P3 Transfektion an Ratten eine geringere Neointimaproliferation sowie eine schnellere Reendothelialisierung nach Ballonangioplastie beobachtet werden (Patel et al., 2006).

**5.2.30 SGK1** (Fold change: 4,73; Synonyme: serum/gluocorticoid regulated kinase 1, SGK; Chromosom: 6, Lokalisation: 6q23)

SGK1 kodiert eine Proteinkinase, die eine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf Stress spielt, indem sie bestimmte Kalium-, Natrium- und Chloridionenkanäle aktiviert, die ihrerseits in die Regulation des Zellüberlebens, der neuronalen Erregbarkeit und der renalen Kaliumextraktion involviert sind (Pearce, 2003). Hohe Expressionsraten von SGK1 können zur Entstehung der diabetischen Nephropathie oder der arteriellen Hypertonie beitragen (Busjahn et al., 2002). Mineralokortikoide wie Aldosteron indizieren eine schnelle SGK1

Transkription, was zur Aktivierung renaler epithelialer Natriumkanäle führt (Wolf et al., 2006).

Die SGK1 wird einerseits durch Insulin aktiviert, ist aber andererseits auch in der Lage, die Expression verschiedener Transporter an der Zelloberfläche zu regulieren. So steigt z.B. die Aktivität des glucose transporters 4 (GLUT4) zeitgleich mit der wachsenden Abundanz der Transporter in der Plasmamembran an. SGK1 trägt also zur Insulin- und GLUT4-abhängigen Regulation der zellulären Glucoseaufnahme bei (Jeyaraj et al., 2007).

SGK1 ist ein Gen, das einen entscheidenden Einfluss beim Androgen Rezeptor abhängigen Überleben beim Prostatakarzinom hat. Eine SGK1 Überexpression führt zur Blockade des Androgen Rezeptors (AR) und dadurch zum apoptotischen Zelltod von AR positiven Prostatakarzinomzellen (Shanmugam et al., 2007).

**5.2.31 IER3** (Fold change: 4,64; Synonyme: IEX1, DIF2, PRG1, GLY96; Chromosom: 6, Lokalisation: 6p21.3)

Zellen brauchen koordinierte Genexpressionsprogramme, um sich an ständig wechselnde Umgebungsbedingungen anpassen zu können. IER3 wird durch multiple Transkriptionsfaktoren (unter anderem NF- $\kappa$ B, Sp1, c-Myc oder p53) reguliert, die eine schnelle, aber flüchtige IER3 Expression in Zellen, die mit veränderten Konditionen zurecht kommen müssen, gewährleisten (Wu, 2003). IER3 kann neben der Kontrolle des Zellwachstums und der vaskulären Intimahyperplasie auch die Apoptose beeinflussen. Dabei interagiert IER3 direkt mit Regulatoren der Apoptose, wie BAT3 oder TNF related apoptosis inducing ligand (Kumar et al., 2004).

Eine direkte Kontrolle der Zellproliferation durch IER3 wird dadurch erreicht, das Sp1 als Aktivator fungiert und die basale Transkriptionsrate erhöht, wohingegen das Tumorsuppressorgen p53 die Promotoraktivität unterdrückt (Im et al., 2002)

Der proapoptotische Effekt von G17 (gastrin 17) in einigen humanen Kolonkarzinom Zellreihen wird durch IER3 vermittelt, welches die NF- $\kappa$ B abhängige antiapoptotische Protektion moduliert und damit die Tumorsuppression verstärkt (Sebens-Müerköster et al., 2008).

Bei myelodysplastischen Syndromen zeigt sich, dass eine Reduktion der IER3 Expression zu ausgeprägter Apoptose mit konsekutiver hämatopoetischer Insuffizienz und eine Überexpression zu einer Progression der Erkrankung bis zur akuten Leukose führt (Steensma et al., 2009).

**5.2.32 CEBPD** (Fold change: 4,54; Synonyme: CELF, CRP3, C/EBP-delta, NF-IL6-beta; Chromosom: 8, Lokalisation: 8p11.2-p11.1)

Das CEBPD Gen kodiert einen Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor, der bei der unmittelbaren Antwort auf inflammatorische Stimuli, der Adipozytendifferenzierung und der Wachstumskontrolle von epithelialen Zellen der Brustdrüse eine Rolle spielt (Wang et al., 2005). Der single nucleotid polymorphism (SNP) 877C/T ist mit einer pathologischen Glucosetoleranz sowie einer Dyslipidämie, unabhängig von Alter, Geschlecht oder Fettleibigkeit, assoziiert (Kaji et al., 2008).

CEBPD ist wichtig für die Initiation und Aufrechterhaltung der Wachstumshemmung in der G(0) Phase des Zellzyklus. Ein Verlust der CEBPD Funktion ist mit einer karzinogenen Wirkung bei humanen Mammakarzinom Zellreihen assoziiert (Tang et al., 2006).

**5.2.33 GPR183** (Fold change: 4,50; Synonyme: EBI2, EBV-induced receptor 2; Chromosom: 13, Lokalisation: 13q32.3)

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPR) sind Rezeptoren in Zellmembranen, die Signale über GTP-bindende Proteine (G-Proteine) ins Zellinnere weiterleiten (Signaltransduktion). Strukturell sind die GPR`s durch einen heptahelikalen, das heißt mit 7 Helices in der Zellmembran verankerten, Aufbau gekennzeichnet (Hill, 2006). G-Protein gekoppelte Rezeptoren kommen ubiquitär vor, allein an kardiovaskulären Zellen werden über 100 GPR`s exprimiert (Tang et al., 2004).

Das GPR183 Gen stellt das am stärksten hochregulierte Gen in EBV (Epstein Barr Virus)-infizierten Zellen dar (Rosenkilde et al., 2006). Die genaue Funktion des GPR183 Gens ist aber letztlich unbekannt.

**5.2.34 RND1** (Fold change: 4,31; Synonyme: ARHS, RHO6, RHOS; Chromosom: 12, Lokalisation: 12q12-q13)

RND1 ist eines von drei Mitgliedern (RND1-3) der Rho GTP-ase Familie und reguliert die Organisation des Zytoskeletts in Abhängigkeit von extrazellulären Wachstumsfaktoren. Das Aktinzytoskelett spielt bei allen eukaryotischen Zellen eine fundamentale Rolle, da es ent-

scheidend für die Zellmorphologie, die Polarität und auch dynamische Prozesse, wie Zellmotilität und Phagozytose ist (Hall und Nobes, 2000).

RND1 wird hauptsächlich in Leber und Gehirn exprimiert, RND2 im Hoden, während RND3 zwar niedrig exprimiert wird, aber ubiquitär vorkommt. RND1 kontrolliert die Neuordnung des Aktinzytoskeletts und verhindert bei starker Expression in Fibroblasten die Formierung der Aktinfasern durch Abbau der Aktinfilamente sowie fokale Adhäsionsmechanismen (Nobes et al., 1998).

**5.2.35 TRIB1** (Fold change: 4,23; Synonyme: C8FW, GIG2, TRB1, SKIP1; Chromosom: 8, Lokalisation: 8q24.13)

TRIB1 ist ein Modulator der MAPK (mitogen-activated protein kinase)-kaskade. MAPK`s regulieren neben der Zellaktivierung, der Proliferation und der vaskulären Kontraktilität auch die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC, vascular smooth muscle cells)(Mii et al., 1996).

TRIB1 kontrolliert die VSMC Proliferation und Chemotaxis in vitro über den Jun kinase Weg, wobei TRIB1 und die Jun Aktivatorkinase MKK4/SEK1 direkt interagieren. Zusätzlich ist die Expression von TRIB1 in humanen atherosklerotischen Arterien, verglichen mit nicht verkalkten Gefäßen, deutlich erhöht, was auf eine Rolle von TRIB1 in der Zellbiologie glatter Gefäßmuskelzellen auch in vivo hindeutet (Sung et al., 2007).

**5.2.36 GEM** (Fold change: 4,49; Synonyme: KIR, MGC26294; Chromosom: 8, Lokalisation: 8q13-q21)

Das Protein, das durch dieses Gen kodiert wird, gehört zur RAD/GEM Familie der GTP-bindenden Proteine. Man kennt zwei Varianten, die das gleiche Protein kodieren und die durch alternatives Spleißen transkribiert werden. Das Protein wird an der Innenseite der Plasmamembran exprimiert und spielt eine Rolle bei der Rezeptor vermittelten Signaltransduktion (Splingard et al., 2007).

**5.2.37 ANKRD37** (Fold change: 4,12; Synonyme: Lrp2bp, MGC111507; Chromosom:4, Lokalisation: 4q35.1)

ANKRD37 kodiert ein Protein, das aus 158 Aminosäuren besteht und 4 Ankyrid Repeat-Proteine enthält, die für die Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sind (Li et al., 2006). ANKRD37 ist unter anderem an der Regulation wichtiger Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, beteiligt (Cockman et al., 2006).

Aktuell konnte ANKRD37 als HIF-1 (hypoxia inducible factor 1)- Target Gen identifiziert werden (Benita et al., 2009). Durch den HIF-1 werden eine Fülle von Hypoxie induzierten Reaktionen der Zelle kontrolliert, wie z.B. das Umschalten vom oxidativen zum glykolytischen Metabolismus, die Inhibition der Zellproliferation und die Stimulation von Erythropoese und Angiogenese (Wenger et al., 2005).

## 6. Diskussion

### 6.1 Diskussion der Literatur

In Deutschland werden jährlich ca. 100.000 Herzoperationen durchgeführt. Trotz der ansteigenden Zahl von Operationen ohne Herzlungenmaschine (OPCAB, off pump coronary artery bypass) gilt die Anwendung der Herzlungenmaschine (HLM) in Verbindung mit einem kardioplegischen Herzstillstand als Goldstandard (Shroyer et al., 2009).

Die HLM kommt bei > 90% der koronaren Bypassoperationen und nahezu allen anderen Operationen der Erwachsenenherzchirurgie zur Anwendung. Es ist seit langem bekannt, dass die extrakorporale Zirkulation zur Aktivierung proinflammatorischer Mechanismen führt, die in der Folge zu Störungen fast aller Organsysteme führen können (Sellke et al., 1997; Friedman et al., 1995). Der kardioplegische Herzstillstand ist mit koronaren Mikrozirkulationsstörungen (Wang et al., 1995), Ischämie/Reperfusionsschäden (Sellke et al., 1993), dem Auftreten eines Myokardödems, dem perioperativen Myokardinfarkt oder dem postoperativen Low output Syndrom assoziiert (Metais et al., 1999).

Erst die Weiterentwicklung der Microarraytechnologie und der molekularbiologische Wissenszuwachs der letzten Dekade haben es ermöglicht, Teile der zugrunde liegenden Pathomechanismen auf der Ebene der Genexpression zu erklären (Duggan et al., 1999). Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die differentielle Genexpression im Rahmen einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation am menschlichen Myokard zu untersuchen.

Das Transkriptionsmuster einer Zelle erfährt nach einer „extrazellulären Stimulation“ eine zweistufige Veränderung. Zuerst und innerhalb von Minuten werden die immediate early gene transkribiert. Diese initiale Antwort ist nicht von einer vorher stattfindenden Proteinsynthese abhängig, sondern wird durch präexistente Transkriptionsfaktoren vermittelt. Danach wird durch die Proteine der immediate early genes die Proteinsynthese der secondary response genes induziert, entsprechend verzögert durch den Translationsprozess der mRNAs der immediate early genes.

Es gibt in diesem Zusammenhang noch eine dritte Gruppe von Genen, die delayed primary response genes. Deren Expression wird, wie die der immediate early genes, ebenfalls nicht durch Proteine induziert. Die zeitliche Verzögerung der delayed primary response Gene ist



durch eine zeitliche Verzögerung der Transkriptionsinitiierung und durch eine spätere Transkriptprozessierung bedingt (Tullai et al., 2007).

Lyn et al. (2000) untersuchten Genexpressionsprofile nach Ischämie im Mäusemyokard. Im Tiermodell wurde der Ramus interventricularis anterior der anästhesierten und kontrolliert beatmeten Maus ligiert und damit distal der Ligatur eine komplette Ischämie mit signifikanten hämodynamischen Veränderungen erreicht. Eine halbe Stunde bis maximal 7 Tage nach Ischämiebeginn erfolgte die Entnahme des ischämischen Gewebes. Ein Maus-cDNA spotted array mit 588 Genen wurde benutzt, um die exprimierten Gene in der Herz-RNA zu detektieren. Die am stärksten hochregulierte Genexpression erfuhr EGR1 (early growth response 1). Die Expression stieg 3 Stunden nach Ischämiebeginn auf das Dreifache an. Der Zinkfingertranskriptionsfaktor EGR1 scheint extrazelluläre Signale durch Veränderung der Expression von Zielgenen in Langzeitantworten umzuwandeln (Thiel und Cibelli, 2002). Es sind insgesamt mehr als 300 Gene, deren Expression durch EGR1 signifikant beeinflusst wird (Fu et al., 2003).

EGR3 (early growth response 3), LKLF (Lung Krüppel-like factor) und KLF2 (Krüppel-like factor 2) zeigten bei den o.g. Untersuchungen von Lyn et al. (2000) eine weniger starke Expression.

In den ersten Genexpressionsanalysen in menschlichem Herzmuskelgewebe vor und nach ischämischem Herzstillstand und Reperfusion wurde bereits ein spezifisches Expressionsmuster mit Hochregulation von Aktivatoren der Entzündung, von Transkriptionsfaktoren und von Apoptose- und Stressgenen beschrieben (Ruel et al., 2003). Eine myokardiale Expressionserhöhung der Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun (Syn. FOS bzw. JUN), die als immediate early gene reguliert werden, wurde von Aebert et al. (1997) und Nelson et al. (2002) nach kardioplegischem Herzstillstand und Reperfusion berichtet. Die Proteine dieser beiden Protoonkogene bilden einen heterodimeren Komplex, das Aktivatorprotein 1 (AP-1). Dieses bindet an die AP-1 Erkennungsstelle der DNA und kontrolliert die basale und induzierbare Transkription verschiedener Gene. Beide, FOS und JUN, ließen sich auch schon durch ischämisches Präkonditionieren des Herzens (2x5 min Ischämie / 10 min Reperfusion im Nager-Tiermodell) hochregulieren (Kingma, 1999).

Darüber hinaus berichten Yao et al. (1995) eine Hochregulation von MYC (c-Myc myeomatos viral oncogene homolog) durch myokardiale Ischämie. Das Protein Myc kann seine bio-

logischen Aktivitäten (Transformation, Apoptose und transkriptionelle Aktivierung von Genen) nur dann entfalten, wenn es mit dem Protein Max dimerisiert. Das Heterodimer kann dann an die DNA binden. Myc kann ungefähr an 10 % der Gene innerhalb des menschlichen Genoms binden und wahrscheinlich ihre Expression beeinflussen (Fernandez et al., 2003).

Voisine et al. (2004) untersuchten den Einfluss von extrakorporaler Zirkulation und kardioplegischem Herzstillstand auf die myokardiale Genexpression von insulinpflichtigen Diabetikern im Vergleich zu Nicht Diabetikern. Hierzu wurden intraoperativ von jeweils 5 Patienten aus jeder Gruppe Gewebeproben aus dem rechten Vorhof, unmittelbar vor und nach dem kardioplegischem Herzstillstand, entnommen. Nach Isolation der RNA, Prozessierung und Hybridisierung der Microarrays wurden Genexpressionsprofile erstellt und miteinander verglichen.

Insgesamt wurden in der Gruppe der Nicht Diabetiker 480 hochregulierte Gene identifiziert, im Gegensatz zu 851 hochregulierten Genen in der Gruppe der Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus. Eine über 4-fach erhöhte differentielle Genexpression konnte bei 28 Genen der Diabetikergruppe und bei 27 anderen Genen der Nicht- Diabetikergruppe gefunden werden. Zusätzlich fanden sich 17 Gene, die in beiden Gruppen gleichermaßen überexprimiert waren.

Bei den in beiden Gruppen hochregulierten Genen handelte es sich im Wesentlichen um früh exprimierte Transkriptionsfaktoren wie EGR3 (early growth response 3) oder CYR61 (cysteine-rich angiogenetic inducer 61) sowie um Mediatoren inflammatorischer Reaktionen wie IL6 (Interleukin 6), SELE (E-Selectin) und CCL2 (chemokine C-C motif ligand 2, Syn: MIP-1).

Ein ähnliches Expressionsmuster konnte bei den Genen, die nur bei Diabetikern exprimiert wurden, gefunden werden. Es wurden Transkriptionsfaktoren wie MYC (c-Myc myelomatosis viral oncogene homolog) und JUN, aber auch potente Mediatoren der Inflammation wie IL8 (interleukin 8) und IL1B (interleukin 1B) exprimiert. Zusätzlich waren VEGF (vascular endothelial growth factor) und IRS1 (insulin receptor substrate 1) exprimiert, was eine wichtige Rolle bei der Insulinwirkung und der Regulation des IGF (insulin-like growth factor) spielt. Demgegenüber waren in der Gruppe der Nicht-Diabetiker vor allem Regulatoren des Zellzyklus wie RBL1 (retinoblastoma-like 1), CDC2L1 (Syn: CDK11B, cyclin-dependent kinase 11B) und STK38 (serine/threonine kinase 38) sowie Mediatoren von Apoptosemechanismen wie CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), exprimiert.

In einer weiteren Untersuchung der Genexpression vor und nach kardioplegischem Herzstillstand (n=5) fanden sich 81 Gene im Myokard mit unterschiedlicher Expression (Arab et al., 2007). Nachweisbare Veränderungen der mRNA Spiegel verschiedener Gene fanden sich etwa eine Stunde nach Klemmen der Aorta ascendens. Die hochregulierten Gengruppen bestanden aus immediate early response genes und Genen für die Regulierung zellulärer Hypertrophie, Reparatur und Apoptose. Die Ergebnisse werden als Antwort auf den kardioplegischen Herzstillstand interpretiert und den hochregulierten Genen werden zytoprotektive Eigenschaften zugesprochen.

