

**Charakterisierung von Mausmodellen kardiomyopathischer
Erkrankungen auf transkriptioneller Ebene**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich für Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Henning Witt
aus Neustadt in Holstein

Dezember 2008

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Patricia Ruiz am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin) und am Center for Cardiovascular Research der Charité (Berlin) in der Zeit von November 2003 bis Dezember 2008 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Patricia Ruiz
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 20.7.2009

Ich danke Patricia Ruiz für die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Ihre hilfsbereite und immer offene Art und die Förderung von Konferenz-Besuchen und von Kooperationen mit anderen Wissenschaftlern ermöglichten mir eine vielfältige und inspirierte wissenschaftliche Tätigkeit.

Ich danke Oliver Bauer, Claus Hultschig und Florian Wagner für die Zusammenarbeit bei der Evaluierung von Protokollen zur Array-Herstellung und deren Produktion.

Ich danke Paulus Kirchhof, Larissa Fabritz und Melanie Zwiener für die Kooperation zur Charakterisierung des Phänotyps von heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen.

Ich danke Aydah Sabah für die Durchführung unzähliger PCR-Amplifikationen zur Herstellung von Arrays und Genotypisierungen.

Ich danke Julia Pfitzner für die Durchführung von quantitativen RT-PCR Messungen zur Bestätigung von Array-Daten.

Ich danke Alistair Garratt für die zur Verfügung Stellung von kardialen Gewebe von ErbB2 *knockout* Mäusen.

Ich danke Cecilia Hertig für die zur Verfügung Stellung von kardialen Gewebe von ErbB4 *knockout* Mäusen und Doxorubicin behandelten Mäusen.

Ich danke Elisabeth Ehler für die zur Verfügung Stellung von kardialen Gewebe von MLP *knockout* Mäusen.

Ich danke Reinhard Pregla, Vera Regitz-Zagrosek und Hugo A. Katus für die zur Verfügung Stellung von humanem kardialen Gewebe.

Ich danke Ute Ungethuem für ihre Unterstützung bei dem Scannen von Arrays und der Hybridisierung von Affymetrix Arrays.

Ich danke Eike Staub, Rainer Spang, Detlev Mennerich, Frank Wittchen, Mario Drungowski, Ralf-Jürgen Kuban und Dirk Klingbiel für die Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung von Arraydaten.

Ich danke Rudi Lurz für die Zusammenarbeit bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von kardialen Maus-Gewebe.

Für meine Eltern

1 EINLEITUNG	9
1.1 Kardiomyopathien	9
1.1.1 Dilatative Kardiomyopathie	9
1.1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie	11
1.1.3 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	12
1.2 Mausmodelle kardiomyopathischer Erkrankungen	13
1.2.1 Plakoglobin <i>knockout</i> Mauslinie	13
1.2.2 MLP <i>knockout</i> Mauslinie	14
1.2.3 ErbB2- und ErbB4 <i>knockout</i> Mauslinie	15
1.2.4 Doxorubicin-behandelte Mäuse	16
1.3 Mikroarray-Technologie	17
1.3.1 Anwendungsgebiete der Array-Technologie: Ein Überblick	17
1.3.2 Detektion differentieller Genexpression	18
1.3.3 Mustererkennung durch Clustering	19
1.3.4 Explorative Werkzeuge für große Sätze von Genen	21
1.3.5 Charakterisierung von Tiermodellen durch Genexpressionsprofile	24
1.3.6 Charakterisierung der dilatativen Kardiomyopathie durch Genexpressionsprofile	26
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	27
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Humanes und murines Probenmaterial	29
2.1.1 Tierhaltung und eingesetzte Mausmodelle	29
2.1.2 Gewebeentnahme und Genotypisierung von Plakoglobin <i>knockout</i> Mäusen	30
2.1.3 Humanes myokardiales Probenmaterial	31
2.2 RNA-Isolation und Amplifikation	32
2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA	32
2.2.2 Überprüfung der RNA-Qualität	32
2.2.3 Lineare Amplifikation von mRNA-Populationen	33
2.3 Generierung eines radioaktiven PCR-Produkts	37
2.4 cDNA-Makroarrays des Human Unigene Set II	38
2.4.1 Array-Format	38
2.4.2 Komplexe Hybridisierungen mit cDNA-Makroarrays	39
2.5 Humaner kardialer Themenarray	40
2.5.1 Array-Format	40
2.5.2 cDNA-Mikroarray Herstellung	41
2.5.3 Oligonukleotid-Hybridisierung zur Überprüfung der cDNA-Mikroarray Qualität	43
2.5.4 Komplexe Hybridisierungen mit cDNA-Mikroarrays	43
2.6 Affymetrix Gene Chip Mouse Genome 430A Mikroarray	46
2.6.1 Array-Format	46
2.6.2 Oligo-Mikroarray Herstellung	47
2.6.3 Komplexe Hybridisierungen mit Affymetrix Gene Chip Mouse Genome 430A-Mikroarrays	47
2.7 Agilent Mouse cDNA-Mikroarray	48
2.7.1 Array-Format	48
2.7.2 cDNA-Mikroarray Herstellung	49

2.7.3 Komplexe Hybridisierungen mit Agilent Mouse cDNA-Mikroarrays	49
2.8 Auswertung und Statistik von Array-Daten	49
2.8.1 Bildauswertung radioaktiver cDNA-Makroarrays	49
2.8.2 Bildauswertung der herzspezifischen cDNA-Mikroarrays	50
2.8.3 Bildauswertung der Affymetrix Gene Chip Mouse Genome 430A Mikroarrays	51
2.8.4 Bildauswertung der Agilent Mouse cDNA-Mikroarrays	51
2.8.5 Normalisierung	51
2.8.6 Differentielle Genexpression	53
2.8.7 Hierarchisches Clustering	56
2.8.8 Funktionelle Annotation von Gruppen von Genen mit DAVID	58
2.8.9 Erstellen von Netzwerken von interagierenden Genen	58
2.8.10 Standardisierung und Veröffentlichung von Array-Datensätzen	58
2.9 Quantitative RT-PCR	59
2.10 Sequenzierung von Plasmiden nach der Kettenabbruchmethode	62
2.10.1 Plasmid-Präparation	62
2.10.2 Sequenzierungsreaktion	63
2.10.3 Ethanolfällung und Bestimmung der Sequenz	63
2.11 Messung der Herzfunktion in der Maus	64
2.12 Elektronenmikroskopie	64
2.13 Lösungen und Puffer	65
3 ERGEBNISSE	68
3.1.1 Evaluierung von amplifizierter RNA und Gesamt-RNA als Startmaterial in komplexen Hybridisierungen und quantitativer RT-PCR	69
3.1.2 Vergleich von Protokollen zur Mikroarray-Herstellung	74
3.1.3 Design eines humanen kardialen Themenarrays	79
3.2.1 Genexpressionsprofile humaner DCM-Gewebe mit kardialen Themenarrays	81
3.2.2 Genexpressionsprofile von MLP-, Plakoglobin-, ErbB2-, ErbB4 <i>knockout</i> Mäusen und Doxorubicin-behandelten Mäusen mit cDNA- Mikroarrays	82
3.2.3 Validierung von Array-Ergebnissen durch RT-PCR	95
3.3.1 Phänotypische Charakterisierung von heterozygoten Plakoglobin <i>knockout</i> Mäusen	97
3.3.2 Genexpressionsprofile von heterozygoten Plakoglobin <i>knockout</i> Mäusen	99
3.3.3 Zelladhäsionskomplexe in heterozygoten Plakoglobin <i>knockout</i> Mäusen	101
4 DISKUSSION	102
4.1 Genexpressionsanalysen mit minimalen RNA-Startmengen	103
4.2 Herstellung von kardialen Themenarrays mit optimierten Protokollen	105
4.3 Genexpressionsmuster von Mausmodellen kardiomyopathischer Erkrankungen	107
4.4 Genexpressionsmuster der DCM in Mensch und Maus	114
4.5 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie in heterozygoten Plakoglobin <i>knockout</i> Mäusen	116
5 ZUSAMMENFASSUNG	119
6 AUSBLICK	121

7 REFERENZEN	124
8 VERÖFFENTLICHUNGEN	148
9 APPENDIX	151
9.1 Weitere Abbildungen und Tabellen	151
9.2 Primer Sequenzen	156
9.3 Listen der differentiell exprimierten Gene	159
9.3.1 kardialer Themenarray	159
9.3.2 cDNA Mikroarray	162

Abkürzungen

aRNA	amplifizierte RNA
ARVC	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery</i>
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EF	Ejektionsfraktion
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
FPR	Falsch-Positiv-Rate
FS	<i>fractional shortening</i>
GO	<i>gene ontology</i>
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RCM	restriktive Kardiomyopathie
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>realtime</i> Polymerase Kettenreaktion
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
SAM	<i>significance analysis of microarrays</i>
TAC	transversale aorte Konstriktion

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien werden als Erkrankungen definiert, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen (WHO/ISF *task force*)¹. Sie können durch veränderte Ventrikelwanddicken, Kammergrößen, Kontraktilität, Relaxation, Konduktion und Rhythmus charakterisiert sein. Nach WHO-Klassifikation werden primäre bzw. spezifische Kardiomyopathien mit bekannter Ätiologie von den idiopathischen mit unklarer Ätiologie abgegrenzt. Eine Vielzahl an Faktoren kann zur Entstehung einer Kardiomyopathie beitragen; hierzu zählen ischämische, valvuläre, metabolische, nutritive, toxische oder physikalische Schädigungen oder aber sie stehen z.B. im Zusammenhang mit Tumorinfiltrationen, Neuro- oder Myopathien. Hinzu kommen neben diesen erworbenen Kardiomyopathien die angeborenen, welche durch einen genetischen Defekt hervorgerufen werden.

Es erfolgt eine Klassifikation in fünf Hauptformen: die dilatative Kardiomyopathie (DCM), die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), die restriktive Kardiomyopathie (RCM), die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) und die unklassifizierbaren Kardiomyopathien. Die dilatative und die hypertrophe Kardiomyopathie stellen die am häufigsten auftretenden Formen dar².

1.1.1 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Dilatation und eingeschränkte Kontraktilität des linken Ventrikels oder beider Ventrikel charakterisiert. Die DCM hat eine Prävalenz von 36,5 auf 100.000 Einwohner in den Vereinigten Staaten³ und mit einer Mortalität von 36% nach fünf Jahren eine ausgesprochen schlechte Prognose⁴. Bei fortschreitendem Verlauf der Erkrankung treten häufig Herzinsuffizienz, Arrhythmien und plötzliches Herzversagen auf. Mikroskopisch können verschmälerte und dilatierte Herzmuskelfasern beobachtet werden und die Anzahl an Kardiomyozyten ist durch Apoptose reduziert (siehe Abbildung 1). Myofilamente sind in ihrer Struktur gestört und Zellkerne können vergrößert und abnorm verformt sein. In Folge dieser Veränderungen tritt interstitielle Fibrose des Herzmuskels auf, deren Ausmaß mit dem Auftreten ventrikulärer Arrhythmien korreliert.

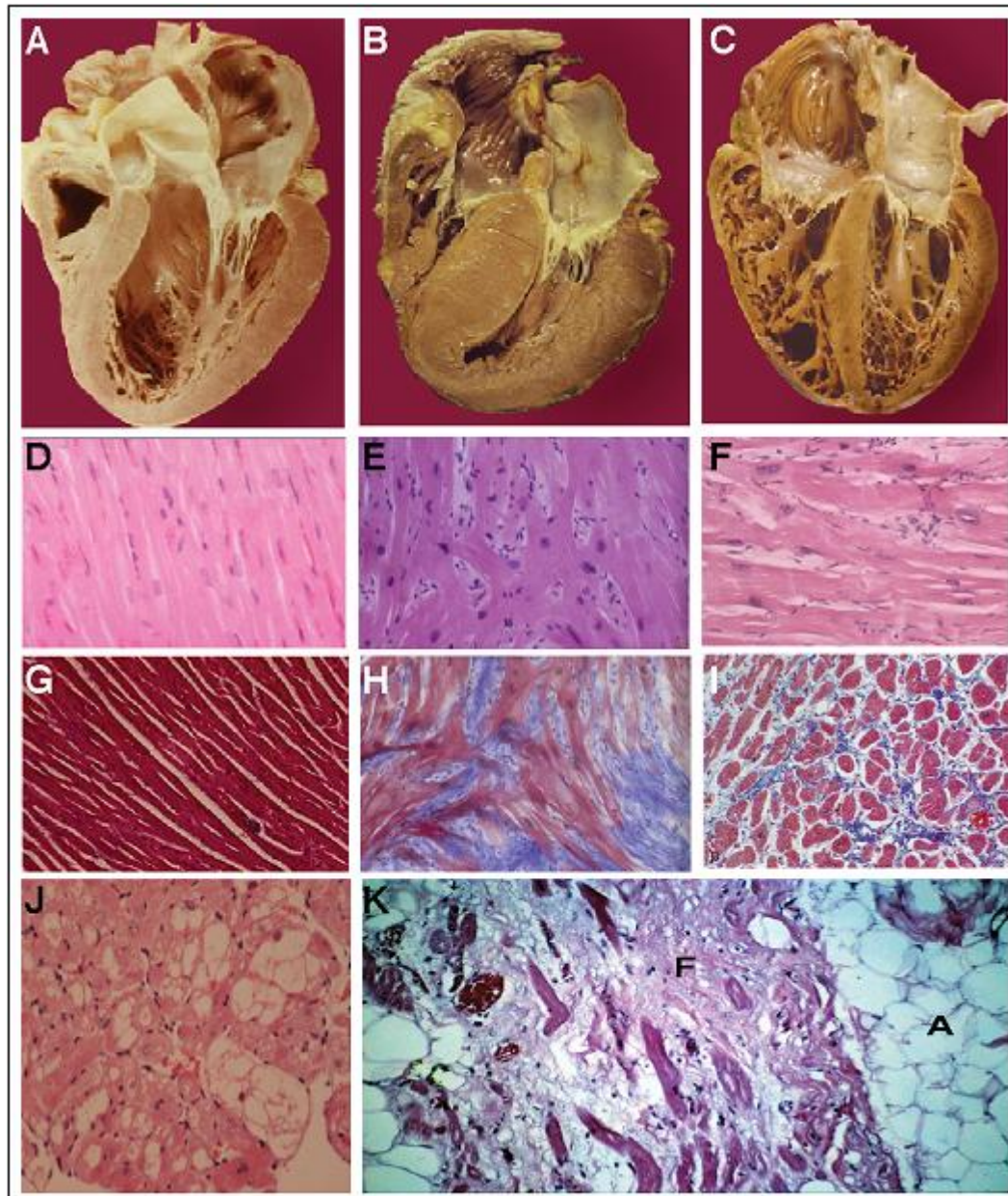


Abbildung 1: Anatomische und histologische Charakteristika in Kardiomyopathien.

Morphologische Veränderungen des gesunden Herzens (A, D, G) führen zu einer Hypertrophie (B) bzw. Dilatation (C). Bei der HCM verlieren die Kardiomyozyten ihre geordnete Struktur (E) und es tritt Fibrose auf (blau, H). Bei der DCM ist die Anzahl der Kardiomyozyten durch Apoptose reduziert (F) und es tritt in Folge dessen ebenso Fibrose auf (blau, I). Bei der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie ersetzt adipöses und fibrotisches Gewebe das Myokard (K) und bei Glykogen-Kardiomyopathien kann eine große Anzahl an Vakuolen in den Kardiomyozyten auftreten (J). Adaptiert von Ahmad et al.⁵ (2005).

Die Invasion von Lymphozyten in das Myokard und die Ausbildung von Inflammationsherden ist häufig zu beobachten. Ursächlich hierfür sind eventuell

Infektionen mit unterschiedlichen Viren, die bei knapp 70% der Patienten nachweisbar sind⁶. Es ist allerdings unklar, welchen Anteil hieran für die DCM ursächliche oder aber begleitende Infektionen bilden.

Sowohl bei der HCM als auch bei der DCM stellen Mutationen in diversen Genen einen Auslöser für die Erkrankung dar; so sind bei 35% aller DCM-Patienten Verwandte ersten Grades ebenfalls von der Erkrankung betroffen. Bisher wurden folgende Mutationen als DCM-assoziiert beschrieben: *lamin A/C*, *cardiac troponin T2*, *titin*, *desmin*, *δ-sarcoglycan*, *thmopoietin*, *phospholamban*, *troponin C*, *metavinculin*, *cypher/ZASP*, *cardiac myosin binding protein C*, *cardiac muscle LIM Protein*, *ATP-sensitive potassium-channel*, *β-myosin heavy chain*, *cardiac actin*, *α-tropomyosin*, *telethonin*, *troponin I*, *dystrophin* und *tafazzin*⁷. Mutationen in Genen, deren Proteine zur Zusammensetzung des Sarkomers beitragen, können sowohl HCM wie DCM hervorrufen und auch Mutationen in ein und dem selben Gen (z.B. β myosin heavy chain) können zu beiden Kardiomyopathieformen führen. Mutationen in Genen, die in der Kalziumhomöostase und der Kraftübertragung vom Sarkomer zur extrazellulären Matrix (Desmosom, Dystrophin Komplex) eine Rolle spielen, führen meistens zu DCM. Mutationen in Genen, die im Metabolismus oder in der Organogenese eine Rolle spielen, führen hingegen meistens zu HCM.

1.1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist durch eine links- un/oder rechtsventrikuläre Hypertrophie charakterisiert, die in der Regel asymmetrisch ist und auch das interventrikuläre Septum betrifft. Das enddiastolische und/oder das endsystolische linksventrikuläre Volumen kann normal oder verkleinert sein.

Anhand der Hämodynamik wird die hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) mit Ausbildung eines Druckgradienten während der Systole von der hypertrophen nichtobstruktiven Kardiomyopathie (HNOCM) ohne Ausbildung eines Druckgradienten unterschieden. Makroskopisch erscheinen die Herzen bei erhöhtem Gewicht vergrößert und kugelförmig. Mikroskopisch ist eine Vergrößerung der Kardiomyozyten mit einer abnormen Anordnung der Myokardfasern zu beobachten. Zellkerne können abnorm verformt sein. Zudem tritt Mitochondriose und Fibrose mit verstärkter Bildung von extrazellulärer Matrix auf (siehe Abbildung 1). Aufgrund dieser strukturellen Veränderungen entsteht bei Kontraktion eine unzureichend ausgerichtete Kraftentfaltung. In Folge dessen steigt die biomechanische

Beanspruchung des Gewebes weiter an und bedingt das Fortschreiten der Erkrankung.

Die HCM hat eine Prävalenz von 200 auf 100.000 Einwohner⁸ und für ca. 70% der Fälle wird eine krankheitsverursachende Mutation angenommen. Bisher wurden dominante Mutationen in den Genen *β-myosin heavy chain*, *cardiac myosin-binding protein C*, *cardiac troponin T*, *cardiac troponin I*, *essential myosin light chain*, *regulatory myosin light chain*, *α-tropomyosin*, *cardiac actin*, *slow skeletal and cardiac muscle troponin C*, *α-myosin heavy chain*, *muscle LIM protein*, *myosin light chain kinase 2*, *LIM binding domain 3*, *Telethonin*, *vinculin/metavinculin*, *α-actinin 2*, *phospholamban*, *myozenin*, *junctional protein 2* und *titin* beschrieben⁹. Mutationen in dem *myosin-binding protein C* und *β-myosin heavy chain* werden für ca. 82% dieser familiären HCMs verantwortlich gemacht (42% bzw. 40%)¹⁰.

Neben diesen pathologischen Formen der Myokardhypertrophie gibt es die physiologische Hypertrophie. Sie stellt eine notwendige Anpassung des Herzmuskels an eine gesteigerte Leistungsanforderung, z.B. bei Sportlern oder während der Schwangerschaft, dar. Sie führt zu einer erhöhten Pumpleistung des Herzens und ist im Gegensatz zur pathologischen Form zumindest weitestgehend reversibel.

1.1.3 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine vorwiegend den rechten Ventrikel betreffende Herzmuskelerkrankung, welche sich meist zwischen dem 15. und dem 40. Lebensjahr durch das Auftreten ventrikulärer Tachykardien manifestiert. Männer sind häufiger betroffen als Frauen und insbesondere in der frühen Krankheitsphase treten Symptome nach körperlicher Belastung auf. Der plötzliche Herztod ist allerdings häufig das erste offensichtliche Symptom für die ARVC. Typische mikroskopische Befunde bei ARVC sind die Substitution des myokardialen Gewebes durch Fettgewebe und fibrotisches Gewebe (siehe Abbildung 1). In Folge dessen kommt es regional oder global zu einer Dilatation und das fibrotische arrhythmogene Substrat führt zu einer lokal verzögerten Erregungsleitung. Mutationen in mehreren Genen werden für die Entstehung der ARVC verantwortlich gemacht: Neben autosomal dominanten in z.B. dem *cardiac ryanodine receptor*¹¹ sind im Gegensatz zur DCM und HCM bisher auch vier rezessive beschrieben worden. Diese betreffen mit *plakophilin 2*¹², *desmoglein 2*¹³, *desmoplakin* (dominant¹⁴ und rezessiv, Carvajal Erkrankung¹⁵) und

Plakoglobin^{16,17} (Naxos Erkrankung) ausschließlich Gene, deren Proteine Bestandteil des Desmosoms sind.

1.2 Mausmodelle kardiomyopathischer Erkrankungen

1.2.1 Plakoglobin *knockout* Mauslinie

Die *intercalated disc* verbindet Kardiomyozyten miteinander und ermöglicht die synchronisierte Kontraktion des Myokards. Sie bestehen aus *adherens junctions* (Verknüpfung des Aktin-Zytoskeletts), *gap junctions* (Übertragung des Aktionspotentials) und Desmosomen (Verknüpfung der Intermediär-Filamente).

Adherens junctions und Desmosomen bestehen unter anderem aus Mitgliedern der Armadillo-Genfamilie, welche dort die zytoplasmatische Domäne der Cadherine mit zytoskeletalen Linkerproteinen (z.B. α -Catenin, Vinculin und Desmoplakin) verbinden. *Adherens junctions* und Desmosomen stellen somit essentielle interzelluläre Proteinkomplexe dar, die die Aktin- bzw. Intermediärfilamente zweier Zellen miteinander in biomechanischen Kontakt bringen, wobei die meisten der Protein-Protein- Interaktionen über die Armadillo-Domäne vermittelt werden. Zwei wichtige Armadillo-Adapter-Proteine sind β -catenin und Plakoglobin (γ -catenin). β -Catenin bindet ausschließlich klassische Cadherine und ist vorrangig in den *adherens junctions* zu finden, wohingegen Plakoglobin an klassische und desmosomale Cadherine bindet und somit in *adherens junctions* und Desmosomen vorkommt.

Entsprechend dieser wichtigen Funktion bei der Verbindung der Zytoskelette zweier Zellen ist Plakoglobin für die Gewebeintegrität in biomechanisch beanspruchten Geweben essentiell. So führen der *knockout* in der Maus und rezessive Mutationen im Menschen (siehe 1.1.3) zu schweren Defekten. Bei Embryonen der Plakoglobin *knockout* Mauslinie kann das myokardiale Gewebe der zunehmenden biomechanischen Beanspruchung während der Entwicklung nicht standhalten und es strömt Blut in den perikardialen Raum, so daß der homozygote *knockout* embryonal letal (E12 bis E16) ist¹⁸. Zusätzlich zu diesem kardialen Phänotyp treten Defekte in der Haut auf (einzelne Schichten lösen sich voneinander)¹⁹. Auf mikroskopischer Ebene sind eine reduzierte Anzahl und veränderte Struktur der Zell-Zell-Kontakte zu beobachten. Rezessive Mutationen im Menschen, z.B. bei der Naxos Erkrankung, verursachen bei den Patienten ARVC, wolliges Haar und palmoplantare

Keratoderma. Bei dieser Erkrankung führt die Deletion von zwei Basen zu einem Abbruch der Translation und dadurch zu einer C-terminalen Verkürzung des Proteins um 56 Aminosäuren. Diese Verkürzung verhindert eine Lokalisation des Proteins in den Desmosomen und *adherens junctions* und somit kann es für die Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte seine Funktion nicht mehr erfüllen²⁰.

Zusätzlich zu dieser Funktion von Plakoglobin und β -Catenin bei Zell-Zell-Kontakten und den daraus resultierenden strukturell bedingten Phänotypen bei knockout Mäusen erfüllen beide Proteine eine wichtige Funktion in dem Wnt-Signaltransduktionsweg. Liegt β -Catenin nicht gebunden in Zelladhäsionskomplexen sondern frei im Zytoplasma vor, kann es in den Zellkern wandern und dort zusammen mit Mitgliedern der Tcf-Familie von Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl an Genen aktivieren, die z.B. in der Embryonalentwicklung oder Tumorgenese involviert sind²¹. Die Translokation von *β -catenin* in den Nukleus wird über dessen Degradation kontrolliert: Ein Komplex aus *tumor suppressor adenomatous polyposis gene* (APC), *axin*, *Thr/Ser protein kinase*, $CKI\alpha$ und *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) phosphoryliert sowohl *β -catenin* als auch Plakoglobin und nach einer folgenden Poly-Ubiquitinierung durch *β -TrCP ubiquitin ligase* wird das jeweilige Protein im Proteasom abgebaut²². Plakoglobin kann indirekt durch Einwirken auf die Degradation von *β -catenin* Tcf-vermittelte Transkription aktivieren²³. Hingegen bei direkter Interaktion mit Tcf wird die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA unterdrückt, so daß Plakoglobin dann als negativer Regulator des *β -catenin*-Tcf Transkriptionskomplexes agiert²⁴. Dementsprechend führt die Überexpression von Plakoglobin oder *β -catenin* z.B. in der Epidermis zu gegensätzlichen Effekten: *β -catenin* fördert Proliferation und Haarfollikelbildung und Plakoglobin unterdrückt diese Vorgänge^{25,26}.

1.2.2 MLP *knockout* Mauslinie

Muscle LIM protein (MLP) gehört zu der Familie der LIM-Domänen-Proteine. Es lokalisiert abhängig vom Entwicklungsstadium im Zellkern oder im Zytoplasma, wo es bevorzugt mit den Aktin-Filamenten und der Z-Disk-Region der Muskelzellen interagiert²⁷. Homozygote *knockout* Mäuse zeigen ein stark vergrößertes Herz und typische Symptome einer DCM²⁸. So sind die Wände des linken Ventrikels dünner als bei Wildtyp-Mäusen und die kontraktile Funktion ist beeinträchtigt²⁹. Bereits vor Ausprägung des Phänotyps einer DCM sind bei jungen Mäusen eine diastolische

Dysfunktion zu beobachten³⁰ und bei fortgeschrittenem Phänotyp kommt es zu einer lokalen Reduktion der Anzahl an Mitochondrien und somit zu einer eingeschränkten Energieversorgung des Herzmuskels³¹. Zusätzlich entwickeln sich strukturelle Veränderungen auf Ebene der *intercalated discs*: Proteine der *adherens junctions* treten vermehrt auf, Proteine der *gap junctions* treten vermindert auf. Proteine der Desmosomen sind hingegen unverändert³². Ein *knockout* von *phospholamban*, eines Inhibitors der muskelspezifischen SERCA2a Kalziumpumpe des Sarkoplasmatischen Retikulums, in Kombination mit dem *knockout* von MLP verhindert vollständig die Ausprägung des Phänotyps einer DCM³³; ein Effekt, welcher bei genetischen Modellen für HCM nicht zu erzielen ist³⁴.

Mutationen im MLP Gen führen im Menschen analog zum Mausmodell zur DCM³⁵. Dieser Phänotyp ist verbunden mit Änderungen im MLP/T-cap Komplex, welcher als Sensor für die biomechanische Beanspruchung des Kardiomyozyten fungiert.

1.2.3 ErbB2- und ErbB4 *knockout* Mauslinie

Alle vier Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie (EGFR (ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4)) besitzen vier extrazelluläre Domänen mit hoher struktureller Homologie, eine einzelne Transmembran-Domäne und eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne. Nur EGFR und ErbB4 sind in Hinblick auf die Ligandenbindung und Kinase-Aktivität voll funktionell. ErbB3 zeigt nur eine schwache Kinaseaktivität und für ErbB2 wurde bisher keine Ligandenbindung nachgewiesen. Die Bindung eines Liganden (z.B. *neuregulin* oder *epidermal growth factor*) induziert Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors, welches für die Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität essentiell ist. Dies führt in einem ersten Schritt zur Auto-Phosphorylierung des Rezeptors und anschließend zur Rekrutierung von Adapter-Proteinen (z.B. Src, Shc oder Nck), die dann weiterführende Signaltransduktionswege ansprechen. ErbB-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion ist in zahlreiche biologische Prozesse wie z.B. Apoptose, Migration, Wachstum oder Differenzierung involviert.

ErbB2 wird bei einem hohen Prozentsatz (20-30%) von Brustkrebspatientinnen überexprimiert oder amplifiziert gefunden. Ein humanisierter monoklonaler Antikörper (Herceptin/Trastuzumab von Genentech und Roche), der gegen die extrazelluläre Domäne von ErbB2 gerichtet ist, unterdrückt das Tumorwachstum erfolgreich. Allerdings führt eine Behandlung mit Herceptin insbesondere in Kombination mit Chemotherapeutika häufig zur Entstehung von Kardiomyopathien³⁶. Wird Herceptin

als Folgetherapie nach Anthrazyclinen verabreicht, so zeigen 7% der Patienten kardiale Dysfunktionen und bei gleichzeitiger Verabreichung beider Medikamente 28% der Patienten^{37,38}. ErbB2, ErbB4 und *neuregulin-1*-defiziente Mäuse sind embryonal letal und zeigen Störungen in der Herzentwicklung^{39,40,41}. Mäuse mit einer herzspezifischen Inaktivierung von ErbB2 oder ErbB4 erreichen das Erwachsenenalter, entwickeln aber wenige Monate nach der Geburt eine schwere DCM und zeigen eine gestörte Trabekulation^{42,43,44}. Inwieweit ein verstärktes Auftreten von Apoptose, z.B. unter Streßbedingungen (Gabe von Anthrazyclinen oder erhöhte Druckbelastung), für die Entstehung des Phänotyps ursächlich ist, bleibt anhand der publizierten Daten widersprüchlich⁴⁵.

1.2.4 Doxorubicin-behandelte Mäuse

Doxorubicin, ein Quinon-enthaltendes Anthrazyclin, stellt derzeit eines der effektivsten Zytostatika dar, es wird bei unterschiedlichen malignen Tumoren eingesetzt. Unglücklicherweise ist jedoch die klinische Anwendbarkeit durch schwere Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität stark eingeschränkt⁴⁶. Es können in Folge einer Behandlung z.B. Myokarditis, linksventrikuläre Fehlfunktionen oder Arrhythmien auftreten⁴⁷. Die durch Doxorubicin verursachten Schäden können bei einzelnen Patienten erst Jahre nach der Behandlung zu klinisch feststellbaren Kardiomyopathien führen. Der Grad der Schädigung verhält sich proportional zu der verabreichten kumulierten Dosis.

Die dieser Schädigung des Myokards zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden. Eine Hypothese geht davon aus, daß Doxorubicin an der inneren Membran der Mitochondrien einen Komplex mit cardiolipin bildet, die Quinon-Komponente ein Elektron der *NADH dehydrogenase* des Komplex 1 übernimmt und dieses auf molekularen Sauerstoff überträgt^{48,49}. Dadurch entstehende Radikale (reactive oxygen species, ROS) schädigen dann die Kardiomyozyten auf verschiedenen Ebenen. Dementsprechend können verschiedene anti-oxidative Substanzen die Kardiotoxizität von Doxorubicin reduzieren⁵⁰.

Des Weiteren sind Veränderungen der kardialen Genexpression, Veränderungen in der Kalziumhomöostase sowie die vermehrte Apoptose von Kardiomyozyten und eine Reduktion der mitochondrialen Funktion nach Behandlung mit Doxorubicin zu beobachten. Welcher dieser Vorgänge die primäre Ursache für die Entstehung der

Kardiomyopathie ist oder nur sekundär auftritt, konnte bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden.

1.3 Mikroarray-Technologie

1.3.1 Anwendungsgebiete der Array-Technologie: Ein Überblick

Die sogenannte Mikroarray-Technologie hat sich in den letzten Jahren eine Vielzahl von Anwendungsgebieten erschlossen und wird sowohl in der Forschung als auch zunehmend in der Diagnostik eingesetzt. Die Art des zu untersuchenden Zielmoleküls ("target") gestattet eine grobe Unterteilung der Mikroarray-Technologie. Mikroarrays mit RNA als Zielmolekül werden in erster Linie zur Erstellung von Genexpressionsprofilen eingesetzt. Das heißt, es werden die Expressionsniveaus einer Vielzahl von Genen auf Transkriptebene gemessen. Hierzu werden auf einem Mikroarray PCR-Produkte oder Oligo-Nukleotide immobilisiert oder durch gerichtete Synthese aufgebracht. Gängige Formate sind genomweite, themenspezifische oder diagnostische Mikroarrays. Auf einem Array können tausende bis Millionen einzelner Oligo-Nukleotide Platz finden, so daß mittlerweile eine Auflösung bis auf die Ebene der einzelnen Exone aller Gene eines Organismus möglich ist (z. B. Affymetrix Exon Arrays).

Mikroarrays mit DNA als Zielmolekül werden für die Untersuchung von chromosomalen Veränderungen ("complex genomic hybridisation", CGH) z. B. bei Krebs genutzt. Zudem ist es möglich, mit Kartierungsarrays nach dem Auftreten von "single nucleotide Polymorphisms" (SNPs) zu suchen und dadurch eine Haplotypenkarte eines Individuums zu erstellen. Sogenannte "tiling"-Arrays (Oligo-Nukleotide über das gesamte Genom verteilt) oder aber Promotor-Arrays (Oligo-Nukleotide über die Promotor-Region eines jeden Gens verteilt) werden für "ChIP on Chip" Anwendungen genutzt. Hierbei wird in einem ersten Schritt mit einem spezifischen Antikörper ein Transkriptionsfaktor gebunden an die entsprechenden Promotoren der DNA isoliert (Chromatin Immunpräzipitation, ChIP) und anschließend, ausgehend von den mitgefällten DNA-Fragmenten, eine Sonde zur Hybridisierung auf "tiling"- bzw. Promotor-Arrays hergestellt. So entsteht ein genomweites *in vivo*-Bild der Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren an

einzelne Promotoren. Weitere Anwendungen konzentrieren sich z.B. auf Resequenzierung oder Genotypisierung.

Mikroarrays mit Protein als Zielmolekül dienen zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Antikörper-Interaktionen, Protein-DNA-Interaktionen und zur Bestimmung von Enzymaktivitäten. Entsprechend der Anwendung können Proteine, Antikörper oder aber auch doppelsträngige DNA auf der Array-Oberfläche immobilisiert sein. Mikroarrays mit Antikörpern als Zielmolekül werden z.B. zur Untersuchung von Patientenseren nach Auto-Antikörpern genutzt; auf ihrer Oberfläche befinden sich dementsprechend immobilisierte Proteine.

1.3.2 Detektion differentieller Genexpression

Das vergleichsweise einfachste Experiment stellt der Vergleich zweier Zustände wie z.B. Wildtyp gegen *knockout*, krank gegen gesund oder behandelt gegen unbehandelt dar. Zur Identifikation von deregulierten Genen zwischen diesen beiden Zuständen gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Vorgehensweisen: Bei der ersten wird unter Berücksichtigung der zu erwarteten Heterogenität der biologischen Proben, der technischen Reproduzierbarkeit der Hybridisierungen und der Anzahl der parallel zu vermessenden Genaktivitäten eine für eine statistische Betrachtung ausreichende Anzahl an Mikroarrays eingesetzt. Ein solches Experiment liefert eine Liste an Genen mit einem Ratio der Genexpression und einer statistischen Kenngröße für die Aussagesicherheit der Deregulation. Bei der zweiten Vorgehensweise wird auf eine größere Anzahl an Replika verzichtet (z.B. nur 1 oder 2 Arrays pro Zustand), so daß die resultierende Liste an Genen neben dem Ratio der Genexpression keine statistische Kenngröße beinhaltet. Um trotzdem eine Aussagesicherheit abzuschätzen, können unterstützend Informationen wie z.B. die Signalintensität eines Gens im Vergleich zur Hintergrundintensität herangezogen werden. Insbesondere bei sehr heterogener Genexpression innerhalb der Zustände oder sehr schwachen Signalintensitäten eines Gens kann bei dieser Vorgehensweise die Falsch-Positiv-Rate sehr hoch liegen. Trotzdem haben beide Strategien ihre Berechtigung; sie unterscheiden sich in der Aussagesicherheit der Ergebnisse und auch in ihren Kosten bzw. ihrem experimentellen Aufwand.

Wird eine statistische Beurteilung der Signifikanz der potentiell deregulierten Gene angestrebt, ist dem Experiment vorhergehend eine Abschätzung der benötigten Arrays bzw. biologischen Proben erforderlich. Aufgrund unvollständiger oder ungenauer Informationen bezüglich der technischen und biologischen Variabilität der

einzelnen Meßgrößen und deren Verteilungen gestaltet sich eine solche Vorhersage jedoch schwierig. Theoretische statistische Abschätzungen gehen bei angestrebten angemessenen Sensitivitäten (Ratio der Genexpression kleiner 2) von mehreren dutzend benötigten biologischen Proben bzw. Arrays aus^{51,52}. Diese theoretischen Betrachtungen entsprechen allerdings nur ungenügend der experimentellen Praxis, bei der sich in der Regel auf die Betrachtung der Heterogenität des Phänotyps und Auswahl eines möglichst sensitiven Array-Formats beschränkt wird.

Bei der statistischen Auswertung der Hybridisierungen zweier Zustände tritt ein grundsätzliches Problem auf: Einer häufig geringen Anzahl an Replika pro Zustand (s.o.) stehen tausende parallel durchzuführende statistische Tests der einzelnen Gene (z.B. bei genomweiten Array-Formaten) gegenüber. Dieses sogenannte "multi-testing"-Problem führt z.B. bei der Anwendung eines t-Tests zu nicht mehr sinnvollen Signifikanzwerten und zudem wird die Falsch-Positiv-Rate stark von der absoluten Anzahl an Positiven beeinflusst. Zur Korrektur des "multi-testing"-Problems bzw. Bestimmung der Falsch-Positiv-Rate werden modifizierte t-Tests als auch permutationsbasierte Tests eingesetzt. Modifizierte t-Tests konzentrieren sich häufig auf eine Korrektur der berechneten Standardabweichungen der Verteilungen beider Zustände. In Ermangelung einer ausreichenden Anzahl an Replika können diese bei einzelnen Genen insbesondere bei geringer Signalintensität zufällig sehr kleine Werte annehmen und dadurch eine nicht vorhandene Meßgenauigkeit vortäuschen. Permutationsbasierte Tests hingegen (z.B. Significance Analysis of Microarrays, SAM) berechnen die statistische Signifikanz durch den Vergleich einer berechneten statistischen Kenngröße bei richtiger Zuordnung der Replika zu den beiden zu analysierenden Zuständen mit einer Vielzahl von berechneten statistischen Kenngrößen bei frei permutierter Replika-Zuordnung zu den beiden Zuständen⁵³.

1.3.3 Mustererkennung durch Clustering

Bei der Analyse von Genexpressionsprofilen einer Vielzahl an Zuständen gruppieren Clustering-Verfahren einzelne Gene und/oder einzelne Arrays nach der Ähnlichkeit der gemessenen Expressionswerte innerhalb des gesamten Datensatzes (Matrix, siehe Abbildung 8). Gene, die in einer Vielzahl an Zuständen ähnliche Expressionswerte zeigen und somit einen Cluster bilden, stehen häufig in einem funktionellen Zusammenhang⁵⁴. Dies können z.B. Gene der "heat shock"-Familie sein, welche in einem Zeitverlaufsexperiment in Folge einer Erhöhung der Temperatur in ihrer Expression induziert werden. Ähnliche biologische Eigenschaften

können die Materialproben aufweisen, welche für die Hybridisierungen der Arrays eines Clusters eingesetzt wurden. Unterschiedliche Cluster von Krebs-Patienten können z.B. unterschiedliche Überlebensraten der einzelnen Patientengruppen vorhersagen und somit eine präzise Subklassifizierung einer Erkrankung ermöglichen^{55, 56}.

Bei dem sogenannten hierarchischen Clustering werden Gene bzw. Arrays schrittweise nach Ähnlichkeit zu Paaren zusammengefaßt und sortiert. Dadurch entsteht eine Baumstruktur, bei der in der Regel die Expressionswerte zur Visualisierung in Falschfarben dargestellt sind. In Abbildung 2 sind in Form eines solchen hierarchischen Clusterings die Genexpressionsprofile eines Zellkulturexperiments ausgewertet worden. Die Genexpression von Adipozyten, welche mit drei unterschiedlichen Liganden des nukleären Rezeptors *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) oder einem Vehikel behandelt wurden, sollte untersucht werden⁵⁷. Bei den Liganden handelte es sich um partielle Modulatoren (Telmisartan und Irbesartan), die bereits als Blutdrucksenker (Angiotensin II Typ 1 Rezeptor-Blocker) in der Patientenbehandlung eingesetzt werden, und einen vollen Agonisten des PPAR γ -Rezeptors (Pioglitazone). Das Clustering visualisiert die in weiten Bereichen identische Expressionsantwort der Adipozyten auf eine Behandlung mit den drei unterschiedlichen Liganden (A) und eine Vielzahl an bekannten PPAR γ -Zielgenen wurde angesprochen (B). Allerdings lieferten einzelne Cluster auch Gene mit einer für den einzelnen Liganden spezifischen Expressionsantwort (C). So wird z.B. der *prostacyclin-rezeptor*, ein wichtiger Initiator für die Adipogenese, nur durch Pioglitazone induziert und die *glycerol-kinase*, die eine Rolle in der Fetteinlagerung spielt, weit stärker durch Pioglitazone induziert als durch Telmisartan und Irbesartan.

Bei dem sogenannten *k-means*-Clustering wird die Anzahl der Cluster vordefiniert und ein iterativ arbeitender Algorithmus gruppiert die Gene oder Arrays entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionswerte⁵⁸. Eine Variation dieser Methodik stellen die *self organizing maps* (SOM) dar⁵⁹. Hierbei beeinflussen die Mitglieder eines Clusters während des iterativen Prozesses die Lage der benachbarten Cluster; es entsteht eine netzartige Struktur mit potentiell stabileren Clustern.

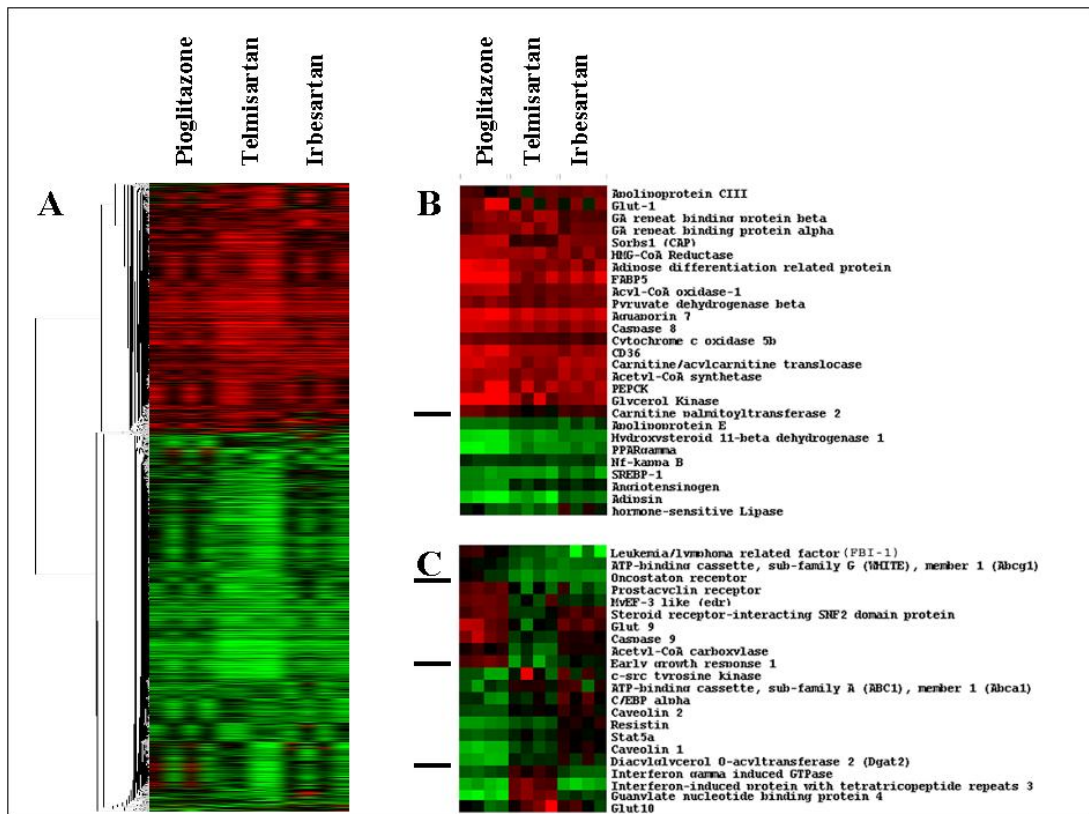


Abbildung 2: Hierarchisches Clustering. Es wurden die Genexpressionsprofile von drei unterschiedlich behandelten Adipozyten-Zellkulturen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ausgewertet. ~2900 Gene zeigten bei zumindest einer der drei zugegebenen Medikamente eine signifikante Deregulation der Expression. Diese ~2900 Gene wurden durch hierarchisches Clustering nach Ähnlichkeit der Expression über die drei Zustände mit jeweils vier technischen Replika sortiert (A). Eine Vielzahl an Genen wurde durch die unterschiedlichen Substanzen, welche Liganden des peroxisome proliferator-activated receptor γ sind, gleichermaßen angesprochen und einige stellten bekannte Zielgene des Rezeptors dar (B). Einzelne Cluster beinhalteten allerdings auch Gene mit medikamentenspezifischer Expression (C). Adaptiert von Schupp et al. (2005)⁵⁷.

