

**Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Heribert Schunkert**

Zeitliche Veränderungen der Transkription in menschlicher
Monozyten-RNA in Folge eines akuten Myokardinfarktes:
Einfluss auf die Monozyten-Adhäsion

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Claas Sören Riedel
aus Uelzen

Lübeck 2011

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Patrick Diemert

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.06.2012

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

A. Einführung	5
1. Der akute Myokardinfarkt	5
1.1 Definition akuter Myokardinfarkt	5
1.2 Pathophysiologie	5
1.3 Therapie	6
1.4 Epidemiologie	7
2. Die Rolle des Monozyten im akuten Myokardinfarkt	7
2.1 Definition Monoyten	7
2.2 Subpopulationen der Monozyten	8
2.3 Die Rolle der Monozyten bei der Immunantwort im Myokardinfarkt ...	8
3. Genomweite Expressionsstudien und Microarrays	10
3.1 Definition DNA-Microarray	10
3.2 Genexpression im akuten Infarkt	10
4. Fragestellung und Hypothese	13
B. Material und Methoden	15
1. Studiendesign	15
2. Patientenrekrutierung	15
2.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien	15
2.2 Ablauf der Blutentnahme	15
2.3 Votum der Ethik-Kommission	16
3. Isolation der Monozyten und der RNA	16
3.1 Der AutoMACS™-Separator	16
3.2 Materialien zur CD14 ⁺ -Monozytenisolation mittels AutoMACS™	17
3.3 Durchführung CD14 ⁺ -Monozytenisolation mittels AutoMACS™	17
3.4 Materialien zur Isolation der RNA aus Monozyten	18
3.5 Vorbereitung der Monozyten für die RNA-Isolation	19
3.6 Durchführung der RNA-Isolierung aus den Monozyten	19
4. Microarray-Analyse der Monozyten-RNA-Profile	20
4.1 Ort der Microarray-Experimente	20
4.2 RNA-Vervielfältigung und Durchführung der Microarray-Experimente	21
4.3 Datenaufbereitung	22
4.4 Datenanalyse	23
C. Ergebnisse	26
1. Das Patientenkollektiv	26
2. Vorübergehende Transkriptionsänderungen während eines akuten Myokardinfarktes	27
3. Am stärksten regulierte Einzelgene	29

3.1 <i>Thrombospondin</i>	29
3.2 <i>Interleukin 1-Rezeptor 2</i>	30
3.3 <i>CX3C-Rezeptor 1</i>	31
3.4 <i>Heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor (HBEGF)</i>	32
4. Gene Set Enrichment – Analysen	32
4.1 <i>Focal Adhesion – Pathway</i>	33
D. Diskussion	38
1. Das Patientenkollektiv	38
2. Vorübergehende Transkriptionsänderungen während eines akuten Myokardinfarktes	38
3. Am stärksten regulierte Einzelgene	39
3.1 <i>Thrombospondin</i>	40
3.2 <i>Interleukin 1-Rezeptor 2</i>	41
3.3 <i>CX3C-Rezeptor 1</i>	41
3.4 <i>Heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor (HBEGF)</i>	42
4. Gene Set Enrichment – Analysen	44
4.1 <i>Focal Adhesion – Pathway</i>	44
E. Schlussfolgerung	50
1. Beantwortung der Fragestellung und Hypothese	50
F. Zusammenfassung	51
G. Literaturverzeichnis	52
H. Danksagung	61
I. Lebenslauf	62

A. Einführung

1. Der akute Myokardinfarkt

1.1 Definition akuter Myokardinfarkt

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der akute Myokardinfarkt, welcher von den gängigen kardiologischen Gesellschaften als ein sich klinisch äußernder, myokardialer Zelluntergang definiert wird, der durch anhaltende myokardiale Ischämie verursacht wird [75]. Begleitend sind dabei eine Reihe verschiedener Charakteristika klinischer, biochemischer und pathologischer Art. Die Patienten zeigen hierbei typische klinische Symptome der Ischämie (plötzlicher Brustschmerz mit typisch linksseitiger Ausstrahlung, Kurzatmigkeit, Herzklopfen usw.), EKG-Veränderungen in Form einer ST-Strecken-Hebung oder der Entwicklung einer Q-Welle und mehrheitlich auch einen Anstieg typischer Biomarker myokardialer Nekrose (Troponin T, CK-MB, LDH und weitere) [79].

1.2 Pathophysiologie

Der akute Myokardinfarkt zeigt sich in zwei Subtypen, dem transmuralen ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) und dem nur subendothelial lokalisierten Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI).

Ein STEMI wird in den meisten Fällen durch den Verschluss einer größeren Koronararterie verursacht. Das auslösende Ereignis ist häufig ein rupturierter, atherosklerotischer Gefäßplaque in einem Herzkranzgefäß. Hierdurch gelangt thrombogenes Material an die Gefäßoberfläche und die Gerinnungskaskade wird aktiviert. Das hierdurch entstehende Blutkoagel führt dann zu einem Verschluss der nachfolgenden Gefäßstrombahn [79].

Es ist mittlerweile Konsens, dass einer Plaqueruptur und dem damit verbundenen akuten Koronarsyndrom chronische und akut-entzündliche Prozesse zu Grunde liegen. Atherosklerotische Plaques weisen einen lipidreichen, nekrotischen Kern auf, der auf der Gefäßlumenseite von einer normalerweise stabilen, fibrinösen Kappe bedeckt ist, um den mechanischen Beanspruchungen Stand zu halten.

In Koronarplaques findet sich eine erhöhte Anzahl an Makrophagen und T-Zellen, so dass durch inflammatorische Mediatoren die Expression von Enzymen (Matrix-Metalloproteasen, Kollagenasen, Gelatinasen) induziert wird, welche die

Kollagenfibrillen der fibrinösen Kappe abbauen und somit die Stabilität des Plaques schwächen. Verstärkt wird diese Ausdünnung dadurch, dass andere Entzündungsmoleküle (z.B. Interferon- γ) die Neusynthese von interstitiellen Kollagenfasern hemmen. Die entzündlichen Prozesse in der Gefäßwand, so wie aber auch im passierenden Blut, nehmen Einfluss auf die prothrombotischen, sowie fibrinolytischen Eigenschaften des Endothels (erhöhte Expression von gewebsständigem Thromboplastin und PAI-1), so dass ein prokoagulatorisches Milieu die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur und einer daraus folgenden Koronarthrombose erhöht. [31]

Hält der Verschluss des Gefäßes und der damit verbundene hypoxische Zustand des Muskelgewebes länger als 30 Minuten an, so kommt es zur myokardialen Nekrose. Beginnend im Subendokard breitet sich der Gewebsuntergang mit fortschreitender Zeit in Richtung des Subepikards durch den Herzmuskel aus. Eine Wiederherstellung der Perfusion durch medizinische Interventionen oder zumindest die Rekrutierung von Kollateralgefäßen, kann die Überlebenswahrscheinlichkeit des betroffenen Gewebes verbessern [79].

1.3 Therapie

Das Mittel der Wahl ist hierbei die perkutane koronare Intervention (PCI), bei der, in der Regel über die Femoralarterie, ein Katheter in die Koronargefäße geschoben und dort das verschlossene Gefäß mittels einer Ballondilatation wieder eröffnet wird. Die Evidenzlage für dieses Verfahren ist dann besonders gut, wenn der Eingriff innerhalb von 2 Stunden, in schweren Fällen innerhalb von 90 Minuten, nach dem ersten Kontakt mit medizinischem Personal (FMC) durchgeführt worden ist. Jedoch steht ein solches Zentrum interventioneller Kardiologie nicht überall zur Verfügung, so dass alternativ, oder begleitend bis zum Erreichen der entsprechenden Klinik in infrastrukturell schwächeren Regionen, eine pharmakologische Fibrinolysetherapie begonnen wird [79]. Der Nutzen einer beginnenden systemischen Lysetherapie bis zum Start einer PCI konnte jedoch bislang nicht bewiesen werden [91]. Während der perkutanen koronaren Intervention wird oftmals ein sogenannter Stent implantiert, der die Engstelle im Gefäß offen halten soll. Der Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern nach dem Eingriff ist dann obligat, um das Risiko einer Re-Thrombosierung zu verhindern [69]. Ebenso verbessert die

Einnahme von Beta-Blockern, ACE-Hemmern und Lipidsenkern das Überleben der Patienten.

1.4 Epidemiologie

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen in westlichen Industriestaaten. Nahezu jeder 13. Deutsche stirbt in Folge eines akuten Herzinfarktes. Auch wenn die Inzidenz in den letzten Jahren etwas abgenommen hat, so erlitten allein im Jahre 2007 in Deutschland 213.683 Menschen einen Herzinfarkt. Dabei sind etwas häufiger männliche Patienten betroffen als weibliche. Auf 100.000 Einwohner erlitten 308 männliche Patienten einen Herzinfarkt, während die Inzidenz für weibliche Patientinnen bei 102 lag. Im Verlauf der letzten zwanzig Jahre konnte die Sterberate deutlich reduziert werden. So waren vor zwanzig Jahren noch 6 von 10 Herzinfarkten tödlich, während die Letalität eines solchen kardialen Ereignisses für beide Geschlechter im Jahre 2007 bundesweit bei circa 36% lag. Ursächlich verbunden ist diese positive Entwicklung mit der verbesserten Notfallversorgung. Durch die bessere Akutbehandlung und vielfältige Rehabilitationsmaßnahmen konnte auch das Risiko für einen Re-Infarkt gesenkt werden. Dennoch gibt es weiterhin große regionale Unterschiede: In Berlin ist die Sterberate am niedrigsten, während in spärlich besiedelten Regionen wie Sachsen-Anhalt oder Brandenburg heutzutage überdurchschnittlich viele Menschen an einem akuten Herzinfarkt versterben [39].

2. Die Rolle des Monozyten im akuten Myokardinfarkt

2.1 Definition Monozyten

Ein Monozyt ist eine weiße Blutzelle, die Teil des menschlichen Immunsystems ist. Die Monozyten haben zwei wichtige Hauptaufgaben: Erstens füllen sie die Bestände an gewebständigen Makrophagen und dendritischen Zellen wieder auf und zweitens sind sie an den Abläufen der inflammatorischen Antwort beteiligt. Sie stellen zirka 3 bis 8 Prozent der Leukozyten im peripheren Blut, in dem sie bis zu drei Tagen verweilen, bevor sie in lokale Gewebe auswandern, um dort zu Gewebsmakrophagen zu differenzieren. Ortständige Makrophagen beschützen das umliegende Gewebe vor körperfremden Substanzen, in dem sie fremde Antigene phagozytieren.

2.2 Subpopulationen der Monozyten

Monozyten lassen sich, wie alle Zellen, anhand ihrer spezifischen Expression bestimmter Antigene (**C**luster of **D**ifferentiation) an ihrer Oberfläche unterscheiden. Es finden sich dabei zwei große Gruppen an Populationen. Den größten Anteil im Blut stellen die klassischen CD14-positiven Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten) mit einer hohen Expressionsrate von CD14. Daneben findet sich jedoch auch eine kleinere Population an Zellen, die CD14 seltener exprimieren und zusätzlich eine Koexpression von CD16 aufweisen (CD14⁺CD16⁺ Monozyten) [84]. Die CD14⁺CD16⁺ Monozyten sind als eine reifere Stufe als die CD14⁺ - Zellen zu betrachten und wirken proinflammatorisch. Nach Stimulation mit einem mikrobiellen Antigen produzieren sie hohe Dosen an Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 12 (IL-12), welche als proinflammatorische Zytokine die Entzündungsreaktion fördern [85]. Die CD14⁺CD16⁺ Monozyten, welche im Normalfall nur etwa 10% der im Blut zirkulierenden Monozyten ausmachen, sind in bestimmten Zuständen wie Sepsis, Dialyse, Katecholaminausschüttung durch körperliche Anstrengung, sowie möglicherweise auch im akuten Koronarsyndrom erhöht [58]. Es findet sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit und der Konzentration an CD14⁺CD16⁺ Monozyten im peripheren Blut [66].

2.3 Die Rolle der Monozyten bei der Immunantwort im Myokardinfarkt

Monozyten spielen eine der Hauptrollen während der Entzündungsreaktion und der anschließenden Reparatur des Myokardgewebes nach einem akuten Herzinfarkt [51].

Im Zuge des Infarktes und der damit verbundenen therapeutischen Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes kommt es zu lokalen inflammatorischen Prozessen im infarzierten Myokardgebiet. Die lokale Entstehung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), Komplementaktivierung (C5a) und die Ausschüttung von Zytokinen (TGF-β1, TNF-α) führt bereits nach kurzer ischämischer Zeit zur gesteigerten Expression des Monozyten anlockenden Proteins (monocyte chemotactic protein, MCP-1) in den Endothelzellen des betroffenen Myokards [9][40]. Auch die Blutplättchen spielen hierbei eine wichtige Rolle. Zum einen interagieren die Thrombozyten mit den Endothelzellen, die die Plättchen dazu veranlassen den Zytokin-ähnlichen Faktor IL-1β zu sezernieren. IL-

1 β führt über den Kernfaktor NF- κ B zur verstärkten Expressierung von MCP-1, Adhäsionsmolekülen für Leukozyten (ICAM, VCAM), Enzymen zur Proteolyse und prothrombotischen Oberflächenmolekülen (TF, CD40L) [26]. Zum anderen finden sich bei Patienten im akuten Infarkt verstärkt Aggregate von Blutplättchen und Monozyten, die teilweise auch frei im Blut zirkulieren. Diese Interaktion induziert wechselseitig inflammatorische Signalwege [67], so dass die Monozyten dazu angeregt werden Chemokine (MCP-1, MIP-1 α), Zytokine (TNF- α , IL-8), prokoagulatorische Gewebefaktoren und Zelladhäsionsmoleküle zu produzieren [26]. Dieses führt zu einer vermehrten Rekrutierung von Monozyten und anderen Leukozyten im ischämischen Gebiet. Um den Monozyten den Austritt aus dem Gefäßsystem zu ermöglichen, exprimieren die Endothelzellen sogenannte Selektine an ihrer Oberfläche (L-Selektin, E-Selektin), die eine lockere Bindung zwischen Endothel und Immunzelle vermitteln. Dadurch rollen die Leukozyten zunächst an der Gefäßwand entlang, bis sie eine festere Bindung mit dem Endothel über bestimmte Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM) eingehen [61]. Die Transmigration durch die Endothelzellen und die Basallamina vermitteln andere Oberflächenmoleküle (PECAM [50], CD99 [65]). Im ischämischen Areal angekommen, differenzieren sie zu Makrophagen, welches durch eine lokale Hochregulierung des Makrophagen kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) begünstigt wird. Die ausgereiften Makrophagen werden als wichtige Quelle von Wachstumsfaktoren (TGF- β [22]) und Zytokinen (TNF- α [81]) angesehen, die die Heilung des Infarktes unterstützen [23]. Des Weiteren beseitigen sie nekrotische Myozyten und apoptotische Neutrophile und modulieren die Angiogenese und Kollageneinlagerung im Gewebe durch Histozyten. Daher spielen sie eine vielschichtige Rolle in der Regulierung der Wundheilung nach einem Myokardinfarkt [41]. Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass die Monozyten-Migration in zwei Phasen erfolgt. In den ersten Tagen immigrieren Monozyten mit dem Oberflächenprotein Ly-6C^{hi}, deren Aufgabe es ist, das beschädigte Gewebe abzuräumen, sowie proteolytische als auch inflammatorische Prozesse zu unterhalten. Im Gegensatz dazu findet sich eine maximale Anzahl von Ly-6C^{lo} Monozyten, die die Heilung des Gewebes über die Stimulation von Myofibroblasten, Kollageneinlagerung und Angiogenese fördern, erst nach einer Woche im Gewebe. Die Anwesenheit von Makrophagen im heilenden Herzen wird durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System regulierend beeinflusst. Nach

zwei bis drei Wochen verschwinden die Makrophagen und das Granulationsgewebe reift zu einer soliden Narbe [52][24].

3. Genomweite Expressionsstudien und Microarrays

3.1 Definition DNA-Microarray

Ein DNA-Microarray (auch DNA-Chip genannt) dient der Erfassung der Aktivität bestimmter Gene. Er besteht aus einer Sammlung mikroskopisch kleiner DNA-Abschnitte, die in der Regel ein bestimmtes Gen repräsentieren. Diese DNA-Sequenzen sind kovalent an einer spezifischen Stelle an die solide Oberfläche eines Glaschips gebunden. Wird die aufbereitete mRNA einer Zellprobe, in Form sogenannter fluoreszenz-markierter cDNA, auf einen DNA-Chip gegeben, so hybridisiert sie komplementär mit dem Gegenstück auf dem Microarray. Die Fluoreszenzsignale geben Aufschluss über das Vorhandensein und der Menge einzelner Transkripte. Damit ist die qualitative und quantitative Erfassung des aktuellen Transkriptoms eines großen Teiles der bekannten Gene auf einem einzigen Microarray möglich. Man spricht auch von genomweiten Expressionsstudien.

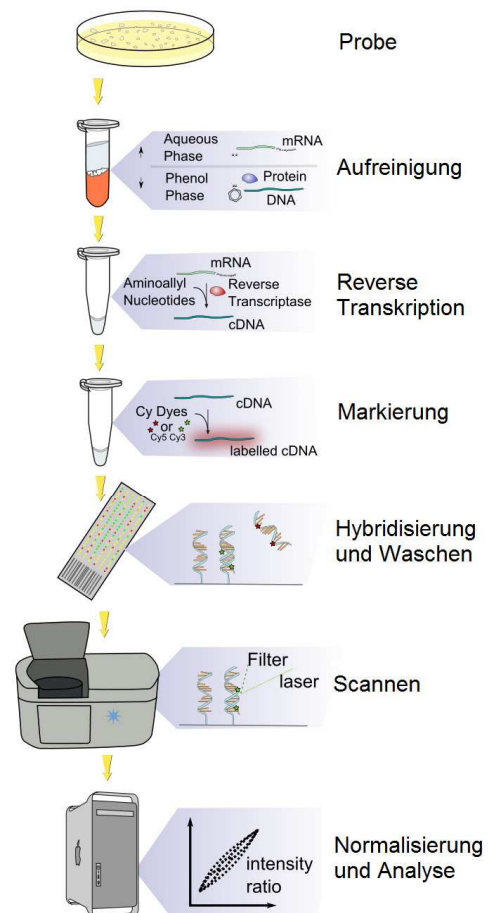


Abb. 1 zeigt schematisch das Verfahren der Microarray-Analyse [94].