EGR1 (early growth response 1) kodiert für ein nukleäres Protein, dessen Funktion in der transkriptionellen Regulierung liegt. Das Gen zeigte nach Ischämie und Reperfusion eine erhöhte Expression und die Autoren schreiben ihm eine zentrale Rolle bei der Zellprotektion nach nicht-letaler Ischämie zu (Arab et al., 2007; Simkhovich et al., 2003).

Arab et al. (2007) fanden darüber hinaus erhöhte Expressionen der Wachstumsfaktoren IGF1 (Insulin-like growth factor 1) und VEGF (vascular endothelial growth factor), des IGF1 –Rezeptors und von Komponenten der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) - Signalkaskade. Eine Aktivierung dieser Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren wird von verschiedenen Autoren als kardioprotektiv gegen Ischämie/Reperfusionsschaden angesehen (Hausenloy und Yellon, 2004; Davani et al., 2003).

Arab et al. (2007) fanden in ihrer Untersuchung weiterhin, dass der ischämische Herzstillstand Pfade der ischämischen Präkonditionierung aktivierte. Die Hauptrolle hierbei spielte die Proteinkinase B (PKB), die durch PI3K aktiviert wird bzw. deren Produkt von der Proteinkinase B als Anker an der Zellmembran benutzt wird. Dieses Andocken der PKB an der Membran setzt eine Transduktionskaskade in Gang, die letztendlich die Hemmung verschiedener Apoptose auslösender Effektorproteine bzw. die Aktivierung der Transkription von Apoptose-Inhibitorproteinen (Caspase-9, FH (Forkhead) Transkriptionsfaktor, cAMP responsive element binding protein, NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), BAD (Bcl-2-Antagonist of Cell Death)) bewirkt (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000).

SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1) wird in verschiedenen menschlichen Geweben exprimiert, am höchsten aber im Myokard und es zeigte sich eine weitere Hochregulierung nach myokardialer Ischämie (Arab et al., 2007). Die SFRPs sind eine Familie von Glykoproteinen. Sie scheinen an postischämischen Reparaturprozessen beteiligt zu sein (Barandon et al., 2004).

Insgesamt kommt die Studie von Arab et al. (2007) zum Ergebnis, dass die transkriptionelle Antwort des Myokards auf Ischämie/Reperfusion kompensatorisch und adaptiv ist.

Gabrielsen et al. (2006) untersuchten mittels Microarray Analyse die globale Genexpressionsänderung in linksventrikulärem Myokard als Folge einer akuten und einer chronischen ischämischen Schädigung. Es wurden dazu Proben gut perfundierten Myokards und chronisch ischämischen Myokards desselben Patienten während und nach kardioplegischem Herzstillstand wegen einer chirurgischen Myokardrevaskularisierung (n=14) entnommen. Die durch akute Ischämie in gut perfundiertem (und nicht chronisch ischämischem) Myokard hochregulierten Gene wurden nach ihrer Funktionalität in Gruppen geordnet. Entsprechend der Gene Ontology database, Affymetrix (NetAffx) query database, war die Hauptgruppe der hochregulierten Gene in die Regulation der transkriptionellen Aktivität und die Signalübertragung in den Zellkern involviert: AP1 (activator protein 1), ATF (activating transcription factor), EGR (early growth response) -Signalwege; NR4A (nuclear subfamily 4, group A) und KLF's (Krüppel-like factors).

Einige der hochregulierten Gene konnten Prozessen, die Entstehung von Entzündung und Chemotaxis fördern, zugeordnet werden: IL6 (Interleukin-6), Calgranulin A, IL8 (interleukin-8), CYR61 (cystein rich angiogenic inducer 61), VCAM1 (vascular cell adhesion molecule-1), MCP1 (monocyte chemotactic protein-1, Syn.: CCL2), CCL3 (Chemokine (C-C motif) ligand 3) und CCL 8 (Chemokine (C-C motif) ligand 8). Andere zeigten sich als Inhibitoren der Zellproliferation und der Apoptose: GADD45 Familie (growth arrest and DNA damage genes).

Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression der Metalloproteasenaktivität ADAMTS1 und ADAMTS9 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 und 9), MMP 9 (matrix metalloproteinase 9) und der intrazellulären Phosphatasenaktivität DUSP1, DUSP2, DUSP5 (dual specificity protein phosphatase 1, 2 und 5) gefunden.

Das Muster der Genexpression im chronisch ischämischen Myokard war unterschiedlich und durch ein „remodelling“ der extrazellulären Matrix mit Synthese verschiedener Kollagentypen und eine Hochregulierung von Wachstumsfaktoren CTGF (connective tissue growth factor), PDGF-D (platelet derived growth factor D), IGF1 (insulin-like growth factor 1), LTB2 (latent TGF-beta binding protein 2) gekennzeichnet.

Zusammengefasst fanden Gabrielsen et al. (2007) nach akutem ischämischen Schaden durch kardioplegischem Herzstillstand vor allem eine frühe Hochregulation von immediate early response genes, die die transkriptionelle Aktivität der Zelle kontrollieren. Darüber hinaus kam es zur Induktion einer Expression von inflammatorischen Genen, von Genen, die Proliferation

und Apoptose beeinflussen und von Genen, deren Signale die extrazelluläre Matrix beeinflussen.

Der alleinige Einfluss der Herzlungenmaschine auf die differentielle kardiale Genexpression wurde tierexperimentell an Ratten untersucht (Podgoreanu et al., 2005). Nach Randomisierung von 6 Versuchstieren wurde bei 3 Tieren eine normotherme, nicht pulsatile extrakorporale Zirkulation durch Punktion der Vena jugularis (venöser Abfluß) und der ventralen Schwanzarterie (arterieller Zufluß) etabliert. Es wurden weder eine Sternotomie noch eine Manipulation am Herzen, ein Klemmen der Aorta ascendens oder ein kardioplegischer Herzstillstand durchgeführt. Nach 90 minütiger extrakorporaler Zirkulation wurden die Herzen in toto entnommen, um anschließend cDNA Microarray Analysen von insgesamt 2343 Genen durchzuführen. Dabei konnte eine Hochregulation bei 17 von 42 differentiell exprimierten Genen gefunden werden.

Zu diesen Genen gehören VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) und SELP (selectin P), die Zytokin Rezeptoren IL6RA und gp130 (IL6ST, interleukin 6 signal transducer), proinflammatorische Chemokine wie IP10 (chemokine (C-X-C motif) ligand 10) sowie inflammatorische Enzyme wie Phospholipase A2. Interessanterweise enthalten alle diese Gene NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) Bindungsmotive an ihren Promotorregionen, so dass eine Koregulation durch NF- $\kappa$ B angenommen werden kann.

Die NF- $\kappa$ B Familie der Transkriptionsfaktoren besteht aus verschiedenen Homo- und Heterodimeren (p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, RelB), wobei p50 und p52/RelA die häufigsten aktiven Formen darstellen (Valen et al., 2001). Die NF- $\kappa$ B Dimere liegen im Zytoplasma in ihrer inaktiven Form, gebunden an I $\kappa$ B (inhibitor of kappa B) Proteine, vor (Thurberg et al., 1998). Die N-terminalen Serinreste von I $\kappa$ Ba und I $\kappa$ Bb werden als Antwort auf unterschiedliche Stimuli phosphoryliert, was zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. NF- $\kappa$ B transloziert daraufhin in den Zellkern, bindet dort an Promotor- oder Enhancerregionen verschiedener Gene und initiiert dadurch die Transkription (Chen et al., 1999).

Es ist beschrieben, dass NF- $\kappa$ B nach myokardialer Ischämie und Reperfusion sowie nach herzchirurgischen Eingriffen mit kardioplegischem Herzstillstand aktiviert wird (Valen et al., 2001). Dabei zeigt sich eine biphasische Aktivierung mit Gipfeln nach 15 Minuten und 3 Stunden, wobei dieser zweite Anstieg durch eine konsekutive Aktivierung proinflammatorischer Zytokine als Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS)

zurückzuführen ist (Chandrasekar et al., 1997). NF- $\kappa$ B spielt darüber hinaus eine positive Rolle bei der ischämischen Präkonditionierung (Morgan et al., 1999).

Als ischämische Präkonditionierung (IP) des Herzens bezeichnet man die Reaktion des Myokards auf kurze ischämische Episoden, die nicht ausreichen, um einen Zelltod zu verursachen, aber die Widerstandsfähigkeit des Myokards für folgende schwerere Ischämien erhöhen (Murray et al., 1986). Eine Reduktion der Infarktgröße und eine schnellere hämodynamische Stabilisierung nach ischämischer Präkonditionierung konnten sowohl im Tiermodell (Yellon et al., 2003) als auch beim Menschen nach operativer Myokardrevaskularisation nachgewiesen werden (Wu et al., 2000; Wu et al., 2002). Es kommt hierbei zu einer biphasischen Protektion, weswegen man die akute oder frühe Phase der ischämischen Präkonditionierung nach ca. 1-2 Stunden von der Spätphase nach 24 Stunden bis zu 2 Tagen unterscheidet.

In beiden Phasen der IP werden die Proteinkinasen Tyrosinkinase, Proteinkinase C und p38 MAPK aktiviert, was letztlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (Xuan et al., 1999). Myokardial protektive Effekte nach NF- $\kappa$ B Aktivierung entstehen dann entweder durch Downregulation der Inflammation während der Reperfusion (Morgan et al., 1999) oder durch eine Reduktion der Apoptose durch die NF- $\kappa$ B abhängige Hochregulation von kardialem BCL2 (Maulik et al., 1998). Ob HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor alpha) eine Rolle bei der IP spielt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Cain et al. (2008) im Tierversuch an Mäusen eine Verbesserung der LV-Funktion und eine Reduktion der Infarktgröße nach ischämischer Präkonditionierung beobachteten, profitierten HIF-1 $\alpha$  Knockout Mäuse nicht, blieben HIF-1 $\alpha$  und die meisten seiner Target Gene (Erythropoietin, VEGF-A, HOX-1) beim Menschen nach ischämischer Präkonditionierung unverändert (Czibik et al., 2008).

Die COX (Cyclooxygenase)-2 ist ein Schlüsselmediator der Spätphase der ischämischen Präkonditionierung (Shinmura et al., 2000) durch Aktivierung von JAK1 und 2 (Janus Kinase 1 und 2) sowie STAT3 und 5 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3 und 5) Signalkaskaden, was unter anderem die COX2 Expression steigert (Xuan et al., 2005).

### **6.1.1 Literaturvergleich**

Im Folgenden werden die bislang maßgeblichen Veröffentlichungen zum Thema myokardiale Genexpression im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe beim Menschen (Ruel et al., 2003; Voisine et al., 2004; Gabrielsen et al., 2006; Arab et al., 2007) und im Tiermodell (Podgore-

anu et al., 2005) mit den eigenen Ergebnissen verglichen. Dabei wurden Patientenkollektive von n=5 (Arab et al., 2007) bis maximal n=16 (Ruel et al., 2003) untersucht.

Bei 21 von 50 hochregulierten Genen der eigenen Untersuchung wurde bislang kein Zusammenhang zwischen Ischämie/Reperfusion und einer differentiellen Genexpression beschrieben. Die meisten dieser Gene (n=10) sind mit der Molekularfunktion der „Signaltransduktion“ assoziiert. Die anderen Gene lassen sich den Gruppen „Zyokine/Inflammation“ (n=3), „Growth arrest/ Apoptose“ (n=3), „transkriptionelle Regulation“ (n=3) und „extrazelluläre Matrix/ Remodelling“ (n=2) zuordnen.

Nr.	Eigene Daten 2009 (n=8)	Ruel et al. 2003 (n=16)	Voisine et al. 2004 (n=10)	Podgoreanu et al. 2005 (n=6)	Gabrielsen et al. 2006 (n=6)	Arab et al. 2007 (n=5)
1.1	FOS B	x	x			
1.2	FOS	x	x		x	
2.1	IL 6		x		x	
2.2	IL 8		x		x	
2.3	IL1B		x			
3	ATF 3	x	x		x	
4.1	NR4A 2		x		x	
4.2	NR4A3	x	x		x	
4.3.	NR4A1	x	x		x	
5.1	CXCL2		x			
5.2	CCL2		x		x	
5.3	CCL3L3					
5.4	CCL8				x	
6.1	RGS1					
6.2	RGS2					
7.1	EGR2	x	x		x	
7.2	EGR1				x	x
7.3	EGR3		x		x	
8.1	ZFP36	x	x			
8.2	ZNF331					

Nr.	Eigene Daten 2009 (n=8)	Ruel et al. 2003 (n=16)	Voisine et al. 2004 (n=10)	Podgoreanu et al. 2005 (n=6)	Gabrielsen et al. 2006 (n=6)	Arab et al. 2007 (n=5)
9	APOLD1					
10	PTGS2					
11	SNF1LK					
12.1	JUNB	x	x		x	
12.2	JUN		x		x	x
13	SLC2A3	x	x			
14	MYC	x	x		x	
15	CDKN1A	x	x			
16	CYR61	x	x		x	x
17	ADAMTS1				x	
18	BTG2	x	x			
19	KLF4		x		x	
20	MAFF		x		x	
21	FAM148B					
22	SELE	x	x			
23	OLR1					
24	DUSP5	x			x	
25	GADD45B				x	
26	SOCS3					
27	CH25H					
28	THBS1					
29	TNFAIP3					
30	SGK1					
31	IER3					
32	CEBPD					
33	GPR183					
34	RND1					
35	TRIB1					
36	GEM					
37	ANKRD37					

**Tabelle 4** : Literaturvergleich

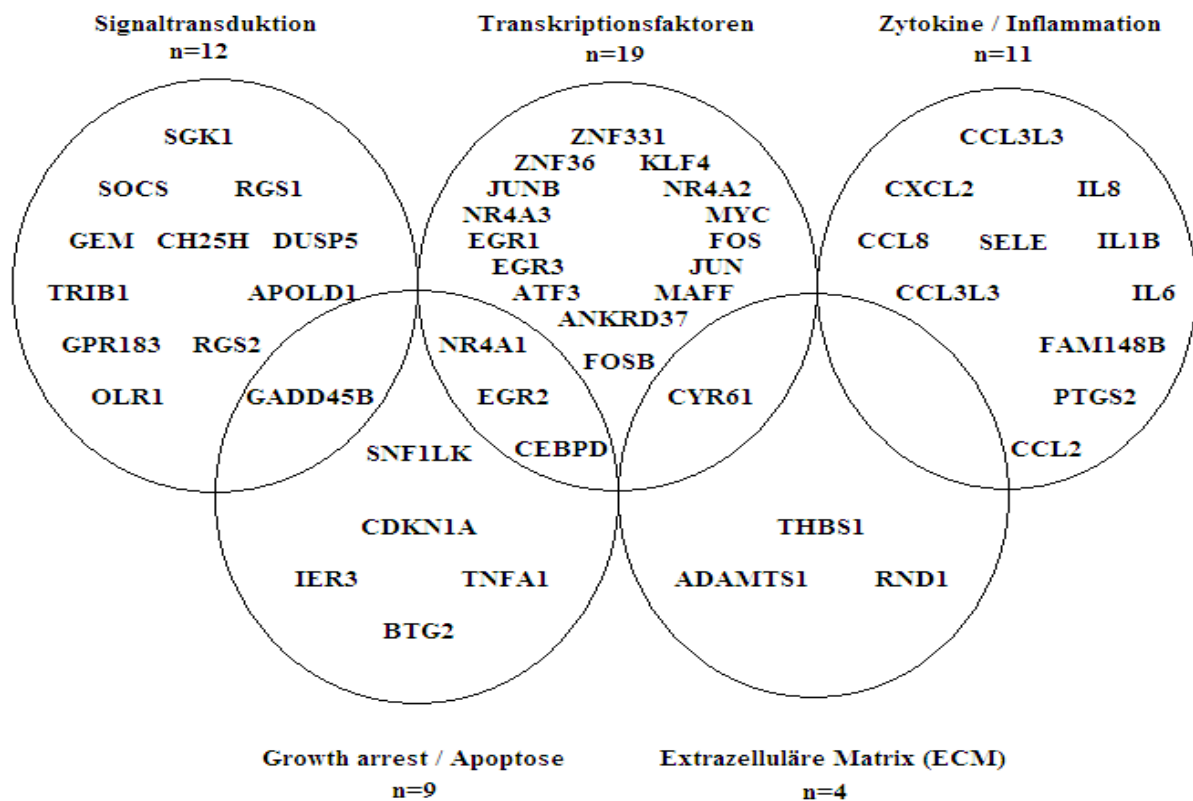


## 6.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden Genexpressionsprofile aus rechtsatrialen Myokardbiopsien von 8 Patienten erstellt, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation unterziehen mussten. Es wurden pangenomische Microarray basierte Analysen nach dem Gene Expression on Sentrix® Arrays Direct Hybridization System Manual der Firma Illumina® (San Diego, CA, USA) durchgeführt. Durch die gewählten Entnahmezeitpunkte -unmittelbar vor der Kardioplegiegabe und nach Beenden der Reperfusion- konnte insbesondere der Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die differentielle Genexpression am menschlichen Myokard untersucht werden.