1.3.4 Explorative Werkzeuge für große Sätze von Genen

Statistische Verfahren wie die Bestimmung der deregulierten Gene zwischen zwei Zuständen oder aber die Detektion spezifischer Expression einer Gruppe von Genen für einen von vielen Zuständen liefern häufig eine große Anzahl von Genen. Das Verständnis bzw. die Interpretation des potentiell vorhandenen funktionellen Zusammenhangs zwischen einer solchen Vielzahl an Genen stellt eine große intellektuelle als auch zeitliche Herausforderung dar. Bei Organismen mit geringer

Genomgröße (z.B. *S. cerevisiae*) können solche Sätze von Genen aufgrund der umfangreichen Kenntnis der Funktionen vieler Gene häufig direkt Aufschluß über biologische Zusammenhänge bzw. Signaltransduktionswege geben. Dies ist jedoch bei der bisher unzureichenden funktionellen Charakterisierung der Genome komplexerer Organismen (z.B. Mensch oder Maus) in der Regel nicht möglich. Erste Schritte in diese Richtung bieten jedoch mehrere explorative Werkzeuge. Hierzu zählt z.B. die *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* (DAVID; bzw. als lokale Anwendung *Expression Analysis Systematic Explorer* (EASE))^{60,61}. Dieser Ansatz gestattet es unter anderem, einen Satz von Genen nach *gene ontology* (GO)⁶² zu kategorisieren und anschließend in Hinblick auf das gesamte Genom eine Überrepräsentation einzelner GO-Kategorien zu bestimmen. Hierbei kann zwischen den GO-Kategorien "Biologischer Prozess", "Molekulare Funktion" und "Zelluläres Kompartiment" gewählt werden. Innerhalb einer der Kategorien kann aus einer sich baumartig strukturierenden Annotation aus fünf Ebenen die Auflösung festgelegt werden.

Bei der webbasierten Ingenuity Software erfolgt aufbauend auf einer manuell erstellten Datenbank mit publizierten Interaktionen/Annotationen von Genen eine Verknüpfung in funktionellen Netzwerken (www.ingenuity.com). Bei solchen Interaktionen kann es sich z.B. um direkte Protein-Protein Interaktionen oder die Aktivierung eines Gens durch einen Transkriptionsfaktor handeln.

Bei der Untersuchung von geschlechter-spezifischen Aspekten der Hypertrophie in einem Tiermodell wurden diese beiden Verfahren angewandt⁶³. Durch transverasle aorte Konstriktion (TAC) wurde in männlichen und weiblichen Mäusen eine Hypertrophie induziert und zwei Wochen später die Genexpression des Myokards untersucht. Mit einer zweifaktoriellen ANOVA wurden 653 mit einer geschlechter- und hypertrophiespezifischen Expression identifiziert ($P < 0.05$). Dieser Satz von Genen wurde in zwei Hälften unterteilt: 338 Gene mit einer relativ höheren Expression in weiblichen Tieren (TAC weibl. / Sham weibl. $>$ TAC männl. / Sham männl.) und 315 Gene mit einer relativ höheren Expression in männlichen Tieren (TAC männl. / Sham männl. $>$ TAC weibl. / Sham weibl.). Diese beiden Sätze von Genen wurden mit DAVID und Ingenuity analysiert. Hierbei konnten geschlechterspezifische Mechanismen des Adaptionsprozesses in der Hypertrophie identifiziert werden (siehe Abbildung 3). Das männliche Genexpressionsmuster war in erster Linie durch einen stärkeren Umbau des Myokards und der extrazellulären Matrix und das weibliche durch einen vorteilhafteren Metabolismus gekennzeichnet (relativ stärkere Fettsäureoxidation).

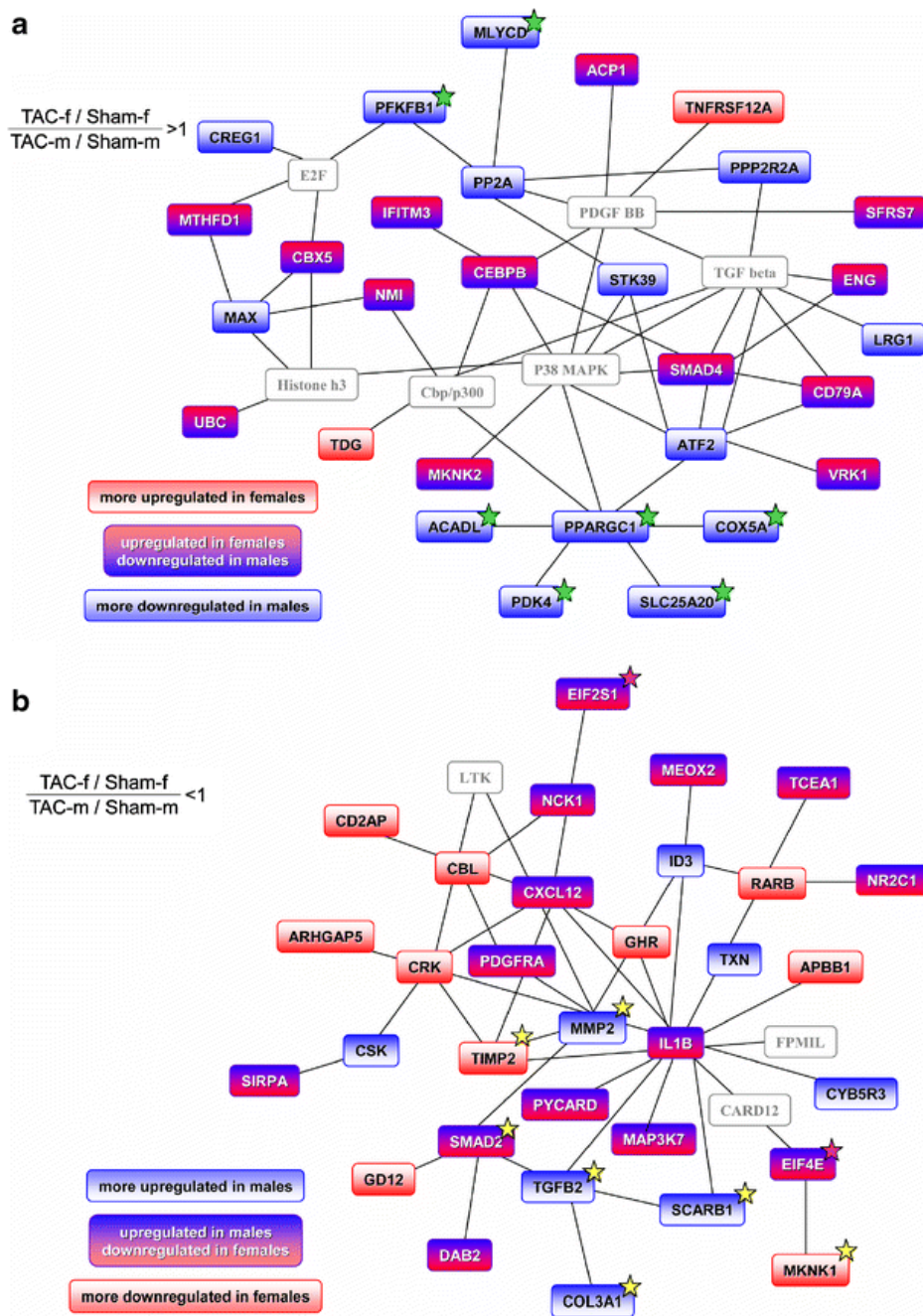


Abbildung 3: Geschlechterspezifische Hypertrophieantwort. Signifikant geschlechterabhängig deregulierte Gene in der Hypertrophieantwort wurden mit der Ingenuity Software zu Netzwerken organisiert. Die schwarzen Linien entsprechen hierbei publizierten Interaktionen zwischen den Genen. Charakteristisch für die weibliche Expressionsantwort war die stärkere Fettsäureoxidation, gesteuert über *pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4* (PDK4) und *PPAR γ , coactivator 1 alpha* (PPARGC1 bzw. PGC-1) und charakteristisch für die männliche der stärkere Umbau des Gewebes mit einer entsprechenden Regulation von z.B. matrix metalloproteinase 2 (MMP2), transforming growth factor β (TGFB2), collagen 3a1 (COL3A1) und tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 2 (TIMP2). Adaptiert von Witt et al. (2008)⁶³. Grüner Stern: Metabolismus; gelber Stern: extrazelluläre Matrix

1.3.5 Charakterisierung von Tiermodellen durch Genexpressionsprofile

Um die Vergleichbarkeit eines Tiermodells für eine Erkrankung zur humanen Situation zu bestimmen, sind verschiedene Ansätze der Datenauswertung von Genexpressionsprofilen möglich: Es kann auf Einzelgenebene die Aktivierung eines ähnlichen Genexpressionsprogramms überprüft werden oder aber mit Methoden der Mustererkennung eine globalere Betrachtung der beteiligten Prozesse erfolgen.

Einen solchen Ansatz verfolgten z.B. Lee et al. bei der Identifikation eines Mausmodells, welches am besten die humane Form der Erkrankung des hepatozellulären Karzinoms widerspiegelt⁶⁴. Hierzu wurden die Genexpressionsprofile von 68 humanen Patienten mit denen von sieben Mausmodellen verglichen. Bei den Mausmodellen handelte es sich um zwei chemisch induzierte (Ciprofibrate und Diethylnitrosamin), vier transgene (Myc, E2f1, Myc/E2f1 und Myc/Tgfa) und ein *knockout* Modell (*Acox*^{-/-}). Ein hierarchisches Clustering (siehe 1.3.3) der humanen Proben zusammen mit den Mausmodellen unter Berücksichtigung der orthologen Gene lieferte drei Cluster (siehe Abbildung 4).

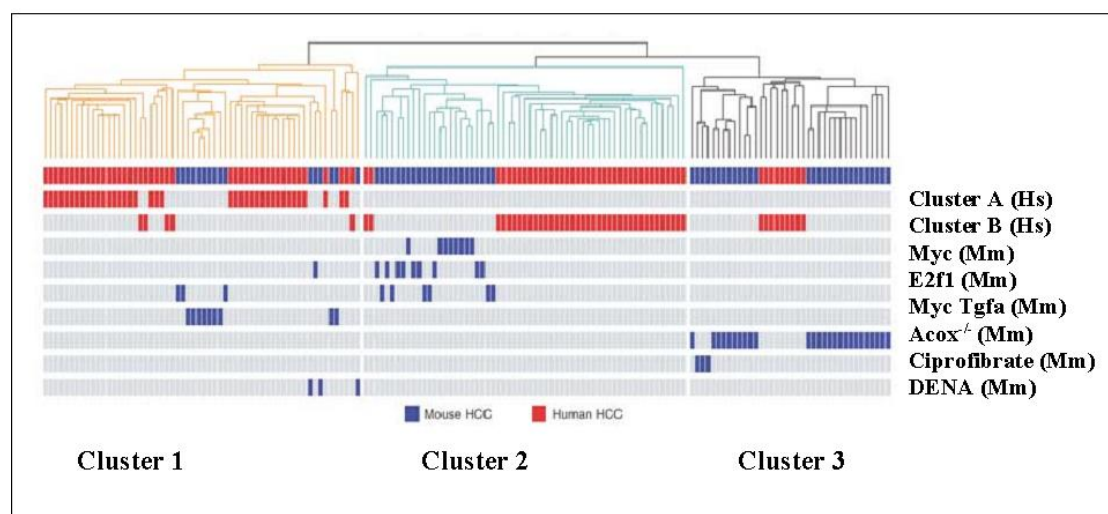


Abbildung 4: Clustering von humanen und murinen Leberkrebsproben. Durch hierarchisches Clustering wurden 68 humane Leberkrebsproben und Leberproben von sieben Mausmodellen in ihrer Genexpression analysiert (1650 orthologe Gene, bei mindestens 10% der Proben um den Faktor 2 differentiell exprimiert). Es ergaben sich drei Subcluster, in denen spezifisch Mausmodelle jeweils mit Patiengruppen mit guter (Cluster 2) bzw. schlechter Prognose (Cluster 1) korrelierten. Adaptiert von Lee et al. (2004)

Cluster A (Hs): humane Leberkrebsproben von Patienten mit schlechter Prognose.

Cluster B (Hs): humane Leberkrebsproben von Patienten mit guter Prognose

rot: humane Proben, blau: murine Proben

In Cluster 1 korrelierte die Expression von Myc/Tgfa transgenen Mäusen und Diethylnitrosamin-behandelten Mäusen mit der von humanen Proben von Patienten mit einer schlechten Prognose, in Cluster 2 korrelierte die Expression von Myc-, E2f1- und Myc/E2f1 transgenen Mäusen mit derjenigen von humanen Proben von Patienten mit einer relativ guten Prognose und in Cluster 3 befanden sich neben *Acox^{-/-} knockout* Mäusen und Ciprofibrate-behandelten Mäusen nur wenige humane Proben. In mehreren vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, daß Gene, welche in Zellwachstum und Proliferation involviert sind, die aussagestärksten prognostischen Marker für das hepatozelluläre Karzinom darstellen⁶⁵. Diese Gruppe von Genen wurde in den Myc/Tgfa transgenen Mäusen und Diethylnitrosamin-behandelten Mäusen weit stärker aktiviert als in den anderen Modellen.

In einem nächsten Schritt wurden die Expressionswerte der beiden Gruppen von Patienten mit hepatozellulären Karzinom mit guter und schlechter Prognose in der Trainingsphase einer Klassenvorhersage für die sieben Mausmodelle eingesetzt. Passend zu den Ergebnissen des hierarchischen Clusterings wurden die Myc/Tgfa transgenen Mäuse den Patienten mit schlechter Prognose und alle weiteren den Patienten mit guter Prognose zugeordnet (keine signifikante Aussage für Diethylnitrosamin-behandelte Mäuse, da nur drei Proben vorlagen). Besonders bemerkenswert an dieser Arbeit ist die mit zwei statistischen Methoden bestimmte Ähnlichkeit der Expressionsmuster zwischen zwei Spezies. Das heißt, der Phänotyp hatte in diesem Beispiel einer Charakterisierung von Tiermodellen einer humanen Erkrankung einen größeren Einfluß auf das jeweilige Expressionsmuster als die Spezies.

In einer Arbeit von Gao et al. wurde zur Analyse der Expressionswerte von Tiermodellen für Herzinsuffizienz im Vergleich zur humanen Situation der *Expression Analysis Systemic Explorer* (EASE) genutzt⁶⁶. Dieser statistische Ansatz gestattet die Identifikation von GO-Kategorien, in welchen im Vergleich zum gesamten Genom eine überproportional große Anzahl an Genen differentiell exprimiert gefunden wurde (siehe 1.3.4). Es wurden die Expressionsmuster von transgenen TNF Mäusen, MLP *knockout* Mäusen und von herzinsuffizienten Hunden (induziert durch eine stark erhöhte Herzfrequenz mit Hilfe eines Herzschrittmachers) mit humanen idiopathischen und ischämischen Kardiomyopathien verglichen. Es zeigte sich, daß eine Vielzahl an GO-Kategorien für das jeweilige Modellsystem spezifisch war und nur wenige Übereinstimmungen in den humanen Proben fanden. So wurden z.B. in den transgenen TNF Mäusen spezifisch Gene des Energiestoffwechsels vermindert exprimiert und Gene der Immunantwort stark induziert, was in den humanen Proben nicht gefunden wurde.

1.3.6 Charakterisierung der dilatativen Kardiomyopathie durch Genexpressionsprofile

Aktuell publizierte Array-Studien humaner Gewebe von DCM- oder HCM-Patienten basieren auf explantierten Herzen^{67,68,69,70,71,72,73,74,75,76} oder endomyokardialen Biopsien^{77,78}. Explantierte Herzen bieten ausreichend Probenmaterial, aber eine nicht zu vermeidende, teilweise stundenlange Lagerung auf Eis mag schwer kalkulierbare Effekte auf die Genexpression und RNA-Qualität haben. Myokardiale Biopsien hingegen sollten aufgrund des kürzeren zeitlichen Abstandes zwischen Entnahme und Lagerung in flüssigem Stickstoff in ihrer Genexpression der *in vivo* Situation näher kommen. Sie sind aber nur von geringer Größe und der Entnahmeort mag durch Variation der zellulären Zusammensetzung einen nicht unerheblichen Einfluß auf die jeweilige detektierte Genexpression haben. Insgesamt sind, bedingt durch die eingeschränkte Verfügbarkeit an humanen Proben, die publizierten Studien vergleichsweise klein (z.B. im Vergleich zu Genexpressionsstudien in der Krebsforschung). So verglichen Yang et al. zwei DCM Patienten mit zwei gesunden Kontrollpatienten und in anderen Studien werden ebenso nur relativ wenige Proben eingesetzt und nur selten mehr als 10 Proben pro Zustand untersucht.

Ein Vergleich und eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller publizierten Genexpressionsstudien mit humanen DCM Proben gestaltet sich schwierig. Geringe Probenanzahlen (s.o.) bei gleichzeitig hoher Heterogenität in der Genexpression führten zusammen mit dem Einsatz unterschiedlicher Array-Technologien und Datenauswertungen im Detail zu recht unterschiedlichen Ergebnissen.

Die in publizierten Studien am stärksten differentiell exprimierten Gene in der DCM betrafen das sogenannte fötale Genprogramm. Zu ihnen gehören das *natriuretic peptide precursor A*, *natriuretic peptide precursor B*, *actin alpha skeletal muscle* und *β-myosin heavy chain* und sie erreichten in einzelnen Publikationen eine mehr als 10-fache Induktion der Expression. Ebenso wurde eine Vielzahl an Genen der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagene und *lumican*) und des Zytoskeletts (z.B. *α-actinin*, *desmin*, *vinculin*) hochreguliert. Außerdem wurden mehrere Gene, welche die Kalziumhomöostase kontrollieren, dereguliert gefunden. Insbesondere eine reduzierte Expression der *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase-2* (SERCA2) wurde übereinstimmend in mehreren Studien detektiert. SERCA2 ist verantwortlich für den Transport des Kalziums in das sarkoplasmatische Retikulum; eine verringerte Expression mag daher zu gestörter Entspannung der Muskulatur in der Diastole führen. Inkonsistente Ergebnisse in den einzelnen Studien ergeben sich

für Gene des Metabolismus und der Apoptose. Hypothesen, wie die verstärkte Nutzung von Glukose im Vergleich zu Fettsäuren, fanden nur in einzelnen Studien eine Bestätigung und die Richtung der Deregulation von involvierten Genen (z.B. *apolipoprotein D* und *aldose reductase*) war häufig widersprüchlich.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Aufgrund der zahlreichen Ursachen für Kardiomyopathien mit stark individueller Pathogenese auf der einen Seite und der schlechten Zugänglichkeit des humanen Herzens für wissenschaftliche Untersuchungen (Messung der Herzfunktion bzw. Biopsienahme) auf der anderen Seite besitzen Tiermodelle in der Herzforschung eine besondere Bedeutung. Das Mausmodell kombiniert die Möglichkeit der gezielten genetischen Manipulation und einer Vielzahl an molekularbiologischen Techniken mit der Möglichkeit der phänotypischen Charakterisierung des vierkammerigen Herzens z.B. durch Echokardiographie.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Charakterisierung von Mausmodellen mit kardiomyopathischen Erkrankungen auf transkriptioneller Ebene angestrebt. Hierzu sollen sogenannte Mikroarrays eingesetzt werden, die eine genomweite Untersuchung der Genaktivität ermöglichen. Durch den Einsatz unterschiedlicher statistischer Verfahren sollen zwischen den Mausmodellen übereinstimmende als auch spezifische Genexpressionmuster identifiziert und funktionell annotiert werden.

Ein solcher Ansatz geht über die Charakterisierung des resultierenden Phänotyps oder die Einzelbetrachtung eines Signaltransduktionsweges hinaus und soll einen detaillierten Blick auf die global ablaufenden Veränderungen in der Pathogenese der Kardiomyopathie ermöglichen.

Es sollen insgesamt sechs Mausmodelle untersucht werden: vier *knockout* Mauslinien, ein chemisch induziertes Modell und die Kombination aus einer *knockout* Mauslinie mit einer chemisch induzierten Kardiomyopathie. Es wurden bewusst Mausmodelle ausgewählt, bei denen die inaktivierten Gene sehr unterschiedliche Zelluläre Funktionen erfüllen: Plakoglobin stabilisiert Zell-Zell Kontakte, ErbB2 und ErbB4 vermitteln Signaltransduktion und MLP erfüllt strukturelle Aufgaben im Sarkomer und Zytoskelett.

Um einen Vergleich mit dem humanen Krankheitsbild zu ermöglichen, werden zusätzlich Genexpressionsstudien mit Proben von DCM Patienten durchgeführt. Hierzu soll eigens ein kardialer Themenarray entwickelt, hergestellt und angewandt

werden. Die erhaltenen murinen und humanen Expressionsdaten sollten dann unter Einbeziehung weiterer publizierter Studien interpretiert werden.

Zusätzlich zu der Untersuchung der homozygoten Plakoglobin *knockout* Mauslinie im Rahmen der Expressionsstudien wird eine detaillierte phänotypische Analyse des heterozygoten Genotyps angestrebt. Rezessive Mutationen in dem Gen Plakoglobin führen zu einer arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie, wolligem Haar und palmoplantarer Keratoderma (Naxos Erkrankung). Der experimentellen Herangehensweise liegt die Hypothese zu Grunde, daß eine reduzierte Menge an Plakoglobin-Transkript bzw. Protein in der Maus zu ähnlichen Effekten wie das in der Länge verkürzte, aber teilweise noch funktionelle humane Protein führen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Humanes und murines Probenmaterial

2.1.1 Tierhaltung und eingesetzte Mausmodelle

Die Tiere wurden unter spezifiziert Pathogen-freien SPF-Bedingungen bei Standardtemperatur (22-24°C) und Luftfeuchtigkeit (55-60%) und einem 12h Licht / 12h Dunkel-Zyklus gehalten. Die Tierpflege und die Durchführung experimenteller Prozeduren folgten dem "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Government of Berlin" und den Empfehlungen der "Society for Laboratory Animal Science" (GV-SOLAS) sowie der "Federation of European Laboratory Animal Science Association" (FELASA).

Bei den eingesetzten Mausmodellen handelte es sich bei den Plakoglobin- und MLP *knockout* Mäusen um eine vollständige Inaktivierung des Gens (Ausschalten des jeweiligen Gens durch homologe Rekombination mit einem Zielgen-Konstrukt). Bei den ErbB2- und ErbB4 *knockout* Mäusen handelte es sich um eine herzspezifische Inaktivierung durch Einsatz des Cre/loxP Systems (Cre unter Kontrolle des *myosin light chain 2* Promotors). Es wurden männliche Tiere im Alter von 8-10 Monaten eingesetzt.

Von folgenden Personen bzw. Einrichtungen wurden entsprechende Mauslinien zur Verfügung gestellt:

-MLP *knockout* Mauslinie: Elisabeth Ehler, Institute of Cell Biology, ETH Zuerich-Hoenggerberg, CH-8093 Zuerich (aktuelle Adresse: Randall Centre, King's College London, London SE1 1UL)

-ErbB4 *knockout* Mauslinie und Doxorubicin-behandelte Mäuse (15 mg Doxorubicin/kg, 3 Mal pro Woche): Cecilia Hertig, INGEBI-CONICET, Vuelta de Obligado 2490, 1428 Buenos Aires

-ErbB2 *knockout* Mauslinie: Alistair Garratt, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Robert Roessle Str. 10, 13125 Berlin

2.1.2 Gewebeentnahme und Genotypisierung von Plakoglobin *knockout* Mäusen

Embryonale Mausherzen wurden aus kontrolliert verpaarten C57BL/6 oder 129SV heterozygoten Plakoglobin *knockout* Weibchen am E12.5 der Trächtigkeit steril entnommen und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Es wurden die Dottersäcke oder Schwanzproben in 500µl Lysispuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl; 100µg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim 85623431)) gegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert (Eppendorf ThermoStat plus). Zur vollständigen Lyse wurden die Ansätze am nächsten Tag mit einem Vortex geschüttelt, dann zur Fällung der DNA 500µl Isopropanol hinzugegeben, 10min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dabei im Abstand weniger Minuten geschwenkt. Der entstandene Faden genomischer DNA wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 70% Ethanol gewaschen; das Pellet wurde in 100µl Low-TE-Puffer (1mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1mM EDTA) aufgenommen.

Zur Bestimmung des Genotyps wurde mit dieser DNA eine PCR (MJ Research PTC-200) mit folgenden Primern durchgeführt: Plakoglobin (sense) 5'-CGG CCA TCG TCC ATC TCA TC-3', Plakoglobin (antisense) 5'-CCT CCT TCT TGG ACA GCT GG-3' und Neomycin (sense) 5'-CTT CTA TCG CCT TCT TGA CG-3'. Für das Wildtyp-Allel ergibt sich ein 300bp Fragment und für das Mutanten-Allel ein 150bp Fragment. Folgendes Temperaturprogramm wurde eingesetzt: 30 Zyklen (96°C 15s; 50°C 15s; 72°C 60s) und 72°C für 10min.

Zusammensetzung der PCR-Reaktion:

1µl	Lösung der genomischen DNA
2,93µl	Wasser
1µl	Primer Plakoglobin (sense) 5 pmol/µl
0,5µl	Primer Plakoglobin (antisense) 5 pmol/µl
0,5µl	Primer Neomycin (sense) 5 pmol/µl
0,75µl	dNTPs je 20mM
0,75µl	PCR-Puffer (Eppendorf 0032.007.724)
0,07µl	Taq-Polymerase 5U/µl (Eppendorf 0032.007.724)

2.1.3 Humanes myokardiales Probenmaterial

Das humane linksventrikuläre myokardiale Gewebe wurde vom Deutschen Herzzentrum (Prof. Regitz Zagrosek, Berlin) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um explantierte Herzen von Patienten mit DCM im Endstadium (n=12) und bei den Kontrollen um explantierte Herzen (n=11) ohne pathologische Veränderungen (Morphologie und Histologie). Das Geschlecht der Personen war männlich und das Alter lag zwischen 40 und 65 Jahren.

Tabelle 1: Patientendaten der Proben der explantierten Herzen mit DCM. Alter: Alter bei Transplantation; Diagnose: Diagnose erstellt vom Deutschen Herzzentrum; NYHA: Klassifikation der Schwere der Herzkrankheit (s.u.); LVEF: linksventrikuläre Ejectionsfraktion; LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, FS: *fractional shortening*; MW: Mittelwert; gesund: übliche Werte für einen gesunden Menschen; n.v.: nicht verfügbar; m: männlich

ID	Alter	Diagnose	Geschlecht	NYHA	LVEF [%]	LVEDD [mm]	FS [%]
1	49	DCM	m	3	20	76	10
2	44	DCM	m	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
3	45	DCM	m	4	15	76	10
4	52	DCM	m	3	22	66	10
5	53	DCM	m	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
6	51	DCM	m	3	n.v.	68	11
7	52	DCM	m	3	15	77	7
8	47	DCM	m	3	n.v.	55	24
9	47	DCM	m	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
10	49	DCM	m	4	n.v.	66	10
11	55	DCM	m	3	25	82	9
12	44	DCM	m	3	n.v.	71	7
MW	49.0			3.2	19.4	70.8	10.9
gesund	40-65		m		>55	<56	>25

Einteilung des Schweregrades von Herzkrankheiten nach NYHA (ursprünglich von der New York Heart Association veröffentlichtes Schema)⁷⁹:

I. Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris

II. Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris

III. Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe

körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris

IV. Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit

Humanen endomyokardiale Biopsien wurden vom Universitätsklinikum Lübeck (Prof. Katus) und dem Virchow Klinikum (Prof. Osterziel, Berlin) zur Verfügung gestellt. Abgesehen von den diagnostizierten Herzphänotypen lagen keine weiteren Daten vor.

Alle Untersuchungen folgten den Richtlinien der Deklaration von Helsinki.

2.2 RNA-Isolation und Amplifikation

2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation der RNA erfolgte mit TRIZOL[®]-Reagenz (GibcoBRL). 1ml TRIZOL[®]-Reagenz pro maximal 50mg Gewebe wurden zum Zellaufschluß mit einem Polytron PT 300 (Kinematika) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 5min des homogenisierten Ansatzes bei 15°C bis 30°C wurden 0,1ml Chloroform hinzugegeben, das Eppendorf-Gefäß kräftig geschüttelt und anschließend 2min bis 3min bei 15°C bis 30°C inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation mit 12.000g für 15min bei 2°C bis 8°C. Die wäßrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und zur Fällung der RNA 0,25ml Isopropanol und bei geringen RNA-Mengen 2µl Polyacrylamid (Molecular Research Center, Inc.) hinzugegeben. Es folgte eine Zentrifugation mit 12.000g für 10min bei 2°C bis 8°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 0,5ml 75% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen und gegebenenfalls zur besseren Lösung für 10min bei 55°C bis 60°C erwärmt.

2.2.2 Überprüfung der RNA-Qualität

Die Integrität der isolierten oder amplifizierten RNA wurde mit einem 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) überprüft. Das Meßprinzip des 2100 Bioanalyzers

beruht auf einer elektrophoretischen Auftrennung nach Größe der RNA in einer Kapillare ("lab on a chip") mit photometrischer Detektion. Zur Beurteilung der RNA-Qualität diente das Verhältnis 28S/18S der rRNA-Banden und die sogenannte RNA Integrity Number (RIN). In der RIN werden neben dem Verhältnis 28S/18S der rRNA-Banden weitere Qualitätsmerkmale wie Anomalien in der 5S Region oder der Basislinie zusammengefaßt und sie kann Werte zwischen 0 und 10 annehmen (siehe Abbildung 8)^{80,81}. Alle Messungen wurden mit dem RNA 6000 Nano Reagents & Supplies Kit (Agilent Technologies 5065-4476) und der RNA 6000 Ladder (Ambion 7152) als Größen- und Konzentrationsstandard durchgeführt.

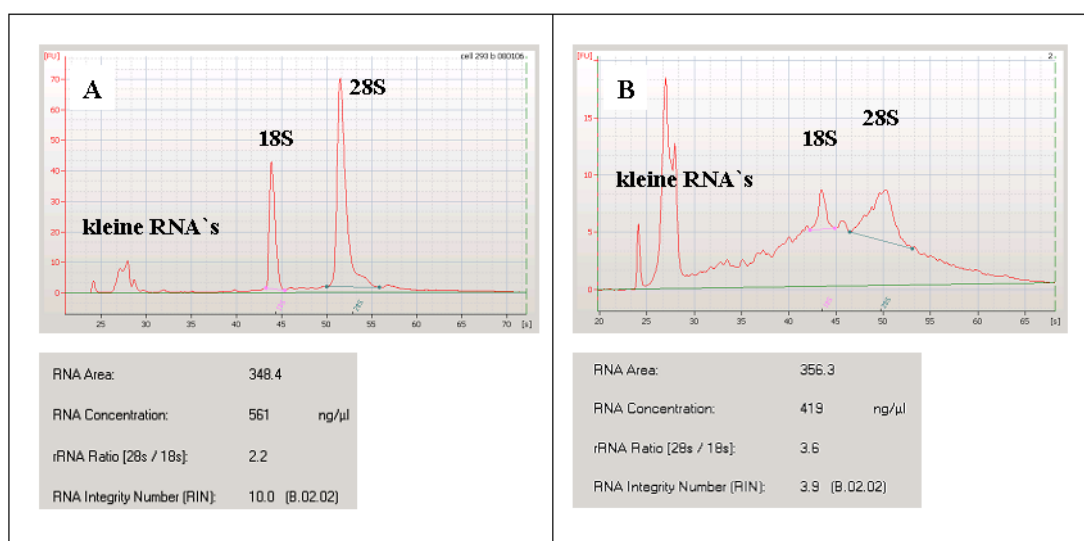


Abbildung 5: Elektropherogramme zweier unterschiedlicher RNA Populationen. Die RNA-Qualität wird charakterisiert durch das 28S/18S rRNA Ratio, welches idealerweise bei ~2.0 liegt, und einer "RNA Integrity Number" (RIN), welche idealerweise bei 10.0 liegt (A). Beginnende Degradation der RNA führt zu einer Abnahme des 28S/18S Ratios bzw. nicht mehr sinnvollen Werten und kleineren RIN (B).

2.2.3 Lineare Amplifikation von mRNA-Populationen

Erste Runde der Amplifikation

Erststrangsynthese

Zu 4,5μl Gesamt-RNA (Menge je nach Anzahl der Runden der Amplifikation) der in RNase-freiem Wasser wurden 0,5μl OligoT7-dT₍₂₈₎-VN-Primer (0,25μg/μl; Sequenz:

5'-TCT AGT CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG
GCG(dT)₂₈-V(AGC)N(AGCT)-3') gegeben und für 10min auf 70°C erhitzt.

Der Ansatz wurde anschließend kurz auf Eis gekühlt, danach wieder auf RT erwärmt und folgende Komponenten zugeben:

2µl	5 x Erststrang-Puffer (Invitrogen 18080-85)
1µl	DTT (100mM; Invitrogen 18080-85)
1µl	dNTPs (je 2,5mM)
0,5µl	Ribonuclease Inhibitor (35U/µl; Fermentas E00311)
0,5µl	Superscript III RT (200U/µl; Invitrogen 18080-85)
Σ 10µl	

Die Reaktion erfolgte bei einer Inkubation bei RT für 5min und dann bei 42°C für 1h.

Zweitstrangsynthese

Zu der Erststrangreaktion wurden auf Eis folgende Komponenten hinzugegeben:

45,5µl	RNase-freies Wasser
15µl	5 x Zweitstrang-Puffer (GibcoBRL 10812-014)
1,5µl	dNTPs (je 2,5mM)
0,5µl	E. coli DNA Ligase (10U/µl; GibcoBRL 18052-019)
0,5µl	RNase H (2U/µl; GibcoBRL 18021-071)
2µl	E. coli DNA-Polymerase I (10U/µl; GibcoBRL 18010-017)
Σ 75µl	

Die Reaktion erfolgte bei einer Inkubation von 16°C für 2h. Anschließend wurden zu dem Ansatz 75µl RNase-freies Wasser gegeben und es folgten eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1 Vol.; Roth A156.1)-Extraktion (150µl) und eine Chloroform-Extraktion (150µl). Die Fällung geschah durch Zugabe von 1µl Polyacrylamid (Molecular Research Center PC152), 10µl 7,5M Ammoniumacetat (Merck 1.01116) und 375µl auf -20°C gekühltem Ethanol. Nach Zentrifugation mit 14.000g für 20min bei 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 4µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

In Vitro-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde mit dem T7-Megascript Kit (Ambion 1334) durchgeführt. Zu den 4 μ l der Zweitstrangsynthese wurden die folgenden auf RT erwärmten Komponenten gegeben:

1 μ l	10 x Transkriptions-Puffer
1 μ l	75 mM ATP
1 μ l	75 mM CTP
1 μ l	75 mM GTP
1 μ l	75 mM UTP
1 μ l	Enzyme Mix
Σ 10 μ l	

Der Ansatz wurde über Nacht (mindestens 6h) bei 37°C inkubiert, anschließend mit 130 μ l RNase-freiem Wasser aufgefüllt und eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 :1)-Extraktion durchgeführt. Aus der in ein neues Eppendorf-Gefäß überführten wässrigen Phase wurde mit 150 μ l Chloroform extrahiert. Zur Fällung der amplifizierten RNA (aRNA) wurde zu der in ein neues Eppendorf-Gefäß überführten wässrigen Phase 10 μ l 7,5M Ammoniumacetat gegeben, auf einem Vortex geschüttelt, auf -20°C vorgekühlter Ethanol zugegeben und nach Durchmischen unverzüglich mit 14.000g für 20min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml 75% Ethanol gewaschen und dann in 10 μ l RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Zweite Runde der Amplifikation

Erststrangsynthese

Zu 4,5 μ l aRNA der ersten Runde der Amplifikation wurden 0,5 μ l beliebige Hexanukleotide (1 μ g/ μ l, MWG Biotech) gegeben und für 10min auf 70°C erhitzt. Der Ansatz wurde anschließend kurz auf Eis gekühlt, danach wieder auf RT erwärmt und folgende Komponenten zugegeben:

2µl	5 x Erststrang-Puffer (Invitrogen 18080-85)
1µl	DTT (100mM; Invitrogen 18080-85)
1µl	dNTPs (je 2,5 mM)
0,5µl	Ribonuclease Inhibitor (35U/µl; Fermentas E00311)
0,5µl	Superscript III RT (200U/µl; Invitrogen 18080-85)
Σ 10µl	

Die Reaktion erfolgte bei einer Inkubation bei RT für 5min und anschließend bei 42°C für 1h. Danach wurden 0,5µl RNase H hinzugefügt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Erwärmung auf 95°C für 2min abgebrochen und der Ansatz kurz auf Eis gekühlt.

Zweitstrangsynthese

Zu der Erststrangreaktion wurden 1µl OligoT7-dT₍₂₈₎-VN-Primer hinzugegeben, für 5min auf 70°C und dann für 10min auf 42°C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Folgende Komponenten wurden zur Zweitstrangsynthese hinzugegeben:

44µl	RNase-freies Wasser
15µl	5 x Zweitstrang-Puffer (GibcoBRL 10812-014)
1,5µl	dNTPs (je 2,5mM)
0,5µl	E. coli DNA Ligase (10U/µl; GibcoBRL 18052-019)
0,5µl	RNase H (2U/µl; GibcoBRL 18021-071)
2µl	E. coli DNA-Polymerase I (10U/µl; GibcoBRL 18010-017)
Σ 75µl	

Die Reaktion erfolgte während einer Inkubation bei 16°C für 2h. Anschließend wurden zu dem Ansatz 75µl RNase-freies Wasser gegeben und es folgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1 Vol.; Roth A156.1)-Extraktion (150µl) und eine Chloroform-Extraktion (150µl). Die Fällung geschah durch Zugabe von 1µl Polyacrylamid, 10µl 7,5M Ammoniumacetat und 375µl auf -20°C gekühltem Ethanol. Nach Zentrifugation mit 14.000g für 20min bei 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 4µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

In Vitro-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde mit dem T7-Megascript Kit (Ambion 1334) durchgeführt. Zu den 4 μ l der Zweitstrangsynthese wurden die folgenden auf RT erwärmten Komponenten gegeben:

1 μ l	10 x Transkriptions-Puffer
1 μ l	75 mM ATP
1 μ l	75 mM CTP
1 μ l	75 mM GTP
1 μ l	75 mM UTP
1 μ l	Enzyme Mix
Σ 10 μ l	

Der Ansatz wurde über Nacht (mindestens 6h) bei 37°C inkubiert, mit 130 μ l RNase-freiem Wasser aufgefüllt und anschließend eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 :1)-Extraktion durchgeführt. Aus der in ein neues Eppendorf-Gefäß überführten wässrigen Phase wurde dann mit 150 μ l Chloroform extrahiert. Zur Fällung der RNA wurde zu der in ein neues Eppendorf-Gefäß überführten wässrigen Phase 10 μ l 7,5M Ammoniumacetat zugegeben, auf einem Vortex geschüttelt, auf -20°C temperierter Ethanol zugegeben und nach Durchmischen unverzüglich mit 14.000g für 20min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml 75% Ethanol gewaschen und dann in 10 μ l RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Weitere Runden der Amplifikation sind möglich. Die Kontrolle der RNA-Qualität erfolgte mit einem Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) unter Verwendung des RNA 6000 Reagents & Supplies Kit (Agilent Technologies, siehe 3.2.2).

2.3 Generierung eines radioaktiven PCR-Produkts

Eine präparative PCR zur Herstellung eines radioaktiv markierten PCR-Produkts ausgehend von dem Arabidopsis-Klon T04358.1 (Fragmentgröße 1.3kb) wurde in einem Peltier Thermal Cycler (MJ Research) durchgeführt.

Zusammensetzung der PCR-Reaktion:

1µl	T04358.1 Plasmid (100ng/µl)
2µl	Primer T7 (200ng/µl)
2µl	Primer Sp6 (200ng/µl)
xµl	dCTP (2mM; Amersham Biosciences 272050)
1µl	dATP (2mM; Amersham Biosciences 272050)
1µl	dGTP (2mM; Amersham Biosciences 272050)
1µl	dTTP (2mM; Amersham Biosciences 272050)
yµl	α - ³³ P dCTP (5mCi/ml oder mehr als 3000Ci/mmol; ca. 4µM; Amersham Pharmacia Biotech AH 9905)
2,5µl	PCR-Puffer (Eppendorf 0032.007.724)
1,0µl	Taq-Polymerase 5U/µl (Eppendorf 0032.007.724)
Σ 25µl	

Nach Durchführung der PCR (94°C 2min; 30 Zyklen (94°C 15s; 55°C 15s; 72°C 2min); 72°C 5min) erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts mit einem QIAquick PCR Purification Kit (Standardprotokoll) oder durch Fällung mit 2 Volumen Ethanol (Merck 1.00986). Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und zudem die eingebaute Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Flexi-Vial, Perkin Elmer) vermessen.

2.4 cDNA-Makroarrays des Human Unigene Set II

2.4.1 Array-Format

Makroarrays des Human Unigene Set II vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) bezogen. Die PCR-Produkte des Human Unigene Set II mit ca. 75.000 Klonen verteilten sich auf drei Makroarrays. Sie waren im Duplikat auf Nylonmembranen gespottet und entsprechend der 384-iger Platten der Bakterienkultur und der PCR wurde die Membran in sechs Felder aufgeteilt, in denen sich jeweils 384 Blöcke, bestehend aus 5 x 5 Spots, befanden. Jeder Block setzte sich aus 11 als Duplikat gespotteten Klonen des Humann Unigene Sets II und drei leeren Spots zur Berechnung der lokalen Hintergrundsignalintensität zusammen

(siehe Abbildung A im Appendix 9.1). Für die Hybridisierungen beider Array-Formate wurde eine "Ein-Farben"-Technologie basierend auf ^{33}P -markierter cDNA genutzt. Folgend entstand als Ergebnis der Hybridisierung eine absolute Signalintensität.

2.4.2 Komplexe Hybridisierungen mit cDNA-Makroarrays

Prähybridisierung

Die Nylonmembranen wurde vorsichtig ohne zu Überlappen in eine zylindrische Glasflasche (Innendurchmesser 7cm) mit 20ml auf 65°C temperierten Hybridisierungspuffer (1M NaCl; 1% SDS; 10mM Tris-HCL pH 7,5) mit den immobilisierten PCR-Produkten auf der Innenseite liegend eingebracht und für mindestens 1h bei 65°C in einem Hybridisierungsofen (Appligene) mit 6 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

Markierung der Sonde

Das Flüssigkeitsvolumen, in dem sich die RNA befand, wurde mit RNase-freiem Wasser auf 8 μl aufgefüllt, bei Gesamt-RNA 2 μl OligodT₍₁₂₋₁₈₎-Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Amersham Pharmacia Biotech 27-7610-01) und bei aRNA 2 μl beliebige Hexanukleotide (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; MWG Biotech) zugegeben und der Ansatz für 10min bei 70°C inkubiert.

Zur Markierung wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

5 μl	5 x AMV-Puffer (Roche 109118)
1,25 μl	dNTPs (10mM dATP, 10mM dGTP, 10mM dTTP; Amersham Biosciences 272050)
1,0 μl	dCTP (12,5 μM)
0,12 μl	RNase-freies Wasser
0,63 μl	RNase-Inhibitor (35U/ μl ; Fermentas E00311)
5,0 μl	α - ^{33}P dCTP (5mCi/ml oder mehr als 3000Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech AH 9905)
2,0 μl	reverse Transkriptase AMV (24U/ μl ; Roche 109118)
Σ 25 μl	

Der Ansatz wurde mit folgendem Temperaturprogramm in einem Thermo-Cycler (MJ Research PT-100) inkubiert:

30°C für 10min

42°C für 40min

51°C für 10min

Die Sonde wurde mit G50-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech 275335-01) aufgereinigt und anschließend der Einbau der radioaktiven Nukleotide mit einem Geigerzähler (Berthold LB 1210B) überprüft.

Hybridisierung

Der Hybridisierungspuffer der Prähybridisierung wurde entfernt und 15ml frischer auf 65°C temperierter Hybridisierungspuffer in die zylindrischen Glasflaschen eingefüllt. Die radioaktive Sonde, 500µg genomische Lachs-DNA (Amersham 27-4565) und 1µg gescherte genomische DNA wurden für 10min bei 95°C denaturiert (Eppendorf Thermomixer compact) und zu dem Hybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C und 6 Umdrehungen pro Minute. Am nächsten Tag wurden die cDNA-Makroarrays dreimal mit 300ml Waschlösung (0,1% SDS; 0,1 SSC) in Plastik-Boxen bei 65°C auf einem Schüttler (WTB Binder) gewaschen und danach auf einer Plastikscheibe in Filtergröße in Saran-Folie (Dow Chemical) verpackt.

2.5 Humaner kardialer Themenarray

2.5.1 Array-Format

Auf dem herzspezifischen cDNA-Mikroarray befanden sich ~11.300 aufgereinigte PCR-Produkte ausgewählter Klone (siehe 3.1.3) des Human Unigene Set II (<http://www.rzpd.de>), gespottet im Duplikat (zwei identische Felder) auf Telechem Superamine SMM Arrays. Für die Hybridisierungen wurde eine "Zwei-Farben"-Technologie basierend auf Cyanin-3- bzw. Cyanin-5 markierten cDNA-Sonden genutzt. Folgend entstand als Ergebnis der Hybridisierung (nach Normalisierung) das Ratio zweier Signalintensitäten.