3.2 Genexpression im akuten Infarkt

In den letzten Jahren ist durch eine Vielzahl an Studien einiges zur Genexpression im akuten Myokardinfarkt bekannt geworden. Im Prinzip wurde dabei die Regulation einzelner Gene unter zwei Gesichtspunkten erforscht: Inflammation und den Gewebsumbau nach einem Infarkt (remodelling).

In Hinblick auf entzündliche Vorgänge konnte im Schweineexperiment bewiesen werden, dass es ischämie-bedingt zu einer verstärkten Expression von

proinflammatorischen Genen von MCP-1, COX-2 und Gewebefaktor TF in mononukleären Zellen des peripheren Blutes kommt (PBMC). Dieses führt zum Fortschreiten der Entzündungsreaktion und zur weiteren Rekrutierung von Leukozyten. Außerdem konnte festgestellt werden, dass eine kurzzeitige Ischämie die Expression von kardialem modifizierten C-reaktiven Protein (mCRP) induziert [80].

Genomweite Untersuchungen zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz nach einem akuten Myokardinfarkt entdeckten eine starke Hochregulierung des Zytokins Fraktalkine (CX3CL1) in den betroffenen Myokard- und Bindegewebszellen, sowie eine erhöhte Immunosensitivität für seinen makrophagenständigen Rezeptor CX3CR1 [34]. In der Forschung zum akuten Nierenversagen ließen sich durch eine Unterdrückung des CX3C-Rezeptors die Inflamationsprozesse im ischämischen Areal günstig beeinflussen [54].

In einer Studie von 2007 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu einer gesunden Kontrollgruppe, in Monozyten von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom die mRNA-Spiegel von TNF- α und IL-6 deutlich erhöht sind und mit den Serumkonzentration dieser Zytokine korrelieren [17]. TNF- α und IL-6 unterhalten den Entzündungsprozess und führen unter anderem zu einer Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen (IL-6).

Die zirkulierenden, monozytären Zellen exprimieren verstärkt den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), dessen Aktivierung pro-entzündliche Signalwege in Gang setzt. Ebenso wurde eine Hochregulierung von IL-12 und B7-1 registriert. Beide Zytokine sind bekannt für ihre Aktivierung von T-Zellen und spielen so auch eine Rolle für das Fortschreiten der Plaqueinstabilität, die als ursächlich für das koronare Ereignis anzusehen ist [48].

Gegensätzlich wirkt der erhöhte mRNA-Spiegel von IRAK-M (Interleukin -1 Rezeptor assoziierte Kinase des katalytisch defekten Subtyps M), der, wie in anderen Studien gezeigt werden konnte, mit TNF- α – Serumspiegeln korreliert und von diesen induziert wird [16]. Während TNF- α eine Schlüsselrolle im Fortschreiten der Inflammation zukommt, so wirkt IRAK-M antiinflammatorisch. Es bildet eine Art Gegenspieler und dämpft die Entzündungsreaktion ein.

Die Expression von antiinflammatorischen IL-10 ist ebenfalls erhöht, ebenso wie die des LPS-Rezeptors (bakterielles Endotoxin Lipopolysaccharide). Es ist

bekannt, dass Monozyten nach Kontakt mit Lipopolysacchariden mit einer Hochregulation von verschiedenen Zytokinen reagieren (z.B. TNF- α , IL-6), jedoch zeigte sich bei Patienten mit akuten Koronarsyndrom (ACS) eine 100-fach geringere Hochregulierung. In diesem Endotoxin-refraktären Zustand wird jedoch die IRAK-M – Expression beschleunigt [17].

Im Zuge des Remodelling ist eine der Aufgaben von Makrophagen im infarzierten Gewebe die Unterstützung bei der Entstehung einer neuen Bindegewebsmatrix im Zuge der Wundheilung.

Troidl und Kollegen konnten im Mäuse-Versuch in einer Micorarray-Analyse eine fundamentale Verschiebung des Transkriptions-Profiles der Makrophagen nachweisen. Wurde in der Frühphase nach dem Infarkt noch eine verstärkte Expression des klassischen Phänotyps gefunden (TNF- α , IL-6, IL-1 β), so änderte sich das Profil nach fünf Tagen im Zuge der Formation des Narbengewebes zu einem alternativen Phänotyp (Arginase 1 u. 2, Mannose Rezeptor C Typ 1, Chitinase 3-like 3) [78].

Eine grundlegende Arbeit aus dem Jahre 2000 zeigte im Microarray-Experiment am Rattenmodell, dass sich das Expressionsmuster der Kardiomyozyten nach dem Infarkt verschiebt. Klassische Signalwege für die Energieerzeugung (β -Oxidation, etc.) werden herunterreguliert, hin zu einer stärkeren Nutzung von Glukose als Energiequelle. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine Überexpression an funktionellen Gengruppen, die für den Aufbau von extrazellulärer Matrix (Kollagen, Fibronectin, Laminin, Fibrillin, OSF-2) und zytoskeletalen Elementen (Vimentin, Spektrin, Actin-Filamente und ihre Regulatorproteine) verantwortlich sind. Gene, die zum Aufbau des kontraktiles Apparates dienen, werden dagegen unterdrückt [71].

Ursprünglich nur bei Tumorzellen beschrieben, zeigte sich, dass auch im akuten Infarkt die Gene, die im Zusammenhang mit den Matrix-Metallo-Proteinasen stehen, vermehrt exprimiert werden. Im Einzelnen sind hier der extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), als auch die membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) zu nennen. Die Aktivierung von EMMPRIN geht einher mit einer verstärkten Sekretion von Metallo-Proteinasen (MMP-2, MMP-9), die eine Rolle in der Pathophysiologie von kardiovaskulären Krankheiten spielen [68] und am Remodelling des infarzierten Gewebes beteiligt sind.

In diesem Zusammenhang konnte schon bei noch nicht-enddifferenzierten Monozyten die Induktion von Versican mRNA nachgewiesen werden. Versican ist als Proteoglykan an der Vernetzung von Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix beteiligt. Außerdem induziert es die Bildung weiterer Proteoglykane (Syndecan, Biglycan, Decorin) [77].

Weiterhin konnte eine chinesische Forschergruppe beweisen, dass bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit, die Expression von Ubiquitin, einer Substanz, welche für den intrazellulären Abbau von Proteinen verantwortlich ist, erhöht ist. Die Hochregulierung nimmt dabei mit der Schwere der Herzerkrankung zu und ist im akuten Myokardinfarkt besonders stark ausgeprägt [13]. Ein ähnlicher Zusammenhang gilt für die Häm-Oxygenase-1 [12].

Ein Krankheitsbild mit ähnlicher Pathogenese ist der akut-ischämische Schlaganfall. Auch hier ruft der Infarkt eine systemische Entzündungsreaktion hervor, die mit der eines akuten Myokardinfarktes vergleichbar ist. Verschiedene Transkriptom-Analysen zeigten auch hier eine Betonung inflammatorischer Gene. Eine Hochregulierung zeigt sich für die proinflammatorischen Gene des Oberflächenmarkers CD40 und des Zytokins TNF- α , ebenso wie für die proapoptotischen Faktoren Caspase-3 (CPP32) und die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), sowie für adhäsionsrelevante Gene wie CD38 [38].

Auch gilt dies für die Phosphodiesterase 4D (PDE4D), den N-formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1), den Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten (IL1RN) und den complement component 3a receptor 1 (C3AR1) [27].

4. Fragestellung und Hypothese

Wie viele erfolgreiche Studien in der letzten Zeit gezeigt haben, ist die begleitende Entzündungsreaktion des Herzinfarktes von bedeutender Rolle für die Abläufe denen das Myokard nach einem Infarkt unterlegen ist. Insbesondere im Rahmen des Remodellings hat die Ausprägung der Entzündung und das Einwirken unterschiedlichster Faktoren entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Heilung des Herzmuskels, die Narbenbildung und die mögliche Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Die Studienlage weist dabei, wie oben bereits angeführt, dem Monozyten als Entzündungszelle eine wichtige Rolle zu im entzündlichen Geschehen des Herzinfarktes. Diese Tatsache und die Möglichkeiten, die eine

Microarray-Studie an einem ausgewählten Zelltyp mit Bedeutung in der Pathogenese der Arteriosklerose ermöglicht, führte zu folgender Fragestellung und Hypothese, die mit dieser Studie zu klären versucht wurde:

Hypothese: Das Monozyten-Transkriptom bildet eine spezifische Momentaufnahme der Genexpression im akuten Myokardinfarkt und spiegelt pathophysiologische Prozesse wider.

Mit dieser Studie wurde das Ziel verfolgt bestimmte und spezifische Gene zu detektieren, die im akuten Myokardinfarkt verstärkt exprimiert und/oder reguliert werden. Die Genexpression kann bei verschiedenen Individuen sehr unterschiedlich sein. Daher wurde nicht nur der Verlauf zwischen einem Kollektiv an Erkrankten und einem gesunden Kontrollkollektiv betrachtet, sondern vor allem der intraindividuelle Verlauf der Genexpression eines Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Durch die Identifizierung von regulierten Genen besteht die Hoffnung auf Pathways schließen zu können, die in der Pathophysiologie des Herzinfarktes von Bedeutung sind. Abgesehen von der grundsätzlichen Aufklärung der Abläufe in Monozyten während eines Infarktes, kann diese Studie dazu dienen, Denkansätze für die Identifizierung von Biomarkern zu liefern, die zur besseren Beurteilung von Krankheitsverläufen und Prognosen im Rahmen des Herzinfarktes beitragen können.

B. Material und Methoden

1. Studiendesign

Es wurden 66 RNA-Proben von 28 Patienten mit akutem Myokardinfarkt in die Studie eingeschlossen. Bei den 28 Patienten wurde die RNA zu zwei verschiedenen, festgelegten Zeitpunkten isoliert, während für 10 der Patienten noch eine dritte RNA-Probe gewonnen wurde nach Ablauf von drei Monaten. Diese RNA-Profile wurden mit denen von 24 Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit aus der Lübecker Cardiogenics WP5 Studie verglichen.

2. Patientenrekrutierung

2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Studie wurden 28 Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt rekrutiert. Hierbei wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen ein ST-Hebungsinfarkt vorlag. Als Bedingung für den Einschluss galt weiterhin, dass das Einsetzen der klinischen Symptomatik weniger als 6 Stunden vor dem Erreichen der Klinik und der danach erfolgten Koronarangiographie liegen sollte. Explizit ausgeschlossen wurden dagegen Patienten bei denen die Einlieferung im kardiogenen Schock erfolgte. Ferner wurden solche Patienten nicht berücksichtigt, bei denen eine Sepsis oder eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz vorlag. Ebenso wurden Tumorpatienten oder Patienten, die mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt wurden, ausgeschlossen.

2.2 Ablauf der Blutentnahme

Bei den eingeschlossenen Patienten wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten eine Blutprobe entnommen. Die erste Entnahme (t1) erfolgte mit der Einlieferung in die Klinik, sofern möglich vor oder mit der Durchführung der Koronarangiographie. Die zweite Entnahme erfolgte am dritten Tage (t3) nach der Krankenseinlieferung während der stationären Nachbehandlung. Zusätzlich konnte bei 10 Patienten eine weitere Blutentnahme nach Ablauf von 90 Tagen erfolgen. Pro Blutabnahme wurden insgesamt 53,7 ml venösen Blutes entnommen.

Dieses wurde wie folgt verteilt:

- 4 EDTA-Röhrchen (8,5 ml Sarstedt-Monovette) für die Monozyten-Isolierung,
- 1 EDTA-Röhrchen (8,5 ml Sarstedt-Monovette) zur DNA-Isolierung,
- 1 Serum-Röhrchen (8.5 ml Sarstedt-Monovette) für Biomarker,
- 1 Lithium-Heparin-Röhrchen (2,7 ml) für weitere Blutanalysen.

2.3 *Votum der Ethik-Kommission*

Das Einverständnis der Ethik-Kommission lag vor im Rahmen des Lübecker Registers von Patienten mit struktureller Herzerkrankung. Sie ist zu finden unter dem Aktenzeichen 04-041 vom 01.10.2004.

3. Isolation der Monozyten und der RNA

3.1 *Der AutoMACS™-Separator*

Zur Isolierung der CD14⁺-Monozyten aus Vollblut wurde das System des AutoMACS™-Separators verwandt. Hierbei wurden die Monozyten mit magnetisierten CD14⁺-Antikörpern markiert und dann über eine magnetische Säule selektiert, während alle anderen Zellen verworfen werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass er den kürzesten Weg von der Blutprobe zur RNA darstellt bei einer Dauer von ungefähr 40 Minuten. Ebenso lässt sich hiermit ein Ficoll-Gradient, wie bei anderen Methoden zur Isolierung von Monozyten, vermeiden, welcher bei der Zentrifugation zu einer Aktivierung der Zellen und damit zur Veränderung der Genexpression führen kann. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur eine Selektion für CD14⁺-Monozyten möglich ist. Mischpopulationen aus CD16⁺- und CD16⁻-Zellen sind möglich. Daher wurde bei jeder Isolierung zur Qualitätskontrolle ein Aliquot der aufgereinigten Zellen mit CD14⁺- und CD16⁺-

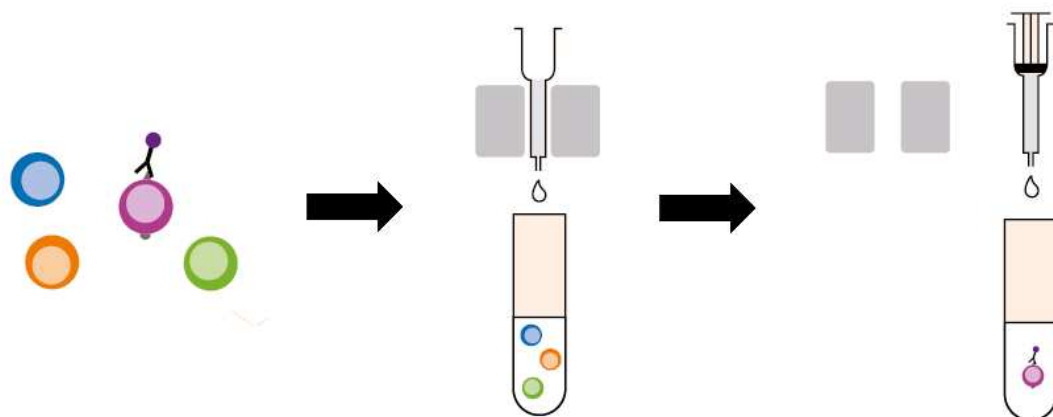


Abb. 2 zeigt schematisch die Monozytenisolation im AutoMACS™[92].

Antikörpern gefärbt, um die Reinheit der Probe sowie die Quantität der Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen.

3.2 Materialien zur CD14⁺-Monozytenisolation mittels AutoMACS™

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Dabei wurden folgende Materialien verwendet:

- CD14-Vollblut-Antikörper von Miltenyi (Kat.-Nr.: 130-090-879)
- PBS-Tabletten von GIBCO (Kat.-Nr.: 1891-014)
- BSA – 10%ige Stammlösung von Miltenyi (Kat.-Nr.: 130-091-376)
- EDTA-Stammlösung (0,5M) von Sigma (Kat.-Nr.: 66H0821)
- EDTA-Röhrchen (9 ml, Monovette) von Sarstedt (Kat.-Nr.: 8092203)
- EDTA-Röhrchen (2,7 ml, Monovette) von Sarstedt (Kat.-Nr.: 8093402)
- Li-Heparin-Röhrchen (9 ml, Monovette) von Sarstedt (Kat.-Nr.: 8093102)
- Serum-Röhrchen (9ml, Monovette) von Sarstedt (Kat.-Nr.: 7092703)
- Sterile 50 ml Zentrifugen-Röhrchen, Pastetten, Pasteurpipetten und Spitzen für Volumen von 100µl.
- 70%-Ethanol als Reinigungslösung

Ebenso folgende Pufferlösungen:

- Laufpuffer für den AutoMACS™
Die Herstellung erfolgte durch Zugabe von 2 PBS-Tabletten auf einen Liter destillierten Wassers. Nach Autoklavierung der obigen Lösung wurden 50 ml der 10%igen BSA-Stammlösung und 4 ml der EDTA-Stammlösung von Sigma hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.
- Spüllösung für den AutoMACS™
Die Herstellung erfolgte durch Zugabe von 2 PBS-Tabletten auf einen Liter destillierten Wassers. Nach Autoklavierung der obigen Lösung wurden 4 ml der EDTA-Stammlösung von Sigma hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

3.3 Durchführung CD14⁺-Monozytenisolation mittels AutoMACS™

Innerhalb einer Stunde nach Abnahme des Blutes wurde das antikoagulierte Blut aus 4 EDTA-Röhrchen zusammengefasst und auf 5 ml Aliquote verteilt, die in

Zentrifugen-Röhrchen mit einem Volumen von 50 mL gefüllt wurden. Zu jeder dieser Teilprobe des Blutes wurden 150 µl der Miltenyi CD14-Vollblut-Antikörper gegeben (30 µl Antikörper pro Milliliter Blut). Die Durchmischung erfolgte durch sanftes Auf- und Abpipettieren und vorsichtiges Kippen des Röhrchens. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei einer Temperatur von 4-8°C inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen bis zu einem Volumen von 50 ml mit dem Laufpuffer aufgefüllt und mit einer Kraft von 445g bei 1800 Umdrehungen pro Minute unter Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Pellets in einem neuen Zentrifugen-Röhrchen zusammengefasst und mit dem Laufpuffer bis zu einem Volumen von 50 ml aufgefüllt.

Nun erfolgte die Durchführung der magnetischen Auftrennung der Zellen unter Auswahl des „Pssel D2“-Programms des AutoMACS™. Der Prozess dauerte 20 Minuten und lieferte eine Suspension an CD14⁺-Zellen in einem Volumen von 2 ml. Um eine größere Reinheit der Zellen zu erreichen, wurde der letzte Schritt wiederholt.

Abschließend wurde zur Qualitätskontrolle ein kleiner Teil (~ 6x 100µl) der gewonnenen Suspensionslösung verwandt, um anhand einer mikroskopischen Zellzählung und der Durchflusszytometrie den Reinheitsgrad zu bestimmen. Aus den restlichen Zellen wurde unverzüglich die RNA extrahiert.