Von den insgesamt etwa 30000 Genen des haploiden menschlichen Genoms konnten Genexpressionsprofile von 413 Genen erstellt werden, von denen 102 mit einem negativen Fold change zwischen 0 und -1,85 supprimiert waren. 311 Gene waren mit einem Fold change  $> 2$  nach Ischämie und Reperfusion hochreguliert. Literaturangaben zufolge sollten Gene, die bei DNA microarrays bezüglich ihrer differentiellen Expression einen Fold change zwischen 2 und 4 aufweisen mit einer real time RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) abgesichert werden (Rajeevan et al., 2001; Morey et al., 2006). In Untersuchungen von Rajeevan et al. (2001) konnten „nur“ 17 von 21 Genen (71%) validiert werden, die in einem Fold change zwischen 2-4 lagen. Demgegenüber ist allgemein akzeptiert, dass qualitätskontrollierte und normierte Daten von cDNA microarrays mit einem Fold change  $> 4$  eine exzellente Konkordanz mit der quantitative real time polymerase chain reaction (q-PCR,  $r=0,94$ ) aufweisen (Beckmann et al., 2004). Wir haben bei unseren eigenen Untersuchungen auf die Validierung durch eine PCR verzichtet, dafür aber die Signifikanzgrenze bei einem Fold change  $> 4$  angesetzt.

Nach diesem Kriterium waren 50 der 413 differentiell exprimierten Gene mit einem Fold change  $>4$  signifikant überexprimiert. Diese 50 nach Ischämie und Reperfusion deutlich hochregulierten Gene konnten anhand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt werden. Die Klassifizierung wurde mittels der NCBI RefSeq Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>) und der NCBI Unigene Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) vorgenommen. Es erfolgte eine Einteilung in 5 Gruppen, wobei 5 Gene anhand funktioneller Gesichtspunkte jeweils 2 Gruppen zugeordnet werden konnten.



**Schema 2:** Gruppeneinteilung der hochregulierten Gene mit Fold change > 4 (Verhältnis vor vs. nach Ischämie und Reperfusion) im menschlichen Myokard.

### 6.2.1 Zytokine/ Inflammation

Der Sauerstoffmangel in ischämischem Gebiet führt zu vermehrtem ATP Abbau. Dadurch konvertiert die Xanthindehydrogenase zur Oxidase. Während der Reperfusion steht wieder Sauerstoff zur Verfügung, der dann mit dem aus ATP entstandenem Hypoxanthin zu Harnsäure und Sauerstoffradikalen reagiert (Sauerstoffparadoxon).

Die Schädigung des endoplasmatischen Reticulums durch Sauerstoffradikale führt zur Kalziumüberlastung der Zelle, wodurch das mitochondriale Membranpotenzial zusammenbricht. Durch die Reperfusion werden angehäuften sauren Metaboliten abtransportiert und der pH normalisiert sich. Protektive Mechanismen, die während einer Azidose wirken, werden dann wie-

der eingestellt und es kommt zu weiterer Schädigung der Zelle (pH Paradoxon) (Vajdovich, 2008).

Die Zellschädigung, insbesondere die Endothelschädigung durch Ischämie/Reperfusion führt zu Komplementaktivierung, Zytokininduktion und schließlich zu Aktivierung und Migration von neutrophilen Granulozyten. Die Emigration von immunkompetenten Zellen erfolgt in den Schritten: Rollen – Aktivierung – Adhäsion – Diapedese und benötigt Selectine, Chemokine, Integrine und ihre Liganden.

Zytokine sind lösliche Polypeptide mit lokaler Wirkung und kurzer Halbwertszeit. Das regionale Zytokinspektrum beeinflusst die regionalen Zellen und ihre Funktionen. Zytokine werden sowohl von Zellen des Immunsystems als auch von Zellen außerhalb des Immunsystems sezerniert. Sie regeln Aktivierung, Differenzierung, Wachstum und Tod verschiedener Zelltypen. Die resultierende Wirkung ergibt sich einerseits aus der Kombination der regionalen Zytokine und andererseits aus dem vorliegenden Muster der Rezeptoren, die von den Zytokinen ligiert werden.

Die Gruppe der Zytokine besteht aus den Zytokinfamilien der Interleukine, Interferone, Chemokine, Cytotoxine, Wachstumsfaktoren und Kolonie stimulierenden Faktoren. Zytokine wirken im Konzert und sowohl pleiotrop, redundant und synergistisch als auch antagonistisch (Schütt und Bröker, 2006).

Kardiochirurgische Operationen können eine systemische Entzündungsreaktion auslösen, die mit postoperativ erhöhten Zytokinplasmaspiegeln (u.a. IL1, IL6, IL8, TNF $\alpha$ ) einhergeht und konsekutiv zu Endorganschäden und einer erhöhten postoperativen Morbidität und Mortalität führen kann (Levy und Tanaka, 2003). Obwohl der Anschluss der extrakorporalen Zirkulation durch die Herzlungenmaschine (HLM) als bedeutendster Einzelfaktor bei der Auslösung eines SIRS (systemic inflammatory response syndrome) gilt, wird der mögliche Benefit von Operationen ohne HLM (OPCAB, off pump coronary artery bypass) kontrovers diskutiert. Laut Schulze et al. (2000) verläuft das SIRS bei OPCAB Operationen häufig abgemildert, was sich neben klinischen Parametern (Herzfrequenz, Blutdruck, Atemfrequenz, Körpertemperatur, Anzahl der weißen Blutkörperchen etc.) auch in einer geringeren Expression proinflammatorischen Zytokine wie IL6, sIL2R und TNF- $\alpha$  äußert. Auf der anderen Seite war bei Untersuchungen von Tatoulis et al. (2006) die Inzidenz von niedrigem systemischen Gefäßwiderstand, mittlerem postoperativen Herzindex und postoperativem Katecholaminbedarf beim Vergleich ON-Pump- vs. OFF-Pump- Bypassoperation nicht signifikant unterschiedlich. Sicher zu sein scheint, dass die absoluten Serumkonzentrationen der in die Pathophysiologie

des SIRS involvierten Zytokine keine zuverlässigen Indikatoren für die Schwere des SIRS sind und daher auch keine Vorhersage des klinischen Verlaufs erlauben (Yun et al., 2007).

Diese Erkenntnisse stehen im Widerspruch zu aktuellen genomischen Microarray basierten Untersuchungen. Hier konnte gezeigt werden, dass bei Bypassoperationen mit HLM und kardioplegischem Herzstillstand, neben der Hochregulation von Apoptose- (GADD45B) und Prostaglandinsynthesegenen (PTGS2), vor allem proinflammatorische Gene (CCL3, CCL4) überexprimiert werden (Ghorbel et al., 2010).

Eine Hochregulation proinflammatorischer Gene im Rahmen einer elektiven koronaren Bypassoperation mit kardioplegischem Herzstillstand wurde erstmalig 2003 von Ruel et al. und 2004 von Voisine et al. beschrieben. Im Tierversuch konnte darüber hinaus eine Ischämie unabhängige Hochregulation proinflammatorischer Interleukingene (u.a. IL6RA, IP10) in Verbindung mit erhöhten Zytokin Plasmaspiegeln (IL6, IL10) gefunden werden (Podgoreanu et al., 2005).

Interleukine sind lösliche Polypeptide aus der Zytokinfamilie mit lokaler Wirkung und einer Halbwertszeit von einigen Minuten. Monozyten gelten als Hauptproduzenten von Zytokinen. Allerdings können sie auch von Zellen außerhalb des Immunsystems sezerniert werden.

**IL6** (Fold change FC=52,54), **IL8** (FC=50,74) und **IL1B** (FC=7,01) zählen bei den eigenen Untersuchungen zu den am stärksten hochregulierten Genen nach Ischämie und Reperfusion im menschlichen Myokard.

### **IL6 (Interleukin 6)**

IL6 ist in der Abfolge der Entzündungskaskade dem TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) untergeordnet. Bei einer akuten Entzündungsreaktion wird das Gewebe zunächst durch neutrophile Granulozyten infiltriert. Dabei steigt mit dem Grad der Infiltration die lokale Konzentration des löslichen IL6 Rezeptors (sIL-6R), was zu einer Begrenzung der Akkumulation neutrophiler Granulozyten und zur Anlockung von CD3+-T-Lymphozyten führt (Jones et al., 2005).

Darüber hinaus ist bei der ischämischen Präkonditionierung IL6 obligatorisch für die Aktivierung des myokardialen JAK/STAT Pfades, die anschließende Hochregulation von iNOS (inducible nitric oxide synthase) und COX-2 (Cyclooxygenase) - einem Komediator der Spätphase der ischämischen Präkonditionierung - und der damit verbundenen Entstehung eines kardioprotektiven Phänotyps (Dawn et al., 2004).

### **IL1B (Interleukin 1, beta)**

IL1B triggert über den aktivierten IL1R (receptor )1 in Endothelzellen die Transduktion der COX (Cyclooxygenase)-2 und führt darüber zu einer vermehrten Bildung von Prostaglandin E2. Außerdem wird die Ausschüttung corticotroper Releasinghormone im Hypothalamus gefördert, was über eine ACTH-Stimulation eine Kortisonausschüttung in den Nebennieren bei Entzündungsreaktionen bewirkt (Rivest et al., 2000). IL1B steht neben TNF $\alpha$  am Anfang der inflammatorischen Kaskade. Beide werden daher oft als early response cytokines bezeichnet. Sie aktivieren neben Makrophagen auch Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, die ihrerseits wieder inflammatorische Zytokine produzieren (Geiser, 1999).

### **PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)**

PTGS2 ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese, indem es die Synthese von Prostaglandin H2 aus Arachidonsäure katalysiert (Smith et al., 1996). Prostaglandin H2 fördert die Entzündungsreaktion. Tierexperimentell konnten PTGS2 vermittelte kardioprotektive Effekte in der späten Phase der ischämischen Präkonditionierung nachgewiesen werden (Shinmura et al., 2000). Beim Menschen ist bislang kein kardioprotektiver Effekt oder eine Änderung der Genexpression nach Ischämie/Reperfusion beschrieben.

### **FAM148B (family with sequence similarity 148, member B)**

Dem ebenfalls deutlich überexprimierten FAM148B Gen wird eine Rolle bei der Reaktion auf inflammatorische Reize, die zur Zunahme der vaskulären Permeabilität führen, zugesprochen (Warton et al., 2004). Seine Expression ist nach Behandlung mit IL1B (interleukin 1 $\beta$ ) deutlich erhöht. Ein direkter Zusammenhang über eine Expressionsänderung nach Ischämie/Reperfusion ist bislang nicht beschrieben.

### **SELE (selectin E)**

Nach ihrer Synthese und Freisetzung induzieren die inflammatorischen Zytokine, zu denen neben TNF $\alpha$  auch IL1B zählt, die Expression von membrangebundenen Glykoproteinen, den Selektinen, welche unter anderem die Einwanderung von neutophilen Granulozyten und Monozyten aus der Blutbahn in das von der Entzündung betroffene Gewebe vermitteln. In der Folge führt eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und Selektin E zum sogenannten rolling der Leukozyten über das Endothel (Geiser, 1999).

SELE ist daher als ein Marker der endothelialen Dysfunktion anzusehen (Zak et al., 2008). Eine erhöhte Expression von SELE (und IL8) konnte in Hautbiopsien bereits nach minimalem Trauma festgestellt werden (Takeuchi et al., 2003).

Von den Zytokinen waren neben oben genannten Interleukinen auch Vertreter der **Chemokine (CCL2, CCL8, IL8, CCL3L3, CXCL2)** mit einem durchschnittlichen Fold change von 4,96 nach Ischämie und Reperfusion deutlich hochreguliert. Die beiden Hauptgruppen, CXC- und CC-Chemokine, unterscheiden sich durch die Position der beiden ersten Cysteine (C), die entweder durch eine Aminosäure (X) getrennt oder direkt benachbart sind (Baggiolini et al., 1997).

### **IL8 (Interleukin 8)**

IL8 ist der Hauptvertreter der CXC-Chemokine. IL8 ist in die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten -insbesondere neutophilen Graulozyten- involviert und wird im Wesentlichen von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Durch die Förderung der Migration von Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix ist IL8 darüber hinaus an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt und stellt somit einen Angiogenesefaktor dar (Brat et al., 2005).

### **CXCL2 (chemokine (C-X-C motif) ligand 2, Synonym: MIP2)**

Auch CXCL2 ist für die Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich, wobei ortsständige Gewebsmakrophagen als die Hauptquelle für die Synthese von CXCL2 gelten (De Filippo et al., 2008).

### **CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2, Synonym: MCP1)**

Das Zytokin, das durch das CCL2- Gen kodiert wird, zeigt chemotaktische Aktivitäten für Monozyten und Basophile, nicht aber für Neutrophile und Eosinophile. Hohe CCL2 Level spielen auch eine Rolle bei der Initiation und Progression der Atherosklerose (Amasyali et al., 2009). Bei Untersuchungen von Gessler et al. (2004) an 40 pädiatrischen kardiochirurgischen Patienten fand sich zudem ein Zusammenhang zwischen postoperativ erhöhten CCL2 Serumkonzentrationen und einer reduzierten LV-funktion und deutlich erhöhtem Katecholaminbedarf.

Einen potentiell protektiven Effekt fanden Park et al. (2008) bei Patienten mit akuten Myokardinfarkt, die keine Reperfusionstherapie innerhalb der ersten 24 Stunden erhalten hatten.

Hier führte eine CCL2 Überexpression zu einer signifikant gesteigerten Ausbildung von Kollateralgefäßen in der frühen Phase des akuten Myokardinfarktes.

#### **CCL8 (chemokine (C-C motif) ligand 8)**

Das durch CCL8 kodierte Protein zeigt chemotaktische Aktivität für Monozyten, Lymphozyten, Basophile und Eosinophile. Dadurch kann CCL8 z.B. zur Tumor assoziierten Leukozyteninfiltration beitragen. Eine Hochregulation von CCL8 nach Ischämie/Reperfusion am Herzen wurde bislang nur von Gabrielsen et al. (2006) beschrieben.

#### **CCL3L3 (chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3)**

Das durch CCL3L3 (Syn.:LD78) kodierte Protein ist ein Mitglied der C-C Familie der Chemokine. Es wird von aktivierten T-Zellen und Makrophagen sezerniert und zeigt chemotaktische Aktivitäten für Leukozyten (Ritter et al., 1995). Für CCL3L3 gibt es in der Literatur bislang keine Hinweise auf Expressionsänderungen unter dem Einfluss von Ischämie und Reperfusion.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nicht einzelne Zytokine den Verlauf einer entzündlichen Reaktion prägen, sondern vielmehr die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bzw. Zytokininhibitoren ausschlaggebend ist. Insgesamt scheint die kurzzeitige stressinduzierte Expression von Zytokin kodierenden Genen eine positiv adaptive Rolle zu spielen, während die lang andauernde, chronische Expression maladaptive Prozesse mit Funktionseinschränkungen bis hin zur kardialen Dekompensation verursachen kann (Mann, 2003).

Somit stellt die inflammatorische Antwort des Herzens nach kardioplegischem Herzstillstand eine mögliche Verbindung zwischen der akuten Schädigung durch Ischämie und einem chronischen Remodelling des Myokards dar (Gabrielsen et al., 2006).

### **6.2.2 Growth arrest/Apoptose**

#### **GADD45B (growth arrest and DNA-damage inducible, beta)**

Die Expression von GADD45B in der Zelle steigt als Antwort auf Exposition mit DNA-schädigenden Noxen und einer konsekutiven NF- $\kappa$ B Aktivierung. Sie führt letzten Endes zur

Zellwachstums- und Apoptoseinhibition (Steenbergen et al., 2003; Zhang et al., 2005). Im Gegensatz dazu findet sich bei dilatativer Kardiomyopathie im insuffizienten Myokard eine proapoptotisch veränderte Genexpression des TNF- $\alpha$  Signalweges und eine verminderte Expression von GADD45B (Steenbergen et al., 2003). Über eine Änderung der GADD45B Expression im Herzen durch Ischämie/Reperfusion gibt es keine Angaben in der Literatur.

### **IER3 (immediate early response 3)**

IER3 ist als immediate early gene reguliert. Es moduliert Zellzyklusprogression, Proliferation und programmierten Zelltod, abhängig vom extrazellulären Stimulus und abhängig von der Zellpopulation (Wu, 2003).

Im Tierversuch wurde nach linksventrikulärer Druckbelastung durch Widerstandserhöhung eine frühe IER3 Expressionssteigerung nachgewiesen. Die IER3 Expression erwies sich als NF- $\kappa$ B abhängig und führte zur Verhinderung einer frühen Kardiomyozytenhypertrophie (de Keulenaer et al., 2002). Eine starke Expression von IER3 in der Gefäßintima der Arteria thoracica interna (im Vergleich zur Arteria radialis), zusammen mit einer vergleichsweise starken Expression antiapoptotischer Gene (p21, CCL2, SOCS3, MCL1, IL1), wurde als protektiv gegenüber Intimahyperplasie und Atherosklerose interpretiert (Krane et al., 2010).

Andererseits erwies sich IER3 in einer Studie von Yoon et al. (2009) als ein proapoptotisches Gen, dessen Wirkung von MCL-1 moduliert wird und das BIM benötigt, um den programmierten Zelltod zu induzieren.

Eine IER3 Hochregulation durch Ischämie/Reperfusion ist bisher nicht beschrieben.

### **NR4A1 ( nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1)**

Außer den in Abschnitt 6.2.3 besprochenen Funktionen werden NR4A1 proapoptotische Eigenschaften zugesprochen. NR4A1 (Syn.: Nur77) spielt eine Schlüsselrolle bei der Apoptose von T-Zellen (Wang et al., 2009).

In Endothelzellen ist NR4A1 stark exprimiert und spielt eine Rolle bei Zellproliferation und Angiogenese. Eine Überexpression von NR4A1 schützt HUVEC`s (human umbilical vein endothelial cells) vor der TNF $\alpha$  und IL1B induzierten Endothelaktivierung (You et al., 2009), was sich in einer abgeschwächten NF $\kappa$ B Aktivierung, einer verringerten Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1) sowie einer geringeren monozytären Adhärenz ausdrückt.