2.5.2 cDNA-Mikroarray Herstellung

Ausgehend von der ~11.300 Klone umfassenden cDNA Bank des auf dem Human Unigene Set II basierenden herzspezifischen Gensatzes wurden PCR-Produkte generiert und nach Aufreinigung für die Herstellung der Mikroarrays eingesetzt. Die PCR wurde in 384-iger PCR-Platten (ABGene AB-0820) durchgeführt; als *template* diente ein Aliquot überführter Bakterienkultur bzw. das darin enthaltene Plasmid (QRep, 384 Pin PP thin/short; Genetix X5050). Aufgrund der Zusammensetzung der cDNA-Bank mit unterschiedlichen Vektoren wurden zwei unterschiedliche Paare von Primern für die PCR-Amplifikation eingesetzt.

Zusammensetzung der PCR-Reaktion (cDNA Bank Teil 1):

2,5µl	10 x HTP-PCR-Puffer
0.05µl	100mM dNTPs (Amersham Biosciences 272050)
0,02µl	Primer M13 forward 0,2pmol/µl
0,02µl	Primer M13 reverse 0,2pmol/µl
7,5µl	5M Betaine (Sigma Aldrich B0300)
14,7µl	H ₂ O
0,2µl	Taq-Polymerase + Pfu-Polymerase (100 : 1) 10U/µl (MPI-MG)
Σ~25µl	

Primer M13 forward: 5`-GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG-3`

Primer M13 reverse: 5`-CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCT CG-3`

Zusammensetzung der PCR-Reaktion (cDNA Bank Teil 2):

2,5µl	10 x HTP-PCR-Puffer
0.05µl	100mM dNTPs (Amersham Biosciences 272050)
0,009µl	Primer M13u 0,2pmol/µl
0,009µl	Primer M13r 0,2pmol/µl
7,5µl	5M Betaine (Sigma Aldrich B0300)
14,7µl	H ₂ O
0,2µl	Taq-Polymerase + Pfu-Polymerase (100 : 1) 10U/µl (MPI-MG)
Σ~25µl	

Primer For23: 5`-CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3`

Primer Rev30: 5`-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3`

Die Qualitätskontrolle der PCR-Amplifikation der cDNA-Bank erfolgte durch Gelelektrophorese (siehe Abbildung B, Appendix 9.1). Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden MultiScreenTM384-PCR Plates (Millipore S384 PCR 50) eingesetzt. Alle Pipettierschritte erfolgten mit einem "Hydra"-Pipettierroboter (Robbins Scientific). Die 25µl PCR-Reaktionsvolumen wurden in MultiScreenTM384-PCR Plates überführt und die Flüssigkeit durch Anlegen eines Unterdruckes mittels Vakuumpumpe (Leybold-Heraeus "minni") abgesogen. Zum Aufnehmen des PCR-Produkts wurden jeweils 100µl Millipore- Wasser auf die Membranen gegeben, mit dem "Hydra" Pipettierroboter wurde zehnmal ein Volumen von 80µl aufgenommen und wieder abgegeben, die Platten wurden anschließend für 1h bei 400rpm geschüttelt (C. Gerhardt), mit dem "Hydra"-Pipettierroboter wurde erneut zehnmal ein Volumen von 80µl aufgenommen und wieder abgegeben und abschließend das in Lösung befindliche PCR-Produkt in Platten zum Spotting überführt (384 U well/covers IND WRAP, Genetix X6000). In diesen wurde das Volumen vollständig eingengt (Speed Vac Plus SC210A, Savant) und das PCR-Produkt in 15µl Spotting-Puffer (Micro Spotting Solution Plus, Telechem International MSP) aufgenommen. Hierzu wurde ein Volumen von 10µl zwanzigmal mit dem "Hydra"-Pipettierroboter aufgenommen und die Platten für 1h bei 400rpm geschüttelt (C. Gerhardt). Die nun für das Spotting fertigen Platten wurden bei -20°C gelagert.

Das Spotting der cDNA-Mikroarrays erfolgte in Kollaboration mit dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Florian Wagner, RZPD) mit einem Virtek ChipWriter (Virtek) auf Telechem Superamine Slides (Telechem International SMM), wobei die aufgereinigten PCR-Produkte in Micro Spotting Solution Plus (Telechem International MSP) vorlagen. Nach dem Spotting wurden die Arrays über Nacht bei 50% relativer Luftfeuchtigkeit und 22°C getrocknet. Am folgenden Tag wurden die Arrays über einem erwärmten Wasserbad rehydriert und anschließend für 5sec bei 100°C auf einer Heizplatte getrocknet. Die PCR-Produkte wurden bei 120mJ/cm² in einem Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene) immobilisiert. Folgend wurden die Arrays zweimal für 5min mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur und 100rpm auf einem Orbitalschüttler (Heidolph) gewaschen. Die noch freien Amino-Gruppen der Array-Oberfläche wurden mit SuperAmine Blockierungslösung durch Schütteln für 20min bei 25°C und 100rpm auf einem Orbitalschüttler abgesättigt,

wobei zu Beginn 30sec heftig per Hand geschüttelt wurde. Anschließend wurden die Arrays fünfmal mit H₂O (Millipore) für 1min bei Raumtemperatur und 130rpm auf einem Orbitalschüttler gewaschen. Die Arrays wurden mit Druckluft (CRC Industries) gereinigt, für 10sec auf einer Heizplatte bei 95°C - 100°C denaturiert und anschließend bis zur Hybridisierung bei 4°C in einem Exsikkator gelagert.

2.5.3 Oligonukleotid-Hybridisierung zur Überprüfung der cDNA-Mikroarray Qualität

Mit Cyanin-3 markierte beliebige 15-mer Nukleotide (300 picomol, MWG Biotech) wurden für 5min bei 60°C erwärmt, anschließend kurz auf Eis gekühlt und dann in einem der Array-Größe entsprechenden Volumen (50µl-100µl) SSARC-Puffer aufgenommen. Das Array und das Deckgläschen (Roth) wurden mit Druckluft (CRC Industries) gereinigt und die Hybridisierungslösung auf das Array gegeben. Nach dem vorsichtigen Auflegen des Deckgläschens wurde das Array in eine Hybridisierungskammer (Scienion) mit 4 x 25µl SSARC-Puffer als Verdunstungsschutz gelegt und für 16h bei Raumtemperatur im Dunkeln hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde für 2 x 15min mit SSARC-Puffer, für 5min mit 0,2 x SSC-Puffer und für 5min mit 0,1 x SSC-Puffer jeweils bei Raumtemperatur in einer Färbeküvette auf einem Magnetrührer (Heidolph) gewaschen. Anschließend wurde das Array durch Zentrifugation bei 2.000rpm für 5min in einem 50ml Falcon Röhrchen getrocknet (Centrifuge 5810 R, Eppendorf).

2.5.4 Komplexe Hybridisierungen mit cDNA-Mikroarrays

Alle cDNA-Mikroarrays (Agilent und selbst hergestellte) wurden nach einem modifizierten Protokoll von Pat Brown (Stanford University, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html>) hybridisiert. Ausgehend von RNA wurde über reverse Transkription in Anwesenheit von Cyanin-3- oder Cyanin-5 markierten Nukleotiden cDNA generiert, aufgereinigt und für die Hybridisierungen eingesetzt. Alle Schritte, in denen Cyanin-Farbstoffe enthalten waren, wurden aufgrund deren Lichtempfindlichkeit so weit wie möglich unter Lichtschutz bzw. im Dunkeln durchgeführt.

Zum Annealing wurden 2µg aRNA oder 50-100µg Gesamt-RNA mit 4µg beliebigen Hexameren bzw. Oligo-dT₍₂₈₎-Primer in einem Volumen von 15,4µl für 10min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Zu diesem Ansatz wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

6,0µl	5 x Erststrang-Puffer (Invitrogen 18080-85)
3,0µl	0,1M DTT (Invitrogen 18080-85)
0,6µl	unmarkierte dNTPs (Amersham Biosciences 272050)
3,0µl	Cyanin-3 oder Cyanin-5 dCTP (Amersham Biosciences PA53021 bzw. PA55021)
2,0µl	Superscript III (200 U/µl, Invitrogen 18080-85)
Σ14,6µl	

unmarkierte Nukleotide (Amersham Biosciences 272050):

25µl	dATP (100mM)
10µl	dCTP (100mM)
25µl	dGTP (100mM)
25µl	dTTP (100mM)
15µl	H ₂ O
Σ100µl	

Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 42°C inkubiert und dann zur Erhöhung der Effizienz der reversen Transkription 1µl Superscript III (200 U/µl, Invitrogen 18080-85) zugegeben und erneut 1h bei 42°C inkubiert. Zum Abbruch der Reaktion und Degradation der RNA wurden 15µl 0,1N NaOH und 2mM EDTA zugegeben und bei Gesamt-RNA als Startmaterial für 30min bei 65°C inkubiert bzw. bei aRNA als Startmaterial für 10min bei 65°C inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 15µl 0,1N HCl. Zur Aufreinigung der markierten cDNA wurden die Reaktionsansätze zweier auf einem Array zu hybridisierenden Sonden zu 380µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) in einer Microcon YM-30 Säule (Millipore 42411) gegeben und für ca. 12min bei 14.000g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde entfernt, 450µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und für 12min bei 14.000g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde entfernt, 450µl TE-Puffer mit 20µg Cot-1 DNA (Invitrogen 18440-016 bzw. 15279-011) und 20µg polyA-RNA (Sigma P-9403) auf die Säule gegeben

und für 12min bei 14.000g zentrifugiert. Die markierte cDNA sollte in dem geringen verbliebenen Flüssigkeitsvolumen als purpurner Belag auf dem Molekularsieb sichtbar sein. Das Flüssigkeitsvolumen sollte weitestgehend reduziert worden, das Molekularsieb aber nicht trockengefallen sein. Die invertierte Säule wurde in ein neues Gefäß überführt und für 1min bei 14.000g zentrifugiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Molekularsieb erneut invertiert, mit 50µl H₂O für 2min inkubiert und anschließend die invertierte Säule für 1min bei 14.000g zentrifugiert. Die Sonde wurde durch Vakuum-Zentrifugation (Concentrator 5301, Eppendorf) aufkonzentriert und einem der Array-Größe entsprechendem Volumen DIG Easy Hyb-Puffer (Roche 1796895) aufgenommen. Die Hybridisierungslösung wurde für 2min bei 99°C (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert und anschließend für 20min bei 14.000g zentrifugiert. Das Array und die Hybridisierungskammer wurden für mindestens 1h bei 42°C temperiert, das Array mit Druckluft (CRC Industries) gereinigt und die Hybridisierungskammer (Scienion) in den dafür vorgesehenen Vertiefungen mit 4 x 25 µl DIG Easy Hyb-Puffer (Roche 1796895) als Verdunstungsschutz versehen. Die Hybridisierungslösung wurde zügig auf das Array pipettiert und ein der Array-Größe entsprechendes zuvor mit Druckluft (CRC Industries) gereinigtes Deckgläschen (Roth) aufgelegt. Nach Verschließen der Hybridisierungskammer wurde im Wasserbad über Nacht bei 42°C hybridisiert.

Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungskammer dem Wasserbad entnommen und getrocknet, das Array vorsichtig aus der Kammer herausgenommen und in ein Gefäß mit Waschpuffer 1 gegeben. Nach selbstständigem Ablösen des Deckgläschens wurde entsprechend des Waschprotokolls (s.u.) das Array in einer Färbeküvette auf einem Magnetrührer (Heidolph) gewaschen. Alle Waschpuffer waren auf 35°C temperiert.

Waschprotokoll:

10min Waschpuffer 1: 2 x SSC; 0,03% SDS

5min Waschpuffer 2: 2 x SSC

5min Waschpuffer 3: 1 x SSC

2min Waschpuffer 4: 0,2 x SSC

Nach dem letzten Waschschrift wurde das Array zum Trocknen in ein 50ml Falcon Röhrchen gegeben und für 5min bei 2.000rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Das getrocknete Array wurde lichtgeschützt verwahrt und so schnell wie

möglich eingescannt (Agilent Microarray scanner G2565BA oder Affymetrix 428 Array Scanner).

2.6 Affymetrix Gene Chip Mouse Genome 430A Mikroarray

2.6.1 Array-Format

Das Gene Chip Mouse Expression Set 430 besteht aus zwei Arrays: 430A und 430B. Auf diesen beiden Arrays befinden sich mehr als 45.000 Probensätze, die ~34.000 Gene repräsentieren. Auf dem 430A Array befinden sich tendenziell mehr annotierte und charakterisierte Gene, wohingegen auf dem 430B Array überwiegend ESTs zu finden sind.

Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit nur das 430A Array eingesetzt. Auf diesem Gene Chip Mouse Genome 430A Array repräsentierten elf durch lichtgerichtete *in situ* Synthese auf der Array Oberfläche hergestellte Oligonukleotide (~25mer) 22.600 Probensätze, die aufgrund von Redundanz ~14.000 Gene darstellten. Zusätzlich zu jedem sogenannten "match"-Oligonukleotid befand sich ein "mismatch"-Oligonukleotid auf dem Array, bei dem das mittlere der 25 Nukleotide ausgetauscht war. Diese Vielzahl an Oligonukleotiden und die "mismatch"-Oligonukleotide zur Kontrolle der spezifischen Bindung waren aufgrund der geringen Länge der Oligonukleotide erforderlich. Die elf Oligonukleotide befanden sich im C-terminalen Bereich des jeweiligen Gens; dies war von Vorteil, da die Sondenherstellung aufgrund des OligoT7-dT₍₂₄₎-Primers diese Region bevorzugte. Das Verhältnis der Signalintensitäten von 3`-gelegenen zu mehr 5`-gelegenen Oligonukleotiden war zudem ein Qualitätsmaß für die Integrität der eingesetzten Sonde. Partiiell degradierte RNA bzw. Sonde hätte zu einem starken Abfall der Signalintensitäten von 3`- zu 5` gelegenen Oligonukleotiden geführt und somit die Unbrauchbarkeit der Ergebnisse angezeigt. Für die Hybridisierungen wurde eine "Ein-Farben"-Technologie genutzt: In amplifizierte complementäre RNA (cRNA) wurden biotinylierte Nukleotide eingebaut, die nach der Hybridisierung mit R-Phycoerythrin-Streptavidin und biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörpern angefärbt wurden. Folgend entstand als Ergebnis der Hybridisierung eine absolute Signalintensität.

2.6.2 Oligo-Mikroarray Herstellung

Die eingesetzten Gene Chip Mouse Genome 430A Arrays wurden von Affymetrix (Santa Clara) hergestellt.

2.6.3 Komplexe Hybridisierungen mit Affymetrix Gene Chip Mouse Genome 430A-Mikroarrays

Es wurde ein Amplifikations- und Markierungsprotokoll mit einer Amplifikationsrunde eingesetzt. Zum Annealing wurden 1µg - 3µg Gesamt-RNA in H₂O mit 100pmol OligoT7-dT₍₂₄₎-Primer (Sequenz: 5`-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG (dT)₂₄-3') in einem Volumen von 10µl für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zu dem Ansatz wurden zur Erststrangsynthese folgende Komponenten hinzugegeben:

4µl	5 x Erststrang-Puffer (Invitrogen 18080-85)
2µl	0,1M DTT (Invitrogen 18080-85)
1µl	dNTPs (je 10mM; Amersham Biosciences 272050)
1µl	RNase-Inhibitor (35U/µl; Fermentas E00311)
2µl	Superscript III (200U/µl; Invitrogen 18080-85)
Σ10µl	

Der Ansatz wurde für 90min bei 43°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz für 10min bei 72°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Folgende Komponenten wurden für die Zweitstrangsynthese hinzugegeben:

18µl	cDNA der Erststrangsynthese
92µl	H ₂ O
30µl	5 x Zweitstrang-Puffer (GibcoBRL 10812-014)
3µl	dNTPs (je 10mM; Amersham Biosciences 272050)
1µl	E. coli Ligase (10U/µl; GibcoBRL 18052-019)
4µl	E. coli DNA Polymerase I (10U/µl; GibcoBRL18010-017)
2µl	RNase H (2U/µl; GibcoBRL 18021-071)
Σ150µl	

Der Ansatz wurde für 2h bei 16°C inkubiert, dann wurden 2µl T4 DNA-Polymerase (Invitrogen 18005-017) hinzugegeben und für weitere 20min bei 16°C inkubiert. Durch Zugabe von 10µl 0,5M EDTA wurde die Reaktion abgebrochen. Die Aufreinigung der doppelsträngigen DNA erfolgte durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 :1; Sigma 15593-031)-Extraktion und anschließende Fällung mit Ammoniumacetat (Merck KGaA 1.01116.1000) und Ethanol (Merck KGaA 1.00986.2500) bei -20°C für 20min. Das getrocknete Pellet wurde in 12µl RNase-freiem Wasser (GibcoBRL 10977-015) aufgenommen. Die Synthese der Biotin-markierten cRNA wurde mit dem GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix 900449) durchgeführt. Die amplifizierte cRNA wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen 74104) aufgereinigt. Die cRNA wurde fragmentiert (Affymetrix 900371) und in ihrer Qualität und Quantität durch Messung in einem Bioanalyser (Agilent Technologies) überprüft. Die cRNA wurde in dem Hybridisierungspuffer (Affymetrix 900720) aufgenommen und mit einer finalen Konzentration von 0,05µg/µl für 16h bei 45°C hybridisiert. Das Waschen der Arrays erfolgte in einer "GeneChip fluidics station" (Affymetrix) entsprechend Affymetrix Protokoll EukGE-WS2 (Waschpuffer 1: 0.9M NaCl, 0,06M NaH₂PO₄, 6mM EDTA, 0,01% Tween-20; Waschpuffer 2: 100mM MES (2-N-Morpholinoethane-sulfonic acid, Sigma), 0,1M NaCl, 0,01% Tween-20) bei 50°C. Anschließend wurden die Arrays mit einem Affymetrix GeneChip System Confocal Scanner 3000 eingescannt.

2.7 Agilent Mouse cDNA-Mikroarray

2.7.1 Array-Format

Auf dem Mouse cDNA Array von Agilent Technologies befanden sich ~8.700 cDNA Proben (gespottete PCR-Produkte) des Incyte Mouse Unigene Sets 1, welche ~8.500 nicht redundante Gene repräsentierten. Für die Hybridisierungen wurde eine "Zwei-Farben"-Technologie basierend auf Cyanin-3- bzw. Cyanin-5 markierten cDNA Sonden genutzt. Folgend entstand als Ergebnis der Hybridisierung (nach Normalisierung) das Ratio zweier Signalintensitäten.

2.7.2 cDNA-Mikroarray Herstellung

Die eingesetzten Mouse cDNA Arrays wurden von Agilent Technologies (Palo Alto) hergestellt.

2.7.3 Komplexe Hybridisierungen mit Agilent Mouse cDNA-Mikroarrays

Es wurde mit einem modifizierten Protokoll von Pat Brown (Stanford University, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html>) gearbeitet. Abweichend von dem unter 2.5.4 beschriebenen Protokoll wurde die Hybridisierungslösung vor dem Denaturieren mit 5µl Deposition Control Targets (Operon SP300) versetzt.

2.8 Auswertung und Statistik von Array-Daten

2.8.1 Bildauswertung radioaktiver cDNA-Makroarrays

Die Bilderzeugung erfolgte mit einem Phosphorimager (Fujifilm Bas-1800), den dazugehörigen Phosphorscreens und Software. Die Filter wurden entsprechend der Stärke ihrer Strahlung im linearen Bereich der Screens exponiert und anschließend die Screens mit einer Auflösung von 50µm eingescannt. Die entstandenen Ausgabeformate waren eine HST-, eine PCB- und eine IMG-Datei. Hierbei beinhaltet die IMG-Datei die logarithmierten Pixelintensitäten und die PCB-Datei die Scanner-Transfer-Funktion, nach der logarithmiert wurde. Durch die Logarithmierung wurde eine Kompression der Pixelintensitäten erreicht, so daß bei einer visuellen Darstellung auch geringe Intensitäten sichtbar wurden und der pro Pixel zur Verfügung stehende Wertebereich (16bit) besser ausgenutzt wurde.

Die PCB-Datei und die IMG-Datei dienten als Eingangsformate für das Bildanalyseprogramm VisualGrid (GPC Biotech). Auf das Bild der logarithmierten Pixelintensitäten wurde per Hand ein Raster gelegt, so daß die Spot-Positionen innerhalb des Rasters mit denen des eingescannten Bildes weitestgehend übereinstimmten. Die innerhalb eines Spots des Rasters gelegenen Pixelintensitäten wurden ohne Gewichtung ihrer Position von der Software unter Berücksichtigung der

Scanner-Transfer-Funktion delogarithmiert und aufsummiert, so daß als Ausgabeformat des Bildanalyseprogrammes eine Textdatei mit allen Spot-Intensitäten und ihren zugehörigen Koordinaten erhalten wurde. Die erhaltenen Spot-Koordinaten der Bildanalyse wurden mittels Perl-Skripten und einer LOG-Datei, die in Folge des Spottingvorganges der Arrays erzeugt wurde, annotiert.

Die spezifische Signalintensität eines Spots wurde berechnet, indem die Hintergrund-Signalintensität (Strahlung durch unspezifisch an die Filtermembranoberfläche gebundene Sonde und Umgebungsstrahlung) subtrahiert wurde. Hierzu wurde ein Profil der Hintergrund-Intensitäten für jeden Filter berechnet: Es wurden für jeden einzelnen Spot in einem definierten Umkreis (11 x 11 Spots) alle Intensitäten leerer Spots, gewichtet nach ihrer Entfernung (Quadrat der reziproken Entfernung), zur Berechnung eingesetzt.

Folgender Algorithmus diente zur Berechnung:

$$I_{Hb} = \frac{\sum_i \frac{1}{R_i^2} \cdot I_{Hi}}{\sum_i \frac{1}{R_i^2}}$$

I_{Hb} : berechnete Hintergrundintensität eines Spots

R : Entfernung der zur Berechnung eingesetzten Intensität eines leeren Spots

I_H : Intensität des zur Berechnung eingesetzten leeren Spots

2.8.2 Bildauswertung der herzspezifischen cDNA-Mikroarrays

Die von dem Affymetrix 428 Array Scanner erzeugten TIF-Dateien dienten als Eingangsformat für das Bildanalyseprogramm AIDA Image Analyser Version 3.20 (Raytest). Diese Software verfügte über einen variablen Algorithmus zum Auffinden der Spot-Positionen, wobei manuell die Eckpunkte des Arrays und auch einzelner Felder vorgegeben wurden bzw. verändert werden konnten. Parameter des Algorithmus zum Auffinden der Spots, wie z.B. der Suchradius, wurden gegebenenfalls angepaßt. Zur Annotation der Spots diente eine GAL-Datei, die in Folge des Spottingvorganges der Arrays durch die Ansteuersoftware des Roboters erzeugt wurde. Die Bestimmung eines lokalen Hintergrundsignals erfolgte mit Hilfe eines in einem definierten Abstand um jeden Spot gelegten Ringes.

2.8.3 Bildauswertung der Affymetrix Gene Chip Mouse Genome 430A Mikroarrays

Die Bildauswertung erfolgte mit der Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS). Diese Software faßte die jeweils elf Signalintensitäten der *match*-Oligonukleotide eines Gens zu einem Signal zusammen und berechnete mit Hilfe der *mismatch*-Oligonukleotide die Spezifität der Bindung (statistische Signifikanz).

2.8.4 Bildauswertung der Agilent Mouse cDNA-Mikroarrays

Die von dem Agilent Microarray Scanner (G2565BA) erzeugten TIF-Dateien dienten als Eingangsformat für das Bildanalyseprogramm Feature Extraction Version 6.1.1 (Agilent Technologies). Diese Software verfügte über einen variablen Algorithmus zum Auffinden der Spot-Positionen, wobei die an den vier Ecken des Arrays gelegenen Spots der Deposition Control Targets (Operon SP300) die Orientierung unterstützten. Parameter des Algorithmus zum Auffinden der Spots wie z.B. der Suchradius wurden gegebenenfalls angepaßt. Zur Annotation der Spots diente eine XML-Datei (Agilent Technologies). Die Bestimmung eines lokalen Hintergrundsignals erfolgte mit Hilfe eines in einem definierten Abstand um jeden Spot gelegten Ringes.

2.8.5 Normalisierung

Die Datensätze aller verwendeten Plattformen (Agilent cDNA-Arrays, in-house cDNA Arrays und radioaktive Makro-Arrays) bis auf Affymetrix wurden mit nichtlinearen globalen Verfahren normalisiert. Bei Affymetrix-Datensätzen war ein nichtlineares Verfahren nicht erforderlich, da aufgrund des hohen Grades an Standardisierung nur minimale Unterschiede in den Signalintensitäten zu beobachten waren. Für diese Plattform wurde mittels eines Skalierungsfaktors (Affymetrix GeneChip Operating Software, GCOS) auf eine globale Intensität von 100 normalisiert. Bei den anderen Plattformen ergab sich jeweils ein intensitätsabhängiger Normalisierungsfaktor durch Anwendung verschiedener Algorithmen (Lowess und lokale Median-Regression). Dies war im Gegensatz zu anderen quantitativen Meßverfahren, wie z.B. quantitativer RT-PCR, erforderlich, da das Verhältnis der eingesetzten Mengen an markierter Sonde sich nur in den Proben starker Signalintensität widerspiegelte,

wohingegen bei schwachen Signalintensitäten im Hintergrundbereich praktisch keine Unterschiede zu beobachten waren. Das Ergebnis der folgend dargestellten verschiedenen nichtlinearen Normalisierungsverfahren bzw. der Skalierung mit GCOS war bei geringen Unterschieden zwischen den Signalintensitäten sehr ähnlich, so daß kein einheitliches, sondern nur plattformspezifische und dort jeweils etablierte Verfahren eingesetzt wurden.

Lowess (Locally Weighted Scatterplot Smoothing)

Diese Methode stellt eine Erweiterung einer lokalen polynomialen Regression oder einfachen Mittelwertberechnung dar. Lowess ist eine lokal gewichtete Regressionsglättung mittels einer iterativen, gewichteten Methode der kleinsten Quadrate zur Kurvenanpassung in einem zweidimensionalen Scatterplot ohne Vorgabe eines speziellen Funktionstyps. In dem iterativen Verfahren wurden mögliche Ausreißer berücksichtigt und folgend in der Berechnung der Regressionsgerade untergewichtet, da diese sonst entgegen der tatsächlichen Beziehung hätte verfälscht werden können. In dem ersten Schritt wurde eine lokale polynomiale Regression in einem definierten Fenster des Scatterplots durchgeführt, die die Summe der Quadrate der gewichteten Fehler (Kernel Funktion) minimierte. Mit den sich ergebenden Fehlern einzelner Datenpunkte wurden dann Gewichte errechnet, wobei Datenpunkte mit kleineren Fehlern stärker gewichtet wurden. In einer solchen Gewichtsfunktion wird allgemein bei einem Fehler von 0 das Gewicht gleich 1 und fällt mit steigendem Fehler ab. Im zweiten Durchgang der Iteration wurde dann erneut die lokale Regression berechnet, wobei dann allerdings die einzelnen Datenpunkte entsprechend ihrer vorher bestimmten Gewichte in einem Fenster auf die resultierende Regressionsgerade einwirkten. Nach mehreren Durchgängen der Iteration änderten sich die resultierenden Gewichte kaum noch und damit war die Regression abgeschlossen. Dieses Verfahren wurde für Agilent Mouse cDNA-Mikroarrays eingesetzt.

Lokale Median Regression

Zur Normalisierung der Daten zweier Arrays oder der zweier unterschiedlich markierter Sonden eines Arrays wurden die Signalintensitäten entsprechend der Summe ihrer Ränge sortiert. In einem laufenden Fenster wurde das Verhältnis aus dem Median der Signalintensitäten (+/- 50 Proben) der beiden Datensätze errechnet. Dieses Verhältnis bildete den intensitätsabhängigen Faktor zur Normalisierung der

Daten. Die Nutzung eines Medians an Stelle eines Mittelwertes verhinderte den möglicherweise verfälschenden Einfluß einzelner Datenpunkte auf den Normalisierungsfaktor. Dieses Verfahren wurde für radioaktive cDNA-Makroarrays des Mouse Unigene Set I und des Human Unigene Set II und für fluoreszente herzspezifische cDNA-Mikroarrays eingesetzt.

2.8.6 Differentielle Genexpression

Die Identifikation von statistisch signifikanter Deregulation eines Gens in einem Array-Experiment ist mit zwei grundlegenden Problemen behaftet. Einer hohen Anzahl an parallelen statistischen Tests (bis zu 50.000 bei genomweiten Arrays) stehen eine häufig geringe Anzahl an biologischen wie technischen Replika (z.B. 2 x 4) gegenüber. Dieses sogenannte *multi-testing*-Problem führt in erster Linie bei schwachen Signalintensitäten durch zufällige Variation dieser zu statistischer Signifikanz und damit Falsch-Positiven. Herkömmliche Korrekturansätze wie die Bonferroni Korrektur liefern aufgrund der sehr hohen Replika-Anzahl keine befriedigenden Ergebnisse. In einem ersten Schritt wurden bei Affymetrix-Datensätzen zur Reduktion des keine Information enthaltenden Hintergrundrauschens alle Proben ohne *present call* in einem der Zustände entfernt. Die folgend dargestellten statistischen Verfahren begegneten dem *multi-testing*-Problem auf zwei unterschiedlichen Ebenen. In einem modifizierten t-Test wurden die beiden Standardabweichungen der beiden Verteilungen durch eine intensitätsabhängige Standardabweichung ersetzt. Bei geringer Replika-Zahl kommt es häufig zu "unsinnig" kleinen Standardabweichungen, die dann auch bei einem nur geringen Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Verteilungen zu Signifikanz führen. Somit wurden potentiell Falsch-Positive direkt identifiziert, da die intensitätsabhängige Standardabweichung gegebenenfalls weit größer als die direkt auf den Signalintensitäten einer Probe basierende ausfiel. Mit der "Significance Analysis of Microarrays" (SAM, Tusher et al.) wurde hingegen basierend direkt auf den Array-Daten aller Proben eine globale Falsch-Positiv-Rate abgeschätzt.

Modifizierter t-Test

Zur Analyse des Datensatzes wurde sowohl ein üblicher als auch ein modifizierter t-Test eingesetzt; es wurde eine Normalverteilung der Signalintensitäten einer Probe angenommen. In dem modifizierten t-Test wurden die beiden Standardabweichungen

der Verteilungen durch intensitätsabhängige, nicht mehr direkt auf den Meßwerten der Probe beruhende, Standardabweichungen ersetzt. Die diesem Ansatz zugrundeliegende Annahme geht von einer intensitätsabhängigen Meßgenauigkeit aus, die in der Standardabweichung ihren Ausdruck findet. Sowohl die technische als auch die biologische Reproduzierbarkeit beeinflussen die Standardabweichung, wobei natürlich nur die technische einen Einfluß auf die Intensitätsabhängigkeit der Standardabweichung hat. Zur Bestimmung der Intensitätsabhängigkeit wurden alle Proben nach der Rangsumme ihrer Signalintensitäten sortiert und dann der Median der Standardabweichung einer jeden Gruppe in einem Fenster von +/- 50 Proben bestimmt. Diese intensitätsabhängige Standardabweichung in Prozent der Signalintensität stieg mit abnehmender Meßgenauigkeit bei schwächer werdenden Signalen und gestattete zudem die Identifikation von gene tags, die eine zufällig deutlich zu niedrige Standardabweichung aufwiesen (siehe Abbildung 6). Ein Gen wurde somit bei statistischer Signifikanz in beiden t-Tests einer Probe als dereguliert betrachtet.

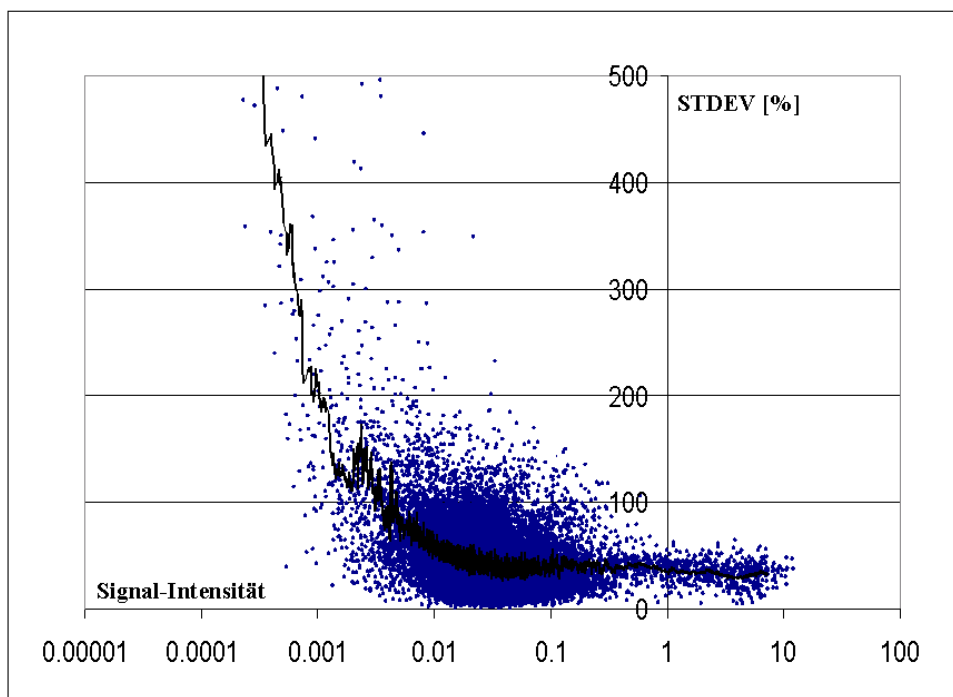


Abbildung 6: Meßgenauigkeit von Array-Signalintensitäten. Die Standardabweichung der Signalintensitäten in Prozent der Signalintensität (STDEV [%]) einer Probe mehrerer Hybridisierungen (fünf biologische und technische Replika, Sonden von MLP *knockout* Mäusen hybridisiert auf Arrays des Mouse Unigene Set 1) steigt mit fallender Signalintensität an. STDEV [%] ist somit ein Maß für die intensitätsabhängige Meßgenauigkeit. Auffallend ist die starke Streuung von STDEV [%] insbesondere bei geringen Signalintensitäten; dies impliziert eine potentiell hohe Falsch-Positiv-Rate für diese Proben.

Permutationsbasierter Test

Bei der "Significance Analysis of Microarrays" (SAM, Tusher et al.) wurde durch den Vergleich einer berechneten statistischen Kenngröße bei richtiger Zuordnung der Signalintensitäten zu den beiden zu analysierenden Zuständen (relative Differenz) im Vergleich zur zufälligen/frei permutierten Zuordnung (erwartete Differenz) die Signifikanz der Deregulation einer Probe bestimmt. Die relative Differenz $d_r(i)$ ergab sich aus:

$$d_r(i) = \frac{x_{i2} - x_{i1}}{s_i + s_0}$$

x_i : Mittelwert einer Gruppe von Signalintensitäten

s_i : Summe der Standardabweichungen der beiden Gruppen

s_0 : Korrekturwert zur Vermeidung zu kleiner s_i

Die erwartete Differenz $d_E(i)$ ergab sich aus dem Mittelwert diverser $d(i)$ bei frei permutierter Gruppenzuordnung der Signalintensitäten. Bei ähnlicher Expression eines Gens (i) in beiden zu vergleichenden Gruppen folgte $d_r(i) \approx d_E(i)$ und bei differentieller Expression $d_r(i) \neq d_E(i)$. Die frei wählbare Differenz beider statistischer Kenngrößen $\Delta d(i) = d_r(i) - d_E(i)$ war also der Grenzwert für die Definition der signifikanten Deregulation eines Gens.

Die freie Permutation aller Signalintensitäten einer Probe lieferte unter Umständen zufällig Kombinationen, die diesen Grenzwert hätten überschreiten können. Dies gestattete die Vorhersage einer Falsch-Positiv Rate (q-Wert), die mit steigendem $\Delta d(i)$ abnahm (siehe Abbildung 7).

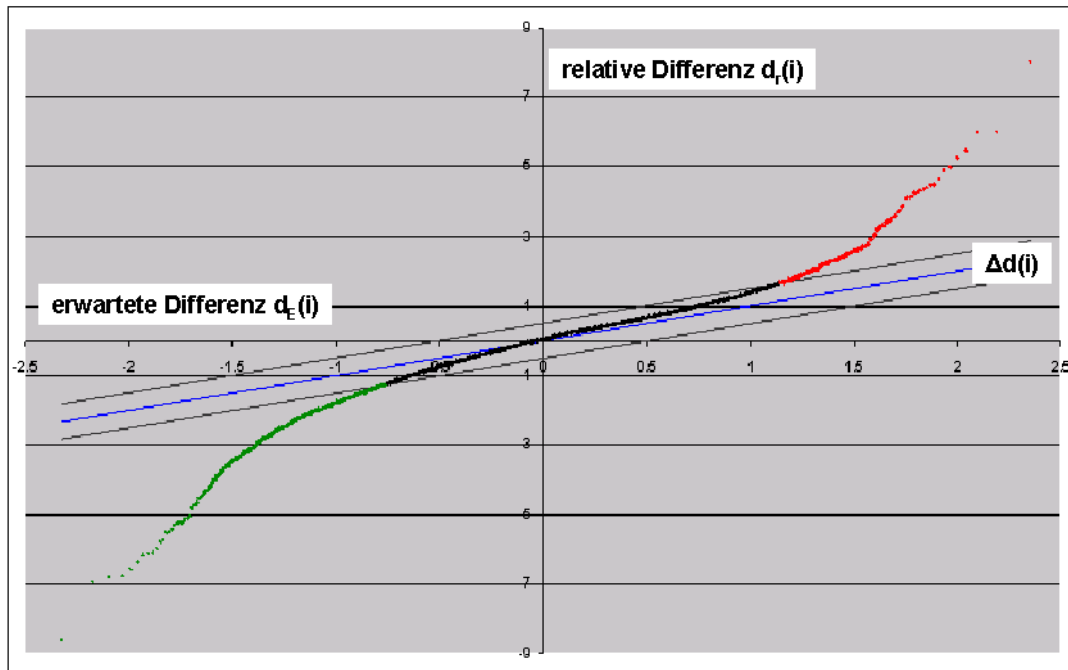


Abbildung 7: Bestimmung differentieller Genexpression durch permutationsbasierte statistische Verfahren. Die relative Differenz $d_r(i)$ bei richtiger Zuordnung der Signalintensitäten der Proben beim Vergleich zweier Zustände ist gegen die erwartete Differenz $d_E(i)$ bei frei permutierter Zuordnung der Signalintensitäten aufgetragen (vier technische Replika, Sonden von Telmisartan-behandelten Adipozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen hybridisiert auf Agilent Maus Olig-Mikroarrays G4121A). Ein gewählter Grenzwert für $\pm \Delta d(i)$ (schwarze Linien) definiert die deregulierten Proben. Bei verstärkter Expression eines Gens ergibt sich $d_r(i) \gg d_E(i)$ (rote Punkte) und bei verminderter Expression $d_r(i) \ll d_E(i)$ (grüne Punkte).

2.8.7 Hierarchisches Clustering

Eine Identifikation übergeordneter Expressionsmuster in einer Vielzahl an unterschiedlichen Zuständen in einem Array-Experiment gestattet das sogenannte Clustering. In einer Matrix aus Genexpressionsdaten in Form von logarithmierten Ratios zu einer Kontrolle oder logarithmierten Ratios zum Mittelwert aller Signalintensitäten einer Probe wurden über die Sonden und/oder über die Gene Vektoren gebildet (siehe Abbildung 8). Diese Vektoren wurden dann unter Anwendung unterschiedlicher Algorithmen nach Ähnlichkeit sortiert. Hierzu wurden bei dem sogenannten hierarchischem Clustering alle Vektoren paarweise miteinander verglichen und dabei z.B. mit einem euklidischen Abstand oder einem

Pearson- Korrelationskoeffizienten ein Ähnlichkeitswert jeweils für alle möglichen Paare berechnet⁸². Für die Paare mit höchster Ähnlichkeit wurde ein resultierender Vektor erzeugt und in den folgenden Runden der Berechnung der Ähnlichkeitswerte wurden wieder alle Vektoren (einzelne wie resultierende) miteinander verglichen. Dadurch entstand eine Baumstruktur, in der Proben mit einem ähnlichen Expressionsmuster über alle Arrays in einzelnen Subclustern zusammenfielen.

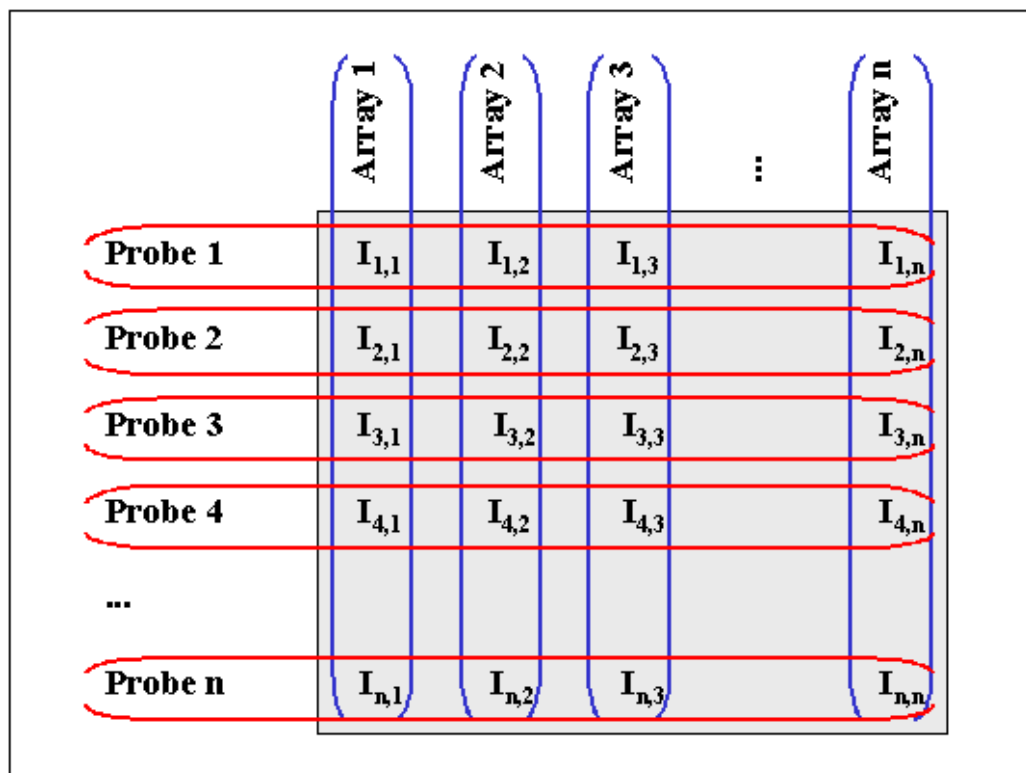


Abbildung 8: Aufbau einer Matrix bestehend aus den Intensitäten der Proben einer größeren Anzahl an Arrays. Vektoren können sowohl über die Spalten/Arrays als auch über die Zeilen/Proben gebildet werden. Diese Vektoren können dann für verschiedene statistische Verfahren wie hierarchisches Clustering, k-means Clustering oder "self organizing maps" (SOM) genutzt werden.

Ein solches Clustering sortierte also Vektoren nach relativer Ähnlichkeit innerhalb des Datensatzes; dafür mußten diese sich aber keinesfalls ähnlich sein, da ein Clustering keine Aussage über die Signifikanz der Korrelation der Expressionsmuster einzelner Gene liefert. Zur Durchführung der Cluster-Analysen wurden Cluster und Tree View (Eisen et al.), Genespring (Silicon Genetics) und GeneMaths (Applied Maths) eingesetzt.

2.8.8 Funktionelle Annotation von Gruppen von Genen mit DAVID

Zur Identifikation von statistisch signifikant überrepräsentierten *gene ontology* (GO)-Kategorien in einem gegebenen Eingangsgensatz wurde DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*)^{60,61} eingesetzt. Die Gene wurden in drei baumartig strukturierte Annotationen bei den übergeordneten Themen "Biologischer Prozeß", "Molekulare Funktion" und "Zelluläres Kompartiment" auf insgesamt fünf Ebenen einsortiert (<http://www.geneontology.org/>). Die erhaltene Anzahl an Genen für eine bestimmte GO-Kategorie im Vergleich zur Größe des Eingangsdatensatzes wurde mit der entsprechenden Anzahl an Genen in der GO-Kategorie des gesamten Genoms im Vergleich zur Gesamtgenzahl des Genoms verglichen. Mit einem exakten Fisher Test (2x2 Kreuztabelle) wurde die statistische Signifikanz berechnet.

2.8.9 Erstellen von Netzwerken von interagierenden Genen

Zur Identifikation von funktionellen Interaktionen von Genen in einem gegebenen Eingangsgensatz wurde die "Ingenuity Pathways Analysis" Software eingesetzt (<http://www.ingenuity.com/>). Funktionelle Interaktionen konnten z.B. direkte Protein-Protein Interaktionen oder Induktion eines Gens durch ein anderes darstellen; sie beruhten vollständig auf Ergebnissen in Publikationen. Basierend auf diesen funktionellen Interaktionen wurde Netzwerke erstellt und deren statistische Signifikanz in Hinblick auf die Größe des Eingangsdatensatzes und der Interaktionen im gesamten Genom durch einen exakten Fisher Test (2x2 Kreuztabelle) abgeschätzt. Die Angabe dieser Größe erfolgt als "score": ein p-Wert von e^{-27} entspricht einem "score" von 27.