3.4 Materialien zur Isolation der RNA aus Monozyten

Für die RNA-Extraktion wurden folgende Materialien verwandt:

- RNeasy® Plus Mini Kit von Qiagen (Kat.-Nr.: 74134)
*(Alle mit * versehenen Materialien sind Bestandteil dieses Kits)*
- Sammel-Röhrchen, 2 ml, von Qiagen (Kat.-Nr.: 74106)
- DNA LoBind Röhrchen, 1,5 ml, von Eppendorf (Kat.-Nr.: 2243102-1)
- Phase Lock Gel Heavy – Röhrchen, 2 ml, von Eppendorf (Kat.-Nr.: 2302830)
- SafeSeal-Spitzen, 1000 µl, von Biozym (Kat.-Nr.: 692079)
(RNase-frei, DNase-frei, Pyrogen-frei)
- SafeSeal-Spitzen, 100 µl, von Biozym (Kat.-Nr.: 692066)
- SafeSeal-Spitzen, 10 µl, von Biozym (Kat.-Nr.: 693010)
- TRIzol®-Reagenz von Invitrogen (Kat.-Nr.: 15596-026)
- RNase-freies DNase Set von Qiagen (Kat.-Nr.: 79254)

- Chloroform
- PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ von Invitrogen (Kat.-Nr.: 10010-015)
- Eppendorf-Zentrifuge 5415R

3.5 Vorbereitung der Monozyten für die RNA-Isolation

Zunächst wurden die Zellen bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten lang herunter zentrifugiert. Der Überstand war abzusaugen und das Zellpellet durch gründliches Schwenken des Röhrchens zu lösen. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmtes TRIzol® hinzugegeben, wobei 1 ml für weniger als 10^7 Zellen ausreichend war. Nach sorgfältigem Durchmischen wurde das Homogenisat in das Eppendorf-Gel-Röhrchen gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. An diesem Punkt wurden die Proben bei -80°C eingefroren und gelagert bis die Patientenrekrutierung abgeschlossen war.

3.6 Durchführung der RNA-Isolierung aus den Monozyten

Die im RNeasy® Plus Mini Kit enthaltenen Bestandteile wurden gemäß der mitgelieferten Gebrauchsanleitung vorbereitet.

Schließlich wurden die tiefgefrorenen Monozyten-Proben für 20 Sekunden auf höchster Drehzahl anzentrifugiert, um danach aufgetaut zu werden. Es erfolgte ein Transfer des Homogenisats in das Phase Lock Gel-Röhrchen und eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Bei guter Durchmischung (Schütteln!) erfolgte die Zugabe von 200 μl Chloroform pro Milliliter TRIzol®. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2-3 Minuten wurden die Proben bei 13.200 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sollte eine klare Phase oberhalb des Gels zu sehen sein und eine trübe organische Phase unterhalb des Gels. War dies nicht der Fall, erfolgte unter erneuter Durchmischung und anschließender Zentrifugation die erneute Zugabe von 0,2 μl Chloroform. Anschließend wurde die wässrige Phase entfernt und bei guter Durchmischung ein äquivalentes Volumen an 70%igen Ethanol hinzugefügt. Nun wurde die erste Hälfte der Probe auf die RNeasy-Säule* gegeben und bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 20 Sekunden zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss war auch in den nachfolgenden Schritten jeweils zu verwerfen und ein neues Sammelröhrchen zu verwenden. Nach Zugabe der zweiten Hälfte der

Probe wurde die Zentrifugation wie im ersten Schritt wiederholt. Ebenso bei der nachfolgenden Zugabe von 350µl RWI-Puffers*.

Schließlich wurden 80 µl DNase I* auf die RNeasy-Säule hinzugefügt und bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Zellzahl für 20-30 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von weiteren 350 µl RWI-Puffers und eine Anzentrifugation bei 10.000 Umdrehungen für ebenfalls 20 Sekunden.

Nun wurden 500 µl an RPE-Puffer* hinzugegeben, bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und schließlich die gesamte Probe bei 10.000 Umdrehungen für 2 Minuten zentrifugiert. Die Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und die nachfolgenden Schritte wurden wiederholt. Zusätzlich wurde die Probe nun „trocken“ zentrifugiert bei maximaler Drehzahl für 3 Minuten.

Nach Zugabe von 25 µl RNase-freiem Wasser wurde die Säule erneut mit oben genannten Einstellungen zentrifugiert und anschließend die Probe aus der Säule in ein neues Sammelröhrchen entlassen.

Der Transfer der frisch isolierten RNA-Probe

erfolgte in ein DNA LoBind Röhrchen von Eppendorf. Zur Quantifizierung des gewonnenen Materials wurde die spektroskopische Nanodrop®-Methode benutzt.

Abschließend konnten die RNA-Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C tiefgefroren werden.

4. Microarray-Analyse der Monozyten-RNA-Profile

4.1 Ort der Microarray-Experimente

Die Durchführung der Microarray-Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Prof. Cambien am INSERM UMR U525/936 der Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie an der Université Paris. Die Proben wurden am dortigen Institut analysiert und statistisch ausgewertet.

eppendorf Phase Lock Gel® Verfahren



Abb. 3 zeigt die RNA-Isolierung nach dem Eppendorf Phase Lock Gel®-Verfahren [6].

4.2 RNA-Vervielfältigung und Durchführung der Microarray-Experimente

Die gewonnenen mRNA-Proben wurden mit Hilfe des Illumina® Total Prep RNA Amplification Kits (von Ambion, Inc., Austin, TX) vervielfältigt und markiert. Dabei wurden insgesamt 250 ng an RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Hierzu wurde das zum Illumina® Amplification Kit gehörende Protokoll wie folgt modifiziert: die Volumina aller Reagenzien wurden halbiert und die Aufreinigungen der cDNA und cRNA wurde mit Hilfe von Qiagen Kits durchgeführt (Qiaquick® PCR Purification Kit beziehungsweise RNeasy® mini Kit).

Die In-Vitro Transkriptionsreaktion der cDNA zu cRNA lief über Nacht (16h) bei 37°C zusammen mit einem Zusatz an Biotin-16-UTP zur Markierung ab. Vor der Hybridisierung erfolgte die Quantifizierung der gewonnenen cRNA mit einem NanoDrop Spektrophotometer, wohingegen zur Bestimmung der Qualität ein Agilent 2100 Bioanalyser verwendet wurde. Über Nacht (16h) wurden insgesamt 750 ng der markierten cRNA mit den Illumina HumanRef-8 v3.0 BeadChips (Illumina Inc., San Diego, CA) bei 58°C hybridisiert, bevor sie gemäß dem Illumina Whole-Genome Gene Expressions-protokoll gewaschen und mit Streptavidin-Cy3 versetzt worden sind.

Zur Auslesung der BeadChips wurde der Illumina BeadArray Reader verwendet. Auf jedem BeadChip wurden acht verschiedene Patienten Proben gleichzeitig und parallel hybridisiert, wobei jeder BeadChip über 24.526 Sonden verfügt, die 21.793 Referenz-Sequenzen (und damit den bekannten menschlichen Transkripten und 18.391 Genen) entsprechen.



Abb. 4 zeigt den Illumina HumanRef-8 v3.0 BeadChip, der für die Microarray-Analyse verwendet wurde [93].

4.3 Datenaufbereitung

Die Intensitätsdaten der Illumina Bead Studio Software wurden zur Qualitätskontrolle, Hintergrundkorrektur, Varianzstabilisierung [44] und Normalisierung in eine R-Statistik-Umgebung unter der Verwendung des Lumi-Paketes [19] geladen. Dabei war eine ganze Reihe an Schritten zur Qualitätskontrolle von Nöten, um die Qualität der Rohdaten und der normalisierten Daten abschätzen zu können:

a) *Verteilung der Rohdaten*

Für jeden Array wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Abstand zum Mittelwert berechnet.

b) *Hintergrundkorrektur*

Die Hintergrundkorrektur ist in der Regel der erste Schritt zum Aufbereiten der Daten. Es ist dabei das Ziel die Werte insoweit zu korrigieren, dass systemische Störungen, die aus dem Versuchsaufbau oder dem Lesegerät resultieren, herausgerechnet werden. Zur Hintergrundadjustierung wurde der Illumina Hintergrund-Algorithmus verwendet, der die Signale aus einer negativen Kontrollprobe verwendet und abschätzt, um sie mit den Messdaten zu verrechnen.

c) *Varianzstabilisierungsumformung (VST)*

Nach der Hintergrundkorrektur wurde das Verfahren der Varianzstabilisierungsumformung auf die Intensitätsdaten angewandt. Die Varianzstabilisierungsumformung ist dabei ein gängiges Verfahren, welches von mehreren Autoren empfohlen wird, um sich die große Anzahl an technischen Wiederholungen zu Nutze zu machen, die auf den Illumina Microarrays verfügbar sind [44, 19, 20]. Von dieser Umformung wird erwartet, dass es die Erkennung von differenziell exprimierten Genen verbessert und die Anzahl der falsch-positiven Resultate reduziert.

d) *Normalisierung*

Die Daten wurden normalisiert unter der Verwendung der RSN (Robust Spline Normalization) Methode, welche Eigenschaften der Quantil- und Loess-Normalisierung miteinander kombiniert. Diese Methode ist eine Alternative zur Quantil-Normalisierung und soll sicherstellen, dass kleine

Unterschiede in den Spiegel der Genexpression zwischen den Proben nicht verloren gehen.

Kontrollproben und Transkripte, die in keiner der Proben messbar waren, wurden herausgefiltert, während Proben, die alle das gleiche Gen betreffen, gemittelt wurden. Die aufbereiteten Daten wurden im NCBI's Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) hinterlegt und sind zugänglich mit dem Code GSE28454.

4.4 Datenanalyse

Es wurden verschiedene Analyse-Verfahren verwendet, deren Ergebnisse schließlich kombiniert wurden, um sie zur Interpretation der temporalen Veränderungen in den Expressionsspiegeln zu verwenden.

a) Differentielle Genexpressionsanalysen unter Verwendung von Limma

Unterschiede der Genexpressionsprofile zwischen den drei Zeitpunkten wurden mit Hilfe der Methode „Linear Model for Micorarray Data“, die Bestandteil des Limma Paketes [70] ist, analysiert. Die Benjamini-Yekutieli Korrekturmethode wurde unter dem Gesichtspunkt des multiplen Testens verwendet [8].

b) Analysen unter Verwendung unter Verwendung des „Linear Mixed-Effects“-Modells

Modelle für lineare Misch-Effekte sind tauglich für die Analyse von Genexpressions-Modellen mit unbalancierten, sich wiederholenden Messgrößen und den damit korrelierenden Beobachtungen, wie sich wiederholende Messwerte. Sie bieten eine große Flexibilität, die es zum Beispiel erlaubt, Kovariablen einzustellen, stratifizierte Analysen durchzuführen oder Interaktionen zwischen Variablen zu testen, wie in konventionellen Regressionsmodellen.

Für die Studie wurde R-Paket lme4 verwendet, um den Einfluss des Zeitverlaufes auf die Genexpression zu untersuchen. In einem ersten Schritt wurde dabei die Beziehung zwischen dem Zeitverlauf und der Genexpression eines jeden Gens getestet. Während in einem weiteren

Schritt zufälligen Effekten Rechnung getragen wird, die sich in Folge der Korrelation zwischen Genexpressionsmessungen beim selben Individuum ergeben. Daher wurde ein Zufallsfaktor integriert und Chargen-Effekte berücksichtigt, da nicht alle Arrays eines Patienten zu den unterschiedlichen, untersuchten Zeitpunkten gleichzeitig hybridisiert und gescannt werden konnten.

c) *Zeitreihenanalyse und Identifikation von koexprimierten Genen*

Es wurde die robuste, nicht-parametrische Version des G-Testes nach Fisher verwendet [1]. Eingebettet in das R-Paket „GeneCycle“ gelang die Identifikation von statistisch signifikanten Periodizitäten in den Genexpressions-Daten. Zusätzlich wurde ein Algorithmus nach Owen [57] benutzt, der, integriert in das „geneRecommender“ R-Paket, alle Gene im Datensatz ermittelt, die sich ähnlich verhalten wie ein im Programm enthaltener Vergleichsabfragesatz. Die daraus resultierende Liste an Genen, welche entsprechend ihrer Stärke an Übereinstimmung mit der Vergleichsdatenbank geordnet wurden, erlaubte die Identifikation von Genen, die sich in ähnlichem Maße veränderten zwischen den drei Zeitpunkten. Zur Identifikation von koexprimierten Gengruppen wurde die „Weighted Gene Co-expression Network“ Analyse von Systems Biology verwendet [86, 33, 43]. Kurz gesagt, es wurde eine Ähnlichkeitsmatrix berechnet, basierend auf den absoluten Werten der Spearman-Rangfolge der Korrelationskoeffizienten der Expressionsprofile aller Genpaare. Anschließend wurde eine Näherungsfunktion verwendet, um die Ähnlichkeitsmatrix in eine symmetrische $n \times n$ Näherungsmatrix umzuformen, bei der $A=[a_{ij}]$ zwischen den Genexpressionen x_i und x_j die Verbindungsstärke (Annäherung) repräsentiert unter der Verwendung der

folgenden Funktion: $a_{ij} = Power(s_{ij}, \beta) \equiv |s_{ij}|^\beta$ mit $s_{ij} = cor(x_i, x_j)$. Das

skalenfreie Topologie-Kriterium wurde benutzt, um die den Potenz-Parameter entsprechend den Daten auszuwählen. Diese Netzwerk-Konstruktion wurde bei allen Proben angewandt (beta = 6) unter Berücksichtigung der 5000 meistverbundenen Genen im Datensatz. Zur

Identifizierung von Gen-Koexpressionsmodulen (Gruppen von vermehrt koexprimierten Genen) erfolgte die unbeaufsichtigte, hierarchische Zusammenlagerung nach durchschnittlicher Verbundenheit unter Einbeziehung der TOM-basierten Unterschiedlichkeitsmessgrößen (1-topologische Überlappung). Die identifizierten Genmodule wurden mit externen Informationen (statistische Ergebnisse aus „Limma“) verknüpft, funktionell analysiert und benutzt, um eine Sammlung aus Genfolgen aufzubauen unter der Verwendung von „SigPathway“.

d) *„Gene Set Enrichment“-Analysen (GSEA) und funktionelle Analysen*

Zur weiteren Aufklärung der Signalwege oder Genfolgen, welche signifikant verstärkt wurden zwischen den drei Zeitpunkten, wurden „Gene Set Enrichment“-Analysen (GSEA) durchgeführt unter Verwendung des „SigPathway“-Paketes [76]. GSEA [72] nutzt eine Sammlung von a priori festgelegten Gensätzen, um ihre Anreicherung in Verknüpfung mit dem Phentyp von Interesse zu verknüpfen. Im Gegensatz zur differentiellen Genexpressionsanalyse mit dem Limma-Paket ist die Methode nicht eingeschränkt durch die willkürliche Auswahl von differentiell exprimierten Genen, sondern erlaubt die koordinierte Detektion subtiler Veränderungen in den Genexpressionsspiegeln eines Signalweges. Um eine biologisch-funktionelle Bewertung der in den vorherigen Analyseschritten erhaltenen Ergebnisse zu ermöglichen, wurden Listen von differentiell exprimierten Genen mit der „WebGestalt“-Software [87] und dem „Ingenuity Pathway Analysis“-System analysiert und die Anreicherung von Kategorien im Sinne der „Gene Ontology“ (GO) getestet.

C. Ergebnisse

1. Das Patientenkollektiv

Das in die Studie eingeschlossene Patientenkollektiv wies folgende Charakteristika auf:

	Myokardinfarktpatienten (n=28)	Patienten mit stabiler KHK (Kontrollgruppe, n=21)
Grundeigenschaften		
Frauen	8 (29%)	3 (14.29 %)
Alter (Jahren; MW±SD)	59.57±11.44	51±9.04
Diabetes	8 (29%)	0 (0%)
Bluthochdruck	21 (75%)	---
BMI (kg/m ² ; MW±SD)	29±8	28.8 (3.71)
Raucher	14 (50%)	0 (0%)
Positive Familienanamnese	6 (21%)	---
LDL > 70 mg/dl	28 (100%)	---
Schmerzbeginn bevor t1 (Stunden; MW±SD)	3.9±2	---
EKG		
Inferiore ST-Hebung	11 (40%)	---
Anteriore ST-Hebung	13 (60%)	---
Door-to-ballon Zeit (Minuten; MW±SD)	29±12	---
Durchgeführte PCI	28 (100%)	100%
BM-Stent	21 (75%)	---
DE-Stent	7 (25%)	---
TIMI III-Fluss nach PCI	28 (100%)	---
Spitzen-CK (U/l ; MW±SD)	1965±821	---
Ejektionsfraktion an t3 (% ; MW±SD)	55±12	---
Medikation		
GpIIb/IIIa Inhibitor an t1	28 (100%)	---
ASS, Clopidogrel, Statin, β-Blocker, ACE-Inhibitor an t3	28 (100%)	100%

Tabelle 1. Charakteristika des Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe

KHK = koronare Herzkrankheit, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, BMI = body mass index, PCI = percutaneous intervention (Herzkatheter), BM = bare-metal stent. DE = drug-eluting stent (Medikament beschichteter Stent), TIMI III = thrombolysis in myocardial infarction (komplette Perfusion nach PCI), CK = Creatininkinase

Von den 28 in die Studie eingeschlossenen Myokardpatienten waren 8 weiblich. Das Durchschnittsalter beträgt 59,6 Jahre. In der Kontrollgruppe von 21 Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit betrug der Anteil der Frauen 14,3% und das mittlere Alter lag bei 51 Jahren. Der Body-Mass-Index liegt in der Gruppe der Patienten mit Herzinfarkt im Durchschnitt bei 29 kg/m², in der Kontrollgruppe vergleichbar bei 28,8 kg/m². Von dem Kollektiv der Herzinfarktpatienten litten 29%

unter einem Diabetes mellitus und dreiviertel zeigten einen arteriellen Hypertonus, während der Anteil der aktiven Raucher in dieser Gruppe bei 50% lag. Bei 21% der Patienten ist eine positive Familienanamnese bekannt, bei der von einer familiären Häufung koronarer Ereignisse ausgegangen werden kann. Alle hatten einen Serum-LDL-Wert größer als 70 mg/dl und der Maximalwert der Creatinkinase lag im Mittel bei 1965 U/l.

Die Betrachtung des Kollektivs unter EKG- und kardiologiespezifischen Gesichtspunkten lieferte bei 40% der Patienten das Bild eines inferioren ST-Hebungsinfarktes und bei 60% einen anterioren Infarkt. Bei allen Patienten wurde eine perkutane Intervention im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung durchgeführt. Dabei wurde in dreiviertel der Fälle ein sogenannter Bare-Metal-Stent verwendet und in den anderen Fällen ein Medikament-beschichteter Stent eingesetzt. Die den klinischen Qualitätsprozess beurteilende Door-to-Ballon-Zeit betrug im Mittel etwa eine halbe Stunde. Bei allen Patienten wurde nach Abschluss der Herzkatheteruntersuchung eine komplette Thrombolyse nachgewiesen werden, mit der die komplette Durchblutung des betroffenen Gefäßes wiederhergestellt werden konnte. Am Zeitpunkt t_3 betrug die Ejektionsfraktion des Herzens durchschnittlich 55%.