### **BTG2 (B-Cell translocation gene family, member 2)**

BTG2 spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und hat antiproliferative Effekte durch Blockade des G1/S Übergangs. Dadurch ist BTG2 an der zellulären Antwort auf DNA Schädigungen beteiligt (Rouault et al., 1996). Tierexperimentell konnte im Rahmen von Versuchen zur ischämischen Präkonditionierung bei spinaler Ischämie eine maximale Expression von BTG2 nach 30 min gemessen werden (Carmel et al., 2004). BTG2 ist ein p53 Target Gen (Han et al., 2008) und wird als immediate early gene reguliert. Ein protektiver Effekt nach Ischämie/Reperfusion am Herzen ist bislang nicht beschrieben.

### **CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)**

CDKN1A wird durch p53 nach einer DNA- Schädigung aktiviert und inhibiert die Cyclin abhängige Kinase. Dies vermittelt einen Zellzyklusarrest (Ono et al., 2000; Löhr et al., 2003). Eine Änderung der Expression in Kardiomyozyten oder Endothelien des Herzens als Antwort auf ein Ischämie-/Reperfusionereignis ist bisher nicht beschrieben.

### **TNFA1P3 (tumor necrosis factor, alpha induced protein 3)**

Das TNFA1P3 Gen (A20) kodiert das TNF $\alpha$ -induced protein 3, das den Tod von Endothelien verhindert, wenn sie Noxen wie LPS (Lipopolysaccharid)) ausgesetzt werden. Es inhibiert die TNF $\alpha$  vermittelte Apoptose und ist gleichzeitig ein Schlüsselgen zur angemessenen Inaktivierung von NF- $\kappa$ B (Shembade et al., 2007). TNFA1P3 wird neben GADD45B u.a. von Endothelien nach extrazellulärer Stimulation hochreguliert (Albrecht et al., 2004) und ist wie GADD45B in insuffizientem dilatativ kardiomyopathischem Myokard herunterreguliert (proapoptische Signalgebung) (Steenbergen et al., 2003).

### **CEBPD (CCAAT/enhancer binding protein delta , C/EBP $\delta$ )**

CEBPs sind eine Familie hoch konservierter basischer Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren. CEBPD ist ein immediate early gene, dessen Expression durch viele Stimuli, z.B. IL1 (interleukin 1), LPS (Lipopolysaccharid)), TNF-  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) induziert wird (Wang et al., 2005).

CEBPD ist an der Zellzykluskontrolle beteiligt. Die CEBPD Proteinkonzentration in kultivierten Epithelzellen der Maus ist während eines durch Serum- oder Wachstumsfaktoren induzierten Wachstumsstillstandes (G<sub>0</sub>-Phase) und während der Apoptose hoch (O'Rourke et al., 1997).

### **SNF1LK (SNF1-like kinase)**

SNF1LK (Syn.: SIK1, salt inducible kinase 1) unterdrückt die Aktivität von CREB (cAMP responsive element binding) durch Phosphorylierung des CREB-spezifischen Koaktivators TORC (transducer of regulated CREB activity) (Takemori und Okamoto, 2008).

In vitro konnte eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus gefunden werden. Eine SNF1LK Hochregulation verhinderte die Zellteilung durch Blockade des G2/M Übergangs (Stephenson et al., 2004). Ein vergleichbarer Effekt beim Menschen oder eine Expressionsänderung unter dem Einfluss von Ischämie/Reperfusion ist bislang nicht bekannt.

## **6.2.3 Transkriptionelle Regulation**

### **Zink-Finger Familie (ZFP36, ZNF331)**

Inflammatorische Proteine werden u.a. durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Die mRNAs dieser Proteine haben Adenin/Uridin reiche Elemente, über deren Bindung durch regulierende Proteine eine Degradation der entsprechenden mRNA erfolgen kann.

ZFP36 ist ein Zink-Finger Protein, das speziell TNF- $\alpha$  Transkripte bindet (Lai et al., 1999). Es wird in Makrophagen durch LPS (Lipopolysaccharid) induziert und schützt vor einer pathologischen Überexpression proinflammatorischer Zytokine. Mäuse mit einem Verlust von ZFP36 entwickeln ein Autoimmunsyndrom. Dies hängt damit zusammen, dass in Makrophagen ohne ZFP36 eine pathologische TNF- $\alpha$  mRNA und –Proteinkonzentration vorliegt (Carballo et al., 1997; 1998).

ZFP36 ist darüber hinaus ein Modulator der HIF-1 $\alpha$  Expression während einer Hypoxie und spielt eine physiologische Rolle in der Regulation zwischen Adaptation der Zelle und Apoptose nach längerer Ischämie (Kim et al., 2010).

ZNF331 (Syn.: RITA) ist ein Aktivator von p53 und von proapoptotischen p53 Zielgenen (Zhao et al., 2010; Yang et al., 2009).

### **FOS (v-FOS FBJ murine osteosarcoma viral onco-gene homolog), JUN (Jun oncogene), FOSB (FBJ murine osteosarkoma viral oncogene homolog B)**

Die am besten untersuchten Mitglieder dieser Gruppe sind FOS und JUN. Die Proteine der Protoonkogene FOS, FOSB und JUN bilden einen heterodimeren Komplex, das Aktivator-

protein1 (AP-1). Dieses bindet an die Erkennungsstelle der DNA und kontrolliert die basale und induzierbare Transkription verschiedener Gene. FOS, FOSB und JUN sind immediate early genes. Der Transkriptionsfaktor AP (activator protein)-1 ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen einschließlich Proliferation, Differenzierung, Wachstum, Apoptose, Zellmigration und Transformation beteiligt (Vesely et al., 2009). Eine Hochregulation von FOS und JUN im Myokard nach Ischämie und Reperfusion wurde bereits von Aebert et al. (1997) und Nelson et al. (2002) beschrieben. Darüber hinaus wurde eine Überexpression von beiden immediate early genes (FOS und JUN) auch schon nach ischämischer Präkonditionierung beschrieben (Kingma, 1999).

### **JUNB**

JUNB ist ein immediate early gene. JUNB Homodimere binden (im Gegensatz zu JUN) nur schwach an AP-1 Bindungsstellen. JUNB reguliert so die Wirkung von JUN herunter, kann aber, obwohl weit weniger wirksam, JUN ersetzen. (Textor et al., 2006).

### **EGR2 (early growth response 2)**

EGR 2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in einigen Tumorzellreihen proapoptotische PTEN (phosphatase and tensin homolog)-induzierte Pfade aktiviert (Unoki und Nakamura, 2003). Obwohl EGR2 bei unseren eigenen Untersuchungen mit einem Fold change von 12,65 deutlich überexprimiert war, konnte bislang in der Literatur keine Beziehung zur myokardialen Expression nach Ischämie und Reperfusion beim Menschen hergestellt werden. Lediglich bei jungen Versuchstieren (3-4 Monate alte Ratten) fanden sich erhöhte EGR2 Level nach ischämischer Präkonditionierung (Liu et al., 2009).

### **EGR1 (early growth response1)**

EGR1 hingegen ist durch Hypoxie induzierbar (Khachigian, 2006). Es ist ein Transkriptionsfaktor, der bei kompletter Ischämie im Tiermodell (Ligatur des Ramus interventrikularis anterior von Mäusen) am stärksten hochreguliert wird (Lyn et al., 2000) und durch transkriptionelle Regulierung eine zentrale Rolle bei der Zellprotektion nach nicht-letaler Ischämie hat (Arab et al., 2007).

Die EGR1 Induktion durch Hypoxie spielt auch eine Rolle bei der Kardiomyozyten- und bei der ventrikulären Hypertrophie. Letzteres kommt insbesondere dadurch zum Ausdruck, dass EGR1-null Mäuse nach chronischem Aortenbanding keine deutliche linksventrikuläre Hypertrophie entwickeln (Khachigian, 2006).

### **EGR3 (early growth response3)**

EGR3 spielt –ähnlich wie EGR1- eine Rolle bei der endothelialen Zellmigration und Proliferation und ist das dominante Mitglied der EGR-Familie bei der VEGF (vascular endothelial growth factor)- induzierten Angiogenese (Liu et al., 2008).

### **NR4A Gruppe (NR4A1, NR4A2, NR4A3)**

Die Mitglieder der NR4A Gruppe (der nukleären Hormonrezeptorfamilie) gehören der Steroidhormon Rezeptorfamilie an. Sie sind immediate early genes und ihre Induktion kann durch verschiedene Stimuli erfolgen, z.B. Fettsäuren, Prostaglandine, Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine, Peptidhormone und Neurotransmitter, aber auch durch physikalische Reize (Magnetfelder, Scherspannung, Membrandepolarisation) (Maxwell und Muscat, 2006). Die NR4A Subfamilie ist im Zusammenhang mit Entzündung gut untersucht. NR4A1, NR4A2 und NR4A3 werden in Makrophagen sehr schnell und ausgeprägt nach Lipopolysaccharid (LPS) Gabe hochreguliert (Pei et al., 2005).

NR4A2 (nuclear receptor subfamily 4 group A, member 2) ist ein Transkriptionsfaktor, der antiapoptotische Effekte durch Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 und durch eine verminderte Bax (BCL2-associated X protein) Expression vermittelt (Zhang et al., 2009). Die Koexpression von NR4A2 und der p65 Untereinheit von NF- $\kappa$ B verstärkt die IL8 Transkription unabhängig von einer direkten DNA Bindung oder einer Heterodimerisation mit zusätzlichen nukleären Rezeptoren. Umgekehrt korrelieren reduzierte NR4A2 Level nach Methotrexat (Mtx) Behandlung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis mit einer Abnahme der IL8 Expression (Aherne et al., 2009). Ein entgegengesetzter Effekt in Bezug auf die Expression proinflammatorischer Zytokine konnte bei menschlichen Makrophagen beobachtet werden. Hier bewirkte eine lentivirale Überexpression von NR4A1, 2 und 3 eine signifikante Reduktion der Expression von IL1B, IL6 und IL8 (Bonta et al., 2006), weswegen der NR4A Familie eine protektive Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zugesprochen werden kann.

Darüber hinaus werden die positiven Effekte von HIF (hypoxia inducible factor)-1 in Bezug auf das Überleben von Endothelzellen durch NR4A3 vermittelt. Hypoxische Stimuli führen zu einer zeit- und dosisabhängigen Erhöhung der NR4A3 mRNA Level, was die Rate der apoptotischen Endothelzellen (in vitro) deutlich vermindert (Martorell et al., 2009).

### **MYC (v-myc myelomatosis viral oncogene homolog)**

MYC kodiert einen Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, bei der Apoptose und bei zellulären Transformationen spielt (Ruf et al., 2001). Es ist das am meisten deregulierte Onkogen bei menschlichen Tumoren (Wahlström und Hendriksson, 2007). Bereits 1995 wurde von Yao et al. eine Hochregulation von MYC nach myokardialer Ischämie beschrieben.

### **ATF3 (activating transcription factor 3)**

ATF3 spielt eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf Stress unterschiedlicher Genese. Es sind sowohl Veränderungen der Genexpression von ATF3 nach mechanischem als auch nach ischämischem Stress bekannt (Payson et al., 2009). Die Induktion korreliert hierbei mit dem Ausmaß des Zellschadens (Hai et al., 2001). In Tiermodellen konnte eine verstärkte Induktion als Reaktion auf Verletzungen der Haut, aber auch bei myokardialen, renalen oder hepatischen Ischämien nachgewiesen werden. Beim Menschen konnten protektive Effekte im Rahmen eines akuten Nierenversagens aufgrund einer renalen Ischämie nachgewiesen werden (Yoshida et al., 2009). Mit einem Fold change > 5 war der ATF3 auch bei den Untersuchungen von Ruel et al. (2003) nach kardioplegischem Herzstillstand deutlich erhöht.

### **MAFF (v-maf musculoaponeurotic fibrosarkoma oncogen homolog F)**

Das MAFF (Proto) Onkogen gehört zu den bZip (basic leucin-zipper) Transkriptionsfaktoren und wird ebenfalls als immediate early gene reguliert. Eine MAFF Induktion konnte sowohl in vitro bereits 15 min nach Stimulation durch NGF (nerve growth factor) (Dijkmans et al., 2009) als auch nach Operationen mit Herz-Lungenmaschine (Voisine et al., 2004; Gabrielsen et al., 2006) nachgewiesen werden.

### **ANKRD37 (ankyrin repeat domain 37)**

Das ANKRD 37 Gen ist eines von vielen HIF (hypoxia inducible factor)-1 Target Genen (Benita et al., 2009). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 spielt eine zentrale Rolle bei der transkriptionellen Antwort der Zelle auf hypoxische Stimuli (Wenger et al., 2005). ANKRD37 ist zudem an der Regulation weiterer Transkriptionsfaktoren beteiligt (Cockman et al., 2006). Zu diesen zählt NF (nuclear factor)- $\kappa$ B, der eine Schlüsselposition in beiden Phasen der ischämischen Präkonditionierung einnimmt.

#### **KLF4 (Krüppel-like factor 4)**

Bei KLF4 handelt es sich um ein Mitglied der KLF-Familie der Zink-Finger Transkriptionsfaktoren. Die Expression von KLF4 in Gefäßendothelzellen wird durch proinflammatorische Stimuli und Scherspannung gesteigert (Hamik et al., 2007).

KLF4 vermittelt außerdem die antiinflammatorische Aktivität von Kallistatin durch einen Anstieg der eNOS (endothelial nitric oxide synthase)- Expression in Endothelzellen (Shun et al., 2009).

### **6.2.4 Signaltransduktion**

#### **OLR1 (oxidized low density lipoprotein receptor 1)**

OLR1 kodiert den LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1)- Rezeptor, der die Aufnahme von oxidiertem LDL in die Endothelzellen steuert (Metha und Li, 2002) und somit in die Pathogenese der Atherosklerose eingreift. Darüber hinaus bewirkt die Aktivierung des Rezeptors eine verminderte NO-Produktion, die Rekrutierung inflammatorischer Zellen sowie eine Proliferation glatter Muskelzellen (Cilingiroglu und Ozer, 2005). Die atheroprotektiven Effekte von Aspirin® und Pravastatin® sind unter anderem auf eine deutlich verminderte Expression des LOX-1 Rezeptors in Endothelzellen und Thrombozyten zurückzuführen (Marwali et al., 2007).

#### **RGS1 (regulator of G-protein signalling 1)**

Das durch RGS1 kodierte Protein ist an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert und schwächt die Wirkung des G-(guaninnucleotid binding) Proteins ab. RGS1 wird als immediate early response Gen reguliert. G-Proteine besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und second-messenger System.

#### **GEM (GTP-binding protein)**

Eine ähnliche Rolle im Bezug auf die Rezeptor vermittelte Signaltransduktion spielt GEM. Das kodierte Protein gehört zur RAD/GEM Familie der GTP-bindenden Proteine und wird an der Innenseite der Plasmamembran exprimiert (Splingard et al., 2007). Eine erhöhte Expression beider Gene (GEM und RGS1) durch die extrakorporale Zirkulation oder eine Reaktion auf hypoxische Stimuli wurde bislang nicht beschrieben.

### **GPR183 (G-protein-coupled receptor 183)**

GPR183 kodiert einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPR), der extrazelluläre Signale G-Protein vermittelt ins Zellinnere weiterleitet (Signaltransduktion). G-Protein gekoppelte Rezeptoren kommen ubiquitär vor, allein an Zellen des kardiovaskulären Systems werden über 100 GPR's exprimiert (Tang et al., 2004). Dennoch gibt es über eine Änderung der Genexpression von GPR183 im Herzen durch Ischämie/Reperfusion keine Angaben in der Literatur.

### **SOCS (suppressor of cytokine signalling 3)**

Das SOCS3 Gen kodiert ein Mitglied der SSI (STAT-induced STAT-inhibitor)- Familie. STAT's (signal transducers and activators of transkription) spielen eine Rolle auf mehreren Ebenen der Signaltransduktion und -terminierung.

Bei der Beendigung der Signalvorgänge spielen Tyrosinphosphatasen eine zentrale Rolle. Die Begrenzung von Signalen ist für die Regulation der Zellaktivität ebenso wichtig wie deren Aktivierung. Ein Mechanismus durch den die Tyrosinphosphorylierung abgeschaltet werden kann ist die Induktion von Transkription und Expression von SOCS (suppressor of cytokine signaling)-Proteinen, die an verschiedenen Stellen mit dem JAK/STAT Signalweg interferieren.

### **DUSP5 (dual specific phosphatase 5)**

DUSP5 kodiert ein Mitglied der specificity protein phosphatase Familie. Es ist an der enzymgekoppelten Signaltransduktion beteiligt, indem es durch Dephosphorylierung von Kinasen als Gegenspieler der mitogen activated protein kinases (MAPK) fungiert (Pramanik et al., 2009).

### **TRIB1 (tribbles homolog 1)**

TRIB1 ist über verschiedene Systeme an der Signaltransduktion beteiligt, zum einen durch Modulation der MAPK (mitogen-activated protein kinase)-kaskade, die ihrerseits neben der vaskulären Kontraktilität auch die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (VSMC, vascular smooth muscle cells) reguliert (Mii et al., 1996), zum anderen über eine direkte Interaktion mit der Jun Aktivator kinase (MKK4/SEK1). Eine erhöhte Expression von TRIB1 in humanen atherosklerotischen Arterien, im Vergleich zu nicht verkalkten Gefäßen, deutet zudem laut Sung et al. (2007) auf eine Bedeutung in der Zellbiologie glatter Muskelzellen hin.

### **APOLD1 (apolipoprotein L domain containing 1)**

APOLD1 (Syn.: Verge, vascular early response gene) ist ein Gen, das zu Veränderungen der vaskulären Permeabilität beitragen kann (Regard et al., 2004). Eine Beeinträchtigung der endothelialen Barrierefunktion ist an der Pathogenese vieler Erkrankungen, einschließlich Entzündung, Sepsis und SIRS (systemic inflammatory response syndrome), beteiligt (van Soeren et al., 2000).

