

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. K. Unertl

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors
Hypoxia-inducible factor-1 in der Sepsis**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Maria Wildermuth, geb. Kim

aus

Tübingen

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. K. Eltzhig

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. A. Grenz

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Der Transkriptionsfaktor Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)	1
1.2	HIF-1-regulierte Gene	4
1.2.1	Beschreibung der signifikant regulierten Gene	6
1.2.1.1	Matrix-Metallopeptidase-2 (MMP-2)	6
1.2.1.2	Interleukin-1 β (IL-1 β)	7
1.2.1.3	Nitric oxide synthase-2 (NOS-2/iNOS)	9
1.2.1.4	Endoglin (ENG)	10
1.2.1.5	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	10
1.2.1.6	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	11
1.3	Regulation von HIF-1	11
1.4	Die Rolle von HIF-1 in der Embryonalentwicklung	15
1.5	Die Rolle von HIF-1 in der Entwicklung von malignen Tumoren und anderen Erkrankungen	16
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	17
2.	Material und Methoden	19
2.1	Patientenkollektiv	19
2.2	Methoden	22
2.2.1	Microarray-Analyse	22
2.2.1.1	Herstellen der Sonden	24
2.2.1.1.1	mRNA-Isolierungsbedingungen	24
2.2.1.1.2	Fluoreszenzmarkierung der Sonde	25
2.2.1.2	Hybridisierung der Microarrays	25
2.2.1.3	Einlesen der DNA-Microarrays	25
2.2.1.4	Ähnlichkeitsanalyse	26
2.2.1.5	Normalisierung der Daten	26
2.2.2	Statistische Analyse	26
2.2.2.1	Kontrollgruppe 1 versus Kontrollgruppe 2	26
2.2.2.2	Gruppe 1/2 (zusammengefasste Kontrollgruppe) versus	

	Gruppe 3, Gruppe 1/2 versus Gruppe 4, Gruppe 1/2 versus Gruppe 5, Gruppe 1/2 versus Gruppe 6	27
3.	Ergebnisse	29
3.1	Vergleich Kontrollgruppe (Gruppen 1 und 2) versus Gruppe 3	40
3.2	Vergleich Kontrollgruppe (Gruppen 1 und 2) versus Gruppe 3 versus Gruppe 4	41
3.3	Vergleich Kontrollgruppe (Gruppen 1 und 2) versus Gruppe 3 versus Gruppe 4 versus Gruppe 5	42
3.4	Vergleich Kontrollgruppe (Gruppen 1 und 2) versus Gruppe 3 versus Gruppe 4 versus Gruppe 5 versus Gruppe 6	43
4.	Diskussion	45
4.1	Aktivierung von HIF-1 in der Sepsis	45
4.2	Expression der HIF-1-regulierten Gene in der Sepsis	48
4.2.1	Matrix-Metallopeptidase-2 (MMP-2)	48
4.2.2	Interleukin-1 β (IL-1 β)	50
4.2.3	Nitric oxide synthase-2 (NOS-2/iNOS)	51
4.2.4	Endoglin (ENG)	52
4.2.5	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	52
4.2.6	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	53
4.2.7	Weitere nicht signifikant regulierte HIF-1-Gene	54
4.3	Kritische Betrachtung der Messergebnisse	55
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	64
7.	Abkürzungen	80

8.	Anhang	84
8.1	Tabelle: Signifikant regulierte Gene bei den Sepsis-Patientengruppen	84
8.2	Tabelle: Expressionswerte der Patienten aus Gruppe 1 bis 6 sowie p- und q-Werte der untersuchten Gene	90
9.	Danksagung	100
10.	Lebenslauf	101

1. Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)

Der menschliche Organismus hat eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um eine verminderte Sauerstoffzufuhr bzw. einen erhöhten Sauerstoffbedarf zu kompensieren. Dabei ist der Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) einer der wichtigsten Regulatoren der Sauerstoff-Homöostase.

HIF-1 wurde im Rahmen von Untersuchungen entdeckt, bei denen die Regulation des menschlichen Erythropoietin-Gens erforscht wurde. Erythropoietin (EPO) kontrolliert die Produktion der Erythrozyten, also die Sauerstofftransportkapazität (Semenza, 2006). Im Jahre 1991 wurde in der 3'-Region des Erythropoietin-Gens ein hypoxia-response element (HRE) gefunden (Beck et al., 1991; Semenza et al., 1991). Dieses HRE wurde in einem Versuch in ein heterologes Reporter-gen und via Transfektion in menschliche Zellen eingesetzt. Unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) resultierte eine dramatische Zunahme der Transkription dieses Reporter-gens, ähnlich wie der des endogenen EPO-Gens (Pugh et al., 1991).

In nachfolgenden Studien konnte HIF-1 als das Protein identifiziert werden, das sich unter hypoxischen Bedingungen an das HRE bindet (Wang et al., 1995).

HIF-1 ist ein heterodimerer Komplex, der aus einer durch Hypoxie induzierbaren Untereinheit HIF-1 α und einer konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 β besteht. HIF-1 β ist auch bekannt als aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT), welcher ursprünglich als Bindungspartner des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors bekannt war (Reyes et al., 1992), wohingegen HIF-1 α erst im Jahre 1995 entdeckt wurde (Wang and Semenza, 1995). HIF-1 α und HIF-1 β gehören zur Familie der basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS)-Proteine (Wang et al., 1995). Die bHLH- und PAS-Regionen erlauben die Bildung von Heterodimeren zwischen der HIF-1 α - und HIF-1 β -Untereinheit. Im Jahre 1999 wurden eine N-terminale und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne gefunden (N-TAD und C-TAD) (Bhattacharya et al., 1999; Ruas et al., 2002). Die C-TAD interagiert mit Coaktivatoren wie z.B.

CBP/p300, wodurch die Gen-Transkription aktiviert wird (Lando et al. 2002b). In der N-TAD befindet sich die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODDD), wo die Verbindung zwischen HIF-1 α und dem „von Hippel Lindau“-Tumorsuppressor-Protein (pVHL) stattfindet. Bei Hypoxie bleibt eine Interaktion zwischen der N-TAD und dem pVHL aus, woraus eine Stabilisierung der N-TAD resultiert, was in der Folge eine Transaktivierung der Zielgene ermöglicht (Ruas et al., 2002).

In späteren Arbeiten stellte sich heraus, dass HIF-1 α ubiquitär in menschlichen Zellen exprimiert wird und dass es bei vielen physiologischen Reaktionen des Organismus unter hypoxischen Bedingungen eine entscheidende Rolle spielt wie z.B. bei der Erythropoese, der Angiogenese oder auch bei der Glykolyse als anaerobe Form der Energiegewinnung (Semenza, 1998).

Im Jahre 1997 wurde ein verwandtes Protein, HIF-2 α , gefunden (auch endotheliales PAS-Protein, HIF-like factor (HLF), HIF-related factor (HRF) und member of the PAS superfamily 2 (MOP2) genannt) (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997). HIF-2 α hat 48% der Aminosäuresequenzen sowie zahlreiche strukturelle und biochemische Eigenschaften mit dem HIF-1 α -Protein gemeinsam wie z.B. die Fähigkeit zur Heterodimerisation mit HIF-1 β und die Bindung an das HRE. Im Gegensatz zu HIF-1 α jedoch wird HIF-2 α nicht ubiquitär exprimiert, sondern kommt vorwiegend in der Lunge, im Endothel sowie im Glomus caroticum vor (Ema et al., 1997; Tian et al., 1997, 1998).

HIF-3 α wurde im Jahre 1998 entdeckt. Das HIF-3 α -Protein wird in verschiedenen Geweben wie z.B. im Thymus, im Gehirn, in der Lunge, im Herzen und in der Niere exprimiert. Es dimerisiert ebenfalls mit HIF-1 β und bindet an das HRE (Gu et al., 1998). HIF-3 α spielt in der frühen Phase der Adaptation an geringen Sauerstoffgehalt eine Rolle und bietet Schutz gegen moderate Hypoxie (Heidbreder et al., 2003).

Schließlich gibt es eine Splicevariante des HIF-3 α , nämlich das inhibitorische PAS (IPAS). Dieses wird vorwiegend in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns sowie im Kornealepithel exprimiert (Makino et al., 2001). Das IPAS selbst

besitzt keine endogene transaktivierende Eigenschaft, sondern interagiert vielmehr mit der amino-terminalen Region des HIF-1 α und verhindert so dessen Bindung an die DNA. Auf diese Weise stellt es eine negative Regulation des HIF-1 α sicher (Makino et al., 2001), so dass in Geweben, in denen physiologischerweise hypoxische Bedingungen herrschen, wie z.B. im Kornealepithel, einer Induktion des durch HIF-1-regulierten vascular endothelial growth factor (VEGF) und somit der Neubildung von Gefäßen entgegengewirkt wird. IPAS wird auch im Herzen und in der Lunge bei Hypoxie induziert und stellt so einen negativen Feedback-Loop für die HIF-1 α -Aktivität in diesen Geweben dar.

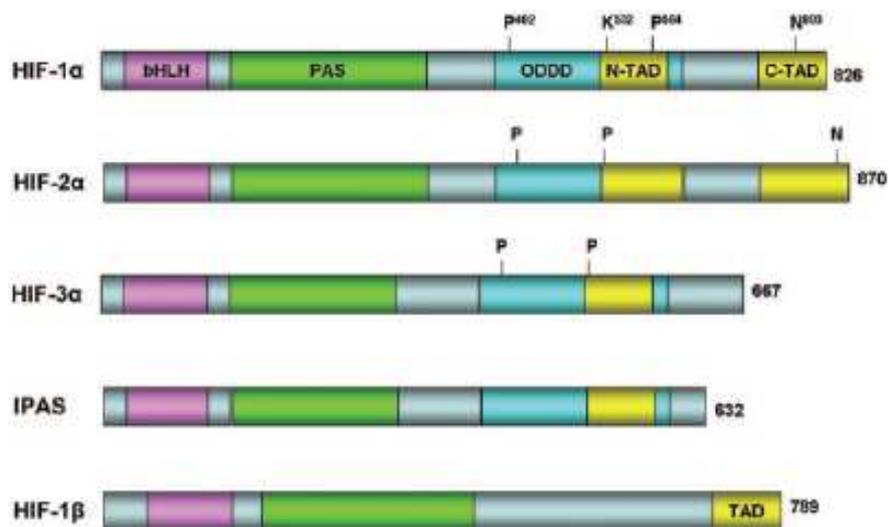


Abb. 1: Struktur der HIF- α - und HIF- β -Domänen. Die Zahlen am Ende der Domänen geben die Zahl der Aminosäuresequenzen wieder (Ke and Costa, 2006).

1.2 HIF-1-regulierte Gene

HIF-1 spielt in den meisten kernhaltigen Zellen hinsichtlich der Regulation der Adaptation unter hypoxischen Bedingungen eine entscheidende Rolle. Bisher sind mehr als 100 Gene bekannt, die durch HIF-1 reguliert werden (Ke and Costa, 2006):

Erythropoiese und Eisenmetabolismus:

Bei Hypoxie wird durch HIF-1 die Expression des Erythropoietin-Gens induziert, so dass mit steigender Erythrozytenzahl das Sauerstoffangebot an die Gewebe erhöht wird (Semenza et al., 1991).

Die vermehrte Produktion von Transferrin, dem Eisentransport-Protein (Rolfs et al., 1997), sowie die Hochregulation des Transferrinrezeptors, mit dessen Hilfe Eisen in die Zellen aufgenommen werden kann, steigert ebenfalls die Hämproduktion und somit die Sauerstoffbindungskapazität (Bianchi et al., 1999; Lok and Ponka, 1999; Tacchini et al., 1999).

Angiogenese:

Die HIF-1 gesteuerte Induktion von angiogenen Faktoren wie z.B. die des vascular endothelial growth factor (VEGF) führt zu einer Zunahme der Gefäßdichte und somit zu einer Verminderung der Sauerstoffdiffusionsstrecke. VEGF trägt zur Entwicklung des vaskulären Endothels sowie dessen Rekrutierung in hypoxische, nicht vaskularisierte Gebiete bei (Neufeld et al., 1999; Josko et al., 2000; Conway et al., 2001).

HIF-1 reguliert weiterhin die Transkription von Genen, die den Gefäßtonus verändern, wie z.B. nitric oxide synthase-2 (NOS-2) (Melillo et al., 1995), Hämoxygenase-1 (Lee et al., 1997), Endothelin-1 (Hu et al., 1998) oder Adrenomedullin (Nguyen and Claycomb, 1999).

Glukosemetabolismus:

Bei vermindertem Sauerstoffangebot produzieren Zellen das benötigte ATP nicht mehr durch die sauerstoffabhängige oxidative Phosphorylation, die in den

Mitochondrien stattfindet, sondern durch die von Sauerstoff unabhängige Glykolyse, die im Zytoplasma abläuft (Seagroves et al., 2001). Die verminderte ATP-Ausbeute (zwei ATP-Moleküle pro Glukose-Molekül bei der Glykolyse anstatt 38 ATP-Moleküle bei der oxidativen Phosphorylation) wird dadurch kompensiert, dass die Glukoseaufnahme in hypoxische Zellen gesteigert wird (Wenger, 2002). Durch HIF-1 werden viele Gene induziert, die der Glykolyse dienen wie z.B. Glukosetransporter-1 und -3 (Chen et al., 2001) und Hexokinase-2 (Yasuda et al, 2004; Mathupala et al., 2001). Weiterhin scheint ein positiver Feedback-Mechanismus im Sinne einer Akkumulation von HIF-1 α verursacht durch die Glykolyseprodukte Laktat und Pyruvat auch unter normoxischen Bedingungen zu bestehen (Lu et al., 2002).

Zellproliferation:

Bei Hypoxie induziert HIF-1 Wachstumsfaktoren wie z.B. insulin-like growth factor-2 (IGF-2) und transforming growth factor- α (TGF- α) (Feldser et al., 1999; Krishnamachary et al., 2003). Diese Faktoren tragen zur Zellproliferation bei und aktivieren selbst wiederum die HIF-1 α -Expression (Semenza, 2003).

Apoptose:

Hypoxie führt nicht nur zur Induktion von Wachstumsfaktoren, sondern auch zur Apoptose, wobei HIF-1 eine große Rolle spielt (Carmeliet et al., 1998). Die Expression von HIF-1 α und HIF-1 β ist signifikant mit der von proapoptotischen Faktoren korreliert, wie z.B. Caspase-3 und Fas (Volm and Koomagi, 2000). Gene, die den Zellzyklus regulieren, wie z.B. p53 und p21 scheinen ebenfalls durch HIF-1 reguliert zu werden (Carmeliet et al., 1998). p53 induziert mehrere Apoptose-Gene wie z.B. Bax, NOXA, PUMA und PERP und trägt so zur hypoxie-induzierten Apoptose bei (Schuler and Green, 2001).

1.2.1 Beschreibung der in dieser Studie signifikant regulierten Gene

1.2.1.1 Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2)

Bei den Matrix-Metalloproteinasen (auch Matrix-Metalloproteinasen genannt) handelt es sich um eine Großfamilie von derzeit 25 bekannten Enzymen mit unterschiedlicher Substratspezifität, die Zink als Bestandteil enthalten (Jackson, 2002). Die Matrix-Metalloproteinasen sind für einzelne Kollagene spezifisch: So spalten z.B. die Kollagenasen, die die Faserkollagene (Typ I, II und III) abbauen (MMP-1 und -8) das Typ IV-Kollagen nicht, welches von MMP-2 und MMP-9, den so genannten Gelatinasen, hydrolysiert wird. Stromelysine (MMP-3, -7, und -10) bauen Proteoglykane, Laminin oder Fibronectin ab. Metalloproteinasen spalten das Kollagen-Molekül an Gly-Leu- oder Gly-Ile-Bindungen in zwei Fragmente.

Die MMPs werden von Fibroblasten, Endothelzellen und anderen Zellen (z.B. auch Tumorzellen) gebildet und als inaktive Proenzyme in den Extrazellulärraum sezerniert. Dort werden sie mit Hilfe von Proteasen durch limitierte Proteolyse aktiviert. Gleichzeitig werden sie durch spezifische Inhibitoren, den tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), gehemmt. Normalerweise existiert ein feinreguliertes Gleichgewicht zwischen den MMPs und den TIMPs.

MMP-2 wird auch als Gelatinase A bezeichnet, da Gelatine das Hauptsubstrat dieses Enzyms darstellt. Es ist jedoch auch in der Lage, weitere Proteine der extrazellulären Matrix zu spalten wie z.B. Elastin, Vitronectin und Aggrecan.

MMP-2 wird als inaktives 72 kD-Proenzym sezerniert und von Proteasen in die aktive Form (64 kD) gespalten.

Die Aktivierung der Gelatinase A erfolgt durch die Bildung eines Komplexes, bestehend aus pro-MMP-2, TIMP-2 und membran-type-MMP-1 (MT-MMP-1). Diese drei Moleküle bilden einen Komplex an der Zelloberfläche, wobei mit Hilfe von TIMP-2 das MT-MMP-1 an die Hämapexin-Domäne des MMP-2 gebunden wird, wodurch die Spaltung des pro-MMP-2 in die aktive Form durch ein weiteres MT-MMP-1-Molekül ermöglicht wird (Jackson, 2002).

MMP-2 wird vor allem von Endothelzellen konstitutiv sezerniert; die Aktivierung erfolgt durch aktiviertes Protein C (APC) und Thrombin. Eine indirekte Induktion findet über die Aktivierung von MT-MMP-1 durch die von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten produzierten Enzyme Elastase, Cathepsin und Proteinase-3 und ferner durch Hydrogenperoxid, Lipopolysaccharide und hepatocyte growth factor statt.

Das Hauptcharakteristikum des MMP-2 ist die Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu degradieren, indem Matrixproteine wie z.B. Gelatine, Typ I-, IV- und V-Kollagen, Elastin und Vitronectin gespalten werden. Mit Hilfe von MMP-2 werden die Kollagenfasern der Basalmembranen von Gefäßen gespalten, wodurch die Aussprossung neuer Gefäße sowie der Ein- und Austritt von Lymphozyten und Leukozyten aus dem Gefäßsystem ermöglicht wird.

Weiterhin ist MMP-2 an krankhaften Umbauprozessen der extrazellulären Matrix beteiligt, wobei insbesondere die Umbauprozesse in der Lunge im Rahmen von Emphysem, Asthma bronchiale und Lungenfibrose von Bedeutung sind (Chakrabarti et al., 2005).

1.2.1.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 β gehört zur Familie der Zytokine. Diese sind zentrale Regulatoren der körpereigenen Immunabwehr, deren Freisetzung durch verschiedene Faktoren, wie Infektionen, Trauma und Entzündungen initiiert werden kann.

Das Interleukin-1 wird intrazellulär als ein Precursor-Protein synthetisiert (Pro-IL-1), das vor der Sekretion zum aktiven IL-1 umgewandelt wird. Dabei initiieren toll-like receptor-Agonisten wie z.B. Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien die Synthese des Precursor-Proteins. In speziellen Lysosomen verbindet sich das Pro-IL-1 mit Caspase-1, das seinerseits von einem Proteinkomplex, dem IL-1-Inflammasom, vom Pro-Caspase-1 zum aktiven Caspase-1 gespalten wird. Das aktive Caspase-1 wiederum spaltet das Pro-IL-1 in das aktive IL-1 (Dinarello, 2005). Es wird zwischen dem IL-1 α (18 kD) und IL-1 β (17,5 kD) unterschieden, wobei IL-1 β bei inflammatorischen Prozessen

die bedeutendere Rolle zu spielen scheint. IL-1 β wird von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen gebildet. Die Freisetzung wird durch Ischämie, Hämorrhagie und mikrobielle Substanzen sowie durch inflammatorische Mediatoren, wie z.B. C5a und TNF induziert (Hildebrand et al., 2005).

Interleukin-1 β zeigt ähnliche Wirkungen wie TNF- α (Pyrogenität, Aktivierung inflammatorischer Zellen, Adhäsionsrezeptorexpression, Permeabilitätsstörungen, Proteinkatabolismus). Aus der frühen und parallelen Ausschüttung von TNF und IL-1 β resultiert eine synergistische Stimulation der abhängigen Mediatoren (z.B. IL-6, IL-10) des unspezifischen Immunsystems. Hohe IL-1 β -Spiegel gehen mit einer Immunsuppression einher. Die Auswirkungen von IL-1 β werden durch den biologisch vorkommenden IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) reguliert. IL-1 β bindet an zwei verschiedenen Rezeptoren. Der Typ 1 (IL-1RI) findet sich auf Endothelzellen, Hepatozyten und T-Lymphozyten. Neben dem IL-1RI wurde der Typ 2 (IL-1RII) zusätzlich auf B-Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Die Interaktion von IL-1 β am IL-1RI und IL-1RII kann durch den IL-1-Rezeptorantagonisten abgeschwächt werden, indem IL-1ra kompetitiv und reversibel an beide Rezeptoren bindet, ohne eine Signaltransduktion zu bewirken. Somit wird IL-1ra in der Literatur ein antiinflammatorisches Wirkungsprofil zugeschrieben. Im Gegenzug kann IL-1ra durch die löslichen Rezeptoren IL-1RI und IL-1RII gebunden werden, was zu einem erneuten proinflammatorischen Signal durch die nun störungsfreie Interaktion von IL-1 β und den membrangebundenen Rezeptoren führt. Dieselben löslichen Rezeptoren, aber auch der vergleichsweise rasche Abbau des IL-1 β in den Nieren, der Leber und der Haut führen dazu, dass das IL-1 β nur eine sehr kurze Halbwertszeit von etwa sechs Minuten aufweist (Lin et al., 2000).

Im gesunden Organismus scheint IL-1 β nur eine randständige Rolle zu spielen. So zeigten Mäuse, die kein IL-1 β exprimierten, einen normalen Phänotyp und gebaren normal große Junge trotz der fehlenden COX-2-Ausschüttung während der Geburt, die normalerweise durch IL-1 β induziert wird (Dinarello, 2005).

1.2.1.3 Nitric oxide synthase-2 (NOS-2/iNOS)

Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) produziert Stickstoffmonoxid (NO) durch Hydroxylierung der Aminosäure L-Arginin. Es werden drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase unterschieden: Die neuronale NOS (nNOS oder NOS-1), die konstitutiv im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird, wobei NO als Neurotransmitter fungiert. Die endotheliale NOS (eNOS oder NOS-3) wird ebenfalls konstitutiv exprimiert und findet sich in Endothelzellen, Epithelzellen und Kardiomyozyten (Titheradge, 1998). Unter physiologischen Bedingungen aktiviert das von eNOS gebildete NO die Guanylatzyklase in der glatten Muskulatur, was zu einer erhöhten Konzentration von cyclo-GMP (cGMP) in den glatten Muskelzellen und somit zu einer Vasodilatation führt.

Die NOS-2 ist unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar. Ihre Expression wird jedoch unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen sprunghaft hochreguliert, weshalb sie auch als induzierbare NOS (iNOS) bezeichnet wird. iNOS bzw. NOS-2 ist in der Lage, 100-1000-mal mehr und über einen längeren Zeitraum hinweg NO zu produzieren als die konstitutiv exprimierten Isoformen eNOS und nNOS (Burgner et al., 1999). iNOS wird von vielfältigen Zelltypen exprimiert wie z.B. von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Astrozyten, Mikroglia, Hepatozyten, Kupfferzellen und Fibroblasten. Stimuliert wird die iNOS-Expression durch Lipopolysaccharide, Interferon- γ , Interleukin-1 β und TNF- α , wohingegen sie durch TGF- β , IL-4, IL-10 und Glukokortikoide gehemmt wird.

Das durch die iNOS in hohen Konzentrationen synthetisierte Stickstoffmonoxid entfaltet antimikrobielle Effekte durch Fragmentierung der DNA von Zielzellen und durch Bildung von Peroxynitrit (OONO^-), welches mikrobielle Schlüsselenzyme, wie z.B. die Ribonukleotidreduktase und die Azonitase inaktiviert.

Die exzessive NO-Produktion durch die iNOS ist bei der Sepsis verantwortlich für die ausgeprägte Vasodilatation bis hin zum septischen Schock sowie für die

verminderte Ansprechbarkeit der Gefäße gegenüber vasokonstriktorisches Substanzen.

1.2.1.4 Endoglin (ENG)

Endoglin ist ein essentielles Enzym für die Angiogenese. Es ist für die Bildung von glatten Muskelzellen verantwortlich und wird in Gefäßendothelzellen, Synzytiotrophoblasten und im Knochenmark exprimiert.

Mutationen des Endoglin-Gens sind ursächlich für Erkrankungen wie die hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT), eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch dilatierte Gefäße, arteriovenösen Malformationen und Blutungen aus Teleangiektasien der Schleimhäute.

In gesundem Gewebe wurden in Endothelzellen keine oder nur geringe Endoglin-Konzentrationen festgestellt. Hohe Expressionswerte des Endoglins hingegen wurden bei der Atherosklerose, der Psoriasis, bei chronischen Nephritiden sowie bei Gefäßneubildungen in Tumoren gefunden, was dazu führte, dass Endoglin als immunhistochemischer Marker für die Tumorangio-genese verwendet wird (Torsney et al., 2002).