Alle Patienten bekamen eine gleiche Medikation bestehend aus einem GPIIb/IIIa-Inhibitor an Zeitpunkt t_1 , sowie bis zum Zeitpunkt t_3 eine Medikation bestehend aus Acetylsalizylsäure, Clopidogrel, einem Statin, einem β -Blocker und einem ACE-Hemmer.

Die Herzkatheteruntersuchung wurde ebenfalls bei allen Patienten der Kontrollgruppe durchgeführt, genauso wie alle aus dieser Gruppe die gleiche Medikation wie die Herzinfarktpatienten zum Zeitpunkt t_3 bekamen.

2. Vorübergehende Transkriptionsänderungen während eines akuten Myokardinfarktes

Von der Gesamtzahl der Sonden auf dem Microarray-Chip blieben nach der Filterung bei der Datenaufbereitung noch 12.518 Proben, entsprechend 10.273 Genen, zur Datenanalyse übrig.

Im Verlauf der Zeit änderte sich die Zahl der Gene, die in Monozyten im akuten Myokardinfarkt differentiell exprimiert wurden. Ausgehend davon, dass bei den Patienten der Kontrollgruppe mit stabiler koronarer Herzkrankheit normale

Expressionsspiegel vorlagen, zeigte sich die größte Änderung zwischen dem Zeitpunkt t_0 und dem Zeitpunkt t_1 . In dieser akuten Phase des Herzinfarktes zeigten 1857 Transkripte einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Das entspricht in etwa 18 % der Gesamtzahl an Genen, die auf dem verwendeten RNA-Microarray repräsentiert wurden.

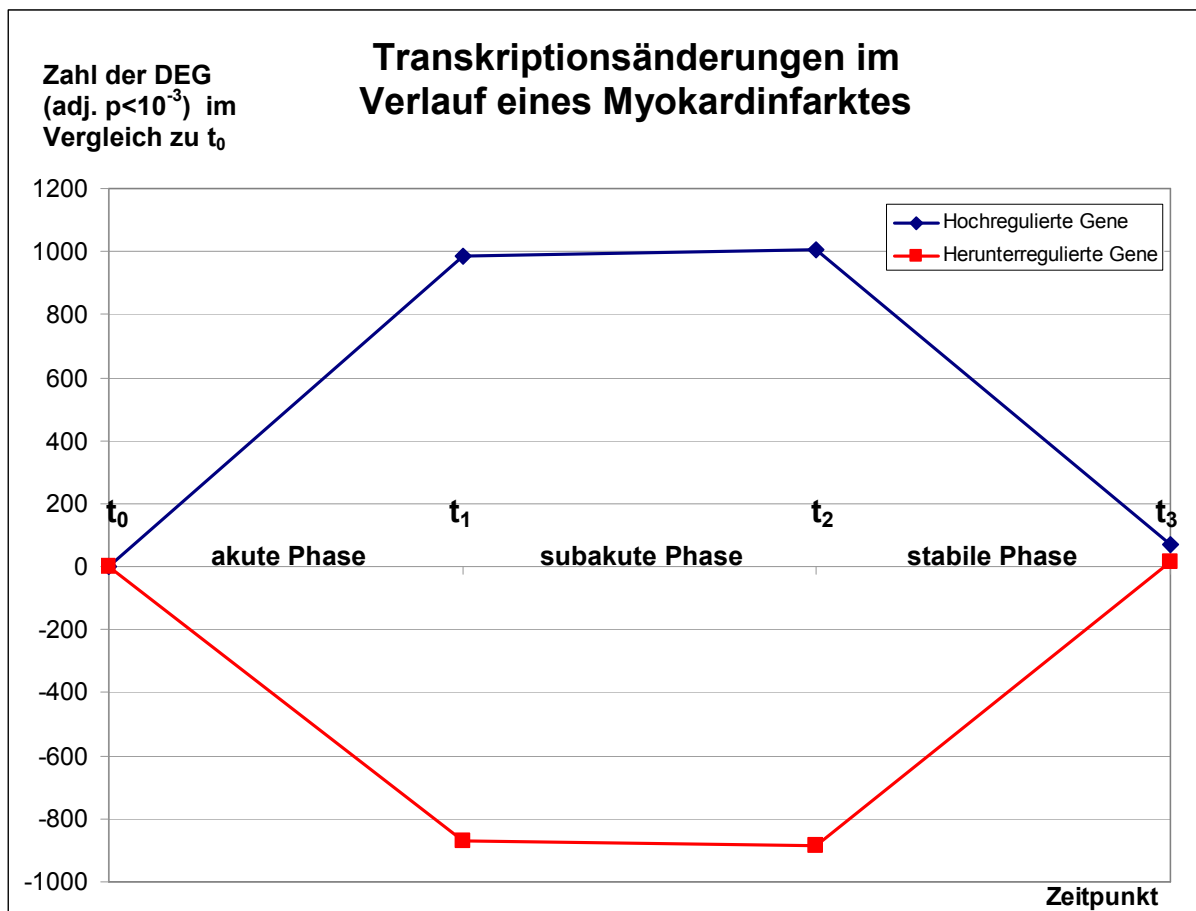


Abb. 5 zeigt wie sich im Verlaufe eines Myokardinfarktes die Zahl der differentiell exprimierten Gene (DEG) im Vergleich zu der Kontrollgruppe von Patienten mit stabiler KHK ändert.

Gesamtzahl der analysierten Gene : 10.273.

t_0 : Kontrollgruppe von Patienten mit stabiler KHK

t_1 : Myokardinfarktpatienten am Tag 1

t_2 : Myokardinfarktpatienten am Tag 3

t_3 : Myokardinfarktpatienten am Tag 90

Von den 1857 zum Zeitpunkt t_1 regulierten Genen wurden 988 hochreguliert und 869 herunterreguliert. In der subakuten Phase des Herzinfarktes, die zwischen t_1 und t_2 liegt, zeigten sich nur noch geringe Veränderungen. Gegenüber t_1 wurden nur noch 18 weitere Gene hoch und 18 weitere Gene herunter reguliert. Dieses entspricht nur 0,35% aller untersuchten Gene. Alle anderen Transkripte lagen weiterhin auf dem Niveau von t_1 . Im Verlaufe der nächsten drei Monate bis zum Zeitpunkt t_3 näherte sich die Zahl der differentiell exprimierten Gene weitgehend

dem Niveau von t_0 wieder an. Beim Vergleich zwischen t_3 und der Kontrollgruppe t_0 waren nur noch 86 Gene reguliert, von denen 83% (entsprechend 72 Genen) herunterreguliert waren. Nur 14 Gene waren zu diesem Zeitpunkt hochreguliert.

3. Am stärksten regulierte Einzelgene

Von den 1857 regulierten Genen zum Zeitpunkt t_1 gegenüber der Kontrollgruppe lohnen einige einer genaueren Betrachtung. Zum einen ist die bei ihnen die starke Regulation auffällig, zum anderen konnte ihnen bereits eine plausible Funktion in der Pathophysiologie des akuten Herzinfarktes nachgewiesen werden. Im Nachfolgenden werden vier Gene eingehender besprochen: THBS1, IL1R2, CX3CR1, HBEGF.

3.1 Thrombospondin

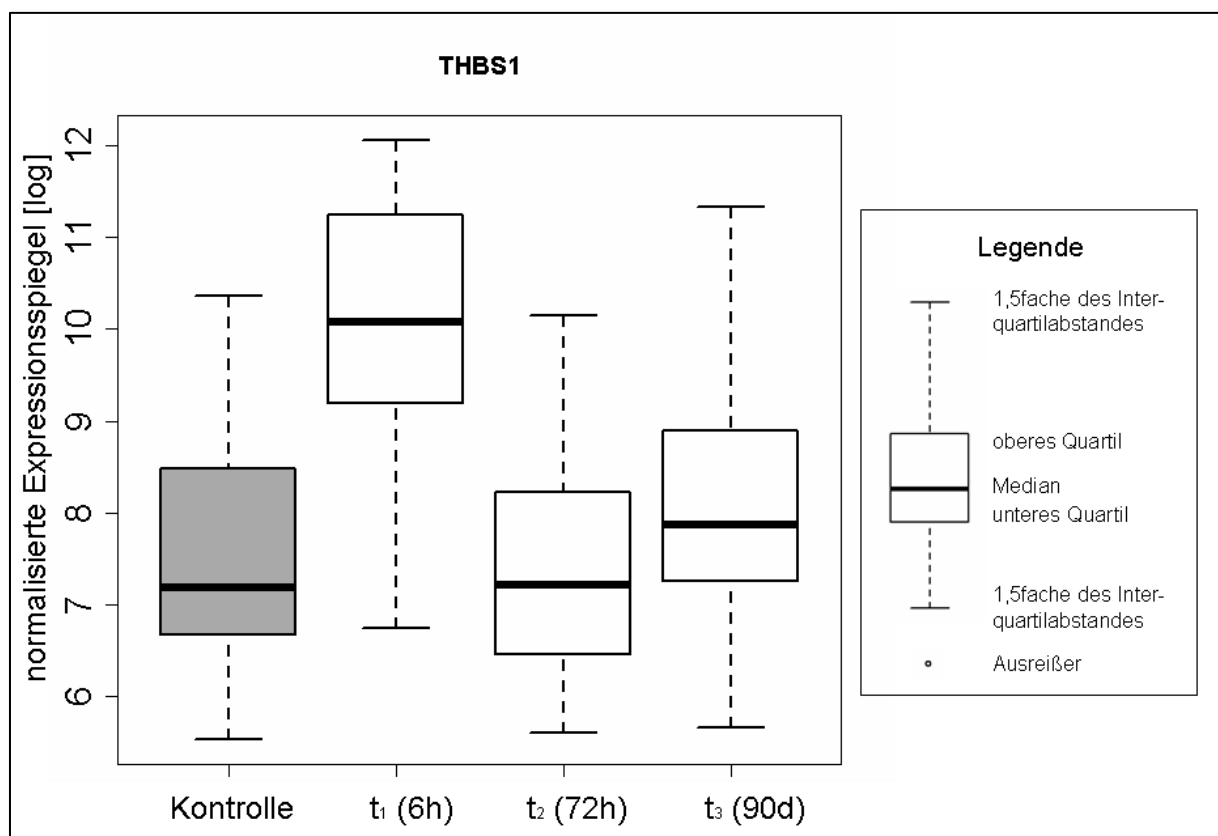


Abb. 6 zeigt in Form eines Box-Whisker-Plots die Expressionsspiegel von Thrombospondin 1 im zeitlichen Verlauf.

Thrombospondin 1 (THBS1) war das am stärksten regulierte Einzelgen. In der Akutphase des Herzinfarktes lag der Spiegel der Transkripte in etwa 5,27-fach ($p = 0,0005$) über dem Normalwert. Jedoch bereits in der Subakutphase zum Zeitpunkt t_2 erreichte die Expressionsrate wieder nahezu den Ausgangswert. Auch

nach dem Verlauf von 3 Monaten zum Zeitpunkt t_3 liegt die Anzahl der Transkripte auf diesem Niveau.

3.2 Interleukin 1-Rezeptor 2

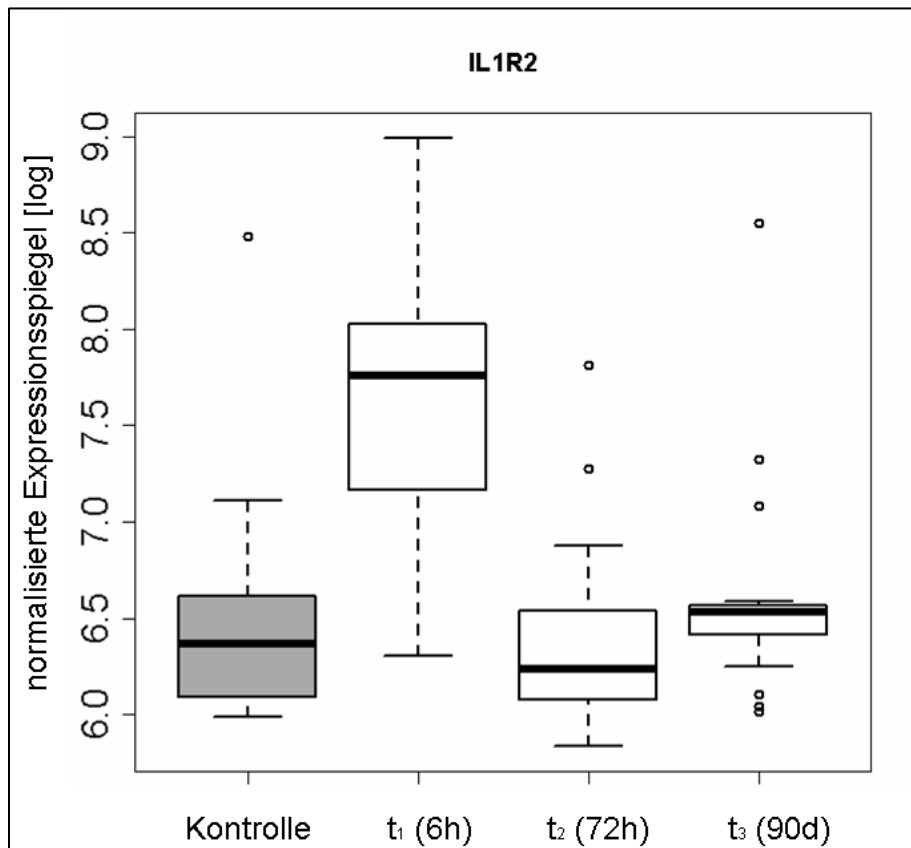


Abb. 7 zeigt mittels Box-Whisker-Plots die Expressionsspiegel vom Interleukin 1- Rezeptor 2 im zeitlichen Verlauf des akuten Myokardinfarktes.

Ebenfalls ein Gen mit biologisch-funktionell bekannter Bedeutung, welches eine starke und signifikante Regulation zeigt, ist das Gen für den Interleukin1-Rezeptor2 (IL1R2). Zum Zeitpunkt t_1 wird es gegenüber den Kontrollen um das 3,84-fache stärker exprimiert. Der adjustierte p-Wert beträgt hierfür $1,13 \times 10^{-5}$. Analog zum Thrombospondin 1 pendeln sich die Expressionsspiegel zu den Zeitpunkten t_2 und t_3 wieder um den Ausgangswert der Kontrollgruppe ein.

3.3 CX3C-Rezeptor 1

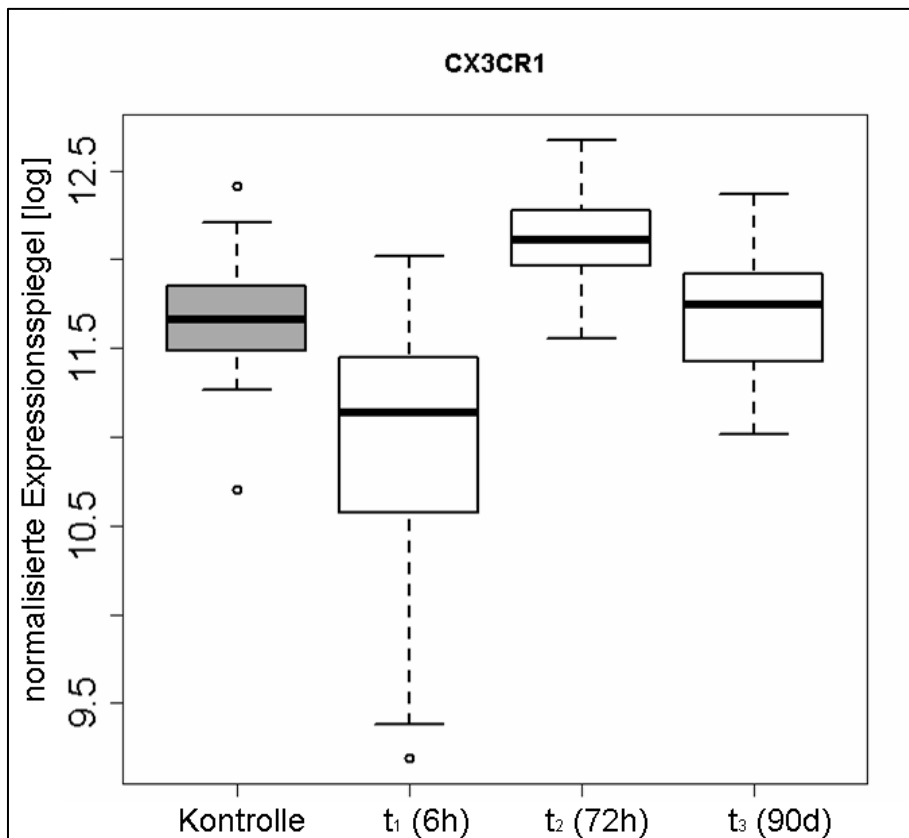


Abb. 8 zeigt mittels Box-Whisker-Plots die Expressionsspiegel vom CX3C-Rezeptor 1 im zeitlichen Verlauf des akuten Myokardinfarktes.

Der Zytokinrezeptor CX3-Chemokin-Motiv-Rezeptor 1 (CX3CR1) zeigt eine differentielle Expression. Findet in der Akutphase zum Zeitpunkt t_1 noch eine etwas verminderte Transkription statt. So steigt die Anzahl der Transkripte 72 Stunden nach dem Infarkt um mehr als das 2,21-fache des t_1 -Wertes. Der adjustierte p-Wert hierfür ist $3,5 \times 10^{-5}$. Nach 3 Monaten pendelt sich die Expressionsrate wieder auf dem Niveau des Ausgangswertes ein.