### **SGK1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1)**

SGK1 kodiert eine Proteinkinase und reguliert unter anderem die Expression von GLUT4 (glucose transporter 4) an der Zelloberfläche, dessen Aktivität mit der wachsenden Abundanz der Transporter in der Plasmamembran ansteigt (Jeyaraj et al., 2007). Außerdem wurde eine Erholung der Herzpumpleistung nach Infarkt bei IGF1 transgenen Mäusen, unter anderem durch die gesteigerte Aktivierung antiapoptotischer PDK1 und SGK1 Signalwege, beobachtet (Santint et al., 2007). SGK1 war bei unseren eigenen Untersuchungen mit einem Fold change von 4,73 deutlich hochreguliert. Beide Effekte könnten protektive Effekte nach Ischämie und Reperfusion darstellen, sind aber so in der Literatur noch nicht beschrieben.

Auch Aldosteron induziert eine schnelle SGK1 Transkription, was zur Aktivierung renaler epithelialer Natriumkanäle führt. Im Tiermodell kam es nach subtotaler Nephrektomie bei Ratten zu einem schnellen Anstieg von myokardialem ET1 (endothelin 1), was in der Folge zu einer SGK1 Induktion im Bereich des linken Ventrikels führte (Wolf et al., 2006). SGK1 ist demnach auch in die ET-1 abhängige Regulation des Blutdrucks und das kardiale Remodelling bei Niereninsuffizienz involviert.

### **CH25H (cholesterol 25- hydroxylase)**

Bei CH25H handelt es sich um ein Gen ohne Introns, das Teile des Cholesterol- und Lipidmetabolismus reguliert. Das kodierte Protein ist ein Membranprotein, das die Hydroxylierung hydrophober Substanzen katalysiert. Erhöhte Expression von CH25H ist mit einem höheren Risiko an Alzheimer Demenz zu erkranken assoziiert (Laumet et al., 2010). Ein Einfluss von Ischämie/Reperfusion auf die Genexpression von CH25H am Herzen ist bislang nicht beschrieben.



## 6.2.5 Extrazelluläre Matrix (ECM), Remodelling

### **ADAMTS1 (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1)**

Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist die Matrix-Metalloproteinase (MMP) ADAMTS1. MMP's sind ECM (extracellular matrix)-degradierende Enzyme und spielen eine bedeutende Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix in infarziertem Herzmuskelgewebe, beeinflussen somit das ventrikuläre Remodelling nach einem Myokardinfarkt (Nakamura et al., 2004). In nicht ischämischem Myokard findet sich keine detektierbare ADAMTS mRNA. Im Gegensatz dazu wird ADAMTS1 in infarziertem Myokard und in Endothelzellen der Infarktgefäße (Infarktinduktion im Tierversuch an Ratten durch Ligatur einer Koronararterie) bereits nach weniger als 3 Stunden stark exprimiert. Diese schnelle Hochregulation unterscheidet sie von anderen Metalloproteinasen (Nakamura et al., 2004) und wird durch Hypoxie induziert (Hatipoglu et al., 2009). Die ADAMTS Proteinase sind darüber hinaus am Reifungsprozess des Prokollagens und des von Willebrand Faktors sowie an der Proteolyse der ECM beteiligt. ADAMTS1 wird *als* immediate early gene reguliert (Apte, 2009).

### **THBS1 (thrombospondin1)**

Das durch THBS1 kodierte Protein ist ein adhäsives Glykoprotein, das Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen vermittelt. Eine verstärkte THBS1 Expression bewirkt eine Inhibition der Angiogenese durch Verlangsamung der endothelialen Zellmigration und -proliferation sowie eine durch den Tumorsuppressor p53 vermittelte Initiierung apoptotischer Mechanismen (Ren et al., 2006). Dies sind gewollte Effekte bei der antiangiogenetischen Behandlung von Tumoren. Antiangiogenetisch wirksame Substanzen wirken auf die Gefäße, indem sie geschlängelte, lakunäre Gefäßstrukturen mit gestörter endothelialer Integrität, einer damit verbundenen Hyperpermeabilität und konsekutiv hohem interstitiellem Druck, normalisieren, was eine bessere Perfusion mit Verringerung der typischen Hypoxie und Azidose des Tumormilieus bewirkt (Tong, 2004; Willet, 2004). Man könnte annehmen, dass THBS1 (und ADAMTS1) auch beim akuten endothelialen Schaden durch Ischämie und Reperfusion eine positive Rolle -beispielsweise durch VEGF-Inhibierung zur Abdichtung der endothelialen Barriere- spielen könnte. Dies wird jedoch in der Literatur verneint (Isenberg et al., 2008).

THBS1 ist das Gen, das bereits 90 Minuten nach koronarer Stentimplantation am stärksten hochreguliert ist (Hoffmann et al., 2005). Außerdem findet sich eine Hochregulation von THBS1 in Bereichen von Gefäßverletzungen und in glatten Gefäßmuskelzellen bei

hyperglykämischer Exposition (Maier et al., 2010), was die meist aggressive Verlaufsform der Atherosklerose bei Diabetikern mit erklären kann.

### **RND1 (Rho family GTPase 1)**

RND1 ist eines von drei Mitgliedern (RND1-3) der Rho GTPase-Familie und reguliert die Organisation des Zytoskeletts in Abhängigkeit von extrazellulären Wachstumsfaktoren (Hall und Nobes, 2000). RND1 kontrolliert die Neuordnung des Aktinzytoskeletts und verhindert bei starker Expression in Fibroblasten die Formierung der Aktinfasern durch Abbau der Aktinfilamente (Nobes et al., 1998).

### **CYR61 (cysteine-rich, angiogenic inducer, 61)**

Das CYR61 (Syn.: CCN1) Gen wird als immediate early gene reguliert und ist an der durch Hypoxie induzierten Angiogenese und dem Remodelling der extrazellulären Matrix beteiligt. Es wird durch Gewebeverletzung, Ang II (angiotensin II), Wachstumsfaktorstimulation oder Myokardinfarkt induziert und spielt eine wichtige Rolle bei Anpassungsvorgängen des Herzens (Hilfiker-Kleiner et al., 2004). Neben diesen proangiogenetischen Eigenschaften vermittelt CYR61 über den beta1 integrin-Akt - Pfad auch antiapoptotische Effekte und schützt kardiale Myozyten vor oxidativem Stress (Yoshida et al., 2007).

## **6.2.6 Immediate early genes**

Von den 50 bei den eigenen Untersuchungen mit einem Fold change > 4 überexprimierten Genen werden 17 Gene als immediate early gene reguliert. Immediate early genes sind Gene mit verschiedenen Funktionen, die nach einem ausreichend starken „extrazellulären Stimulus“ als erste und sehr schnell –innerhalb von Minuten- transkribiert werden. Das Besondere an ihnen ist, dass ihre Transkription nicht von einer und vorher stattfindenden Proteinsynthese, sondern von präexistenten Transkriptionsfaktoren abhängig ist. Bindungsstellen für Regulatoren (z.B. AP-1, NF-κB) sind bei immediate early genes häufiger und die Prävalenz für Minimal-Promotoren (z.B. TATA boxes) höher als in allen anderen Genen des Genoms. Darüber hinaus sind immediate early genes kürzer und enthalten weniger Exons als andere Gene (Tullai et al., 2007).

Bei Experimenten von Tullai et al. (2007) wurde eine Induktion von 49 dieser immediate early genes durch Wachstumsfaktorstimulation (platelet derived growth factor, PDGF)

innerhalb von 30 Minuten detektiert. Weitere 84 Gene benötigten nach PDGF-Stimulation 2-4 Stunden bis zu einem nachweisbaren Expressionsanstieg. Davon waren 58 (delayed) primary response genes. Eine ähnliche Kinetik konnte auch durch Stimulation der Zellen durch EGF (epidermal growth factor) erzielt werden.

Mittels Gene Ontology Database (GO) wurde den innerhalb 4 Stunden überexprimierten Genen eine funktionelle Klassifizierung zugeordnet. Dabei waren die immediate early genes häufig mit den Molekularfunktionen der transkriptionellen Regulation assoziiert und zeigten in der funktionellen Klassifizierung keine wesentlichen Gemeinsamkeiten mit den delayed primary response genes und den secondary response genes (Tullai et al., 2007).

Nachfolgend werden die 17 immediate early genes der eigenen Untersuchung –sortiert nach Fold change- aufgelistet:

<b>Nr.</b>	<b>Symbol</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>Fold change</b>	<b>Gruppenzugehörigkeit</b>
<b>1</b>	FOSB	FBJ murine osteosarkoma viral oncogene homolog B	62,78	Transkriptionelle Regulation
<b>2</b>	ATF3	activating transcription factor 3	24,55	Transkriptionelle Regulation
<b>3</b>	FOS	v-FOS FBJ murine osteo-sarcoma viral onco-gene homolog	15,69	Transkriptionelle Regulation
<b>4</b>	RGS1	regulator of G-protein signalling 1	13,97	Signaltransduktion
<b>5</b>	EGR2	early growth response 2	12,65	Transkriptionelle Regulation
<b>6</b>	APOLD1	apolipoprotein L domain containing 1	11,54	Signaltransduktion
<b>7</b>	EGR1	early growth response 1	11,23	Transkriptionelle Regulation
<b>8</b>	JUNB	Jun B proto-oncogen	9,95	Transkriptionelle Regulation
<b>9</b>	MYC	v-myc myelomatosis viral oncogene homolog	9,10	Transkriptionelle Regulation

10	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif,1	8,32	Extrazelluläre Matrix/Remodelling
11	BTG2	(B-Cell translocation gene family, member 2)	8,27	Growth arrest/Apoptose
12	GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	6,38	Signaltransduktion Growth arrest/Apoptose
13	JUN	Jun oncogene	6,36	Transkriptionelle Regulation
14	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha induced protein 3	4,97	Growth arrest/Apoptose
15	IER1	immediate early response 3	4,64	Transkriptionelle Regulation
16	ANKRD37	Ankyrin repeat domain 37	4,12	Transkriptionelle Regulation
17	EGR3	early growth response 3	4,02	Transkriptionelle Regulation

**Tabelle 5:** Überexprimierte immediate early genes (Fold change >4) beim Vergleich nach vs. vor kardioplegischem Herzstillstand und Reperfusion (geordnet nach Fold change)

Die Mehrzahl dieser immediate early response Gene ist mit der Molekularfunktion der „transkriptionellen Regulation“ (n=12) assoziiert. Die anderen Gene lassen sich den funktionellen Gruppen „Growth arrest/Apoptose“ (n=3), „Signaltransduktion“ (n=2) und „extrazelluläre Matrix/Remodelling“ (n=1) zuordnen. Interessanterweise werden die Gene der Gruppe Zytokine/Inflammation nicht als immediate early genes reguliert. Das GADD45B Gen kann funktionell der Gruppe „Signaltransduktion“ und „Growth arrest/Apoptose“ zugeteilt werden.

### 6.2.7 Top Ranking

Betrachtet man nur deutlich überexprimierte Gene mit einem Fold change > 10, dominieren auch hier Gene, die an der „transkriptionellen Regulation“ beteiligt sind (n=8). Die restlichen Gene lassen sich den Molekularfunktionen „Zytokine/Inflammation“ (n=4), „Signaltransduk-

tion“ (n=2) und „Growth arrest/Apoptose“ (n=1) zuordnen. Aus dem Bereich „Extrazelluläre Matrix/Remodelling“ und sind keine Gene mit einem Fold change >10 exprimiert.

<b>Nr.</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>Symbol</b>	<b>Fold change</b>	<b>Gruppe</b>
<b>1</b>	FBJ murine osteosarkoma viral oncogene homolog B	FOS B	62,78	Transkriptionelle Regulation
<b>2</b>	interleukin 6	IL 6	52,54	Zytokine/ Inflammation
<b>3</b>	interleukin 8	IL 8	50,74	Zytokine/ Inflammation
<b>4</b>	activating transcription factor 3	ATF 3	24,55	Transkriptionelle Regulation
<b>5</b>	nuclear receptor subfamily 4 group A, member 2	NR4A 2	22,45	Transkriptionelle Regulation
<b>6</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	16,29	Zytokine/ Inflammation
<b>7</b>	v-FOS FBJ murine osteosarcoma viral onco-gene homolog	FOS	15,69	Transkriptionelle Regulation
<b>8</b>	regulator of G-protein signalling 1	RGS1	13,97	Signaltransduktion
<b>9</b>	early growth response 2	EGR2	12,65	Transkriptionelle Regulation
<b>10</b>	zinc finger protein 36, C3H type, homolog	ZFP36	12,42	Transkriptionelle Regulation
<b>11</b>	apolipoprotein L domain containing 1	APOLD1	11,54	Signaltransduktion
<b>12</b>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	11,26	Zytokine/ Inflammation

<b>13</b>	early growth response 1	EGR1	11,23	Transkriptionelle Regulation
<b>14</b>	SNF1-like kinase	SNF1LK	10,77	Growth arrest/ Apoptose
<b>15</b>	nuclear receptor subfamily 4 group A, member 3	NR4A3	10,45	Transkriptionelle Regulation

**Tabelle 6:** Top Ranking der im Vorhofmyokard überexprimierten Gene (Fold change >10) nach kardioplegischen Herzstillstand und Reperfusion

### 6.2.8 Schlussfolgerungen

Bei einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation mit Anwendung der Herz-Lungenmaschine wurden unterschiedliche Genexpressionsprofile detektiert, denen potentiell protektive Eigenschaften zugesprochen werden können, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen unterschiedlich sind.

Gene, die in Zusammenhang mit der ischämischen Präkonditionierung (u.a. IL-8, PTGS2) überexprimiert sind, werden in der Literatur als kardioprotektiv beschrieben, ebenso wie die Gene, die eine Apoptoseinhibition (u.a. GADD45B, NR4A2, NR4A3) bewirken.

Die schnelle Hochregulation von Genen der Gruppe „Zytokine/Inflammation“ scheint eine positiv adaptive Rolle zu spielen, während die langandauernde (chronische) Expression maladaptive Prozesse, wie die Ausbildung eines SIRS (systemic inflammatory response syndrome) triggern oder myokardiale Funktionseinschränkungen mit postoperativ erhöhtem Katecholaminbedarf verursachen.

Die Gene, die die „transkriptionelle Regulation“ der Zelle beeinflussen, stellen in unseren Untersuchungen die größte, allerdings funktionell inhomogene Gruppe dar. Einigen Vertretern (z.B. EGR1, ATF3) werden zytoprotektive Eigenschaften zugesprochen.

CYR61 ist am Remodelling der extrazellulären Matrix des Herzens beteiligt. Auch ADAMTS1 spielt eine wichtige Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix in infarziertem Herzmuskelgewebe. Beide Gene der Gruppe „Extrazelluläre Matrix/Remodelling“ sind demnach potentiell protektiv und durch Hypoxie stimulierbar.

Insgesamt führt der kardioplegische Herzstillstand mit anschließender Reperfusion im Rahmen einer aortokoronaren Bypassoperation bereits innerhalb von Minuten zu einer ausgeprägten Reaktion des Myokards auf der Ebene der Genexpression, bei der funktionelle Pfade aktiviert werden, die potentiell protektiv sind.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abdel Malak NA, Mofarrahi M, Mayaki D, Khachigian LM, Hussain SN (2009) Early growth response-1 regulates angiopoietin-1-induced endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:209-216
2. Aebert H, Cornelius T, Ehr T, Holmer SR, Birnbaum DE, Riegger GA, Schunkert H (1997) Expression of immediate early genes after cardioplegic arrest and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 63:1669-1675
3. Aebert H, Cornelius T, Birnbaum DE, Siegel AV, Riegger GA, Schunkert H (1997) Induction of early immediate genes and programmed cell death following cardioplegic arrest in human hearts. *Eur J Cardiothorac Surg* 12:261-267
4. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, Ward P (2004) C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* 164:849-859
5. Amasyali B, Kose S, Kursaklioglu H, Barcin C, Kilic A (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 in acute coronary syndromes: complex vicious interaction. *Int J Cardiol* 136:356-359
6. Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Ferrari SM, Paolicchi A, Romagnani P, Serio M, Ferrannini E (2006) Increase of CXC chemokine CXCL10 and CC chemokine CCL2 serum levels in normal ageing. *Cytokine* 34:32-38
7. Antonelli A, Fallahi P, Delle Sedie A, Ferrari SM, Maccheroni M, Bombardieri S, Riente L, Ferrannini E (2009) High values of Th1 (CXCL10) and TH2 (CCL2) chemokines in patients with psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 27:22-27
8. Apte SS (2009) A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 284:31493-31497



9. Arab S, Konstantinov IE, Boscarino C, Cukerman E, Mori A, Li J, Liu P, Redington AN, Coles JG (2007) Early gene expression profiles during intraoperative myocardial ischemia-reperfusion in cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134:74-81
10. Arkenbout EK, de Waard V, van Bragt M, van Achterberg TA, Grimbergen JM, Pichon B, Pannekoek H, de Vries CJ (2002) Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in transgenic mice. *Circulation* 106:1530-1535
11. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 75:675-705
12. Bagi Z, Erdei N, Papp Z, Edes I, Koller A (2006) Up-regulation of vascular cyclooxygenase-2 in diabetes mellitus. *Pharmacol Rep* 58:52-56
13. Baldi P, Hatfield GW (2002) DNA microarrays and gene expression. Cambridge University Press, Cambridge, UK
14. Barandon L, Couffinhal T, Dufourcq P, Ezan J, Costet P, Daret D, Deville C, Duplaa C (2004) Frizzled A, a novel angiogenic factor: promises for cardiac repair. *Eur J Cardiothorac Surg* 25:76-83
15. Barklay JL, Anderson ST, Waters MJ, Curlewis JD (2009) SOCS3 as a tumor suppressor in breast cancer cells, and its regulation by RPL. *Int J Cancer* 124:1756-1766
16. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116:281-297
17. Beckman KB, Lee KY, Golden T, Melov S (2004) Gene expression profiling in mitochondrial disease: assessment of microarray accuracy by high-throughput Q-PCR. *Mitochondrion* 4:453-470

18. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU (2000) Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 86:29-35
19. Benita Y, Kikuchi H, Smith A, Zhang M, Chung DC, Xavier RJ (2009) An integrative genomics approach identifies hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res* 37:4587-4602
20. Bennetzen J (2002) The rice genome. Opening the door to comparative plant biology. *Science* 296:60-63
21. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120:21-24
22. Bonta P, Tiel C, Vos M, Pols T, Thienen J, Ferreira V, Arkenbout E, Seppen J, Spek C, Poll T, Pannekoek H, Vries C (2006) Nuclear receptors Nur77, Nurr1 and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2288-2294
23. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncology* 7:122-133
24. Braunwald E, Kloner RA (1982) The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66:1146-1151
25. Braunwald E (1990) The stunned myocardium. Newer insights into mechanisms and clinical implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 100:310-317
26. Brinkley TE, Kume N, Mitsuoka H, Brown MD, Phares DA, Ferrel RE, Kita T, Hagberg JM (2008) Variation in human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene is associated with plasma soluble LOX-1 levels. *Exp Physiol* 93:1085-1090

27. Brooks SA, Connolly JE, Diegel RJ, Fava RA, Rigby WF (2002) Analysis of the function, expression, and subcellular distribution of human tristetraprolin. *Arthritis Rheum* 46:1362-1370
28. Busjahn A, Aydin A, Uhlmann R, Krasko C, Bähring S, Szelestei T, Feng Y, Dahm S, Sharma AM, Luft AM, Lang F (2002) Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension* 40:256-260
29. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA (2008) Complete loss of ischemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res* 77:463-470
30. Carballo E, Lai WS, Blakeshear PJ (1998) Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production by tristetraprolin. *Science* 281:1001-1005
31. Carballo E, Gilkeson GS, Blakeshear PJ (1997) Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (- / -) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNF $\alpha$  overproduction. *J Clin Invest* 100:986-995
32. Carmel JB, Kakinohana O, Mestral R, Young W, Marsala M, Hart RP (2004) Mediators of ischemic preconditioning identified by microarray analysis of rat spinal cord. *Exp Neurol* 185:81-96
33. Carrick DM, Lai WS, Blakeshear PJ (2004) The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 6:248-264
34. Ceyhan ST, Onguru O, Baser I, Gunhan O (2008) Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in ovarian endometriotic cysts and their relationship with angiogenesis. *Fertil Steril* 90:988-993
35. Chandrasekar B, Freeman GL (1997) Induction of nuclear kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett* 401:30-34

36. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM (1999) New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of disease. *Clin Chem* 45:7-17
37. Cho BO, Jeong YW, Kim SH, Park K, Lee JH, Kweon GR, Park JC (2008) Up-regulation of BTG2 gene in TPA- or RA-treated HL-60 cell lines. *Oncol Rep* 19:633-637
38. Cho YG, Choi BJ, Kim CJ, Song JW, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS (2006) Genetic alterations of the KLF-6 gene in colorectal cancers. *APMIS* 114:458-464
39. Choi JE, Kim DS, Kim EJ, Chae MH, Cha SI, Kim CH, Jheon S, Jung TH, Park JY (2008) Aberrant methylation of ADAMTS1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 187:80-84
40. Chung KW, Sunwoo IN, Kim SM, Park KD, Kim WK, Kim TS, Koo H, Cho M, Lee J, Choi BO (2005) Two missense mutations of EGR2 R359W and GJB1 V136A in a Charcot-Marie-Tooth disease family. *Neurogenetics* 6:159-163
41. Cilingiroglu M, Ozer K (2005) The human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor and its role in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 7:103-107
42. Cockman ME, Lancaster DE, Stolze IP, Hewitson KS, McDonough MA, Coleman ML, Cloes CH, Yu X, Hay RT, Ley SC (2006) Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in K-kappaB proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF. *Proc Natl Acad Sci* 103:14767-14772
43. Corona-Sanchez EG, Gonzalez-Lopez L, Munoz-Valle JF, Vazquez-Del Mercado M, Lopez-Olivo MA, Aguilar-Chavez EA; Salazar-Paramo M, Loaiza-Caradenas C, Oregon-Romero E, Navarro-Hernandez RE, Gamez-Nava JI (2009) Circulating E-selectin and tumor necrosis factor alpha in extraarticular involvement and joint disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 29:281-286
44. Costa Reis Monte-Mor B, Plo I, da Cunha AF, Costa GG, de Albuquerque DM, Jedidi A, Villeval JL, Badaoui S, Lorand-Metze I, Pagano KB, Saad ST, Vainchenker W, Costa FF

(2009) Constitutive JunB expression, associated with the JAK2 V617F mutation, stimulates proliferation of the erythroid lineage. *Leukemia* 23:144-152

45. Crick F (1979) Split genes and RNA splicing. *Science* 204:264-271

46. Curran T, Bravo R, Müller R (1985) Transient induction of c-fos and c-myc in an immediate consequence of growth factor stimulation. *Cancer Surv* 4:655-681

47. Czibik G, Wu Z, Berne GP, Tarkka M, Vaage J, Laurikka J, Järvinen O, Valen G (2008) Human adaptation to ischemia by preconditioning or unstable angina: involvement of nuclear factor kappa B, but not hypoxia-inducible factor 1 alpha in the heart. *Enr J Cardiothorac Surg* 34:976-984

48. Dai WB, Ren ZP, Chen WL, Du J, Shi Z, Tang DY (2007) Expression and significance of APC, beta-catenin, C-Myc, and Cyclin D1 proteins in colorectal carcinoma. *Ai Zheng* 26:963-966

49. Darnell JE Jr. (1982) Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297:365-371

50. Davani EY, Brumme Z, Singhera GK, Cote HC, Harrigan PR, Dorscheid DR (2003) Insulin-like growth factor-1 protects ischemic murine myocardium from ischemia/reperfusion associated injury. *Crit Care* 7:R176-183

51. Dawn B, Xuan YT, Guo Y, Rezazadeh A, Stein AB, Wu WJ, Tan W, Bolli R (2004) IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signalling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res* 64:61-71

52. De Filippo K, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N (2008) Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signalling pathways. *J Immunol* 180:4308-4315

53. De Keulenaer GW, Wang Y, Feng Y, Muangman S, Yamamoto K, Thompson JF, Turi TG, Landschutz K, Lee RT (2002) Identification of IEX-1 as a biomechanically controlled

nuclear factor-kappaB target gene that inhibits cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 90:690-696

54. De Lange RJ, Smith EL (1971) Histones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 40:279-314

55. De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G (2001) Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates proapoptotic JNK signalling. *Nature* 414:308-313

56. De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000) The regulator of G protein signalling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:235-271

57. DiFeo A, Martignetti JA, Narla G (2009) The role of KLF-6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resist Updat* 12:1-7

58. Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Schouten TG, Kamphorst JT, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E (2009) Identification of new Nerve Growth Factor-responsive immediate early genes. *Brain Res* 1249:19-33

59. Dreyer WJ, Phillips SC, Lindsey ML, Jackson P, Bowles NE, Michael LH, Entman ML (2000) Interleucin-6 induction in the canine myocardium after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120:256-63

60. Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993) hnRNP proteins and their biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62: 289-321

61. Du P, Kibbe W, Lin S (2007) lumi: BeadArray specific methods for Illumina microarrays. R package version 1.3.5.2

62. Dudek SM, Garcia JG (2001) Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 91:1487-1500

63. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21:10-14
64. Ehsan A, Mann MJ, Dell'Àcqua G, Dzau VJ (2001) Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligonucleotide gene therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:714-722
65. Ellis SG, Henschke CI, Sandor T, Wynne J, Braunwald E, Kloner RA (1983) Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1:1047-1055
66. Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17:1115-1129
67. Fischer CP (2006) Interleucin-6 in acute exercises and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 12: 6-33
68. Friedman M, Wang SY, Stahl GL, Johnson RG, Sellke FW (1995) Altered beta-adrenergic and cholinergic pulmonary vascular response after total cardiopulmonary bypass. *J Appl Physiol* 79:1998-2006
69. Fu M, Zhu X, Zhang J, Liang J, Lin Y, Zhao L, Ehrenguber MU, Chen YE (2003) Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 315:33-41
70. Gabrielsen A, Lawler PR, Yongzhong W, Steinbrüchel D, Blagoja D, Paulsson-Berne G, Kastrup J, Hansson G (2007) Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 42:870-883
71. Gao H, Hoesel LM, Guo RF, Rancilio NJ, Samara JV, Ward PO (2006) Adenoviral-mediated overexpression of SOCS3 enhances IgG immune complex-induced acute lung injury. *J Immunol* 177 :612-620

72. Garrell J, Campuzano S (1991) The helix-loop-helix-domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *Bioessays* 13: 493-498
73. Geiser T (1999) Inflammatorische Zytokine und Chemokine bei akuter, entzündlicher Lungenerkrankung. *Schweiz Med Wochenschr* 129:540-546
74. Gessler P, Pretre R, Hohl V, Rousson V, Fischer J, Dahinden C (2004) CXC-Chemokine stimulation of neutrophils correlates with plasma levels of myeloperoxidase and lactoferrin and contributes to clinical outcome after pediatric cardiac surgery. *Shock* 22:513-520
75. Ghilardi G, Biondi ML, Turri O, Guagnellini E, Scorza R (2004) Ser128Arg gene polymorphism for E-selectin and severity of atherosclerotic arterial disease. *J Cardiovasc Surg* 45:143-147
76. Ghorbel MT, Cherif M, Mokhtari A, Bruno VD, Caputo M, Angelini GD (2010) Off-pump coronary bypass surgery is associated with fewer gene expression changes in the human myocardium in comparison to on-pump surgery. *Physiol Genomics*
77. Giusti B, Marini M, Rossi L, Lapini I, Magi A, Capalbo A, Tullio S, Samaja M, Esposito F, Margonato V, Boddi M, Abbate R, Veicsteinas A (2009) Gene expression profile of rat left ventricles reveals persisting changes following chronic mild exercise protocol: implications for cardioprotection. *BMC Genomics* 10: 342-353
78. Goodbourn S (1990) Negative regulation of transcriptional initiation in eukaryotes. *Biochem Biophys Acta* 103: 53-77
79. Grünebach F, Erndt S, Häntschel M, Heine A, Brossart P (2008) Generation of antigen-specific CTL responses using RGS1 mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 57:1483-1491
80. Grupe A, Li Y, Rowland C, Nowotny P, Hinrichs AL, Smemo S, Kauwe JS, Maxwell TJ, Cherny S, Doil L, Tacey K, Morris CM, Catanese J, Snirsky J, White TJ, Powell J, Hardy J, O'Donovan M, Lovestone S, Jones L, Morris JC, Thal L, Owen M, Williams J, Goate A



(2006) A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 78:78-88

81. Gu S, Tirgari S, Heximer SP (2008) The RGS2 gene product from a candidate hypertension allele shows decreased plasma membrane association and inhibition of Gq. *Mol Pharmacol* 73:1037-1043

82. Guardavaccaro D, Corrente F, Covone F, Micheli L, D`Agnano I, Starace G, Caruso M (2000) Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. *Mol Cell Biol* 20:1797-1815

83. Hai T, Hartmann MG (2001) The molecular biology and nomenclature of activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activation transcribing factor proteins and homeostasis. *Gene* 273:1-11

84. Hall A, Nobes CD (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:965-970

85. Hamik A, Lin Z, Kumar A, Balcells M, Sinha S, Katz J, Feinberg MW, Gerzsten RE, Edelman ER, Jain MK (2007) Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem* 282:13769-13779

86. Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX (2002) Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 8:203-207

87. Hahntow IN, Mairuhu G, van Valkengoed IG, Baas F, Alewijnse AE, Koopmans RP, Michel MC (2009) Are RGS2 gene polymorphisms associated with high blood pressure in an ethnic- and gender-specific manner? *Am J Hypertens* 22:80-86

88. Han ES, Muller FL, Perez VI, Qi W, Liang H, Xi L, Fu C, Doyle E, Hickey M, Cornell J, Epstein CJ, Roberts LJ, Van Remmen H, Richardson A (2008) The in vivo gene expression signature of oxidative stress. *Physiol Genomics* 34:112-126

89. Harrison SC, Aggarwal AK (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix-motif. *Annu Rev Biochem* 59:993-969
90. Harrison SC (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353:715-719
91. Hatipoglu OF, Hirohata S, Cilek MZ, Ogawa H, Miyoshi T, Obika M, Demircan K, Shinohata R, Kusachi S, Ninomiya Y (2009) ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 284:16325-16333
92. Hausenloy DJ, Yellon DM (2004) New directions for protecting the heart against ischemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61:448-460
93. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM (2005) Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:971-976
94. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrik SH, Keith FM, Bronstein MH (1994) Relationship of proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularisation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110:1663-1669
95. Herschbach BM, Johnson AD (1993) Transcribed repression in eukaryotes. *Annu Rev Cell Biol* 9:479-511
96. Hickey DA, Benkel BF, Abukashawa SM (1989) A general model for the evolution of nuclear pre-mRNA introns. *J Theor. Biol.* 137:41-53
97. Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Kaminska A, Fuchs M, Klein G, Podewski E, Grote K, Kiian I, Wollert KC, Hilfiker A, Drexler H (2004) Regulation of proangiogenic factor CCN1 in cardiac muscle: impact of ischemia, pressure overload, and neurohumoral activation. *Circulation* 109:2227-2233
98. Hill SJ (2006) G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol* 147 Suppl1:S27-37

99. Huber W, von Heydebreck A, Suelmann H, Poustka A, Vingron M (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18:96-104
100. Im HJ, Pittelkow MR, Kumar R (2002) Divergent regulation of the growth-promoting gene IEX-1 by the p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem* 277:14612-14621
101. Isenberg JS, Romeo MJ, Maxhimer JB, Smedley J, Frazier WA, Roberts DD (2008) Gene silencing of CD47 and antibody ligation of thrombospondin-1 enhance ischemic tissue survival in a porcine model: implications for human disease. *An Surg* 247:860-868
102. Hoffmann J, Simon P, Zimmermann AK, Lemancyk M, Walter T, Beyer M, Hoffmeister HM, Ziemer G, Wendel HP (2005) Thrombospondin 1 as possible key factor in the hemocompatibility of endocoronary prostheses. *Biomaterials* 26:5240-5250
103. Hori T, Naishiro Y, Sohma H, Hatakeyama N, Yamamoto M, Sonoda T, Mizue Y, Tsutsumi H, Kokai Y (2008) CCL8 is a potential candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease. *Blood* 111:4403-4412
104. Hussain S, Bharti AC, Salam I, Bhat MA, Mir MM, Hedau S, Siddiqi MA, Basir SF, Das BC (2009) Transcription factor AP-1 in esophageal squamous cell carcinoma: alterations in activity and expression during human Papillomavirus infection. *BMC Cancer* 16:319-329
105. Jackson ME (1991) Negative regulation of eukaryotic transcription *J Cell Sci* 100:1-7
106. Jacobs-Helber SM, Abutin RM, Tian C, Bondurant M, Wickrema A, Sawyer ST (2002) Role of JunB in erythroid differentiation. *J Biol Chem* 277:4859-4866
107. Jeyaraj S, Boehmer C, Lang F, Palmada M (2007) Role of SGK1 kinase in regulating glucose transport via glucose transporter GLUT4. *Biochem Biophys Res Commun* 356:629-635

108. Jin R, De Smaele E, Zazzeroni F, Nguyen DU, Papa S, Jones J, Cox C, Gelinas C, Franzoso G (2002) Regulation of the gadd45beta promoter by NF-kappaB. *DNA Cell Biol* 21:491-503
109. Johnson LN, Barford D (1993) The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22: 199-232
110. Jung YD, Liu W, Reinmuth N, Ahmad SA, Fan F, Gallick GE, Ellis LM (2001) Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleucin-1 beta in human vascular smooth muscle cells via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Angiogenesis* 4:155-162
111. Kaji H, Fukano C, Kimura Y, Takiguchi E, Tanida K (2008) Genetic variations at the CCAAT/enhancer-binding protein delta are associated with metabolic phenotypes in the Japanese population. *Metab Syndr Relat Disord* 6:24-31
112. Katz AM (2001) *Physiology of the heart*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia (PA): Lippincott, Williams and Williams
113. Kawanami D, Mahabeleshwar GH, Lin Z, Atkins GB, Hamik A, Haldar SM, Maemura K, Lamanna JC, Jain MK (2009) Kruppel-like factor 2 inhibits hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and function in the endothelium. *J Biol Chem* 284:20522-20530
114. Kazerounian S, Yee KO, Lawler J (2008) Thrombospondin in cancer. *Cell Mol Life Sci* 65:700-712
115. Khachigian LM, Fahmy RG, Zhang G, Bobrshew YV, Kaniaros A (2002) c-Jun regulates vascular smooth muscle cell growth and neointima formation after arterial injury. Inhibition by a novel DNA enzyme targeting c-Jun. *J Biol Chem* 277:22985-22991
116. Khachigian LM (2006) Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* 98:186-191