1.2.1.5 Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

In den energieliefernden Reaktionen der Glykolyse wird Glyceraldehyd-3-Phosphat zweimal dehydriert, wobei als Endprodukt Pyruvat entsteht, welches leicht in Laktat überführt werden kann. Dabei wird Glycerinaldehyd-3-Phosphat zum 1,3-Bisphosphoglycerat oxidiert. Diesen Schritt katalysiert die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Das aktive Enzym ist ein Tetramer aus vier identischen Polypeptidketten. Im aktiven Zentrum jeder monomeren Peptidkette befindet sich ein Cysteinylnrest, dessen SH-Gruppe an der enzymatischen Reaktion teilnimmt (Löffler et al., 1997).

1.2.1.6 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

In dieser Studie wurde VEGF zwar nicht signifikant reguliert, jedoch wird aufgrund seiner Bedeutung als einer der wichtigsten Zielgene von HIF-1 gesondert darauf eingegangen.

VEGF wurde zunächst als ein von Tumoren produzierter „vascular permeability factor“ entdeckt (Senger et al., 1983). Er ist einer der wichtigsten Faktoren, die die Permeabilitätssteigerung und die Neubildung von Gefäßen bewirken und spielt ebenfalls eine große Rolle in der Wundheilung. Bei Sepsis wird VEGF von Liu et al. eine ursächliche Rolle bei der Entwicklung des Kapillarlecks und der Hypotension zugeschrieben (Liu et al., 2004).

1.3 Regulation von HIF-1

HIF-1 α hat eine äußerst kurze Halbwertszeit von weniger als fünf Minuten und wird durch Änderungen der Sauerstoffkonzentration in engen Grenzen reguliert (Salceda and Caro, 1997). Transkription und Synthese von HIF-1 α erfolgen konstitutiv unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (Wang et al., 1995; Kallio et al., 1997; Wiesener et al., 1998). Bei Normoxie wird HIF-1 α rasch degradiert, so dass keine messbaren Konzentrationen vorhanden sind (Wang et al., 1995). De novo synthetisiertes HIF-1 α wird von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen im Zytoplasma an zwei Prolinresten (Pro402 und Pro564) hydroxyliert, die in der sauerstoffabhängigen Degradationsdomäne (ODDD) lokalisiert sind (Srinivas et al., 1999; Masson et al., 2001). Diese beiden Prolinreste existieren ebenfalls bei HIF-2 α und HIF-3 α .

Die humanen HIF-1 α -Dioxygenasen werden als prolyl hydroxylase domain (PHD) bezeichnet. Bisher sind drei Isoformen bekannt: PHD1, PHD2 und PHD3 (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Huang et al., 2001). Die biochemischen Eigenschaften der PHDs entsprechen denen der Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylasen, d.h., dass sie ebenso 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen sind und für die Hydroxylierung als Kosubstrate Sauerstoff, Eisen (Fe²⁺) sowie Ascorbat benötigen (Schofield and Zhang, 1999). Bei der

Hydroxylierung wird ein O₂-Molekül gespalten, dabei wird ein Sauerstoffatom an den Prolinrest gebunden, das andere reagiert mit 2-Oxoglutarat, wobei Succinat und CO₂ entstehen (Bruick and McKnight, 2001). Das Eisenatom ist an zwei Histidinreste sowie an einen Aspartatsäurerest gebunden. Eisenchelatoren oder Metallionen wie z.B. Kobalt, Nickel oder Mangan binden das Eisenatom bzw. verdrängen es von seiner Bindungsstelle und stabilisieren auf diese Weise HIF-1 α , da die Hydroxylierung durch die PHDs ausbleibt (Yuan et al., 2003). Ascorbat hält das Eisenatom in seiner reduzierten Form (Fe²⁺) und gewährleistet so die Funktion der PHDs (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001).

HIF-1 α wird hauptsächlich durch PHD2 reguliert. Eine Inaktivierung von PHD2 bewirkt eine Stabilisierung von HIF-1 α auch unter normoxischen Bedingungen, während ein ähnlicher Effekt bei einer Inaktivierung von PHD1 und PHD3 nicht beobachtet werden konnte (Berra et al., 2003).

Es konnte nachgewiesen werden, dass in hypoxischen Zellen PHD2 und PHD3 im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus hochreguliert wurden. Dies galt jedoch nicht für PHD1 (Epstein et al., 2001; Metzen et al., 2003).

PHD2 ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, während PHD1 im Zellkern und PHD3 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma gefunden werden können (Metzen et al., 2003). PHD2 kann trotz seiner primären Lokalisation im Zytoplasma auch in den Zellkern transloziert werden und dort zur Degradation von HIF-1 α beitragen.

Obwohl alle PHDs in verschiedenen Geweben vorkommen, zeigt sich doch eine gewebespezifische Expression: PHD2 findet sich gehäuft im Fettgewebe (Oehme et al., 2002), PHD 3 im Herzen und in der Plazenta (Lieb et al., 2002) und PHD1 im Hoden (Lieb et al., 2002).

Bei Normoxie befinden sich die PHDs in einem aktiven Zustand, hydroxylieren die Prolinreste von HIF-1 α und bereiten es so für die Verbindung mit dem „von Hippel-Lindau“ (pVHL)-Ubiquitin-Ligase-Komplex und die nachfolgende Ubiquitination und Degradation vor (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Bei Hypoxie hingegen sind die Prolylhydroxylasen inaktiv, was in einer

Stabilisierung und Akkumulation von HIF-1 α in der Zelle resultiert. Somit stellen sich die PHDs als die Sauerstoffsensoren der Zelle dar, da sie zwingend Sauerstoff als Kosubstrat benötigen (Epstein et al., 2001).

Eine Mutation beider Prolinreste führt zu einer Störung der Interaktion zwischen HIF-1 α und pVHL, so dass die Stabilität von HIF-1 α auch bei normalen Sauerstoffkonzentrationen erhalten bleibt und so eine erhöhte HIF-1 α -Konzentration resultiert (Masson et al., 2001).

Nach Hydroxylierung der beiden Prolinreste erfolgt die Interaktion zwischen HIF-1 α und dem „von Hippel-Lindau“ (pVHL)-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Srinivas et al., 1999; Masson et al., 2001). Der pVHL-Komplex markiert das HIF-1 α mit Ubiquitin und bereitet es somit für die Degradation durch das 26S-Proteasom vor.

Das pVHL wurde erstmals im Rahmen der hereditären von Hippel-Lindau (VHL)-Krankheit beschrieben, die sich in der Ausbildung von multiplen Tumoren wie z.B. renalen Klarzellenkarzinomen, Phäochromozytomen und Hämangioblastomen in der Retina und im zentralen Nervensystem manifestiert (Ivan and Kaelin, 2001). Mutationen im VHL-Gen führen zu oben beschriebenem Krankheitsbild (Iliopoulos et al., 1998; Schoenfeld et al., 1998). In Zellen, in denen ein intaktes von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Protein fehlt, befinden sich HIF-1 α und HIF-2 α auch bei Normoxie in einem stabilen Zustand, so dass vermehrt Hypoxie-induzierbare Gene exprimiert werden, was zu einer Produktion von angiogenen Faktoren führt, obwohl dies für die Zelle bei fehlendem hypoxischem Stress nicht notwendig ist (Iliopoulos et al., 1996). Der (pVHL)-Ubiquitin-Ligase-Komplex wird ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert und ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wobei er jedoch auch in den Zellkern transloziert werden kann, so dass dort ebenfalls eine Degradation von HIF-1 α stattfinden kann (Berra et al., 2001; Groulx and Lee, 2002).

Durch die Acetylierung eines Lysinrestes (Lys 532) in der ODD-Domäne von HIF-1 α durch die Acetyltransferase arrest-defective-1 (ARD1) wird die Verbindung zwischen HIF-1 α und pVHL und somit die Degradation des HIF-1 α begünstigt (Jeong et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation des HIF-1 α besteht in der Modulation der Transaktivierungsdomänen N-TAD und C-TAD. An diese Domänen werden Koaktivatoren zur Transkription gebunden, wie z.B. CBP/p300 (Arany et al., 1996; Ebert and Bunn, 1998; Kallio et al., 1998; Ema et al., 1999; Carrero et al., 2000). Bei Normoxie wird ein Asparaginrest in der C-TAD (bei HIF-1 α Asn 803, bei HIF-2 α Asn 851) durch den factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) hydroxyliert, so dass auf diese Weise die Interaktion zwischen HIF-1 α und dem Koaktivator CBP/p300 verhindert wird (Hewitson et al., 2002; Lando et al., 2002b; Sang et al., 2002) und HIF-1 α keine transkriptionelle Aktivität entwickeln kann (Lando et al., 2002a).

Durch Hypoxie wird die Hydroxylierung des Asparaginrestes aufgehoben, so dass eine Interaktion zwischen der C-Transaktivierungsdomäne von HIF-1 α mit CBP/p300 ermöglicht wird und somit die Transkription der Zielgene beginnen kann (Lando et al., 2002a). Wie die PHDs ist das FIH-1 eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase und benötigt ebenfalls Eisen (Fe^{2+}) und Ascorbat als Kosubstrate (Lando et al., 2002a). In Anbetracht seiner Abhängigkeit von Sauerstoff als Kosubstrat kann FIH-1 ebenfalls wie die PHDs als ein Sauerstoffsensoren der Zelle betrachtet werden.

Bei Hypoxie erfolgt eine Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins sowie dessen Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern, wo es mit HIF-1 β dimerisiert und als HIF-Komplex transkriptionell aktiv wird (Huang et al., 1996; Kallio et al., 1997). Der aktivierte HIF-Komplex assoziiert im Zellkern mit den HREs in den regulatorischen Regionen der Zielgene, wo auch die Co-Aktivatoren gebunden werden, so dass die Genexpression induziert werden kann (Lando et al., 2002b).

Neben der Stabilisierung durch Hypoxie wird die Aktivität von HIF-1 α durch eine Vielzahl von Hormonen, Zytokinen und anderen Faktoren moduliert wie z.B. durch Insulin, TNF- α , IL-1 β , Angiotensin II, Thrombin, platelet-derived growth factor (PDGF) u. a. (Wenger, 2002). Die Aktivierung der Transkription durch diese Faktoren erfolgt durch Phosphorylierung über die p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) oder über Phosphatidylinositol 3-

Kinase/PTEN/AKT-Signalkaskaden (Richard et al., 1999; Zhong et al., 2000).

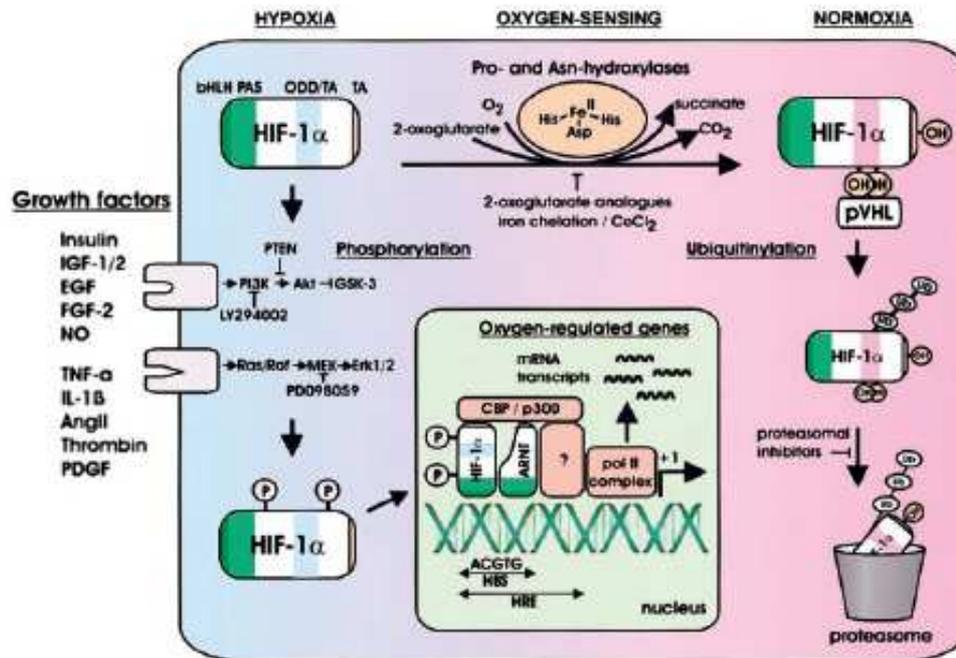


Abb. 2: Regulation von HIF-1α; dargestellt ist die Aktivierung bei Hypoxie sowie die Degradation bei Normoxie (Wenger, 2002).

1.4 Die Rolle von HIF-1 in der Embryonalentwicklung

HIF-1 spielt in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle. Bei Versuchstieren bewirkt ein Knockout von HIF-1α, (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998; Kotch et al., 1999), HIF-2α (Tian et al., 1998; Peng et al., 2000) oder auch HIF-1β (Maltepe et al., 1997) eine abnorme Gefäßentwicklung und schließlich den Tod der Versuchstiere. Es konnte nachgewiesen werden, dass die HIF-1-Expression bei Mäuseembryos zwischen dem achten und neunten Entwicklungstag ansteigt (Iyer et al., 1998). HIF-1α-Knockout-Mäuseembryos (HIF-1α^{-/-}) starben an ihrem elften Entwicklungstag aufgrund von

Neuralrohrdefekten, mangelnder Entwicklung der Blutgefäße und des Herz-Kreislauf-Systems (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). Heterozygote Mäuse für HIF-1 α (HIF1 $\alpha^{+/-}$), entwickelten sich zwar normal, zeigten aber bei Hypoxie unzureichende Kompensationsmechanismen, wie z.B. verminderte Erythropoiese, fehlende Hypertrophie des rechten Ventrikels, ausbleibende Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie sowie eines Remodelings der Pulmonalgefäße (Yu et al., 1999; Kline et al., 2002).

HIF-2 α -Knockout-Mäuseembryos (HIF-2 $\alpha^{-/-}$) starben zwischen dem 12. und 16. Entwicklungstag aufgrund von inadäquater Entwicklung der Blutgefäße, unzureichender Lungenreifung sowie aufgrund von Bradykardien bei mangelnder Katecholaminproduktion (Tian et al., 1998; Peng et al., 2000).

HIF-1 β -Knockout-Mäuse (HIF-1 $\beta^{-/-}$) zeigten eine allgemeine Entwicklungsverzögerung und starben am elften Entwicklungstag bei mangelnder Gefäßentwicklung, fehlerhafter Gefäßbildung im Bereich des Dottersacks und der Kiemenbögen (Maltepe et al., 1997).

1.5 Die Rolle von HIF-1 in der Entwicklung von malignen Tumoren und anderen Erkrankungen

In verschiedenen Tumoren konnte eine gesteigerte Genexpression von HIF-1 α und HIF-2 α möglicherweise als Konsequenz von Hypoxie innerhalb der wachsenden Tumormasse oder auch aufgrund von Genalterationen gefunden werden (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000). Immunhistochemische Analysen zeigten jeweils ansteigende HIF-1 α -Proteinkonzentrationen in benignen Tumoren, malignen Primärtumoren sowie sehr hohe Konzentrationen in Tumormetastasen, während in gesundem Gewebe kein HIF-1 α nachgewiesen werden konnte (Zhong et al., 1999; Harris, 2002). HIF-1 α gilt deshalb als ein Faktor, der die Tumorentstehung und –entwicklung fördert (Maxwell et al., 1997; Ryan et al., 2000).

Im Myokard von Patienten, die ein akutes Koronarsyndrom entwickelten, konnte eine erhöhte HIF-1 α - und VEGF-Konzentration nachgewiesen werden (Lee et

al., 2000). Ein effektives Gefäßremodeling im Anschluss an eine Ischämie beruht entscheidend auf der HIF-abhängigen Genexpression.

Eine Induktion von HIF-1 α und HIF-2 α sowie erhöhte Konzentrationen von HIF-induzierten Genen konnten weiterhin in der präeklampsischen Plazenta (Rajakumar et al., 2003), in Makrophagen der rheumatoiden Synovia (Hollander et al., 2001), in der ischämischen Retina (Ozaki et al., 1999; Grimm et al., 2001) und bei der Wundheilung (Elson et al., 2000) gefunden werden.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

HIF-1 wird außer durch Hypoxie auch noch durch eine Vielzahl von Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Umwelteinflüsse) auch unter normoxischen Bedingungen hochreguliert wie z.B. durch Insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und insulin-like growth factor-2 (IGF-2) (Feldser et al., 1999), durch Interleukin-1 β und TNF- α (Hellwig-Burgel et al., 1999), durch Angiotensin II, Thrombin und platelet-derived growth factor (Richard et al., 2000) sowie durch transforming growth factor- β (TGF- β) (Gorlach et al., 2001).

Auch Lipopolysaccharide, die ein Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien sind, scheinen in der Lage zu sein, HIF-1 auch bei Normoxie zu induzieren (Blouin et al., 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nachzuweisen, inwieweit sich bei septischen Patienten die Expression der HIF-1-induzierten Gene verändert. Dabei war es von besonderem Interesse, ob HIF-1-Gene „nur“ bei Patienten induziert wurden, die an einer Hypoxie leiden, oder ob HIF-1 auch durch die inflammatorische Reaktion im Rahmen eines SIRS bzw. einer Sepsis aktiviert werden konnte, ohne dass die Patienten eine Gewebhypoxie zeigten. Zu diesem Zweck wurden die Patienten in unterschiedliche Gruppen eingeteilt: Neben zwei Kontrollgruppen, in der sich Patienten befanden, die weder ein SIRS bzw. eine Sepsis noch ein Lungenversagen aufwiesen, wurden vier weitere SIRS/Sepsis-Patientengruppen etabliert. In diesen SIRS/Sepsis-Gruppen zeigten die Patienten bei zunehmender Erkrankungsschwere

schließlich in der letzten Gruppe ein manifestes Lungenversagen im Sinne eines ARDS (s. auch Kapitel 2). So konnte zwischen Sepsis-Patienten mit Lungenversagen und Sepsis-Patienten ohne Lungenversagen bzw. Gewebhypoxie differenziert werden. Von diesen ausgewählten Patienten wurde auf einem Microarray die Genexpression der HIF-1-Gene untersucht mit der Fragestellung:

Welche HIF-1-regulierten Gene werden im Rahmen eines SIRS bzw. einer Sepsis induziert?

Werden HIF-1-Gene auch bei Patienten mit SIRS bzw. Sepsis induziert, die keine Hypoxie aufweisen?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden sechs Patientengruppen der Intensivstationen der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Jena miteinander verglichen. Die Intensivstationen I und II umfassen mit insgesamt 50 Bettplätzen alle operativen Intensivabteilungen des Universitätsklinikums in Jena. Auf den Intensivstationen wird die intensivmedizinische Behandlung von Patienten der Fachdisziplinen Kardio- und Thoraxchirurgie, Viszeralchirurgie, Unfallchirurgie, Kinderchirurgie, Gefäßchirurgie, Neurochirurgie, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-, Nasen- und Ohrenklinik sowie Urologie und Frauenheilkunde gewährleistet.

Gruppe 1 bestand aus vier Patienten ohne Vorliegen einer Sepsis oder eines SIRS und ohne Beatmung (Alter zwischen 48 und 71 Jahren, Median = 65,5 Jahre; 3 männliche Patienten und eine weibliche Patientin), die zur postoperativen Überwachung für einen Tag auf der Intensivstation betreut wurden. Gruppe 2 setzte sich aus fünf Patienten zusammen, die nach einem längeren operativen Eingriff am ersten postoperativen Tag beatmet wurden und danach extubiert werden konnten. Auch bei ihnen bestand kein SIRS und keine Sepsis (Alter zwischen 58 und 83 Jahren, Median = 64 Jahre; 3 männliche Patienten und 2 weibliche Patientinnen). Bei der Gruppe 3, die elf Patienten enthielt, wurde ein SIRS oder eine Sepsis diagnostiziert, allerdings fehlte bei ihnen ein Lungenversagen ($p_aO_2/F_iO_2 > 300$; Alter zwischen 33 und 83 Jahren, Median = 64 Jahre; 8 männliche Patienten und 3 weibliche Patientinnen). Gruppe 4 bestand aus 5 Patientinnen und 15 Patienten (Alter zwischen 33 und 84 Jahren, Median = 68,5 Jahre), die an einem SIRS bzw. einer Sepsis litten und wegen eines geringgradig ausgeprägten Lungenversagens aufgrund einer Pneumonie beatmet werden mussten ($200 < p_aO_2/F_iO_2 \leq 300$). Die Patienten aus Gruppe 5 (6 Patientinnen und 13 Patienten, Alter zwischen 49 und 80 Jahren, Median = 72 Jahre) boten neben einem SIRS bzw. einer Sepsis ein

manifestes Lungenversagen im Sinne eines ARDS ($p_aO_2/F_iO_2 < 200$). Um dabei Patienten zu selektieren, die an einer Gewebehypoxie litten, wurde ein Laktatwert > 4 mmol/l als zusätzlicher Parameter gefordert. Gruppe 6 schließlich bestand aus 17 Patienten (9 Patientinnen und 8 Patienten, Alter zwischen 33 und 88 Jahren, Median = 66 Jahre), die eine Sepsis aufgrund einer massiven Peritonitis entwickelten. Um bei dieser Gruppe die Inflammation und nicht die Hypoxie in den Vordergrund zu stellen wurden nur Patienten ausgewählt, die eine gute Lungenfunktion boten ($p_aO_2/F_iO_2 > 300$).

Die Gruppen 1 und 2 dienten als Kontrollgruppen, während die Gruppen 3 bis 5 eine zunehmende Erkrankungsschwere zeigten. Bei der Gruppe 6 stand die Inflammation im Vordergrund mit der Fragestellung, ob auch bei diesem Patientenkollektiv der Transkriptionsfaktor HIF-1 aktiviert wurde.

Die Diagnose des SIRS bzw. der Sepsis wurde anhand der Diagnosekriterien für das SIRS bzw. die Sepsis entsprechend den ACCP (American College of Chest Physicians)/SCCM (Society of Critical Care Medicine)-Konsensus-Konferenz-Kriterien gestellt:

1. Nachweis der Infektion:

Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien.

2. Severe Inflammatory Host Response Syndrome (SIRS) (mindestens zwei Kriterien müssen erfüllt sein):

- a. Fieber ($\geq 38^\circ\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^\circ\text{C}$) bestätigt durch eine rektale, intravasale oder –vesikale Messung der Körperkerntemperatur.
- b. Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$.
- c. Tachypnoe (Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($P_aCO_2 \leq 4,3$ kPa bzw. ≤ 33 mmHg).
- d. Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild.

3. Akute Organdysfunktion (mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein):
- a. Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.
 - b. Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen wurde ausgeschlossen.
 - c. Arterielle Hypoxämie: $P_aO_2 \leq 10 \text{ kPa}$ bzw. $\leq 75 \text{ mmHg}$ unter Raumluft oder ein P_aO_2/F_iO_2 von $\leq 33 \text{ kPa}$ bzw. $\leq 250 \text{ mmHg}$ unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung wurde als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen.
 - d. Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5 \text{ ml/kg/h}$ für wenigstens zwei Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und / oder ein Anstieg des Serumkreatinins um das Doppelte des lokal üblichen oberen Referenzbereiches.
 - e. Metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder eine Laktatkonzentration $> 1,5$ -mal oberhalb des lokal üblichen oberen Referenzbereiches.

Sepsis: Kriterien 1 und 2.

Schwere Sepsis: Kriterien 1, 2 und 3.

Septischer Schock: Kriterien 1 und 2 sowie für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90 \text{ mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $\geq 65 \text{ mmHg}$ zu halten. Die Hypotonie bestand trotz adäquater Volumengabe und ließ sich nicht durch andere Ursachen erklären.

2.2 Methoden

2.2.1 Microarray-Analyse

Mit Microarrays kann die Genexpression (Genaktivität) vieler Gene gleichzeitig bestimmt werden. Die Genexpression entspricht dabei der Menge mRNA, die in einer Zelle vorhanden ist. Die mRNA kann also als ein Surrogat für die Genaktivität in einer Zelle verstanden werden.

Die Microarray-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Dabei lagern sich komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge spezifisch über Wasserstoffbrückenbindungen aneinander.

Bei der Herstellung des Microarrays werden Nukleinsäuren der zu untersuchenden Gene einer bekannten Sequenz, die so genannten Proben-Nukleinsäuren, an definierten Positionen (Spots) auf beschichteten Glas-Objektträgern, Siliziumchips oder Nitrocellulose-Membranen immobilisiert (Schober, 2002).

Die zu untersuchende mRNA des interessierenden Ausgangsmaterials wird zunächst isoliert. Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird complementary DNA (cDNA) synthetisiert. Dabei werden in die neue cDNA Nukleotide mit fluoreszierenden Farbstoffen inkorporiert. Die aus den zu untersuchenden Ausgangsmaterialien entstandene cDNA (Target-Nukleinsäure) wird zur Hybridisierung auf die einzelnen Spots des Microarrays aufgetragen. Anschließend wird der Microarray gewaschen, um ungebundene cDNA zu entfernen. Zur Quantifizierung der Genexpression wird die Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots auf dem Microarray mit einem Laser gescannt und ermittelt. Der Ablauf eines cDNA-Microarray-Experiments ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Die auf dem für diese Arbeit vorliegenden Microarray-Chip vorhandenen HIF-1-Gene sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Alle Versuche wurden im Labor der SIRS-Lab GmbH in Jena durchgeführt.