2.8.10 Standardisierung und Veröffentlichung von Array-Datensätzen

Eine Vielzahl an unterschiedlichen statistischen Ansätzen zur Analyse von Array-Datensätzen wurde im Laufe der letzten Jahre entwickelt, die teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Analyse eines identischen Datensatzes führen. Um trotzdem eine Standardisierung und damit Vergleichbarkeit von Array Experimenten zu erreichen, wurden in der Zusammenarbeit einer Vielzahl von

Wissenschaftlern konkrete Richtlinien für die Durchführung von Array-Experimenten aufgestellt. Diese sogenannten "*Minimum information about a microarray experiment*" (MIAME)⁸³ Richtlinien zielen auf eine standardisierte Annotation des Experiments und des biologischen Materials ab und gliedern sich wie folgt:

a. Experimentelles Design

Annotation der hybridisierten Arrays (technische und biologische Replika)

b. Array-Design

Annotation aller Elemente (z.B. der Oligonukleotide) eines Arrays

c. Sondencharakterisierung

Exakte Beschreibung des biologischen Materials und der eingesetzten Methoden der RNA-/DNA-Isolation und Sondenmarkierung

d. Hybridisierung

Angabe der Hybridisierungsparameter (Puffer, Temperatur, Dauer, etc.)

e. Scannen und Bildanalyse

Angabe des Scanners und der Bildanalysesoftware

f. Normalisierung

Angabe des Algorithmus und gegebenenfalls der Software

Verschiedene webbasierte Datenbanken wie "*Gene Expression Omnibus*" (GEO) vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) folgen diesen Richtlinien und gestatten die uneingeschränkte Verfügbarkeit von Array-Datensätzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Diese beinhalten auch die unbearbeiteten Signalintensitäten direkt aus der Bildanalyse, so daß jeder interessierte Wissenschaftler diese Datensätze entsprechend seiner Fragestellung oder mit den von ihm bevorzugten Algorithmen bearbeiten kann.

2.9 Quantitative RT-PCR

Die reverse Transkription (RT) wurde mit dem TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems N808-0234) durchgeführt. Entsprechend der Ausgangsmenge an Gesamt-RNA wurde das Reaktionsvolumen dimensioniert; folgende Angaben beziehen sich auf eine maximale Gesamt-RNA-Menge von 2µg als Startmaterial für die RT. Das hinzuzugebende Volumen an H₂O ergab sich aus

38,5 μ l abzüglich des Volumens an Gesamt-RNA in H₂O. Es wurden äquivalente Mengen an beliebigen Hexameren und Oligo d(T)₁₆-Primer eingesetzt.

Die Reaktion setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

x μ l	H ₂ O
y μ l	Gesamt-RNA in H ₂ O
10.0 μ l	10 x TaqMan RT-Puffer
22.0 μ l	MgCl ₂ (jeweils 25mM)
20.0 μ l	dNTPs (2,5mM)
5.0 μ l	beliebige Hexamere und/oder oligo d(T) ₁₆ -Primer (50 μ M)
2,0 μ l	RNase Inhibitor (20U/ μ l)
2,5 μ l	MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ μ l)
Σ 100 μ l	

Der Ansatz wurde mit folgendem Reaktionsprogramm in einem Thermo-Cycler (MJ Research PT-100) inkubiert:

25°C für 10min

48°C für 40min

95°C für 10min

Es wurden Verdünnungsreihen der cDNAs erstellt und entsprechend ihrer Konzentration und der Expressionsniveaus der zu untersuchenden Gene angepasste Mengen für die quantitative RT-PCR eingesetzt. Um eine cDNA-spezifische und damit eine der Fragestellung entsprechende quantitative RT-PCR zu garantieren, wurden Intron-überspannende Primer genutzt, die ein Amplikon der Größe von ca. 100 Basenpaare generierten. Die Sequenzinformation für die einzelnen Gene wurde der Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/>) oder der Genbank-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Die Primer wurden mit der web-basierten Primer3 Software⁸⁴ des Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://frodo.wi.mit.edu/>) identifiziert, die Amplikongröße in einem Agarosegel überprüft und zudem die Spezifität durch virtuelle PCR kontrolliert (electronic PCR, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die PCR-Effizienz wurde mittels Verdünnungsreihen der cDNA bestimmt (siehe Abbildung 9) und gegebenenfalls

durch Variation der Annealing-Temperatur optimiert. Die Messungen erfolgten in einem ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) und die PCR wurde mit dem SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems 4309155) durchgeführt. Für die Messungen wurden "MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plates" (Applied Biosystems 4306737) genutzt, die mit "MicroAmp™ Optical Adhesive Films" (Applied Biosystems 4311971) verschlossen wurden. Entsprechend der parallel in einer Platte laufenden Proben wurde soweit wie möglich beim Ansetzen mit Master-Lösungen gearbeitet und zur Vermeidung von Verdunstungseffekten die Platte auf Eis gekühlt. Eine einzelne Reaktion war wie folgt zusammengesetzt:

10µl	cDNA
5µl	RT-PCR Primer (jeweils 7,5pmol/µl forward und reverse Primer)
15µl	SYBR Green (Applied Biosystems 4309155)
Σ30µl	

Der Ansatz wurde mit folgendem Reaktionsprogramm in einem ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) inkubiert:

1. 95°C für 10min
2. 40 Zyklen:
95°C für 15s
58°C - 60°C für 1min (je nach Primerpaar)
3. Dissoziationsgradient: 95°C - 60°C

Mit der ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems) wurden die Ct-Werte ausgelesen. Die Normalisierung des Datensatzes erfolgte mit zwei bis drei Haushalts-Genen (*hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase* (HPRT), *glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase* (GAPDH), *ribosomal protein P0* (P0)), wobei bei annähernd 100%-iger PCR-Effizienz (technische Replika immer in Verdünnungsreihen) die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode zur Berechnung der Ratios der Genexpression genutzt wurde^{85,86}. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt.

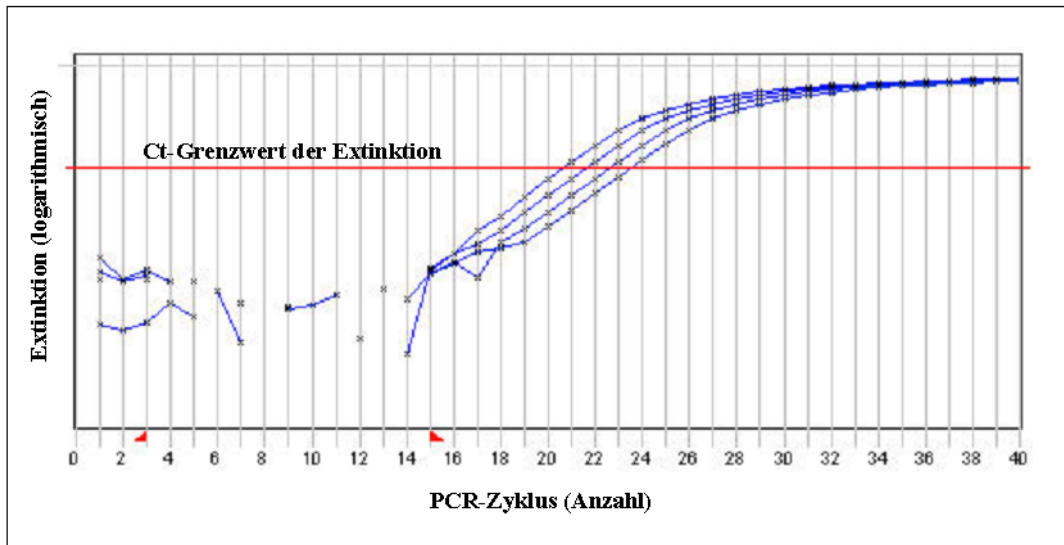


Abbildung 9: Messung der PCR-Amplifikation des Gens *ribosomal protein P0*. Es wurde eine Verdünnungsreihe einer murinen cDNA (jeweils 1 zu 1) in vier Stufen eingesetzt. In dem quantitativen Bereich der Messung (linearer Anstieg der Extinktion bei logarithmischer Auftragung) erfolgte die Festlegung des Ct-Wertes (rote Linie). Entsprechend der jeweils doppelten cDNA-Mengen wurde bei einer PCR-Effizienz von ~100% das gemessene $\Delta C_t = 1$ zwischen zwei Verdünnungsstufen.

2.10 Sequenzierung von Plasmiden nach der Kettenabbruchmethode

2.10.1 Plasmid-Präparation

In einem 96er Deepwellblock (Promega) wurden 1,5ml 2 x YT Medium mit 100mg/ml Ampicillin (sterilfiltriert, Sigma A2804) mit einem Klon beimpft und 16h bei 37°C und 260rpm (Wesbart) inkubiert. Nach einer Zentrifugation mit 4.000rpm (Eppendorf Zentrifuge 5810R) für 10min wurde der Überstand entfernt, 80µl Puffer 1 (siehe 2.13) zugegeben und auf einem Vortex bis zum Erreichen einer vollständigen Suspension geschüttelt. Dann wurden 80µl von Puffer 2 zugegeben, die Lösung kurz durchmischt und bis zu 5min inkubiert. Nach Zugabe von 80µl von Puffer 3 und kurzem Durchmischen (Vortex) wurden 240µl des Lysats in Millipore-Filterplatten überführt, diese auf eine 96-MTP Platte (Costar) in eine PE-Base gesetzt und mit 3.500rpm bis

4.000rpm (Eppendorf Zentrifuge 5810R) für 10min zentrifugiert. Das geklärte Lysat wurde in Millipore- Glasfiberplatten überführt, mit 3.500rpm bis 4.000rpm (Eppendorf Zentrifuge 5810R) für 5min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Plasmide wurden zweimal mit 200µl 80% Ethanol gewaschen (3.500rpm bis 4.000rpm; 5min; Eppendorf centrifuge 5810R) und mit 70µl Tris-HCl pH 8,5 nach 2min bis 3min Inkubation aus der Glasfiberplatte eluiert (Zentrifugation: 3000rpm; 5min-10min; Eppendorf Zentrifuge 5810R).

2.10.2 Sequenzierungsreaktion

Die Inserts der Plasmide wurden vom 5'- und vom 3'-Ende ausgehend ansequenziert. Zu 3µl Plasmid (25ng/µl) wurden 2µl Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems) und entsprechend des Plasmids 1µl Primer (5pmol/µl) gegeben.

Eingesetzte Primer und Reaktionsprogramme:

M13 forward: 5'-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

96°C 3min; 25 Zyklen (96°C 10s; 55°C 5s; 70°C 4min); 70°C 8min; 20°C endlos

M13 reverse 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

96°C 3min; 25 Zyklen (96°C 10s; 50°C 5s; 70°C 4min); 70°C 8min; 20°C endlos

T3 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'

96°C 3min; 25 Zyklen (96°C 10s; 48°C 5s; 70°C 4min); 70°C 8min; 20°C endlos

T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

96°C 3min; 25 Zyklen (96°C 10s; 45°C 5s; 70°C 4min); 70°C 8min; 20°C endlos

2.10.3 Ethanol fällung und Bestimmung der Sequenz

Zu der Sequenzierungsreaktion wurden 60µl Ethanol (0°C) gegeben und der Ansatz für mindestens 10min eingefroren. Es folgte eine Zentrifugation bei 4.000rpm für 60min und 4°C (Eppendorf Zentrifuge 5810R); der Überstand wurde entfernt und das Pellet dreimal mit 120µl 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 4.000rpm, 20min,

4°C, Eppendorf Zentrifuge 5810R). Das Pellet wurde in 3µl Sequenzierungs-Auftragungspuffer aufgenommen und die Sequenz mit einem ABI 3700 Sequenzer (PE Applied Biosystems) und der dazugehörigen Software bestimmt. Zur Annotation der erhaltenen Sequenzen wurde BLAST genutzt (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.11 Messung der Herzfunktion in der Maus

Alle Messungen der Herzfunktion in der Maus wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Paulus Kirchhof am Universitätsklinikum Münster durchgeführt.

Es wurden Gruppen untrainierter Tiere im Alter von 9-12 Wochen, 22-26 Wochen und >42 Wochen sowie trainierte Tiere im Alter von 22-26 Wochen untersucht. Die trainierten Tiere im Alter von 22-26 Wochen wurden einem 8-wöchigem Schwimmtraining unterzogen. Hierbei wurde die Trainingsdauer von 5min auf 1,5h pro Tag über den gesamten Zeitraum von 8 Wochen gesteigert (auf 5 Tage Training folgten 2 Tage Ruhe). Die Messung der kardialen Morphologie und *in vivo* Funktion am sedierten Tier erfolgte mit einem Philips Sonos 5500 Ultraschallgerät (Philips Medical Systems, schematischer Versuchsaufbau siehe Abbildung C im Appendix 9.1). Elektrokardiographie-Messungen am sedierten Tier erfolgten mit einem 6-Kanal-EKG (EMKA Technologies) und an frei beweglichen Tieren mit einem implantierten telemetrischen Transmitter (Data Science Inc.). Elektrophysiologische Messungen erfolgten am isolierten Langendorff-perfundiertem Herzen (schematischer Versuchsaufbau siehe Abbildung D im Appendix 9.1).

2.12 Elektronenmikroskopie

Es wurden 1mm³ große Gewebestücke aus dem rechten Ventrikel entnommen und für 2h in 4%iger Fixationslösung eingelegt. Anschließend wurden die Präparate 2x für jeweils 10min bei RT mit 50mM Cacodylatpuffer (pH 7,4) und 100mM NaCl gewaschen. Nach einstündiger Inkubation in 50mM Glycylglycin und 100mM NaCl bei RT zur Neutralisierung der freien Aldehydgruppen wurden die Gewebe erneut wie oben beschrieben gewaschen. Es folgte eine einstündige Behandlung mit einer Lösung aus 1% Osmiumtetroxid, 50mM Cacodylatpuffer und 100mM NaCl und ein

dritter Waschgang mit abschließender Waschung in destillierten Wasser. Danach wurden die Proben über Nacht in 1% Uranylacetat in H₂O belassen. Nach jeweils zehnmütiger Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25%, 50%, 75%, 85%, 95%, 100%) wurden die Gewebe für 15min in Propylenoxid überführt und anschließend in Epon Einbettungsmedium nach Spurr eingebettet. Die in Beemkapseln überführten Präparate wurden zur Polymerisation für 2 Tage bei 60°C in einem Brutschrank inkubiert. Die mit dem Ultramikrotom Leica Ultracut III (Leica Microsystems GmbH) angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit Reynoldsfärbelösung nachkontrastiert und mit einem Elektronenmikroskop Philips CM100 (Philips Medizin Systeme GmbH) und einer TVIPS Fsatscan 1K CCD-Kamera (Tietz Video and Image Processing Systems GmbH) untersucht.

2.13 Lösungen und Puffer

SSARC-Puffer (Angabe pro Liter):

198ml	20 x SSC
7,9ml	0,5M EDTA
556ml	Wasser
238ml	'Sarkosyl' NL (Merck 70005920)

20 x SSC-Stammlösung (Angabe pro Liter):

175,3g	NaCl
88,2g	Natriumcitrat

HTP-PCR-Puffer (Angaben für 100ml):

20ml	2,5M KCl (Merck 1.04936)
10ml	10% TWEEN 20 (Sigma-Aldrich P2287)
1,5ml	1m MgCl ₂ (Merck 1.05833)
35ml	1M Tris-Base (Roth 4855.2)
15ml	1M Tris-HCl pH 5,0
18,5ml	H ₂ O

SuperAmine-Blockierungslösung:

1,5g	Bernsteinsäure (Merck 8.00683)
250ml	1-Methyl-2-Pyrolidione (Sigma-Aldrich 494496)
250ml	0,2M Natriumborat (Merck 1.06306) pH 8,0 eingestellt mit NaOH (Merck 1.06498)

Die Blockierungslösung wurde immer frisch angesetzt. Bernsteinsäure wurde zunächst in 250ml 1-Methyl-2-Pyrolidione gegeben und, nachdem es vollständig gelöst war, sofort das Natriumborat hinzugegeben.

2 x YT-Medium (Angaben pro Liter)

16g	bacto-tryptone (Gibco 152-00014)
10g	bacto-yeast extract (Gibco20047-056)
5g	NaCl (Merck 1.06404)

Der pH-Wert wurde mit 5N NaOH auf 7 eingestellt und das Medium autoklaviert

Sequenzierungs-Auftragungspuffer

50mg/ml	Dextran Blue from Leuconotoc spp. (Fluka 31393)
25mM	EDTA pH 8,0

obige Lösung 1:5 mit Formamid (Sigma F-9037) verdünnen

10 x TBE-Puffer

1,33M	Tris-HCl pH 8,8
25mM	EDTA pH 8,0
460mM	H ₃ BO ₃ (Merck 1.00165)

Puffer für die Plasmidpräparation (Promega):

Puffer P1 (Wizard® SV 96 Resuspension)

50mM	Tris-HCl pH 7,5
10mM	EDTA (Merck 1.08418)
100µg/ml	RNase A (Ambion 12091-039)

Puffer 2 (Wizard® SV 96 Cell Lysis Solution)

0,2M NaOH (Merck 1.06498)
1% SDS

Puffer 3 (Wizard® SV 96 Neutralization Solution)

4,09M Guanidin Hydrochlorid (Sigma G-7153)
0,759M Kalium Azetat (Merck 1.04820)
2,12M Essigsäure (Merck 1.00063)

Gelauftragungspuffer

0,25% (w/v) Bromphenolblau (Merck 11746)
0,25% (w/v) Xylene Cyanol (Bio Rad 161-0423)
25% (w/v) Ficoll 400 (Serva21373)

Lösungen für die Elektronenmikroskopie

Fixationslösung:

2% Glutardialdehyd
2% Formaldehyd (Frisch aus Paraformaldehyd hergestellt)
in 50mM Cacodylatpuffer (pH 7,4) und 50mM NaCl

Waschlösung:

50mM Cacodylatpuffer (pH 7,4) und 100mM NaCl

Neutralisation:

50mM Glycylglycin, 100mM NaCl

3 Ergebnisse

Zur Charakterisierung von sechs Mausmodellen kardiomyopathischer Erkrankungen und der humanen Form der DCM wurden jeweils Genexpressionsprofile mit Mikroarrays erstellt. Für die Experimente mit murinem Probenmaterial wurden kommerzielle Agilent cDNA Mikroarrays und für die Experimente mit humanem Probenmaterial eigens hergestellte kardiale Themenarrays eingesetzt. Eine Übersicht über den Aufbau der Experimente und die Schritte der bioinformatischen Auswertung ist in Abbildung 10 gegeben.

Zwei wichtige Evaluierungsexperimente wurden den zentralen Array-Studien der einzelnen Mausmodelle bzw. humanen Proben vorgeschaltet: 1. Der Einsatz von T7-Promotor-basierten Protokollen zur Amplifikation von mRNA, welcher aufgrund der geringen RNA-Mengen bei den embryonal lethalen homozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen erforderlich war; 2. Die Optimierung von Protokollen zur Mikroarray-Herstellung und deren Einsatz zur Produktion von humanen kardialen Themenarrays möglichst hoher Sensitivität.

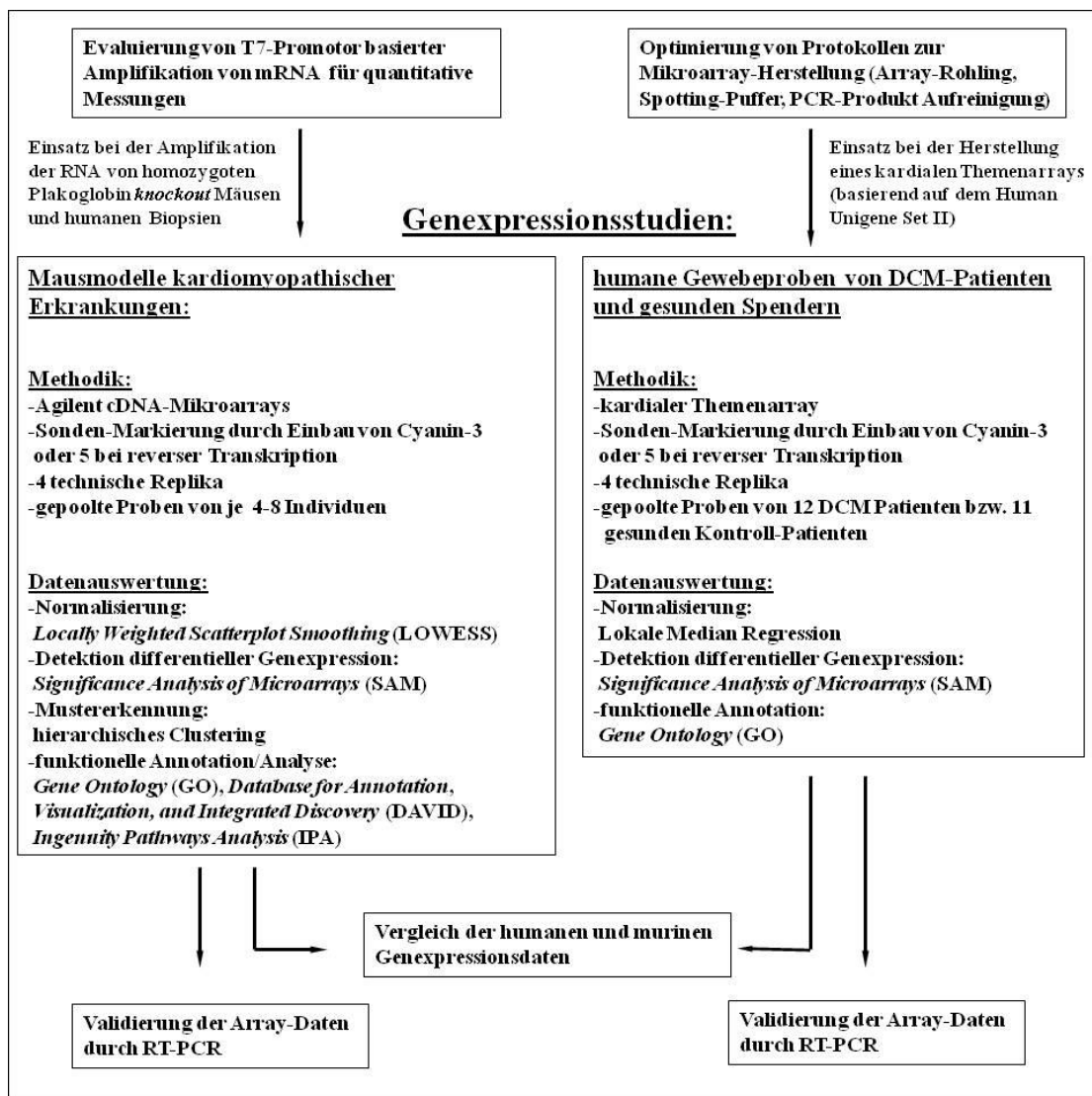


Abbildung 10: Aufbau und Methodik der vergleichenden humanen und murinen Kardiomyopathie-Expressionsstudien und der vorgeschalteten Evaluierungsexperimente.

3.1.1 Evaluierung von amplifizierter RNA und Gesamt-RNA als Startmaterial in komplexen Hybridisierungen und quantitativer RT-PCR

Um die Durchführung von Genexpressionstudien nach Standard Protokollen (Mikroarray-Hybridisierungen und quantitative RT-PCR) mit unzureichenden RNA-Startmengen zu ermöglichen, wurde ein vorgeschaltetes T7-Promotor basiertes Amplifikationsprotokoll validiert. Als Startmaterial für die Herstellung der markierten Sonden mittels reverser Transkription diente Gesamt-RNA und amplifizierte RNA (aRNA) von HeLa- und HEK293-Zellen (aufgrund der zu erwartenden großen

Unterschiede in der Genexpression). Zur Herstellung der aRNA wurden zwei Runden der T7-basierten Amplifikation (2.2.3) durchgeführt; als Startmaterial der ersten Runde dienten 5µg Gesamt-RNA und als Startmaterial der zweiten Runde eine äquivalente Menge aRNA der ersten Runde. Die Konzentration und Größenverteilung wurde nach jeder Runde der Amplifikation überprüft (2.2.2); das Amplifikationsverhältnis von Startmaterial zu erhaltener aRNA betrug ca. Faktor 1:100. Um das Ergebnis einer komplexen Hybridisierung mit aRNA bzw. Gesamt-RNA als Startmaterial zu vergleichen, wurden ausgehend von beiden RNA-Arten sowohl für die HeLa- als auch für die HEK293-Zellen markierte Sonden hergestellt (jeweils Cyanin-3 und Cyanin-5, *dye-swap*) und auf humane kardiale Mikroarrays hybridisiert (2.5.4).

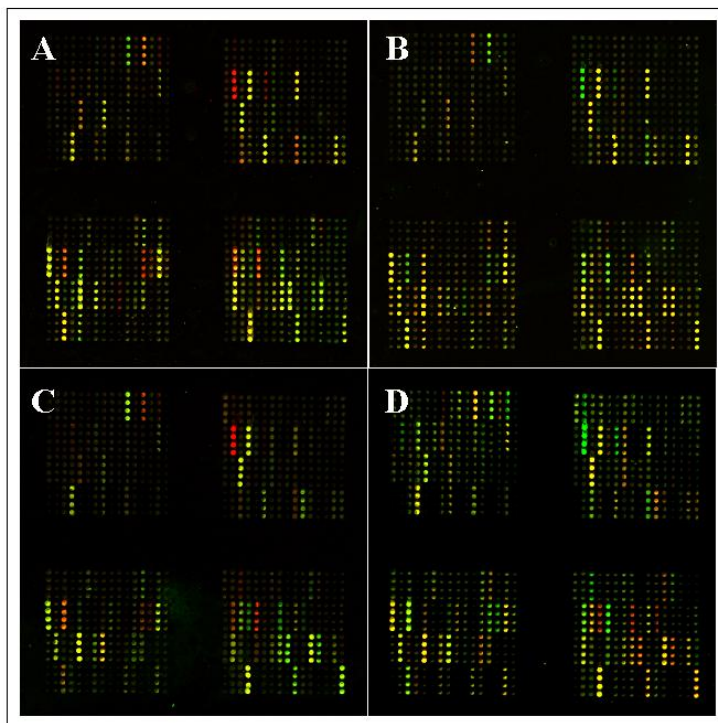


Abbildung 11: Vergleich der Hybridisierung von Sonden ausgehend von Gesamt-RNA (A und B) oder aRNA (C und D). Zwei unterschiedliche RNA-Populationen (HEK293 und HeLa) dienten als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Cyanin-3- und Cyanin-5 markierten Sonden. Die Genexpression beider Zelltypen wurde in *dye-swap*-Experimenten sowohl mit Gesamt-RNA als auch mit aRNA nach zwei Runden der T7-basierten Amplifikation verglichen. Es wurde ein 1.300 PCR-Produkte umfassender humaner Test-Array eingesetzt (8 Replika pro PCR-Produkt).

A: Gesamt-RNA als Startmaterial, HEK293-Cyanin-3 und HeLa-Cyanin-5;

B: Gesamt-RNA als Startmaterial, HEK293-Cyanin-5 und HeLa-Cyanin-3;

C: aRNA als Startmaterial, HEK293-Cyanin-3 und HeLa-Cyanin-5;

D: aRNA als Startmaterial, HEK293-Cyanin-5 und HeLa-Cyanin-3

Dieser humane Mikroarray beinhaltete ca. 1300 Klone des Human Unigene Set 1 mit je 8 technischen Replika (gespottet vom RZPD), die in vorhergehenden Experimenten mit Biopsien von DCM-Patienten oder gesunden Kontrollpatienten in kardialem Gewebe signalgebend gefunden wurden. Entsprechend der Unterschiedlichkeit des Genexpressionsprogrammes von HeLa - und HEK293-Zellen waren sehr viele Gene dereguliert. Rein optisch lieferte der Einsatz von aRNA als Startmaterial ähnliche Ergebnisse bei den Hybridisierungen wie Gesamt-RNA (siehe Abbildung 11). Der Austausch der Farbstoffe Cyanin-3 und Cyanin-5 bei der Markierung der unterschiedlichen cDNA-Populationen ("dye-swap") führte nach Normalisierung (2.8.2 und 2.8.5) bei den komplexen Hybridisierungen zu entsprechend reziproken Verhältnissen der Intensitäten beider Farbkanäle (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Resultierende Ratios der Genexpression im Vergleich von HEK293- und HeLa-Zellen bei Einsatz von Gesamt-RNA oder aRNA als Startmaterial. Für repräsentativ ausgewählte Klone mit relativ starker Deregulation ergaben sich die jeweils reziproken Ratios bei Austausch der Farbstoffe. Der Einsatz von amplifizierter RNA lieferte ähnliche Ratios der Genexpression wie der Einsatz von Gesamt-RNA als Startmaterial.

S/H-Ratio: Ratio der Signalintensität zur Hintergrundintensität

P: Signifikanz berechnet mit einem modifizierten t-Test (2.8.6)

Gesamt-RNA							
HEK293 Cyanin-3 ,HeLa Cyanin-5				HEK293 Cyanin-5, HeLa Cyanin-3			
Klon ID	Expressions-Ratio	S/H-Ratio	p	Klon ID	Expressions-Ratio	S/H-Ratio	p
11D2B5	+17	80	5e-7	11D2B5	.15	12	2e-8
11E1N13	+5	35	5e-6	11E1N13	.6	11	1e-6
21D3M1	+3	143	4e-6	21D3M1	.4	21	5e-6
11D2A5	+5	25	3e-6	11D2A5	.10	12	6e-7
21D2B5	+19	43	2e-9	21D2B5	.18	23	4e-8
amplifizierte RNA (2 Runden)							
HEK293 Cyanin-3, HeLa Cyanin-5				HEK293 Cyanin-5, HeLa Cyanin-3			
Klon ID	Expressions-Ratio	S/H-Ratio	p	Klon ID	Expressions-Ratio	S/H-Ratio	p
11D2B5	+11	56	1e-8	11D2B5	.16	36	8e-9
11E1N13	+6	61	6e-7	11E1N13	.5	6	3e-6
21D3M1	+4	140	1e-6	21D3M1	.4	56	2e-7
11D2A5	+7	67	3e-7	11D2A5	.6	17	1e-7
21D2B5	+14	39	1e-7	21D2B5	.15	24	7e-9

Zur Beurteilung auf Datenebene wurden Scatter-Plots der Signalintensitäten der Hybridisierungen erstellt; um mögliche Verfälschungen leicht variabler Größen wie beispielsweise Korrelationskoeffizienten zu verhindern, wurde hier auf Abzug der

Hintergrundsignalintensität und auf jegliche Normalisierung verzichtet. Für die beiden Hybridisierungen mit Gesamt-RNA als Startmaterial lagen die Korrelationskoeffizienten bei $r=0,73$ und $r=0,71$ (siehe Abbildung 12). Dies waren im Vergleich zu anderen komplexen Hybridisierungen relativ niedrige Werte, welches durch die sehr unterschiedlichen Genexpressionsprogramme von HeLa- und HEK293-Zellen verursacht wurde. Für die beiden Hybridisierungen mit aRNA als Startmaterial lagen die Korrelationskoeffizienten bei $r=0,72$ und $r=0,62$ und damit nur geringfügig niedriger.

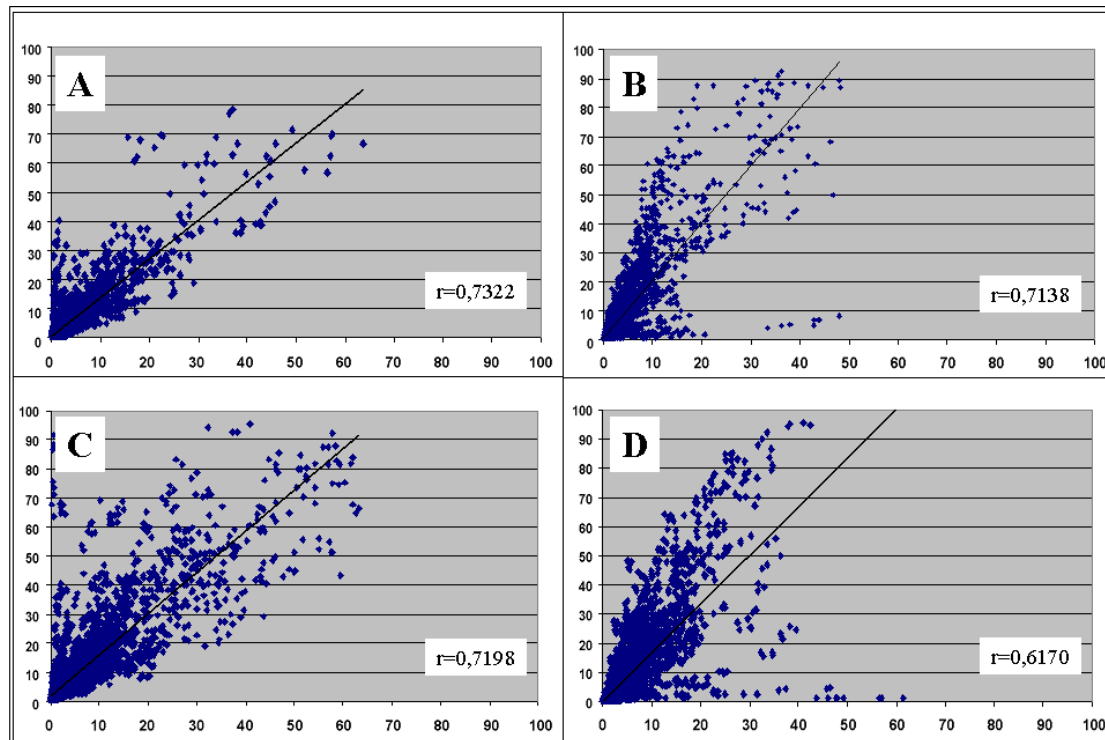


Abbildung 12: Berechnung der Korrelationskoeffizienten der Signalintensitäten von HEK293- bzw. HeLa-Sonden mit Gesamt-RNA (A und B) und aRNA (C und D) als Startmaterial. Aufgetragen wurden die nicht normalisierten Signalintensitäten der zwei Sonden eines Arrays jeweils im *dye swap*-Experiment. Für Gesamt-RNA (A und B) bzw. amplifizierte RNA (C und D) wurden in der Größenordnung ähnliche Korrelationskoeffizienten gefunden. Die relativ starke Streuung der Signalintensitäten wurde durch die sehr unterschiedliche Genexpression der zwei Zelllinien verursacht.

Ein Vergleich der 50 Klone, die mit Gesamt-RNA bzw. mit aRNA als Startmaterial die jeweils stärkste Signifikanz (modifizierter t-Test; 2.8.6) in der Deregulation zeigten, lieferte eine Übereinstimmung von 62%. Nur ein Klon, der mit Gesamt-RNA als Startmaterial in dieser Liste der 50 Klone mit stärkster Signifikanz auftauchte, erreichte mit aRNA als Startmaterial keine Signifikanz ($p < 0,01$ als Grenzwert; 2.8.6).

Generell führte allerdings, bedingt durch die Abnahme der durchschnittlichen Transkriptgröße bei jeder Runde der Amplifikation (Annealing mit beliebigen Hexameren, beschränkte Effizienz der reversen Transkription und *in vitro* Transkription), der Einsatz von aRNA bei komplexen Hybridisierungen zu einer stärkeren unspezifischen Bindung. Zudem variierte das Amplifikationsverhältnis für unterschiedliche Transkripte, da die enzymatische Aktivität bei der reversen Transkription und *in vitro* Transkription zum Teil sequenzabhängig ist. In Folge dessen wurden nur Sonden, die ausgehend von aRNA der gleichen Anzahl an Runden der Amplifikation generiert wurden und eine ähnliche Größenverteilung aufwiesen, in komplexen Hybridisierungen eingesetzt.

Neben der Validierung bei komplexen Hybridisierungen wurde die Vergleichbarkeit von aRNA und Gesamt-RNA als Startmaterial für die quantitative RT-PCR untersucht. Es wurden hierzu mehrere Gene ausgewählt, die in einem Mikroarray-Experiment als dereguliert detektiert worden waren (ErbB4 *knockout* Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen; siehe 3.2.2). Es wurde aRNA nach einer Runde der Amplifikation und Gesamt-RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (mit beliebigen Hexameren bzw. Oligo d(T)₁₆-Primer) und mit genspezifischen Primern die quantitative RT-PCR durchgeführt (2.9). Die erhaltenen Ratios der Genexpression lagen für aRNA und Gesamt-RNA in einer vergleichbaren Größenordnung und es wurde jeweils für alle Gene statistische Signifikanz erreicht ($p < 0.05$; students t-Test, siehe Abbildung 13). Nur bei *Four and a half LIM domains 1* (fhl1) ergaben sich größere Abweichungen im Vergleich zu den Array-Daten.

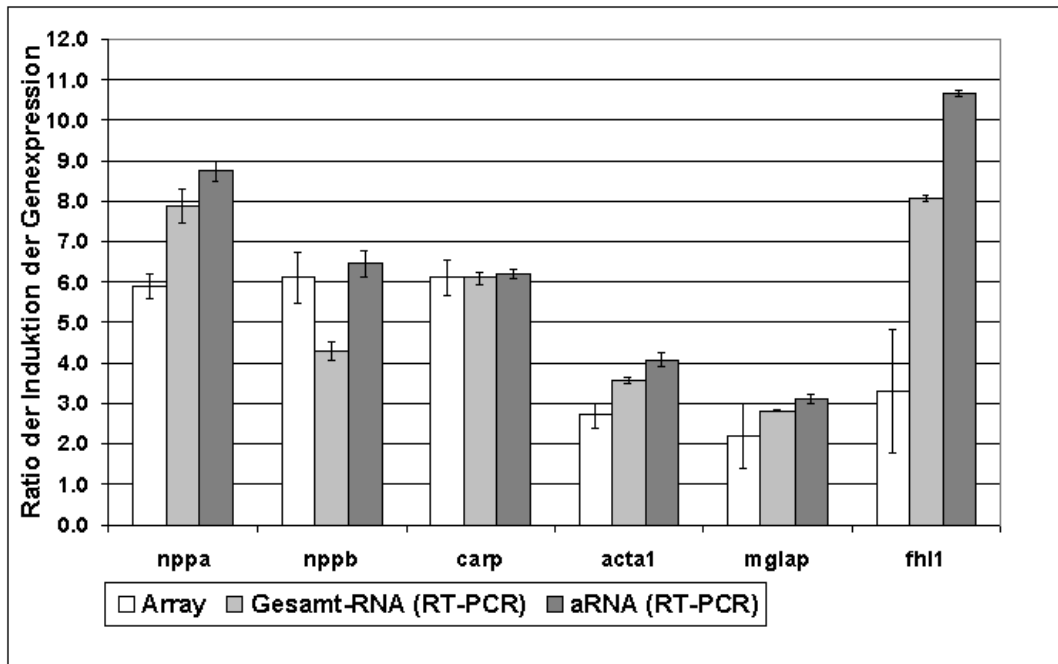


Abbildung 13: Quantitative RT-PCR mit Gesamt-RNA oder aRNA als Startmaterial. Es wurde ausgehend von Gesamt-RNA oder aRNA (eine Runde der Amplifikation) als Startmaterial mittels reverser Transkription cDNA von Wildtyp- und ErbB4 *knockout* Mäusen generiert. Für sechs Gene, die eine signifikante Deregulation in einem Array-Experiment aufwiesen (ErbB4 *knockout* gegen Wildtyp), wurde quantitative RT-PCR auf den unterschiedlichen cDNAs durchgeführt. Für alle Gene waren bei allen Methoden die beobachteten Expressionsunterschiede statistisch signifikant (SAM bzw. students t-Test).

nppa: *natriuretic peptide precursor A*, nppb: *natriuretic peptide precursor B*, carp: *cardiac ankyrin repeat protein*, mglap: *matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein*, fh1: *Four and a half LIM domains 1*, acta1: *actin, alpha skeletal muscle*

3.1.2 Vergleich von Protokollen zur Mikroarray-Herstellung

Zur Optimierung der Leistungsfähigkeit bzw. Sensitivität von cDNA-Mikroarrays wurden vier kommerzielle Array-Rohlinge (Telechem Superamine SMM, Corning CMT GAPS 40006, Sigma-Prep Silane SS4651 und Sigma Screen S9936) in Kombination mit drei unterschiedlichen Spotting-Puffern (Micro Spotting Solution Plus MSS, 3 x SSC und 50% DMSO) und zwei unterschiedlichen Aufreinigungen des gespotteten PCR-Produkts (Fällung mit EtOH und QIAquick PCR Purification Kit) verglichen. Hierzu wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Produkt ausgehend von einem *Arabidopsis thaliana* cDNA-Klon hergestellt (2.3). Da die Konzentration von kommerziell erhältlichem α -³³P-markiertem dCTP für eine PCR vergleichsweise

niedrig war (ca. $4\mu\text{M}$), wurde dieses mit unmarkiertem dCTP versetzt. Zum Erhalt einer maximalen Menge an markiertem PCR-Produkt wurden drei unterschiedliche Verhältnisse von $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ dCTP zu dCTP getestet (siehe Abbildung 14), wobei entsprechend des PCR-Reaktionsansatzes die maximal mögliche Menge Radioaktivität zugegeben wurde. Für das Verhältnis $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ dCTP / dCTP von 1 zu 10 wurden die höchsten Ausbeuten an radioaktivem PCR-Produkt erzielt und folgend eine präparative PCR für das vorgesehene Spotting durchgeführt.

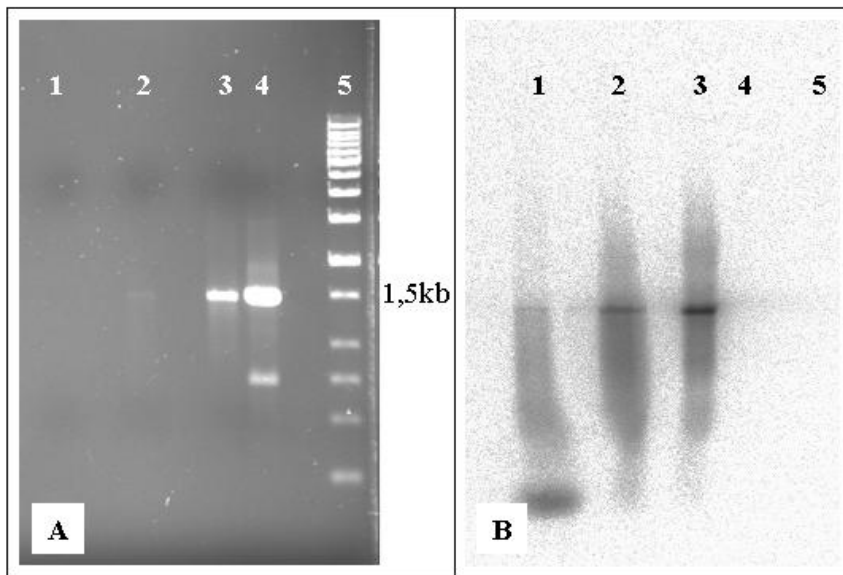


Abbildung 14: Erzeugung eines radioaktiven PCR-Produkts ausgehend von einem *Arabidopsis thaliana* Klon. Es wurden drei unterschiedliche Verhältnisse von $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -dCTP zu kaltem dCTP eingesetzt. 1: $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -dCTP, 2: $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -dCTP / dCTP: 1 zu 1, 3: $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -dCTP / dCTP: 1 zu 10, 4: dCTP, 5: Stratagene kb DNA ladder. Die Detektion der PCR-Produkte in einem Agarosegel erfolgte sowohl mittels Ethidiumbromid (A) als auch nach Trocknen mittels eines Phosphorimagers (B). Die beste Ausbeute ergab sich bei einem Verhältnis $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -dCTP / dCTP von 1 zu 10. Unterschiede in der Größenverteilung des Produkts zwischen beiden Detektionsarten ergaben sich durch die lineare Visualisierung des Geldokumentationssystems (SynGene) und durch die logarithmische Visualisierung des Phosphorimagers (Fuji).

Von dem erhaltenen PCR-Produkt wurde ein Teil durch Fällung mit Ethanol und ein Teil mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und anschließend die Konzentration und Aktivität vermessen. Es wurden Verdünnungsreihen erstellt und die Verdünnungsstufen mit den drei unterschiedlichen Spotting-Puffern (Micro Spotting Solution Plus MSS, 3 x SSC und 50% DMSO) vermischt

(Endkonzentrationen: 500ng/μl; 400ng/μl; 200ng/μl; 100ng/μl; 50ng/μl; 25ng/μl; 12,5ng/μl; 6,25ng/μl). Diese Verdünnungsreihen wurden auf die vier unterschiedlichen Array-Rohlinge (Telechem Superamine SMM, Corning CMT GAPS 40006, Sigma-Prep Silane S4651 und Sigma Screen S9936) gespottet (2.5.2). Drei Arrays pro Fabrikat mit drei identischen Feldern und jeweils den PCR-Produkten im Duplikat ergaben insgesamt 18 technische Replika für jedes spezifische PCR-Produkt (siehe Abbildung 15).