3.4 Heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor (HBEGF)

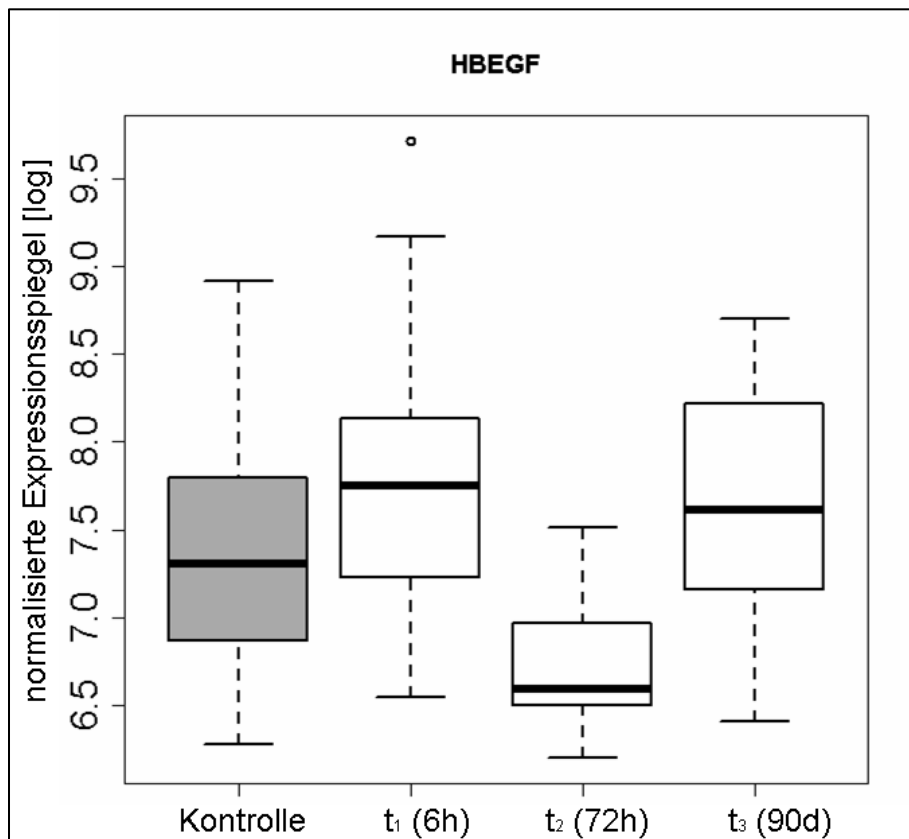


Abb. 9 zeigt mittels Box-Whisker-Plots die Expressionsspiegel vom Heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktors im zeitlichen Verlauf des akuten Myokardinfarktes.

Der Heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor wird differentiell exprimiert. In der Akutphase etwa 6 Stunden nach Beginn des Herzinfarktes zeigen sich leicht erhöhte Spiegel. In der Subakutphase 72 Stunden nach Infarktbeginn fällt der Expressionsspiegel gegenüber t₁ wieder um das 2-fache ab ($p = 0,001$) und wird sogar unter den Spiegel der Kontrollgruppe reguliert. Nach drei Monaten nähern sich auch die Expressionsspiegel dieses Markers nicht nur den Ausgangswerten an, sondern liegen sogar leicht über ihnen.

4. Gene Set Enrichment – Analysen

Bei den Gene Set Enrichment - Analysen wird die im Microarray-Experiment gewonnene Gensammlung auf bestimmte, vordefinierte und in einen funktionellen Zusammenhang mit einem Herzinfarkt gebrachte Signalwege, sogenannte Pathways, getestet. Bei diesen Analysen zeigten sich vier der über 659 getesteten Pathways als besonders signifikant angereichert mit differentiell exprimierten Genen.

Als handelt sich um die Signalwege für die fokale Adhäsion (focal adhesion), die Adherens Junction, die Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAM) und die transendotheliale Migration von Leukozyten (leukocyte transendothelial migration). Getestete Einzelgene in diesen Pathways exprimieren differentiell auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$.

Gen-Set Name (Quelle)	Kontrolle vs. T1 q-Wert (t Statistik)	T1 vs. T2 q-Wert (t Statistik)	T2 vs. T3 q-Wert (t Statistik)	T1 vs. T3 q-Wert (t Statistik)	T3 vs. Kontrolle q-Wert (t Statistik)
Focal adhesion (KEGG; 109 genes)	$< 10^{-4}$ (3.18)	n.s. (-0.80)	< 0.03 (-2.75)	< 0.04 (-3.09)	n.s. (-0.84)
Adherens junction (KEGG; 41 genes)	$< 10^{-4}$ (3.56)	n.s. (-0.83)	$< 10^{-04}$ (-2.75)	10^{-04} (-3.23)	n.s. (-0.96)
Leukocyte transendothelial migration (KEGG; 176 genes)	0.05 (2.88)	n.s. (0.88)	< 0.02 (-3.09)	n.s. (-2.20)	n.s. (-0.72)
Cell adhesion molecules (CAMs) (KEGG; 187 genes)	n.s. (0.33)	n.s. (-0.02)	< 0.09 (-1.93)	n.s. (-1.91)	< 0.02 (-3.09)

Tab. 2 zeigt die vier am stärksten regulierten Signalwege der Gene-Set-Enrichment-Analysen mit den zugehörigen q-Werten und t-Statistiken im Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte untereinander. Die Abkürzung „n.s.“ steht für „nicht signifikant“ und meint einen q-Wert $> 0,05$.

Der stärksten Regulation unterlagen die vier angesprochenen Pathways in dem Vergleich des Zeitpunktes t1 nach Myokardinfarkt mit der Kontrollgruppe. Die Betrachtung der Zeitpunkte t1 und t2 brachte ebenso wenig signifikante Ergebnisse, wie die Betrachtung des Zeitpunktes t3 mit der Kontrollgruppe. In dieser Arbeit soll im weiteren Verlauf der Signalweg für die fokale Adhäsion im Vordergrund stehen.

4.1 Focal Adhesion – Pathway

Fokale Adhäsionen dienen unter anderem zur Zellverankerung an die Extrazellulärmatrix (ECM) und auch zur Motilität entlang dieser. Dieses wird über Integrine der Zellmembran (ITGA und ITGB) vermittelt. Sie vernetzen sich mit Adapterproteinen wie Actinin, Zyxin, Talin, Vinculin, Filamin, über die die Actinfilamente des Zytoskletts gekoppelt werden. Neben der Bildung der Zellstruktur spielen die fokalen Adhäsionen eine wichtige Rolle in der Signalübertragung. Über die Schlüsselproteine SRC, FAK und SHC nehmen

fokale Adhäsionen auch Einfluss auf die Zellproliferation und das Zellüberleben. Der Focal Adhesion-Pathway wird nicht nur über die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix aktiviert, sondern auch über die Bindung von Zytokinen an die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) der Zellmembran [96].

Zeitpunkt t1 gegenüber der Kontrollgruppe

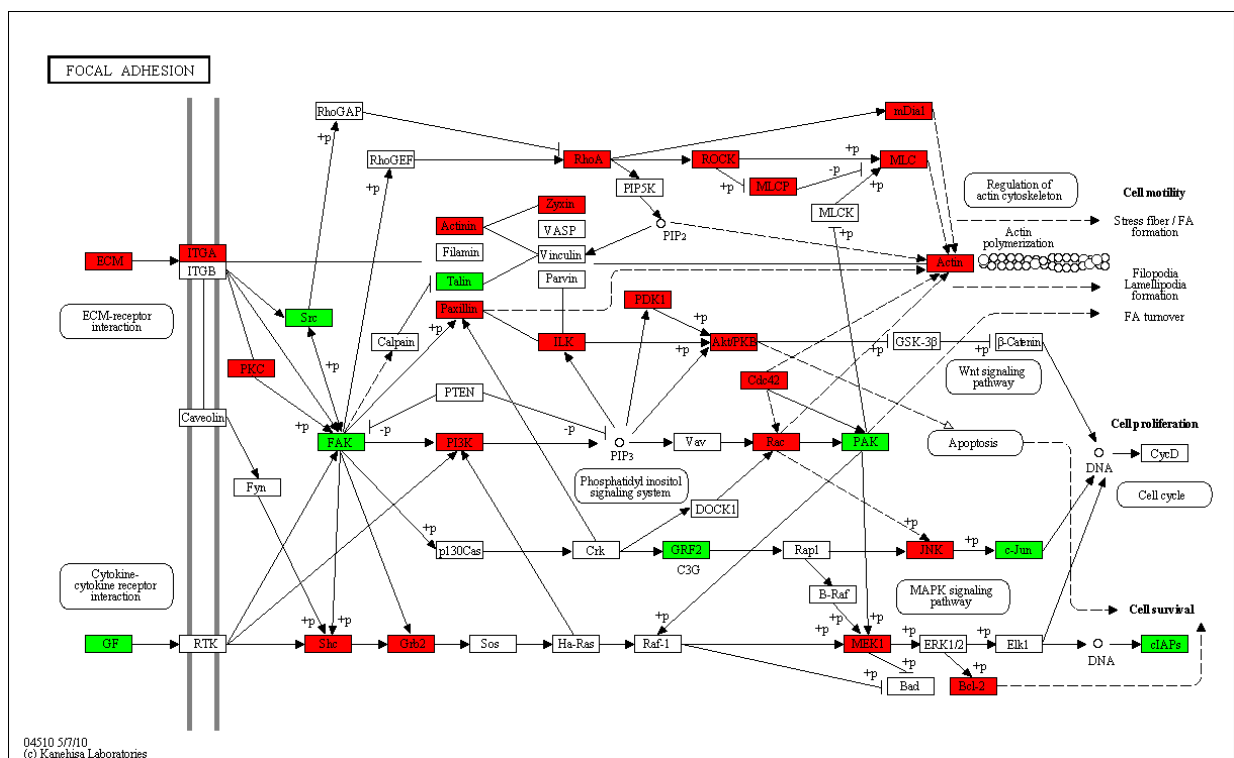


Abb. 10 zeigt schematisch den Signalweg für die fokale Adhäsion. Grün hinterlegte Gene sind beim Vergleich von t1 mit der Kontrollgruppe hochreguliert. Rot hinterlegte Gene werden vermindert exprimiert. [95]

Die Gene Set Enrichment – Analysen zeigten eine differentielle Regulierung des Signalweges für die fokale Adhäsion. Beim Vergleich zwischen dem Zeitpunkt t1 und der Kontrollgruppe zeigt sich eine differentielle Expression des Pathways auf einem Signifikanzniveau von $q < 10^{-4}$. Farblich hinterlegte Einzelgene exprimieren differentiiell signifikant auf einem Niveau von $p < 0,001$. Es finden sich 7 hochregulierte Gene und 22 herunterregulierte Gene.

Zum Zeitpunkt t1 erfahren die Schlüsselproteine FAK und SRC eine Hochregulierung. Wichtige Proteine für die Ausbildung des Zytoskeletts (wie Actin, RhoA, ROCK und MLC) und zur Bindung an die Extrazellulärmatrix (wie Integrin alpha, Actinin, Zyxin) sind noch herunterreguliert. Die Gene RhoA und PAK werden antagonistisch runter- beziehungsweise hochreguliert.

Von den Genen der proapoptotischen Signalkette PI3K und Akt/PKB gibt es weniger Transkripte. Auch die Gene für MEK1 und ERK1/2 werden vermindert exprimiert. Das Protein cJUN, welches Einfluss auf die Zelldifferenzierung und -proliferation hat, ist im Gegensatz zu den vorherigen Genen hochreguliert.

Zeitpunkt t1 gegenüber t2

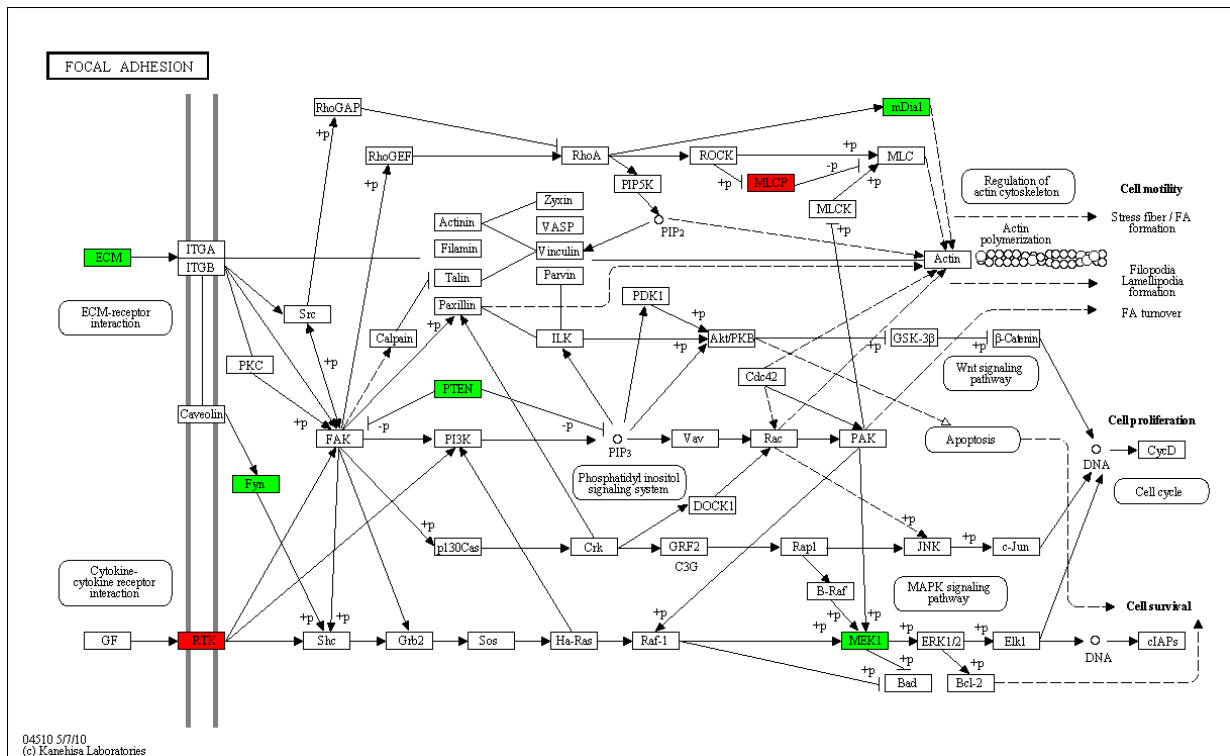


Abb. 11 zeigt schematisch den Signalweg für die fokale Adhäsion. Grün hinterlegte Gene sind beim Vergleich von t1 mit t2 hochreguliert. Rot hinterlegte Gene werden vermindert exprimiert. [95]

Beim Vergleich des Focal Adhesion-Pathways zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 zeigten sich nur einige wenige Einzelgene signifikant differentiell exprimiert. Innerhalb des Pathways waren im Vergleich vier hochregulierte und zwei herunterregulierte Gene. Bei der Testung des gesamten Pathways ergab sich ein $q > 0,05$, weshalb die Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten als nicht signifikant zu werten sind.

Zeitpunkt t2 gegenüber t3

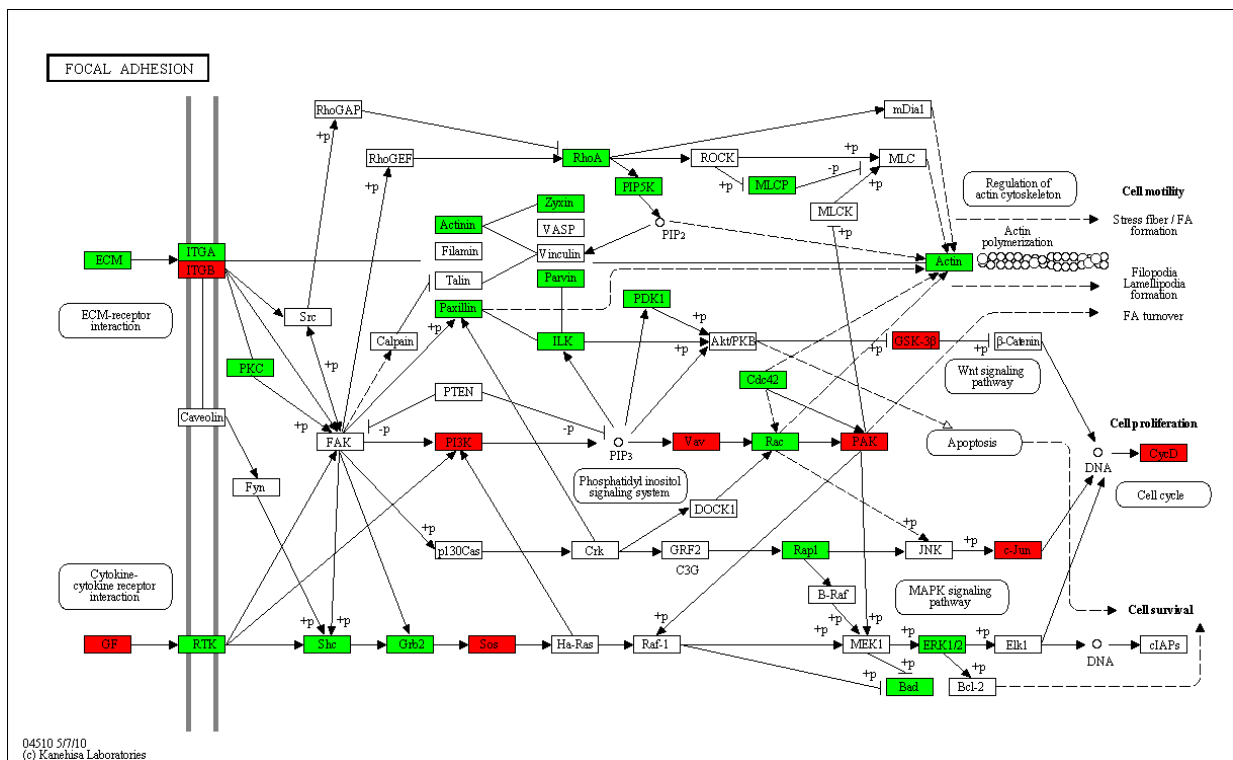


Abb. 12 zeigt schematisch den Signalweg für die fokale Adhäsion. Grün hinterlegte Gene sind beim Vergleich von t2 mit dem Zeitpunkt t3 hochreguliert. Rot hinterlegte Gene werden vermindert exprimiert. [95]

Beim Vergleich der Regulation des Signalwegs der fokalen Adhäsion zwischen dem Zeitpunkt t2 und t3 zeigen sich signifikante Veränderungen. Die Veränderungen bestehen bei einem Signifikanzniveau von $q < 0,03$. Es sind 20 Einzelgene hochreguliert und 8 Gene herunterreguliert.

Am dritten Tage des Myokardinfarktes werden nun ebenfalls die Proteine, die den Focal Adhesion-Pathway über die Bindung mit der Extrazellulärmatrix aktivieren (wie ITGA), verstärkt exprimiert. Auch die Proteine, die das Zytoskelett mit den Integrinen koppeln (wie Zyxin, Actinin, Paxicillin, Parvin) werden verstärkt gebildet. Neben der vermehrten Bildung von Bausteinen des Zytoskeletts (Actin) kommt es über den Rho-Kinase Weg (RhoA und ROCK) zur vermehrten Phosphorylierung der MLC und somit zur Ausbildung von Stressfasern. Für die Zellteilung verantwortliche Proteine (wie CycD oder cJun) werden vermindert gebildet. Die Hochregulierung der Signalkette RTK, SHC, GRB2 und letztendlich ERK1/2 beeinflusst das Zellüberleben.