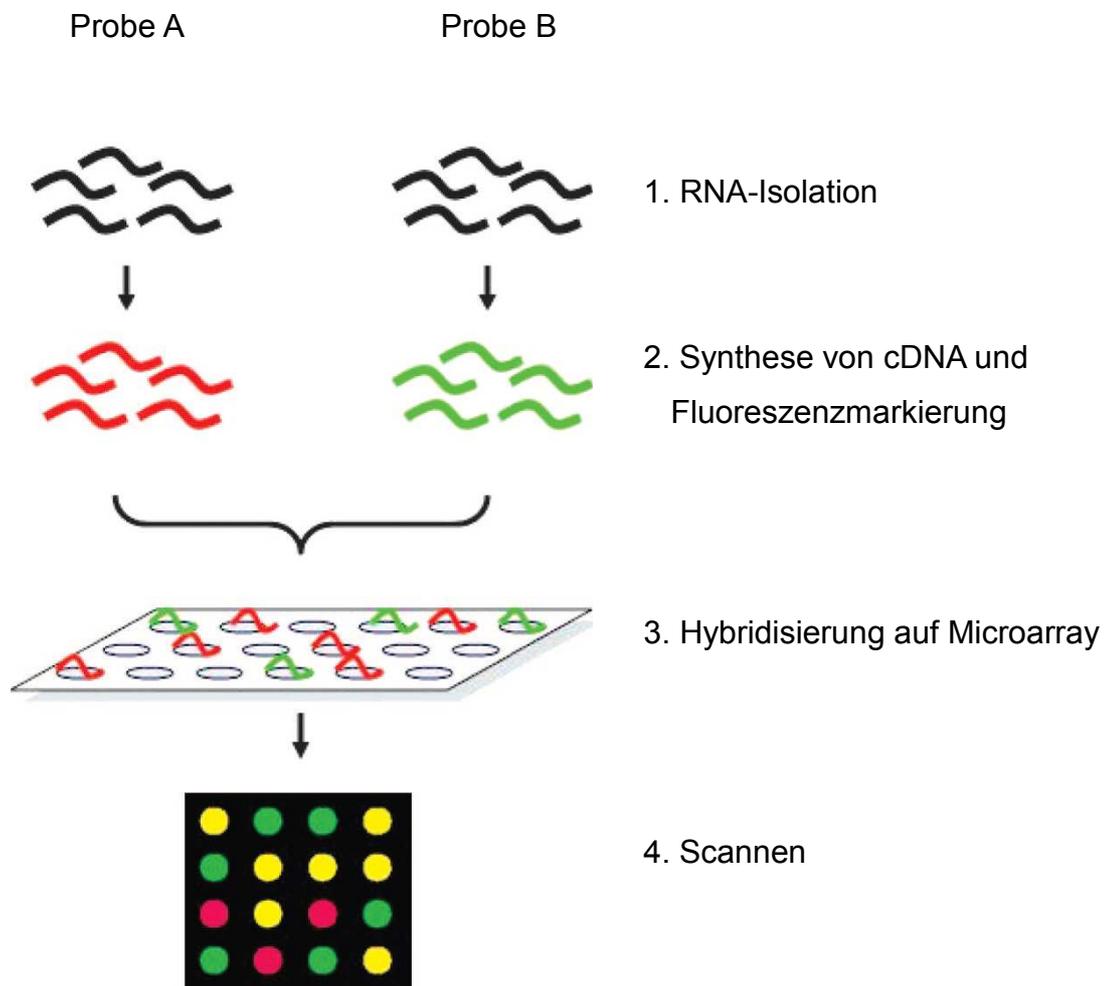


Abb. 3: Herstellung eines cDNA-Microarrays: 1. mRNA wird isoliert. 2. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird cDNA synthetisiert, dabei werden Nukleotide mit fluoreszierenden Farbstoffen inkorporiert. 3. Die entstandene cDNA wird zur Hybridisierung auf die Spots des Microarray aufgetragen. 4. Zur Quantifizierung der Genexpression wird die Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots auf dem Microarray mit einem Laser gescannt. In diesem Beispiel werden die Expressionsmuster zweier Proben miteinander verglichen: Ein roter Spot bedeutet Genexpression der Probe A > Genexpression der Probe B; grün bedeutet Genexpression der Probe B > Genexpression der Probe A und gelb Genexpression der Probe A = Genexpression der Probe B (nach Christie, 2005).

Nr.	Gen	Abkürzung
1.	Vascular endothelial growth factor	VEGF
2.	Endoglin	ENG
3.	Insulin-like growth factor-2	IGF-2
4.	Phosphoglycerate kinase-2	PGK-1
5.	Glucose transporter-1	SLC2A1
6.	Transforming growth factor- β 3	TGFB3
7.	Urokinase plasminogen activator protein	PLAUR
8.	Nitric oxide synthase-2 (inducible, hepatocytes)	NOS-2
9.	Interleukin-1 β	IL-1 β
10.	Decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	CD55
11.	Beta 2 integrin	ITGB2
12.	Ecto-5'-nucleotidase	NT5E
13.	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	PPARA
14.	Solute carrier family 12	SLC12A2
15.	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1	ENTPD1
16.	Amphiregulin	AREG

Tab.1: HIF-regulierte Gene auf dem Microarray-Chip.

2.2.1.1 Herstellen der Sonden

2.2.1.1.1 mRNA-Isolierungsbedingungen

Von den ausgewählten Patienten wurde Vollblut in PAXgene™ Blood RNA Tubes (Qiagen, Hilden) abgenommen. Das Vollblut wurde nach Protokoll und mit dem entsprechenden PAXgene™ Blood RNA Kit aufgearbeitet. Eine Prä-Amplifizierung war bei ausreichend vorhandenem Material nicht erforderlich.

2.2.1.1.2 Fluoreszenzmarkierung der Sonde

Zunächst wurde die isolierte mRNA unter Inkorporation von Aminoallyl-dUTP (AA-dUTP) unter Verwendung von Superscript-II reverse transcriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben und anschließend der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor®647 (rotes Signal) über die eingeführten Aminogruppen kovalent gebunden. Kontrollproben (SigM5-Zellkultur von der American Type Culture Collection) wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor®555 (grünes Signal) markiert. Damit die Farbstoffe nicht von den nicht in die cDNA eingebauten Aminoallyl-dUTPs gebunden wurden, wurde die cDNA unter Verwendung eines PCR Clean-up Kits aufgereinigt.

2.2.1.2 Hybridisierung der Microarrays

Die Hybridisierung der markierten cDNA erfolgte vollautomatisch in der HS 400™Pro Hybridization Station (Tecan); (10 Stunden Inkubation bei 42°C in der Hybridization Station unter Verwendung eines Formamid-basierten Hybridisations-Puffersystems). Anschließend wurden die Arrays gemäß den Herstellerangaben gewaschen und getrocknet. Je ein RNA-Paar (Probe versus Kontrolle) wurde auf einem Mitteldichte Inflammation Microarray kohybridisiert. Ein Array enthielt 5546 Sonden für 5268 humane, inflammationsrelevante Gene und 64 interne Kontrollen (z. T. mehrfach gespottet).

2.2.1.3 Einlesen der DNA-Microarrays

Nach der Hybridisierung wurden die Microarrays mittels eines Axon GenePix® 4000B Scanners digitalisiert und die Rohexpressionssignale mit Hilfe von Bildanalysemethoden aus den Scanbildern gemessen. Die Vorverarbeitung der Rohsignale bestand aus der Spotdetektion und –quantifizierung sowie der Bewertung der Spotqualität mit Hilfe der GenePix® Analysis Software. Die weitere Analyse der Microarray-Daten erfolgte unter Verwendung der Statistiksoftware R Development Core Team (2006) und Bioconductor (Gentleman et al., 2004).

2.2.1.4 Ähnlichkeitsanalyse

Um Ausreißer zu identifizieren, wurde eine Ähnlichkeitsanalyse für die roten und grünen Signale durchgeführt. Die Ähnlichkeit der Arrays wurde mittels einer hierarchischen Clusteranalyse dargestellt, wobei als Abstand der Stichproben-Korrelationsabstand (d.h. $1 - \text{Korrelationskoeffizient}$) nach Pearson verwendet wurde.

Die Expressionsdaten eines Patienten aus der Gruppe 4 sowie zweier Patienten aus der Gruppe 5 wichen deutlich von den Expressionsdaten der anderen Patienten ab, so dass diese als so genannte outliers von den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden.

2.2.1.5 Normalisierung der Daten

Für die Normalisierung wurden die Box – Cox Potenztransformationen in Verbindung mit Median und „median absolute deviation“ (MAD) verwendet, wobei mit den Rohdaten (ohne Background – Korrektur) gearbeitet wurde.

Bei zwei Ausreißern (jeweils ein Patient aus Gruppe 3 bzw. 4) schlug die Normalisierung fehl, so dass diese Patienten von den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden.

2.2.2 Statistische Analyse

2.2.2.1 Kontrollgruppe 1 versus Kontrollgruppe 2

Mit Hilfe des Zweistichproben Welch – t – Tests wurde festgestellt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2 bestanden. Die beiden Kontrollgruppen 1 und 2 konnten somit zu einer Gruppe zusammengefasst werden, so dass auf diese Weise die Größen der Kontrollgruppe und der Sepsis-Patientengruppen aneinander angeglichen werden konnten.

2.2.2.2 Gruppe 1/2 (zusammengefasste Kontrollgruppe) versus Gruppe 3, Gruppe 1/2 versus Gruppe 4, Gruppe 1/2 versus Gruppe 5, Gruppe 1/2 versus Gruppe 6

Mit Hilfe der Microarrays lässt sich der Momentanzustand einer Zelle auf Transkriptionsebene festhalten. Das bedeutet, dass mit einem einzigen Experiment die Aktivität – die Expression – von mehreren Tausend Genen beobachtet werden kann. Wird nun die Expression der Proben der Kontroll- und der Sepsis-Patientengruppen miteinander verglichen, stellt sich die Frage, ob es Gene gibt, deren Expression sich zwischen den Proben der miteinander zu vergleichenden Gruppen unterscheidet, und weiterhin, ob die Unterschiede, wenn sie gefunden werden, signifikant sind. Die erste Frage lässt sich beantworten, indem die Differenz der Expressionsmittelwerte in den unterschiedlichen Proben berechnet wird. Die Signifikanz drückt sich dann im p-Wert aus, der angibt, wie wahrscheinlich es ist, rein zufällig eine gleiche oder höhere Differenz zu beobachten. Je kleiner der p-Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Genexpression tatsächlich unterscheidet.

Um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß es in dieser Arbeit Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Sepsis-Patientengruppen gab, wurde eine Variante des Mittelwertvergleichs, nämlich die Welch-Modifikation der 1-Weg ANOVA verwendet. Bei dieser Modifikation müssen die Varianzen der Gruppen nicht notwendigerweise gleich sein.

Bei der Auswertung der umfangreichen Expressionsdaten, die, wie in dieser Arbeit geschehen, mit Hilfe von Microarrays gewonnen werden, entsteht ein multiples Testproblem, da die Mittelwerte der Expressionswerte der zu untersuchenden Proben für jedes einzelne Gen auf einen möglichen Unterschied untersucht werden müssen. Zudem müssen alle Tests simultan durchgeführt und so sehr viele Hypothesenpaare gleichzeitig getestet werden. Hierbei wird eine Fehlerrate für den Fehler erster Art benötigt, die einen geeigneten Kompromiss zwischen zu vielen falsch-positiven Ergebnissen und zu wenig signifikanten Ergebnissen findet. Die false discovery rate (FDR) ist ein recht junges Fehlerkontrollkriterium in multiplen Testproblemen. Sie stellt den zu

erwartenden Anteil der falsch-positiven Ergebnisse an allen positiven Ergebnissen dar.

In dieser Studie wurde das Problem des multiplen Testens bei den statistischen Vergleichen mittels dieser FDR in Form des q-Wertes berücksichtigt und damit der zu erwartende Anteil an falsch positiven Tests geschätzt.

3. Ergebnisse

Um das Genexpressionsmuster von Sepsis-Patienten darzustellen, wurde von Kontroll- und Sepsis-Patienten unterschiedlicher Erkrankungsschwere Vollblut abgenommen und die Genexpression insbesondere von HIF-1-induzierten Genen auf einem Microarray-Chip untersucht. Mit dem Microarray war die Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Akute-Phase-Genen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren, Matrix-Metalloproteinasen sowie Signaltransduktionsgenen und Enzymen messbar. Zusätzlich waren verschiedene Housekeeping-Gene auf dem Array vertreten.

Bei den Sepsis-Patientengruppen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe 1/2 150 Gene signifikant reguliert. Dabei wurde Gen für Gen eine Varianzanalyse (one-way-anova) durchgeführt, in der geprüft wurde, ob sich der Mittelwert der Genexpression in mindestens einer der sechs Patientengruppen von den anderen unterscheidet. Das resultierende Ergebnis wurde als p-Wert erfasst. Um eine Schwelle für die Auswahl von signifikanten Genen zu bestimmen, wurde zu jedem p-Wert der q-Wert berechnet, der die falsch positive Rate schätzt (Abb. 4a). Wie aus dem Kurvenverlauf der Abbildung 4b ersichtlich ist, ergab sich eine günstige Schwelle für den Wert q von 0,075. Er entspricht dem p-Wert von 0,008. Bei den Genen, die einen p-Wert kleiner als 0,008 erreichten, befanden sich also nach der Schätzung ca. 7,5% falsch positive Ergebnisse.

Bei einem p-Wert von 0,008 bzw. einem q-Wert von 0,075 stellten sich also signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen heraus und 150 Gensonden zeigten signifikante Farbintensitäten (Abb. 4b).

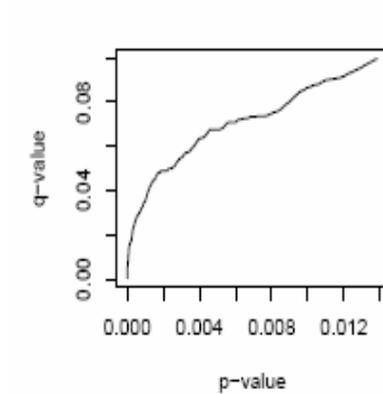


Abb. 4a: Bei steigendem p-Wert steigt die Anzahl der falsch positiven Tests.

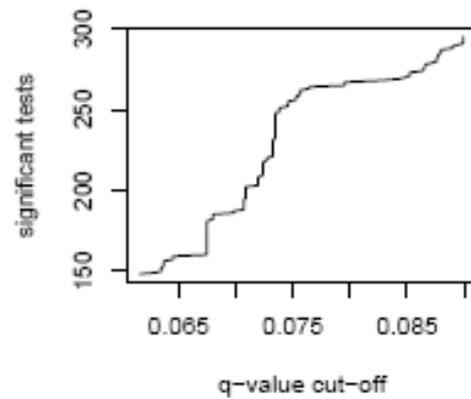


Abb. 4b: Je höher der tolerierte q-Wert, desto mehr signifikante Ergebnisse sind zu erwarten. Bei einem q-Wert von 0,075 ist ein deutlicher Anstieg der Zahl der signifikant regulierten Gene zu beobachten.

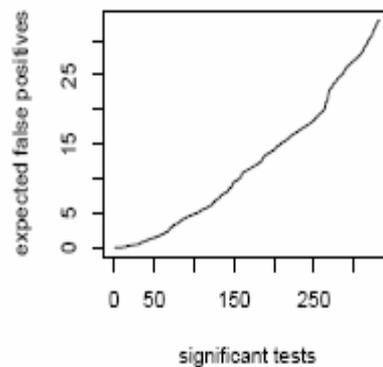


Abb. 4c: Je mehr Ergebnisse als signifikant eingestuft werden, desto höher ist die Anzahl der zu erwartenden falsch positiven Ergebnisse.

Die Liste der in dieser Arbeit signifikant regulierten Gene ist im tabellarischen Anhang unter Tabelle 8.1: „Signifikant regulierte Gene bei den Sepsis-Patientengruppen“ aufgeführt.

Diese signifikant regulierten Gene wurden in Abb. 6 und 7 dargestellt. Die hierbei gebräuchliche Abbildungsform ist die nachfolgend abgebildete Heatmap: Eine charakteristische Eigenschaft aller Microarray-Analysen ist, dass innerhalb sehr kurzer Zeit sehr große Datenmengen produziert werden. Die Verarbeitung dieser Daten ist nur mit der Unterstützung von Computern und entsprechender Software möglich. Die bei der Datenanalyse verwendete Software umfasst unter anderem Verfahren zur Bilderkennung, statistischen Analyse, Visualisierung, Cluster-Analyse und Datenbankabfrage. Dabei spielt die Visualisierung der Microarray-Daten eine zentrale Rolle bei jeder Analyse. Durch die Visualisierung sollen die Daten in ein benutzerfreundliches Format gebracht werden, das es dem Anwender ermöglicht, Muster und Strukturen in den Daten zu identifizieren, die anders nur schwer detektierbar wären.

Bei einem für diese Arbeit gewählten Signifikanzniveau von 5% zeigten sich bei einem q-Wert von 0,0995 fünf HIF-1-Gene als signifikant reguliert (Tab. 2):

Nr.	Gen	Abkürzung
1.	Matrix -Metallopeptidase-2	MMP-2
2.	Interleukin-1 β	IL-1 β
3.	Nitric oxide synthase-2	NOS-2
4.	Endoglin	ENG
5.	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	GAPDH

Tab. 2: Signifikant regulierte HIF-1-Gene.

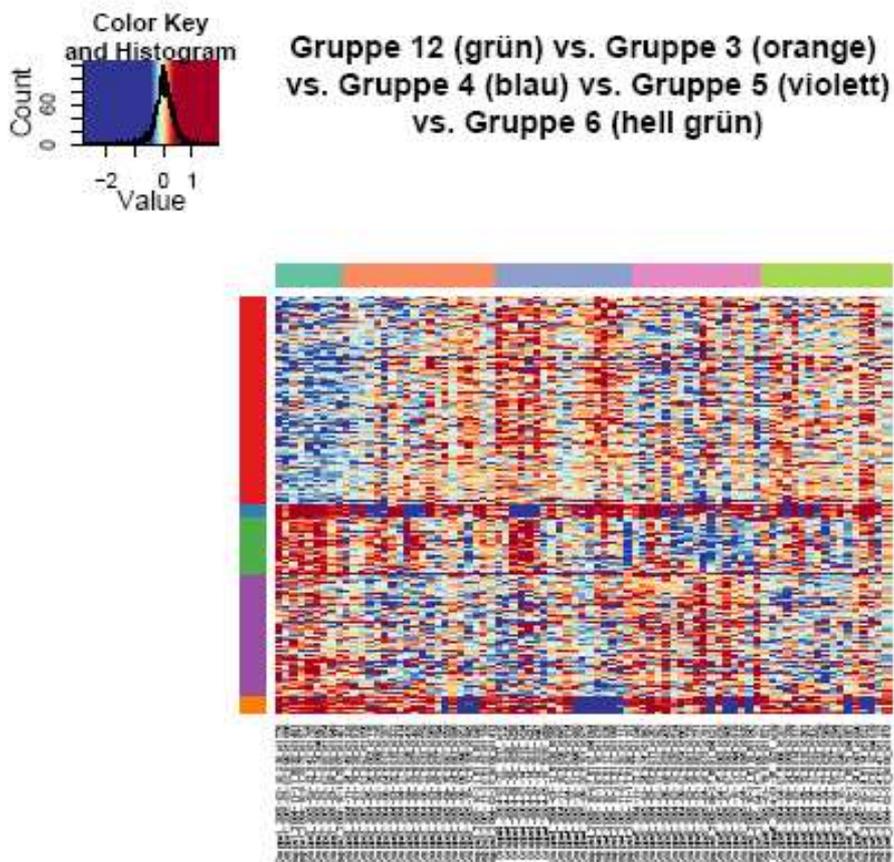
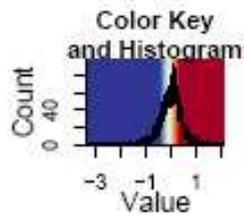


Abb. 6: Die Kontrollgruppen (dunkelgrün) bilden einen eigenen Subcluster, die Sepsis-Gruppen sind jedoch nicht voneinander zu unterscheiden (blau: Negativ regulierte Gene; rot: Induzierte Gene).



**Gruppe 3 (orange) vs. Gruppe 4 (blau) vs.
Gruppe 5 (violett) vs. Gruppe 6 (hell grün)**

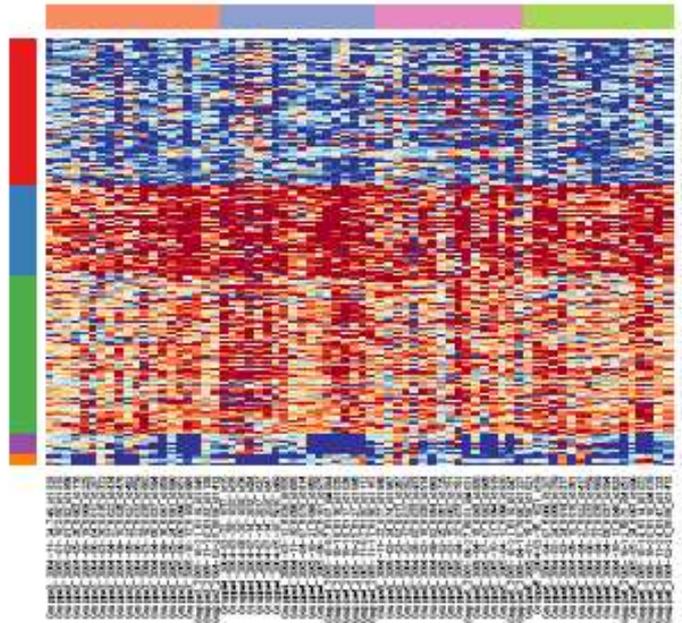


Abb. 7: Darstellung der signifikant regulierten Gene mittels einer Heatmap, wobei die Veränderung bezogen auf den Mittelwert der Kontrollgruppe 1/2 gezeigt wird (blau: Negativ regulierte Gene, rot: Induzierte Gene).

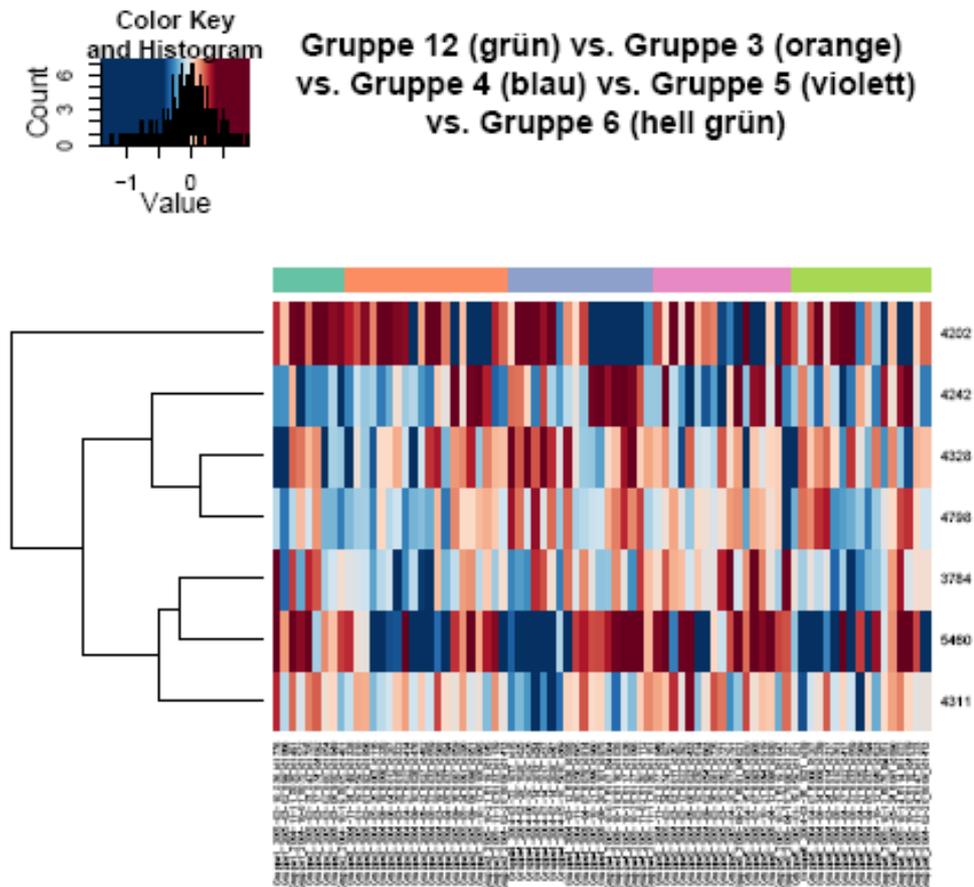
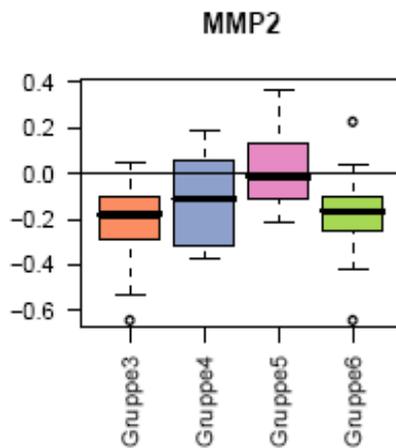


Abb. 8: Darstellung der signifikant regulierten HIF-1-Gene sowie Interleukin-6 (IL6) und intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) als Kontrollgene mittels einer Heatmap

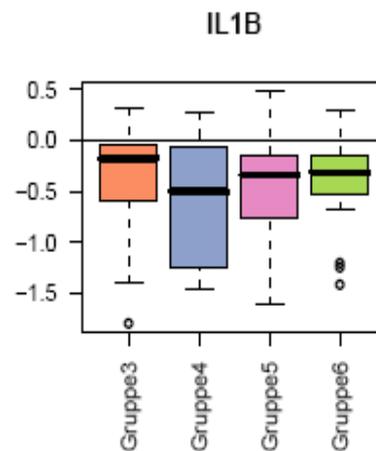
(4202: IL-1 β ; 4242: NOS-2; 4328: ENG; 4798: IL6; 3784: MMP-2; 5460: GAPDH; 4311: ICAM; blau: Negativ regulierte Gene, rot: Induzierte Gene).