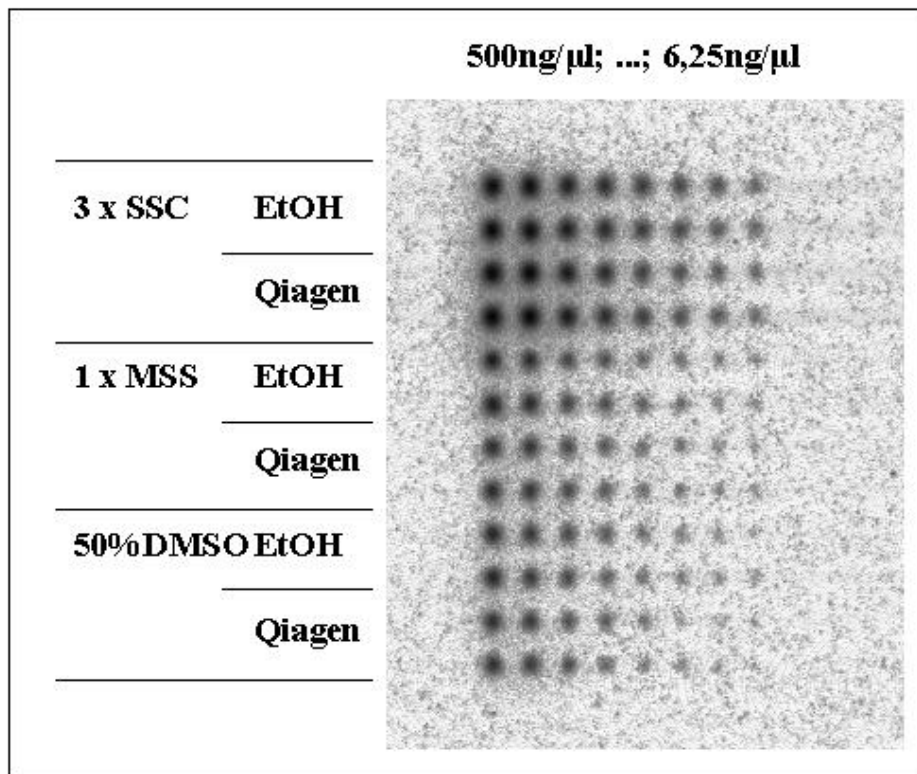


Abbildung 15: Einzelnes Feld eines Arrays der gespotteten radioaktiven PCR-Produkte. In einem solchen Feld wurden alle spezifischen PCR-Produkte einer Verdünnungsstufe im Duplikat gespottet. Jeweils drei Arrays pro Array-Typ wurden hergestellt und pro Array drei solcher Felder in der Bild- bzw. Datenanalyse berücksichtigt, so daß sich je Array-Typ, Spotting-Puffer, Aufreinigung und Verdünnungsstufe 18 technische Replika ergaben. EtOH: gereinigt durch Fällung mit Ethanol; Qiagen: gereinigt mit QIAquick PCR Purification Kit; 3 x SSC: 3 x SSC- Puffer, 1 x MSS: 1 x MSS: Micro Spotting Solution; 50% DMSO: 50% DMSO-Puffer.

Die Arrays wurden prozessiert und die immobilisierten PCR-Produkte mit einem Phosphorimager und den dazugehörigen Phosphorscreens quantifiziert. Dieses gemessene radioaktive Signal stellte ein Maß für die Menge an immobilisiertem PCR-Produkt dar. Aufgrund der eingeschränkten Meßmöglichkeiten der beim

Spotten übertragenen Volumina (viskositätsabhängig) und der letztendlich für das angestrebte Experiment maßgeblichen erzielten Signalintensität wurden alle Meßgrößen auf Ebene der dimensionslosen radioaktiven bzw. fluoreszenten Signalintensitäten in Abhängigkeit von der eingesetzten PCR-Produktkonzentration betrachtet. Bei den jeweils 18 technischen Replika hoher PCR-Produktkonzentrationen ($\geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$) lag die Standardabweichung in Prozent der Signalintensität bei den radioaktiven Signalen zwischen ca. 5% und 15%.

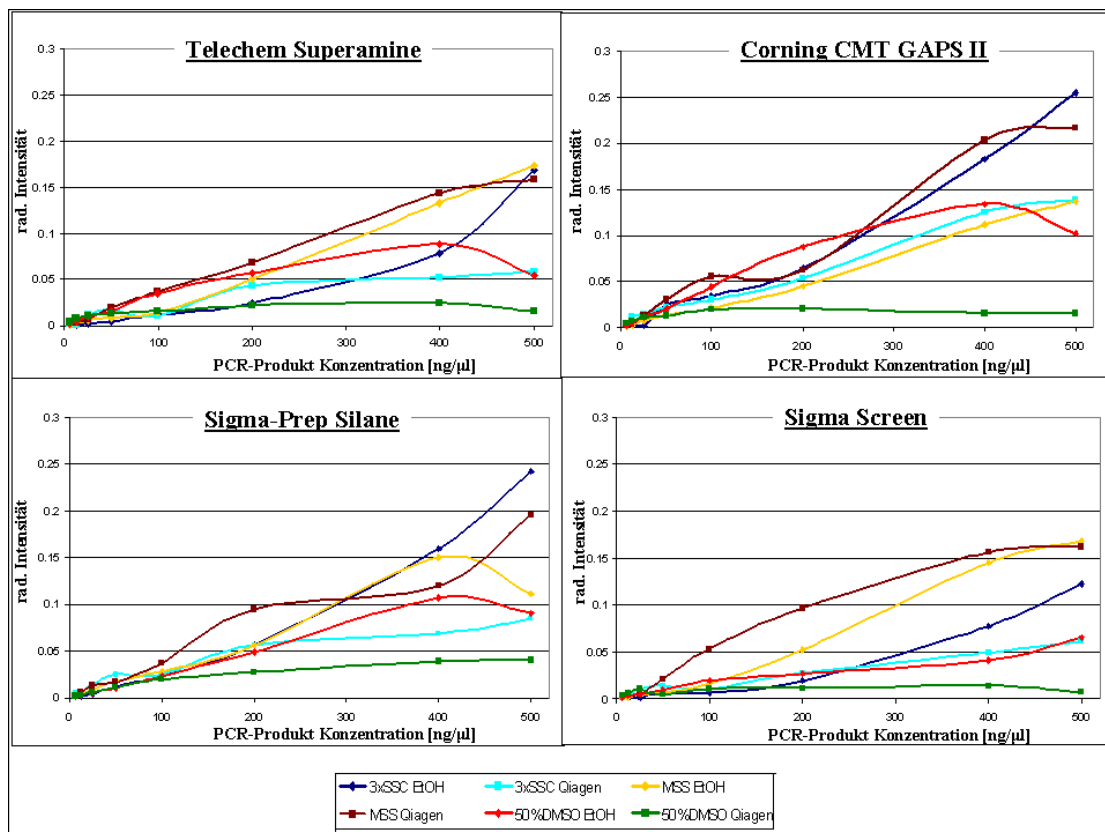


Abbildung 16: Radioaktive Signalintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten PCR-Produkts. Abgesehen von 50% DMSO Qiagen war ein weitgehend linearer Anstieg der Signalintensität bei höheren PCR-Produktkonzentrationen zu beobachten; demnach wurde bei den hier eingesetzten Konzentrationen keine Sättigung der Oberfläche erreicht. Die im Schnitt stärksten Signale über alle Array-Typen lieferten MSS Qiagen, 3 x SSC EtOH und MSS EtOH. Zwischen den Array-Typen ergaben sich in Hinblick auf die erreichten Maximalwerte nur geringe Unterschiede.

EtOH: gereinigt durch Fällung mit Ethanol; Qiagen: gereinigt mit QIAquick PCR Purification Kit; 3 x SSC: 3 x SSC-Puffer, 1 x MSS: 1 x Micro Spotting Solution; 50% DMSO: 50% DMSO-Puffer.

Ein weitgehend linearer Anstieg der radioaktiven Signalintensität wurde mit MSS und 3 x SSC als Spotting-Puffer erzielt; es wurde demnach mit den eingesetzten PCR-

Produktkonzentrationen keine Sättigung der Oberfläche erreicht. Hingegen fielen die Signalintensitäten bei 50% DMSO Qiagen unabhängig vom Array-Typ deutlich schwächer aus. Bei Betrachtung aller Array-Typen zeigten MSS Qiagen, 3 x SSC-EtOH und MSS EtOH die stärksten Signale (siehe Abbildung 16).

Zur Bestimmung der Zugänglichkeit der immobilisierten PCR-Produkte wurden Hybridisierungen mit beliebigen fluoreszenten 15mer-Nukleotiden (Cyanin-3 markiert) durchgeführt (2.5.3). Das Verhältnis von fluoreszentem Signal der hybridisierten Nukleotide zu dem radioaktiven Signal des immobilisierten PCR-Produkts diente als Maß für die Zugänglichkeit für eine Bindung. Die Standardabweichung in Prozent der Signalintensität lag bei den fluoreszenten Signalen zwischen ca. 5% und 25%.

Für geringe PCR-Produktkonzentrationen ($\leq 25\text{ng}/\mu\text{l}$) schwankte dieses Verhältnis aufgrund der Meßungenauigkeit der beiden beteiligten Größen noch relativ stark und nahm dann für höhere Konzentrationen ($\geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$) annähernd konstante Werte an (abgesehen von 3 x SSC EtOH). Die mit einer Qiagen-Säule aufgereinigten PCR-Produkte zeigten im Vergleich zu mit Ethanol gefällten PCR-Produkten unabhängig vom Spotting-Puffer eine deutlich bessere Zugänglichkeit (eine halbe bis eine ganze Zehnerpotenz). Unter den Spotting-Puffern lieferte 3 x SSC vor MSS und 50% DMSO die besten Ergebnisse. Zwischen den vier betrachteten Array-Typen ergaben sich nur geringe Unterschiede (siehe Abbildung 17).

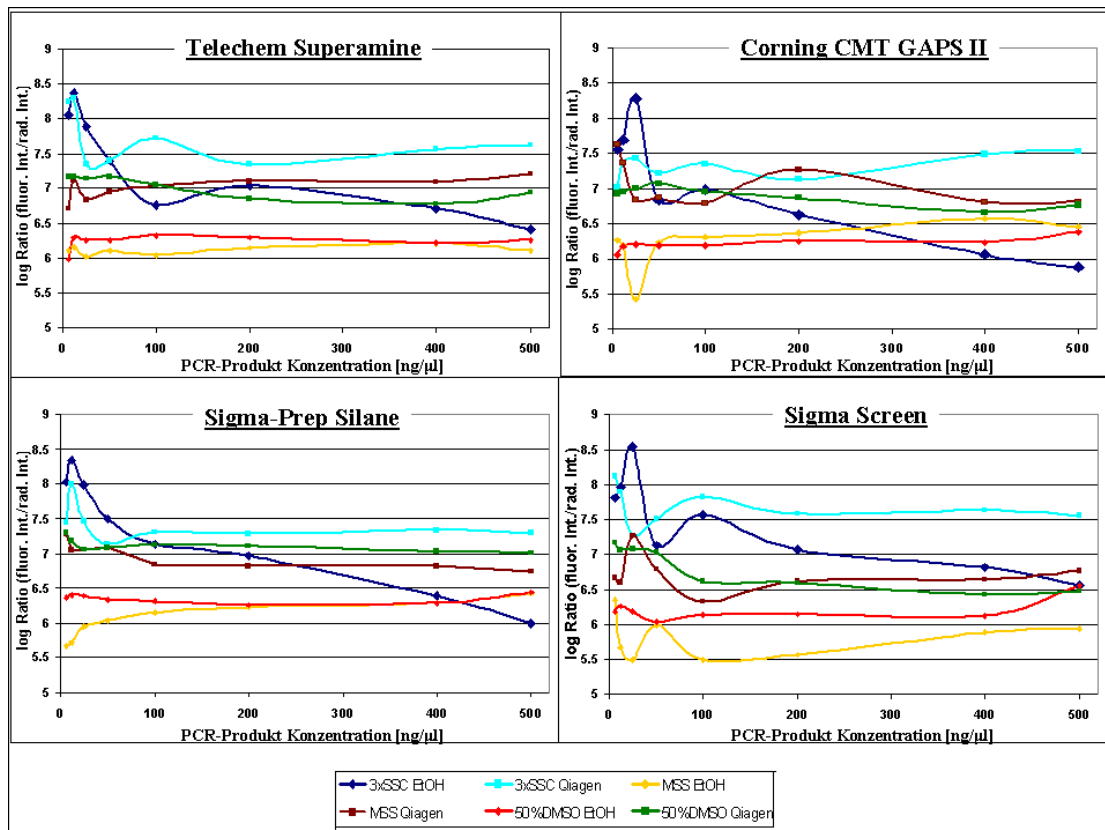


Abbildung 17: Verhältnis von fluoreszenter Signalintensität (Cyanin-3-markierte Sonde) zu radioaktiver Signalintensität (radioaktives PCR-Produkt) als Maß für die Zugänglichkeit für eine Bindung. Ab ~100ng/µl blieb das Verhältnis von fluoreszenter Signalintensität zu radioaktiver Signalintensität, abgesehen von 3 x SSC EtOH, weitestgehend konstant. Mit QIAquick PCR Purification Kit gereinigte PCR-Produkte wiesen eine deutlich bessere Bindungskapazität als EtOH gereinigte PCR-Produkte auf, hingegen waren zwischen den einzelnen Array-Typen kaum Unterschiede zu beobachten. Im Vergleich lieferte der Spotting-Puffer 3 x SCC vor 1 x MSS und 50% DMSO jeweils mit QIAquick PCR Purification Kit gereinigt die besten Ergebnisse. EtOH: gereinigt durch Fällung mit Ethanol; Qiagen: gereinigt mit QIAquick PCR Purification Kit; 3 x SSC: 3 x SSC-Puffer, 1 x MSS: 1 x Micro Spotting Solution; 50% DMSO: 50% DMSO-Puffer.

3.1.3 Design eines humanen kardialen Themenarrays

Zum Erhalt eines reduzierten herzspezifischen Gensatzes wurden humane Sonden ausgehend von unterschiedlichen Herzphänotypen auf genomweite cDNA-Makroarrays hybridisiert und Klone mit deutlicher Signalintensität selektiert. Es wurden jeweils gepoolte RNAs aus kardialen Biopsien oder explantierten Herzen mehrerer Spender mit folgenden Herzphänotypen eingesetzt:

1. obstruktive hypertrophe Kardiomyopathie (6 Biopsien, Universitätsklinikum Lübeck)
2. nicht-obstruktive hypertrophe Kardiomyopathie (8 Biopsien, Universitätsklinikum Lübeck)
3. dilatative Kardiomyopathie (22 Biopsien, Universitätsklinikum Lübeck)
4. dilatative Kardiomyopathie (9 Biopsien, Universitätsklinikum Charité)
5. rheumatoide Systemerkrankung (11 Biopsien, Universitätsklinikum Lübeck)
6. gesunde Spender (4 Explantate, Universitätsklinikum Lübeck)

Es wurden mittels reverser Transkription radioaktiv markierte cDNA-Sonden hergestellt und auf genomweite cDNA-Makroarrays des Human Unigene Set 2 hybridisiert (2.4). Diese Makroarrays umfaßten die PCR-Produkte von 74.695 cDNA-Klonen, welche im Duplikat auf insgesamt drei Nylonmembranen immobilisiert waren (hergestellt vom RZPD, siehe Appendix 9.1, siehe Abbildung A). Mit Hilfe dieser insgesamt 18 hybridisierten Arrays (sechs gepoolte RNA-Populationen, deren Sonden auf je drei cDNA-Makroarrays hybridisiert wurden) wurden exprimierte (signalgebende) Klone/Gene identifiziert. Als Grenzwert wurde eine gegenüber der Hintergrundsignalintensität dreifach erhöhte Signalintensität bei Gesamt-RNA (Explantate) als Startmaterial und eine siebenfach erhöhte Signalintensität bei aRNA als Startmaterial (Biopsien) in zumindest einer der Hybridisierungen angesetzt. Dieses Vorgehen führte zur Selektion von 11.192 Klonen, welche zu einem neuen Satz von cDNA-Klonen zusammengestellt wurden. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit eines solchen Ansatzes wurde der erhaltene kardiale Klonsatz in Hinblick auf das Vorhandensein wichtiger Markergene kardialer Dysfunktion überprüft. Hierzu wurden, so denn im Gensatz vorhanden, Klone entsprechender Annotation (IMAGE Konsortium) resequenziert (2.10). Der kardiale cDNA-Klonsatz beinhaltete *alpha B crystallin*; *natriuretic peptide precursor B*; *cardiac ankyrin repeat protein*; *Four and a half LIM domains 1*; *Four and a half LIM domains 2*; *cardiac troponin I*; *actin, alpha skeletal muscle* und *type 1 alpha 2 collagen*. Hingegen war das *natriuretic peptide precursor A* aufgrund einer Kontamination in dem Human Unigene Set 2 in dem kardialen cDNA-Klonsatz nicht vorhanden. Der kardiale Klonsatz wurde um einen entsprechenden Klon ergänzt. Die Inserts der Plasmide dieser 11.192 Klone wurden, um möglichst große Ausbeuten zu erhalten, zweimal durch PCR amplifiziert (je 25µl) und diese PCR-Produkte mit Hilfe von Molekularsieben (MultiScreen™384-PCR Plates) aufgereinigt (2.5.2). Diese PCR-Produkte wurden in Micro Spotting Solution aufgenommen und im Duplikat auf

Telechem Superamine-Rohlinge gespottet. In der gesamten Prozedur der Array-Herstellung erfolgten neben der Resequenzierung einzelner Klone auf Ebene der gereinigten PCR-Produkte (Gelelektrophorese, siehe Appendix 9.1, siehe Abbildung B) und der prozessierten Mikroarrays (Oligonukleotid-Hybridisierung und komplexe Hybridisierungen; 2.5.3 und 2.5.4) jeweils Qualitätskontrollen.

3.2.1 Genexpressionsprofile humaner DCM-Gewebe mit kardialen Themenarrays

Es wurden die RNA aus explantierten Herzen von zwölf DCM Patienten und elf gesunden Spendern isoliert (2.2.1) und die Qualität mit einem Bioanalyser von Agilent überprüft (2.2.2). Bei den DCM Patienten wurde eine Herztransplantation vorgenommen, entsprechend weit fortgeschritten war die Pathogenese (klinische Parameter der Herzfunktion siehe 2.1.3, Tabelle 1).

Es wurden Pools der Gesamt-RNA der linken Ventrikel von den DCM Patienten und den gesunden Spendern gebildet. Durch reverse Transkription in Anwesenheit von fluoreszenten Nukleotiden wurden markierte Sonden hergestellt und auf humane kardiale Themenarrays hybridisiert (4 Arrays, 2 "dye-swaps", 2.5). Die ausgelesenen Signalintensitäten (2.8.2) wurden, um eine Vergleichbarkeit herzustellen, nichtlinear durch lokale Median Regression normalisiert (2.8.5) und anschließend die differentielle Genexpression zwischen den beiden Zuständen mit der SAM bestimmt (2.8.6). Bei einer Falsch-Positiv Rate von 10% als Grenzwert für die Signifikanz zeigten 104 cDNA-Klone verstärkte Expression und 61 cDNA-Klone reduzierte Expression (siehe Appendix 9.3.1; Zahlen inklusive Redundanz z.B. bei NPPA). Diese cDNA-Klone wurden zur Validierung der Identität des Inserts resequenziert (2.10). Am stärksten in der Expression induziert war NPPA, ein typischer Marker für Kardiomyopathien. Insbesondere Gene des Zytoskeletts/Sarkomers (z.B. *cardiac ankyrin repeat protein*; *myosin regulatory light chain, non sarcomeric*, *cardiac troponin I* und *gelsolin*) und der Immunantwort (z.B. *Ig heavy chain variable region 1*; *complement component 9*, *Ig kappa constant region*) zeigten verstärkte Expression in den DCM Patienten. Zudem wurde *apolipoprotein D* verstärkt und *pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4* (Inhibitor des kardialen Glukose Metabolismus) reduziert exprimiert. Für NPPA wurde die differentielle Expression detektiert durch die Mikroarray-Hybridisierungen durch quantitative RT-PCR in individuellen Proben (2.9) bestätigt (Ratio: 4,9 und p: 0,00012). Jedoch zeigte sich im Gegensatz zu den

Array-Daten eine signifikante Induktion der NPPB Expression (Ratio: 4,7 und p: 0,038). Der Unterschied mag in der Methodik oder der konservativeren Signifikanzabschätzung durch SAM begründet liegen (im Vergleich zum t-Test sind die Signifikanzwerte um eine halbe bis eine Zehnerpotenz verschoben).

3.2.2 Genexpressionsprofile von MLP-, Plakoglobin-, ErbB2-, ErbB4 *knockout* Mäusen und Doxorubicin-behandelten Mäusen mit cDNA- Mikroarrays

Es wurde Gesamt-RNA des Herzens von je 4-8 *knockout* Mäusen bzw. Doxorubicin-behandelten Mäusen und je 4-8 Wildtyp-Mäusen der jeweiligen Linie mit TRIZOL[®]-Reagenz isoliert (2.2.1) und die Qualität mit einem Bioanalyser von Agilent überprüft (2.2.2). Das Alter der MLP-, ErbB2- und ErbB4 *knockout* Mäuse und der Doxorubicin-behandelten Mäuse betrug 8-10 Monate. Die Herzen der Plakoglobin *knockout* Mäuse wurden am E10.0 präpariert. Aufgrund der beobachteten sehr homogenen Genexpression zwischen den Individuen einer Gruppe bei den Genexpressionsprofilen der MLP *knockout* Mäuse mit radioaktiven cDNA-Makroarrays (siehe Abbildung E, Appendix 9.1) wurden gepoolte RNAs der jeweiligen Zustände eingesetzt.

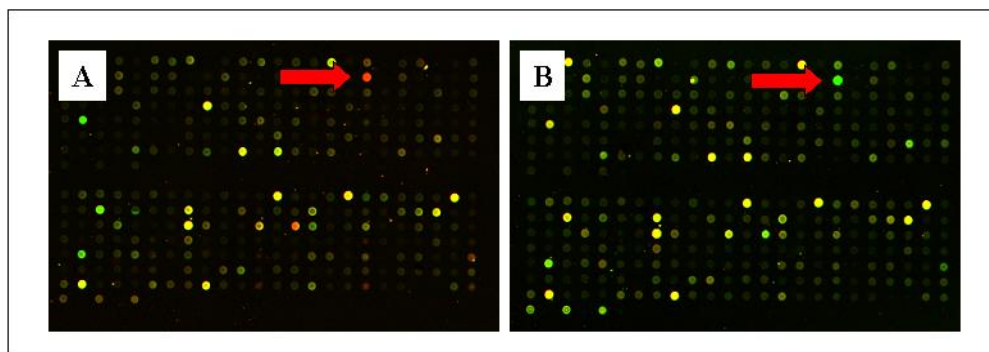


Abbildung 18: Induktion der Expression des *natriuretic peptide precursor A* in MLP *knockout* Mäusen. Fluoreszent markierte cDNA-Sonden gepoolter Wildtyp- und MLP *knockout* Mäuse wurden auf Mouse cDNA-Mikroarrays von Agilent Technologies hybridisiert. Es wurden vier technische Replika mit Austausch der Farbstoffe in der Markierungsreaktion durchgeführt. Der MLP *knockout* in den Mäusen führte zu verstärkter Expression des *natriuretic peptide precursor A*, eines Markergens für Kardiomyopathien (lineare Skalierung der Pixelintensitäten in Falschfarben).

A: MLP *knockout* Cyanin-5, Wildtyp Cyanin-3

B: MLP *knockout* Cyanin-3, Wildtyp Cyanin-5

Die fluoreszent-markierten cDNA-Sonden für die Hybridisierungen der MLP-, ErbB2- und ErbB4 *knockout* Mäuse und der Doxorubicin-behandelten Mäuse sowie der jeweils zugehörigen Wildtyp-Mäuse wurden ausgehend von den Pools der RNAs mittels reverser Transkription hergestellt (2.7). Aufgrund der geringen Ausbeuten an RNA aus den Herzen der Plakoglobin *knockout* Mäuse (E10.0) war zum Erhalt ausreichender Mengen Startmaterials für die Markierungsreaktion eine Runde der T7-basierten RNA-Amplifikation erforderlich (2.2.3). Für jede untersuchte Mauslinie wurden vier technische Replika der Hybridisierung mit Agilent cDNA Mikroarrays (2.7.3; 2x2 *dye swap*-Experimente) durchgeführt (Beispiel siehe Abbildung 18). Die Signalintensitäten wurden mit einem Scanner eingelesen und es folgte eine nichtlineare Normalisierung (LOWESS; 2.8.5), um eine Vergleichbarkeit der Intensitäten der biologischen Zustände zu erreichen. Alle Arraydaten sind in der *Gene Expression Omnibus* (GEO) Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>) unter dem "series record" GSE7746 verfügbar (2.8.10).

Mit der SAM (2.8.6) wurden die jeweils signifikant deregulierten Gene einer Mauslinie identifiziert (FPR < 10%, Tabelle 3 und Genliste siehe Appendix 9.3.2). Die absoluten Zahlen schwankten erheblich und lagen zwischen 35 und 1166 Genen je Linie.

Tabelle 2: Anzahl der deregulierten Gene der einzelnen Mausmodelle. Als Kriterium für eine signifikante Deregulation wurde eine FPR von 10% definiert (SAM).

Mausmodell	verstärkt exprimiert	reduziert exprimiert
MLP knockout	53	34
Plakoglobin knockout	41	1
ErbB2 knockout	10	25
ErbB4 knockout	104	193
Doxorubicin-behandelt	543	623
ErbB4 knockout Doxorubicin-behandelt	250	70

Mit allen Genen, die in mindestens einer Mauslinie signifikant dereguliert waren, wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt (2.8.7). Ein solches Verfahren führte zu einer Gruppierung von Genen mit einem ähnlichen Expressionsmuster über alle sechs Mauslinien im Vergleich zum Wildtyp. Folgend sind vier Beispiele solcher Cluster von Genen dargestellt und näher charakterisiert.

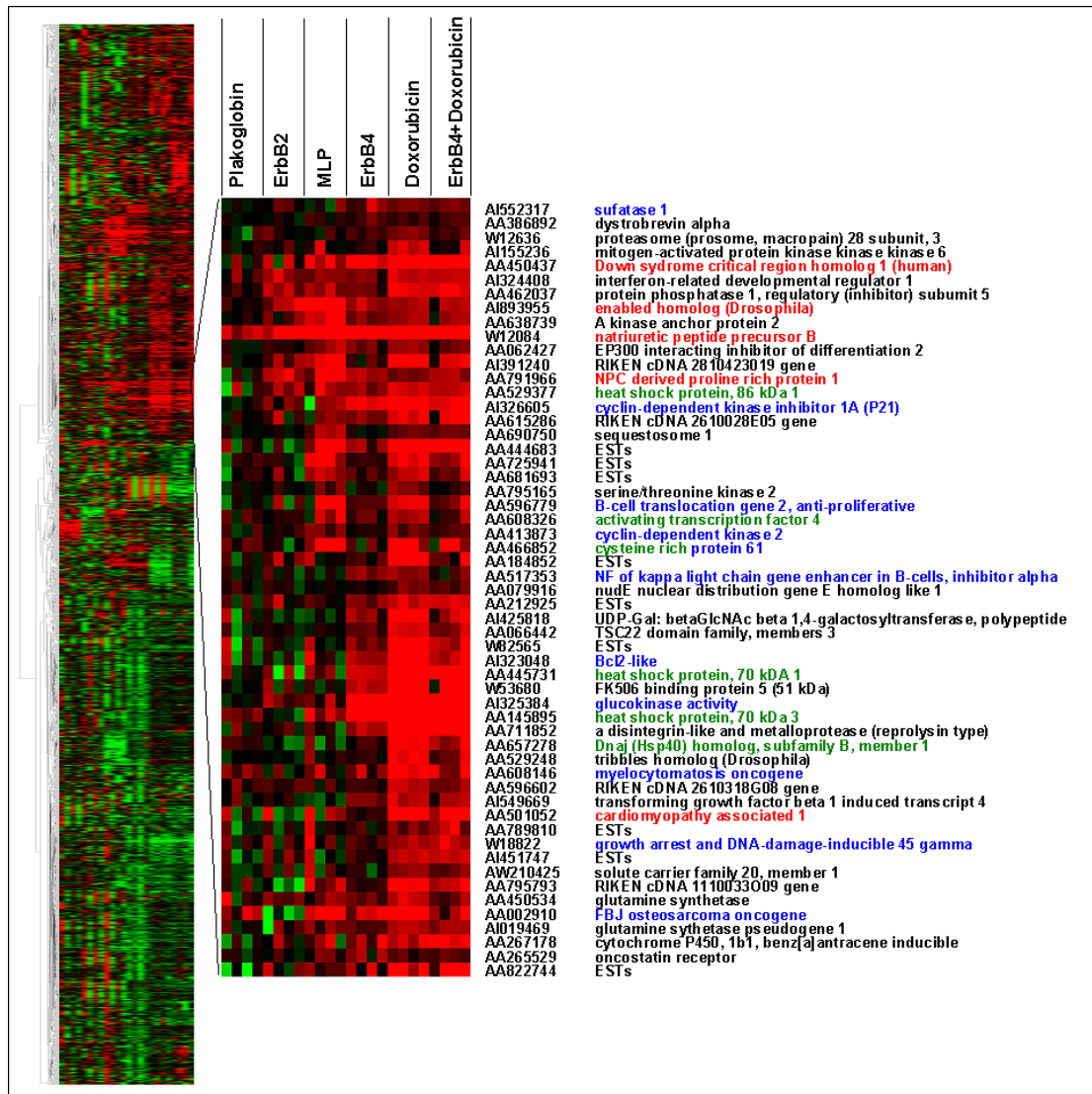


Abbildung 19: Hierarchisches Clustering der sechs Mausmodelle (Cluster 1). Gene mit einem über alle Zustände und technischen Replika ähnlichen Expressionsmuster wurden gruppiert. Vergrößert hervorgehoben ist ein Cluster mit Genen, die in den meisten Modellen oder bevorzugt bei Doxorubicin-Behandlung in ihrer Expression induziert wurden.

Cluster: rot: verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtyp; grün: reduzierte Expression im Vergleich zum Wildtyp; Genname: rot: Kardiomyopathie-Marker; grün: allgemeine Streß-Antwort; blau: involviert in Apoptose

Ein Cluster mit 55 Genen zeigte eine primär in Doxorubicin-behandelten Wildtypmäusen bzw. ErbB4 *knockout* Mäusen erhöhte Expression (siehe Abbildung 19). Eine statistische Analyse (DAVID, 2.8.8) der Zugehörigkeit zu GO-Kategorien dieser Gruppe von Genen ergab eine signifikante Überrepräsentation insbesondere bei den biologischen Prozessen Apoptose und der negativen Regulation von zellulären und physiologischen Vorgängen (Tabelle 4).

Tabelle 4: DAVID-Analyse des Clusters von Doxorubicin-induzierten Genen. In Ebene 3 der GO-Einteilung Biologischer Prozeß wurde mit einem exakten Fisher- Test die Signifikanz der Überrepräsentation im Vergleich zum gesamten Genom bestimmt.

GO-Kategorie Biologischer Prozeß (Ebene 3)	Anzahl der Gene [%]	p-Wert
Apoptose	13,4	0,00013
negative Regulation von zellulären Vorgängen	13,4	0,00064
negative Regulation von physiologischen Prozessen	11,9	0,0016
Regulation von zellulären physiologischen Prozessen	25,4	0,007
primärer Metabolismus	41,8	0,0076
Antwort auf Bestrahlung	4,5	0,012
zellulärer Metabolismus	41,8	0,016
Zell Proliferation	7,5	0,022
Regulation von Transferase Aktivität	4,5	0,033
positive Regulation von Enzymaktivität	4,5	0,038
Makromolekül Metabolismus	26,9	0,042
negative Regulation von Enzymaktivität	3,0	0,097

Nach der Ermittlung der wichtigsten beteiligten biologischen Prozesse in dem Doxorubicin-induzierten Cluster von Genen mit DAVID wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software (2.8.9) nach publizierten Interaktionen innerhalb dieser Gruppe von Genen gesucht. Ein Netzwerk mit 14 Genen des Clusters erreichte mit einem "score" von 29 die höchste Signifikanz. Von diesen 14 Genen können 9 eine Rolle in apoptotischen Vorgängen spielen (siehe Abbildung 20).

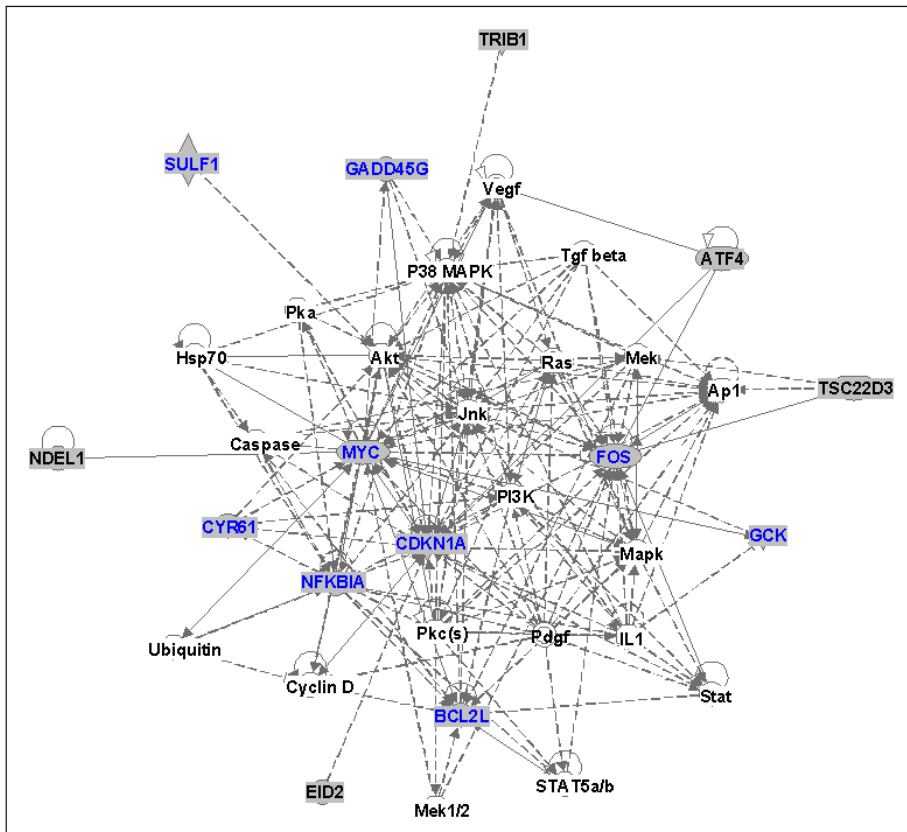


Abbildung 20: Netzwerk an funktionellen Interaktionen von Doxorubicin-induzierten Genen. Verbindungslinien zwischen Genen repräsentieren jeweils publizierte Interaktionen; 14 Gene des Doxorubicin induzierten Clusters (grauer Knotenpunkt) wurden durch 21 Verknüpfungsgene (weißer Knotenpunkt) ergänzt.

blau: involviert in Apoptose, ATF4: *activating transcription factor 4*; BCL2L: *BCL2-like*, CDKN1A: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)*, CYR61: *cysteine rich protein 61*, EID2: *EP300 interacting inhibitor of differentiation 2*, FOS: *FBJ osteosarcoma oncogene*, GADD45G: *growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma*, GCK: *glycokinase activity*, MYC: *myelocytomatosis oncogene*, NDEL1: *nudE nuclear distribution gene E homolog like 1*, NFKBIA: *NF of kappa light chain gene enhancer in B-cells, inhibitor alpha*

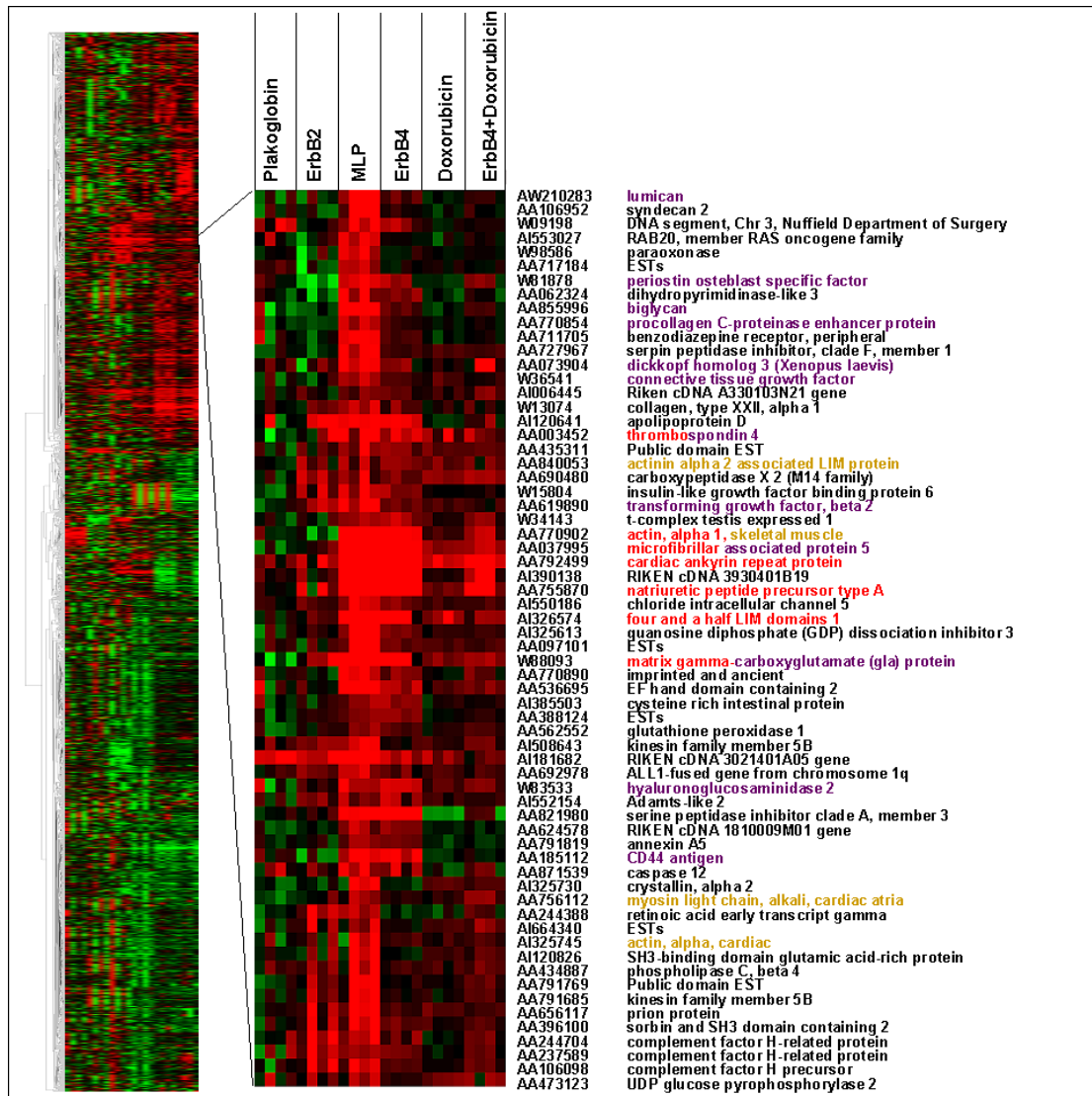


Abbildung 21: Hierarchisches Clustering der sechs Mausmodelle (Cluster 2). Gene mit einem über alle Zustände und technischen Replika ähnlichen Expressionsmuster wurden gruppiert. Vergrößert hervorgehoben ist ein Cluster mit Genen, die in fast allen Modellen oder bevorzugt im MLP *knockout* in ihrer Expression induziert wurden.

Cluster: rot: verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtyp; grün: reduzierte Expression im Vergleich zum Wildtyp; Genname: rot: Kardiomyopathie-Marker; violett: Umbau der extrazellulären Matrix; gelb: lokalisiert im Zytoskelett

Ein weiterer Cluster mit 63 Genen zeigte eine primär in MLP *knockout* Mäusen erhöhte Expression (siehe Abbildung 21). Eine statistische Analyse (DAVID, 2.8.8) der Zugehörigkeit zu GO-Kategorien dieser Gruppe von Genen ergab eine signifikante Überrepräsentation insbesondere bei den biologischen Prozessen "Muskelentwicklung und -kontraktion" und "Geweberemodellierung" (Tabelle 5) und

den zellulären Komponenten "verankert in der Membran", "kontraktile Faser" und "Aktin Zytoskelett".

Tabelle 5: DAVID-Analyse des Clusters von primär in MLP *knockout* Mäusen in ihrer Expression induzierten Genen. In Ebene 3 der GO-Einteilung Biologischer Prozeß und in Ebene 4 der GO-Einteilung zelluläre Komponente wurde mit einem exakten Fisher-Test die Signifikanz der Überrepräsentation im Vergleich zum gesamten Genom bestimmt.

GO-Kategorie Biologischer Prozeß (Ebene 3)	Anzahl der Gene [%]	p-Wert
Muskelentwicklung	4,6	0,0022
Muskelkontraktion	3,4	0,013
Geweberemodellierung	3,4	0,019
Zellwachstum	3,4	0,026
skeletale Entwicklung	3,4	0,043
Gefäßentwicklung	3,4	0,059
Zellorganisation und Biogenese	10,3	0,064
zelluläre Morphogenese	4,6	0,069
Bindegewebeentwicklung	2,3	0,069
GO-Kategorie zelluläre Komponente (Ebene 4)	Anzahl der Gene [%]	p-Wert
verankert in der Membran	4,6	0,00000067
kontraktile Faser	4,6	0,00017
Aktin Zytoskelett	4,6	0,0045

Nach der Ermittlung der wichtigsten beteiligten biologischen Prozesse und zellulären Komponenten in dem Cluster von in MLP *knockout* Mäusen in ihrer Expression induzierten Genen mit DAVID wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software (2.8.9) nach publizierten Interaktionen innerhalb dieser Gruppe von Genen gesucht. Ein Netzwerk mit 14 Genen des Clusters erreichte mit einem "score" von 28 die höchste Signifikanz. Von diesen 14 Genen können 6 eine Rolle in dem Umbau der extrazellulären Matrix bzw. Bei der Remodellierung des Gewebes spielen (siehe Abbildung 22).

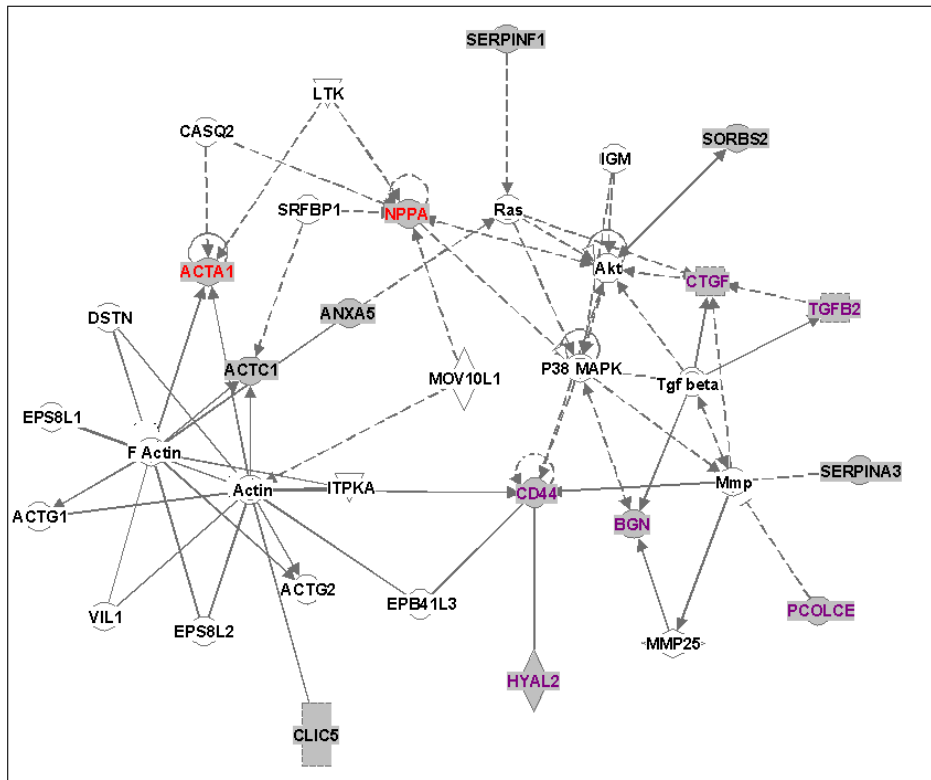


Abbildung 22: Netzwerk an funktionellen Interaktionen von primär in MLP *knockout* Mäusen induzierten Genen. Verbindungslinien zwischen Genen repräsentieren jeweils publizierte Interaktionen; 14 Gene des MLP-induzierten Clusters (grauer Knotenpunkt) wurden durch 21 Verknüpfungsgene (weißer Knotenpunkt) ergänzt. rot: Kardiomyopathie-Marker, violett: Umbau der extrazellulären Matrix; ACTA1: *actin, alpha, skeletal muscle*, ACTC1: *actin, alpha, cardiac muscle*, ANXA5: *annexin A5*, BGN: *biglycan*, CD44: *CD44 antigen*, CLIC5: *chloride intracellular channel*, CTGF: *connective tissue growth factor*, HYAL2: *hyaluronoglucosaminidase 2*, NPPA: *natriuretic peptide precursor A*, SERPINA3: *serpin peptidase inhibitor clade A, member 3*, SERPINF1: *serpin peptidase inhibitor clade F, member 1*, TGFB2: *transforming growth factor, beta 2*

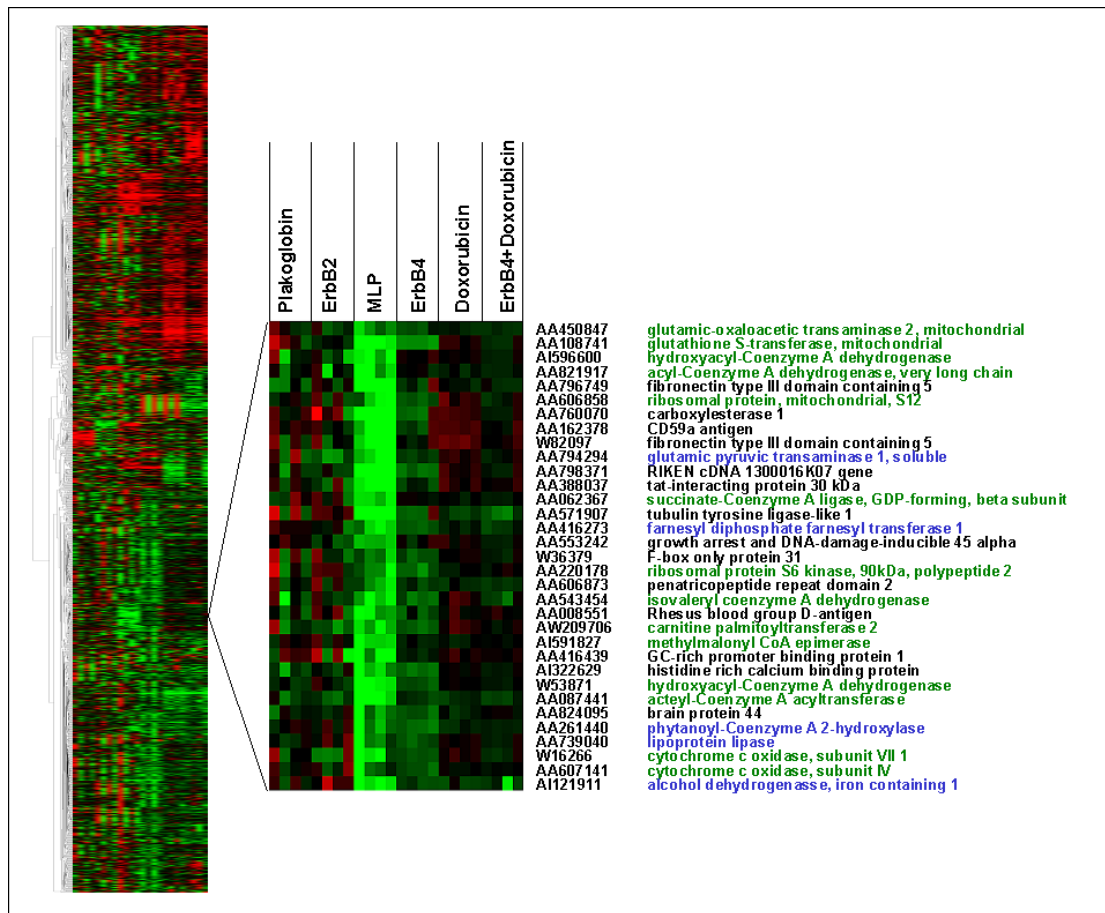


Abbildung 23: Hierarchisches Clustering der sechs Mausmodelle (Cluster 3). Gene mit einem über alle Zustände und technischen Replika ähnlichen Expressionsmuster wurden gruppiert. Vergrößert hervorgehoben ist ein Cluster mit Genen, die bevorzugt im MLP *knockout* in ihrer Expression reduziert wurden.