Zeitpunkt t3 gegenüber der Kontrollgruppe

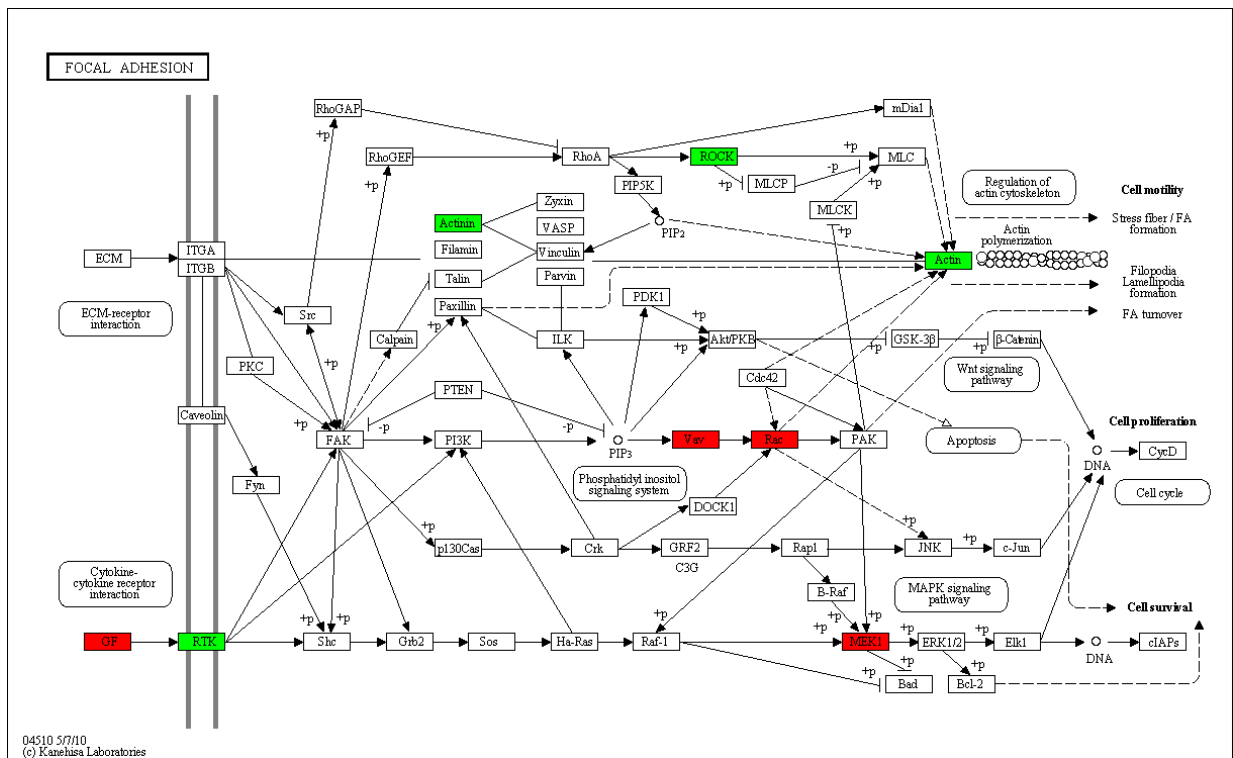


Abb. 13 zeigt schematisch den Signalweg für die fokale Adhäsion. Grün hinterlegte Gene sind beim Vergleich von t3 mit der Kontrollgruppe hochreguliert. Rot hinterlegte Gene werden vermindert exprimiert. [95]

Beim Vergleich des Focal Adhesion-Pathways zwischen dem Zeitpunkt t3 und der Kontrollgruppe zeigten sich nur einige wenige Einzelgene signifikant differentiell exprimiert. Innerhalb des Pathways waren im Vergleich vier hochregulierte und drei herunterregulierte Gene. Bei der Testung des gesamten Pathways ergab sich ein $q > 0,05$, weshalb die Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten als nicht signifikant zu werten sind.

D. Diskussion

1. Das Patientenkollektiv

Um eine Vergleichbarkeit zwischen der Kontrollgruppe, die in dieser Studie als Referenzwert dient, und der Myokardinfarktgruppe zu gewährleisten, ist es wichtig, dass beide Kohorten möglichst in ihren Charakteristika übereinstimmen. Es kann in diesem Fall von einer passenden Kontrollgruppe gesprochen werden. Auch wenn der Anteil der Frauen und das Alter in der Kontrollkohorte etwas niedriger sind. Im Body-Mass-Index jedoch herrscht eine gute Übereinstimmung. Die Tatsache, dass alle Patienten, sowohl der Myokardgruppe als auch der Kontrollgruppe, eine Koronarangiographie durchliefen und auch die gleiche Medikation bestehend aus ASS, Clopidogrel, β -Blocker, Statin und ACE-Hemmer erhielten ist wichtig. Hierdurch kann ein potentieller manipulativer oder medikamentöser Einfluss auf die Genexpression ausgeschaltet werden. Kritisch anzumerken ist, dass in der Kontrollgruppe keine Raucher bzw. Diabetiker dabei waren. Zumal insbesondere für das Rauchen ein Einfluss auf die Genexpression nachgewiesen ist, wie einige Studien unlängst zeigten [3][60]. Im Vergleich mit Studien, die die typischen Charakteristika eines Myokardinfarktpatienten untersuchten, zeigt sich das Patientenkollektiv als repräsentativ. Eine große amerikanische Studie zeigte, dass über 60% der Herzinfarktpatienten männlich sind, das Durchschnittsalter bei knapp unter 70 Jahren liegt, dreiviertel an Bluthochdruck leiden und etwa 30% Diabetiker sind [82]. Lediglich das Durchschnittsalter der Myokardinfarktpatienten ist etwas geringer.

2. Vorübergehende Transkriptionsänderungen während eines akuten Myokardinfarktes

Die Untersuchungen zeigten, dass der Einfluss eines Herzinfarktes auf das Genexpressionsmuster von Monozyten in der akuten Phase (t_1) signifikant ist. Mit 18% der gesamten untersuchten 10.273 Gene unterliegt ein ganz erheblicher Teil dem Einfluss der Stressreaktion des Herzinfarktes. Der Unterschied zwischen der Anzahl der regulierten Gene zwischen t_1 und t_2 in der subakuten Phase ist nur gering. Es lässt sich dadurch erklären, dass die Stressbelastung für den Körper vor Abschluss des Remodellings und somit der Adaptation des Körpers auf das

schädigende Ereignis des Herzinfarktes noch weiterhin groß ist. Nach 90 Tagen stellt man fest, dass nur noch wenige Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe mit stabiler KHK differentiell exprimiert werden. Die meisten der Gene sind wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückgegangen. Dieses lässt sich im Rahmen der Adaptation und nach Abschluss des Remodellings als Einstellen einer stabilen koronaren Herzkrankheit werten.

Auch in der Fachliteratur findet sich Bestätigung für dieser Funde. Denn es ist bereits seit langem unumstritten, dass ein frischer Herzinfarkt als Stressereignis Einfluss auf die molekularen Abläufe des Körpers hat. Im Zusammenspiel mit Hypoxie und Ischämie konnten Arbeiten bereits vor etlichen Jahren Einflüsse auf die Gen-Expression nachweisen [15]. Hong et al. konnten ferner im Tierversuch mit Ratten zeigen, dass dieser Einfluss auf die Gen-Expression nicht nur für einige wenige Gene gilt, sondern das eine große Anzahl an Genen verändert exprimiert werden. Dieses Forscherteam führte allerdings ihre Untersuchungen an Myokardzellen von Ratten durch [32]. Dass sich diese Ergebnisse auch auf andere Zellen übertragen lassen und die Stresssituation Herzinfarkt somit auch Einfluss auf andere Gewebe hat, zeigten andere Studien. Ootsuji et al. wiesen Effekte des Herzinfarktes auf die Gen-Expression von Leber-Zellen nach [55]. Für Blutzellen und auch für Monozyten gibt es Studien, die massive Expressionsveränderungen nachweisen [21, 18].

Die Frage bleibt offen, ob die gefundenen Expressionsänderungen spezifisch sind für einen Myokardinfarkt. Es ist gut vorstellbar, dass auch bei anderen Krankheiten mit entzündlichen Reaktionen (z.B. Asthma bronchiale, Schlaganfall, Mesenterialinfarkt, etc.) Änderungen im Monozyten-Transkriptom auftreten, die mit den in dieser Studie belegten Änderungen vergleichbar sind. Im Tiermodell gibt es hierfür bereits erste Hinweise. Zur Klärung dieser Frage bedarf es weiterer genomweiter Expressionsstudien.

3. Am stärksten regulierte Einzelgene

Von den 1857 regulierten Genen zum Zeitpunkt t1 gegenüber der Kontrollgruppe lohnen einige einer genaueren Betrachtung. Zum einen ist bei ihnen die starke Regulation auffällig, zum anderen konnte ihnen bereits eine plausible Funktion in der Pathophysiologie des akuten Herzinfarktes nachgewiesen werden. Im

Nachfolgenden werden vier Gene eingehender besprochen: THBS1, IL1R2, CX3CR1, HBEGF.

3.1 Thrombospondin

Bei der Betrachtung der Expression des Gens für Thrombospondin fallen zwei Dinge auf. Erstens die starke Hochregulierung um das 5-fache in der akuten Phase des Herzinfarktes nach 6 Stunden und zweitens die Herunterregulierung in der subakuten Phase 72 Stunden nach Beginn des Infarkts.

Thrombospondin ist ein Protein mit verschiedensten Aufgaben und wird von Körperzellen sezerniert. Ursprünglich entdeckt in Thrombozyten, wo es auch seine höchsten Konzentrationen aufweist, wird es doch während der Embryonalperiode in vielen Zellen gebildet, später jedoch nur noch in wenigen Zellen. Es bindet an verschiedenste Oberflächenrezeptoren wie CD36 und CD47, das LDL-Rezeptor-related Protein 1 oder auch an Integrine alpha und beta [63]. Über letztere kann es über die Focal Adhesion-Kinase zum Abbau von fokalen Adhäsionen kommen, welches begünstigend für eine verbesserte Zellmotilität ist [56]. Ein erhöhter Thrombospondinspiegel in der Akutphase reflektiert so das pathophysiologische Geschehen nach Eintreten eines Myokardinfarktes. Bereits nach kurzer Ischämie-Zeit beginnt die Anlockung von Monozyten in das infarzierte Gewebe [40]. Um in das geschädigte Gewebe einzuwandern, bedarf es einer guten Zellbeweglichkeit, denn die Monozyten müssen nach Verlassen des Gefäßes eigenständig an den Ort des Geschehens migrieren. Ein dies begünstigender Thrombospondinspiegel erscheint hier zweckmäßig.

Dass die hohen Expressionspiegel bereits am Zeitpunkt t2 nach 72 Stunden auf normale Werte hinunterreguliert werden erscheint auch sinnvoll, wenn man sich eine weitere Eigenschaft von Thrombospondin vor Augen führt. Thrombospondin gilt nachweislich als antiangiogenetisches Protein. Die Neovaskularisierung von Tumoren steht im antiproportionalen Zusammenhang mit dem Thrombospondin-1-Spiegel [45]. Berücksichtigend, dass auch im frischinfarzierten Herzmuskel eine Neubildung von Blutgefäßen förderlich ist, um möglichst viel von potentiell geschädigtem Myokard zu erhalten, beziehungsweise um Kollateralkreisläufe zu bilden, wären dauerhaft erhöhte Thrombospondinspiegel im geschädigten Gewebe nicht von Vorteil. Folglich scheint auch die Herunterregulierung von Thrombospondin im Verlauf pathophysiologisch sinnvoll.

3.2 Interleukin 1-Rezeptor 2

Im zeitlichen Verlauf der Genexpression für den Interleukin 1 – Rezeptor 2 ist die starke Hochregulierung in der akuten Phase des Herzinfarktes nach 6 Stunden augenscheinlich.

Mögliche Erklärungen dafür lassen sich aus den bereits bekannten Funktionen des Rezeptors herleiten. Interleukin 1 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Durch seine Freisetzung, unter anderem aus gewebständigen Makrophagen, werden Entzündungsreaktionen getriggert und weitere Leukozyten angelockt [70]. Es bindet an die Rezeptoren IL1R1 und IL1R2. Der IL1-Rezeptor 1 vermittelt die Signalkaskade, die die Immunzelle in einen entzündlichen Aktivierungszustand versetzt. Jedoch unterliegt IL1R1 nahezu keiner Regulation und wird immer gleichmäßig exprimiert. Zur Modulation der Signalkette, ausgelöst durch IL-1, bedarf es des IL1-Rezeptors 2. Er wirkt als Rezeptorfalle und bindet IL-1 ohne die anschließende Signalkette auszulösen [42]. Unter diesem Gesichtspunkt scheint in der Frühphase des Infarktes, in der es gilt die gesamte Immunantwort des Körpers fein zu regulieren, eine Modulation der Signalantwort auf Interleukin-1 sinnvoll.

Es gibt eine weitere Studie zum IL1-Rezeptor 2 die Einflüsse des Rezeptors auf die Zellmotilität nachweist. Hiernach führt eine Überexpression von IL1R2 zu einer verstärkten Aktivierung des pIL1-alpha - Signalweges (einer Vorläuferform von IL1-alpha) und darüber zur verbesserten und verstärkten Zellmigration [11]. Gerade in der Akutphase des Herzinfarktes, in der es gilt möglichst viele zellschrottabbauende Monozyten and Makrophagen ins geschädigte Gewebe zu locken, passt somit die frühe Überexpression des IL1-Rezeptors 2 in einen logischen Kontext.

3.3 CX3C-Rezeptor 1

Die Ergebnisse zeigen zunächst eine Herunterregulierung dieses Gens während der akuten Phase und im subakuten Verlauf dann eine Überexpression.

Auch hier gelingt die Einordnung dieser Ergebnisse besser unter Betrachtung der physiologischen Funktion dieses Rezeptors.

Der CX3C-Rezeptor bindet an CX3CL, auch Fraktalkine genannt, welches unter anderem an der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird. Über

diese Bindung wirkt der Rezeptor als Mediator für chemotaktische und Bindungsfunktionen der Zelle [35]. Es kommt zunächst zu einer festen Bindung an die Endothelzelle [4] und schließlich zur Extravasation. Dazu vermittelt der Rezeptor auch die Produktion von Matrixmetalloproteasen, die die Zell-Zellverbindungen des Endothels lösen und so dem Monozyten die Möglichkeit zu einer besseren transendothelialen Migration geben [30].

Mit diesem Wissen ist der physiologische Sinn einer Überexpression des CX3C-Rezeptors nach einem Herzinfarkt verständlich. Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass die Einwanderung von Monozyten in das infarzierte Herzgewebe erst nach 24 Stunden einsetzt und am dritten Tage nach dem Infarkt am größten ist [52]. In Bezug auf den CX3C-Rezeptor spiegeln sich jene Ergebnisse auch in dieser Studie wieder. Denn es konnte gezeigt werden, dass das für die Extravasation notwendige Gen CX3CR1 erst nach 72 Stunden besonders stark exprimiert wird. Warum zum Zeitpunkt t1 eine Mindereexpression erfolgt, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher klären. Möglicherweise geschieht dieses aus zellökonomischen Gründen.

Der Rezeptor CX3CR hat noch eine weitere Funktion neben der Triggerung von Zellbewegung und Zelladhäsion. Über Signalwege, die durch diesen Rezeptor aktiviert werden, kommt es zur Zelldifferenzierung und zu einem längeren Zellüberleben. Letzteres geschieht über die Induktion des antiapoptotischen Proteins bcl-2 [37]. Zwar wurden diese Eigenschaften des CX3C-Rezeptors bislang nur an Monozyten im Rahmen einer Leberzirrhose gezeigt, doch lassen sich diese Eigenschaften möglicherweise auch auf die Funktion der Monozyten im Remodelling nach dem Myokardinfarkt übertragen. Da der Erfolg des Remodellings, gemessen an einer bestmöglichen Herzfunktion nach dem Infarkt, abhängig ist von dem Gleichgewicht aus Inflammation und Heilung, erscheint ein längeres Überleben von Makrophagen im verletzten Herzmuskel doppelt sinnvoll, weil absterbende Monozyten die Entzündungsreaktion weiter triggern würden.

3.4 Heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor (HBEGF)

Es konnte für den Heparin-binding EGF-like Growth Factor eine differentielle Expression belegt werden. In der Akutphase erfolgte eine Hochregulation gefolgt von einer Herunterregulierung nach 3 Tagen. Während nach 3 Monaten wieder eine Hochregulation zu beobachten war.

Die Studienlage, um derartige Ergebnisse in einen pathophysiologischen Zusammenhang zum Herzinfarkt zu stellen, ist etwas dünn. Zur Diskussion werden einige Studien aus anderen Bereichen herangezogen unter der Vorstellung, dass sich die Ergebnisse dort auch auf das Geschehen im akuten Myokardinfarkt übertragen lassen.

Eine Hochregulierung von HBEGF hat viele Effekte die auch im akuten Myokardinfarkt von Vorteil sein können. So konnte bereits in Studien zum Mesenterialinfarkt nachgewiesen werden, dass Anoxie zu einer verstärkten Freisetzung von HBEGF führt, bereits wenige Stunden nach Beginn der Ischämie [83]. Dieses kann darin begründet sein, dass HEGF als potenter Vasodilatator Einfluss auf die Mikrodurchblutung hat [90]. Auch spielt es eine Rolle in der Bildung neuer Blutgefäße [46] und damit für die Erholung des Gewebes nach einer Verletzung und der Wundheilung [49], wie es beim Herzinfarkt von Nöten ist. Ebenso führt eine Hochregulierung von HBEGF zur Inaktivierung der durch Hypoxie ausgelösten Signalkaskade der Apoptose [5]. Jenes ist für den einwandernden Monozyten genauso von Vorteil, wie für das unter Hypoxie leidende ischämische Myokard.

Somit erscheint eine vermehrte Expression von HBEGF gerade in der akuten Phase des Herzinfarktes sinnvoll, da es viele Eigenschaften aufweist, die sich bei der Regeneration des Herzmuskel selbst, oder auch bei der Mithilfe dabei durch einwandernde Monozyten, als positiv herausstellen.