Die signifikant regulierten HIF-1-Gene wurden zusätzlich mithilfe von Boxplots dargestellt (Abb. 10 a-e). Dabei wurde das Rechteck eines Boxplots durch das obere und untere Quartil begrenzt. Im Rechteck ist zusätzlich der Median eingezeichnet. Die Länge der gestrichelten vertikalen Linien wurde durch den maximalen bzw. minimalen Wert festgelegt. Ausreißer wurden als Punkte separat ins Diagramm eingetragen. Die Expressionswerte der Gruppen drei bis sechs wurden jeweils auf den Mittelwert der Kontrollgruppe 1/2 bezogen:

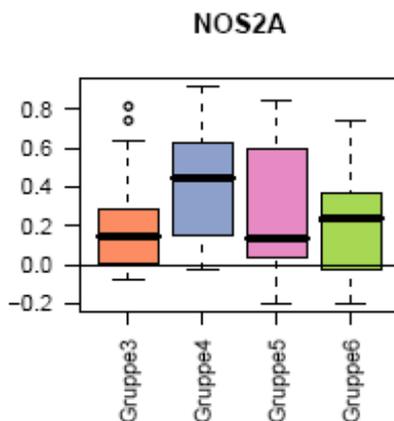
Abbildungen 10 a-e:



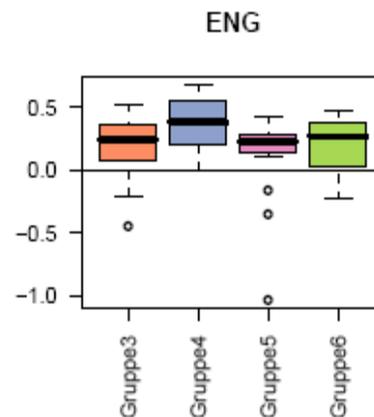
a.: Matrix-Metallopeptidase-2



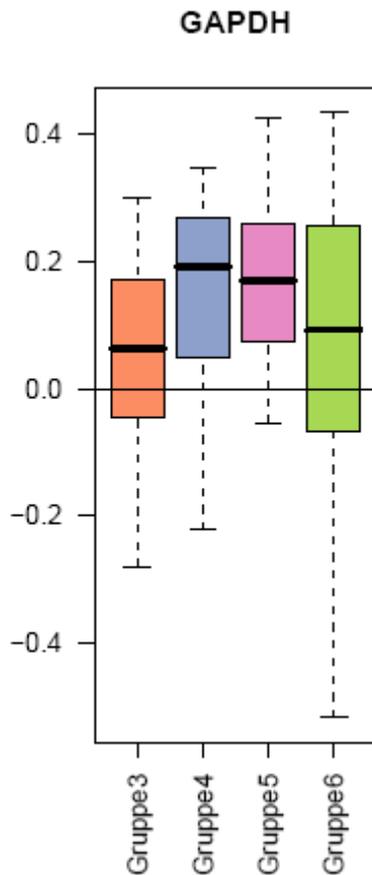
b.: Interleukin-1 β



c.: Nitric oxide synthase-2



d.: Endoglin

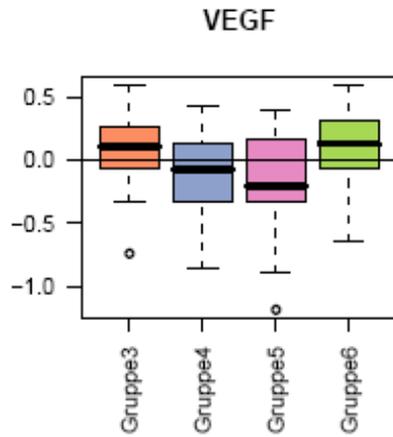


e.: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

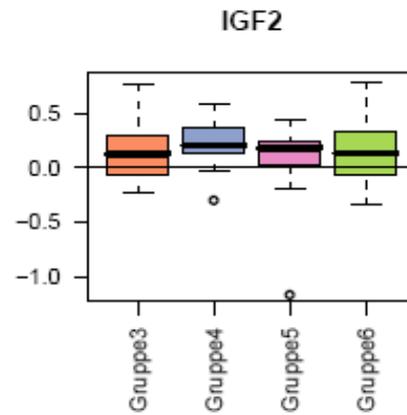
In den oben dargestellten Boxplots sind die log-fachen Veränderungen, bezogen auf die Mittelwerte der Kontrollgruppe 1/2, ersichtlich.

In den Abbildungen 11 a-m wurden die Expressionsmuster der restlichen, nicht signifikant regulierten HIF-1-Gene mithilfe von Boxplots dargestellt (Abb. 11 a-m). Auch hier sind die log-fachen Veränderungen, bezogen auf die Mittelwerte der Kontrollgruppe 1/2, zu sehen:

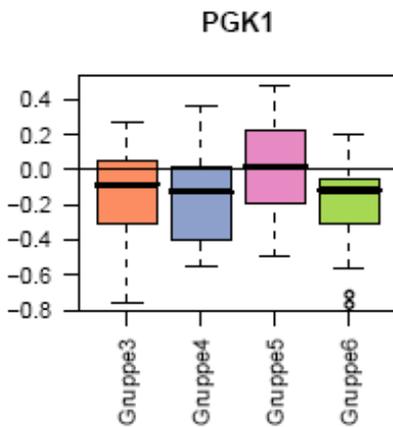
Abb. 11 a-n:



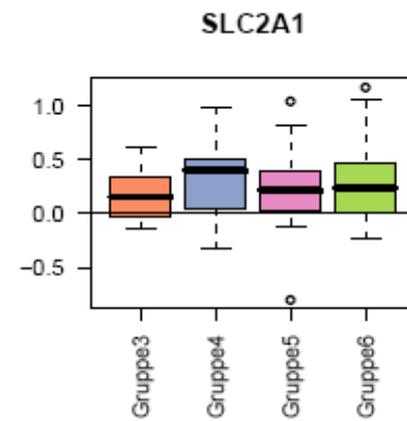
a: Vascular endothelial growth factor

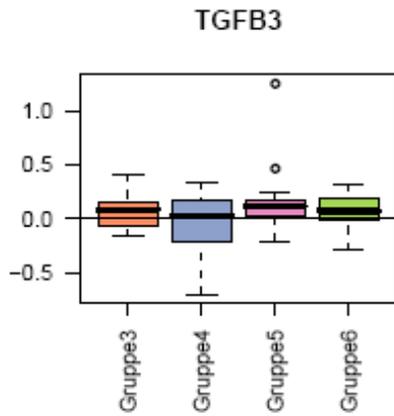
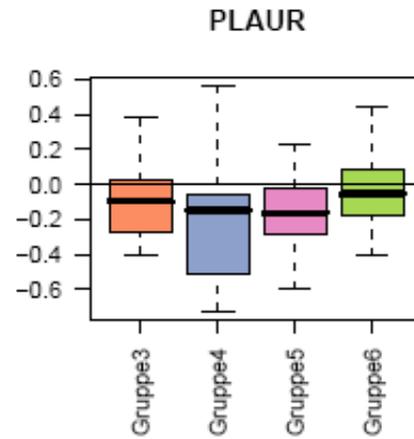


b: Insulin-like growth factor-2

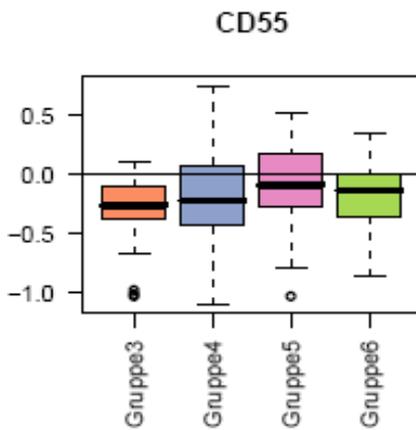


c: Phosphoglycerate kinase-1

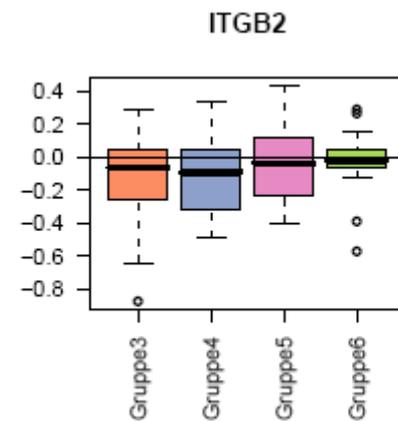
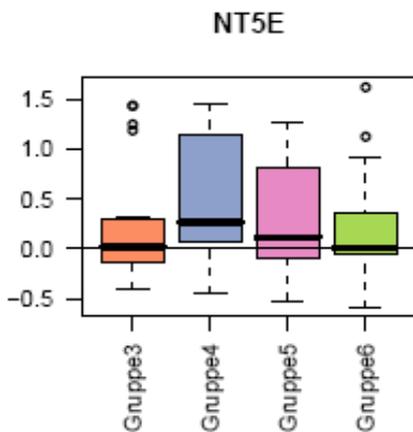
d: Solute carrier family 12/
Glukosetransporter-1

e: Transforming growth factor- β 3

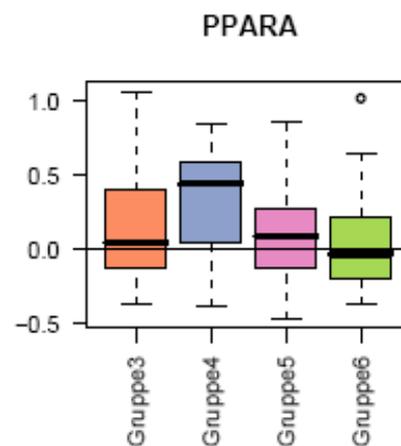
f: Urokinase plasminogen activator protein



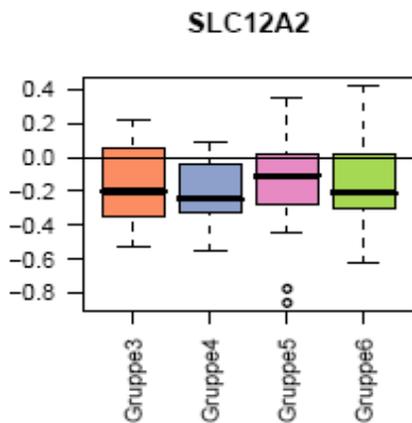
g: Decay accelerator factor for complement (cromer blood group)

h: β_2 -Integrin

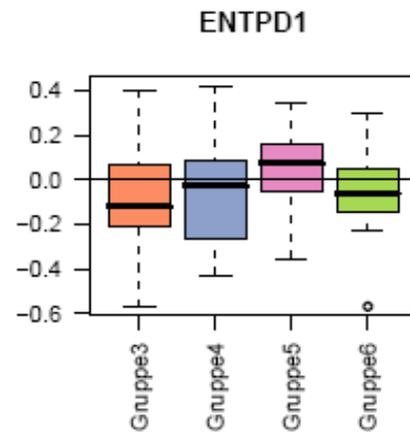
i: Ecto-5'-nucleotidase



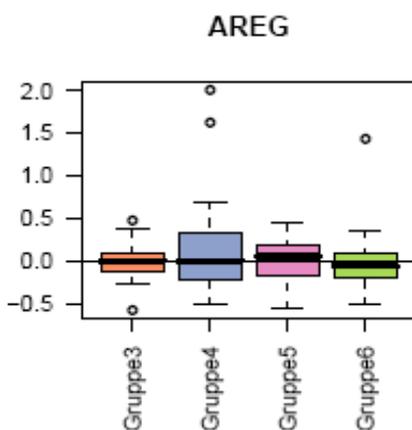
k: Peroxisome proliferator-activator regulated receptor-alpha



l: Solute carrier family 12



m: Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1



n: Amphiregulin

3.1 Vergleich Kontrollgruppe (Gruppe 1/2) versus Gruppe 3

Gruppe 3 setzte sich aus Patienten zusammen, bei denen zwar ein SIRS bzw. eine Sepsis diagnostiziert wurde, die jedoch kein Lungenversagen aufwiesen ($p_aO_2/F_iO_2 > 300$).

Die Genexpression der Gene Matrix-Metalloproteinase-2 und Interleukin-1 β wurden in Gruppe 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe 1/2 signifikant negativ reguliert. Die Genexpression der Gene nitric oxide synthase-2, Endoglin und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase hingegen wurde, wie aus den Schaubildern 10 c-e ersichtlich wird, signifikant hochreguliert.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe 1/2 wurden die nicht signifikant regulierten Gene der Patienten der Gruppe 3 vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor-2 (IGF2), Glukosetransporter-1 (SLC2A1), transforming growth factor β -3 (TGFB3), ecto-5'-nucleotidase (NT5E), und peroxisome proliferator-activator regulated receptor-alpha (PPARA) hochreguliert, die Gene phosphoglycerate kinase-1(PGK1), urokinase plasminogen activator protein (PLAUR), decay accelerator factor for complement (Cromer blood group)(CD 55), β_2 -Integrin (ITGB2), solute carrier family 12 (SLC12A2) und ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (ENTPD1) wurden reprimiert. Das Gen für Amphiregulin in der Gruppe 3 wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe 1/2 weder hoch- noch herunterreguliert.

3.2 Vergleich Kontrollgruppe (Gruppe 1/2) versus Gruppe 3 versus Gruppe 4

In Gruppe 4 wurden Patienten eingeteilt, die ein SIRS bzw. eine Sepsis aufwiesen und im Rahmen einer Pneumonie eine Einschränkung der Lungenfunktion boten ($200 < p_aO_2/F_iO_2 \leq 300$).

Auch bei dieser Patientengruppe wurden die schon bei Gruppe 3 genannten Gene MMP-2, IL-1 β signifikant negativ reguliert bzw. die Gene NOS-2, ENG und GAPDH signifikant induziert.

Bei den signifikant regulierten HIF-1-Genen konnte eine Veränderung im Expressionsmuster festgestellt werden:

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde das Gen MMP-2 in der Gruppe 4 zwar ebenfalls reprimiert, aber in einem geringeren Umfang als bei der Gruppe 3. Das Gen IL-1 β hingegen wurde noch stärker als bei der Gruppe 3 herabreguliert. Die Gene NOS-2, ENG und GAPDH zeigten in der Patientengruppe 4 eine noch stärkere Induktion als bei der Gruppe 3, bei der diese Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits induziert wurden (s. auch Abb.10).

Bei den nicht-signifikant regulierten HIF-1-Genen der Gruppe 4 konnte ebenfalls

ein verändertes Expressionsmuster beobachtet werden:

Im Vergleich zur Gruppe 3, bei der eine Induktion des Gens VEGF festzustellen war, wurde bei dieser Gruppe VEGF auch im Vergleich zur Kontrollgruppe reprimiert. Auch die Gene PGK1, PLAUR, ITGB2 und SLC12A2 wurden noch weiter herabreguliert als bei Gruppe 3. Bei den Genen IGF2, SLC2A1, NT5E und PPARA konnte eine verstärkte Transkription sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch im Vergleich zur Gruppe 3 festgestellt werden. Bei den Genen CD55 und ENTPD1 konnte zwar eine stärkere Transkription im Vergleich zur Gruppe 3 beobachtet werden, im Vergleich zur Kontrollgruppe 1/2 jedoch wurden diese Gene bei Gruppe 4 wie auch schon bei Gruppe 3 herabreguliert. Die Gene Amphiregulin (AREG) und TGFB3 zeigten auch in dieser Sepsis-Gruppe das gleiche Expressionsmuster wie das der Kontrollgruppe.

3.3 Vergleich Kontrollgruppe (Gruppen 1/2) versus Gruppe 3 versus Gruppe 4 versus Gruppe 5

Die Patienten, die in Gruppe 5 eingeteilt wurden, zeigten neben einem SIRS bzw. einer Sepsis ein Lungenversagen im Sinne eines ARDS ($p_aO_2/F_iO_2 < 200$) und einen Serumlaktatwert $> 4\text{mmol/l}$ als Ausdruck einer Gewebehypoxie.

Bei den signifikant regulierten HIF-1-Genen konnten weitere Veränderungen im Expressionsmuster beobachtet werden:

Das Gen MMP-2 wurde nicht mehr, wie in den Gruppen 3 und 4 reprimiert, sondern zeigte eine ähnliche Expression wie die der Kontrollgruppe 1/2. Das Gen IL-1 β wurde zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe herabreguliert, aber in einem geringeren Umfang als bei der Gruppe 4. Bei den Genen NOS-2, ENG und GAPDH konnte ein ähnliches Expressionsmuster wie bei der Gruppe 3 beobachtet werden: Im Vergleich zur Kontrollgruppe 1/2 wurden diese Gene zwar induziert, aber in einem geringeren Ausmaß als bei der Gruppe 4.

Bei den signifikant regulierten HIF-1-Genen der Patientengruppe 5 kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Veränderungen, verglichen mit

den Werten der Gruppe 4, wieder eine rückläufige Tendenz in Bezug auf die Werte der Kontrollgruppe 1/2 bezüglich ihrer positiven bzw. negativen Regulation hatten.

Bei den nicht signifikant regulierten HIF-1-Genen ist das Genexpressionsmuster heterogen. Das Gen VEGF in der Gruppe 5 ist im Vergleich zur Gruppe 4 und noch mehr in Bezug zur Kontrollgruppe weiter herabreguliert. Bei den Genen IGF2, SLC2A1, NT5E und PPARA wurden die Gene wie bei den oben beschriebenen Genen NOS-2, ENG und GAPDH zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe induziert, jedoch in einem geringeren Umfang als bei Gruppe 4. Die Gene PGK1, TGFB3 und ENTPD1 zeigten im Vergleich zur Gruppe 4 eine stärkere Transkription, so dass im Falle von PGK1 ähnliche Expressionswerte und bei ENTPD1 sowie TGFB3 sogar erhöhte Werte, bezogen auf die Werte der Kontrollgruppe, erreicht wurden. Die Gene CD55, ITGB2 und SLC12A2 wurden zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe reprimiert, jedoch in einem geringeren Ausmaß als bei Gruppe 4. Das Gen Amphiregulin (AREG) wurde auch in dieser Gruppe nicht reguliert und zeigte ähnliche Expressionswerte wie in der Kontrollgruppe. Das Gen PLAUR aus der Gruppe 5 wurde etwa in demselben Masse wie in der Gruppe 4 herabreguliert.

Bei der Betrachtung dieser Gene kann ebenfalls festgestellt werden, dass, mit Ausnahme des Gens VEGF, die Veränderungen in der Patientengruppe 5 in Bezug zur Kontrollgruppe im Sinne einer erhöhten bzw. verminderten Transkription wieder rückläufig waren und somit eher dem Expressionsmuster in der Kontrollgruppe 1/2 entsprachen.

3.4 Vergleich Kontrollgruppe (Gruppen 1/2) versus Gruppe 3 versus Gruppe 4 versus Gruppe 5 versus Gruppe 6

Gruppe 6 enthielt Patienten, die eine Sepsis aufgrund einer Peritonitis entwickelten. Bei diesen Patienten wurde versucht, die Inflammation und nicht die Hypoxie in den Vordergrund zu stellen, so dass Patienten ausgewählt wurden, die trotz ihrer Peritonitis eine gute Lungenfunktion boten ($p_aO_2/F_iO_2 >$

300). Die Fragestellung bei dieser Patientengruppe war, ob auch bei Sepsis-Patienten, die keine Einschränkung der Lungenfunktion boten, d.h. weder beatmet werden mussten noch eine Hypoxie zeigten, die HIF-1-Gene induziert, reprimiert bzw. nicht reguliert wurden.

Bei Betrachtung der signifikant regulierten HIF-1-Gene konnte bei MMP-2 und IL-1 β beobachtet werden, dass diese Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe herabreguliert wurden, so dass ähnliche Werte wie bei Gruppe 3 erreicht wurden. Bei den Genen NOS-2, ENG und GAPDH konnte eine Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, wobei das Gen NOS-2 im Vergleich zur Gruppe 5 vermehrt induziert wurde und die Gene ENG und GAPDH im Vergleich zur Gruppe 5 weniger hochreguliert wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Genexpression der signifikant regulierten HIF-1-Gene bei Gruppe 6 ähnliche Werte erreichte wie die Genexpression der Gruppe 3 (Patienten mit SIRS/Sepsis ohne Einschränkung der Lungenfunktion).

Bei den nicht signifikant regulierten HIF-1-Genen verhielt es sich in ähnlicher Weise: VEGF wurde wie auch in der Gruppe 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe induziert im Gegensatz zum Expressionsmuster der Gruppen 4 und 5, bei denen VEGF im Vergleich zur Kontrollgruppe reprimiert wurde. Bei IGF2, TGFB3, NT5E und PPARA konnte eine Reduktion der Geninduktion im Vergleich zur Gruppe 5 beobachtet werden. Das Gen SLC2A1 zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie in der Gruppe 5. Die Gene PLAUR und ITGB2 wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe herabreguliert, jedoch in einem geringeren Ausmaß als bei der Gruppe 5. Die Gene SLC12A2, PGK1, CD55 und ENTPD1 wurden sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch im Vergleich zur Gruppe 5 weiter reprimiert. Auch in dieser Gruppe wurde Amphiregulin (AREG) weder nennenswert induziert noch herabreguliert und fand sich damit in allen Sepsis-Patientengruppen auf dem Expressionsniveau der Kontrollgruppe 1/2.

4. Diskussion

4.1 Aktivierung von HIF-1 in der Sepsis

Die pathologischen Elemente der im Rahmen einer Sepsis induzierten Aktivierung des Immunabwehrsystems können zu erheblichen Auswirkungen auf das kardio-zirkulatorische System und zu direkten Zell- bzw. Organschädigungen führen (Burchardi et al., 2001). Dabei kommt es über die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren und über die Genexpression leukozytärer Adhäsionsmoleküle wie z.B. intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) oder P-Selektin und die Bildung vasoaktiver Mediatoren zu Störungen der Endothelfunktion, der nutritiven Perfusion sowie der zellulären Integrität der Mikrostrombahn (Bauer and Reinhart, 2004). ICAM-1 und P-Selektin führen zur Akkumulation der bei Sepsis aktivierten neutrophilen Leukozyten, die durch mechanische Flussbehinderung oder Freisetzung zytotoxischer Mediatoren zur Aggravation der Mikrozirkulationsstörungen beitragen können. Diese primären Störungen der Mikrozirkulation werden verstärkt durch einerseits Störungen der Sauerstoffaufnahme z.B. bei septischem ARDS sowie durch Störungen des konvektiven Transports von Sauerstoff von der Lunge zu den Geweben im Rahmen von Makrozirkulationsstörungen, die sich z.B. auf dem Boden einer septischen Kardiomyopathie oder auch im Rahmen regionaler Verteilungsstörungen entwickeln. Daneben können Entzündungsmediatoren eine direkte Störung der Sauerstoffutilisation durch die Zelle infolge einer mitochondrialen Dysfunktion bewirken, die möglicherweise die Einschränkung des Sauerstoffangebots infolge von Makro- und Mikrozirkulationsstörungen aggraviert. Alle Mechanismen münden in eine deletäre Endstrecke der hypoxischen zellulären Schädigung, die je nach Ausmaß der Depletion energiereicher Phosphate einerseits den nekrotischen oder andererseits apoptotischen Zelltod initiieren kann.

Im Rahmen der zellulären Hypoxie ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 als einer der wichtigsten Regulatoren der Sauerstoff-Homöostase zu verstehen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray-

Experimenten jedoch zeigte sich ein heterogenes Bild der Aktivierung der HIF-1-regulierten Gene. Drei der fünf signifikant regulierten Gene, nämlich nitric oxide synthase-2 (NOS-2), Endoglin (ENG) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden induziert, die Transkription der Gene Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) und Interleukin-1 β (IL-1 β) jedoch war, verglichen mit den Kontrollgruppen, signifikant vermindert.