Cluster: rot: verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtyp; grün: reduzierte Expression im Vergleich zum Wildtyp; Genname: grün: mitochondriale Expression; blau: Metabolismus

Ein weiterer Cluster mit 33 Genen zeigte eine in MLP *knockout* Mäusen reduzierte Expression (siehe Abbildung 23). Eine statistische Analyse (DAVID, 2.8.8) der Zugehörigkeit zu GO-Kategorien dieser Gruppe von Genen ergab eine signifikante Überrepräsentation insbesondere bei den biologischen Prozessen "zellulärer und primärer Metabolismus" und "Biosynthese" und verschiedenen zellulären Komponenten des Mitochondriums (Tabelle 6).

Tabelle 6: DAVID-Analyse des Clusters von primär in MLP *knockout* Mäusen in ihrer Expression reduzierten Genen. In Ebene 3 der GO-Einteilung Biologischer Prozeß und in Ebene 4 der GO-Einteilung zelluläre Komponente wurde mit einem exakten Fisher Test die Signifikanz der Überrepräsentation im Vergleich zum gesamten Genom bestimmt.

GO-Kategorie Biologischer Prozeß (Ebene 3)	Anzahl der Gene [%]	p-Wert
zellulärer Metabolismus	34,0	0,0019
primärer Metabolismus	30,0	0,018
Biosynthese	10,0	0,069
GO-Kategorie zelluläre Komponente (Ebene 4)	Anzahl der Gene [%]	p-Wert
Mitochondrium	26,0	0,0000000035
mitochondriale innere Membran	14,0	0,000018
innere Membran einer Organelle	14,0	0,000025
mitochondriale Membran	14,0	0,000028
mitochondriale Hülle	14,0	0,000042
intrazellulär membrangebunden an einer Organelle	36,0	0,000076

Nach der Ermittlung der wichtigsten beteiligten biologischen Prozesse und zellulären Komponenten in dem Cluster von in MLP *knockout* Mäusen in ihrer Expression induzierten Genen mit DAVID wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software (2.8.9) nach publizierten Interaktionen innerhalb dieser Gruppe von gesucht. Ein Netzwerk mit 13 Genen des Clusters erreichte mit einem "score" von 30 die höchste Signifikanz. Von diesen 13 Genen wiesen 9 eine mitochondriale Expression auf (siehe Abbildung 24).

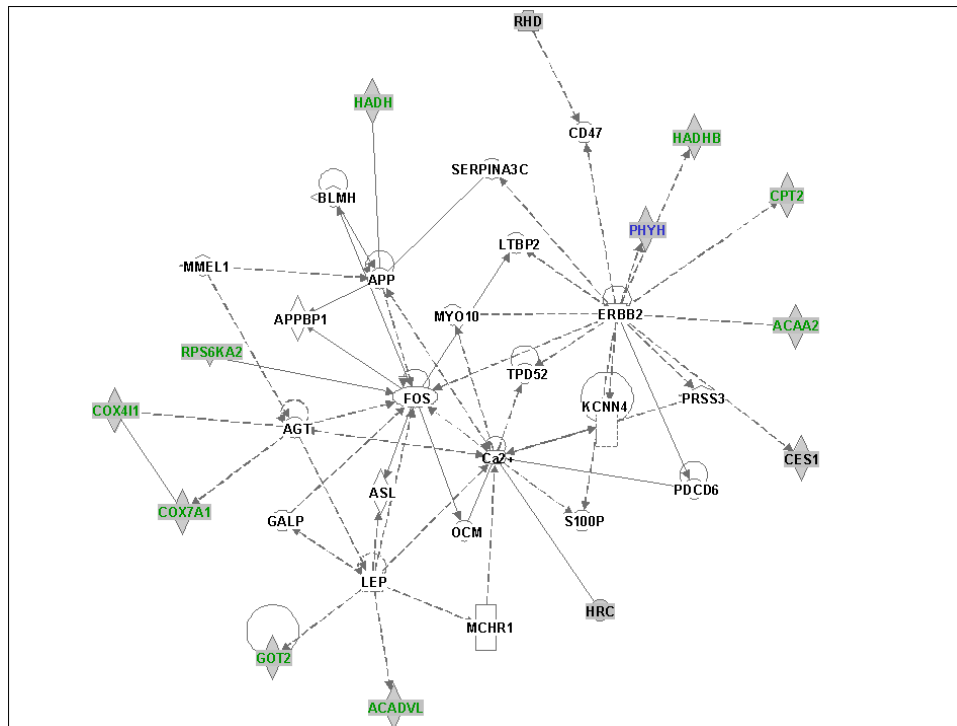


Abbildung 24: Netzwerk an funktionellen Interaktionen von in MLP knockout Mäusen in ihrer Expression reduzierten Genen. Verbindungslinien zwischen Genen repräsentieren jeweils publizierte Interaktionen; 14 Gene des MLP-reduzierten Clusters (grauer Knotenpunkt) wurden durch 20 Verknüpfungsgene und Kalzium (weißer Knotenpunkt) ergänzt.

grün: mitochondriale Expression, blau: Metabolismus; ACAA2: *acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2*, ACADVL: *acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain*, CES1: *carboxylesterase 1*, COX4I1: *cytochrome c oxidase, subunit IV*, COX7A1: *cytochrome c oxidase, subunit VII 1*, CPT2: *carnitine palmitoyltransferase 2*, GOT2: *glutamic-oxaloacetic transaminase 2*, HADH(-B): *hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase*, HRC: *histidine rich calcium binding protein*, PHYH: *phytanoyl-Coenzyme A 2-hydroxylase*, RHD: *Rh blood group, D antigen*, RPS6KA2: *ribosomal protein S6 kinase 90kDa, polypeptide 2*

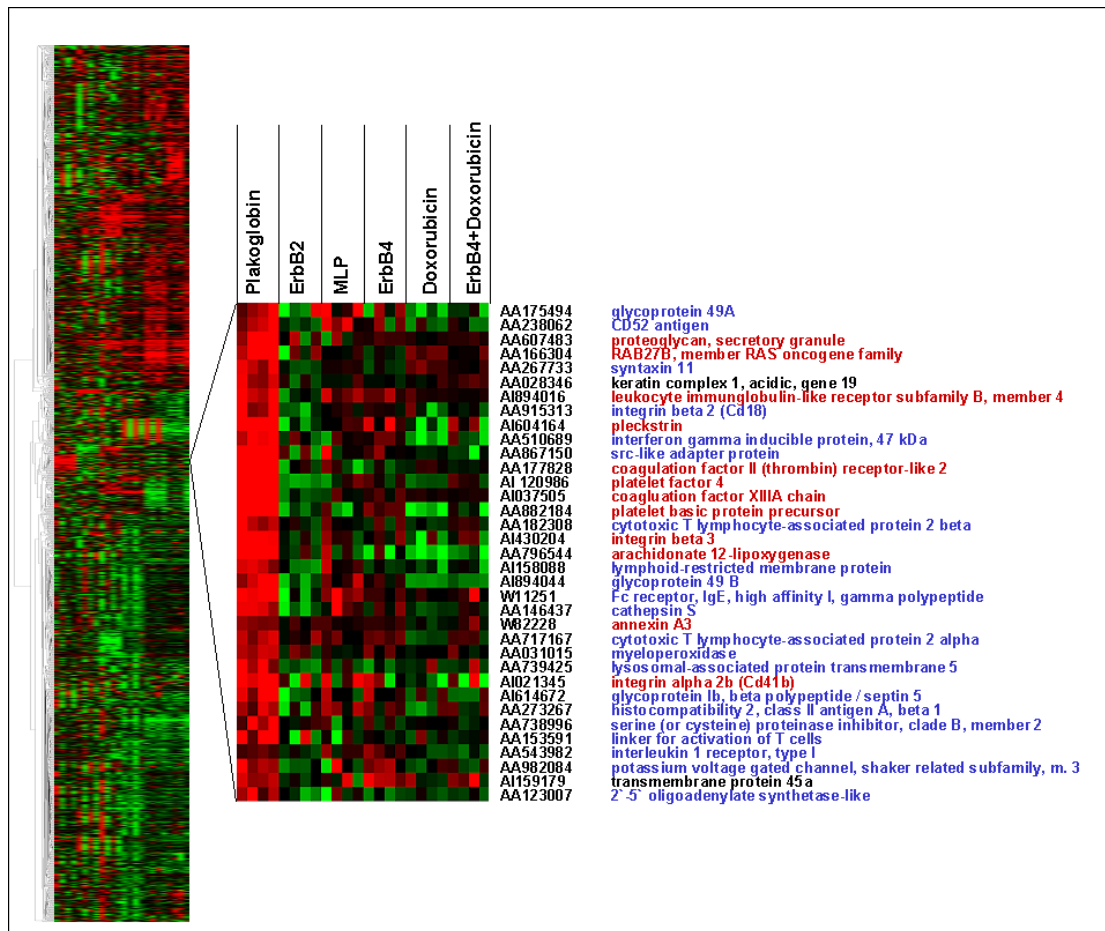


Abbildung 25: Hierarchisches Clustering der sechs Mausmodelle (Cluster 4). Gene mit einem über alle Zustände und technischen Replika ähnlichen Expressionsmuster wurden gruppiert. Vergrößert hervorgehoben ist ein Cluster mit Genen, die im Plakoglobin *knockout* in ihrer Expression induziert wurden.

Cluster: rot: verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtyp; grün: reduzierte Expression im Vergleich zum Wildtyp; Genname: rot: assoziiert mit Blutplättchen/Koagulation; blau: Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen

Ein weiterer Cluster mit 35 Genen zeigte eine in Plakoglobin *knockout* Mäusen induzierte Expression (siehe Abbildung 25). Eine statistische Analyse (DAVID, 2.8.8) der Zugehörigkeit zu GO-Kategorien dieser Gruppe von Genen ergab eine signifikante Überrepräsentation insbesondere bei den biologischen Prozessen "Antwort auf Verletzung", "Immunantwort" und "Blutkoagulation" (Tabelle 7).

Tabelle 7: DAVID-Analyse des Clusters von in Plakoglobin *knockout* Mäusen in ihrer Expression induzierten Genen. In Ebene 3 der GO-Einteilung Biologischer Prozeß wurde mit einem exakten Fisher-Test die Signifikanz der Überrepräsentation im Vergleich zum gesamten Genom bestimmt.

GO-Kategorie Biologischer Prozeß (Ebene 3)	Anzahl der Gene [%]	p-Wert
Antwort auf Verletzung	16,2	0,00065
Immunantwort	18,9	0,0026
Blutkoagulation	8,1	0,0033
Zell-Substrat-Adhäsion	8,1	0,004
Regulation von Körperflüssigkeiten	8,1	0,0052
Abwehrantwort	18,9	0,0081
Signaltransduktion	29,7	0,056
Zellbewegung	8,1	0,074
Lokalisation der Zelle	8,1	0,074
Antwort auf Pest, Pathogen oder Parasit	10,8	0,089
Antwort auf andere Organismen	10,8	0,096

Nach der Ermittlung der wichtigsten beteiligten biologischen Prozesse in dem Cluster von in Plakoglobin *knockout* Mäusen in ihrer Expression induzierten Genen mit DAVID wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software (2.8.9) nach publizierten Interaktionen innerhalb dieser Gruppe von Genen gesucht. Ein Netzwerk mit 13 Genen des Clusters erreichte mit einem "score" von 29 die höchste Signifikanz (siehe Abbildung 26).

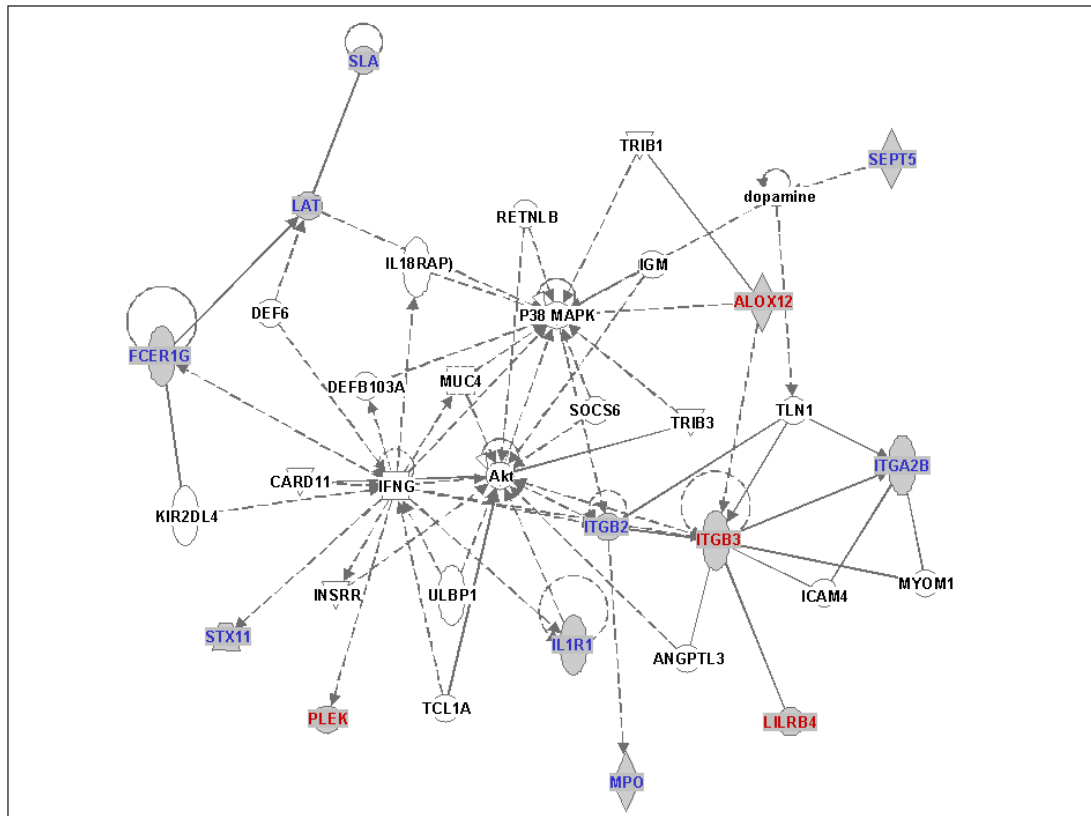


Abbildung 26: Netzwerk an funktionellen Interaktionen von in Plakoglobin *knockout* Mäusen in ihrer Expression induzierten Genen. Verbindungslinien zwischen Genen repräsentieren jeweils publizierte Interaktionen; 13 Gene des Plakoglobin-induzierten Clusters (grauer Knotenpunkt) wurden durch 21 Verknüpfungsgene und Dopamin (weißer Knotenpunkt) ergänzt.

rot: assoziiert mit Blutplättchen/Koagulation; blau: Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen; ALOX12: *arachidonate 12-lipoxygenase*, FCER1G: *Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide*, IL1R1: *interleukin 1 receptor, type I*, ITGA2B: *integrin, alpha 2b*, ITGB2: *integrin beta 2*, ITGB3: *integrin, beta 3*, LAT: *linker for activation of T cells*, LIRB4: *leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4*, MPO: *myeloperoxidase*, PLEK: *pleckstrin*, SEPT5: *septin*, SLA: *src-like adapter protein*, STX11: *syntaxin 11*

3.2.3 Validierung von Array-Ergebnissen durch RT-PCR

Zur Abschätzung der Aussagesicherheit der generierten Array-Daten wurde die detektierte Deregulation einzelner Gene der Cluster durch quantitative RT-PCR (2.9) überprüft. Hierzu wurde RNA der einzelnen Mauslinien mit dem TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents Kit in cDNA umgeschrieben und mit genspezifischen Intron-

überspannenden Primern (siehe Appendix 9.2) und dem SYBR Green PCR Master Mix Kit die quantitative RT-PCR durchgeführt. Es wurden drei technische Replika je Probe eingesetzt und die Ratios der Genexpression mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet. Für eine Vielzahl an Genen mit unterschiedlich starker Deregulation und statistischer Signifikanz in den Mikroarray-Experimenten wurden Messungen in vier Mauslinien im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Hierbei korrelierten weitestgehend sowohl die Ratios der Genexpression der beiden Methoden wie auch die berechnete statistische Signifikanz (ein q-Wert von 1.0 entspricht in der statistischen Aussagesicherheit einem p-Wert von 0.01 eines t-Tests). Die wenigen größeren Abweichungen traten bei kleinen Ratios der Genexpression oder aber geringer statistischer Signifikanz auf (z.B. bei *Four and a half LIM domains 1* bei Doxorubicin-behandelten Mäusen).

Tabelle 8: Validierung von Array-Daten. Mit Mikroarrays (Agilent) detektierte Ratios der Genexpression unterschiedlicher statistischer Signifikanz wurden mit quantitativer RT-PCR überprüft. Bei den auf gepoolten RNA-Populationen beruhenden Mikroarray-Experimenten wurde global über das gesamte Genom normalisiert und die statistische Signifikanz mit SAM (Falsch-Positiv Rate, FPR) bestimmt. Bei den auf individuellen Messungen beruhenden RT-PCR-Experimenten wurde über zwei Haushaltsgene (ribosomal protein P0 und hypoxanthin-phosphoribosyltransferase (Hprt)) normalisiert und die statistische Signifikanz mit einem students t-Test (p-Wert) bestimmt. n.d.: nicht dereguliert

	Doxorubicin				erbB4 Doxorubicin				MLP				Plakoglobin			
	Array		RT-PCR		Array		RT-PCR		Array		RT-PCR		Array		RT-PCR	
	Ratio	FPR	Ratio	p	Ratio	FPR	Ratio	p	Ratio	FPR	Ratio	p	Ratio	FPR	Ratio	p
actin, alpha, skeletal muscle	1.2	30.0	2.0	0.163	1.7	5.4	2.3	0.100	3.4	2.09	5.3	<0.001				
cardiac ankyrin repeat protein	2.0	0.6	3.8	0.034	2.4	1.5	2.6	0.029	6.6	2.09	4.6	<0.001	n.d.		1.1	0.607
matrix gamma carboxyglutamat (gla) protein	1.5	3.9	2.1	0.005	1.7	1.5	2.6	0.031	6.2	2.09	4.9	<0.001	n.d.		1.0	0.892
four and a half LIM domains 1	1.8	1.3	2.0	0.251	6.0	6.1	1.4	0.419	7.0	2.09	9.0	<0.001	n.d.		0.8	0.308
natriuretic peptide precursor A	1.4	7.8	1.5	0.197	2.9	3.3	3.2	0.086	57.3	2.09	80.3	<0.001	n.d.		1.0	0.990
natriuretic peptide precursor B	8.3	0.6	7.1	0.029	6.3	1.5	8.5	0.005	7.9	2.09	4.9	<0.001	1.8	5.7	1.8	0.164
cardiomyopathy associated 1	3.1	0.6	3.8	0.179	2.4	2.0	3.6	0.038								
transformation related protein (trp 53, human: p53)			1.3	0.021			1.5	0.013								
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	3.0	0.6	3.8	0.035	2.7	2.0	3.4	0.044								
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	2.2	0.6	3.2	0.098	1.6	7.0	2.8	0.015								
BCL2-like	3.2	0.6	3.5	0.000	2.2	2.7	2.9	0.032								
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	1.7	0.6	1.9	0.365	1.9	1.5	2.3	0.011								
glycoprotein Ib, beta polypeptide													3.8	5.7	5.4	0.013
coagulation factor II (thrombin) receptor like 2													4.6	4.8	7.9	0.004
arachidonate 12-lipoxygenase													3.9	4.8	4.4	0.017
platelet factor 4													7.3	4.8	6.7	0.003

3.3.1 Phänotypische Charakterisierung von heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen

Zur Charakterisierung der Herzfunktion von heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen wurden Tiere unterschiedlichen Alters (3, 6 und 10 Monate) untersucht sowie 6 Monate alte Tiere nach intensivem 8-wöchigen Schwimmtraining (2.11). Bei unveränderter linksventrikulärer Funktion trat bei den trainierten und bei den 10 Monate alten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen eine signifikante Vergrößerung des rechten Ventrikels auf (Echokardiographie; Tabelle 9).

Tabelle 9: Charakterisierung der Herzfunktion in heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen. Mittels Echokardiographie und Magnetresonanz-Bildgebung wurden bei untrainierten Plakoglobin *knockout* Mäusen (Alter: 3, 6 und 10 Monate) und trainierten Plakoglobin *knockout* Mäusen (Alter: 6 Monate) verschiedene Parameter der Herzfunktion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gemessen. Es zeigte sich ein vergrößerter rechter Ventrikel mit verringerter Pumpleistung bei trainierten 6 Monate alten Tieren und untrainierten 10 Monate alten Tieren. Die linksventrikuläre Funktion war hingegen nicht beeinträchtigt.

Wildtyp: Wildtyp-Mäuse; PG (+/-): heterozygote Plakoglobin *knockout* Mäuse

*: $p < 0.05$ (students t-Test)

	3 Monate		6 Monate		6 Monate trainiert		> 10 Monate	
	Wildtyp	PG (+/-)	Wildtyp	PG (+/-)	Wildtyp	PG (+/-)	Wildtyp	PG (+/-)
Doppler Echokardiographie	n=8	n=9	n=9	n=9	n=16	n=19	n=15	n=21
Fläche des rechten Ventrikel								
Vier-Kammerblick (mm ²)	-	-	5 ± 0.5	7 ± 0.5	7 ± 0.6	10 ± 1.1*	7 ± 0.4	11 ± 0.4*
Längsansicht (mm ²)	5 ± 0.5	6 ± 1.4	7 ± 0.5	7 ± 0.6	6 ± 0.3	7 ± 3*	5 ± 0.3	7 ± 0.3*
Querschnitt (mm ²)	4 ± 0.4	6 ± 2.4	4 ± 0.4	5 ± 0.6	4 ± 0.5	5 ± 1	3 ± 0.2	5 ± 0.2*
Funktion des linken Ventrikel								
enddiastolischer Durchmesser (mm)	3.2 ± 0.08	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.11	3.2 ± 0.1
endsystolischer Durchmesser (mm)	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Fractional Shortening (%)	51 ± 2	48 ± 4	51 ± 2	50 ± 3	51 ± 1	52 ± 1	48 ± 3	52 ± 3
Ejections Fraktion (%)	84 ± 2	80 ± 4	83 ± 2	82 ± 2	83 ± 1	84 ± 1	79 ± 3	82 ± 2
kardialer Auswurf (ml/min)	15.3 ± 2	15.0 ± 2	15.5 ± 1	13.8 ± 1	16.3 ± 1	16.4 ± 2	13.7 ± 2	16.1 ± 1
Schlagvolumen (µl)	50 ± 4	60 ± 8	60 ± 6	50 ± 3	60 ± 3	60 ± 3	50 ± 4	50 ± 3
Herzfrequenz (Schläge pro Minute)	464 ± 16	434 ± 35	474 ± 22	479 ± 10	417 ± 13	424 ± 11	509 ± 36	486 ± 35
linksventrikuläre Masse (mg)	71 ± 3	78 ± 6	94 ± 3	93 ± 3	96 ± 5	97 ± 5	94 ± 6	105 ± 6
Magnetresonanz					n=4	n=4		
Funktion des rechten Ventrikel								
Ejections Fraktion (%)					77 ± 2	59 ± 5*		
kardialer Auswurf (ml/min)					19 ± 1	13 ± 0.8*		

Zudem war die Ejections Fraktion und der kardiale Auswurf reduziert und somit die Pumpleistung des rechten Ventrikels eingeschränkt (Magnetresonanz-Bildgebung bei 6 Monate alten trainierten Tieren). Bei dem linken Ventrikel waren hingegen keine

signifikanten Veränderungen in Masse, Abmessungen und Pumpleistung festzustellen.

Die Untersuchung der Elektrophysiologie erfolgte am Langendorff-perfundierten Herzen. Es wurde der Atrioventrikularknoten blockiert und dadurch die Umstellung des Herzens von einem schnellen Sinusrhythmus zu einem langsameren ventrikulären Ersatzrhythmus herbeigeführt. Zur Detektion von Arrhythmien wurde das monophasische Aktionspotential mit drei Kathetern an der freien Wand des rechten Ventrikels, an der freien Wand des linken Ventrikels und am Septum aufgezeichnet (siehe Abbildung D Appendix 9.1). Mit einer darauf folgenden Kammerstimulation bei 200ms, 150ms und 100ms (je 40s) mit einem oktapolaren elektrophysiologischen Mauskatheter wurde das Auftreten von Arrhythmien provoziert und die resultierenden Aktivierungszeiten wurden vermessen. Anschließend wurde das Protokoll der ventrikulären Kammerstimulation nach Gabe von Orciprenalin (induziert eine starke Erhöhung der Herzfrequenz; 2,5mg/l) wiederholt.

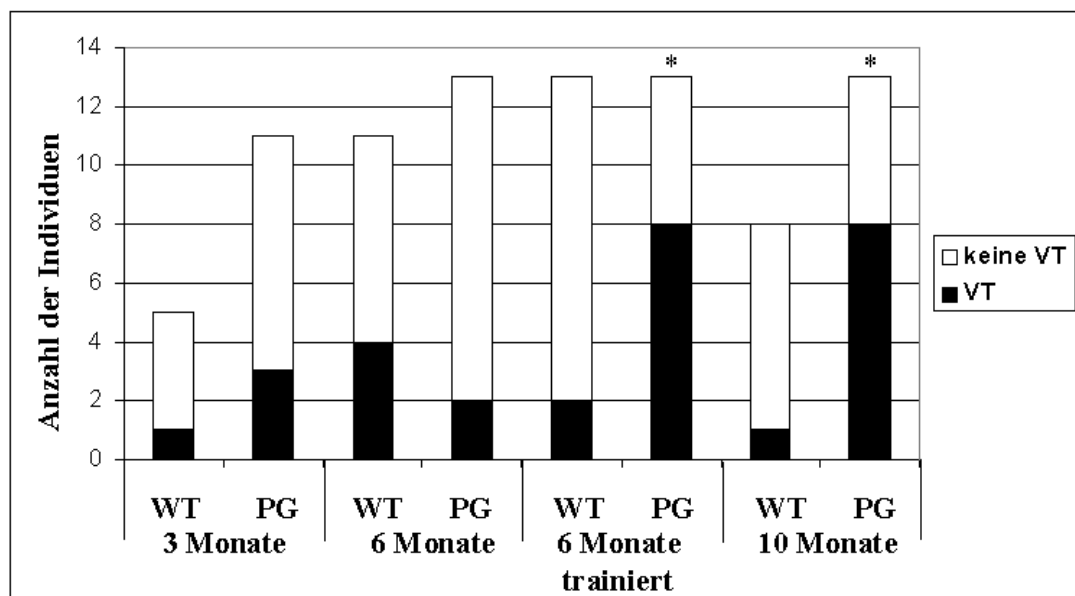


Abbildung 27: Spontane ventrikuläre Tachykardien (VT) in heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen. Nach Blockierung des Atrioventrikularknotens trat am Langendorff-perfundierten Herzen von 6 Monate alten trainierten sowie 10 Monate alten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl an ventrikulären Tachykardien im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen auf. Im Gegensatz zu größeren Organismen zeigten allerdings auch gesunde Wildtyp-Mäuse bedingt durch die deutlich höhere Herzfrequenz eine geringe Anzahl an Tachykardien.

WT: Wildtyp-Mäuse; PG: heterozygote Plakoglobin *knockout* Mäuse; *: $p < 0.05$ (Fisher Test)

Bei Durchführung dieser Prozedur wurde sowohl bei 6 Monate alten trainierten als auch 10 Monate alten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl an ventrikulären Arrhythmien im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen detektiert (siehe Abbildung 27).

3.3.2 Genexpressionsprofile von heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen

Es wurden die rechten Ventrikel von 6 Monate alten trainierten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen, trainierten Wildtyp-Mäusen (je vier) und von zwei 6 Monate alten untrainierten Mäusen (Wildtyp und heterozygoter *knockout*) präpariert. Die mit TRIZOL[®]-Reagenz isolierte RNA (2.2.1) diente als Startmaterial für komplexe Hybridisierungen mit Affymetrix Gene Chip Mouse Expression Set 430A Arrays (2.6). Die Bestimmung der Signifikanz der differentiellen Genexpression erfolgte zwischen den trainierten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen und den trainierten Wildtyp-Mäusen mit SAM (2.8.6); der Vergleich der trainierten mit den beiden untrainierten Kontroll-Mäusen erfolgte nur auf der Basis der berechneten Ratios der Genexpression. Im Vergleich zu den untrainierten Mäusen induzierte das Schwimmtraining die Expression einer Vielzahl an Hypertrophie-Markern und reduzierte die Expression von *pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4* (PDK4, Inhibitor des kardialen Glukose Metabolismus) und *PPAR γ coactivator 1 alpha* (PGC-1, verstärkt den kardialen Fettsäure Metabolismus) (siehe Abbildung 28 und Tabelle A im Appendix 9.1).

Hingegen waren zwischen den 6 Monate alten trainierten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen und trainierten Wildtyp-Mäusen keine signifikanten Genexpressionsunterschiede zu detektieren. In der Datenauswertung wurde sowohl mit linearen als auch logarithmierten Intensitäten gerechnet und die Statistik mit einfacher Zuordnung in zwei Gruppen (Wildtyp gegen heterozygoter *knockout*) oder aber unter Berücksichtigung der Zuordnung der Tiere zu einzelnen Würfen (Paarbildung) durchgeführt. Allein bei logarithmierten Ratios der Genexpressionswerte der gebildeten Paare an Mäusen gleicher Würfe deutete sich die Deregulation einzelner Gene mit vergleichsweise hohen Falsch-Positiv-Raten an. Entsprechende Genexpressionsunterschiede einer Auswahl an Genen konnten jedoch durch quantitative RT-PCR (2.9) nicht bestätigt werden (z.B. *myocyte enhancer factor 2C* und *WD repeat domain 1*).

Zusätzlich zu den Mikroarray Experimenten wurden Kandidatengene für ARVC (*connexin 43*, *sodium channel protein type V, alpha subunit 3*), Regulatoren für

Adipogenese (*Pparγ*, *CCAT enhancer-binding protein-α*), Fibrose Marker (*collagen 1A1*, *collagen 3A1*) und ein Zielgen des Wnt-Signalwegs (*cyclin D1*) mit quantitativer RT-PCR in den homozygoten und heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Nur *CCAT enhancer-binding protein-α* zeigte in den homozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen eine verstärkte Expression (Ratio=2.95, p=0.0060), alle anderen Gene waren unverändert.

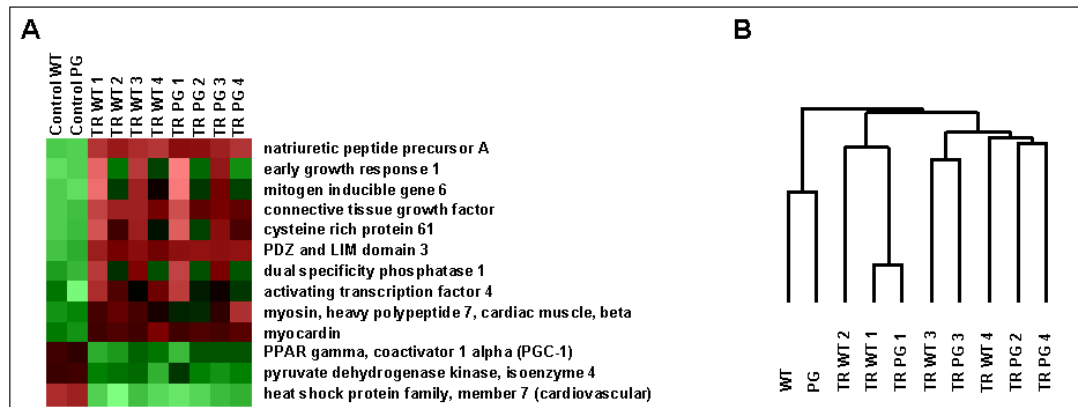


Abbildung 28: Genexpressionsprofile von heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen.

Es wurden Genexpressionsprofile von trainierten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen mit ARVC im Vergleich zu den trainierten Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Das Training induzierte im Vergleich zu untrainierten Mäusen (WT und PG) eine Vielzahl an Markern für Hypertrophie (A). Die Stärke der Induktion war jedoch nicht genotyp-/phänotypabhängig (TR WT 1 bis 4 bzw. TR PG 1 bis 4). Permutationsbasierte statistische Verfahren sowie auch ein hierarchisches Clustering aller exprimierten Gene (basierend auf den "detection p-values") zeigten keine Unterschiede in den Expressionsmustern von heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen mit ARVC und trainierten Wildtyp-Mäusen (B). TR: trainiert; WT: Wildtyp-Maus; PG: heterozygote Plakoglobin *knockout* Maus

Zusätzlich zu dieser Analyse auf Ebene einzelner Gene wurden die zehn Individuen unter Einbeziehung aller exprimierten Gene (basierend auf dem "detection p-value") hierarchisch geclustert (2.8.7). Die beiden untrainierten Kontrolltiere und die acht trainierten Tiere wurden so zwar getrennt, aber auch mit diesem statistischen Verfahren ergaben sich keine Unterschiede zwischen den trainierten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen und den trainierten Wildtyp-Mäusen (siehe Abbildung 28).

3.3.3 Zelladhäsionskomplexe in heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen

Es wurden von je zwei Wildtyp- und heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen im Alter von 10 Monaten mit Elektronenmikroskopie die Struktur des rechtsventrikulären Myokards untersucht (2.12). Es wurden keine offensichtlichen Unterschiede in der Struktur der Kardiomyozyten beobachtet (räumliche Anordnung der Sarkomere und Mitochondrien, Menge an extrazellulärer Matrix, Anzahl an apoptotischen Zellkernen und Mitochondrien, etc.). Im Gegensatz zu homozygoten *knockout* Mäusen (siehe Abbildung 29 A, adaptiert von Ruiz et al.¹⁸) waren in heterozygoten sowohl Desmosomen als auch *adherens junctions* vorhanden. Ihre Anzahl und Struktur wies keine offensichtlichen Veränderungen zum Wildtyp auf, allerdings ist mit der begrenzten Anzahl an untersuchten Tieren und Schnitten keine statistische Aussage möglich.

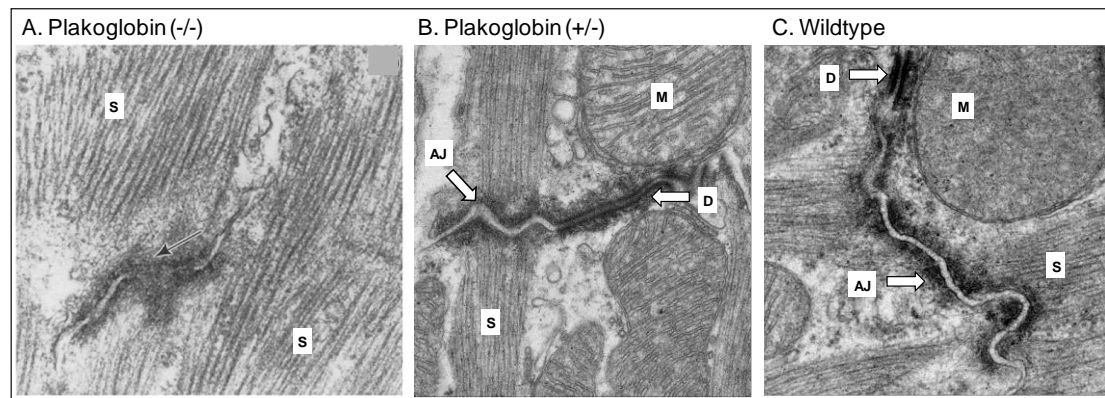


Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsionskomplexe in heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen. Rechtsventrikuläres Myokard wurde von 10 Monate alten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen und Wildtyp Mäusen präpariert und die Ultrastruktur elektronenmikroskopisch untersucht. A. Ergänzt von: Ruiz et al.¹⁸

D: Desmosomen; AJ: adherens junctions; S: Sarkomer; M: Mitochondrium

4 Diskussion

Kardiomyopathien stellen trotz erheblicher Fortschritte in der Forschung, Therapie und Diagnostik eine der großen Herausforderungen in der Zukunft für eine bessere medizinische Versorgung der Bevölkerung dar. Als Haupttodesursache vor malignen Tumoren verkürzen die Lebenserwartung eines Menschen im Durchschnitt um sieben Jahre². Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Dilatation eines oder beider Ventrikel und einer Störung der systolischen Pumpfunktion charakterisiert. Der umfangreiche Umbau der kardiovaskulären Gewebestruktur in der DCM mit Apoptose von Kardiomyozyten, Fibrose und Inflammation ist in seinem resultierenden Phänotyp gut charakterisiert, aber in seinen regulatorischen Prozessen noch weitgehend unverstanden. Dementsprechend faßt die Begrifflichkeit DCM ein vergleichsweise heterogenes Krankheitsbild zusammen, welches in erster Linie durch die makroskopische Dilatation des linken Ventrikels charakterisiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mausmodelle kardiomyopathischer Erkrankungen im Vergleich zum humanen Krankheitsbild untersucht. Für die Erforschung von kardiovaskulären Erkrankungen sind Mausmodelle von besonderer Bedeutung: Sie sind genetisch gut manipulierbar, trotz ihrer geringen Größe kann eine erhebliche Anzahl an Parametern der Herzfunktion quantitativ bestimmt werden und Inzuchtlinien besitzen genetische Homogenität. Zudem gibt es keine geeigneten Zellkultur-Systeme zur Untersuchung der Funktion des Herzens und der Einsatz von primären Kardiomyozyten ist sehr aufwendig und in der Aussagekraft zwangsläufig aufgrund der fehlenden Struktur und Funktion des Gewebes limitiert. Humanes Material von Patienten ist nur in geringem Umfang verfügbar und stammt von explantierten Herzen oder aber kleinsten Biopsien (2-3mm im Durchmesser). Um eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse von wissenschaftlichen Studien von einem Tiermodell zu dem Menschen zu gewährleisten, ist eine exakte Charakterisierung und Verständnis des Modellsystems erforderlich.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausmodellen lag die primäre Ursache der Erkrankung jeweils im kardialen Gewebe selber und wurde nicht durch z.B. Verengung der Koronarien oder einen erhöhten Blutdruck hervorgerufen. Es wurden vier transgene Mauslinien (Plakoglobin-, MLP-, ErbB2- und ErbB4 *knockout* Mäuse), ein chemisch induziertes Modell (Doxorubicin-behandelte Mäuse) und die Kombination aus einer transgenen Mauslinie mit chemischer Induktion (Doxorubicin-behandelte ErbB4 *knockout* Mäuse) untersucht. Alle genetischen Modelle zeigen trotz der Unterschiedlichkeit in der Funktion der inaktivierten Gene eine Dilatation

des Herzens. Bei den herzspezifischen ErbB2- und ErbB4 *knockout* Mäusen und den MLP *knockout* Mäusen entwickelt sich der Phänotyp im adulten Tier und ist als solcher entsprechend der publizierten Charakterisierung als DCM zu bezeichnen (1.1.1, 1.2.2 und 1.2.3). Bei den homozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen führt die Inaktivierung des Gens zu embryonaler Letalität (E12.0-16.0); in Folge geschwächter struktureller Integrität dilatiert das Herz bereits kurz nach Einsetzen der kardialen Pumpfunktion (ca. E8.0), bis es der steigenden biomechanischen Beanspruchung nicht mehr standhalten kann (1.2.1). Entsprechend der Definition der Krankheitsbilder ist der Phänotyp als Dilatation, aber nicht als DCM zu bezeichnen. Ein chronischer Krankheitsverlauf z.B. mit Remodellierung der Gewebestruktur und Änderungen in der zellulären Zusammensetzung fehlt zwangsläufig aufgrund der frühen embryonalen Letalität (1.2.1). Die Gabe von Doxorubicin wird als Chemotherapie bei malignen Tumoren eingesetzt und hat eine stark kardiotoxische Wirkung, welche die Pumpleistung des Herzens reduziert und letztlich zu Herzversagen führen kann (1.2.4). Sekundär verursacht dies insbesondere bei chronischem Krankheitsverlauf zusätzlich eine Dilatation. In der Regel wird aber das Krankheitsbild nur als Kardiomyopathie bezeichnet, da die Kardiotoxizität und weniger die Dilatation klinisch relevant ist.

Die Diagnose bzw. Klassifikation einer DCM sowohl bei Patienten als auch Tiermodellen basiert weitestgehend auf phänotypischen Parametern. Zu ihnen zählen z.B. makroskopisch die Abmessungen des Herzens, mikroskopisch Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des kardialen Gewebes und bei der Funktion die Pumpleistung. Eine solche Klassifikation ist jedoch in ihrer Aussage begrenzt, da sie keinen Aufschluß über die potentiell unterschiedlichen molekularbiologischen Vorgänge und Auslöser der Erkrankung zuläßt und sich auf den phänotypischen Endpunkt konzentriert. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Arrays zur Charakterisierung des kardialen Phänotyps auf transkriptioneller Ebene eingesetzt, um die in der Pathogenese genomweit veränderte Genaktivität untersuchen zu können.

4.1 Genexpressionsanalysen mit minimalen RNA-Startmengen

Bei der Durchführung von Genexpressionsprofilen werden in Abhängigkeit der eingesetzten Methodik der Markierungsreaktion erhebliche Mengen an RNA als Startmaterial benötigt. Es werden z.B. für typische cDNA Mikroarrays bei direkter

Markierung mit fluoreszenten Nukleotiden während reverser Transkription oder Amino-Allyl-Markierung bis zu 50µg Gesamt-RNA eingesetzt (Beispiele siehe: <http://brownlab.stanford.edu/>) und bei Oligonukleotid-Mikroarrays von Affymetrix 3-5µg. Derartige Mengen sind jedoch häufig nicht verfügbar (z.B. bei Laser-Dissektionen einzelner Zellen, Biopsien oder Gewebe von Mausembryonen), sodaß eine Amplifikation der RNA und/oder des zu detektierenden Signals erforderlich ist. Insbesondere sogenannte "lineare" T7-Promotor-basierte Amplifikationsverfahren haben sich in den letzten Jahren gegen "exponentielle" (z.B. PCR) durchgesetzt, da sie in der Regel eine bessere Reproduzierbarkeit und Repräsentation langer Transkripte gewährleisten⁸⁷. Trotzdem sind die möglicherweise durch wenigstens zwei zusätzliche enzymatische Reaktionen (reverse Transkription und *in vitro*-Transkription) verursachten Effekte auf eine komplexe Population unterschiedlicher mRNA-Moleküle nur schwer kalkulierbar. Daher wurden zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse von Genexpressionsprofilen sowohl Experimente mit Gesamt-RNA als Startmaterial als auch mit aRNA als Startmaterial (zwei Runden der Amplifikation) durchgeführt (3.1.1). Als biologisches Material diente RNA von HEK293- und HeLa-Zellen. Die Korrelationskoeffizienten der Signalintensitäten der Hybridisierungen zwischen beiden Zelltypen lagen für Gesamt-RNA und aRNA in einer vergleichbaren Größenordnung. Die berechneten Ratios der Genexpression sowie das Verhältnis von Signalintensität zu Hintergrundintensität zeigte bei signifikant deregulierten Genen zwischen Gesamt-RNA und aRNA eine gute Reproduzierbarkeit. Ein Vergleich der jeweils 50 mit höchster Signifikanz deregulierten Gene lieferte eine Übereinstimmung von 62%. Dies ist eine vergleichsweise hohe Prozentzahl, da sich auch bei der Wiederholung eines Experiments mit gleichem Startmaterial (z.B. in beiden Fällen Gesamt-RNA) Variationen einer leicht veränderlichen Größe wie z.B. eines p-Wertes ergeben (für publizierte Studien zur Anwendbarkeit von Amplifikationsprotokollen siehe Patel et al.⁸⁸, King et al.⁸⁹ und Cope et al.⁹⁰; zur Reproduzierbarkeit von Array-Ergebnissen bei identischem Startmaterial siehe Guo et al.⁹¹ und Shi et al.⁹²).