Warum sich aber in der subakuten Phase eine signifikante Herunterregulation dieses Gens beobachten lässt, ist schwieriger zu beantworten. Vor kurzem konnten Nash et al. in einer Studie zeigen, dass HBEGF neben der Apoptose auch die Zelldifferenzierung verhindert [53]. Wenn man bedenkt, dass die subakute Phase des Herzinfarktes der Hauptzeitpunkt der Monozytenmigration in das verletzte Herzmuskelgewebe ist, dann wäre gerade in jenem Moment eine Blockierung der Differenzierung ungünstig. Eine kurzfristige Minderexpression könnte hier also den Monozyten genug Zeit geben zu Makrophagen zu reifen, damit sie ihre weiteren Aufgaben bei der Heilung des Myokard wahrnehmen können. Diese These kann auch dadurch untermauert werden, wenn man bedenkt, dass HBEGF auch antiinflammatorische Effekte zugeschrieben werden [47]. In einer Phase des Herzinfarktes, in der das Gleichgewicht zwischen

Inflammation und Ausheilung noch auf Seiten der Entzündung weilt, erscheint eine Dauerexpression eines antiinflammatorischen Faktors als wenig sinnvoll.

Es zeigte sich, dass nach 90 Tagen wieder eine Hochregulation des HBEGF erfolgt. Dieses passt mit den Ergebnissen einer tierexperimentellen Studie zusammen, die die Expression von HBEGF in Ratten-Myozyten 6 Wochen nach einem akuten Herzinfarkt untersucht. Es lässt sich vermuten, dass HBEGF eine fortwährende Rolle in der Proliferation von Herzfibroblasten und beim Remodelling nach einem Myokardinfarkt spielt [74].

4. Gene Set Enrichment – Analysen

In dieser Studie zeigten sich die Signalwege für die fokale Adhäsion (focal adhesion), die Adherens Junction, die Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules) und die transendotheliale Migration von Leukozyten (leukocyte transendothelial migration) als besonders signifikant differentiell exprimiert.

Alle Signalwege sind eng verbunden mit dem Auswandern der Monozyten in beschädigtes Gewebe und können somit auch in einen physiologischen Zusammenhang mit dem Geschehen nach einem akuten Herzinfarkt gebracht werden. So erfolgt zunächst ein Andocken der im Blutstrom zirkulierenden Makrophagen an das geschädigte Endothelium über Zelladhäsionsmoleküle und konsekutiv die transendotheliale Migration durch das Endothel in das verletzte Gewebe, wo die Monozyten zu Makrophagen reifen und Zellschrott entfernen und somit zur Ausheilung des Myokards beitragen [52][7]. Im Angesicht dessen, dass die zirkulierenden Monozyten kurz vor der Auswanderung ins geschädigte Gewebe stehen, scheint eine differentielle Expressierung der oben genannten Signalwege wie eine genetische Momentaufnahme der Vorgänge, die bald folgen werden.

4.1 Focal Adhesion – Pathway

Im Gegensatz zu Analysen einzelner Gene helfen Gene Set Enrichment – Analysen ganze Signalwege auf das Vorliegen differentieller Expression zu überprüfen. Sie helfen dabei funktionelle Abläufe innerhalb einer Zelle besser zu verstehen. In der Studie zeigte sich der Focal Adhesion Pathway als einer der Signalwege, die besonders signifikant reguliert werden. Dabei gab es valide

Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt t1 und der Kontrollgruppe und in der Betrachtung des Zeitpunktes t2 gegen t3.

Bei der Betrachtung des Zeitpunktes t1 gegen t2 und t3 gegen die Kontrollgruppe gab es keine signifikante Regulation, so dass hierfür davon ausgegangen werden muss, dass die Änderungen im Expressionsmuster des Pathways zufälliger Natur sind.

Zur Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf ihre pathophysiologische Plausibilität ist es wichtig, sich noch einmal die bereits bekannten Funktionen des Signalwegs vor Augen zu führen. Fokale Adhäsionen dienen erst einmal der Zellverankerung, indem sie das Aktin-Zytoskelett an andere extrazellulär liegende Strukturen koppeln. Durch die Bindung der Zelle an einer anderen entsteht ein Fixpunkt, entlang dessen eine Zellbewegung stattfinden kann. Die fokale Adhäsion bleibt zwar zunächst fest mit der Nachbarzelle verbunden, ist aber mobil in der Zellmembran der eigentlichen Zelle. Mit Hilfe des kontraktiven Zellskeletts ist nun eine Bewegung der Zelle möglich. Erreicht die fokale Adhäsion das Ende der Zelle, wird die Zellverankerung aufgelöst und andernorts eine neue gebildet [25]. Ferner spielen fokale Adhäsionen eine Rolle bei der Modulation der Signalwege für das Zellüberleben, der Zelldifferenzierung und der Apoptose [28].

Zeitpunkt t1 gegenüber der Kontrollgruppe

Es ließ sich nachweisen, dass in der Akutphase des Herzinfarktes die Monozyten ein Schlüsselenzym, die Focal Adhesion Kinase (FAK), verstärkt exprimieren. Dass in der Frühphase eine Hochregulierung des Schlüsselproteins stattfindet, erscheint besonders sinnvoll, sollen im Verlauf die von ihm getriggerten Funktionen genutzt werden.

Interessant erscheint, dass zeitgleich noch eine verminderte Transkription von Integrin alpha [ITGA] in der Zelloberfläche erfolgt. Wie bereits im vorherigen Abschnitt dieser Arbeit erwähnt, erfolgt die Aktivierung des Signalweges und auch die Verankerung des Aktinzytoskeletts mit den extrazellulären Strukturen über die membranständigen Integrine [14]. Die Tatsache, dass ITGA zum Zeitpunkt t1 herunterreguliert ist, lässt vermuten, dass zum einen die Aktivierung der FAK und des gesamten Signalweges zu diesem Zeitpunkt nicht über die Integrine erfolgt und zum anderen auch die Ausbildung von komplexen fokalen Adhäsionen zur Zell-Zell-Bindung noch nicht im Vordergrund steht.

Viel mehr lässt sich davon ausgehen, dass die Regulation des Focal Adhesion Pathways zu diesem Zeitpunkt über die Zytokin-Rezeptoren (RTK) der Zelloberfläche getriggert werden. Diese stellen einen alternativen Aktivierungsweg neben den Integrinen dar. Wie bereits in dieser Arbeit dargestellt wurde, ist ein akuter Myokardinfarkt von einer massiven Entzündungsreaktion begleitet, in dessen Rahmen es bereits wenige Stunden nach Beginn zu einer massiven Ausschüttung von Zytokinen kommt, die Entzündungszellen in das geschädigte Myokard locken sollen. Eines der freigesetzten Zytokine ist das MCP-1, welches Monozyten anlockt [9]. Für MCP-1 konnte bereits in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass es zur Aktivierung und Ausbildung von fokalen Adhäsionen führt [10]. In Anbetracht der Tatsache, dass die Invasion von Monozyten in das Myokardgewebe ihren Höhepunkt erst einige Tage nach dem Infarkt hat [52], erscheint die erste Aktivierung der Monozyten über systemisch wirkende Zytokine als sinnvoll.

Neben der bereits angesprochenen FAK wird auch Steroid Receptor Coactivator-1 (SRC) hochreguliert, der ebenfalls eine wichtige Funktion zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen innehat [62]. Es ist denkbar, dass die verstärkte Ausbildung von Zell-Zellverbindungen, wie den fokalen Adhäsionen, in der Zelle erst einiges an Vorlauf braucht und deswegen zunächst eine Hochregulierung der Schlüsselenzyme für die Ausbildung erfolgt, bevor weitere Bestandteile für die Zellverbindungen produziert werden. Diese Vermutung wird gestützt durch die Auffälligkeit, dass in dieser frühen Akutphase des Myokardinfarktes die Gene, die für die strukturelle Ausbildung von fokalen Adhäsionen verantwortlich sind (z.B. Actin, Actinin, Zyxin, RhoA, MLCK, etc.), vermindert exprimiert werden. Die zeitgleiche antagonistische Hochregulierung von PAK1 weist auf eine erhöhte Zellmotilität hin [89]. Diese Funde lassen sich als mögliches Spiegelbild einer vermehrten Auswanderung von jungen Monozyten in den Blutstrom interpretieren. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich dagegen eine Überexpression in den Zweigen des Signalweges, die anderweitige Zellfunktionen regulieren. In diesem Zusammenhang ist die Bedeutung von cJun, welches vermehrt gebildet wird, zu diskutieren. Es nimmt Einfluss auf die Zelldifferenzierung und durch Regulation des Zellzyklus auch auf die Apoptose [73]. Beides erscheint im pathophysiologischen Zusammenhang sinnvoll. Denn zum einen werden die Monozyten nach Einwanderung in das Myokard zu Makrophagen differenzieren

[22] und zum anderen verschafft ein längeres Überleben den Monozyten die Zeit für die Verrichtung ihrer Aufgaben. Ähnliche Wirkung scheint auch die vermehrte Transkription von cIAP zu haben. Für dieses Protein wurden ebenfalls antiapoptotische Eigenschaften beschrieben [59]. Synergistisch wirkt auch eine Herunterregulation der Signalkette PI3K und Akt/PKB. Für diese Signalkette sind proapoptotische Eigenschaften beschrieben, unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle [28]. Signalwege, die wichtig für das Zellüberleben ausdifferenzierter Zellen (wie MEK1 und ERK 1/2) sind, werden in der Akutphase des Herzinfarktes offensichtlich weniger benötigt. Dieses Ergebnis erscheint in einem sinnvollen Kontext, da wie bereits angesprochen, die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen erst später erfolgt.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass das Expressionsmuster der Monozyten in der Akutphase des Herzinfarktes, 6 Stunden nach Infarktbeginn, eine Momentaufnahme des Geschehens liefert. Zu diesem Zeitpunkt lassen allein unter Betrachtung des Focal Adhesion Pathways folgende Erkenntnisse ziehen. Erstens erfolgt, vermutlich im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion durch massive Zytokinausschüttung, eine Induktion der FAK über Zytokinrezeptoren. Zweitens scheinen in diesem Moment hauptsächlich die Signalkaskaden im Vordergrund zu stehen, die den Monozyten, ein längeres Überleben und eine erhöhte Zellmotilität im Sinne eines Auswanderns in den Blutstrom ermöglichen.

Zeitpunkt t2 gegenüber t3

Während in der Frühphase des Myokardinfarktes hauptsächlich die Gene aktiviert worden sind, die den Monozyten ein längeres Überleben ermöglichen, findet sich in der Subakutphase zum Zeitpunkt t2 eine Verschiebung des Expressionsmusters. Während in der Akutphase der Focal Adhesion Pathway hauptsächlich über Zytokine aktiviert wird, erfolgt nun eine verstärkte Expression von Integrin alpha und damit eine vermehrte Aktivierung über die Bindung extrazellulärer Strukturen. Wie bereits zuvor beschrieben, wandern die meisten der Monozyten erst nach einem Zeitraum von circa 3 Tagen in das infarzierte Gebiet ein [52]. Bei der Extravasation spielen die Integrine eine entscheidende Rolle, da sie an extrazelluläres Fibronectin binden und darüber die Transduktion des Focal

Adhesion Pathways einleiten [2]. Bereits in der Akutphase konnten erhöhte FAK-Spiegel beobachtet werden, die neben der Transduktion von Signalen des Zellüberlebens auch als Vorbereitung auf die Ausbildung von fokalen Adhäsionen zu werten sind. In der Subakutphase kommt die Hochregulierung der Gene hinzu, die zum einen das Zellgerüst für die fokalen Adhäsionen sind (Actinin, Paxillin, Zyxin, Parvin, Actin), beziehungsweise zum anderen für den Zusammenbau der Bestandteile benötigt werden.

Im Vergleich mit der Regulation der Gene RhoA und PAK1 zum Zeitpunkt t1 findet sich zum Zeitpunkt t2 erneut eine gegensinnige Regulation. Eine vermehrte Expression von RhoA bei gleichzeitiger Minderexpression von PAK1 verringert die Zellmotilität [89] und kann als Ausdruck des bevorstehenden Anhaftens der Monozyten an die Endothelzellen zum Auswandern aus den Gefäßen gedeutet werden. Hierzu ist die Ausbildung von fokalen Adhäsionen als erste Zell-Zellverbindungen von zentraler Bedeutung. Auch führt eine erhöhte Aktivität von RhoA über ROCK zur vermehrten Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten (MLC), was in der vermehrten Kontraktilität des Zytoskeletts resultiert und somit zur Ausbildung und Festigung von fokalen Adhäsionen führt. Da ROCK ebenfalls zu einer vermehrten Inhibition der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) [36], die im aktiven Zustand MLC dephosphorylieren würden und damit die fokalen Adhäsionen wieder auflösen könnte, scheint es logisch dieses Enzym vermehrt zu exprimieren. Die Monozyten nutzen die Bindung an die Endothelzellen, um aus dem Blutstrom abzubremsen und schlussendlich in das infarzierte Gewebe zu wandern. Hierfür ist später eine Auflösung der fokalen Adhäsionen von Nöten, um die Zellmigration durch das Endothel zu ermöglichen.

Wie bereits für die Akutphase des Herzinfarktes beschrieben, wirkt der Focal Adhesion Signalweg nicht nur auf die Ausbildung fokaler Adhäsionen, sondern nimmt ebenfalls Einfluss auf andere zelluläre Funktionen, wie die Steuerung der Apoptose. Zeigten in diesem Zusammenhang während des ersten untersuchten Zeitpunktes Signalketten eine Regulierung, die für undifferenzierte Zellen wichtig sind, kommt jetzt eine weitere Signalkette dazu. In den Untersuchungen zeigte sich eine Hochregulierung der Gene SHC und GRB2, über die es letztendlich zur Aktivierung von ERK1/2 kommt [64], welches ebenfalls vermehrt gebildet wird. ERK ist ein wichtiges Protein bei der Unterdrückung der Apoptose bei ausdifferenzierten Zellen [28]. Die Tatsache, dass eine Hochregulierung dieser

Signalkette erfolgt, spricht dafür, dass die Monozyten sich auf das Ausdifferenzieren zu Makrophagen im geschädigten Myokard vorbereiten.

Zusammenfassend zeigt das Expressionsmuster auch zum Zeitpunkt t2 eine Momentaufnahme des Geschehens im pathophysiologischen Zusammenhang. Die Monozyten bilden verstärkt Proteine, die ihnen das bevorstehende Auswandern aus dem Gefäßsystem ermöglichen, beginnend mit der Anhaftung an das entzündlich veränderte Endothel. Ferner zeigen sich auch Signalwege hochreguliert, die für ein Ausdifferenzieren der Monozyten zu Makrophagen verantwortlich sind.

E. Schlussfolgerung

1. Beantwortung der Fragestellung und Hypothese

Diese Arbeit und die dazugehörige Studie konnten zeigen, dass Monozyten während eines akuten Herzinfarktes signifikante Änderungen in der Genexpression aufweisen. Hierbei kommt zu einer im zeitlichen Verlauf sehr differenzierten Expression, sowohl in Bezug auf einzelne Gene, als auch bei der Betrachtung ganzer Pathways. Es ließ sich nachweisen, dass sogar die noch zirkulierenden Zellen aus peripheren Venen, die Ereignisse im Myokard widerspiegeln. Anhand des Signalweges fokaler Adhäsionen konnte gezeigt werden, dass Expressionsprofile der Monozyten spezifisch sind im Rahmen ihres pathophysiologischen Wirkens.

Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Zeitpunkte lieferten die Microarray-Untersuchungen spezifische Momentaufnahmen genetischer Abläufe im Rahmen des Geschehens während eines akuten Myokardinfarktes. Diese Momentaufnahmen stehen im Einklang mit den Beobachtungen, die bislang aus makro- und mikroskopischer Sicht getätigt werden konnten. Die Veränderungen im Monozyten-Transkriptom sind in diesem Zusammenhang rasch. Sie treten bereits nach wenigen Stunden auf, bleiben 72 Stunden stabil und verschwinden nach 90 Tagen komplett.

In Bezug auf den Fokal Adhesion Signalweg konnte ebenfalls gezeigt werden, welche Rolle ihm in Bezug auf das entzündliche Geschehen im akuten Myokardinfarkt zukommt. Als Schlüsselsignalweg ist er mitentscheidend für die Rekrutierung, das Überleben und die Ausdifferenzierung von Monozyten, die eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Ausheilung des Myokards spielen.

Diese Studie liefert grundlegende Erkenntnisse für das pathophysiologische Verständnis genetischer Abläufe während eines akuten Myokardinfarktes und kann dazu dienen neue Denkansätze für die Identifizierung von Biomarkern zu liefern, die zur besseren Beurteilung von Krankheitsverläufen und Prognosen im Rahmen des Herzinfarktes beitragen können.

F. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Genexpression von Monozyten im zeitlichen Verlauf eines akuten Myokardinfarktes untersucht werden. Dazu wurde bei 28 Patienten 6 Stunden und 3 Tage nach einem akuten Herzinfarkt eine RNA-Probe aus den zirkulierenden Monozyten isoliert. Bei 10 dieser Patienten wurde ebenfalls eine dritte RNA-Probe nach Ablauf von drei Monaten gewonnen. Es erfolgte der Vergleich der RNA-Proben im intraindividuellen Verlauf, sowie mit einer passenden Kontrollgruppe aus 24 Patienten mit stabiler KHK.

Die gewonnenen RNA-Proben wurden mithilfe der Microarray-Technologie analysiert und statistisch ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die Monozyten einer differentiellen Genexpression im Verlauf des Herzinfarktes unterliegen und nahezu ein Fünftel der gesamten Gene signifikant differentiell reguliert wird. Die Veränderungen im Monozyten-Transkriptom erfolgen dabei rasch innerhalb weniger Stunden, bleiben über 72 Stunden stabil und verschwinden nach dem Ablauf von 90 Tagen. Besonders stark regulierte Einzelgene mit biologisch plausiblen Funktionen sind THBS1, IL1R2, CX3CR1, HBEGF. Gene Set Enrichment Analysen halfen bei der Identifizierung signifikant regulierter Pathways aus der Gesamtheit der regulierten Gene. Hierbei zeigen sich insbesondere Pathways, die bei der Extravasation der Monozyten aus dem Blutstrom eine Rolle spielen, besonders signifikant reguliert. Einer von ihnen ist der Focal Adhesion Pathway. Er spielt eine Rolle bei der Ausbildung fokaler Adhäsionen zum Zell-Zellkontakt und der Regulation der Zelldifferenzierung und des Zellüberlebens. Es konnte gezeigt werden, dass für diesen Signalweg eine differentielle Expression vorliegt. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden bestimmte Gene für unterschiedliche Funktionen dieses Pathways besonders stark exprimiert, was sich wiederum in einen plausiblen physiologischen Kontext stellen lässt.

Anhand dieser Ergebnisse ließ sich schlussfolgern, dass das Transkriptom von zirkulierenden Monozyten im akuten Herzinfarkt eine spezifische, genetische Momentaufnahme ihres Wirkens im pathophysiologischen Zusammenhang liefert.