Interessant ist, dass bei den signifikant regulierten Genen die Kontrollen in der dargestellten Heatmap einen eigenen Subcluster bildeten, dass die Sepsis-Gruppen jedoch nicht voneinander zu unterscheiden waren. Dies könnte für die Hypothese sprechen, dass HIF-1 auch im Rahmen einer Sepsis induziert wird, ohne dass eine Hypoxie besteht. Denkbar ist auch ein Zusammenspiel zwischen HIF-1 und NF- κ B, einem der wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression bei Inflammation und Sepsis regulieren. Diese Vermutung wird durch eine Arbeit von Frede et al. bestätigt, in der es Hinweise dafür gibt, dass in Monozyten und Makrophagen die p42 und p44 mitogen-activated protein kinases (p42/44 MAPK) durch bakterielle Lipopolysaccharide über Phosphorylation aktiviert wird und so auch in normoxischen Zellen zu erhöhten HIF-1-Konzentrationen führt. Die Aktivität des HIF-1-Promotors wurde dabei dosisabhängig auch bei Normoxie durch die Lipopolysaccharide angeregt. Innerhalb dieses Promotors konnte eine Bindungsstelle für NF- κ B identifiziert werden (Frede et al., 2006). Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass HIF-1 auch unter normoxischen Bedingungen im Rahmen eines septischen Geschehens z.B. durch NF- κ B induziert werden kann. Vergleicht man die HIF-1-regulierten Gene dieser Arbeit der Gruppe 3 (Sepsis-Patienten ohne Lungenversagen) mit der Gruppe 6 (Peritonitis-Patienten ohne Lungenversagen), so findet man in Bezug zur Kontrollgruppe 1/2 ein nahezu identisches Expressionsverhalten, was als experimentelle Bestätigung dieser Hypothese interpretiert werden kann. Möglicherweise werden über diesen Mechanismus z.B. Monozyten auf die hypoxischen Bedingungen vorbereitet, die nach ihrer Extravasation aus den Gefäßen im entzündeten Gewebe vorherrschen (van der Bruggen et al., 1999; Chu et al., 2001).

Makrophagen und neutrophile Granulozyten produzieren das von ihnen benötigte ATP auch unter normoxischen Bedingungen durch Glykolyse. Diese Glykolyse ist entscheidend von der Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 abhängig. Makrophagen, in denen das Gen für HIF-1 eliminiert wurde, zeigten erniedrigte ATP-Konzentrationen und den Verlust der Fähigkeit zur Chemotaxis, Aggregation, Invasion in entzündetes Gewebe und zur Phagozytose des aufgenommenen Materials (Cramer et al., 2003).

Peyssonnaud et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass HIF-1 α auch bei Normoxie durch Bakterien bzw. durch Lipopolysaccharide stabilisiert wird. Des Weiteren fanden sie in Makrophagen, in denen das HIF-1-Gen ausgeschaltet wurde, signifikant reduzierte Konzentrationen von IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-12 und folgerten daraus, dass HIF-1 entscheidend bei der Expression wichtiger Zytokine, die eine Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielen, beteiligt ist (Peyssonnaud et al., 2007).

Auch Blouin et al. entdeckten in normoxischen Makrophagen nach Lipopolysaccharid-Stimulation eine Steigerung der Transkription von HIF-1 (Blouin et al., 2004).

Kempf et al. fanden, dass eine bakterielle Infektion z.B. durch *Bartonella henselae* durch gesteigerten Sauerstoffverbrauch direkt in der Wirtszelle zu einer Aktivierung von HIF-1 führt (Kempf et al., 2005).

Als erwiesen gilt, dass TNF- α oder auch Interleukin-1 β selbst die Translation von HIF-1 zusätzlich aktivieren können (Frede et al., 2005; Zhou et al., 2004). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zahlreiche weitere Mechanismen existieren, die eine Erklärung für die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit sein könnten, dass HIF-1 bei einer Sepsis auch ohne Vorliegen einer Hypoxie induziert wird.

4.2 Expression der HIF-1-regulierten Gene in der Sepsis

In der Zeit von 2002 bis 2004 wurden die Expressionsdaten von 5268 humanen, inflammationsrelevanten Genen von 86 Patienten der Intensivstationen des Universitätsklinikums Jena untersucht. In dieser Arbeit wurde speziell auf die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 bei Sepsis-Patienten eingegangen.

Die Transkription von fünf durch HIF-1-regulierten Genen zeigte sich in dieser Studie signifikant verändert, auf die im Folgenden näher eingegangen wird: Matrix-Metallopeptidase-2, Interleukin-1 β , nitric oxide synthase-2, Endoglin und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

4.2.1 Matrix-Metallopeptidase-2 (MMP-2)

Im Rahmen des acute respiratory distress syndrome (ARDS) kommt es zu einer exzessiven Freisetzung von Proteasen, Antiproteasen sowie von freien Radikalen. Hohe MMP-2-Konzentrationen konnten in den durch bronchioalveoläre Lavage gewonnenen Proben von ARDS-Patienten gefunden werden (Lanchou et al., 2003; Torii et al., 1997). Des Weiteren wurden erhöhte MMP-2-Konzentrationen in der bronchioalveolären Flüssigkeit von an Pneumonie erkrankten Patienten festgestellt (Qu et al., 2000).

Corbel et al. entdeckten in der bronchioalveolären Flüssigkeit von Mäusen nach Verabreichung von Lipopolysacchariden als Aerosol in der akuten Entzündungsphase eine um das 1,5-fach erhöhte MMP-2-Konzentration sowie im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion nach 26 Wochen eine um das 2-fach erhöhte MMP-2-Konzentration (Corbel et al., 2001).

In einer weiteren Studie wurden bei gesunden Versuchspersonen nach der venösen Verabreichung von bakteriellen Lipopolysacchariden zwar ein Anstieg der MMP-9-, jedoch kein Anstieg der MMP-2-Konzentrationen festgestellt (Albert et al., 2003).

MMP-9 wird von Entzündungszellen wie z.B. von Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten produziert. Die Produktion wird durch Zytokine

wie z.B. Interleukin-1 und TNF- α aktiviert. MMP-2 hingegen wird von Gewebszellen wie z.B. Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen konstitutiv sezerniert. Die Aktivierung der MMP-2-Transkription erfolgt durch aktiviertes Protein C (APC) und Thrombin sowie eine indirekte Aktivierung über die Aktivierung von membran-type-MMP-1 durch die von polymorphkernigen Neutrophilen produzierten Enzyme Elastase, Cathepsin und Proteinase-3 und ferner durch Hydrogenperoxid, Lipopolysacchariden und den hepatocyte growth factor.

Bei Sepsis-Patienten konnten keine erhöhten MMP-2-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten gefunden werden, während die Plasmakonzentrationen von MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 signifikant erhöht waren (Hoffmann et al., 2006).

Dieses Ergebnis konnte mit den in dieser Arbeit festgestellten Expressionswerten untermauert werden: Bei Sepsis-Patienten, die kein bzw. ein leicht ausgeprägtes Lungenversagen aufwiesen, waren die MMP-2-Konzentrationen niedriger als die der Kontrollpatienten, wohingegen sich die Expressionsmesswerte der MMP-2-Konzentrationen der Kontrollpatienten und der Sepsis-Patienten mit einem fulminanten Lungenversagen ähnelten. Offenbar fand eine Induktion von MMP-2 bei den an Sepsis erkrankten Patienten nicht statt. Dies könnte damit zusammenhängen, dass im Gen für MMP-2 keine Bindungsstellen für proinflammatorische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1, existieren (Chakrabarti and Patel, 2005). Ein weiterer Erklärungsansatz hängt mit dem Ort der Induktion zusammen: Möglicherweise wird MMP-2 durch HIF-1 bei inflammatorischen Prozessen der Lunge nicht in den Zellen der Blutstrombahn, wohl aber im Lungengewebe induziert; eventuell hätte eine Induktion von MMP-2 in Proben, die durch bronchioalveoläre Lavage gewonnen wurden, beobachtet werden können.

4.2.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Die Mediatorfreisetzung wird häufig durch Endotoxin, das bei durch gramnegative Bakterien induzierter Sepsis gefunden wird, ausgelöst. Enterotoxin, „toxic-shock-syndrome“-Toxin-1, Zellwandbestandteile von grampositiven Bakterien oder Pilzen sowie virale Antigene oder Pilzantigene können ebenfalls die Mediatorkaskade in Gang setzen. Auch nichtinfektiöse Stimuli, wie sie z.B. bei der schweren nekrotisierenden Pankreatitis auftreten, lösen die gleiche physiologische Reaktion aus. Diese primären Trigger setzen kaskadenhaft weitere Mediatoren frei: Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) werden u. a. von Makrophagen und Endothelzellen freigesetzt (Burchardi et al., 2001).

Interleukin-1 β zählt zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen, die wie z.B. auch TNF- α bei Sepsis vermehrt exprimiert werden.

IL-1 β und TNF- α werden 30-90 Minuten nach Lipopolysaccharid-Exposition ausgeschüttet (Cohen, 2002). Beide Zytokine wurden in der bronchioalveolären Flüssigkeit von an ARDS erkrankten Patienten gefunden (Park et al., 2001).

In einer von Bhatia et al. durchgeführten Studie waren die IL-1 β -Konzentrationen bei denjenigen Patienten am höchsten, die ein anhaltendes ARDS aufwiesen (Bhatia et al., 2004).

Im Gegensatz zu den aufgeführten Studien war in dieser Arbeit die Expression von Interleukin-1 β im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant reprimiert.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sich die Sepsis-Patienten in einer Phase der Repression der Zytokinausschüttung befanden, die im Anschluss an eine initiale Aktivierungsphase auftreten kann. Diese Phase beginnt unter Umständen bereits drei bis fünf Stunden nach dem Auftreten des initialen „Zytokinsturms“. Üblicherweise dauert diese Phase der Repression bei SIRS-Patienten über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden an. Die Unterdrückung der Expression der proinflammatorischen Gene kann jedoch z.B. bei Leukozyten, die sich im Blutkreislauf befinden, viele Tage bzw. Wochen anhalten (McCall and Yoza, 2007).

Ein weiterer Grund für die verminderte Expression des IL-1 β bei den Sepsis-Patienten im Gegensatz zu der Kontrollgruppe könnte sein, dass die Kontrollgruppe dieser Studie aus Patienten zusammengesetzt war, die sich einer größeren elektiven Operation unterzogen haben und zur postoperativen Beobachtung bzw. kurzzeitigen Nachbeatmung auf die Intensivstation aufgenommen wurden. Baigrie et al. wiesen nämlich mit sehr engmaschigen perioperativen Probeentnahmen einen sehr frühen und kurzen IL-1 β -Anstieg nach einem chirurgischen Eingriff nach (Baigrie et al., 1992).

So kann vermutet werden, dass es bei der Kontrollgruppe auch zu einer vermehrten Expression von IL-1 β gekommen ist und hierdurch das erwartete Ergebnis überlagert wurde.

4.2.3 Nitric oxide synthase-2 (NOS-2/iNOS)

Entsprechend einer Vielzahl von Studien wurden auch in dieser Arbeit bei septischen Patienten signifikant erhöhte NOS-2-Expressionswerte gefunden (Gomez-Jimenez et al., 1995; Wong et al., 1996; Payen et al., 1996).

Das Zytokin TNF- α , das ebenfalls in dieser Studie mitbestimmt wurde, war im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls hochreguliert. Stickstoffmonoxid (NO), das in Makrophagen bakterizide Wirkung aufweist, wird durch die nitric oxide synthase-2 produziert, die unter anderem durch HIF-1 reguliert wird. NO wiederum ist in der Lage, die Produktion von TNF- α zu stimulieren. Wird die Bildung von NO supprimiert, folgt eine Hemmung der durch Lipopolysaccharide getriggerten Freisetzung von TNF- α und Interleukin-1 (Wu, 2003). Die Produktion von TNF- α in Makrophagen ist also unter anderem von der NO-Konzentration abhängig und diese wiederum von der HIF-1-regulierten NOS-2. Es besteht also ein enges Zusammenspiel verschiedener Mediatoren mit sich selbst verstärkenden Mechanismen.

Ein weiterer positiver Feedback-Mechanismus besteht in der Hemmung der Aktivität der Prolylhydroxylasen durch NO, so dass eine Hydroxylierung der Prolinreste von HIF-1 α sowie dessen nachfolgende Ubiquitination und

Degradation ausbleibt, was zu einer erhöhten HIF-1 α -Konzentration führt (Zinkernagel et al., 2007).

4.2.4 Endoglin (ENG)

In einer von Torsney et al. durchgeführten Studie wurden stark erhöhte Endoglin-Expressionswerte in entzündetem Gewebe gefunden wie z.B. in entzündeten Hautwunden, begleitet von einem Infiltrat aus Entzündungszellen wie z.B. Makrophagen und T-Zellen. Hohe Expressionswerte wurden auch in den Gefäßendothelzellen bei Leberzirrhose festgestellt, wobei in den Gefäßen der gesunden Leber kein Endoglin nachweisbar war.

In gesundem Lungengewebe hingegen konnten in den Alveolargefäßen bereits signifikante Endoglin-Konzentrationen gefunden werden, deren Werte in entzündetem Gewebe, wiederum begleitet von Infiltraten aus Entzündungszellen, weiter anstiegen (Torsney et al., 2002).

Auch in dieser Arbeit wurden entsprechend den oben genannten Ergebnissen erhöhte Expressionswerte von Endoglin bei Sepsis-Patienten, im Vergleich zu den Kontrollpatienten gefunden. Vergleichbare Daten fehlen, da es bisher keine Arbeiten gab, die, wie in dieser Studie geschehen, die Endoglin-Expression bei Sepsis untersuchten. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass mit zunehmender Schwere der Erkrankung die Infektionsorte zunehmen, so dass sich auf diese Weise die erhöhten Endoglin-Expressionswerte erklären lassen.

4.2.5 Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei zunehmender Erkrankungsschwere steigende Expressionswerte für GAPDH festgestellt. Gruppe 4 dieser Studie bestand aus Patienten, die an einem SIRS bzw. einer Sepsis litten und wegen eines mittelgradig ausgeprägten Lungenversagens aufgrund einer Pneumonie beatmet werden mussten ($200 < p_aO_2/F_iO_2 \leq 300$) und Gruppe 5 aus Patienten, die neben einem SIRS bzw. einer Sepsis ein manifestes Lungenversagen im

Sinne eines ARDS ($p_aO_2/F_iO_2 < 200$) boten. Um dabei Patienten mit zusätzlich signifikanter Gewebhypoxie zu selektieren, wurde ein Laktatwert > 4 mmol/l als zusätzlicher Parameter gefordert.

Zellen sind bei vermindertem Sauerstoffangebot nicht mehr in der Lage, ATP durch die sauerstoffabhängige oxidative Phosphorylation, die in den Mitochondrien stattfindet, zu produzieren, sondern stellen ATP durch die von Sauerstoff unabhängige Glykolyse, die im Zytoplasma stattfindet, her. GAPDH fungiert als ein wesentliches Enzym der Glykolyse, weshalb sich die gefundenen Ergebnisse auch im Hinblick darauf, dass GAPDH durch HIF-1 induziert wird, gut verstehen lassen.

4.2.6 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Verschiedene Studien belegen, dass bei Vorliegen eines SIRS bzw. einer Sepsis die Expression von VEGF hochreguliert wird (van der Flier et al., 2004; Yano et al., 2006). Dabei korrelierten erhöhte VEGF-Plasmakonzentrationen mit der Schwere der Erkrankung und Nonsurvivor zeigten höhere Plasmakonzentrationen als Survivor.

Von diesen Ergebnissen abweichend wurden in dieser Arbeit bei schwer erkrankten Sepsis-Patienten erniedrigte Expressionswerte von VEGF im Vergleich zu weniger schwer erkrankten Patienten respektive der Kontrollgruppe festgestellt. Neben HIF-1 wird VEGF auch durch proinflammatorische Mediatoren wie z.B. durch Interleukin-1 β induziert (Jung et al., 2001). Möglicherweise hängt das in dieser Arbeit gefundene Expressionsmuster von VEGF mit der ebenfalls verminderten Induktion von IL-1 β in dieser Untersuchung zusammen.

Interessanterweise fanden sich in der Arbeit von Yano et al. zwar bei Mäusen, denen Lipopolysaccharide verabreicht wurden, erhöhte Expressionswerte für VEGF, jedoch nicht bei Mäusen, die eine isolierte Pneumonie aufwiesen (Yano et al., 2006).

Weiteren Aufschluss über die Expression von VEGF in der Sepsis könnte eine

Untersuchung liefern, bei der die Expression des VEGF-Gens zwischen Sepsis-Patienten mit hochakuter Bakteriämie (d.h. Patienten, die einen raschen und hohen Fieberanstieg aufzeigen) und Sepsis-Patienten in einem weniger akuten Sepsisstadium verglichen wird sowie der Vergleich von Patienten mit schwerer Sepsis, aufgeteilt in eine Survivor- und eine Nonsurvivor-Gruppe.

4.2.7 Weitere nicht signifikant regulierte HIF-1-Gene

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe waren die Expressionswerte des Wachstumsfaktors insulin-like growth factor-2 (IGF-2) erhöht. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der bei Sepsis auftretenden Insulinresistenz und dem erhöhten Insulinbedarf.

Zellen, die Insulin, IGF-1 oder IGF-2 exponiert waren, exprimierten vermehrt HIF-1; umgekehrt induzierte der Transkriptionsfaktor HIF-1 die Expression der Gene für IGF-2 und der IGF-bindenden Proteine IGFBP-2 und IGFBP-3 (Feldser et al, 1999).

Die Expressionswerte des Glukosetransporter-1-Gens waren im Vergleich zu der Kontrollgruppe ebenfalls erhöht. Dieses Ergebnis geht einher mit den Arbeiten von Zeller et al. (Zeller et al., 1994) und Bateman et al. (Bateman et al., 2007), die ebenfalls in ihren Arbeiten bei Mäusen, denen Endotoxin verabreicht wurde, eine erhöhte Expression des Glukosetransporter-1-Gens fanden. Dieses Ergebnis lässt sich aus der Tatsache heraus erklären, dass durch die verminderte ATP-Ausbeute bei der Glykolyse (zwei Moleküle ATP bei der anaeroben Glykolyse anstatt 38 Moleküle ATP bei der oxidativen Phosphorylierung pro Glukose-Molekül) vermehrt Glukose in die Zelle aufgenommen werden muss, um ausreichend ATP herstellen zu können.

Die Expression weiterer nicht signifikant regulierter Gene war, verglichen mit der Kontrollgruppe, nicht nennenswert verändert: Der Rezeptor für den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator, das Glykolyse-Enzym Phosphoglyceratkinase, der Wachstumsfaktor transforming growth factor- β 3 und der decay accelerating factor (DAF/CD55), der auf der apikalen Membran

des Schleimhautepithels exprimiert wird und eine wichtige Rolle beim Erhalt der Barrierefunktion des Schleimhautepithels spielt. Ferner β_2 -Integrin, ein Adhäsionsrezeptor, der aus einem an der Zelloberfläche exprimiertem Glykoprotein besteht, das an der Bindung von Lipopolysacchariden beteiligt ist (van Amersfoort et al., 2003) und die Ecto-Nucleotidase CD39, die ATP und ADP in AMP, sowie die Ecto-5'-Nucleotidase CD73, die AMP in Adenosin umwandelt. Ebenso war dies der Fall für das HIF-1-regulierte Gen, das für den Transkriptionsfaktor peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPARA) kodiert, der 80-100 Gene reguliert, die beim Fettmetabolismus, bei der Fettoxidation sowie bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen (Ahmed et al., 2007) sowie das Gen solute carrier family 12 (SLC12A2), das für einen elektroneutralen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter kodiert, der ubiquitär exprimiert wird und in die Regulation des Zellvolumens involviert ist (Hebert et al., 2004). Auch das Gen für Amphiregulin, ein Glykoprotein, das die Zellproliferation fördert und für die Wundheilung und Tumorentstehung einen wichtigen Faktor darstellt, war bei den Sepsis-Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant reguliert.

4.3 Kritische Betrachtung der Messergebnisse

Eine Schwierigkeit in der Beurteilung der Expressionsdaten dieser Arbeit ist die Tatsache, dass die untersuchten Gene nicht allein durch HIF-1 reguliert werden. Bei der Matrix-Metalloproteinase-2 konnte nachgewiesen werden, dass sie durch Typ I-Kollagen (Zucker et al., 2004), aktiviertes Protein C (Nguyen et al., 2000), und Thrombin (Nguyen et al., 1999) aktiviert wird. Interleukin- 1β und VEGF werden neben HIF-1 auch durch den Transkriptionsfaktor nuclear factor- κB (NF- κB) induziert (Pahl, 1999). Ebenfalls durch NF- κB , sowie durch AP-1, NF-IL-6, interferon response elements, γ -activated sites und TNF- α -response elements (Titheradge, 1998) und durch IL- 1β (Perrella, 1996) wird die nitric oxide synthase-2 reguliert. Der Transkriptionsfaktor NF- κB induziert weiterhin auch Endoglin (Ruis et al., 1998) wie auch der Wachstumsfaktor transforming

growth factor- β 1 (Botella et al., 2001). Die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase wird neben HIF-1 ebenfalls durch Insulin (Nasarin et al., 1990) und durch Interleukin-2 (Sabath et al., 1990) aktiviert.

Hinzu kommt, dass neben HIF-1 zahlreiche Transkriptionsfaktoren existieren, die durch zelluläre Hypoxie aktiviert werden (Cummins and Taylor, 2005):

Der nuclear factor- κ B (NF- κ B) gilt als der wichtigste Transkriptionsfaktor der inflammatorischen Reaktion. NF- κ B wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli aktiviert, wie z.B. durch Hypoxie, aber auch durch Zytokine (TNF- α , IL-1), bakterielle Lipopolysaccharide und ultraviolette Strahlung. Zu den Mitgliedern der NF- κ B/Rel Familie zählen p65, cRel, RelB, p50 und p52, die untereinander Homo- bzw. Heterodimere bilden. Das am häufigsten vorkommende Heterodimer besteht aus der p50/p65-Untereinheit und kommt in inaktiver Form im Cytosol vor, wo es an das Repressormolekül I κ B gebunden ist, wodurch die Kernlokalisierungssequenz maskiert wird. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors erfolgt durch die Phosphorylierung von zwei Serinresten von I κ B, welches dann durch eine E3-Ubiquitin-Ligase ubiquitinyliert und analog zu HIF-1 α durch das 26S-Proteasom degradiert wird. Als Folge dessen wird die Kernlokalisierungssequenz von NF- κ B freigegeben, welches in den Nucleus transloziert wird. Dort bindet der Transkriptionsfaktor an den Promotor zahlreicher Zielgene und initiiert deren Transkription. Zielgene umfassen zahlreiche Zytokine, Immunorezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Akute-Phase-Proteine, Wachstumsfaktoren und antiapoptotische Gene.

Das cyclic AMP response element binding protein (CREB) ist ein Transkriptionsfaktor, der durch intrazelluläres cAMP und Ca²⁺ reguliert wird und bereits bei Vorliegen einer milden Hypoxie aktiviert wird. Zielgene dieses Transkriptionsfaktors beinhalten solche, die für Inflammation, Zellmetabolismus und Signaltransduktion verantwortlich gemacht werden.

Activating protein-1 (AP-1) ist in diverse zelluläre Funktionen wie Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Katecholaminsynthese, Inflammationsreaktionen und Angiogenese involviert. AP-1 wird durch Hypoxie, Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine und ultraviolette Strahlung aktiviert. AP-1

ist z.B. an der Induktion von VEGF, Tyrosinhydroxylase und endothelial NOS (eNOS) beteiligt und interagiert mit Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 und NF- κ B und katalysiert die hypoxie-induzierte Genexpression durch die Interaktion mit diesen Faktoren.

p53 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der Zellzyklus und Apoptose reguliert. p53 wird durch zahlreiche Faktoren wie ultraviolette Strahlung, DNA-Schäden, Hitzeschock und Hypoxie aktiviert und induziert zahlreiche proapoptotische Gene wie z.B. Bax, Bid, PUMA und Apaf-1. HIF-1 ist in der Lage, die proteosomale Degradation von p53 zu verhindern und so dessen Stabilisation zu bewirken.

Die specificity proteins SP-1 und SP-3 gehören zu den Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Housekeeping-Genen, aber auch von Genen wie EPO und VEGF, die ebenfalls durch HIF-1 induziert werden, regulieren. SP1/SP3 katalysieren bei schwerer Hypoxie die HIF-1-getriggerte Geninduktion.

Die Transkriptionsfaktoren Egr-1, NF-IL6/EBP β , RTEF-1, GATA-2, STAT5, Mash-2, GADD153/CHOP-10 werden ebenfalls bei Hypoxie aktiviert, da es den Rahmen dieser Arbeit jedoch sprengen würde, werden diese nicht weiter ausgeführt.

Die Heterogenität im Aktivierungsmuster der HIF-1-regulierten Gene kann auch dadurch verstärkt worden sein, dass die Versuche in einem Zeitraum von zwei Jahren zwischen 2002 und 2004 durchgeführt wurden. Experimente mit Microarrays enthalten zahlreiche potenzielle Fehlerquellen. Bereits die Präparation der zellulären mRNA ist ein kritischer Schritt der Untersuchung, da diese zum Beispiel degradieren kann oder Fehler beim Markieren der hergestellten cDNA mit den fluoreszierenden Nukleotiden auftreten können. Es könnte sein, dass dadurch das Versuchsergebnis nicht die In-vivo-Situation widerspiegelt. Weitere Fehlerquellen können bei der Hybridisierung oder beim Scannen der Arrays auftreten. Die Verwendung von verschiedenen Chargen von RNA Kits, Fluoreszenzfarbstoffen und Puffersystemen über den langen Zeitraum von zwei Jahren hinweg kann, bei der enormen Empfindlichkeit des Systems, zu Messungenauigkeiten zum Beispiel bei der Spotdetektion und der

Spotquantifizierung geführt haben.