Allerdings erfordert der Einsatz von derartigen Amplifikationsprotokollen eine Parallelisierung der enzymatischen Reaktionen und Qualitätskontrollen auf allen möglichen Ebenen: Amplifikate, welche in einem Experiment eingesetzt werden, müssen ähnliche Größenverteilungen aufweisen und Hybridisierungsergebnisse sind in Hinblick auf unspezifische Bindungsreaktionen zu überprüfen. Durch den sorgfältigen Einsatz solcher Amplifikationsverfahren werden Genexpressionsprofile

ausgehend von nur wenigen Zellen möglich und erweitern das Anwendungsspektrum der Methode erheblich⁹³.

Zusätzlich zu der Validierung der Einsetzbarkeit in Array-Experimenten wurde quantitative RT-PCR mit aRNA im Vergleich zu Gesamt-RNA durchgeführt. Für sechs Gene, welche in ErbB4 *knockout* Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in einem Array-Experiment dereguliert gefunden wurden, erfolgte die Durchführung der quantitativen RT-PCR mit beiden RNA-Typen als Startmaterial. Zwischen Gesamt-RNA und aRNA ergaben sich für die berechneten Ratios der Genexpression nur geringe Unterschiede und die Induktion der Expression zwischen ErbB4 *knockout* Mäusen und Wildtyp-Mäusen war jeweils statistisch signifikant (siehe Abbildung 13). Diese Ergebnisse in Vergleichsexperimenten für Array-Hybridisierungen und für quantitative RT-PCR belegen, daß bei sorgfältiger Anwendung von T7-Promotor-basierten Amplifikationsverfahren aRNA an Stelle von Gesamt-RNA als Startmaterial genutzt werden kann.

4.2 Herstellung von kardialen Themenarrays mit optimierten Protokollen

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen humaner Herzproben wurde ein organspezifisches Array-Format angestrebt. Dieses sollte möglichst viele der im Herzen exprimierten und durch Array-Hybridisierungen detektierbaren Gene beinhalten. Ein solcher reduzierter Gensatz bietet den Vorteil der einfacheren Handhabung in der Herstellung und einer verringerten Anzahl an Falsch-Positiven in der Auswertung, bedingt durch insgesamt weniger Gene/Proben bei gleichzeitig mehr Replika

Im Gegensatz zu anderen Erkrankungen (z.B. malignen Tumoren) sind bei Kardiomyopathien die Veränderungen in der Genexpression vergleichsweise gering (1.3.6). So zeigten in einer Studie von Steenman et al. (2005)⁷⁴ nur sechs von 43 deregulierten Genen ein Ratio, das größer war als drei.

Um ein somit erforderliches hohes Maß an Sensitivität bei den selbst produzierten Mikroarrays zu erreichen, wurden unterschiedliche Parameter bzw. Materialien zur Herstellung verglichen (3.1.2). Als Basis hierfür dienten Vorarbeiten von Dr. Florian Wagner (RZPD, Berlin), Dr. Claus Hultschig und Dr. Oliver Bauer (beide Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin). Entsprechend der in diesen Vorarbeiten generierten Erkenntnisse wurden vier Array-Typen, drei Spotting-Puffer und zwei

Arten der Aufreinigung von PCR-Produkten verglichen. Es wurden Telechem Superamine SMM, Corning CMT GAPS 40006, Sigma-Prep Silane S4651 und Sigma Screen S9936 eingesetzt. Alle Array-Typen verfügten über freie Amino-Gruppen, wobei Sigma-Prep Silane S4651 nicht speziell für Array-Anwendungen entwickelt wurden. Bei den Spotting-Puffern handelte es sich um Micro Spotting Solution Plus MSS, 3 x SSC und 50% DMSO. Zudem wurden zwei Arten der Aufreinigung verglichen: Eine Fällung mit Ethanol ist experimentell wenig aufwendig und zudem kostengünstig, allerdings werden potentiell die Primer und andere Komponenten der PCR-Reaktion nicht vollständig abgetrennt. Eine Reinigung mit einer Säule oder Membran (QIAquick PCR Purification Kit oder andere Säulen bzw. Molekularsiebe) ist experimentell vergleichsweise aufwendig und teuer, aber es wird eine hohe Reinheit bei den erhaltenen PCR-Produkten erreicht.

Eine Vielzahl an Parametern kennzeichnet die Leistungsfähigkeit eines Arrays; hierzu gehören z.B. der dynamische Bereich, die Spezifität der Bindung, die Sensitivität und die Spot-Morphologie^{94,95}. In dem Evaluierungsexperiment wurde ein radioaktiv-markiertes PCR-Produkt in Verdünnungsreihen gespottet, um die immobilisierten Mengen detektieren zu können. Hierbei zeigten sich zwischen den unterschiedlichen Array-Formaten und Aufreinigungsformen nur geringe Unterschiede und bei den Spotting-Puffern wurde bei Micro Spotting Solution Plus MSS und 3 x SSC deutlich mehr PCR-Produkt immobilisiert als mit 50% DMSO. Selbst bei relativ hohen Konzentrationen (500ng/μl) wurde mit keiner der Verdünnungsreihen eine Sättigung der Oberfläche erreicht. Zur Bestimmung der Zugänglichkeit der unterschiedlichen immobilisierten PCR-Produkte wurden Hybridisierungen mit beliebigen fluoreszenten 15mer-Nukleotiden durchgeführt. Erneut waren zwischen den einzelnen Array-Typen nur geringe Unterschiede festzustellen, aber PCR-Produkte, die mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt wurden, wiesen eine deutlich bessere Zugänglichkeit auf als durch Fällung gereinigte PCR-Produkte. Die homogenste Spot-Morphologie war bei PCR-Produkten mit Micro Spotting Solution Plus MSS zu beobachten und das Hintergrundsignal lag bei allen Array-Typen in einer vergleichbaren Größenordnung. Ein solches Evaluierungsexperiment kann helfen, die Qualität der Kombination aus unterschiedlichen Parametern wie Array-Typ, Spotting-Puffer und Aufreinigungsmethode zu beurteilen. Die Variation einzelner, vergleichsweise trivialer Parameter des Herstellungsprozesses von Mikroarrays hat einen erheblichen Einfluß auf die Qualität des Ergebnisses (z.B. Luftfeuchtigkeit beim Trocknen der gespotteten PCR-Produkte)^{96,97,98}. In Folge dessen wurden in der vorliegenden Arbeit Protokolle der Herstellung verglichen und es kann z.B. keine absolute Aussage

getroffen werden, welcher Array-Typ der leistungsfähigste ist. In der Zusammenfassung aller analysierten Qualitätswerte wurden mit PCR-Produkte, welche mit einer Säule gereinigt und mit Micro Spotting Solution Plus MSS auf Telechem Superamine SMM gespottet wurden, die qualitativ hochwertigsten Ergebnisse erzielt. Diese Prozedur wurde anschließend zur Herstellung kardialer Themenarrays eingesetzt.

Durch Erstellung von Genexpressionsprofilen unterschiedlicher kardialer Erkrankungen mit Makroarrays des Human Unigene Set 2 wurde eine möglichst breit angelegte Identifikation kardial exprimierter Gene durchgeführt (3.1.3). Ausgehend von 74.695 cDNA Klonen des Sets wurden 11.192 (15%) von ihnen entsprechend der Hybridisierungsergebnisse als signalgebend definiert. Im Vergleich zu anderen Geweben/Zellen (z.B. Gehirn oder embryonalen Stammzellen) ist der Anteil der exprimierten Gene des (Herz-) Muskels relativ gering (siehe <http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>). Diese identifizierten Klone wurden zu einem neuen Klonsatz zusammengestellt und auf das Vorhandensein von bekannten Kardiomyopathie-Markern hin überprüft. Bis auf eine Kontaminate (NPPA) waren alle Gene vorhanden; welches die grundsätzliche Anwendbarkeit eines solchen *screening* Ansatzes belegt. Folgend wurden die kardialen Themenarrays entsprechend der zuvor optimierten Bedingungen hergestellt.

4.3 Genexpressionsmuster von Mausmodellen kardiomyopathischer Erkrankungen

Zur vergleichenden Charakterisierung von sechs Mausmodellen kardiomyopathischer Erkrankungen (Plakoglobin-, ErbB2-, ErbB4- und MLP *knockout* Mäuse, Doxorubicin-behandelte Mäuse und Doxorubicin-behandelte ErbB4 *knockout* Mäuse) auf transkriptioneller Ebene wurden Genexpressionsprofile erstellt. Gepoolte Sonden von vier bis acht Tieren pro Zustand im Vergleich zum Wildtyp wurden auf Agilent Mikroarrays (~8.700 cDNA-Proben) hybridisiert. Entsprechend der zuvor gezeigten Validität wurde eine T7-Promotor-basierte Amplifikation der RNA der Plakoglobin *knockout* Mausembryonen vorgeschaltet (3.1.1). Mit den vier technischen Replika der Hybridisierungen wurden durch die statistische Auswertung mit SAM die deregulierten Gene identifiziert (siehe Tabelle 3 und Appendix 9.3.2). In der Validierung der Array-Ergebnisse auf Ebene einzelner Tiere mittels RT-PCR zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit sowohl bei den Ratios der Genexpression

als auch der statistischen Signifikanz (3.2.3). Aufgrund der Unterschiedlichkeit des experimentellen Designs (z.B. gepoolte Sonden bzw. individuelle Sonden) und der statistischen Auswertung beider Methoden (SAM und t-Test) ist diese Ähnlichkeit zwischen den p- und FPR-Werten allerdings nicht beliebig auf andere Array-Experimente übertragbar. Zwingend erforderlich für einen solchen experimentellen Ansatz mit gepoolten Proben und einer guten Aussagefähigkeit der Ergebnisse ist ein weitgehend homogenes Genexpressionsmuster der biologischen Replika.

Um die Ergebnisse der einzelnen Array-Experimente der sechs Mausmodelle vergleichen zu können, wurde ein hierarchisches Clustering aller signifikant deregulierten Gene durchgeführt (1879 Proben, FPR<10% bei zumindest einem Mausmodell). Ein hierarchisches Clustering gruppierte Gene nach der Ähnlichkeit ihrer Expressionsverläufe über die betrachteten sechs Mausmodelle mit jeweils vier technischen Replika. Innerhalb der Baumstruktur ergaben sich einzelne Cluster mit sehr spezifischen aber auch unspezifischen Expressionsverläufen. Die Funktion der Gene von vier erhaltenen Clustern wurde mit DAVID und Ingenuity näher charakterisiert.

Induktion von Apoptose durch Doxorubicin in Wildtyp- und ErbB4 knockout Mäusen

Ein Cluster mit Genen, welche vornehmlich in den Doxorubicin-behandelten Mäusen (Wildtyp und ErbB4 *knockout*) induziert waren, ist in Abbildung 19 dargestellt. Die funktionelle Analyse zeigte eine starke Anreicherung in diesem Cluster von Genen, die in der Apoptose und Streßantwort eine Rolle spielen (siehe Tabelle 4 und Abbildung 20). Diese vergleichsweise stärkste Induktion der Expression dieser Gene mag in der kardiotoxischen Wirkung der Substanz begründet liegen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß p53 (trp53) durch Doxorubicin induziert wird und daß eine Inaktivierung des p53-Signaltransduktionsweges (*knockout* oder chemisch) die Apoptose in behandelten Kardiomyozyten reduziert^{99,100}. Mehrere Gene, welche in dem p53-Signaltransduktionsweg involviert sind und auf beschädigte DNA reagieren, wurden in Doxorubicin-behandelten Tieren aktiviert (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*^{101,102}; *B-cell translocation gene 2, anti proliferative*^{103,104}; *cyclin dependent kinase 2*^{105,106} und *growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma*¹⁰⁷); p53 (trp53) selber war nicht in dem Gensatz des Array-Formates vorhanden, es konnte aber durch quantitative RT-PCR eine erhöhte Expression in den Doxorubicin-behandelten Wildtyp- und ErbB4 *knockout* Mäusen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 8). Die Aktivierung dieser Gruppe von Genen führt zu einer Unterbrechung des Zellzyklus, wobei *cyclin dependent kinase inhibitor 1A* und *growth arrest and*

DNA-damage-inducible, *gamma* zusammen in einem Komplex agieren können¹⁰⁸. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigten *Bcl2-like* und *myelocytomatosis oncogene*, die sowohl apoptotisch als auch anti-apoptotisch wirken können^{109,110}.

Eine sehr spezifische Aktivierung bei Doxorubicin-Behandlung war bei dem Gen *cardiomyopathy associated 1* (CMYA1 oder auch Xin) zu beobachten. CMYA1 ist an dem BMP-Nkx2.5-MEF2C Signaltransduktionsweg in der kardialen Morphogenese beteiligt und lokalisiert im adulten Herz in den *adherens junctions*. In der pathologischen Hypertrophie bei Tiermodellen wurde CMYA1 induziert gefunden¹¹¹.

Teilweise erfolgte eine Aktivierung dieser Apoptose-assoziierten Gene auch bei den genetischen DCM-Mausmodellen; der Grund mag in der auch bei der DCM auftretenden Apoptose ohne Doxorubicin-Behandlung liegen (1.1.1). Insbesondere in den ErbB4 *knockout* Mäusen wurde mehrere apoptotische Gene aktiviert (z.B. *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*, *glucokinase activity* und *Bcl2-like*). In kardialem Gewebe wird von dem Endothelium *neuregulin* freigesetzt und bindet an ErbB2-ErbB4 Heterodimere und ErbB4-ErbB4 Homodimere der Kardiomyozyten, wodurch Wachstum und Überleben induziert werden¹¹². In publizierten *in vitro* Studien bleibt umstritten, ob hierbei ErbB2 oder ErbB4 die essentielle Rolle spielt^{112, 113}. Ebenso widersprüchlich bleiben Untersuchungen zur Apoptose in zwei unterschiedlichen ErbB2 Mauslinien^{42, 43}; in den generierten Genexpressionsdaten beschränkte sich die Aktivierung einiger apoptotischer Gene allerdings auf den ErbB4 *knockout*.

Induktion von Gewebe-Remodellierung in MLP knockou Mäusen

Ein Cluster beinhaltete Gene, welche vornehmlich eine Induktion in den MLP *knockout* Mäusen zeigten (siehe Abbildung 21). Die funktionelle Analyse zeigte eine starke Anreicherung von Genen in diesem Cluster, die in der Muskelentwicklung und –kontraktion eine Rolle spielen (siehe Tabelle 5 und Abbildung 22) und unter anderem in der kontraktilen Faser, dem Aktin Zytoskelett und der extrazellulären Matrix lokalisiert sind. Die verstärkte Expression von Genen der extrazellulären Matrix deutet auf einen Umbau der Gewebestruktur mit starker Fibrose hin¹¹⁴ und ist für eine DCM aber auch andere Kardiomyopathien charakteristisch^{115,116,117}. *Transforming growth factor β* gilt als Marker für solche Umbauprozesse und induziert die Expression von *connective tissue growth factor*; beide wirken pro-fibrotisch^{118,119}.

Genotyp- und Behandlungs-unabhängige Induktion von Genen

Eine Gruppe von Genen in Cluster 1 und 2 zeigte aber eine erhöhte Expression in fast allen Mausmodellen; wobei *natriuretic peptide precursor B* (NPPB) als einziges Gen übereinstimmend an allen Mausmodellen im Vergleich zum Wildtyp verstärkt exprimiert war (FPR<10%, Cluster 1). NPPB bildet zusammen mit dem *natriuretic peptide precursor A* (NPPA, Cluster 2) und dem *natriuretic peptide precursor C* (NPPC) eine Familie von natriuretischen Peptiden, die eine diuretische, vasodilative und anti-mitogene Wirkung besitzen und zudem eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären, renalen und endokrinen Homöostase spielen. NPPA und NPPB stellen die verlässlichsten Markergene für eine Kardiomyopathie dar und werden sowohl in einer Vielzahl von Tiermodellen^{120,121,122} als auch bei entsprechenden humanen Erkrankungen in ihrer Expression induziert (1.3.6). NPPA sowie NPPB werden vom Myokard sezerniert und können im Blutplasma quantitativ nachgewiesen werden. Insbesondere für NPPB konnte gezeigt werden, daß die bestimmten Plasma-Konzentrationen prognostischen Wert für Patienten mit Herzversagen besitzen^{123,124,125}. Zusätzlich zu dieser wichtigen Rolle als Marker für kardiale Fehlfunktion besitzen sie auch regulatorische Eigenschaften insbesondere in der Hypertrophie. Der Transkriptionsfaktor GATA4 aktiviert zusammen mit NFAT3¹²⁶, GATA6¹²⁷, TEF¹²⁸, dHAND¹²⁹ und anderen die Expression von NPPB. NPPB und NPPA wirken antagonistisch auf die kardiale Hypertrophie und Wachstumsfaktor-vermitteltes Zellwachstum. So führt zum Beispiel eine Überexpression von NPPA zu verkleinerten Herzen und in *knockout* Modellen wird Hypertrophie beobachtet¹³⁰. NPPB und NPPA zeigen zusammen mit *actin, alpha skeletal muscle* (ACTA1) in einer erheblichen Zahl an publizierten Studien über Kardiomyopathien bzw. Herzversagen eine erhöhte Expression, welche sich in Richtung der Expressionsniveaus im fötalen Entwicklungsstadium bewegen. Ihre Aktivierung wird daher als das "fötale Genprogramm" bezeichnet¹³¹.

Ein ähnliches Expressionsmuster mit einer Aktivierung in allen Modellen abgesehen von dem Plakoglobin *knockout* zeigten: *down syndrome critical region 1*, *enabled homolog* (entspricht *NPC derived proline rich protein 1*), *four and a half LIM domains 1*, *cardiac ankyrin repeat protein*, *matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein*, *microfibrillar associated protein 5* und *thrombospondin 4* (siehe Abbildung 19 und 21).

Calcipressin stellt das Genprodukt von *down syndrome critical region 1* (DSCR1) dar und ist in die VEGF-induzierte Migration von Endothel-Zellen und Angiogenese involviert¹³². Es bindet zudem *calcineurin* und inhibiert dadurch die Translokation von

N-FAT in den Nucleus und die damit verbundene Aktivierung von Hypertrophie-assoziierten Genen¹³³. Außerdem könnte die Bindung an *calcineurin* ähnlich wie bei den Medikamenten Cyclosporin A und FK506 eine Unterdrückung der Immunantwort herbeiführen¹³⁴.

Enabled homolog (Drosophila)(ENAH) gehört zusammen mit *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP) und *Enah/Vasp-like* (EVL) zur Enah/VASP Proteinfamilie. Sie weisen zwei Domänen auf (EVH1 und EVH2), die sie zur Interaktion mit mehreren Proteinen des Fokalen Adhäsions Komplexes (z.B. *vinculin*, *zyxin*) und Aktin-bindenden Proteinen (*profilin*) befähigen. Zudem kann ENAH durch die *protein kinase A* phosphoryliert werden¹³⁵ und lokalisiert an Aktin-Streßfasern und Filopodia/Lamellipodia¹³⁶. ENAH und VASP bilden durch Oligomerisierung einen gemeinsamen Komplex und werden im Herzen in hohen Konzentrationen in den *intercalated discs* gefunden, wo sie eine wichtige strukturelle Aufgabe für die Integrität des Myokards erfüllen. Die Inaktivierung nur eines der beiden Gene führt im Tiermodell zu keinem kardialen Phänotyp, wohingegen die herzspezifische Inaktivierung beider Gene DCM hervorruft¹³⁷.

Four and a half LIM domains 1 (FHL1) gehört zur Familie der "LIM-only"-Proteine und wird sowohl im adulten Herzen als auch während der Organentwicklung stark exprimiert. Über die Funktion des Proteins ist nur wenig bekannt; es bindet an das *myosin-bindende protein C* und wirkt dadurch auf die Assemblierung des Sarkomers ein¹³⁸. Zudem wurde es sowohl in Mausmodellen kardiomyopathischer Erkrankungen¹³⁹ als auch bei Patienten mit HCM¹⁴⁰ in der Expression induziert gefunden. Diese Induktion war jeweils, wie bei fünf der sechs im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mausmodellen, auf FHL1 beschränkt und FHL2-4 waren in der Regel nicht dereguliert.

Das *cardiac ankyrin repeat protein* (CARP) gehört zusammen mit dem *diabetes related ankyrin repeat protein* (DARP oder ANKRD23) und dem *ankyrin repeat domain 2* (ANKRD2) zu den Muskel Ankyrin Repeat Proteinen. Die Induktion ihrer Expression erfolgt als Streßantwort auf Verletzung/Hypertrophie (CARP), Verlust von Nerven/Zugbeanspruchung (ANKRD2) und in der Erholungsphase nach Hungern (DARP)¹⁴¹. Eine direkte Bindung von CARP an DNA wurde bisher nicht beschrieben, aber es wurde postuliert, daß CARP als Co-Repressor im Zusammenspiel mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren agiert und damit die Expression kardialer Gene unterdrückt¹⁴². Zusätzlich zu dieser Funktion ist das Protein für den strukturellen Erhalt des Sarkomers verantwortlich¹⁴³, interagiert mit Titin-Filament-basierten Streß-Antwort Komplexen¹⁴¹ und wird mit Arteriogenese assoziiert¹⁴⁴. In verschiedenen Tiermodellen kardiomyopathischer Erkrankungen¹⁴⁵ und bei Patienten

mit Herzkrankheiten wurde CARP induziert gefunden¹⁴⁶. *In vitro* Studien mit neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, die eine Reduktion der CARP- als auch BNP Expression in Folge von einer Doxorubicin-Behandlung zeigen¹⁴⁷, scheinen nicht auf die *in vivo* Situation übertragbar zu sein.

Matrix gamma carboxyglutamate (gla) protein (MGLAP oder MGP) ist ein Protein der extrazellulären Matrix und wird mit erhöhter Expression in atherosklerotischen Plaques gefunden¹⁴⁸. Es wird angenommen daß es dort möglicherweise als Inhibitor eine weitere Verkalkung zu limitiert. Defizienz von MGLAP in Mäusen oder dem Menschen führt zu schwerer Gefäßverkalkung und Störungen in der vaskulären Differenzierung^{149,150}. Es interagiert mit dem *bone morphogenetic protein* (BMP2), einem die Verkalkung fördernden Faktor, und in Abhängigkeit der relativen Konzentrationen der beiden Proteine wirkt MGLAP inhibierend oder verstärkend¹⁵¹.

Microfibrillar-associated protein 5 (MFAP5 oder *microfibril-associated glycoprotein 2* (MGP2)) ist ein Protein der extrazellulären Matrix und interagiert mit Fibrillinen und Fibrillin-enhaltenden Mikrofibrillen¹⁵². Möglicherweise wirkt es zudem über eine Interaktion mit *jagged 1*, einem DSL (Delta/Serrate/LAG2) Protein, über den Notch-Rezeptor auf die Zell-Differenzierung ein¹⁵³.

Thrombospondin 4 (THBS4) gehört zur Proteinfamilie der Thrombospondine mit insgesamt fünf Mitgliedern. Thrombospondine sind Kalzium-bindende Glycoproteine der extrazellulären Matrix. Sie unterstützen durch Bindung an Zell-Adhäsionsrezeptoren und Moleküle der extrazellulären Matrix die Zell-Zell-Kontakte, wodurch sie an Prozessen wie Adhäsion, Regulation der Zellform, Migration, Angiogenese und Wundheilung beteiligt sind¹⁵⁴. Einzelnukleotidpolymorphismen in THBS4 zeigen eine hohe Assoziation mit Erkrankungen der Koronarien¹⁵⁵ und Herzinfarkt¹⁵⁶. Zudem wurde THBS4 in Kardiomyopathien neben anderen Genen der extrazellulären Matrix in Genexpressionsstudien überexprimiert gefunden¹⁵⁷.

Die Induktion von Genen des fötalen Genprogramms (NPPB, NPPA und ACTA1), der extrazellulären Matrix (MGLAP, THBS4, MFAP5) und mehrerer zytoplasmatischer Gene erfolgte weitgehend unabhängig von der Inaktivierung des jeweiligen Gens bzw. der Doxorubicin-Behandlung in allen Mausmodellen. Eine Ausnahme bildete die Plakoglobin *knockout* Maus, bei der nur NPPB als typischer Marker einer Kardiomyopathie induziert wurde. Dieser Unterschied lag vermutlich in dem embryonalen Letalität und der somit nur wenigen zur Verfügung stehenden Zeit zur Entwicklung des Phänotyps bis zur Gewebeentnahme begründet (von ca. E8.0 bis E10.0). Zudem sind in dem ErB2 *knockout* insgesamt nur wenige Gene (35) und diese schwach dereguliert.

Dieser Satz der in wenigstens vier von sechs Mausmodellen induzierten Gene ist *nicht* spezifisch für eine DCM, sondern wird auch in anderen Kardiomyopathien induziert gefunden. So wurde ausnahmslos jedes dieser Gene bei einer Hypertrophie, welche durch Verengung der Aorta in Mäusen herbeigeführt wurde, ebenso induziert (1.3.4, Daten im Detail nicht gezeigt bzw. Siehe Witt et al.⁶³). Dieses Expressionsmuster repräsentiert also eine allgemeine Antwort auf eine übermäßige biomechanische Beanspruchung des Herzens, welche vom Ursprung weitgehend unabhängig ist.

Reduktion von Genen des Metabolismus in MLP knockout Mäusen

Eine größere Anzahl an Genen zeigte zudem eine spezifische Reduktion in der Expression in den MLP-*knockout* Mäusen (siehe Abbildung 23). Zu ihnen zählten insbesondere mitochondrial exprimierte Gene und solche des Metabolismus (siehe Tabelle 6 und Abbildung 24). Fehlfunktionen im respiratorischem System wurden in mehreren Studien mit kardialem Gewebe von der HCM und der DCM beschrieben. Es wurden sowohl Mutationen¹⁵⁸ als auch Veränderungen der enzymatischen Aktivität beobachtet^{159,160}. Auf Ebene des Transkriptoms sind die beobachteten Veränderungen für Gene des Metabolismus und der Atmungskette in den bisher veröffentlichten Studien jedoch widersprüchlich und zeigen keinen einheitlichen Trend¹⁶¹. Hingegen bestätigt die detektierte reduzierte Expression mitochondrialer Gene die Beobachtung von van den Bosch et al., daß in MLP *knockout* Mäusen die Anzahl an Mitochondrien verringert ist und es in Folge dessen zu Energiemangel kommt³¹.

Ein weiteres spezifisch in MLP *knockout* Mäusen in der Expression reduziertes Gen stellt *histidine-rich calcium-binding protein* (HCR) dar. Es bindet Kalzium und entsprechend verschiedener Publikationen lokalisiert es innerhalb des Sarkoplasmatischen Retikulums oder aber an dessen zytoplasmatischer Oberfläche^{162,163}. Sowohl in Tiermodellen für Herzinsuffizienz als auch entsprechenden humanen Gewebeproben wurde HCR reduziert gefunden¹⁶⁴ und eine Überexpression in transgenen Mäusen oder Ratten-Kardiomyozyten führt zu gestörter Kalziumhomöostase¹⁶⁵.

Induktion von Gewebsverletzung in homozygoten Plakoglobin knockout Mäusen

In einem weiteren Mausmodell-spezifischen Cluster gruppierten sich Gene mit einer Induktion der Expression nur bei den Plakoglobin *knockout* Mäusen (siehe Abbildung

25). In dieser Gruppe befanden sich Gene, die eine typische Antwort auf eine Gewebsverletzung mit Invasion von inflammatorischen Zellen und Koagulation von Blutplättchen anzeigen (siehe Tabelle 7 und Abbildung 26). Ein Marker für die Invasion mit Neutrophilen ist die von diesen Zellen exprimierte *myeloperoxidase*. Diese baut nach Muskelverletzung vermehrt entstehende Wasserstoffperoxid ab und kann dabei in Abhängigkeit der biochemischen Umgebung noch reaktivere und zytotoxischere Radikale freisetzen¹⁶⁶. Makrophagen und Neutrophile beseitigen beschädigte Kardiomyozyten und tragen zu einer Regeneration des Gewebes bei¹⁶⁷. In den homozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen ist die strukturelle Integrität durch das Fehlen eines solch wichtigen Zell-Adhäsionsproteins allerdings zu stark geschwächt und die Mäuse sterben in der Regel zwischen E12 und E16 der Entwicklung.

4.4 Genexpressionsmuster der DCM in Mensch und Maus

Eine große Anzahl an Array-Studien wurde mit Gewebe von Patienten mit Kardiomyopathien durchgeführt, allerdings ist die Übereinstimmung in den erhaltenen Genexpressionsmustern jedoch vergleichsweise gering (siehe 1.3.6 und Saoudou et al.¹⁶⁸). Unterschiedliche Faktoren mögen hierfür ursächlich sein. Es wurden unterschiedliche Array-Plattformen und Methoden der Datenauswertung eingesetzt. Häufig wurden nur wenigen Patienten pro Zustand (z.B. DCM) miteinbezogen oder aber unterschiedliche Stadien der Erkrankung untersucht. Erschwerend kommt hinzu, daß für solche Array-Studien eine größere Anzahl an gut charakterisierten gesunden Kontrollen in der Regel kaum verfügbar ist. Im Vergleich zu anderen Erkrankungen (maligne Tumore oder inflammatorische Erkrankungen) ist zudem die Anzahl an stark deregulierten Genen und damit gut detektierbaren Unterschieden bei Kardiomyopathien sehr gering. Es erreichten nur NPPA und NPPB als charakteristische Kardiomyopathiemarker in mehreren Studien Genexpressionsratios >5, trotzdem wurden sie nur in ca. Der Hälfte der publizierten Studien in ihrer Expression induziert gefunden. Außerdem ist die Variabilität der Genexpression im Menschen zwangsläufig deutlich höher als bei Tiermodellen mit Individuen, die einen identischem genetischen Hintergrund aufweisen.

In Folge dessen ergibt sich ein vollständigeres Bild der in der DCM ablaufenden Prozesse nur in einer Zusammenfassung der vielen Array-Studien und die Deregulation von Genen ist dann als valide bzw. charakteristisch anzusehen, wenn

sie in mehreren Studien gefunden wurde (für eine Übersicht siehe Kittleson et al.¹⁶⁹, Barth et al.¹⁷⁰ und Sharma et al.¹⁷¹). Inwieweit solche deregulierten Gene prognostischen Wert zur Klassifikation unterschiedlicher Kardiomyopathien besitzen, bleibt anhand der wenigen verfügbaren vergleichenden Studien und deren Inkonsistenz jedoch offen^{70,172,173}. Einen erheblichen Einfluß auf die Genexpression hat zudem die Medikation des Kardiomyopathie Patienten. Es wurde z.B. gezeigt, daß der Einsatz von Beta-Blockern die Aktivierung des fötalen Genprogramms erheblichen reduziert¹⁷⁴.

Für die DCM wurden insbesondere für Gene des Zytoskeletts/Sarkomers, der extrazellulären Matrix, des Metabolismus und der Immunantwort eine veränderte Expression beschrieben (1.3.6). Bei der Genexpressionanalyse von zwölf DCM Patienten und elf gesunden Spendern wurden entsprechend Gene dieser funktionellen Gruppen dereguliert gefunden (3.2.1). Hierunter befanden sich typische Kardiomyopathiemarker und eine auffallend große Anzahl an Genen der Immunantwort. Inflammatorische Prozessen sind typisch für eine fortgeschrittene DCM; möglicherweise deutet dies aber auch auf eine Beteiligung von Infektionen hin¹¹⁹.

In Kapitel 3.2.2 wurden durch Clustering die übereinstimmenden als auch spezifischen Expressionsmuster der sechs untersuchten Mausmodelle identifiziert. Die MLP- und ErbB4 *knockout* Mäuse, die Doxorubicin-behandelten Mäuse und die Doxorubicin-behandelten ErbB4 *knockout* Mäuse zeigten die Aktivierung einer großen Anzahl an charakteristischen Kardiomyopathiemarkern (z.B. Nppa, Nppb, Acta1 und Ctgf; siehe Abbildung 19 und 21). Im Gegensatz zur humanen Situation wurden allerdings in den Doxorubicin behandelten Mäusen als auch teilweise in den ErbB4 *knockout* Mäusen eine größere Anzahl an Streß- und Apoptose-assoziierten Gene aktiviert. Die umfangreiche Induktion von einer Vielzahl an Genen des Zytoskeletts/Sarkomers und der extrazellulären Matrix, wie sie für die Remodellierung des kardialen Gewebes in der DCM charakteristisch ist, wurde jedoch nur in den MLP *knockout* Mäusen gefunden (siehe Tabelle 5 und Abbildung 21). Tabelle 10 gibt eine Übersicht über eine Auswahl an konsistent deregulierten Genen in Expressionstudien der humanen DCM im Vergleich zu den sechs untersuchten Mausmodellen. Sowohl auf Ebene der beteiligten Prozesse als auch auf Ebene einzelner Gene wurden die größten Übereinstimmungen bei den MLP *knockout* Mäusen gefunden.

In Folge dessen ist in der Beurteilung der Ähnlichkeit der unterschiedlichen untersuchten Mausmodelle mit der humanen Situation anhand der Genexpressionsmuster der MLP *knockout* als für die DCM am geeignetsten

anzusehen. Zudem führen Mutationen in dem MLP Gen auch im Menschen zu einer DCM³⁵. Dieses deutet neben der Ähnlichkeit der beobachteten Genexpressionsmuster auf eine vergleichbare Pathogenese im Menschen und der Maus hin.

Tabelle 10: Auswahl an deregulierten Genen bei humanen DCM Studien im Vergleich zu den sechs Mausmodellen. n.d.: nicht dereguliert; "Zahl": Ratio der Genexpression in eigener Studie (FPR<10%); +: Induktion der Expression in humanen Studie(n) Dritter (Array oder quantitative RT-PCR); EZM: extrzelluläre Matrix; *: quantitative RT-PCR Messung

Gen	Plako	ErbB2	MLP	ErbB4	Doxo	ErbB4 doxo	human	Studie
Signalübertr.								
NPPA	n.d.	n.d.	57,3	5,9	n.d.	2,9	11,0	Barrans ⁷² , Barth ¹⁷⁰ , Tan ⁷¹
NPPB	1,8	2,6	7,9	6,1	8,3	6,3	4,7	Tan ⁷¹ , Barth ¹⁷⁰ , Kittleson ⁷⁵
Sarkomer								
ACTA1	n.d.	n.d.	3,4	2,7	n.d.	1,7	+	Steenman ⁶⁹ , Grzeskowiak ⁷⁷
FHL1	n.d.	n.d.	7,1	3,3	n.d.	1,5	2,1	Grzeskowiak ⁷⁷ , Barrans ⁷²
CARP	n.d.	n.d.	6,6	6,1	2,0	2,4	+	Nagueh ¹⁴⁶ , Zolk ¹⁷⁵
EZM								
LUM	n.d.	n.d.	2,8	2,8	n.d.	n.d.	2,5	Hwang ⁷⁰ , Boheler ⁷⁶ , Tan ⁷¹
TGFβ1	n.d.	n.d.	3,4	n.d.	n.d.	n.d.	+	Shigeyama ¹⁷⁶
CTGF	n.d.	n.d.	1,5	n.d.	n.d.	n.d.	+	Tan ⁷¹ , Barth ¹⁷⁰
PCOLCE	n.d.	n.d.	1,9	n.d.	n.d.	n.d.	+	Barth ¹⁷⁰ , Kittleson ⁷⁵ , NHLBI ¹⁷⁷¹⁷⁵
OSF2	n.d.	n.d.	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	+	Kittleson ⁷⁵ , Tan ⁷¹ , Barrans ⁷²
THBS4	n.d.	n.d.	2,4	2,4	1,5	n.d.	+	Tan ⁷¹
Metabolismus								
APOD	n.d.	n.d.	2,5	2,5	n.d.	n.d.	1,9	Steenman ⁶⁹
Immunantw.								
CFHR1	n.d.	n.d.	1,5	n.d.	n.d.	n.d.	+	Steenman ⁶⁹ , Barth ¹⁷⁰ , Barrans ⁷²

4.5 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie in heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen

Ausgehend von dem klinischen Befund der ARVC bei Patienten mit einer homozygoten Mutation in dem Gen Plakoglobin (Naxos Erkrankung) wurde eine phänotypische Charakterisierung der heterozygoten Plakoglobin *knockout* Maus durchgeführt. Diesem Herangehen lag die Hypothese zu Grunde, daß eine reduzierte Menge an Plakoglobin-Transkript bzw. Protein in der Maus zu ähnlichen Effekten wie

das in der Länge verkürzte, aber teilweise noch funktionelle humane Transkript führen könnte. Mittels quantitativer RT-PCR konnte eine um 40-50% reduzierte Menge an Plakoglobin-Transkript in heterozygoten *knockout* Mäusen gemessen werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Paulus Kirchhof (Universitätsklinikum Münster) erfolgte eine Untersuchung der Herzfunktion bei Mäusen unterschiedlicher Altersstufen (3, 6 und 10 Monate) und bei trainierten 6 Monate alten Tieren (zur Erhöhung der biomechanischen Belastung des Herzens). Es zeigte sich bei den 10 Monate alten heterozygoten *knockout* Mäusen und bei den 6 Monate alten trainierten *knockout* Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein vergrößerter rechter Ventrikel mit eingeschränkter Pumpleistung (3.3.1). Zudem traten bei explantierten Herzen dieser Tiere signifikant mehr Tachykardien auf (siehe Abbildung 27).

Zur Analyse des kardialen Phänotyps auf transkriptioneller Ebene wurden Genexpressionsprofile mit den rechten Ventrikeln von je vier trainierten heterozygoten *knockout*- und Wildtyp-Mäusen (6 Monate alt) sowie zwei untrainierten Mäusen (heterozygoter *knockout* und Wildtyp) durchgeführt. Das Training der Mäuse induzierte auf Transkriptionsebene eine deutlich detektierbare Hypertrophie-Antwort. *Nppa* wurde verstärkt exprimiert und die reduzierte Expression von *pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4* und *PPAR γ , coactivator 1 alpha* deutete auf eine charakteristische verstärkte Nutzung von Glukose an Stelle von Fettsäuren als Energiequelle hin (siehe Abbildung 28). Zwischen den trainierten heterozygoten *knockout* Mäusen und Wildtyp-Mäusen waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Allein bei paarweiser Betrachtung der 4x2 Geschwister-Mäuse (je Wildtyp und *knockout*) ergab sich in der SAM ein schwacher Trend (FPR 16% und größer) bei relativ kleinen Ratios der Genexpression (2,5 und kleiner) bei einer Gruppe von Genen. Mehrere dieser Gene deuteten auf eine pathologischere Form der Hypertrophie (*myocyte enhancer factor 2C*¹⁷⁶) und einen stärkeren Umbau des Zytoskeletts (z.B. *WD repeat domain 1*) bei den trainierten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen hin, aber eine Deregulation konnte durch quantitative RT-PCR nicht validiert werden. Zudem wurden zusätzlich zu dem Mikroarray-Experiment die Expression publizierter Kandidatengene für ARVC durch quantitative RT-PCR untersucht, welche jedoch nicht dereguliert waren (*connexin 43*^{177,178}, *sodium channel protein type V, alpha subunit 3*^{179,180}). Durch den heterozygoten *knockout* von Plakoglobin kommt es zu einer reduzierten Menge an Transkript und Protein im Vergleich zum Wildtyp¹⁸¹, wodurch potentiell der Wnt/ β -catenin-Signaltransduktionsweg beeinflusst werden könnte. Garcia-Gras et al. Beschrieben, daß eine Inaktivierung des desmosomalen Gens *desmoplakin in vitro*

und *in vivo* zu einem Verlust von Desmosomen und zu einer stärkeren nukleären Lokalisation von Plakoglobin führt¹⁸². In Folge dessen war die Tcf/Lef1 vermittelte Regulation der Genexpression in dem Wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg zweifach reduziert (gezeigt für *c-myc* und *cyclin D1*). Cyclin D1 als Zielgen war jedoch weder in den homozygoten noch in den heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen dereguliert (Mikroarray und quantitative RT-PCR).

Im Gegensatz zu Patienten, die an der Naxos Erkrankung leiden, wurde kein nennenswerter Ersatz von Myokard durch Fett- oder fibrotisches Gewebe festgestellt^{16, 17} (siehe Abbildung 29). Dementsprechend waren keine Marker für Fibrose und Adipogenese in den heterozygoten *knockout* Mäusen dereguliert. Dies legt den Schluß nahe, daß die Ursache für die ARVC nicht in dem Ersatz von Myokard durch Fettgewebe oder fibrotisches Gewebe liegt.

Veränderungen in den Zell-Zell-Adhäsionskomplexen können eine weitere mögliche Ursache für den Phänotyp darstellen¹⁸³. Daher wurde die Ultrastruktur des Myokards von heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht. Im Gegensatz zu dem homozygoten *knockout* waren jedoch Desmosomen und *adherens junctions* vorhanden (siehe Abbildung 29). Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Tieren und Schnitten und der auftretenden Mischformen beider Adhäsionskomplexe in adulten Tieren¹⁸⁴, wurden keine Abmessungen dieser Komplexe verglichen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mausmodelle kardiomyopathischer Erkrankungen im Vergleich zum Menschen auf transkriptioneller Ebene charakterisiert.

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen von humanen Gewebeproben wurde ein kardialer Themenarray entwickelt. In einem ersten Schritt wurden Protokolle für Expressionanalysen bei geringen RNA-Startmengen und Protokolle zur Herstellung von Mikroarrays validiert bzw. optimiert. Anschließend wurden durch ein Screening mit Geweben unterschiedlicher Herzphänotypen aus einer 75.000 Klone umfassenden cDNA-Bank kardial exprimierte Gene identifiziert und für den kardialen Themenarray zusammengestellt. Mit diesem Array-Format wurden die Genexpressionsanalysen humaner DCM-Gewebe im Vergleich zu gesunden Spendern durchgeführt.

Es wurden vier genetische Mausmodelle (MLP-, Plakoglobin-, ErbB2 und ErbB4 *knockout*) gewählt, bei denen die inaktivierten Gene sehr unterschiedliche zelluläre Funktionen erfüllen, aber der resultierende Phänotyp der Dilatation des Myokards vergleichsweise ähnlich ist. Zudem wurde eine chemisch induzierte Kardiomyopathie (Doxorubicin) und die Kombination aus chemischer Induktion und ErbB4 *knockout* untersucht. Es konnte durch Clustering der generierten Array-Daten sowohl unspezifische als auch für das jeweilige Modell spezifische Genexpressionsmuster identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Zu den unspezifisch deregulierten Genen zählten charakteristische Kardiomyopathie-Markergene. Bei einer Auswahl an Mausmodell spezifischen Clustern von Genen konnte ihre Deregulation mit dem beobachteten Phänotyp verknüpft werden (z.B. Aktivierung von Leukozyten bei Gewebsverletzung bei Plakoglobin *knockout* Mäusen oder Apoptose bei Doxorubicin-Behandlung).

Die Expressionsmuster der sechs Mausmodelle wurden mit humanen Expressionsmustern in der DCM (eigene und publizierte Studien) verglichen. Die größte Übereinstimmung ergab sich bei den MLP *knockout* Mäusen (Induktion von Genen der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts und von Kardiomyopathie-Markern).

Zudem konnte in einer detaillierten phänotypischen Analyse eine Dilatation des rechten Ventrikels und ARVC bei heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen nachgewiesen werden. Dieser Phänotyp entwickelte sich ohne detektierbare Veränderungen der Genexpression und der Zell-Adhäsionskomplexe.

Summary

This study aimed at the characterization of cardiomyopathy mouse models in comparison to humans at the transcript level. To perform gene expression profiling of human samples a cardiac specific array format was developed. Protocols allowing the usage of small amounts of RNA, and the production of sensitive microarrays were established. Cardiovascular tissues derived from patients with different cardiovascular diseases were used to screen a library with 75.000 cDNA clones for expression. The identified clones were rearranged and spotted onto microarrays. These microarrays were used to perform gene expression profiling with samples of dilated cardiomyopathy patients.

Four genetic mouse models (MLP-, plakoglobin-, erbB2- and erbB4 *knockout*) were selected on the basis of the different functions of the genes but these mice developed a similar cardiovascular phenotype (dilation). In addition, a chemically induced cardiomyopathy (doxorubicin) and the combination of chemical induction and erbB4 *knockout* was investigated. The gene expression data of these six mouse lines were clustered and common as well as model specific groups of deregulated genes were identified and functionally annotated. Typical cardiomyopathy marker genes were induced in almost all models. Several specific expression patterns were correlated with the observed phenotype (i.e. the activation of leukocytes in the injured tissue of plakoglobin *knockout* mice and apoptosis in doxorubicin treated mice).

The expression pattern of the six mouse lines were compared with human expression patterns of dilated cardiomyopathy (own data as well as published studies). The highest level of similarity was observed for the MLP *knockout* mice (induction of genes of the extracellular matrix and sarcomer and cardiomyopathy marker).

Furthermore a detailed phenotypical analysis of the heterozygote plakoglobin *knockout* mice revealed a rightventricular dilation and arrhythmogenic rightventricular cardiomyopathy. No alterations at transcript level or cell adhesion complexes were observed.