117. Kim KP, Wahl LM, Yanek LR, Becker DM, Becker LC (2007) A monocyte chemo-attractant protein-1 gene polymorphism is associated with occult ischemia in a high-risk asymptomatic population. *Atherosclerosis* 193:366-372
118. Kim TW, Yim S, Choi BJ, Jang Y, Lee JJ, Sohn BH, Yoo HS, Yeom YI, Park KC (2010) Tristetraprolin regulates the stability of HIF-1alpha mRNA during prolonged hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 391:963-968
119. Kingma JG Jr (1999) Cardiac adaptation to ischemia-reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 874:83-99
120. Kivelä R, Kyröläinen H, Selänne H, Komi PV, Kainulainen H, Vihko V (2007) A single bout of exercise with high mechanical loading induces the expression of Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 103:1395-1401
121. Kobayashi H, Sugihara K, Uetake H, Higuchi T, Yasuno M, Enmoto M, Iida S, Lenz HJ, Danenberg KD, Danenberg PV (2009) Messenger RNA expression of COX-2 and angiogenic factors in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis. *Int J Oncol* 34:1147-1153
122. Kohl M (2007) SLmics: Miscellaneous functions for analysis of gene expression data at SIRS-Lab GmbH. R package, SIRS-Lab GmbH Jena
123. Konstantinov IE, Coles JG, Boscarino C, Takahashi M, Goncalves J, Ritter J et al. (2004) Gene expression profiles in children undergoing cardiac surgery for right heart obstructive lesions. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127: 746-754
124. Konstantinov IE, Arab S, Li J (2005) The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:1326-1332
125. Korgun ET, Demir R, Sedlmayr P, Desoye G, Aarikan GM, Puerstner P, Haeusler M, Dohr G, Skofitsch G, Hahn T (2002) Sustained hypoglycaemia affects glucose transporter expression of human blood leucocytes. *Blood Cells Mol Dis* 28:152-159

126. Kragstrup TW, Otkjaer K, Holm C, Jorgensen A, Hokland M, Iversen L, Deleuran B (2008) The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Cytokine* 41:16-23
127. Krane M, Dummler S, Dreßen M, Hauner H, Hoffmann M, Haller D, Heller K, Widhirt S, Voss B, Grammer J, Lahm H, Lange R, Bauernschmitt R (2010) Identification of an up-regulated anti-apoptotic network in the internal thoracic artery. *Int J Cardiol* PMID: 20207035
128. Kumar R, Lutz W, Frank E, Im HJ (2004) Immediate early gene X-1 interacts with proteins that modulate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1293-1298
129. Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ (1999) Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor  $\beta$  mRNA. *Mol Cell Biol* 19:4311-4323
130. Landschulz WH, Johnson PF, McNight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins. *Science* 240: 1759-1764
131. Laumet G, Chouraki V, Boley BG, Legry V, Health S, Zelenika D, Fievet N, Hannequin D, Delepine M, Pasquier F, Hanon O, Brice A, Epelbaum J, Berri C, Dartigues JF, Tzourio C, Lambert JC (2010) Systematic analysis of candidate genes for Alzheimer's disease in a French, genom-wide association study. *J Alzheimers Dis* (Epub ahead for print)
132. Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK (2003) Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet.* 33:85-89
133. Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC (2008) Cyclooxygenase polymorphisms and risk of cardiovascular events: the Artherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Clin Pharmacol Ther* 83:52-60
134. Leung WK, To KF, Go MY, Chan KK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ (2003) Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 23:1317-1322

135. Levy JH, Tanaka KA (2003) Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 75:715-720
136. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170:3369-3376
137. Li J, Mahajan A, Tsai MD (2006) Ankyrid repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* 45:15168-15178
138. Li Q, Ke N, Sundaram R, Wong-Staal F (2006) NR4RA 1, 2, 3 – an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histol Histopathol.* 21:533-540
139. Limb J, Yoon S, Lee K, Kim B, Bae Y, Jhon G, Kim J (2009) Regulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells by FosB, a member of the Fos family of AP-1 transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 66:1962-1973
140. Liu D, Holmes DI, Stannard A, Zachary I (2003) Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and related nuclear receptors Nurr 77, Nurr 1 and Nor 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:2002-2007
141. Liu D, Evans I, Britton G, Zachary I (2008) The zinc-finger transcription factor, early growth response 3, mediates VEGF-induced angiogenesis. *Oncogene* 21:2989-2998
142. Liu L, Zhu J, Glass PS, Brink PR, Rampil IJ, Rebecchi MJ (2009) Age-associated changes in cardiac gene expression after preconditioning. *Anesthesiology* 111:1052-1064
143. Liu Y, Li YM, Tian RF, Liu WP, Fei Z, Long QF, Wang XA, Zhang X (2009) The expression and significance of HIF-1 alpha and GLUT-3 in glioma. *Brain Res* 1304:149-54
144. Liu YJ, Xu Y, Yu Q (2006) Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* 25:2452-2467

145. Löhr K, Möritz C, Contente A, Dobbstein M (2003) p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* 278:32507-32516
146. Lubrano V, Del Turco S, Nicolini G, Di Cecco P, Basta G (2008) Circulating levels of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 are associated with inflammatory markers. *Lipids* 43:945-950
147. Lucas PC, Granner DK (1992) Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem* 61:1131-1173
148. Mann DL (2003) Stress-activated cytokines and the heart: from adaption to maladaptation. *Annu Rev Physiol* 65:81-101
149. Martorell L, Gentile M, Rius J, Rodriguez C, Crespo J, Badimon L, Martinez-Gonzalez J (2009) The hypoxia-inducible factor1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells in hypoxia. *Mol Cell Biol* 29:5828-5842
150. Marwali MR, Hu CP, Mohandas B, Dandapat A, Deonikar P, Chen J, Cawich I, Sawamura T, Kavdia M, Mehta JL (2007) Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 322:1324-1332
151. Massrieh W, Derjuga A, Doualla-Bell F, Ku CY, Sanborn BM, Blank V (2006) Regulation of the MAFF transcription factor by proinflammatory cytokines in myometrial cells. *Biol Reprod* 74:699-705
152. Maulik N, Goswami S, Galang N, Das DK (1999) Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NFkB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaption. *FEBS Lett* 443:331-336
153. Maxwell MA, Muscat GEO (2006) The NR4a subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4:e002



154. McMullen JR, Shioi T, Huang WY (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phospho-inositide 3-kinase (p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 279:4782-4793
155. Meiboom M, Murura Escobar H, Pentimalli F, Fusco A, Bullerdiek J (2003) A 3.4-kbp transcript of ZNF331 is solely expressed in follicular thyroid adenomas. *Cytogenet Genome Res* 101:113-117
156. Meyuhaz R, Pikarsky E, Tavor E, Klar A, Abramovitch R, Hochman J, Lago TG, Honigman A (2008) A key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CYR61) in tumor cells. *Mol Cancer Res* 6:1397-1409
157. Merlini PA, Rossi ML, Faioni EM, Franchi F, Bramuchi E, Lucreziotti S, Biguzzi E, Mannucci PM, Ardissino D (2004) Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in human coronary atherosclerotic plaques. *Ital Heart J* 5:42-47
158. Metais C, Li J, Simons M, Sellke FW (1999) Serotonin-induced coronary contraction increases after blood cardioplegia-reperfusion: role of COX-2 expression. *Circulation* 100:328-334
159. Metha JL, Li D (2002) Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor. *J Am Coll Cardiol* 39:1429-1435
160. Metha JL (2004) The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 20:Suppl B:32B-36B
161. Mii S, Khali RA, Morgan KG, Ware JA, Kent KC (1996) Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270:142-150
162. Misra S, Lee N, Fu AA, Raghavakaimal S, Mandrekar J, Bjarnson H, McKusick MA, Iruela-Arispe L, Mukhopadhyay D (2008) Increased expression of a disintegrin and metalloproteinase thrombospondin 1 in thrombosed hemodialysis grafts. *J Vasc Interv Radiol* 19:111-119

163. Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA (2005) Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol* 20:1327-1338
164. Morey JS, Ryan JC, van Dolah FM (2006) Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarray and real-time PCR. *Biol Proced Online* 8:175-193
165. Morgan EN, Boyle EM, Yun W, Griscavage-Ennis JM, Farr AL, Canty TG Jr, Pohlman TH, Verrier ED (1999) An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann Thorac Surg* 68:377-382
166. Murray CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136
167. Murrell M, Khachigian L, Ward MR (2007) The role of c-jun in PDTC-sensitive flow-dependent restenosis after angioplasty and stenting. *Atherosclerosis* 194:364-371
168. Nagy B, Szendroi A, Romics I (2009) Overexpression of CD24, c-myc and phospholipase 2A in prostate cancer tissue samples obtained by needle biopsy. *Pathol Onco Res* 15:279-283
169. Nakagawa T, Iida S, Osanai T, Uetake H, Aruga T, Toriya Y, Takagi Y, Kawachi H, Sugihara K (2008) Decreased expression of SOCS3 mRNA in breast cancer with lymph node metastasis. *Oncol Rep* 19:33-39
170. Nakamura K, Hirohata S, Murakami T, Demircan K, Oohashi T, Ogawa H, Koten K, Toeda K, Kusachi S, Ninomiya Y, Shiratori Y (2004) Dynamic induction of ADAMTS1 gene in early phase of acute myocardial infarction. *J Biochem* 136:439-446
171. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelle A, van der Meer JW, Dinarello CA (2009) Differential requirement for the

activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 113:2324-2335

172. Nelson DP, Wechsler SB, Miura T, Stagg A, Newburger JW, Mayer JE Jr, Neufeld EJ (2002) Myocardial immediate early gene activation after cardiopulmonary bypass with cardiac ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg* 73:156-162

173. Nevins JR (1983) The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 441-66

174. Ni J, Waldman A, Khachgian L (2010) c-Jun regulates shear- and injury- inducible Egr-1 expression, vein graft stenosis after autologous end-to-side transplantation in rabbits, and intimal hyperplasia in human saphenous veins. *J Biol Chem* 285:4038-4048

175. Niu J, Kolattukudy PE (2009) Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci* 117:95-109

176. Nobles CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 141:187-197

177. Nobles M, Benians A, Tinker A (2005) Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18706-18711

178. Numakura C, Shirahata E, Yamashita S, Kijima K, Matsuki T, Hayasaka K (2003) Screening of early growth response 2 gene in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease type1. *J Neurol Science* 210:61-64

179. Olofsson PS, Sheikine Y, Jatta K, Ghaderi M, Samnegard A, Erikson P, Sirsjö A (2009) A functional interleukin-1 receptor antagonist polymorphism influences atherosclerosis development. The interleukin-1 beta:interleukin-1 receptor antagonist balance in atherosclerosis. *Circ J* 73:1531-1536

180. Ono T, Kitaura H, Ugai H, Murata T, Yokoyama KK, Iguchi-Arigo SMM, Ariga H (2000) TOK-1, a novel p21Cip1-binding protein that cooperatively enhances p21-dependent inhibitory activity toward CDK2 kinase. *J Biol Chem* 275:31145-31154
181. O'Rourke JP, Yuan R, DeWille J (1997) CCAAT/enhancer-binding protein-delta (C/EBP-delta) is induced in growth-arrested mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 272:6291-6296
182. Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T (2008) Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 104:1918-1926
183. Ou HC, Song TY, Yeh YC, Huang CY, Yang SF, Chiu TH, Tsai KL, Chen KL, Wu YJ, Tsai CS, Chang LY, Kuo WW, Lee SD (2010) EGCG protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by inhibiting LOX-1-mediated signalling. *J Appl Physiol* Epub ahead for print
184. Park HJ, Chang K, Park CS, Jang SW, Ihm SH, Kim PJ, Baek SH, Seung KB, Choi KB (2008) Coronary collaterals: the role of MCP-1 during the early phase of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 130:409-413
185. Park JK, Chung YM, Kang S, Kim YT, Kim HJ, Kim JS, Yoo YD (2002) C-Myc exerts a protective function through ornithine decarboxylase against cellular insults. *Mol Pharmacol* 62:1400-1408
186. Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, Braunwald E (1988) Postischemic myocardial "stunning": a clinically relevant phenomenon. *Ann Intern Med* 108:626-633
187. Patel VI, Daniel S, Longo CR, Shirkhande GV, Scali ST, Czismadia E, Groft CM, Shukri T, Motley-Dore C, Ramsey HE, Fisher MD, Grey ST, Arvelo MB, Ferran C (2006) A20, a modulator of smooth muscle cell proliferation and apoptosis, prevents and induces regression of neointimal hyperplasia. *Faser J* 20:1418-1430

188. Patino WD, Kang JG, Matoba S, Mian OY, Gochuico BR, Hwang PM (2006) Atherosclerotic plaque macrophage transcriptional regulators are expressed in blood and modulated by tristetraprolin. *Circ Res* 98:1282-1289
189. Pearce D (2003) SGK1 regulation of epithelial sodium transport. *Cell Physiol Biochem* 13:13-20
190. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P (2005) Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J Biol Chem* 280:29256-29262
191. Podgoreanu M, Michelotti GA, Sato Y, Smith M, Lin S, Morris R, Grocott H, Mathew J, Schwinn D (2005) Differential cardiac gene expression during cardiopulmonary bypass: Ischemia-independent up-regulation of proinflammatory genes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:330-3399
192. Pramanik K, Chun CZ, Garnaas MK, Samant GV, Li K, Horswill MA, North PE (2009) Dusp-5 and Snrk-1 coordinately function during vascular development and disease. *Blood* 113:1184-1191
193. Proudfoot NJ (1989) How RNA polymerase II terminates transcription in higher eucaryotes. *Trends Biochem Sci* 14:105-110
194. Rahimtoola SH (1997) Importance of diagnosing hibernating myocardium: how and whom? *J Am Coll Cardiol* 30 1701-1706
195. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER (2001) Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* 3:26-31
196. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER (2001) Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 25:443-451

197. Rangel J, Nosrati M, Leong SP, Haqq C, Miller JR 3<sup>rd</sup>, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M (2008) Novel role for RGS1 in melanoma progression. *Am J Surg Pathol* 32:1207-1212
198. Regard J, Scheek S, Borbiev T, Lanahan A, Schneider A, Demetriades AM, Hiemisch H, Barnes CA, Verin A, Worley PF (2004) *Verge*: A novel vascular early response gene. *J Neurosci* 24:4092-4103
199. Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R (2006) Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochem Biophys Acta* 1765:178-188
200. Rhodes D, Klug A (1993) Zinkfinger. *Spektrum* 4:54-61
201. Ritter LM, Bryans M, Abdo O, Sharma V, Wilkie NM (1995) MIP1 alpha nuclear protein (MNP), a novel transcription factor expressed in hematopoietic cells that is crucial for transcription of human MIP-1 alpha gene. *Mol Cell Biol* 15:3110-3118
202. Rivest S, Lacroix S, Valliere L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N (2000) How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:22-38
203. Rosenkilde MM, Benned-Jensen T, Andersen H, Holst PJ, Kledal TN, Lüttichau HR, Larsen JK, Christensen JP, Schwartz TW (2006) Molecular pharmacological phenotyping of EBI2. An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *J Biol Chem* 281:13199-13208
204. Rouault JP, Falette N, Guehenneux F, Guillot C, Rimokh R, Wang Q, Berthet C, Moyret-Lalle C, Savatier P, Pain B, Shaw P, Berger R, Samarut J, Magaud JP, Ozturk M, Samarut C (1996) Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* 14:482-486
205. Ruel M, Bianchi C, Khan TA, Xu S, Liddicoat JR, Voisine P, Araujo E, Lyon H, Kohane IS, Libermann T, Sellke FW (2003) Gene expression profile after cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:1521-1530

206. Ruf IK, Rhyne PW, Yang H, Borza CM, Hutt-Fletcher LM, Cleveland JL, Sample JT (2001) EBV regulates c-MYC, apoptosis, and tumorigenicity in Burkitt's lymphoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 258:153-160
207. Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, Mochizuki N (2009) Angiopoetin-1 induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of monocyte enhancer factor 2. *J Biol Chem*:284:5592-5601
208. Sakurai K, Sawamura T (2003) Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J Pharmacol Sci* 91:182-186
209. Sanders J, Hawe E, Brull DJ, Hubbart C, Lowe GD, Rumley A, Humphries SE, Montgomery HE (2009) Higher IL-6 levels but not IL-6-174G>C or 573G>C genotype are associated with postoperative complication following coronary artery bypass graft (CABG) surgery. *Artherosclerosis* 204:196-201
210. Sangodkar J, Shi J, Difeo A, Schwartz R, Bromberg R, Choudhri A, McClinch K, Hatami R, Scheer E, Kremer-Tal S, Martignetti JA, Hui A, Leung WK, Friedmann SL, Narla G (2009) Functional role of the KLF6 tumor suppressor gene in gastric cancer. *Eu J Cancer* 45:666-676
211. Santini MP, Tsao L, Monassier L, Theodoropoulos C, Carter J, Lara-Pezzi E, Slonimsky E, Delafontaine P, Song YH, Freund C, Suzuki K, Rosenthal N (2007) Enhancing repair of the mammalian heart. *Circ Res* 100:1732-1740
212. Schulze C, Conrad N, Schütz A, Egi K, Reichenspurner H, Reichart B, Wildhirt SM (2000) Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 48:364-369
213. Schütt C, Bröker B (2006) *Grundwissen Immunologie*. 1st ed. Elsevier. Spektrum Akademischer Verlag. München

214. Sebens Mürköster S, Rausch AV, Isberner A, Minkenberg J, Blaszczyk E, Witt M, Fölsch UR, Schmitz F, Schäfer H, Arlt A (2008) The apoptosis-inducing effect of gastrin on colorectal cancer cells relates to an increased IEX-1 expression mediating NF-kappaB inhibition. *Oncogene* 27:1122-1134
215. Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 804-808
216. Sehl PD, Tai JT, Hillan KJ, Brown LA, Goddard A, Yang R et al (2000) Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation* 101: 1990-2000
217. Sellke FW, Shafique T, Ely DL, Weintraub RM (1993) Coronary endothelial injury after cardiopulmonary bypass and ischemic cardioplegia is mediated by oxygen-derived free radicals. *Circulation* 88:395-400
218. Sellke FW, Tofukuji M, Stamler A, Li J, Wang SY (1997) Beta-adrenergic regulation of the cerebral microcirculation after hypothermic cardiopulmonary bypass. *Circulation* 96:304-310
219. Shanmugam I, Cheng G, Terranova PF, Trasher JB, Thomas JB, Li B (2007) Serum/glucocorticoid-induced protein kinase-1 facilitates androgen receptor-dependent cell survival. *Cell Death Differ* 14:2085-2094
220. Shaw RJ (2009) Tumor suppression by LKB1: SIK-ness prevents metastasis. *Sci Signal* 2:55-61
221. Shembade N, Harhaj NS, Liebl DJ, Harhaj EW (2007) Essential role for TAX1BP1 in termination of TNF-alpha-, IL-1- and LPS-mediated NF-kappaB and JNK signalling. *EMBO J* 26:3910-3922
222. Shen B, Smith RS Jr, Hsu YT, Chao L, Chao J (2009) Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation via increased endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem* 284:35471-35478