Neben proinflammatorischen Mediatoren werden bei kritisch kranken Patienten phasenweise auch antiinflammatorische Mediatoren produziert, um einer überschießenden Entzündungsreaktion vorzubeugen (Bone, 1996). Kommt es zu einem Überwiegen der inflammatorischen Reaktion, treten die Zeichen des systemic inflammatory response syndrome (SIRS) auf: Hypotension, Tachykardie, Veränderungen der Körpertemperatur (Hyper- oder Hypothermie), Störungen der Mikrozirkulation und eine Aktivierung des Energiestoffwechsels (Hypermetabolismus). Diese Zeichen werden auch als „Flow-Phase“ der metabolischen Reaktion auf schwere Erkrankungen bezeichnet. Persistiert die überschießende proinflammatorische Reaktion, kann sich ein multiple organ dysfunction syndrome (MODS) entwickeln, das eine hohe Mortalität aufweist. Ist hingegen die antiinflammatorische Reaktion stärker ausgeprägt, liegt ein compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS) vor, das durch Immunsuppression und deshalb durch erhöhte Infektanfälligkeit im Sinne einer Anergie gekennzeichnet ist.

Dieses Phänomen könnte ein Erklärung dafür sein, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HIF-1-regulierten Gene in einigen Fällen eine Induktion bei weniger kritisch kranken Sepsis-Patienten ohne Lungenversagen zeigten, während bei Patienten mit schwerer Sepsis, die ein klinisch manifestes Lungenversagen im Sinne eines ARDS boten, die Expression dieser Gene unterdrückt war. Dies traf für die folgenden HIF-1-regulierten Gene zu: Nitric oxide synthase-2 und peroxisome proliferator-activated receptor- α .

Um das uneinheitliche Aktivierungsmuster der Expression der HIF-1-regulierten Gene zu erklären, könnte eine weiterführende Untersuchung mit der Fragestellung sinnvoll sein, ob es einen Unterschied im Outcome der Patienten gibt, je nachdem, ob bei ihnen die HIF-1-regulierten Gene aktiviert wurden oder nicht. Dazu könnten die Patienten, deren Expressionsdaten bereits in dieser Studie gemessen wurden, in Survivor und Nonsurvivor eingeteilt und die Daten daraufhin untersucht werden, ob es einen signifikanten Unterschied in der Expression der HIF-1-regulierten Gene zwischen diesen Gruppen gibt.

Auch die initiale Phase nach elektiven Operationen ist gekennzeichnet von einer systemischen proinflammatorischen Inflammation (SIRS) (Hildebrand et al., 2005). Die Aufnahme von Patienten, die nach einem größeren chirurgischen Eingriff zur Beobachtung auf die Intensivstation aufgenommen wurden, so wie in dieser Studie geschehen, könnte daher problematisch sein. Klarheit könnte diesbezüglich geschaffen werden, wenn als Kontrollpatienten gesunde Probanden ausgewählt würden, bei denen eine Entzündungsreaktion mit der sich daraus ergebenden Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren nicht zu erwarten ist. Eine solche Gruppe von Probanden wurde leider nicht in die Untersuchungen mit einbezogen.

Schließlich bestand eine Schwierigkeit in der Beurteilung der Geninduktion bei Sepsis-Patienten darin, dass diese aus einer sehr heterogenen Patientenpopulation bestanden hinsichtlich ihres Geschlechts, Alters, Vorerkrankungen sowie des Stadiums der Sepsis, in dem sich die Patienten befanden. Um Untersuchungen an homogeneren Patientengruppen durchzuführen und dadurch die Interpretation der Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten, könnte es sinnvoll sein, diese Parameter bei der Patientenrekrutierung in einer Folgestudie zu berücksichtigen.

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) wird nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Umwelteinflüsse auch unter normoxischen Bedingungen induziert.

In der Zeit von 2002 bis 2004 wurden die Expressionsdaten von 5268 humanen, inflammationsrelevanten Genen von 86 Patienten der Intensivstation des Universitätsklinikums Jena untersucht. In dieser Arbeit wurde speziell auf die Rolle von HIF-1 bei Sepsis-Patienten eingegangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es aufzuzeigen, inwieweit sich bei septischen Patienten mit und ohne Vorliegen einer Hypoxie die Expression der HIF-1-induzierten Gene verändert. Zu diesem Zweck wurden die Sepsis-Patienten in Gruppen mit und ohne Lungenversagen respektive Gewebhypoxie eingeteilt und deren Expressionsmuster mit Hilfe von Microarray-Experimenten dargestellt. Die Kontrollgruppe, bestehend aus nicht oder nur kurzfristig postoperativ beatmeten Patienten ohne Sepsis, bildete bei den signifikant regulierten Genen in der dargestellten Heatmap einen eigenen Subcluster, die verschiedenen Sepsis-Gruppen waren jedoch nicht wesentlich voneinander zu unterscheiden. Dies könnte für die Hypothese sprechen, dass HIF-1 im Rahmen einer Sepsis induziert wird, ohne dass eine Hypoxie vorliegt.

Jedoch ließ sich die theoretische Annahme, dass bei den Patienten aus den Sepsis-Gruppen eine einheitliche Induktion der HIF-1-regulierten Gene stattfindet, durch diese Arbeit nicht bestätigen. Vielmehr fand sich bei den 18 HIF-1-regulierten Genen bei den septischen Patienten ein gemischtes Bild aus drei signifikant induzierten Genen (nitric oxide synthase-2 (NOS-2), Endoglin (ENG) und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)), zwei signifikant reprimierten Genen (Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) und Interleukin-1 β (IL-1 β)) neben 13 nicht signifikant, ebenfalls heterogen regulierten HIF-1-Genen.

Die nachfolgend angestellten theoretischen Überlegungen könnten hierbei als

Erklärungsversuche dienen und der Ausgangspunkt für weitere erforderliche Untersuchungen auf diesem Gebiet sein:

1. Möglicherweise wird z.B. das Gen MMP-2 bei inflammatorischen Prozessen im Lungengewebe, jedoch nicht in den Zellen der Blutstrombahn induziert, so dass die Art der in dieser Arbeit entnommenen Proben (Vollblut) dies nicht widerspiegeln kann.

2. Die Sepsis-Patienten bildeten eine sehr heterogene Patientengruppe hinsichtlich ihres Geschlechts, Alters, Vorerkrankungen sowie des Stadiums der Sepsis, in dem sich die Patienten befanden, so dass sich möglicherweise einige Patienten im Stadium einer überschießenden proinflammatorischen Reaktion, andere hingegen sich in einem Stadium befanden, in dem die antiinflammatorische Reaktion stärker ausgeprägt war.

3. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene werden nicht nur durch HIF-1, sondern auch durch eine Vielzahl anderer, die Ergebnisse möglicherweise überlagernde Faktoren reguliert.

4. Die Länge des Untersuchungszeitraums von etwa zwei Jahren könnte zu systematischen Fehlerquellen bei den Microarray-Experimenten geführt haben.

5. Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten, die vor der Probeentnahme einem größeren operativen Eingriff unterzogen wurden, so dass sich bei diesen sicherlich höhere Konzentrationen von proinflammatorischen Mediatoren fanden, als dies bei gesunden – nicht intensivpflichtigen – Probanden der Fall gewesen wäre.

Nicht zuletzt könnte eine Einteilung der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten in eine Survivor- und eine Nonsurvivor-Gruppe und der Vergleich der Expressionsdaten dieser Gruppen untereinander einen Hinweis für das uneinheitliche Ergebnis liefern und weitere Aufschlüsse über die Rolle von HIF-1 in der Sepsis geben.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit als ein kleiner Baustein in einem hochkomplexen System der HIF-1-Genexpression in der Sepsis verstehen, für dessen weiteres Verständnis noch zahlreiche weitere spezifische Untersuchungen erforderlich sind.

5. Summary

The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) as a transcriptional activator is not only upregulated by hypoxia, but also by a broad variety of other factors like cytokines, growth factors and environmental influences even under normoxic conditions.

The expression profiles of 5268 human inflammatory genes from 86 patients of the intensive care unit of the university hospital in Jena were analyzed from 2002 to 2004. In this study the main focus was on the role of HIF-1 in sepsis.

The aim of this study was to figure out the extent of the alteration of HIF-1 gene expression in sepsis under normoxic and hypoxic conditions. For this purpose the septic patients were classified into groups with and without pulmonary failure respectively tissue hypoxia. The expression patterns were detected with microarray experiments.

In the displayed heatmap the control group consisting of not or only for a short time postoperative mechanically ventilated patients without sepsis constituted an own subcluster, whereas the groups formed by the septic patients did not differ substantially from each other. This could provide evidence that HIF-1 is induced in sepsis also without manifested hypoxia.

However the theory that all patients belonging to the sepsis groups show a uniform induction of the HIF-1 regulated genes could not be corroborated by this study.

In fact there was a great variety of results between the 18 investigated HIF-1 regulated genes. Three HIF-1 regulated genes, namely nitric oxide synthase-2 (NOS-2), endoglin (ENG) and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) were significantly induced, whereas two HIF-1-regulated genes, namely matrix-metalloproteinase-2 (MMP-2) and interleukin-1 β (IL-1 β) were significantly repressed besides 13 not significantly also heterogeneously regulated HIF-1 genes. The following considerations could serve as explanations for these inconsistent results and must be seen as an initial point for further essential investigations in this field of study:

1. In case of inflammatory processes for example the gene MMP-2 is possibly induced in the lung tissue but not in the blood stream so that the modality of sampling in this study (whole blood instead of bronchoalveolar lavage fluid) is not capable to reflect the inflammatory process in the lung tissue.
2. The septic patients formed a heterogenous group concerning gender, age, previous diseases and the stadium of sepsis. Some patients might have been in a sepsis stadium with an excessive proinflammatory reaction whereas other patients were in a sepsis stadium with an antiinflammatory reaction.
3. The genes investigated in this study are not only regulated by HIF-1 but also by a variety of other factors possibly overlapping the discovered results.
4. The test period lasted for two years which might have caused biased errors in the results of the microarray experiments.
5. The fact that the patients of the control group underwent a major surgical treatment before taking the blood samples led to higher concentrations of proinflammatory mediators caused by the operative trauma than healthy subjects would have shown.

Different classification of the patients enclosed in this study could lead to an explanation for the inconsistent results found in this study. For instance the classification of the patients in a survivor and a nonsurvivor group and comparing the expression profiles of these groups with each other might achieve further comprehension of the role of HIF-1 in sepsis.

In summary the results of this study must be regarded as a small component of a highly complex system of the HIF-1 gene expression in sepsis. Further specific investigations are necessary for a deeper comprehension of this complex subject.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed, W., Ziouzenkova, O. Brown, J. Devchand, P. Francis, S., Kadakia, M., Kanda, T. Orasanu, G., Sharlach, M., Zandbergen, F., Plutzky, J. (2007) PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med* 262: 184-198.
2. Albert, J., Radomski, A., Soop, A., Sollevi, A., Frostell, C., Radomski, M.W. (2003) Differential release of matrix metalloproteinase-9 and nitric oxide following infusion of endotoxin to human volunteers. *Acta Anaestheiol Scand* 47: 407-410.
3. Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F., Livingston, D.M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12969-12973.
4. Baigrie, R.J., Lamont, P.M., Kwiatkowski, D., Dallman, M.J., Morris, P.J. (1992) Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 79: 757-760.
5. Bateman, R.M., Tokunaga, C., Kareco, T., Dorscheid, D.R., Walley, K.R. (2007) Myocardial hypoxia-inducible HIF-1 α , VEGF, and GLUT1 gene expression is associated with microvascular and ICAM-1 heterogeneity during endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H448-H456.
6. Bauer, M. and Reinhart, K. (2004) Ätiologie und Diagnostik des septischen Organversagens. *Intensivmed* 41: 465-475.
7. Bhattacharya, S., Michels, C.L., Leung, M.K., Arany, Z.P., Kung, A.L., Livingston, D.M. (1999) Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13: 64-75.
8. Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R., Caro, J. (1991) Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J. Biol chem* 266: 15563-15566.
9. Berra, E., Roux, D., Richard, D.E., Pouyssegur, J. (2001) Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization : nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep* 2: 615-620.

10. Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., Pouyssegur, J. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*: 22: 4082-4090.
11. Bianchi, L., Tacchini, L., Cairo, G. (1999) HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res* 27: 4223-4227.
12. Blouin, C.C., Pagé, E.L., Soucy, G.M., Richard, D.E. (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood* 103: 1124-1130.
13. Bone, R.C. (1996) Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 125: 680-687.
14. Botella, L.M., Sánchez-Elsner, T., Rius, C., Corbí, A., Bernabéu, C. (2001) Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* 276: 34486-34494.
15. Bruick, R.K. and McKnight, S.L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340.
16. Burchardi, H., Larsen, R., Schuster, H.P., Suter, P.M. (2001) Sepsis. In: *Intensivmedizin*. 8. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York S. 997-1022.
17. Burgner, D., Rockett, K., Kwiatkowski, D. (1999) Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* 81: 185-188.
18. Carrero, P., Okamoto, K., Coumilleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., Poellinger, L. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 20: 402-415.
19. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert, E. (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-490.
20. Chakrabarti, S. and Patel, K.D. (2005) Matrix metalloproteinase-2 and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 31: 599-621.

21. Christie, J.D. (2005) Microarrays. *Crit Care Med* 33 (12 Suppl): S449-S452.
22. Chu, A.J., Wang, Z.G., Walton, M.A., Seto, A. (2001) Involvement of MAPK activation in bacterial endotoxin-inducible tissue factor upregulation in human monocytic THP-1 cells. *J Surg Res* 101: 85-90.
23. Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-891.
24. Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P. (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521.
25. Corbel, M., Lanchou, J., Germain, N., Malledant, Y., Boichot, E., Lagnete, V. (2001) Modulation of airway remodeling-associated mediators by the antifibrotic compound pirfenidone and the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, during acute lung injury. *Eur J Pharmacol* 426: 113-121.
26. Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., Johnson, R.S. (2003) HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112: 645-657.
27. Crews, S.T. (1998) Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 12: 607-620.
28. Cummins, E.P., Taylor, C.T. (2005) Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450: 363-371.
29. Dinarello, C.A. (2005) Interleukin-1 β . *Crit Care Med* 33 (12): S460-S462.
30. Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 (1): 10-14.
31. Ebert, B.L. and Bunn, H.F. (1998) Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, and adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 18: 4089-4096.
32. Elson, D.A., Ryan, H.E., Snow, J.W., Johnson, R., Arbeit, J.M. (2000) Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 60: 6189-6195.

33. Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y. (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4273-4278.
34. Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 18: 1905-1914.
35. Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54.
36. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G., Semenza, G.L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59: 3915-3918.
37. Flamme, I., Fröhlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A., Risau, W. (1997) HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 63: 51-60.
38. Frede, S., Freitag, P., Otto, T., Heilmaier, C., Fandrey, J. (2005) The proinflammatory cytokine interleukin 1 β and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res* 65: 4690-4697.
39. Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., Fandrey, J. (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B. *Biochem J* 396: 517-527.
40. Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y., Zhang, J. (2004) Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80.

41. Gómez-Jiménez, J., Salgado, A., Mourelle, M., Martín, M.C., Segura, R.M., Peracaula, R., Moncada, S. (1995) Nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med* 23: 253-258.
42. Görlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V.B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R.P., Kietzmann, T., Busse, R. (2001) Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 89: 47-54.
43. Grimm, C., Wenzel, A., Groszer, M., Mayser, H., Seeliger, M., Samardzija, M., Bauer, C., Gassmann, M., Remé, C.E. (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 8: 718-724.
44. Groulx, I. and Lee, S. (2002) Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 22: 5319-5336.
45. Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., Bradfield, C.A. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF 3 alpha. *Gene Expr* 7: 205-213.
46. Harris, A.L. (2002) Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2: 38-47.
47. Hebert, S.C., Mount, D.B., Gamba, G. (2004) Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family. *Pflugers Arch* 447: 580-593.
48. Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., Jelkmann, W. (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94: 1561-1567.
49. Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Riordan, M.V., Tian, Y.M., Bullock, A.N., Welford, R.W., Elkins, J.M., Oldham, N.J., Bhattacharya, S., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W., Schofield, C.J. (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 277: 26351-26355.
50. Hildebrand, F., Pape, H.C., Krettek, C. (2005) Die Bedeutung der Zytokine in der posttraumatischen Entzündungsreaktion. *Unfallchirurg* 108: 793-803.

51. Hoffmann, U., Bertsch, T., Dvortsak, E., Liebetrau, C., Lang, S., Liebe, V., Huhle, G., Borggreffe, M., Brueckmann, M. (2006) Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: Prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J of Infect Dis* 38: 867-872.
52. Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H., Bradfield, C.A. (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272: 8581-8593.
53. Hollander, A.P., Corke, K.P., Freemont, A.J., Lewis, C.E. (2001) Expression of hypoxia-inducible factor 1 α by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum* 44: 1540-1544.
54. Hu, J., Discher, D.J., Bishopric, N.H., Webster, K.A. (1998) Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 894-899.
55. Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., Bunn, H.F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem* 271: 32253-32259.
56. Iliopoulos, O., Levy, A.P., Jiang, C., Kaelin, W.G. Jr, Goldberg, M.A. (1996) Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10595-10599.
57. Iliopoulos, O., Ohh, M., Kaelin, W.G. Jr (1998) pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11661-11666.
58. Ivan, M. and Kaelin, W.G. Jr (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev* 11: 27-34.
59. Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D.C., Michelson, K.S., Günzler, V., Kondo, K., Yang, H., Sorokina, I., Conaway, R.C., Conaway J.W., Kaelin, W.G. Jr (2002) Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13459-13464.
60. Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., Semenza, G.L. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12: 149-162.

61. Jackson, C. (2002) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002, 11: 295-299.
62. Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., Kim, K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111: 709-720.
63. Joško, J., Gwózdź, B., Jedrzejowska-Szypulka, H., Hendryk, S. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 6: 1047-1052.
64. Jung, Y.D., Liu, W., Reinmuth, N., Ahmad, S.A., Fan, F., Gallick, G.E., Ellis, L.M. (2001) Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 beta in human vascular smooth muscle cells via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Angiogenesis* 4: 155-162.
65. Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5667-5672.
66. Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., Poellinger, L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 17: 6573-6586.
67. Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.C., Conaway J.W. (2000) Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10430-10435.
68. Ke, Q., Costa, M. (2006) Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70: 1469-1480.
69. Kempf, V.A., Lebiedziejewski, M., Alitalo, K., Wälzlein, J.H., Eehalt, U., Fiebig, J., Huber, S., Schütt, B., Sander, C.A., Müller, S., Grassl, G., Yazdi, A.S., Brehm, B., Autenrieth, I.B. (2005) Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* 111: 1054-1062.
70. Kline, D.D., Peng, Y.J., Manalo, D.J., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R. (2002) Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 821-826.

71. Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E., Semenza, G.L. (1999) Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209: 254-267.
72. Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., Semenza, G.L. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 63: 1138-1143.
73. Lanchou, J., Corbel, M., Tanguy, M., Germain, N., Boichot, E., Theret, N., Clement, B., Lagente, V., Malledant, Y. (2003) Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*. 31: 536-542.
74. Lando, D., Peet, D.J., Gormann, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., Bruick, R.K. (2002a) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16: 1466-1471.
75. Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., Whitelaw, M.L. (2002b) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295: 858-861.
76. Lee, P.J., Jiang, B.H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L., Choi, A.M. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 272: 5375-5381.
77. Lee, S.H., Wolf, P.L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S.W., Thistlethwaite, P.A. (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342: 626-633.
78. Lieb, M.E., Menzies, K., Moschella, M.C., Ni, R., Taubmann, M.B. (2002) Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol* 80: 421-426.
79. Lin, E., Calvano, S.E., Lowry, S.F. (2000) Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 127: 117-126.
80. Liu, H., Ren, J.G., Cooper, W.L., Hawkins, C.E., Cowan, M.R., Tong, P.Y. (2004) Identification of the antivasopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6605-6610.

81. Löffler, G., Petrides, P.E. (1997) Stoffwechsel der Kohlenhydrate. In: Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York S.377-423 .
82. Lok, C.N. and Ponka, P. (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 274: 24147-24152.
83. Lu, H., Forbes, R.A., Verma, A. (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277: 23111-23115.
84. Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., Poellinger, L. (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414: 550-554.
85. Maltepe, E., Schmidt, J.V., Baunoch, D., Bradfield, C.A., Simon, M.C. (1997) Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386: 403-407.
86. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 20: 5197-5206.
87. Mathupala, S.P., Rempel, A., Pedersen, P.L. (2001) Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem* 276: 43407-43412.
88. Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8104-8109.
89. McCall, C.E. and Yoza, B.K. (2007) Gene silencing in severe systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 175: 763-767.
90. Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W., Varesio, L. (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 182: 1683-1693.

91. Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Bürgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., Fandrey, J. (2003) Intracellular localisation of human HIF-1alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116: 1319-1326.
92. Nasrin, N., Ercolani, L., Denaro, M., Kong, X.F., Kang, I., Alexander, M. (1990) An insulin response element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene binds a nuclear protein induced by insulin in cultured cells and by nutritional manipulations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5273-5277.
93. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.
94. Nguyen, S.V. and Claycomb, W.C. (1999) Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 265:382-386.
95. Nguyen, M., Arkell, J., Jackson, C.J. (1999) Thrombin rapidly and efficiently activates gelatinase A in human microvascular endothelial cells via a mechanism independent of active MTI matrix metalloproteinase. *Lab Invest* 79: 467-475.
96. Nguyen, M., Arkell, J., Jackson, C.J. (2000) Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem* 275: 9095-9098.
97. Oehme, F., Ellinghaus, P., Kolkhof, P., Smith, T.J., Ramakrishnan, S., Hütter, J., Schramm, M., Flamme, I. (2002) Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 343-349.
98. Ozaki, H., Yu, A.Y., Della, N., Ozaki, K., Luna, J.D., Yamada, H., Hackett, S.F., Okamoto, N., Zack, D.J., Semenza, G.L., Campochiaro, P.A. (1999) Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 182-189.
99. Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866.
100. Park, W.Y., Goodman, R.B., Steinberg, K.P., Ruzinski, J.T., Radella, F. 2nd, Park, D.R., Pugin, J., Skerrett, S.J., Hudson, L.D., Martin, T.R. (2001) Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1896-1903.

101. Payen, D., Bernard, C., Beloucif, S. (1996) Nitric oxide in sepsis. *Clin Chest Med* 17: 333-350.
102. Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L., Fong, G.H. (2000) The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8386-8391.
103. Perrella, M.A., Patterson, C., Tan, L., Yet, S.F., Hsieh, C.M., Yoshizumi, M., Lee, M.E. (1996) Suppression of interleukin-1-beta-induced nitric-oxide synthase promoter/enhancer activity by transforming growth-factor-beta-1 in vascular smooth-muscle cells. Evidence for mechanisms other than NF-kappaB. *J Biol Chem* 271 : 13776-13780.
104. Peyssonnaud, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., Nizet, V. (2007) Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* 178: 7516-7519.
105. Pugh, C.W., Tan, C.C., Jones, R.W., Ratcliffe, P.J. (1991) Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10553-10557.
106. Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272: 11205-11214.
107. Qu, J., Rong, Z., He, L., Pan, J., Chen, X. (2000) Relationship between the burden of *Pneumocystis carinii*, the inflammatory reaction and lung injury in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chin Med. J (Engl)* 113: 1071-1074.
108. Rajakumar, A., Doty, K., Daftary, A., Harger, G., Conrad, K.P. (2003) Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 24: 199-208.
109. Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256: 1193-1195.
110. Richard, D.E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D., Pouysségur, J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274: 32631-32637.

111. Richard, D.E., Berra, E., Pouyssegur, J. (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275: 26765-26771.
112. Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., Wenger, R.H. (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 272: 20055-20062.
113. Ruas, J.L., Poellinger, L., Pereira, T. (2002) Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem* 277: 38723-38730.
114. Ríus, C., Smith, J.D., Almendro, N., Langa, C., Botella, L.M., Marchuk, D.A., Vary, C.P., Bernabéu, C. (1998) Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 92: 4677-4690.
115. Ryan, H.E., Lo, J., Johnson, R.S. (1998) HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 17: 3005-3015.
116. Ryan, H.E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J.M., Johnson, R.S. (2000) Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 60: 4010-4015.
117. Sabath, D.E., Broome, H.E., Prystowsky, M.B. (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene* 91: 185-191.
118. Salceda, S. and Caro, J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272: 22642-22647.
119. Sang, N., Fang, J., Srinivas, V., Leshchinsky, I., Caro, J. (2002) Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 α is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol* 22: 2984-2992.
120. Schober, Daniel (2002) Microarrays, Genexpressionsanalyse und Bioinformatik. *BIOspektrum* 8: 307-310.

121. Schoenfeld, A., Davidowitz, E.J., Burk, R.D. (1998) A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8817-8822.
122. Schofield, C.J. and Zhang, Z. (1999) Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 9: 722-731.
123. Schuler, M. and Green, D.R. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29: 684-688.
124. Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., Johnson, R.S. (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21: 3436-3444.
125. Semenza, G.L., Neufeldt, M.K., Chi, S.M., Antonarakis, S.E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5680-5684.
126. Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.
127. Semenza, G.L. (2006) Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 91: 803-806.
128. Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.
129. Srinivas, V., Zhang, L.P., Zhu, X.H., Caro, J. (1999) Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 557-561.
130. Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A., Cairo, G. (1999) Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1 mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 274: 24142-24146.
131. Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157: 411-421.