G. Literaturverzeichnis

- [1] Ahdesmäki M, Lähdesmäki H, Pearson R, Huttunen H, Yli-Harja O: Robust detection of periodic time series measured from biological systems, *BMC Bioinformatics* (2005) May 13; 6, 117
- [2] Akiyama SK: Integrins in cell adhesion and signalling. *Human Cell* (1996) Sep; 9(3), 181-6
- [3] Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB: Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* (2002) Sep; 23(9), 1511-8
- [4] Apostolakis S, Vlata Z, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos DA: Angiotensin II up-regulates CX3CR1 expression in THP-1 monocytes: impact on vascular inflammation and atherogenesis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* (2010) May; 29(4), 443-8
- [5] Armant DR, Kilburn BA, Petkova A, Edwin SS, Duniec-Dmuchowski ZM, Edwards HJ, Romero R, Leach RE: Human trophoblast survival at low oxygen concentrations requires metalloproteinase-mediated shedding of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* (2006) Feb; 133(4), 751-9
- [6] entnommen und verändert nach:
Bauer C, Klotzsche O: Einfache Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen mit TRIZOL® und Eppendorf Phase Lock Gel®. *Eppendorf BioNews Application Notes* (2003) Mai, CCS Cell Culture Service GmbH, Hamburg; Frank Apostel, Eppendorf AG
<http://www.eppendorf.com/script/cms-newspic.php?id=3662&col=DOWNLOADFILE> (Stand vom 27.02.2011)
- [7] Beekhuizen H, van Furth R: Monocyte adherence to human vascular endothelium. *Journal of Leukocyte Biology* (1993) Oct; 54(4), 363-78
- [8] Benjamini Y, Yekutieli D: The control of false discovery rate under dependency, *Annals of Statistics* (2001) 29, 1165-1188
- [9] Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD: Complement C5a, TGF-beta 1 and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first five hours after reperfusion, *Circulation* (1997) Feb 4; 95(3), 684-692
- [10] Biswas SK, Sodhi A: Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *International Immunopharmacology* (2002) Jul; 2(8), 1095-107

- [11] Chang SY, Su PF, Lee TC: Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1alpha pathway. *Cytokine* (2009) Jan; 45(1), 32-8
- [12] Chen SM, Li YG, Wang DM, Zhang GH, Tan CJ: Expression of heme oxygenase-1, hypoxia inducible factor-1alpha, and ubiquitin in peripheral inflammatory cells from patient with coronary heart disease, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (2009) Feb 9
- [13] Chen SM, Zhang HX, Li YG, Wang DM, Zhang GH, Tan CJ: Expression of ubiquitin in peripheral inflammatory cells from patients with coronary artery disease, *The Journal of International Medical Research* (2008) 36, 1227-1234
- [14] Comisar WA, Mooney DJ, Linderman JJ: Integrin organization: Linking adhesion ligand nanopatterns with altered cell responses. *Journal of Theoretical Biology* (2011) Apr 7; 274(1), 120-30
- [15] Das DK, Maulik N, Moraru II: Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (1995) Jan; 27(1), 181-93
- [16] del Fresno C, Gómez-García L, Caveda L, Escoll P, Arnalich F, Zamora R, López-Collazo E: Nitric oxide activates the expression of IRAK-M via release of TNF-alpha in human monocytes, *Nitric Oxide* (2004) Jun; 10(4), 213-220
- [17] del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares Schanoski A, Gomez-Pina V, González-León MC, Gómez-García L, Mendoza-Barberá E, Rodríguez-Rojas A, García F, Fuentes-Prior P, Arnalich F, López-Collazo E: Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes, *Journal of Endotoxin Research* (2007) 13(1), 39-52
- [18] Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR: Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Functional & Integrative Genomics* (2010) Aug; 10(3), 329-37
- [19] Du P, Kibbe WA, Lin SM: Lumi: a pipeline for processing Illumina microarray, *Bioinformatics* (2008) Jul 1; 24(13), 1547-1548
- [20] Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Lynch AG, Tavaré S, Ritchie ME: Statistical issues in the analysis of Illumina data, *BMC Bioinformatics* (2008) Feb 6; 9:85
- [21] Fang L, Du XJ, Gao XM, Dart AM: Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction. *Clinical Science (London)* (2010) May 18; 119(4), 175-83
- [22] Frangogiannis NG: The immune system and cardiac repair, *Pharmacological Research* (2008) Aug; 58(2), 88-111

- [23] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML: The inflammatory response in myocardial infarction, *Cardiovascular Research* (2002) 53, 31-47
- [24] Frantz S, Bauersachs J, Ertl G: Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation, *Cardiovascular Research* (2009) 81, 474-481
- [25] Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman CM: Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2010) Nov 10; 26, 315-33
- [26] Gawaz M, Langer H, May AE: Platelets in inflammation and atherogenesis, *The Journal Clinical Investigation* (2005) Dec 1; 115(12), 3378-3384
- [27] Grond-Ginsbach C, Hummel M, Wiest T, Horstmann S, Pflieger K, Hergenahn M, Hollstein M, Mansmann U, Grau AJ, Wagner S: Gene expression in human peripheral blood mononuclear cells upon acute ischemic stroke, *Journal of Neurology* (2008) May; 255(5), 723-731
- [28] Hao HF, Naomoto Y, Bao XH, Watanabe N, Sakurama K, Noma K, Tomono Y, Fukazawa T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Matsuoka J, Takaoka M: Progress in researches about focal adhesion kinase in gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology* (2009) Dec 21; 15(47), 5916-23
- [29] Hayashi T, Iwata H, Hasegawa T, Ozaki M, Yamamoto H, Onodera T: Decrease in neutrophil migration induced by endotoxin and suppression of interleukin-1 production by macrophages in lactic dehydrogenase virus-infected mice. *Journal of Comparative Pathology* (1991) Feb; 104(2), 161-70
- [30] Held-Feindt J, Hattermann K, Mürköster SS, Wedderkopp H, Knerlich-Lukoschus F, Ungefroren H, Mehdorn HM, Mentlein R: CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Experimental Cell Research* (2010) May 15; 316(9), 1553-66
- [31] Hölschermann H, Tillmanns H, Bode C: Pathophysiology of Acute Coronary Syndrome, *Hämostaseologie* (2006) 2, 99-103
- [32] Hong D, Zeng X, Xu W, Ma J, Tong Y, Chen Y: Altered profiles of gene expression in curcumin-treated rats with experimentally induced myocardial infarction. *Pharmacological Research* (2010) Feb; 61(2), 142-8
- [33] Horvath S, Zhang B, Carlson M, Lu KV, Zhu S, Felciano RM, Laurance MF, Zhao W, Qi S, Chen Z, Lee Y, Check AC, Liao LM, Wu H, Geschwind DH, Febbo PG, Kornblum HI, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS: Analysis of oncogenic signalling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target, *Proceeding of the National Academic Sciences USA* (2006) Nov 14; 103(46), 17402-17407
- [34] Husberg C, Nygård S, Finsen AV, Damås JK, Frigessi A, Oie E, Waehre A, Gullestad L, Aukrust P, Yndestad A, Christensen G: Cytokine expression profiling

of the myocardium reveals a role for CX3CL1 (fractalkine) in heart failure. *Journal of Molecular Cellular Cardiology* (2008) Aug; 45(2), 261-269

[35] Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiya H, Schall TJ, Yoshie O: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* (1997) Nov 14; 91(4), 521-30

[36] Jin LM: Rock 'n' Rho: regulation of ion channels. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* (2009) Apr; 296(4), H908-9

[37] Karlmark KR, Zimmermann HW, Roderburg C, Gassler N, Wasmuth HE, Luedde T, Trautwein C, Tacke F: The fractalkine receptor CX3CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology* (2010) Nov; 52(5), 1769-82

[38] Kassner SS, Kollmar R, Bonaterra GA, Hildebrandt W, Schwab S, Kinscherf R: The early immunological response to acute ischemic stroke: differential gene expression in subpopulations of mononuclear cells, *Neuroscience* (2009) May 5; 160(2), 394-401

[39] entnommen aus der Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Stand: 31. Januar 2009, auf Grundlage des KORA Herzinfarktregister Augsburg des Helmholtz Zentrums München

[40] Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, Entman ML: Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia, *American Journal of Pathology* (2001) Oct; 159(4), 1301-1311

[41] Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML: Macrophage roles following myocardial infarction, *International Journal of Cardiology* (2008) Nov 12; 130(2), 147-158

[42] Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, Martin MU: The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *Journal of Immunology* (1998) Dec 15; 161(12), 6871-7

[43] Langfelder P, Zhang B, Horvath S: Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R, *Bioinformatics* (2008) Mar 1; 24(5), 719-720

[44] Lin SM, Du P, Huber W, Kibbe WA: Model-based variance-stabilizing transformation for Illumina microarray data, *Nucleic Acids Research* (2008) Feb; 36(2):e11

[45] Maeda K, Nishiguchi Y, Kang SM, Yashiro M, Onoda N, Sawada T, Ishikawa T, Hirakawa K: Expression of thrombospondin-1 inversely correlated with tumor vascularity and hematogenous metastasis in colon cancer. *Oncology Reports* (2001) Jul-Aug; 8(4), 763-6

- [46] Mehta VB, Besner GE: HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors* (2007) Aug; 25(4), 253-63
- [47] Mehta VB, Besner GE: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor inhibits cytokine-induced NF-kappa B activation and nitric oxide production via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of Immunology* (2005) Aug 1; 175(3), 1911-8
- [48] Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J: Expansion of circulating toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* (2005); 111, 2654-2661
- [49] Monslow J, Sato N, Mack JA, Maytin EV: Wounding-induced synthesis of hyaluronic acid in organotypic epidermal cultures requires the release of heparin-binding egf and activation of the EGFR. *Journal of Investigative Dermatology* (2009) Aug; 129(8), 2046-58
- [50] Muller WA, Randolph GJ: Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes, *Journal of Leukocyte Biology* (1999) Nov; 66(5), 698-704
- [51] Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK: Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* (2010) Jun 8; 121(22), 2437-45
- [52] Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ: The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions, *Journal of Experimental Medicine* (2007) 204(12), 3037-3047
- [53] Nash RJ, Heimbürg-Molinaro J, Nash RJ: Heparin binding epidermal growth factor-like growth factor reduces ethanol-induced apoptosis and differentiation in human embryonic stem cells. *Growth Factors* (2009) Dec; 27(6), 362-9
- [54] Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, Edelstein CL: Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice, *American Journal of Physiology Renal Physiology* (2008), 294, 264-271
- [55] Ootsuji H, Honda M, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M: Altered hepatic gene expression profiles associated with myocardial ischemia. *Circulation. Cardiovascular Genetics* (2010) Feb 1; 3(1), 68-77
- [56] Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, Murphy-Ullrich JE: Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *Journal of Biological Chemistry* (2004) Nov 19; 279(47), 48983-92

- [57] Owen AB, Stuart J, Mach K, Villeneuve AM, Kim S: A gene recommender algorithm to identify coexpressed genes in *C. elegans*, *Genome Research* (2003) 13, 1828-1837
- [58] Passlick B, Flieger D, Ziegler Heitbrock HW: Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood, *Blood* (1989) Nov 15; 74(7)
- [59] Prakobwong S, Gupta SC, Kim JH, Sung B, Pinlaor P, Hiraku Y, Wongkham S, Sripa B, Pinlaor S, Aggarwal BB: Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Carcinogenesis*. 2011 Feb 16; [Epub ahead of print]
- [60] Preciado D, Kuo E, Ashktorab S, Manes P, Rose M: Cigarette smoke activates NF κ B-mediated Tnf- α release from mouse middle ear cells. *Laryngoscope* (2010) Dec; 120(12), 2508-15
- [61] Preiss DJ, Sattar N: Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis, *International Journal of Clinical Practice* (2007) 61(4), 697-701
- [62] Qin L, Chen X, Wu Y, Feng Z, He T, Wang L, Liao L, Xu J: Steroid Receptor Coactivator-1 Upregulates Integrin α 5 Expression to Promote Breast Cancer Cell Adhesion and Migration. *Cancer Research* (2011) Feb 22; 71(5); 1-10
- [63] Roberts DD : THBS1 (thrombospondin-1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* (2005) May,
URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/THBS1ID42548ch15q15.html>
- [64] Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, Bussolino F, Oliviero S: Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* (2005) Nov 15; 106(10), 3423-31
- [65] Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA: CD99 plays a role in the migration of monocytes through endothelial junctions, *Nature Immunology* (2002) Feb; 3(2), 143-150
- [66] Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ: CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels, *Thrombosis and Haemostasis* (2004) Aug; 92(2), 419-424
- [67] Schmidt R, Bültmann A, Fischel S, Gillitzer A, Cullen P, Walch A, Jost P, Ungerer M, Tolley ND, Lindemann S, Gawaz M, Schömig A, May AE: Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappa b – dependent inflammation in monocytes, *Circulation Research* (2008) 102, 302-309

- [68] Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bülbül Ö, Thieme S, Chavakis T, Toole BP, Gawaz M, Schömig A, May AE: Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells, *Circulation* (2006) 113, 834-841
- [69] Silber S, Hoffmeister HM, Bode C: Optimal platelet inhibition after coronary stent implantation, *Herz* 2008 Jun; 33(4), 244-253
- [70] Smyth GK: Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, Springer New York (2005), 397-420
- [71] Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, Garrick BL, Lam A, Kapoun AM, Zheng Q, Protter AA, Schreiner GF, White RT: Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction, *Circulation Research* (2000), 86, 939-945
- [72] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP: Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceeding National Academic Sciences USA* (2005), 102, 15545-15550
- [73] Szabo E, Francis J, Birrer MJ: Alterations in differentiation and apoptosis induced by bufalin in cJun overexpressing U-937 cells. *International Journal of Oncology* (1998) Feb; 12(2), 403-9
- [74] Tanaka N, Masamura K, Yoshida M, Kato M, Kawai Y, Miyamori I: A role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Biochemical Biophysical Research Communications* (2002) Sep 20; 297(2), 375-81
- [75] Thygesen K, Alpert JS and White HD on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for Redefinition of Myocardial Infarction: Universal definition of myocardial infarction, *European Heart Journal* (2007) 28, 2525-2538
- [76] Tian L, Greenberg SA, Kong SW, Altschuler J, Kohane IS, Park PJ: Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies, *Proceeding National Academic Sciences USA* (2005), 102, 13544–13549
- [77] Toeda K, Nakamura K, Hirohata S, Hatipoglu OF, Demircan K, Yamawaki H, Ogawa H, Kusachi S, Shiratori Y, Ninomiya Y: Versican is induced in infiltrating monocytes in myocardial infarction, *Molecular and Cellular Chemistry* (2005) Dec; 280(1-2), 47-56
- [78] Troidl C, Möllmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, Willmer M, Rolf A, Rixe J, Troidl K, Kostin S, Hamm C, Elsässer A: Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction, *Journal of Cellular Molecular Medicine* (2009) Feb 17 [Epub ahead of print]

- [79] Van de Werf F and the Taskforce on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology: Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation, *European Heart Journal* (2008) 29, 2909-2945
- [80] Vilahur G, Hernández-Vera R, Molins B, Casaní L, Duran X, Padró T, Badimon L: Short-term myocardial ischemia induces cardiac modified C-reactive protein expression and proinflammatory gene (cyclo-oxygenase-2, monocyte chemoattractant protein-1, and tissue factor) upregulation in peripheral blood mononuclear cells, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2009) Mar; 7(3), 485-493
- [81] Weihrauch D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J: Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium, *Molecular and Cellular Biochemistry* (1995) Jun 7-21; 147(1-2), 13-19
- [82] Yeh RW, Sidney S, Chandra M, Sorel M, Selby JV, Go AS: Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* (2010) June 10; 362(23), 2155-65
- [83] Xia G, Rachfal AW, Martin AE, Besner GE: Upregulation of endogenous heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) expression after intestinal ischemia/reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery* (2003) Mar-Apr; 16(2), 57-63
- [84] Ziegler-Heitbrock HWL: Definition of human blood monocytes, *Journal of Leukocyte Biology* (2000) 67, 603-606
- [85] Ziegler-Heitbrock HWL: The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation, *Journal of Leukocyte Biology* (2007) 81, 584-592
- [86] Zhang B and Horvath S: A general framework for Weighted Gene Co-Expression Network Analysis, *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* (2005) Vol. 4, No.1, Article 17
- [87] Zhang B, Kirov S, Snoddy J: WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Research* (2005), 33, 741–7488
- [88] Zhang C, Xu X, Potter BJ, Wang W, Kuo L, Michael L, Bagby GJ, Chilian WM: TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2006) Mar;26(3), 475-480
- [89] Zhou H, Kramer RH: Integrin engagement differentially modulates epithelial cell motility by RhoA/ROCK and PAK1. *Journal of Biological Chemistry* (2005) Mar 18; 280(11), 10624-35

[90] Zhou Y, Brigstock D, Besner GE: Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent dilator of terminal mesenteric arterioles. *Microvascular Research* (2009) Jun; 78(1), 78-85

[91] Zimarino M, Sacchetta D, Renda G, De Caterina R: Faciliated PCI: rationale, current evidence, open questions, and future directions, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (2008) Jan; 51(1), 3-10

[92] entnommen und verändert nach:
http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf
(Stand: 28.02.2011)

[93] entnommen und verändert nach:
http://privatewww.essex.ac.uk/~mastal/illumina_ge.html (Stand: 28.02.2011)

[94] entnommen und verändert nach:
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Microarray.svg> (Stand: 28.02.2011)

[95] entnommen und verändert nach:
<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04510.png> (Stand: 28.02.2011)

[96] entnommen aus der GenomeNet Database:
<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04510.html> (Stand 28.02.2011)

H. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Heribert Schunkert bedanken für das Überlassen des Materials und des Arbeitsplatzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Patrick Diemert für die Vergabe des Themas, seine gute Betreuung und seine Ratschläge.

Auch möchte ich Frau Stephanie Belz danken für die Unterstützung im Labor, sowie der Forschungsgruppe von Prof. Francois Cambien für die Auswertung der Microarray-Experimente.

Abschließend danke ich meinen Eltern für ihre moralische Unterstützung und ihre Geduld.

I. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Claas Sören Riedel

Geboren am 27.07.1985 in Uelzen

Familienstand: ledig

Konfession: evangelisch



Schulbildung:

1992-1998 Sternschule, Uelzen

1998-2005 Herzog-Ernst-Gymnasium, Uelzen

Studium:

2005 Beginn des Medizinstudiums, Medizinische Universität zu Lübeck

2007 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2010-2011 Praktisches Jahr am UKSH Lübeck und im Klinikum Neustadt i.H.

2011 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation

Dissertation:

Beginn im Oktober 2007 im Labor von Prof. Dr. Heribert Schunkert, Medizinische Klinik II, UKSH Campus Lübeck