223. Shin IS, Asano T, Yao Y, Zhang R, Claret FX, Korc M, Sabapathy K, Menter DG, Abbruzzese JL, Reddy SA (2009) Activator protein-1 has an essential role in pancreatic cancer cells and is regulated by a novel Akt-mediated mechanism. *Mol Cancer Res* 7:745-754
224. Shin IS, Kim JM, Kim KL, Jang SY, Jeon ES, Kim DK, Suh W, Kim YW (2009) Early growth response factor-1 is associated with intraluminal thrombus formation in human abdominal aortic aneurysm. *J Am Coll Cardiol* 53:792-799
225. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R (2000) Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10197-10202
226. Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Ishikawa H, Shinohara K, Okada M, Inoue M (2004) Decreased expression of early growth response-1 and its role in uterine leiomyoma growth. *Cancer Res* 64:4677-4684
227. Shroyer AL, Grover FL, Hattler B, Collins JF, McDonald GO, Kozora E, Lucke JC, Baltz JH, Novitzky D (2009) On-pump versus off-pump coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 361:1827-1837
228. Simkhovic BZ, Marjoram P, Poizat C (2003) Brief episode of ischemia activates protective genetic program in rat heart: a gene chip study. *Cardiovasc Res* 59:450-459
229. Singh OP (2001) Functional diversity of hnRNP proteins. *Indian J Biochem Biophys* 38:129-134
230. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271:33157-33160
231. Soriano F, Baxter P, Murray L, Sporn M, Gillingwater T, Hardingham G (2009) Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin. *Mol Cells* 27:279-282

232. Splingard A, Menetrey J, Perderiset M, Cicolari J, Regazzoni K, Hamoudi F, Cabanie L, El Marjou A, Wells A, Houdusse A, de Gunzburg J (2007) Biochemical and structural characterization of the gem GTPase. *J Biol Chem* 282:1905-1915
233. Steenbergen C, Afshari CA, Petranka JG, Collins J, Martin K, Bennett L, Haugen A, Bushel P, Murphy E (2003) Alterations in apoptotic signaling in human idiopathic cardiomyopathic hearts in failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H268-H276
234. Steensma DP, Neiger J, Porcher JC, Keats J, Bergsagel PL, Knudson RA, Jenkins RB, Santa-Davila RA, Kumar R, Ketterling RP (2009) Rearrangements and amplification of IER3 (IEX-1) represent a novel and recurrent molecular abnormality in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 69:7518-7523
235. Stephenson A, Huang GY, Ngyyen NT, Reuter S, McBride JL, Ruiz JC (2004) Snf1lk encodes a protein kinase that may function in cell cycle regulation. *Genomics* 83:1105-1115
236. Strachan T, Read AP (2004) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Verlag, 3. Auflage: 317-341
237. Sung HY, Guan H, Czibula A, King AR, Eder K, Suvarna SK, Dower SK, Wilson AG, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E (2007) Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signalling pathways. *J Biol Chem* 282:18379-18387
238. Takahashi M, Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T (2008) Role of thrombospondin-1 in hypoxia-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Yakugaku Zasshi* 128:377-383
239. Takemori H, Doi J, Horike N, Katoh Y, Min L, Lin XZ, Wang ZN, Muraoka M, Okamoto M (2003) Salt-inducible kinase-mediated regulation of steroidogenesis at the early stage of ACTH-stimulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:397-400
240. Takemori H, Okamoto M (2008) Regulation of CREB-mediated gene expression by salt inducible kinase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:287-291

241. Takeuchi F, Sterlein RD, Hall RP 3<sup>rd</sup> (2003) Increased E-selectin, IL-8 and IL-10 gene expression in human skin after minimal trauma. *Exp Dermatol* 12:777-783
242. Tang CM, Insel PA (2004) GPCR expression in the heart; “new” receptors in myocytes and fibroblasts. *Trends Cardiovasc Med* 14:94-99
243. Tang D, Sivko GS, DeWille JW (2006) Promotor methylation reduces C/EBPbeta (CEBPD) gene expression in the SUM-52PE human breast cancer cell line and in primary breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 95:161-170
244. Tang SW, Chang WH, Su YC, Chen YC, Lai YH, Wu PT, Hsu CI, Lin WC, Lai MK, Lin JY (2009) MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells. *Cancer Lett* 273:35-43
245. Tatoulis J, Rice S, Davis P, Goldblatt JC, Marasco S (2006) Patterns of postoperative systemic vascular resistance in a randomized trial of conventional on-pump versus off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Ann Thorac Surg* 82:1436-1444
246. Teoh N, Leclercq I, Pena AD (2003) Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology* 37:118-128
247. Textor B, Sator-Schmitt M, Richter KH, Angel P, Schorpp-Kistner M (2006) c-Jun and Jun Bare essential for hypoglycemia-mediated VEGF induction. *Ann N Y Acad Sci* 1091:310-318
248. Thiel G, Cibelli G (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 193:287-292
249. Thurberg BL, Collins T (1998) The nuclear factor kappaB/inhibitor of kappaB autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9:387-396
250. Tone A, Shikata K, Sasaki S, Yozai K, Usui HK, Okada S, Wada J, Shikata Y, Makino H (2007) Changes of gene expression profiles in macrophages stimulated by angiotensin II-

angiotensin II induces MCP-2 through AT1-receptor. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 8:45-50

251. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK (2004) Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 64:3731-3736

252. Tsai CS, Chen DL, Lin SJ, Tsai JC, Lin TC, Lin CY, Chen YH, Huang GS, Tsai HY, Lin FY, Li CY (2009) TNF-alpha inhibits toll-like receptor 4 expression on monocytic cells via tristetraprolin during cardiopulmonary bypass. *Shock* 32:40-48

253. Tuomisto TT, Lumivuori H, Kansanen E, Häkkinen SK, Turunen MP, van Thienen JV, Horrevoets AJ, Levonen AL, Ylä-Herttuala S (2008) Simvastatin has an anti-inflammatory effect on macrophages via upregulation of an atheroprotective transcription factor, Kruppel-like factor 2. *Cardiovasc Res* 78:175-184

254. Tullai JW, Schaffer ME, Mullenbrock S, Sholder G, Kasif S, Cooper GM (2007) Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *J Biol Chem* 282:23981-23995

255. Turchi L, Fareh M, Aberdam E, Kitajima S, Simpson F, Wicking C, Aberdam D, Virolle T (2009) ATF3 and p15 (PAF) are novel gatekeepers of genomic integrity upon UV stress. *Cell Death Differ* 16:728-737

256. Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y (2003) Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene* 22:5586-5591.

257. Unoki M, Nakamura Y (2003) EGR2 induces apoptosis in various cancer cell lines by direct transactivation of BNIP3L and BAK. *Oncogene* 22:2172-2185

258. Vajdovich P (2008) Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-injury. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 38:31-123

259. Van der Vliet PC, Verrijzer CP (1993) Bending of DNA by transcription factors. *Bioessays* 15:25-32
260. Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The Pi3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346:561-576
261. Valen G, Paulsson G, Vaage J (2001) Induction of inflammatory mediators during reperfusion of human heart. *Ann Thorac Surg* 71:226-232
262. Valen G, Yan Z, Hansson GK (2001) Nuclear factor kappaB and the heart. *JACC* 38:307-314
263. Van Soeren MH, Diehl-Jones WL, Maykut RJ, Haddara WM (2000) Pathophysiology and implications for treatment of acute respiratory distress syndrome. *AACN Clin Issues* 11:179-197
264. Vereecke L, Beyaert R, van Loo G (2009) The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFA1P3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* 30:383-391
265. Vesely PW, Staber P, Hoefler G, Kenner L (2009) Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res* 682:7-12
266. Victor A, Klug SJ, Blettner M (2005) cDNA-Microarrays-Strategien zur Bewältigung der Datenflut. *Dtsch Ärztebl* 102:255-360
267. Voisine P, Ruel M, Khan TA, Bianchi C, Xu S, Kohane I, Out H, Libermann TA, Saltiel AR, Sellke FW (2004) Differences in gene expression profiles of diabetic and nondiabetic patients undergoing cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. *Circulation* 110:280-286
268. Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL (1996) Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112:806-811

269. Wang A, Rud J, Olson CM Jr, Anguita J, Osborne BA (2009) Phosphorylation of Nur77 by the MEK-ERK-RSK cascade induces mitochondrial translocation and apoptosis in T cells. *J Immunol* 183:3268-3277
270. Wang JM, Tseng JT, Chang WC (2005) Induction of human NF-IL6beta by epidermal growth factor is mediated through the p38 signaling pathway and cAMP response element-binding protein activation in A431 cells. *Mol Biol Cell* 16:3365-3376
271. Wang SY, Friedman M, Franklin A, Sellke FW (1995) Myogenic reactivity of coronary resistance arteries after cardiopulmonary bypass and hyperkalemic cardioplegia. *Circulation* 92:1590-1596
272. Wahlgren CM, Zheng W, Shaalan W, Tang J, Bassiouny HS (2009) Human carotid plaque calcification and vulnerability. Relationship between degree of plaque calcification, fibrous cap inflammatory gene expression and symptomatology. *Cerebrovasc Dis* 27:193-200
273. Wahlström T, Henriksson M (2007) Mnt takes control as key regulator of the myc/max/mxd network. *Adv Cancer Res* 97:61-80
274. Warton K, Foster NC, Gold WA, Stanley KK (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* 342:85-95
275. Weitzmann JB (2001) Life and death in the JUNgle. *Trends Mol Med* 7:141-142
276. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G (2005) Integration of oxygen signalling at the consensus HRE. *Sci STKE* 306:rev12
277. White RJ, Jackson SP (1992) The TATA-binding protein: a central role by transcription by RNA polymerases I, II and III. *Trends Genet* 8:284-288
278. Wickens M (1990) How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci* 15:277-281

279. Willet CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK (2004) Direct evidence that VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10:145-147
280. Winkles JA (1998) Serum- and polypeptide growth factor-inducible gene expression in mouse fibroblasts. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58:41-78
281. Wolf SC, Schulze M, Risler T, Rieg T, Lang F, Schulze-Osthoff K, Brehm BR (2006) Stimulation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 gene expression by endothelin-1. *Biochem Pharmacol* 14:1175-1183
282. Wu MY, Chen MH, Liang YR, Meng GZ, Yang HX, Zhuang CX (2001) Experimental and clinicopathologic study on the relationship between transcription factor Egr-1 and esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 4:490-495
283. Wu MX (2003) Roles of stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* 8:11-18
284. Wu ZK, Tarkka MR, Pehkonen E, Kaukinen L, Honkonen EL, Kaukinen S (2000) Beneficial effects of ischemic preconditioning on right ventricular function after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 70:1551-1557
285. Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR (2002) Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. *Circulation* 106:3091-3096
286. Xuan YT, Tang XL, Barnerjee S (1999) Nuclear factor-kB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 84:1095-1109
287. Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, Messing RO, Bolli R (2005) Role of protein kinase C-epsilon-Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signalling cascade in the activation

of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation* 112:1971-1978

288. Yan C, Lu D, Hai T, Boyd DB (2005) Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J* 24:2425-2435

289. Yang J, Ahmed A, Poon E, Perusinghe N, de Haven BA, Box G, Valenti M, Eccles S, Rouschop K, Wouters B, Ashcroft M (2009) Small-molecule activation of p53 blocks hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in vivo and leads to tumor cell apoptosis in normoxia and hypoxia. *Mol Cell Biol* 29:2243-2253

290. Yang Z, Song L, Huang C (2009) Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades. *Curr Cancer Drug Targets* 9:915-930

291. Yao A, Takahashi T, Aoyagi T, Kinugawa K, Kohmoto O, Sugiura S, Serizawa T (1995) Immediate-early gene induction and MAP kinase activation during recovery from metabolic inhibition in cultured cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96:69-77

292. Ye X, Shi Y, Huo K, Chen D (2009) Establish a recombinant yeast detection system to study the effect of MIP on transactivation function of hMafF in US2-driven gene transcription. *J Microbiol Methods* 79:96-100

293. Yoon S, Ha HJ, Kim YH, Won M, Park M, Ko JJ, Lee K, Bae J (2009) IEX-1 induced cell death requires BIM and is modulated by MCL-1. *Biochem Biophys Res Commun* 382:400-404

294. Yoshida T, Sugiura H, Mitobe M, Tsuchiya K, Shirota S, Nishimura S, Shiohira S, Ito H, Gullans S, Akiba T, Nitta K (2008) ATF3 protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 19:217-224

295. Yoshida Y, Togi K, Matsumae H, Nakashima Y, Kojima Y, Yamamoto H, Ono K, Nakamura T, Kita T, Tanaka M (2007) Ccn1 protects cardiac myocytes from oxidative stress via beta1 integrin-Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 355:611-618



296. You B, Jiang YY, Chen S, Yan G, Sun J (2009) The orphan nuclear receptor Nur77 suppresses endothelial cell activation through induction of IkappaBalpha expression. *Circ Res* 104:742-749
297. Yu JR, Wu YJ, Qin Q, Lu KZ, Yan S, Liu XS, Zheng SS (2005) Expression of cyclooxygenase-2 in gastric cancer and its relation to liver metastasis and long-term prognosis. *World J Gastroenterol* 11:4908-4911
298. Yu L, Miao H, Hou Y, Zhang B, Guo L (2006) Neuroprotective effect of A20 on TNF-induced postischemic apoptosis. *Neurochem Res* 31:21-32
299. Yun Qing M, Qiang J, Xisheng W, Jing F, Bangchang C, Yan X, Jue L, Dayi H (2007) Study on the relationship of APACHE III and levels of Cytokines in patients with systemic inflammatory response syndrome after coronary artery bypass grafting. *Biol Pharm Bull* 30:410-417
300. Zak I, Sarecka B, Krauze J (2008) Synergistic effects between 561A>C and 98G>T polymorphisms of E-selectin gene and hypercholesterolemia in determining the susceptibility to coronary artery disease. *Heart Vessels* 23:257-263
301. Zhang N, Ahsan MH, Zhu L, Sambucetti LC, Purchino AF, West DB (2005) NF-kappaB and not the MAPK signaling pathway regulates GADD45beta expression during acute inflammation. *J Biol Chem* 280:21400-21408
302. Zhang T, Wang P, Ren H, Fan J, Wang G (2009) NGFI-B nuclear orphan receptor Nurr1 interacts with p53 and suppresses its transcriptional activity. *Mol Cancer Res* 7:1408-1415
303. Zhang Y, Pu X, Shi M, Chen L, Song Y, Qian L, Yuan G, Zhang H, Yu M, Shen B, Guo N (2007) Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model. *BMC Cancer* 7:145-152
304. Zhao CY, Szekely L, Bao W, Selivanova G (2010) Rescue of p53 by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation. *Cancer Res* 70:3372-3381

305. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbin BA, Lamb NE, Yang VW (2004) Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 23:395-402

306. Zhou S, Wang S, Wu Q, Fan J, Wang Q (2008) Expression of glucose transporter-1 and -3 in the head and neck carcinoma – the correlation of the expression with the biological behaviors. *J Otorhinolaryngol Relat Spec* 70:189-194

## **8. Danksagung**

Ich danke Herrn OA PD Dr. med. H. Huwer für das Überlassen des Themas und die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. R. Claus (Leiter Institut für Experimentelle Anästhesie, Reserch Center Lobeda der Friedrich Schiller Universität Jena) danke ich für die konstruktive Hilfe bei der frühen Planung des Projektes und der Hilfe bei der Konservierung der Myokardproben.

Ich danke Fr. Dr. Elke Grunow (SIRS-Lab GmbH, Jena) für die praktische Durchführung der Untersuchungen (RNA Amplifikation und Hybridisierung der Microarrays).

Fr. Dr. Karen Felsmann (Scientific Liason Manager, SIRS-Lab GmbH, Jena) danke ich für die Mithilfe bei der Koordination der Untersuchungen.

Mein Dank geht außerdem an Frau Wiebke Iffert (SIRS-Lab GmbH, Jena) für die Hilfe bei der Auswertung der Microarrays und der statistischen Analyse.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	BRAUSCH
Vorname	Axel Lorenz
Wohnhaft	Zum Ottersberg 18, 66802 Überherrn - Altforweiler
Geburtsdatum	22.05.1970
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder (Anna & Max)
Vater	Günther Brausch, Direktor Gesamtschule Ludweiler († 1993)
Mutter	Margret Brausch, Lehrerin

### Schulbildung / Wehrdienst

1976 - 1980	Grundschule 66333 Völklingen – Lauterbach
1980 - 1989	Warndt-Gymnasium, 66333 Völklingen – Geislautern
1989 - 1991	Wehrdienst 4./Jägerbatallion 542 in Bexbach/Saar

### Hochschulbildung / Berufliche Ausbildung

1991 - 1998	Studium der Humanmedizin an der Universitätsklinik Homburg / Saar
1998 - 1999	AiP in der Abteilung für Allgemein- Unfall- und Gefäß- chirurgie, Krankenhaus Saarlouis vom DRK
29.01.2000	Approbation als Arzt
2000 - 2009	Assistenzarzt der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, SHG- Klinik Völklingen
15.02.2007	Erwerb des Facharztes für Herzchirurgie
01.10.2009	Ernennung zum Oberarzt der Klinik für Herz- und Thorax- chirurgie, SHG - Klinik Völklingen