132. Tian, H., McKnight, S.L., Russell, D.W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS 1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72-82.
133. Tian, H., Hammer, R.E., Matsumoto, A.M., Russell, D.W., McKnight, S.L. (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS 1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 12: 3320-3324.
134. Titheradge, M.A. (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1411: 437-455.
135. Torii, K., Iida, K., Miyazaki, Y., Saga, S., Kondoh, Y., Taniguchi, I., Taki, F., Takagi, K., Matsuyama, M., Suzuki, R. (1997) Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchialveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 155: 43-46.
136. Torsney, E., Charlton, R., Parums, D., Collis, M., Arthur, H.M. (2002) Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res* 51: 464-470.
137. Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J., Kuiper, J. (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16: 379-414.
138. van der Bruggen, T., Niejenhuis, S., Van Raaij, E., Verhoef, J., van Asbeck, B.S. (1999) Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun* 67: 3824-3829.
139. van der Flier, M., van Leeuwen, H.J., van Kessel, K.P., Kimpen, J.L., Hoepelman, A.I., Geelen, S.P. (2005) Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock* 23: 35-38.
140. Volm, M. and Koomägi, R. (2000) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 20: 1527-1533.
141. Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1995) Purification and Characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270: 1230-1237.
142. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514.

143. Wenger, R.H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 16: 1151-1162.
144. Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Maxwell, P.H. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible facor-1alpha. *Blood* 92: 2260-2268.
145. Wong, M.L., Rettori, V., al-Shekhlee, A., Bongiorno, P.B., Canteros, B., McCann, S.M., Gold, P.W., Licinio, J. (1996) Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med* 2: 581-584.
146. Wu, C.H., Chen, T.L., Chen, T.G., Ho, W.P., Chiu, W.T., Chen, R.M. (2003) Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages. *J Trauma* 55: 540-545.
147. Yano, K., Liaw, P.C., Mullington, J.M., Shih, S.C., Okada, H., Bodyak, N., Kang, P.M., Tolti, L., Belikoff, B., Buras, J., Simms, B.T., Mizgerd, J.P., Carmeliet, P., Karumanchi, S.A., Aird, W.C. (2006) Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med* 203: 1447-1458.
148. Yasuda, S., Arie, S., Mori, A., Isobe, N., Yang, W., Oe, H., Fujimoto, A., Yonenaga, Y., Sakashita, H., Imamura, M. (2004) Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol* 40: 117-123.
149. Yu, A.Y., Shimoda, L.A., Iyer, N.V., Huso, D.L., Sun, X., McWilliams, R., Beaty, T., Sham, J.S., Wiener, C.M., Sylvester, J.T., Semenza, G.L. (1999) Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest* 103: 691-696.
150. Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., Millhorn, D.E. (2003) Cobald inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible facot-alpha. *J Biol Chem* 278: 15911-15916.
151. Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., Simons, J.W. (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59: 5830-5835.

152. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., Semenza, G.L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 2-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60: 1541-1545.
153. Zhou, J., Callapina, M., Goodall, G.J., Brüne, B. (2004) Functional integrity of nuclear factor kappaB, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis factor alpha-evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res.* 64: 9041-9048.
154. Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., Nizet, V. (2007) Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med* 85: 1339-1346.
155. Zucker, S., Hymowitz, M., Conner, C., DeClerck, Y., Cao, J. (2004) TIMP-2 is released as an intact molecule following binding to MT1-MMP on the cell surface. *Exp Cell Res* 293: 164-174.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
AP-1	activating protein-1
APC	aktiviertes Protein C
AREG	Amphiregulin
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
ARD1	arrest-defective-1
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B. henselae	Bartonella henselae
bHLH-PAS	basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome
CD55	decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	cyclic AMP response element binding protein
C-TAD	C-terminale Transaktivationsdomäne
DNA	desoxyribonucleic acid
d.h.	das heißt
dUTP	2'-deoxyuridine-5'-triphosphate
EBP β	enhancer-binding protein β
Egr-1	early growth response-1
ENG	Endoglin
eNOS	endothelial NOS
ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1

EPO	Erythropoietin
et al.	et alii (lat.: und andere)
FDR	false discovery rate
Fe	Eisen
FIH	factor inhibiting HIF-1
FIH-1	factor inhibiting HIF-1
F _i O ₂	inspiratorische Sauerstoffsättigung
GADD153	growth arrest and DNA damage-153
HHT	Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HIF	hypoxia inducible factor
HLF	HIF-like factor
HRE	hypoxia response element
HRF	HIF-related factor
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IGF	insulin-like growth factor
IGF1	insulin-like growth factor-1
IGF2	insulin-like growth factor-2
IGFBP-2	insulin-like growth factor binding protein-2
IGFBP-3	insulin-like growth factor binding protein-3
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	inducible NOS
IPAS	inhibitorisches PAS
ITGB2	β 2-Integrin
kD	10 ³ Dalton
MAD	median absolute deviation
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MASH-2	mammalian achaete-scute homologous protein-2
MMP-2	Matrix-Metallopeptidase-2
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
MOP2	member of the PAS superfamily 2
mRNA	messenger RNA

MT-MMP-1	membran-type-MMP-1
NF-IL6	nuclear factor for interleukin 6
NF- κ B	nuclear factor- κ B
nNOS	neuronal NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS-2	nitric oxide synthase-2
NT5E	ecto-5'-nucleotidase
N-TAD	N-terminale Transaktivationsdomäne
O ₂	Sauerstoff
ODDD	oxygen-dependent degradation domain
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
p _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PDGF	platelet-derived growth factor
PGK2	Phosphoglyceratkinase-2
PHD	prolyl hydroxylase domain
PLAUR	urokinase plasminogen activator protein
PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor α
pVHL	“von Hippel Lindau“-Tumorsuppressor-Protein
RNA	ribonucleic acid
RTEF-1	related transcriptional enhancer factor-1
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SLC2A1	Glucosetransporter-1
SLC12a2	solute carrier family 12
SP-1	specificity protein 1
SP-3	specificity protein 3
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
Tab.	Tabelle
TGF- α	transforming growth factor- α
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1

TGFB3	transforming growth factor- β 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

8. Anhang

Tabelle 8.1: Signifikant regulierte Gene bei den Sepsis-Patientengruppen

Nr.	Gen	Abkürzung	Genbank/ Unigene Zugangszahl
1.	Uridine-cytidine kinase 1	UCKL1	XM_00115142 1.1 Hs.504998
2.	Leucine zipper transcription factor-like 1	LZTFL1	Hs. 30824
3.	Chromosome 4 open reading frame 18	C4orf18	XM_00114204 9.1 Hs.567498
4.	M-phase phosphoprotein 1	MPHOSPH1	XM_00114325 7.1 Hs.240
5.	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	KCNQ1	Hs. 95162
6.	Chromosome 14 open reading frame 148	C14orf148	XM_00116451 0.1 Hs.97556
7.	UDP glucuronyltransferase 1 family, polypeptide A1	UGT1A1	XM_00115076 2.1 Hs.124112
8.	Stromal antigen 2	STAG2	XR_023127.1 Hs. 496710
9.	Coiled Coil domain containing 40	CCDC40	XM_00116008 0.1 Hs. 202542
10.	Transmembrane 7 superfamily member 2	TM7SF2	XR_023793.1 Hs.31130
11.	Replication factor C (activator 1) 3	RFC3	XM_00114310 7.1 Hs.115474
12.	Chromosome 1 open reading frame 86	C1orf86	Hs. 107101
13.	Zinc finger, HIT type 2	ZNHIT2	NM_014205.2 Hs.121025
14.	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	CAMK4	XM_517873.2 Hs. 591269
15.	Chromosome X open reading frame 36	Cxorf36	NM_024689.1 Hs. 98321

16.	Islet amyloid polypeptide	IAPP	Hs. 46835
17.	Protein kinase N3	PKN3	XM_00115977 6.1 Hs. 300485
18.	Malonyl CoA: ACP acetyltransferase (mitochondrial)	MCAT	XM_00117169 0.1 Hs. 349111
19.	Leucin rich repeat and fibronectine type III domain containing 3	LRFN3	XM_524229.2 Hs. 143792
20.	Tumor necrosis-factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	NM_003810.2 Hs. 478275
21.	BMP2 inducible kinase	BMP2K	XM_526576.2 Hs. 146551
22.	Cordon-bleu homolog (mouse)	COBL	Hs. 99141
23.	Integrin-2 β (complement component 3) receptor 3 and 4 subunit	ITGB2	XM_00115675 8.1 Hs. 375957
24.	Solute carrier family 43, member 2	SLC43A2	Hs. 160550
25.	Hypothetical protein LOC7	LOC729287	XM_00112643 7.1 Hs. 646619
26.	TMDC II	TMDCII	Hs. 369765
27.	FLJ 4117 protein	FLJ42117	Hs. 368434
28.	Coiled-coil domain containing 131	CCDC131	Hs. 527874
29.	Ataxin 2	ATXN2	Hs. 76253
30.	Solute carrier family 24, member 3 (Sodium/potassium/calcium exchanger)	SLC24A3	Hs. 211252
31.	Kinesin family 13B	KIF13B	XM_00115434 6.1 Hs. 444767
32.	Fibroblast activation protein, alpha	FAP	Hs. 516493
33.	Zinc finger protein 274	ZNF274	Hs. 83761
34.	Chromosome 12 open reading frame 33	C12orf 33	Hs. 408739
35.	Paired related homeobox 2	PRRX2	Hs. 112596
36.	ATP/GTP binding protein-like 2	AGBL2	Hs. 147377
37.	Dystrobrevin, alpha	DTNB	Hs. 307720
38.	Peptidyl arginine demininase-type III	PADI3	Hs. 149195
39.	KIAA 0562	KIAA0562	Hs. 509017
40.	Podocalyxin-like 2	PODXL2	Hs. 591290
41.	SDA 1 domain containing 1	SDAD1	Hs. 632604
42.	Similar to RIKEN cDNA 27	LOC402682	Hs. 534845
43.	MON 2 homolog (S. Cerevisiae)	MON2	Hs. 389378
44.	Nucleoporin 98Da	NUP98	Hs. 524750

45.	Eukaryotic translation initiation factor 2, Subunit 1 alpha, 25 kDa	EIF2A	Hs. 378808
46.	Chromosome 10 open reading frame 63	C10orf63	Hs. 534486
47.	TBC 1 domain family, member 10 A	TBC1D10A	Hs. 444950
48.	Claudin 14	CLDN14	Hs. 505146
49.	Cyclin B 3	CCNB3	Hs. 130310
50.	Family with sequence similarity 129, member c	FAM129C	Hs. 434133
51.	Dpy-19-like 1(C. elegans)	DPY19L1	Hs. 408623
52.	Hypothetical protein LOC 7	LOC727878	Hs. 343482
53.	CNKSR family member 3	CNKSR3	Hs. 16064
54.	Myeloid/lymphoid or mixed-lineaged leukemia (trithorax homolog, Drosophila), translocated to, 4	MLLT4	Hs. 648081
55.	Forkhead box K 1	FOXK1	Hs. 487393
56.	WD repeat domain 90	WDR90	Hs. 511903
57.	Kelch-like 24 (Drosophila)	KLHL24	Hs. 407709
58.	Ribosomal protein L 24	RPL24	Hs. 547172
59.	Chromosome 20 open reading frame 39	C20orf39	Hs. 124638
60.	MBD 2- interacting zinc finger	MIZF	Hs. 504091
61.	CD 81	CD81	Hs. 54457
62.	Solute carrier family 39 (Zinc transporter), member 10	SLC39A10	Hs. 413434
63.	Serine/threonine kinase 38	STK38	Hs. 409578
64.	Spermatid perinuclear RNA binding protein	STRBP	Hs. 652378
65.	Protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)	PIN4	Hs. 118076
66.	Solute carrier family 12, member 6 (potassium/chloride transporters)	SLC12A6	Hs. 510939
67.	Hypothetical protein DKFZ	DKFZp586l14 20	Hs. 112423
68.	Ferrdoxin 1	FDX1	Hs. 744
69.	Katanin p80 (WD repeat containing) subunit B1	KATNB1	Hs. 275675
70.	Complexin 2	CPLX2	Hs. 193235
71.	Solute carrier family 22, member 6	SLC22A6	Hs. 369252
72.	Growth arrest-specific 7	GAS7	Hs. 462214
73.	N-acetyltransferase 12	NAT12	Hs. 165465
74.	Beta-1,3-glucuronyltransferase 3	B3GAT3	Hs. 502759

	Glucuronyltransferase I		
75.	KIAA0319	KIAA0319	Hs. 26441
76.	Hypothetical LOC 402110	LOC402110	Hs. 355711
77.	Mevalonate (diphospho) decarboxylase	MVD	Hs. 252457
78.	Latent transforming growth factor binding protein 1	LTBP1	Hs. 49787
79.	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartase	GRIN1	Hs. 558334
80.	Major histocompatibility complex, class II, DO alpha	HLA-DOA	Hs. 631991
81.	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	MAP3K11	Hs. 502872
82.	Matrix metalloproteinase, type IV collagenase	MMP-2	Hs. 513617
83.	Mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	Hs. 114198
84.	Toll-like receptor 7	TLR7	Hs. 443036
85.	Thrombospondin receptor	CD36	Hs. 120949
86.	Chemokine binding protein 2	CCBP2	Hs. 24286
87.	Platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD 31 antigen)	PECAM1	Hs. 652132
88.	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	DYRK1A	Hs. 652287
89.	Low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor)	LRP1	Hs. 162757
90.	Chemokine (c-c motif) ligand 21	CCL21	Hs. 57907
91.	G-Protein-coupled receptor 109 B	GPR109B	Hs. 458425
92.	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	Hs. 534074
93.	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1	TREM1	Hs. 283022
94.	Nucleotide-binding dimerization domain containing 2	NOD2	Hs. 592072
95.	BCL2-associated X-protein	BAX	Hs. 631546
96.	Interleukin 18 receptor 1	IL18R1	Hs. 469521
97.	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	MAP3K13	Hs. 591306
98.	Chemokine (c-c motif) ligand 19	CCL19	Hs. 50002
99.	Interleukin 10 receptor, alpha	IL10RA	Hs. 504035
100.	Selectin P ligand	SLPLG	Hs. 591014
101.	Interleukin-1 β	IL-1 β	Hs. 126256
102.	Peroxisome proliferator-activated	PPARA	Hs. 103110

	receptor, alpha		
103.	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10 B	TNFRSF10B	Hs. 521456
104.	CDC-like kinase 1	CLK1	Hs. 433732
105.	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, ssubfamily B, member 1	LILRB1	Hs. 67846
106.	CD 82	CD82	Hs. 527778
107.	ELK1, member of ETS oncogene family	ELK1	Hs. 652415
108.	Nitric oxide synthase-2 (inducible, hepatocytes)	NOS-2	Hs. 434386
109.	Chemokine (c-c motif) ligand 5	CCL5	Hs. 514821
110.	Dual specificity phosphatase 6	DUSP6	Hs. 298654
111.	Interleukin 5 receptor, alpha	IL5RA	Hs. 68876
112.	cAMP responsive element binding protein 3	CREB3	Hs. 522110
113.	Interleukin 13	IL13	Hs. 845
114.	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (Interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	Hs. 2490
115.	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10 A	TNFRSF10A	Hs. 591834
116.	BCL 2-associated athanogene	BAG1	Hs. 377484
117.	Similar to protein kinase C	LOC646096	Hs. 448789
118.	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (Survivin)	BIRC5	Hs. 645371
119.	Galactosylceramidase	GALC	Hs. 513439
120.	Chemokine (c-c motif) receptor 9	CCR9	Hs. 225946
121.	Chemokine (c-c motif) receptor 2	CCR2	Hs. 644637
122.	Chemokine (c-x3-motif) receptor 1	CX3CR1	Hs. 78913
123.	Chemokine (c-c motif) ligand 23	CCL23	Hs. 169191
124.	Interleukin 13	IL13	Hs. 845
125.	Interleukin 17 receptor B	IL17RB	Hs. 558512
126.	Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	Hs. 557403
127.	Complement component 8, gamma polypeptide	C8G	Hs. 1285
128.	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	CHUK	Hs. 198998
129.	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein	IKBKAP	Hs. 494738
130.	NFKB inhibitor interacting Ras-like 1	NKIRAS1	Hs. 173202
131.	Serum response factor (c-fos serum response element-binding	SRF	Hs. 520140

	transcription factor)		
132.	Myosin binding protein C, cardiac	MYBPC3	Hs. 524906
133.	Lamin A/C	LMNA	Hs. 594444
134.	Troponin C type 1 (slow)	TNNC1	Hs. 118845
135.	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	PPARGC1A	Hs. 527078
136.	Insulin-like growth factor 2 (Somatomedin)	IGF2	Hs. 523414
137.	Inter-alpha (globulin) inhibitor H3	ITIH3	Hs. 76716
138.	Latent transforming growth factor beta binding protein 4	LTBP4	Hs. 466766
139.	Heat shock 70kDa protein 2	HSPA2	Hs. 432648
140.	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5	NOX5	Hs. 128105
141.	Fibrinogen-like 2	FGL2	Hs. 520989
142.	Serta domain containing 2	SERTAD2	Hs. 645287
143.	Cathepsin G	CTSG	Hs. 421724
144.	Similar to alpha tubulin	LOC112714	Hs. 433336
145.	Tubulin, alpha 1	TUBA1	Hs. 75318
146.	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	Hs. 652416
147.	Major histocompatibility complex, Class II, DR beta 1	HLA-DRB1	Hs. 534322
148.	Major histocompatibility complex, DQ alpha1	HLA-DQA1	Hs. 387679
149.	Chromosome 14 open reading frame 58	C14orf58	Hs. 509966
150.	Processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)	POP1	Hs. 252828

Tabelle 8.2: Expressionswerte der Patienten aus Gruppe 1 bis 6 sowie p- und q-Werte der untersuchten Gene

Gen	Abkürzung	Genbank Zugangszahl	UniGene Zugangszahl	p-Wert (Signifikanz)	q-Wert (false dis- covery rate)	Pat.Gruppe1 _2005.02.10_ 836_id1776	Pat.Gruppe1 _2005.03.02_ 899_id1866
Vascular endothelial growth factor	VEGF	NM_001033756.1	Hs.644747	0,157642343	0,203722063	-0,24001307	0,598337582
Endoglin	ENG	NM_000118.1	Hs.76753	0,039415635	0,135113967	0,187084947	0,385881657
Insulin-like growth factor-2	IGF-2	NM_001042377.1	Hs.611486	0,132813515	0,19752056	0,392039155	0,318523271
Phosphoglycerate kinase-2	PGK-1	NM_000291.2	Hs.652416	0,286061104	0,246020601	1,808507016	0,304189065
Glucose transporter-1	SLC2A1	XM_001090625.1	Hs.473721	0,076040991	0,168570941	0,465864686	0,268828408
Transforming growth factor- β 3	TGFB3	XM_001161623.1	Hs.649945	0,454285704	0,293720287	0,40292669	-0,21733615
Urokinase plasminogen activator protein	PLAUR	NM_001005377.1	Hs.466871	0,265490586	0,241408611	0,35865716	0,778804767
Nitric oxide synthase-2 (inducible, hepatocytes)	NOS-2	NM_153292.1	Hs.434386	0,807790315	0,380475945	-0,03160262	0,16947506
Interleukin 1 beta	IL-1 β	NM_000576.2	Hs.126256	0,360027287	0,26720344	0,187084947	0,545368586
Decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	CD55	XM_001166663.1	Hs.527653	0,107737235	0,188296549	1,296481203	0,998964954
Beta 2 integrin	ITGB2	NM_000211.2	Hs.375957	0,403457209	0,279223913	1,940325566	1,329136737
Ecto-5'-nucleotidase	NT5E (CD73)	NM_002526.1	Hs.153952	0,156795711	0,203722063	0,132679139	-0,47928308
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	PPARA	XM_515198.2	Hs.103110	0,00243141	0,049857992	-0,98783189	-1,0130606
Solute carrier family 12	SLC12A2	NM_001046.2	Hs.643978	0,547741612	0,320594966	2,10391114	1,332434155
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	ENTPD1	NM_001776.3	Hs.576612	0,499240392	0,305749078	0,264000722	0,595977834
Amphiregulin	AREG	XM_517224.2	Hs.270833	0,822638032	0,383984794	-0,39978743	-1,0130606
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	NM_000201.1	Hs.643447	0,070126199	0,165380269	0,929882978	0,69393044
Interleukin 6	IL6 (CD54)	XM_001154396.1	Hs.512234	0,030046853	0,124298476	1,073266276	0,878372242

Abkürzung	Gruppe1_200 4.11.11_8035 _id1491	Gruppe1_200 4.10.01_8075 _id1572	Gruppe2_200 5.02.23_842_ id1785	Gruppe2_200 5.03.17_874_ id4092	Gruppe2_200 5.03.02_880_ id1854	Gruppe2_200 5.03.08_950_ id1949	Gruppe2_200 4.10.19_8005 _id1401	Gruppe3_200 4.11.24_749_i d1328	Gruppe3_200 5.01.19_859_ id1818
VEGF	0,119297718	0,186363369	0,096658996	0,156989123	0,495357307	0,272515616	-0,04461036	0,204266676	0,43104955
ENG	1,345486346	1,32141187	1,228424264	1,288061388	0,573654883	1,024375355	1,003295092	0,723782756	1,142028841
IGF2	0,820551679	0,436717978	0,64006764	0,410195334	0,312338463	0,330630859	0,663547457	0,357221988	0,324438211
PGK1	1,255782916	0,83829614	1,073399417	0,847610198	0,730270148	0,533285982	1,17423502	0,871720302	0,777042671
SLC2A1	0,028113382	0,055852593	0,119186688	-0,30466686	0,257849078	0,32685621	0,41542526	0,363578329	0,620254007
TGFB3	-0,43814439	-1,14536585	-0,85643925	-0,12984537	-0,79385385	-0,25974359	-0,44044298	-0,03511536	-0,36412506
PLAUR	-0,01443306	0,896069063	0,320881632	0,726516252	0,919751928	0,503186649	0,483073616	0,685923645	0,482615025
NOS2A	0,49991647	-0,10830419	0,267544592	0,066374085	0,257849078	0,396788705	-0,3373802	0,337706268	0,318413386
IL1B	0,506930888	0,941065241	0,479239248	0,732642847	1,167015393	0,742829809	0,821120262	0,492255815	0,44278236
CD55	0,632260646	1,192648509	0,778178445	1,450373008	1,300021271	0,742829809	0,945886335	0,708407777	0,890296221
ITGB2	1,476753175	1,4996834	1,609158571	1,515538552	1,60272569	1,20123686	1,333999971	1,5008988	1,371443768
NT5E (CD73)	-0,22893363	-0,2976701	-0,85643925	-0,48783236	-0,22233848	-0,35074201	-1,11433505	-0,30916643	-0,46104084
PPARA	-0,56266256	-0,88597461	-0,47908651	-0,60872771	-0,89433423	-1,16331881	-0,73873723	-0,72946612	-0,70664485
SLC12A2	1,6521013	1,010524718	1,560653576	1,535992593	1,498197659	1,14979113	1,20753626	1,538377118	1,232336223
ENTPD1	0,36691884	0,526189072	0,970762729	0,654419934	0,936274877	0,516709624	0,621199184	0,66223069	0,675326213
AREG	-1,14334085	-0,64229977	-0,99952888	-0,64113243	-1,39097985	-1,21068598	-1,21682342	-0,59776313	-0,95104652
ICAM1	0,808582507	0,628540966	0,831114266	0,8223976	0,783676268	0,76585702	0,460216899	0,655224053	0,846256845
IL6 (CD54)	1,073999234	1,253144055	1,114660343	1,311173858	0,994977287	0,993406681	0,891062979	1,001737124	1,045322483

Abkürzung	Gruppe3_200 5.02.01_892_ id1856	Gruppe3_200 4.05.26_6003 _id116	Gruppe3_200 4.08.19_6009 _id235	Gruppe3_200 4.06.04_6012 _id287	Gruppe3_200 4.03.25_6015 _id322	Gruppe3_200 4.04.27_6022 _id414	Gruppe3_200 4.09.10_6026 _id476	Gruppe3_200 4.06.23_6027 _id482	Gruppe3_200 4.06.22_6033 _id559
VEGF	0,198564415	0,213498924	0,393077151	-0,1350177	0,617706068	0,50965735	-0,54767789	0,448143745	0,772145664
ENG	1,004651843	0,784600675	1,167054988	1,173377358	1,248917769	1,070094226	0,486565448	1,081901525	1,406214024
IGF2	0,705654281	0,664063613	0,51796255	0,776243321	0,8550143	0,790537912	0,551368739	0,539248859	0,404115795
PGK1	0,91615227	1,038024678	0,964655944	1,146458317	0,411303134	1,016717034	1,225569402	0,837329116	0,238825025
SLC2A1	0,421866761	0,785785071	0,205884205	0,043979833	0,077085598	0,059478742	0,320074183	0,28159665	0,418865069
TGFB3	0,099945543	-0,26856204	-0,53873561	-0,37934502	-0,2781336	-0,73868875	-0,3803639	-0,76686515	-0,17718736
PLAUR	0,252297415	0,416265342	0,931671921	0,431614292	0,519509266	0,622916223	0,183014746	0,53273813	0,82105309
NOS2A	0,207928896	-0,09551442	-0,22101686	0,105592741	0,56850251	0,321989197	0,040713349	0,083199349	0,038940892
IL1B	0,769505049	0,547439116	0,859040046	1,069169436	0,388901838	-0,33190303	-0,18079814	0,534374881	0,88871347
CD55	0,810676315	0,718607258	0,986653745	0,085602808	0,601876985	0,747590943	0,05665682	0,673904868	1,136349612
ITGB2	1,380591314	1,298957334	1,596031444	1,603775322	0,409472698	1,22633376	0,538749325	1,357913353	1,685570757
NT5E (CD73)	-0,59977042	-0,71264769	-0,38435666	-0,55145233	-0,83874895	-0,11253431	-0,17583309	-0,22708649	-0,48352613
PPARA	-0,91597394	0,201415878	0,656612697	0,180584844	-0,70298403	-1,0898172	-0,55992245	-0,02901485	1,039828894
SLC12A2	1,232629388	1,535680917	1,338168357	1,59308952	1,08822916	1,669501898	1,109340114	1,465334664	1,470427724
ENTPD1	0,526354123	0,492123889	1,006904651	0,811127589	0,450010035	0,296868732	0,40774972	0,484272233	0,836282794
AREG	-0,81851087	-1,08300613	-1,20944769	-0,47120154	-1,01268141	-0,89833043	-1,11239093	-1,23957363	-1,00154539
ICAM1	0,875812241	0,553164299	0,625733156	0,731525724	0,712318178	0,936123554	0,644021192	0,73973947	0,671413316
IL6 (CD54)	1,046635502	0,905965232	1,205544202	1,072468896	1,109371116	0,898209224	0,991771633	1,010968792	0,97780954

Abkürzung	Gruppe3_200 4.03.19_6035 _id568	Gruppe3_200 4.04.05_6037 _id594	Gruppe3_200 5.09.16_6087 _id859	Gruppe3_200 5.05.24_6091 _id890	Gruppe3_200 5.09.09_6098 _id951	Gruppe3_200 5.10.12_6106 _id995	Gruppe3_200 5.10.21_6119 _id1045	Gruppe3_200 5.11.10_6133 _id1139	Gruppe3_200 4.02.20_8009 _id1413
VEGF	0,267641339	0,538751213	0,249104041	0,30989189	-0,14790962	0,028274502	0,017703895	0,376063169	0,366221712
ENG	1,446466389	0,964153352	1,27643082	1,299806909	1,436790821	0,99618025	1,308855612	1,228447689	1,215441505
IGF2	1,247429384	0,606743719	0,249104041	0,612375671	0,604133328	0,814816035	0,806293327	0,407218095	0,400680961
PGK1	0,730768556	0,833142227	0,501387178	0,997485122	1,028142556	0,559964911	0,874177388	0,196204204	0,858787841
SLC2A1	0,470796194	0,169701987	0,124195684	0,802257949	0,628036803	0,261337821	0,350663424	0,109042617	0,584829619
TGFB3	-0,29521565	-0,17474232	0,532978767	-0,34595261	0,190434008	-0,18948414	-0,04090419	-0,3603462	-0,44793331
PLAUR	0,152998657	0,498244391	0,538036367	0,371443462	0,270240512	0,160960404	0,299315491	0,668596688	0,427855224
NOS2A	0,540259323	0,402136486	0,481899976	0,33216104	0,010515277	0,400934965	-0,16395945	0,189476542	0,268613787
IL1B	-0,11429997	0,498244391	0,329071193	0,396006344	0,507053915	0,394109217	0,499103724	0,654632966	0,427855224
CD55	0,130773941	0,704839206	1,002137791	0,824526871	0,949055429	0,372914293	0,639583242	1,083767201	0,865525596
ITGB2	1,50175902	1,351818388	1,351580409	1,333385716	1,437265632	0,929354504	1,303270726	1,4777262	1,400869779
NT5E (CD73)	-0,53668221	-0,60175857	0,82435764	-0,45406661	1,001257934	0,762736344	1,014715446	-0,71640795	-0,3607887
PPARA	-1,04283197	-1,19764821	0,303087438	-0,8659005	0,154341671	-0,19553605	0,054867943	-0,60947251	-1,01713261
SLC12A2	1,199754668	1,554577615	1,044911724	1,218428334	1,262402216	0,918740849	1,050894774	1,287717489	1,094266663
ENTPD1	0,195553039	0,449110525	0,387833	0,458811069	0,24603431	0,036060376	0,493618276	0,796496388	0,655804083
AREG	-0,92155012	-0,87716152	-0,86845159	-0,98715474	-1,04192611	-1,1255916	-0,94270924	-1,52966128	-0,77692811
ICAM1	1,031963357	0,721352404	0,65537441	0,839746806	0,515591507	0,71242193	0,492236261	0,899700948	0,716138728
IL6 (CD54)	1,25942973	0,881612373	1,32835968	1,2007408	1,200928209	1,252506414	1,276137109	1,231835039	1,109849469

Abkürzung	Gruppe4_200 4.03.22_1017 _id15	Gruppe4_200 4.03.29_1028 _id25	Gruppe4_200 4.06.29_1029 _id26	Gruppe4_200 4.07.14_2013 _id34	Gruppe4_200 4.07.14_2017 _id37	Gruppe4_200 4.07.14_2028 _id47	Gruppe4_200 4.05.18_5010 _id69	Gruppe4_200 4.03.12_6036 _id585	Gruppe4_200 4.11.10_6056 _id685
VEGF	-0,46569354	0,208344269	0,452105901	-0,43838894	0,059927815	-0,4709266	-0,02439671	0,475892252	0,442150341
ENG	1,606079495	1,359130111	1,531226334	1,366563564	1,57932043	1,417939093	1,111746011	1,487401087	1,127542584
IGF2	1,069325921	0,889708472	0,854503103	0,467640657	0,662018791	0,742579233	0,722076898	0,660882475	0,447550386
PGK1	0,432582532	0,714078523	0,900858625	1,247549161	1,320410243	1,158678333	0,708442581	1,149154633	0,852904799
SLC2A1	0,582498436	0,589338285	0,644791388	0,218844456	0,460941486	0,208782696	0,387602832	0,784225973	0,695590351
TGFB3	-0,75479549	-0,96738248	-0,58765525	-1,63443409	-1,07373409	-0,78955905	-0,10927039	-0,75574213	-0,36159434
PLAUR	0,192504321	0,463622261	1,112048708	-0,16827938	0,526490434	0,041996884	0,014201962	0,416444087	0,358829876
NOS2A	0,718011941	0,658438506	0,328305267	-0,16827938	0,097681585	0,294642201	-0,02439671	0,438405502	0,320288473
IL1B	0,148918407	0,846215268	0,878960197	0,68759347	0,321993105	0,785501518	0,136973808	0,258075785	0,434846459
CD55	0,551528749	0,728844212	1,108375737	1,735818612	1,148929284	1,221249275	1,378311607	0,775488285	0,951176701
ITGB2	1,510407242	1,452561786	1,714528222	1,58106024	1,747968361	1,460281048	1,478120555	1,349667628	1,329232475
NT5E (CD73)	-0,67449076	-0,31425898	-0,28927774	0,015325886	-0,54216703	-0,25321138	-0,24684991	-0,36323029	-0,88128521
PPARA	-0,7138787	-1,13103203	0,484092837	1,011279951	0,66620378	0,730347159	1,084709851	-0,71410478	-1,34751483
SLC12A2	0,899146342	1,046663163	1,222191844	1,536652553	1,412528262	1,122056038	1,499379562	1,196734054	1,212423042
ENTPD1	0,754400723	0,55621076	1,027585732	0,674490759	0,57656184	0,770275459	0,691761226	0,177225059	0,698511583
AREG	-0,81925387	-0,84980931	-0,64213091	-0,2642765	-1,01971441	-1,48396859	-0,94262566	-1,1705497	-1,23643814
ICAM1	0,314769187	0,580130836	0,427583223	0,310590851	0,483504431	-0,0188743	0,302669139	0,809451527	0,724738794
IL6 (CD54)	1,49668712	1,359418429	1,11265668	1,506761841	1,139415091	1,367221116	1,035204571	1,37317983	1,052446813

Abkürzung	Gruppe4_200 5.04.07_6079 _id814	Gruppe4_200 5.10.21_6099 _id960	Gruppe4_200 5.09.20_6101 _id975	Gruppe4_200 5.10.07_6107 _id4064	Gruppe4_200 5.10.19_6116 _id1035	Gruppe4_200 5.10.18_6117 _id1036	Gruppe4_200 5.10.25_6127 _id1096	Gruppe4_200 5.11.02_6130 _id1112	Gruppe4_200 5.11.11_6136 _id1151
VEGF	0,613089503	0,199319451	0,250769704	0,027993728	-0,67525599	-0,15299539	0,320582291	0,055498235	0,161416156
ENG	1,004456048	0,995171448	0,927990702	1,155027165	1,217933386	1,462369168	1,573914377	1,187965196	1,261448088
IGF2	0,618438892	0,664333179	0,706863994	0,805339467	0,475667865	0,628143765	0,190129764	0,902234728	0,862768981
PGK1	0,80109363	0,554290716	0,715156301	0,421167529	0,944201256	0,396590875	0,523893162	0,97165624	0,859624956
SLC2A1	-0,10062209	0,497857424	1,174649415	0,78684624	0,640438481	0,114000176	0,597601198	1,162295529	-0,14908715
TGFB3	-0,24294573	0,033517851	0,089592696	0,311073201	0,298397247	-0,18104108	0,583776408	-0,04941159	-0,11633322
PLAUR	0,472441294	0,395972418	0,537833548	0,467225111	-0,05451028	0,385710244	0,535724744	0,494430029	-0,12436754
NOS2A	0,500724129	0,097081316	0,162013807	0,068138322	0,304447377	0,628962723	0,072405919	-0,3522382	0,209531496
IL1B	0,450096879	0,592757182	0,664871277	0,715166988	0,090031576	0,046460124	0,0502868	0,714388901	0,328744321
CD55	0,434618911	0,815319747	0,656004434	0,716287137	0,866279669	-0,07179155	1,074279256	0,499114953	0,425326486
ITGB2	1,40894594	1,417380409	1,217893674	1,179614256	1,448014215	1,67491808	1,64566238	1,408333858	1,076768456
NT5E (CD73)	-0,08114214	0,652330573	0,729097039	0,626506271	1,029750974	0,947629191	0,709230197	0,897914494	-0,5924636
PPARA	-0,76148957	0,182712492	0,137614753	0,132575671	0	0,15418731	-0,06238241	-0,02928132	-1,20775584
SLC12A2	1,489805158	1,303208227	1,133184665	1,0705009	1,107001748	1,200573444	1,163820189	1,493959313	1,27471663
ENTPD1	0,604942535	0,431555233	0,606841977	0,343155692	0,226740095	0,485964601	0,581430743	0,309794307	0,306209501
AREG	-0,34724346	-1,27995266	-1,36158069	-1,19357893	-1,01631163	-0,83490534	1,042816428	0,678237631	-0,98433844
ICAM1	0,973364904	0,752919013	0,742519828	0,601575825	0,205387464	0,573142965	0,596465142	0,691672675	0,842364619
IL6 (CD54)	1,075926047	1,101871465	1,109372298	1,276416625	1,340608133	1,453621313	1,328691047	1,424248179	1,056457639

Abkürzung	Gruppe5_200 4.11.22_877_i d1846	Gruppe5_200 5.02.24_974_ id1987	Gruppe5_200 4.03.03_6011 _id267	Gruppe5_200 4.02.12_6022 _id392	Gruppe5_200 4.06.08_6023 _id433	Gruppe5_200 4.02.18_6030 _id514	Gruppe5_200 4.09.02_6054 _id663	Gruppe5_200 5.02.25_6061 _id725	Gruppe5_200 5.03.15_6062 _id731
VEGF	0,569495086	-0,1426739	0,384820494	0,350398205	-0,30633793	-0,12523764	0,21524736	0,384530478	-0,02126931
ENG	1,211928837	1,291623237	1,065410951	0,765214085	1,350279858	1,072308502	1,093277804	1,0433139	1,361445748
IGF2	0,660226483	0,731125637	0,278410216	0,659966863	-0,67449076	0,729590422	0,499050754	0,347400199	0,360941817
PGK1	0,80942586	1,132954939	1,176239652	0,970458867	0,762359025	1,203555467	1,106361465	0,692977516	0,874323713
SLC2A1	0,145104699	0,569644145	0,723034897	0,465552651	0,067046423	0,264678027	1,235996809	0,285370132	0,51509858
TGFB3	-0,3145229	-0,56152823	-0,5559778	-0,4623317	-0,54769517	-0,03194022	-0,25776092	-0,11429419	-0,08471853
PLAUR	0,370615116	0,359357711	0,774662409	0,463035633	0,780111004	0,171938891	0,647336527	0,46251069	0,413405244
NOS2A	0,316418036	0,227862646	-0,41053713	0,19493149	0,279502955	0,25518279	-0,39413963	0,224798299	-0,28042999
IL1B	0,718289937	0,539044525	1,256263159	0,371976033	1,185262992	0,444399083	0,572801365	0,575812567	-0,04773722
CD55	1,169130988	0,941084758	1,157546025	1,542606004	1,437657301	0,923972385	1,163700683	0,554986294	0,748998594
ITGB2	1,443202339	1,535233424	1,635209893	1,399541482	1,862694178	1,061637328	1,537850513	1,180936594	1,354304837
NT5E (CD73)	-0,33519079	0,293679126	-0,62544224	-0,75915397	0,373043957	-0,44400985	-0,52967502	-0,77190597	-0,25589362
PPARA	-0,75125709	-1,13015928	-0,4909892	-0,67128124	0,671400338	-0,95838413	1,003827551	-0,97055512	-1,14161349
SLC12A2	1,28958525	1,469911476	1,341186303	1,049313039	1,707656916	0,68042431	1,167173925	1,412418432	1,364238715
ENTPD1	0,763878456	0,658869649	0,923406032	0,80150931	0,948476344	0,557438974	0,684366097	0,564281615	0,680516753
AREG	-0,64725183	-1,09301436	-1,13437516	-0,873799	-1,31412181	-0,88451013	-0,98631506	-1,23984729	-0,90679377
ICAM1	0,817463516	0,766229289	1,052753125	0,690061577	1,05376444	0,585767498	0,744906544	1,010038296	0,90981393
IL6 (CD54)	1,117067028	1,178138091	1,286868107	1,152197363	1,03315299	1,198463951	1,173992381	1,12619245	1,17982984

Abkürzung	Gruppe5_200 5.04.28_6073 _id791	Gruppe5_200 5.09.27_6081 _id4021	Gruppe5_200 5.04.15_6083 _id830	Gruppe5_200 5.07.07_6093 _id906	Gruppe5_200 5.10.21_6094 _id919	Gruppe5_200 5.04.12_6096 _id930	Gruppe5_200 5.10.21_6119 _id1047	Gruppe5_200 5.04.15_7009 _id1227	Gruppe6_200 5.01.19_859_ _id1821
VEGF	-0,99420062	-0,09823971	0,262126387	-0,1355183	-0,22239759	0,449067208	0,068547161	-0,70642937	0,608564143
ENG	1,156221858	1,26572451	0,581861463	1,205472273	1,11054015	1,180144262	1,189022558	-0,10216125	0,69599755
IGF2	0,787536554	0,694542649	0,672870147	0,736029487	0,923286583	0,540960077	0,541564637	0,590884785	0,517255502
PGK1	1,258376476	0,620973877	0,885146353	1,434433444	0,98252421	0,455672301	0,47443063	1,435320068	0,821365224
SLC2A1	0,158684992	0,798531477	0,316824301	0,996762929	0,517142437	0,202000428	0,399497046	-0,61600455	0,233377759
TGFB3	1,937329484	-0,08945169	-0,19686878	-0,16859151	-0,02906635	-0,06702168	0,125150154	0,601970123	-0,2319311
PLAUR	-0,04157432	0,375145677	0,534265315	-0,0283793	0,388684151	0,704129818	0,261705865	0,268253538	0,641837427
NOS2A	0,713706315	0,631312092	0,517915957	-0,15190794	-0,10955586	0,428659701	0,166744582	-0,27899622	0,367137395
IL1B	0,534362054	-0,00762773	0,732803217	0,067102494	0,195220827	0,430972445	0,139393504	0,194468189	0,687166826
CD55	0,689909792	0,717399424	0,676104531	0,999620042	0,947683876	1,265406171	0,104097605	0,335712313	0,898427287
ITGB2	1,897866126	1,285735216	1,4959667	1,077523157	1,359411311	1,554978476	1,30518436	1,32386887	1,533774603
NT5E (CD73)	-0,95789896	0,835964514	-0,31899383	0,759791413	0,697679058	-0,42192558	0,689604702	-0,27899622	-0,75317037
PPARA	-0,40680373	-0,07648937	-1,06674951	-0,01407415	0,084448644	-0,9856385	-0,06352044	-0,3117085	-0,79549627
SLC12A2	1,466050089	0,594633085	1,394582924	1,542839231	1,168191886	1,321949971	1,007148952	1,795556048	1,381267879
ENTPD1	0,762640194	0,403599766	0,445549346	0,346974107	0,25206666	0,895626242	0,576093541	0,693713476	0,623449807
AREG	-0,76119814	-0,70622843	-0,52593258	-0,77123909	-0,94642474	-0,83291345	-1,18653877	-1,51802396	-0,84004952
ICAM1	0,147567625	0,486616883	0,978665741	0,731151224	0,718633792	0,757989823	0,526199307	0,644451631	0,729454662
IL6 (CD54)	1,302861592	1,31949439	0,965288167	1,278239473	1,256594997	1,176739852	1,22572438	0,623573087	0,984763974

Abkürzung	Gruppe6_200 4.03.16_1021 _id19	Gruppe6_200 4.04.07_6008 _id207	Gruppe6_200 4.08.24_6009 _id239	Gruppe6_200 4.03.24_6014 _id317	Gruppe6_200 4.06.15_6018 _id361	Gruppe6_200 4.04.27_6022 _id417	Gruppe6_200 4.06.22_6033 _id559	Gruppe6_200 4.04.21_6035 _id569	Gruppe6_200 4.04.05_6037 _id594
VEGF	0,126017497	0,278792251	0,418250337	0,424398834	0,501608755	0,507341208	0,772145664	0,11197068	0,538751213
ENG	1,368970637	1,196986649	1,293477523	1,345498251	1,167214879	0,896317718	1,406214024	1,126398858	0,964153352
IGF2	0,610714732	1,085517085	0,133674154	1,210579041	0,191669824	0,748898395	0,404115795	0,593951321	0,606743719
PGK1	0,849778156	1,002596217	1,157959905	0,678339839	0,779977816	0,644676824	0,238825025	0,191388918	0,833142227
SLC2A1	-0,05212658	0,329089264	0,18155823	0,44615444	0,200543587	0,648151024	0,418865069	0,730069633	0,169701987
TGFB3	-0,41488151	-0,34525355	-0,19040201	-0,23033823	-0,16570462	-0,12934362	-0,17718736	-0,36387575	-0,17474232
PLAUR	0,330225516	0,459071154	0,776624034	0,53938586	0,509324432	0,991047592	0,82105309	0,338548589	0,498244391
NOS2A	0,524117674	0,205210079	-0,04137926	0,321553822	0,315483949	0,009141557	0,038940892	0,516717808	0,402136486
IL1B	0,479258632	0,590891222	0,788876625	-0,16711517	0,67718748	0,086928167	0,88871347	-0,09585487	0,498244391
CD55	1,349644451	1,055359187	1,004291624	0,161299213	0,808250862	0,75459501	1,136349612	0,593244619	0,704839206
ITGB2	1,316447005	1,327007589	1,555878035	1,467377789	1,420526923	1,595858272	1,685570757	1,328091431	1,351818388
NT5E (CD73)	-0,08229529	-0,77795804	-1,02699448	-0,0658919	-0,42563371	-0,39119028	-0,48352613	-0,30982613	-0,60175857
PPARA	-1,02422374	-0,74207597	0,487393309	-0,86435402	0,124951641	-0,81849116	1,039828894	-0,75689332	-1,19764821
SLC12A2	0,824135189	1,240131595	1,365812017	1,21388925	1,511874444	1,871192463	1,470427724	1,595727759	1,554577615
ENTPD1	0,544229053	0,447476921	0,529192697	0,467245254	0,509324432	0,626970504	0,836282794	0,782580115	0,449110525
AREG	-0,61337996	-1,02970299	-1,04957402	-1,40593575	-1,16994813	-0,86339877	-1,00154539	-1,21748454	-0,87716152
ICAM1	0,338185236	0,577712825	0,810818594	0,819011121	0,750991639	0,782155679	0,671413316	0,067346122	0,721352404
IL6 (CD54)	1,36223997	1,325474898	1,44481759	1,477972639	0,932367621	0,953727672	0,97780954	1,035007741	0,881612373

Abkürzung	Gruppe6_200 4.10.12_6040 _id623	Gruppe6_200 5.10.12_6075 _id4051	Gruppe6_200 5.05.24_6091 _id890	Gruppe6_200 5.10.14_6114 _id1022	Gruppe6_200 5.10.20_6118 _id4019	Gruppe6_200 5.11.24_6147 _id1223	Gruppe6_200 4.02.20_8009 _id1413
VEGF	0,283064388	-0,25418966	0,30989189	0,097201139	-0,45695656	-0,2290487	0,366221712
ENG	1,322320044	0,900487751	1,299806909	1,000832242	0,768944451	1,235662021	1,215441505
IGF2	0,248750807	0,882026937	0,612375671	0,811397524	1,27134359	0,684054902	0,400680961
PGK1	0,900675028	0,879468132	0,997485122	0,964246536	0,393158053	0,494088791	0,858787841
SLC2A1	0,049609467	0,033392219	0,802257949	1,235516941	1,371470707	0,583072689	0,584829619
TGFB3	-0,55480192	-0,0354979	-0,34595261	0,054588244	-0,37397058	-0,01750714	-0,44793331
PLAUR	0,520055803	0,411353513	0,371443462	0,926025639	0,257032411	0,143473693	0,427855224
NOS2A	-0,25664195	0,0113542	0,33216104	0,105433259	0,293631413	0,277371385	0,268613787
IL1B	0,267766442	0,214680432	0,396006344	0,588293114	0,877242281	0,463395303	0,427855224
CD55	0,649652381	0,094637288	0,824526871	1,216842866	0,990711174	0,898355753	0,865525596
ITGB2	1,468955633	1,015337302	1,333385716	1,824063216	1,801299171	1,22589597	1,400869779
NT5E (CD73)	-0,48375744	0,700893456	-0,45406661	1,194226932	0,490484127	-0,42377146	-0,3607887
PPARA	-1,04644538	-0,32811529	-0,8659005	-0,08996222	0,234144811	-0,8681681	-1,01713261
SLC12A2	1,151219566	0,965433107	1,218428334	1,363211575	1,207791232	0,88636965	1,094266663
ENTPD1	0,617542851	0,04409054	0,458811069	0,88823189	0,907746481	0,379569734	0,655804083
AREG	0,469143108	-1,02255679	-0,98715474	-1,48121184	-1,06963881	-1,29352252	-0,77692811
ICAM1	0,588603622	0,653738799	0,839746806	0,786138	0,411422978	0,617018716	0,716138728
IL6 (CD54)	1,035732105	1,149593369	1,2007408	1,410912934	1,442077222	1,195873692	1,109849469

9. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. H. K. Eltzhig möchte ich mich für die Vergabe dieses hochinteressanten Themas sowie für die exzellente Einarbeitung, Betreuung und für die unermüdliche Bereitschaft bei Fragestellungen mit Ratschlägen hilfreich zur Seite zu stehen, bedanken. Ferner danke ich ihm für die geduldige Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt auch dem ärztlichen Direktor meiner Abteilung Herrn Prof. Dr. K. Unertl, der es mir ermöglichte, in der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin solch ein interessantes Promotionsthema zu bearbeiten.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Matthias Kohl für die viele Mühe, die er sich mit der statistischen Auswertung meiner Arbeit gemacht hat und ohne dessen Ausdauer die Bearbeitung dieses Themas nie erfolgreich verlaufen wäre.

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich auch bei Herrn Alessandro Romualdi und Herrn Christoph Zanke für die Mühe, die sie sich mit der Installation der Software gemacht haben.

Auch bei Herrn Dr. Peter Däubler möchte ich mich bedanken für seine Hilfe bei der Formatierung sowie bei Frau Anna Kozmenko für ihre Hilfe bei der Bearbeitung der Excel-Tabellen.

Sehr dankbar bin ich auch meinem Ehemann Dr. Stephan Wildermuth, der mir tatkräftig, moralisch und inhaltlich beratend zur Seite stand sowie meinen Eltern Dorothee Kim-Grebe und Prof. Dr. Kyuun-Jin Kim für die vielen Betreuungsstunden unseres Sohnes Nikolas und unserer Tochter Sarah, während ich diese Dissertation ausarbeitete.

10. Lebenslauf

Name Maria Wildermuth, geb. Kim
Geburtstag 04.05.1975
Geburtsort Tübingen

Schulbildung

1985-1985 Deutsche Schule Seoul, Süd-Korea
1985-1989 Fernschule „Institut für Lernsysteme“ in Seoul, Süd-Korea
1989-1990 Evangelisches Seminar Maulbronn
1990-1994 Uhland-Gymnasium Tübingen
17.06.1994 Allgemeine Hochschulreife
1994-1995 Freiwilliges Soziales Jahr, Behindertenheim Markgröningen

Studium

1995-2002 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
13.03.1998 Ärztliche Vorprüfung
23.03.1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24.08.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
31.10.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arbeitsstelle

2003-2004 Ärztin im Praktikum an der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Tübingen
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Unertl
Seit 01.08.2004 Approbation als Ärztin und Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Tübingen
Seit 10.05.2006 Elternzeit/Elternteilzeit