6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Daten zur Charakterisierung von Mausmodellen auf transkriptioneller Ebene eröffnen einen globalen Einblick in die genomweit ablaufenden Prozesse in der Pathogenese einer Kardiomyopathie und erlauben einen Vergleich zum humanen Krankheitsbild. Bei einem solchen Ansatz spiegelt das erhaltene Expressionsmuster die einzelnen Aspekte der Pathogenese der Kardiomyopathie wider (z.B. Fibrose, Apoptose oder Gewebsverletzung), verbleibt aber zwangsläufig auf einer deskriptiven Ebene dieser weitestgehend irreversibel verlaufenden Prozesse in der DCM.

Zur Zeit verfügbare Medikamente kardiovaskulärer Erkrankungen wie z.B. Beta-Blocker senken zwar effektiv den Blutdruck und behandeln somit die Symptome, aber pathologische Veränderungen wie in der DCM oder ARVC können mit ihnen nicht therapiert werden. Somit wird das Fortschreiten der Erkrankung nur verlangsamt und für viele Patienten bleibt eine Herz-Transplantation der einzige Ausweg. In den letzten Jahren hat sich daher ein Schwerpunkt der kardiovaskulären Forschung mit der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Gesundung des Herzens gebildet. Hierzu zählen z.B. der Ersatz von verlorengangenen Myokard durch Zufuhr externer (Stamm-) Zellen¹⁸⁵, Gewebeimplantate ("*tissue engineering*")¹⁸⁶ oder aber die Aktivierung des Zellzyklus der Kardiomyozyten¹⁸⁷. Bereits weit fortgeschritten und in klinischen Testphasen befindlich ist die Stammzell-Therapie, bei der direkt in das Herz oder in den Blutstrom entsprechende Zellen injiziert werden. Die Ergebnisse sowohl tierexperimenteller Arbeiten als auch der bisher publizierten klinischen Studien sind wissenschaftlich und auch ethisch umstritten¹⁸⁸. Insbesondere die Differenzierung von Stammzellen in funktionelle Kardiomyozyten im Myokard konnte bisher nur unzureichend gezeigt werden. Verbesserungen in der Herzfunktion bei einer solchen Therapie werden häufig auf positive Effekte auf die Angiogenese durch Zytokine zurückgeführt, nicht aber auf die theoretisch stattfindende Bildung neuen Myokards^{189,190}.

Interessanterweise gibt es jedoch Organismen, die zu kardialer Regeneration und damit dem Ersatz von verlorengangenen Myokard in der Lage sind. Im Laufe der Evolution ist diese Eigenschaft verlorengegangen und der Lurch stellt die evolutionär jüngste Spezies dar, welche zu solchen Prozessen noch in der Lage ist. Ein Verlust an Myokard durch Apoptose von Kardiomyozyten führt in höheren Organismen (z.B. dem Menschen) zu Hypertrophie der noch verbliebenen Kardiomyozyten und Fibrose. Im Lurch hingegen beginnen die noch vorhandenen Kardiomyozyten zu

dedifferenzieren und anschließend zu proliferieren. Zur Untersuchung dieses Vorganges wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Braun (Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung) Genexpressionsprofile mit dem sich in Regeneration befindlichen Gewebe durchgeführt. Hierzu wurde eine cDNA-Bank mit 100.000 Klonen vom Tag 14 der Regeneration hergestellt, die als Basis für die Mikroarray-Herstellung diente (50.000 Klone je Array). Es wurden unterschiedliche Gewebe (Herz, Fuß und Schwanz) zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zu scheinoperierten Tieren untersucht (siehe Abbildung 30).

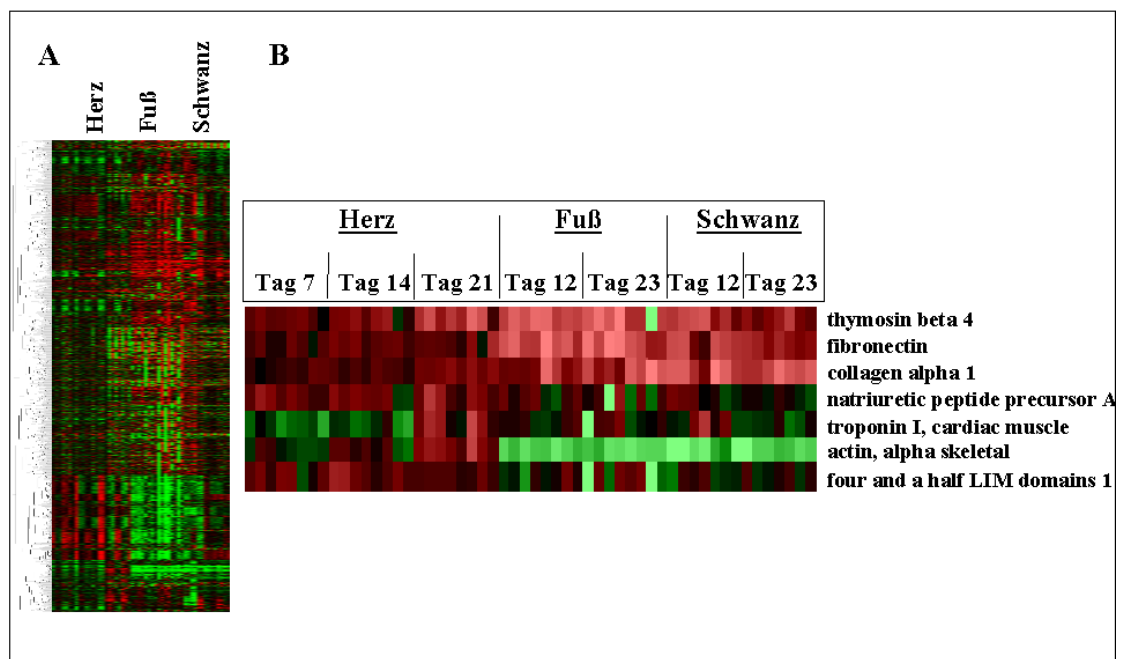


Abbildung 30: Genexpressionsprofil der kardialen Regeneration des Lurchs. Es wurden Genexpressionsprofile unterschiedlicher Gewebe des Lurchs (Herz, Fuß und Schwanz) zu verschiedenen Zeitpunkten des Regenerationsvorganges durchgeführt (je Gewebe und Zeitpunkt vier biologische Replika mit je zwei technischen Replika). Unabhängig vom Gewebe zeigte mit ca. 10% der insgesamt 50.000 Klone des cDNA-Mikrorrays eine sehr hohe Anzahl der Gene signifikante Deregulation. Gruppen von Genen wurden gewebspezifisch dereguliert oder aber in allen drei untersuchten Geweben (A, hierarchisches Clustering aller 50.000 Klone). Spätestens am Tag 21 wurden von höheren Organismen bekannte Markergene für Kardiomyopathien induziert gefunden. Zudem wurden mehrere Gene (z.B. Thymosin beta 4), denen eine kardioprotektive Rolle zugeschrieben wird, aktiviert (B).

Im Herzen zeigte sich spätestens am Tag 21 nach Schädigung eine Aktivierung charakteristischer Kardiomyopathie-Markergene und zusätzlich eine Vielzahl an Genen, die potentiell in dem Prozess der Regeneration eine Rolle spielen könnten.

Hierzu zählte Thymosin beta 4. Es wurde unspezifisch in allen Geweben und zu allen Zeitpunkten signifikant induziert gefunden. In tierexperimentellen Studien konnten Bock-Marquette et al. nachweisen, daß Injektion des Proteins eine stark kardioprotektive und potentiell regenerative Wirkung bei Herzinfarkt erzielt^{191,192}.

7 Referenzen

¹ Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996; 93(5): 841-2.

² Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC Jr, Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006; 113(6): e85-151.

³ Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*. 1989;80(3): 564-72.

⁴ The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study. Sugrue DD, Rodeheffer RJ, Codd MB, Ballard DJ, Fuster V, Gersh BJ. *Ann Intern Med*. 1992 Jul 15;117(2):117-23.

⁵ Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005; 6: 185-216.

⁶ Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005; 111(7): 887-93.

⁷ Kärkkäinen S, Peuhkurinen K. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med*. 2007; 39(2): 91-107.

⁸ Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002; 287(10): 1308-20.

⁹ Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005; 6: 185-216.

¹⁰ Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M; EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003 May 6; 107(17): 2227-32.

¹¹ Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2001) Identification of mutations in cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD 2). *Human Mol Genet* 10(3):189–194

¹² Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11):1162-4.

¹³ Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 2006;113(9):1171-9.

¹⁴ Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA (2002) Mutation in human

desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 71:1200–1206

¹⁵ EE Norgett, SJ Hatsell, L Carvajal-Huerta, JC Ruiz Cabezas, J Common, PE Purkis, N Whittock, IM Leigh, HP Stevens and DP Kelsell, Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 9 (2000), pp. 2761–2766

¹⁶ McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*. 2000; 355(9221):2119-24.

¹⁷ Stuhmann M, Bukhari IA, El-Harith el-HA. Naxos disease in an Arab family is not caused by the Pk2157del2 mutation. Evidence for exclusion of the plakoglobin gene. *Saudi Med J*. 2004; 25(10): 1449-52.

¹⁸ Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, Behrend M, Grund C, Thalhammer C, Vogel F, Birchmeier C, Gunthert U, Franke WW, Birchmeier W. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol*. 1996 Oct; 135(1): 215-25.

¹⁹ Bierkamp C, Mclaughlin KJ, Schwarz H, Huber O, Kemler R. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Dev Biol*. 1996 15; 180(2): 780-5.

²⁰ Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Spiliopoulou C, Anastasakis A, Squarcioni CP, McKenna WJ, Thiene G, Basso C, Brousse N, Fontaine G, Saffitz JE. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm*. 2004 May;1(1):3-11

²¹ Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004; 303(5663): 1483-7.

- ²² Sadot E, Simcha I, Iwai K, Ciechanover A, Geiger B, Ben-Ze'ev A. Differential interaction of plakoglobin and beta-catenin with the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene*. 2000; 19(16): 1992-2001.
- ²³ Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*. 2000; 113 (Pt 18):3127-39.
- ²⁴ Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(12): 4238-52.
- ²⁵ Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell*. 1998; 95(5): 605-14.
- ²⁶ Charpentier E, Lavker RM, Acquista E, Cowin P. Plakoglobin suppresses epithelial proliferation and hair growth in vivo. *J Cell Biol*. 2000; 149(2): 503-20.
- ²⁷ Arber S, Halder G, Caroni P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell*. 1994; 79(2): 221-31.
- ²⁸ Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*. 1997 Feb 7; 88(3): 393-403.
- ²⁹ Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*. 1997; 88(3): 393-403.
- ³⁰ Lorenzen-Schmidt I, Stuyvers BD, ter Keurs HE, Date MO, Hoshijima M, Chien KR, McCulloch AD, Omens JH. Young MLP deficient mice show diastolic dysfunction before the onset of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39(2): 241-50.

- ³¹ van den Bosch BJ, van den Burg CM, Schoonderwoerd K, Lindsey PJ, Scholte HR, de Coo RF, van Rooij E, Rockman HA, Doevendans PA, Smeets HJ. Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovasc Res* 2005; 65(2): 411-8.
- ³² Ehler E, Horowitz R, Zuppinger C, Price RL, Perriard E, Leu M, Caroni P, Sussman M, Eppenberger HM, Perriard JC. Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J Cell Biol.* 2001; 153(4): 763-72.
- ³³ Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J Jr, Kranias EG, Giles WR, Chien KR. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell.* 1999; 99(3): 313-22.
- ³⁴ Song Q, Schmidt AG, Hahn HS, Carr AN, Frank B, Pater L, Gerst M, Young K, Hoit BD, McConnell BK, Haghighi K, Seidman CE, Seidman JG, Dorn GW 2nd, Kranias EG. Rescue of cardiomyocyte dysfunction by phospholamban ablation does not prevent ventricular failure in genetic hypertrophy. *J Clin Invest.* 2003; 111(6): 859-67.
- ³⁵ Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR. Cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 2002; 111(7): 943-55.
- ³⁶ Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001; 344(11): 783-92.
- ³⁷ Baselga J. Current and planned clinical trials with trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol.* 2000; 27(5 Suppl 9): 27-32.
- ³⁸ Sparano JA. Cardiac toxicity of trastuzumab (Herceptin): implications for the design of adjuvant trials. *Semin Oncol.* 2001; 28 (1 Suppl 3):20-7.

- ³⁹ Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring F, Brinkmann V, Birchmeier C, Riethmacher D. The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev.* 1998; 12(12): 1825-36.
- ⁴⁰ Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development.* 1997; 124(24): 4999-5011.
- ⁴¹ Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature.* 1995; 378(6555): 390-4.
- ⁴² Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hubner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(13): 8880-5.
- ⁴³ Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, Peterson KL, Chen J, Kahn R, Condorelli G, Ross J Jr, Chien KR, Lee KF. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med.* 2002; 8(5): 459-65.
- ⁴⁴ Garcia-Rivello H, Taranda J, Said M, Cabeza-Meckert P, Vila-Petroff M, Scaglione J, Ghio S, Chen J, Lai C, Laguens RP, Lloyd KC, Hertig CM. Dilated cardiomyopathy in Erb-b4-deficient ventricular muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(3): H1153-60.
- ⁴⁵ Garratt AN, Ozcelik C, Birchmeier C. ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(2): 80-6.
- ⁴⁶ Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med.* 1996; 125(1): 47-58.

- ⁴⁷ Bristow MR, Billingham ME, Mason JW, Daniels JR. Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep.* 1978; 62(6): 873-9.
- ⁴⁸ Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem.* 1990; 35(2-3): 247-57.
- ⁴⁹ Doroshow JH. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res.* 1983; 43(10): 4543-51.
- ⁵⁰ Liu X, Chen Z, Chua CC, Ma YS, Youngberg GA, Hamdy R, Chua BH. Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283(1): H254-63.
- ⁵¹ Zien A, Fluck J, Zimmer R, Lengauer T. Microarrays: how many do you need? *J Comput Biol.* 2003;10(3-4): 653-67.
- ⁵² Dobbin K, Simon R. Sample size determination in microarray experiments for class comparison and prognostic classification. *Biostatistics.* 2005; 6(1): 27-38.
- ⁵³ Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(9): 5116-21.
- ⁵⁴ Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 2000;11(12): 4241-57.
- ⁵⁵ Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature.* 2000; 406(6795): 536-40.

⁵⁶ Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgeirsson SS. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology*. 2004; 40(3): 667-76.

⁵⁷ Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. Molecular Characterization of New Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\{\gamma\}$ Modulators With Angiotensin Receptor Blocking Activity. *Diabetes*. 2005; 54(12): 3442-52.

⁵⁸ Jain AK, Dubes RC. Algorithms for clustering data. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1988

⁵⁹ Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Mar 16; 96(6): 2907-12.

⁶⁰ Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology* 2003; 4(5): P3.

⁶¹ Douglas A Hosack, Glynn Dennis Jr, Brad T Sherman, HClifford Lane, Richard A Lempicki. Identifying Biological Themes within Lists of Genes with EASE. *Genome Biology* 2003 4(6):P4.

⁶² Gene Ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium (2000) *Nature Genet*. 25: 25-2

⁶³ Witt H, Schubert C, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A, Tiemann K, Stypmann J, Roepcke S, Brokat S, Mahmoodzadeh S, Brozova E, Davidson MM, Ruiz Noppinger P, Grohé C, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med*. 2008; 86(9): 1013-24.

- ⁶⁴ Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, Thorgeirsson SS. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet.* 2004; 36(12): 1306-11.
- ⁶⁵ Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgeirsson SS. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology.* 2004; 40(3): 667-76.
- ⁶⁶ Gao Z, Xu H, DiSilvestre D, Halperin VL, Tunin R, Tian Y, Yu W, Winslow RL, Tomaselli GF. Transcriptomic profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 40(1): 76-86.
- ⁶⁷ Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy PM, Bond M. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation.* 2000;102(25): 3046-52.
- ⁶⁸ Kaab S, Barth AS, Margerie D, Dugas M, Gebauer M, Zwermann L, Merk S, Pfeufer A, Steinmeyer K, Bleich M, Kreuzer E, Steinbeck G, Nabauer M. Global gene expression in human myocardium-oligonucleotide microarray analysis of regional diversity and transcriptional regulation in heart failure. *J Mol Med.* 2004; 82(5): 308-16.
- ⁶⁹ Steenman M, Chen YW, Le Cunff M, Lamirault G, Varro A, Hoffman E, Leger JJ. Transcriptomal analysis of failing and nonfailing human hearts. *Physiol Genomics.* 2003;12(2): 97-112.
- ⁷⁰ Hwang JJ, Allen PD, Tseng GC, Lam CW, Fananapazir L, Dzau VJ, Liew CC. Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure. *Physiol Genomics.* 2002; 10(1): 31-44.
- ⁷¹ Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB, Bond M. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(17):11387-92.

⁷² Barrans JD, Allen PD, Stamatiou D, Dzau VJ, Liew CC. Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol.* 2002;160(6): 2035-43.

⁷³ Barrans JD, Stamatiou D, Liew C. Construction of a human cardiovascular cDNA microarray: portrait of the failing heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280(4): 964-9.

⁷⁴ Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Cunff M, Escande D, Leger JJ. Distinct molecular portraits of human failing hearts identified by dedicated cDNA microarrays. *Eur J Heart Fail.* 2005; 7(2): 157-65.

⁷⁵ Kittleson MM, Ye SQ, Irizarry RA, Minhas KM, Edness G, Conte JV, Parmigiani G, Miller LW, Chen Y, Hall JL, Garcia JG, Hare JM. Identification of a gene expression profile that differentiates between ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2004; 110(22): 3444-51.

⁷⁶ Boheler KR, Volkova M, Morrell C, Garg R, Zhu Y, Margulies K, Seymour AM, Lakatta EG. Sex- and age-dependent human transcriptome variability: implications for chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(5): 2754-9.

⁷⁷ Grzeskowiak R, Witt H, Drungowski M, Thermann R, Hennig S, Perrot A, Osterziel KJ, Klingbiel D, Scheid S, Spang R, Lehrach H, Ruiz P. Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2003; 59(2): 400-11.

⁷⁸ Wittchen F, Suckau L, Witt H, Kühl U, Skurk C, Fechner H, Lassner D, Ungethüm U, Pauschinger M, Tschoepe C, Rauch U, Ruiz P, Schultheiss HP, Poller W. Genomic Expression Profiling of Human Inflammatory Cardiomyopathy (DCMi) Suggests Novel Therapeutic Targets. *Journal of Molecular Medicine. J Mol Med.* 2007; 85(3): 257-71.

⁷⁹ Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol.* 2005; 94: 488-509.

- ⁸⁰ Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(6): e56.
- ⁸¹ Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci G, Kornacker K. Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nat Genet.* 2003; 35(4): 292-3.
- ⁸² Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(25): 14863-8.
- ⁸³ Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 2001; 29(4): 365-71.
- ⁸⁴ Steve Rozen and Helen J. Skaletsky. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ (2000); pp 365-386
- ⁸⁵ Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8.
- ⁸⁶ Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(14): e73.
- ⁸⁷ Wadenback J, Clapham DH, Craig D, Sederoff R, Peter GF, von Arnold S, Egertsdotter U. Comparison of standard exponential and linear techniques to amplify small cDNA samples for microarrays. *BMC Genomics.* 2005; 6(1): 61.

- ⁸⁸ Patel OV, Suchyta SP, Sipkovsky SS, Yao J, Ireland JJ, Coussens PM, Smith GW. Validation and application of a high fidelity mRNA linear amplification procedure for profiling gene expression. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 105(3-4): 331-42.
- ⁸⁹ King C, Guo N, Frampton GM, Gerry NP, Lenburg ME, Rosenberg CL. Reliability and reproducibility of gene expression measurements using amplified RNA from laser-microdissected primary breast tissue with oligonucleotide arrays. *J Mol Diagn*. 2005 Feb;7(1):57-64.
- ⁹⁰ Cope L, Hartman SM, Gohlmann HW, Tiesman JP, Irizarry RA. Analysis of Affymetrix GeneChip data using amplified RNA. *Biotechniques*. 2006; 40(2): 165-6, 168, 170.
- ⁹¹ Guo L, Lobenhofer EK, Wang C, Shippy R, Harris SC, Zhang L, Mei N, Chen T, Herman D, Goodsaid FM, Hurban P, Phillips KL, Xu J, Deng X, Sun YA, Tong W, Dragan YP & Shi L. Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms. *Nat Biotechnol*. 2006; 24(9): 1162-1169.
- ⁹² Shi L, MAQC Consortium. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol*. 2006; 24(9): 1151-1161
- ⁹³ Kamme F, Salunga R, Yu J, Tran DT, Zhu J, Luo L, Bittner A, Guo HQ, Miller N, Wan J, Erlander M. Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J Neurosci*. 2003; 23(9): 3607-15.
- ⁹⁴ Dufva M. Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Eng*. 2005; 22(5-6): 173-84.
- ⁹⁵ Sobek J, Bartscherer K, Jacob A, Hoheisel JD, Angenendt P. Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2006; 9(5): 365-80.

⁹⁶ Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD. Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(7): E38.

⁹⁷ Diehl F, Beckmann B, Kellner N, Hauser NC, Diehl S, Hoheisel JD. Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(16): e79.

⁹⁸ Park CH, Jeong HJ, Jung JJ, Lee GY, Kim SC, Kim TS, Yang SH, Chung HC, Rha SY. Fabrication of high quality cDNA microarray using a small amount of cDNA. *Int J Mol Med.* 2004; 13(5): 675-9.

⁹⁹ Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, Chua BH. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286(3): H933-9.

¹⁰⁰ Shizukuda Y, Matoba S, Mian OY, Nguyen T, Hwang PM. Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice. *Mol Cell Biochem.* 2005; 273(1-2): 25-32.

¹⁰¹ Golubnitschaja O, Moenkemann H, Trog DB, Blom HJ, De Vriese AS. Activation of genes inducing cell-cycle arrest and of increased DNA repair in the hearts of rats with early streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Med Sci Monit.* 2006; 12(2): BR68-74.

¹⁰² Shizukuda Y, Matoba S, Mian OY, Nguyen T, Hwang PM. Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice. *Mol Cell Biochem.* 2005; 273(1-2): 25-32.

¹⁰³ Guardavaccaro D, Corrente G, Covone F, Micheli L, D'Agnano I, Starace G, Caruso M, Tirone F. Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(5): 1797-815.

- ¹⁰⁴ Cortes U, Moyret-Lalle C, Falette N, Duriez C, Ghissassi FE, Barnas C, Morel AP, Hainaut P, Magaud JP, Puisieux A. BTG gene expression in the p53-dependent and -independent cellular response to DNA damage. *Mol Carcinog.* 2000; 27(2): 57-64.
- ¹⁰⁵ Muller-Tidow C, Ji P, Diederichs S, Potratz J, Baumer N, Kohler G, Cauvet T, Choudary C, van der Meer T, Chan WY, Nieduszynski C, Colledge WH, Carrington M, Koeffler HP, Restle A, Wiesmuller L, Sobczak-Thepot J, Berdel WE, Serve H. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(20): 8917-28.
- ¹⁰⁶ Adachi S, Ito H, Tamamori-Adachi M, Ono Y, Nozato T, Abe S, Ikeda Ma, Marumo F, Hiroe M. Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2001; 88(4): 408-14.
- ¹⁰⁷ Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA. GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol.* 2002; 192(3): 327-38.
- ¹⁰⁸ Zhao H, Jin S, Antinore MJ, Lung FD, Fan F, Blanck P, Roller P, Fornace AJ Jr, Zhan Q. The central region of Gadd45 is required for its interaction with p21/WAF1. *Exp Cell Res.* 2000; 258(1): 92-100.
- ¹⁰⁹ Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333(2): 336-43.
- ¹¹⁰ Liu J, Levens D. Making myc. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 302: 1-32.
- ¹¹¹ Jung-Ching Lin J, Gustafson-Wagner EA, Sinn HW, Choi S, Jaacks SM, Wang DZ, Evans S, Li-Chun Lin J. Structure, Expression, and Function of a Novel Intercalated Disc Protein, Xin. *J Med Sci.* 2005; 25(5): 215-222.
- ¹¹² Lemmens K, Segers VF, Demolder M, De Keulenaer GW. Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem.* 2006; 281(28): 19469-77.

- ¹¹³ Fukazawa R, Miller TA, Kuramochi Y, Frantz S, Kim YD, Marchionni MA, Kelly RA, Sawyer DB. Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35(12): 1473-9.
- ¹¹⁴ Takano H, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I. Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies. *Intern Med.* 2003; 42(6): 465-9
- ¹¹⁵ Baba H, Ishiwata T, Takashi E, Xu G, Asano G. Expression and localization of lumican in the ischemic and reperfused rat heart. *Jpn Circ J.* 2001; 65(5): 445-50.
- ¹¹⁶ Ayada Y, Kusachi S, Murakami T, Hirohata S, Takemoto S, Komatsubara I, Hayashi J, Iwabu A, Ninomiya Y, Tsuji T. Increased expression of biglycan mRNA in pressure-overloaded rat heart. *Clin Exp Hypertens.* 2001; 23(8): 633-43.
- ¹¹⁷ Litvin J, Blagg A, Mu A, Matiwala S, Montgomery M, Berretta R, Houser S, Margulies K. Periostin and periostin-like factor in the human heart: possible therapeutic targets. *Cardiovasc Pathol.* 2006; 15(1): 24-32.
- ¹¹⁸ Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(10): 1805-19.
- ¹¹⁹ Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004; 18(7): 816-27.
- ¹²⁰ Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* 1991; 5: 3037–3046.
- ¹²¹ Marttila M, Hautala N, Paradis P, Toth M, Vuolteenaho O, Nemer M, Ruskoaho H. GATA4 mediates activation of the B-type natriuretic peptide gene expression in response to hemodynamic stress. *Endocrinology.* 2001; 142(11): 4693-700.
- ¹²² Hautala N, Tokola H, Luodonpaa M, Puhakka J, Romppanen H, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Pressure overload increases GATA4 binding activity via endothelin-1.

Circulation. 2001 Feb 6;103(5):730-5.

¹²³ Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 1997; 96(2): 509-16.

¹²⁴ Bettencourt P, Ferreira S, Azevedo A, Ferreira A. Preliminary data on the potential usefulness of B-type natriuretic peptide levels in predicting outcome after hospital discharge in patients with heart failure. *Am J Med*. 2002;113(3): 215-9.

¹²⁵ Yoshimura M, Mizuno Y, Nakayama M, Sakamoto T, Sugiyama S, Kawano H, Soejima H, Hirai N, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. B-type natriuretic peptide as a marker of the effects of enalapril in patients with heart failure. *Am J Med*. 2002 Jun 15;112(9):716-20.

¹²⁶ Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998; 93(2): 215-28.

¹²⁷ Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol*. 1999;19(6): 4355-65.

¹²⁸ Thuerauf DJ, Glembotski CC. Differential effects of protein kinase C, Ras, and Raf-1 kinase on the induction of the cardiac B-type natriuretic peptide gene through a critical promoter-proximal M-CAT element. *J Biol Chem*. 1997; 272(11): 7464-72.

¹²⁹ Dai YS, Cserjesi P, Markham BE, Molkenin JD. The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2002; 277(27): 24390-8.

¹³⁰ Molkenin JD. A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest*. 2003; 111(9): 1275–1277.

- ¹³¹ Ghatpande S, Goswami S, Mascareno E, Siddiqui MA. Signal transduction and transcriptional adaptation in embryonic heart development and during myocardial hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* 1999; 196(1-2): 93-7.
- ¹³² Iizuka M, Abe M, Shiiba K, Sasaki I, Sato Y. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *J Vasc Res.* 2004; 41(4): 334-44.
- ¹³³ Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Perez-Riba M, Estivill X, de la Luna S. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(11): 1681-90.
- ¹³⁴ Harris CD, Ermak G, Davies KJ. Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(21): 2477-86.
- ¹³⁵ Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem.* 1994; 269(20): 14509-17.
- ¹³⁶ Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fassler R, Wehland J, Gertler FB. Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell.* 2000; 101(7): 717-28.
- ¹³⁷ Eigenthaler M, Engelhardt S, Schinke B, Kobsar A, Schmitteckert E, Gambaryan S, Engelhardt CM, Krenn V, Eliava M, Jarchau T, Lohse MJ, Walter U, Hein L. Disruption of cardiac Ena-VASP protein localization in intercalated disks causes dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285(6): H2471-81.
- ¹³⁸ McGrath MJ, Cottle DL, Nguyen MA, Dyson JM, Coghill ID, Robinson PA, Holdsworth M, Cowling BS, Hardeman EC, Mitchell CA, Brown S. Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem.* 2006; 281(11): 7666-83.

- ¹³⁹ Gaussin V, Tomlinson JE, Depre C, Engelhardt S, Antos CL, Takagi G, Hein L, Topper JN, Liggett SB, Olson EN, Lohse MJ, Vatner SF, Vatner DE. Common genomic response in different mouse models of beta-adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation*. 2003; 108(23): 2926-33.
- ¹⁴⁰ Lim DS, Roberts R, Marian AJ. Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38(4): 1175-80.
- ¹⁴¹ Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol*. 2003; 333(5): 951-64.
- ¹⁴² Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Kedes L. A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 1997; 272(36): 22800-8.
- ¹⁴³ Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitas K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC, Labeit S. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol*. 2001; 153(2): 413-27.
- ¹⁴⁴ Boengler K, Pipp F, Fernandez B, Ziegelhoeffer T, Schaper W, Deindl E. Arteriogenesis is associated with an induction of the cardiac ankyrin repeat protein (carp). *Cardiovasc Res*. 2003; 59(3): 573-81.
- ¹⁴⁵ Maeda T, Sepulveda J, Chen HH, Stewart AF. Alpha(1)-adrenergic activation of the cardiac ankyrin repeat protein gene in cardiac myocytes. *Gene*. 2002; 297(1-2): 1-9.
- ¹⁴⁶ Zolk O, Ng LL, O'Brien RJ, Weyand M, Eschenhagen T. Augmented expression of cardiotrophin-1 in failing human hearts is accompanied by diminished glycoprotein 130 receptor protein abundance. *Circulation*. 2002; 106(12): 1442-6.

- ¹⁴⁷ Aihara Y, Kurabayashi M, Tanaka T, Takeda SI, Tomaru K, Sekiguchi KI, Ohyama Y, Nagai R. Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(8): 1401-14.
- ¹⁴⁸ Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 93(6): 2393-402.
- ¹⁴⁹ Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997; 386(6620): 78-81.
- ¹⁵⁰ Meier M, Weng LP, Alexandrakis E, Ruschoff J, Goeckenjan G. Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *Eur Respir J.* 2001; 17(3): 566-9.
- ¹⁵¹ Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem.* 2003; 90(4): 756-65.
- ¹⁵² Hanssen E, Hew FH, Moore E, Gibson MA. MAGP-2 has multiple binding regions on fibrillins and has covalent periodic association with fibrillin-containing microfibrils. *J Biol Chem.* 2004; 279(28): 29185-94.
- ¹⁵³ Nehring LC, Miyamoto A, Hein PW, Weinmaster G, Shipley JM. The extracellular matrix protein MAGP-2 interacts with Jagged1 and induces its shedding from the cell surface. *J Biol Chem.* 2005; 280(21): 20349-55.
- ¹⁵⁴ Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest.* 2001; 107(8): 929-34.
- ¹⁵⁵ Stenina OI, Byzova TV, Adams JC, McCarthy JJ, Topol EJ, Plow EF. Coronary artery disease and the thrombospondin single nucleotide polymorphisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jun;36(6):1013-30.

- ¹⁵⁶ Cui J, Randell E, Renouf J, Sun G, Han FY, Younghusband B, Xie YG. Gender dependent association of thrombospondin-4 A387P polymorphism with myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(11): e183-4.
- ¹⁵⁷ Rysa J, Leskinen H, Ilves M, Ruskoaho H. Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure. *Hypertension.* 2005; 45(5): 927-33.
- ¹⁵⁸ Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ, Perez-Atayde A. Cardiac mitochondrial dysfunction and DNA depletion in children with hypertrophic cardiomyopathy. *J Inherit Metab Dis.* 1997; 20(5): 674-80.
- ¹⁵⁹ Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, Wiegand V. Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 1990; 11(6): 509-16.
- ¹⁶⁰ Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Pierpont ME, Ananthakrishnan R. Impaired mitochondrial function in idiopathic dilated cardiomyopathy: biochemical and molecular analysis. *J Card Fail.* 1995; 1(4): 285-91.
- ¹⁶¹ Sanoudou D, Vafiadaki E, Arvanitis DA, Kranias E, Kontrogianni-Konstantopoulos A. Array lessons from the heart: focus on the genome and transcriptome of cardiomyopathies. *Physiol Genomics.* 2005; 21(2): 131-43.
- ¹⁶² Damiani E, Margreth A. Subcellular fractionation to junctional sarcoplasmic reticulum and biochemical characterization of 170 kDa Ca(2+)- and low-density-lipoprotein-binding protein in rabbit skeletal muscle. *Biochem J.* 1991; 277 (Pt 3): 825-32.
- ¹⁶³ Kim KC, Caswell AH, Talvenheimo JA, Brandt NR. Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry.* 1990; 29(39): 9281-9.

¹⁶⁴ Fan GC, Gregory KN, Zhao W, Park WJ, Kranias EG. Regulation of myocardial function by histidine-rich, calcium-binding protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287(4): H1705-11.

¹⁶⁵ Gregory KN, Ginsburg KS, Bodi I, Hahn H, Marreez YM, Song Q, Padmanabhan PA, Mitton BA, Waggoner JR, Del Monte F, Park WJ, Dorn GW 2nd, Bers DM, Kranias EG. Histidine-rich Ca binding protein: a regulator of sarcoplasmic reticulum calcium sequestration and cardiac function. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 40(5): 653-65.

¹⁶⁶ Winterbourn CC. Myeloperoxidase as an effective inhibitor of hydroxyl radical production. Implications for the oxidative reactions of neutrophils. *J Clin Invest*. 1986 Aug;78(2):545-50.

¹⁶⁷ Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(2): R345-53

¹⁶⁸ Sanoudou D, Vafiadaki E, Arvanitis DA, Kranias E, Kontrogianni-Konstantopoulos A. Array lessons from the heart: focus on the genome and transcriptome of cardiomyopathies. *Physiol Genomics*. 2005; 21(2): 131-43.

¹⁶⁹ Kittleson MM, Hare JM. Molecular signature analysis: using the myocardial transcriptome as a biomarker in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2005; 15(4): 130-8.

¹⁷⁰ Barth AS, Kuner R, Bunes A, Ruschhaupt M, Merk S, Zwermann L, Kääh S, Kreuzer E, Steinbeck G, Mansmann U, Poustka A, Nabauer M, Sültmann H. Identification of a common gene expression signature in dilated cardiomyopathy across independent microarray studies. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(8): 1610-7.

¹⁷¹ Sharma UC, Pokharel S, Evelo CT, Maessen JG. A systematic review of large scale and heterogeneous gene array data in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38(3): 425-32.

¹⁷² Kittleson MM, Minhas KM, Irizarry RA, Ye SQ, Edness G, Breton E, Conte JV, Tomaselli G, Garcia JG, Hare JM. Gene expression analysis of ischemic and

nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure. *Physiol Genomics*. 2005; 21(3): 299-307.

¹⁷³ Kittleson MM, Ye SQ, Irizarry RA, Minhas KM, Edness G, Conte JV, Parmigiani G, Miller LW, Chen Y, Hall JL, Garcia JG, Hare JM. Identification of a gene expression profile that differentiates between ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004; 110(22): 3444-51.

¹⁷⁴ Lowes BD, Zolty R, Minobe WA, Robertson AD, Leach S, Hunter L, Bristow MR. Serial gene expression profiling in the intact human heart. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25(5): 579-88.

¹⁷⁵ NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School. Genomics of cardiovascular development, adaptation, and remodeling. Available at: <http://www.cardiogenomics.org>

¹⁷⁶ Konhilas JP, Widegren U, Allen DL, Paul AC, Cleary A, Leinwand LA. Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289(1): H455-65.

¹⁷⁷ Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res*. 2002; 54(2): 361-79.

¹⁷⁸ Wilhelm M, Kirste W, Kuly S, Amann K, Neuhuber W, Weyand M, Daniel WG, Garlichs C. Atrial distribution of connexin 40 and 43 in patients with intermittent, persistent, and postoperative atrial fibrillation. *Heart Lung Circ*. 2006; 15(1): 30-7.

¹⁷⁹ Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006; 17(3): 270-5.

¹⁸⁰ Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde AA, Mannens MM. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction

disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res.* 2003; 92(2): 159-68

¹⁸¹ Isac CM, Ruiz P, Pfitzmaier B, Haase H, Birchmeier W, Morano I. Plakoglobin is essential for myocardial compliance but dispensable for myofibril insertion into adherens junctions. *J Cell Biochem.* 1999; 72(1): 8-15.

¹⁸² Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.*; 116(7): 2012-21.

¹⁸³ Basso C, Czarnowska E, Della Barbera M, Bauce B, Beffagna G, Wlodarska EK, Pilichou K, Ramondo A, Lorenzon A, Wozniak O, Corrado D, Daliento L, Danieli GA, Valente M, Nava A, Thiene G, Rampazzo A. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J.* 2006; 27(15): 1847-54.

¹⁸⁴ Pieperhoff S, Franke WW. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development. *Eur J Cell Biol.* 2007; 86(7): 377-91.

¹⁸⁵ Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation.* 2003; 107(7): 1024-32.

¹⁸⁶ Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med.* 2006;12(4): 452-8.

¹⁸⁷ Engel FB, Hauck L, Boehm M, Nabel EG, Dietz R, von Harsdorf R. p21(CIP1) Controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(2): 555-65.

¹⁸⁸ Welt FGP, Losordo D. Cell therapy for acute myocardial infarction: curb your enthusiasm? *Circulation.* 2006;113(10):1287-94.

¹⁸⁹ Dimmeler S. Viewpoint: stem cells in cardiology. *Circulation.* 2006; 113(18): f69-70.

¹⁹⁰ Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005; 115(3): 572-83.

¹⁹¹ Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM, Srivastava D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature.* 2004; 432(7016): 466-72.

¹⁹² Schneider MD. Regenerative medicine: Prometheus unbound. *Nature.* 2004; 432(7016): 466-72.

8 Veröffentlichungen

(1) Klingbiel D, Witt H, Ivandic B, Weichenhan D, Katus HA, Ruiz P, Dümbgen L. Singular value decomposition for feature selection in gene chips. Proceedings of the GCB 2003, 1: 73-76.

(2) Grzeskowiak R, Witt H, Drungowski M, Thermann R, Hennig S, Perrot A, Osterziel KJ, Scheid S, Spang R, Lehrach H, and Ruiz P. Profiling of dilated cardiomyopathy using routine cardiac biopsies. Cardiovascular Research 2003. 59: 400-411.

(3) Most P, Remppis A, Pleger ST, Löffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Kleuss C, Heierhorst J, Ruiz P, Witt H, Karczewski P, Mao L, Rockman HA, Duncan SJ, Katus HA, Koch WJ. Transgenic overexpression of the Ca²⁺ binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. J Biol Chem 2003. 278: 33809-33817.

(4) Ungethüm U, Häupl T, Koczan D, Huber H, v. Helversen T, Ruiz P, Witt H, Drungowski M, Zacher HJ, Seyfert C, Neidel J, Krenn V, Burmester GR, Thiesen HJ, Lehrach H and Bläß S. RA-specific expression profiles and new candidate genes. Arthritis Research & Therapy 2003. 5 (Suppl.1), 81.

(5) Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. Diabetes 2005. 54:3442-52.

(6) Ruiz P and Witt H. Microarray analysis to evaluate different animal models for human heart failure. J Mol Cell Cardiol 2006. 40: 13-15.

(7) Pfab T, Thöne-Reineke C, Theilig F, Lange I, Witt H, Maser-Gluth C, Bader M, Stasch JP, Ruiz P, Bachmann S, Yanagisawa M and Hofer B. Diabetic endothelin B receptor-deficient rats develop severe hypertension and progressive renal failure. J Am Soc Nephrol 2006. 17:1082-9.

- (8) Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M, Witt H, Schäfers M, Zellerhoff S, Paul M, Athai T, Hiller KH, Baba HA, Breithardt G, Ruiz P, Wichter T and Levkau B Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation* 2006.114 (17): 1799-806.
- (9) Wittchen F*, Suckau L*, Witt H, Kühl U, Skurk C, Fechner H, Lassner D, Ungethüm U, Pauschinger M, Tschoepe C, Rauch U, Ruiz P, Schultheiss HP, Poller W. Genomic Expression Profiling of Human Inflammatory Cardiomyopathy (DCMi) Suggests Novel Therapeutic Targets. *J Mol Med* 2007. 85(3): 253-67.
- (10) Goldin-Lang P, Tran QV, Szotowski B, Wittchen F, Antoniak S, Willich T, Witt H, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Effect of ionizing radiation on cellular procoagulability: transcriptional tissue factor upregulation is associated with inflammation and apoptosis. *Haematologica* 2007. 92(8): 1091-8.
- (11) Isensee J, Witt H, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V, Ruiz Noppinger P. Gene expression profiling to identify gender-dimorphisms in the heart of mice and men. *J Mol Med*. 2008. 86(1): 61-74.
- (12) Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W. Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 2008. 29(9):1168-80.
- (13) Hillmeister P, Lehmann K, Bondke A, Witt H, Duelsner A, Gruber C, Busch HJ, Jankowski J, Ruiz P, Hossmann K, Buschmann I. Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008. 28(11): 1811-23.
- (14) Witt H*, Schubert C*, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A, Tiemann K, Stypmann J, Roepcke S, Brokat S, Mahmozadeh S, Ruiz Noppinger P, Grohé C and Regitz-Zagrosek V. Sex-Specific Pathways in Early Cardiac Response to Pressure Overload in Mice. *J Mol Med*. 2008. 86(9): 1013-24.
- (15) Witt H, Manefeld C, Yalcin S, Bondke A, Kirchhof P, Floss T, Wurst W, Hofman I, Ruiz Noppinger P. A gene trap mutation in plakophilin 4 (p0071) reveals its

functional relevance in vivo. *European Journal of Cell Biology* 2008. 87: 431-453.

(16) Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology*. zur Veröffentlichung angenommen

(17) Ungethuem U*, Haeupl T*, Witt H*, Koczan D, Krenn V, Herwig R, Drungowski M, von Helversen T, Huber H, Reutermann P, Seifert C, Pruss A, Neidel J, Lehrach H, Thiesen J, Ruiz P, Blaess S. Identification of molecular signatures and new candidates to target the pathogenesis of rheumatoid arthritis. eingereicht

(18) Thöne-Reineke C*, Steckelings UM*, Krikov M, Zimmermann M, Neumann C, Schmerbach K, Ungethüm U, Witt H, Ruiz P, Müller S, Villringer A and Unger T. Expression profiling of genes regulated by treatment with an angiotensin AT1-receptor blockade in stroke. eingereicht

Autoren mit einem "*" trugen gleichermaßen zum Inhalt der Arbeit bei.

9 Appendix

9.1 Weitere Abbildungen und Tabellen

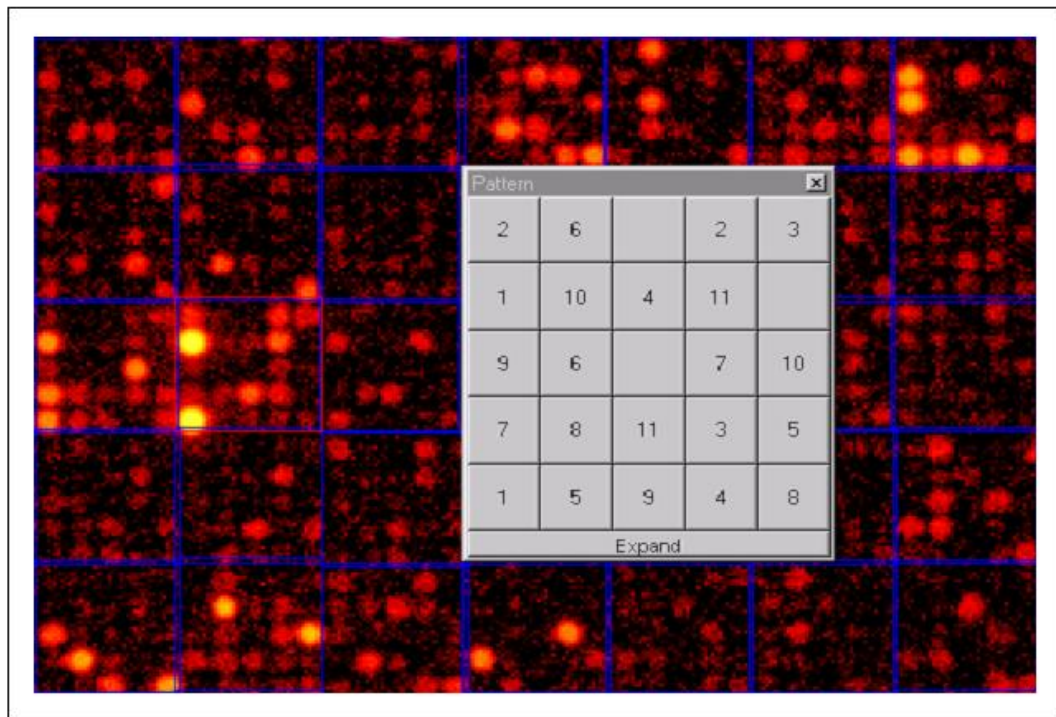


Abbildung A: Spotting-Muster der cDNA Makroarrays des Human Unigene Set II. Entsprechend der 384-iger Platten der Bakterienkultur und der PCR wurde die Membran in sechs Felder aufgeteilt, in denen sich jeweils 384 Blöcke, bestehend aus 5 x 5 Spots, befanden. Jeder Block setzte sich aus elf als Duplikat gespotteten Klonen des Human Unigene Set II und drei leeren Spots zur Berechnung der lokalen Hintergrundsignalintensität zusammen.

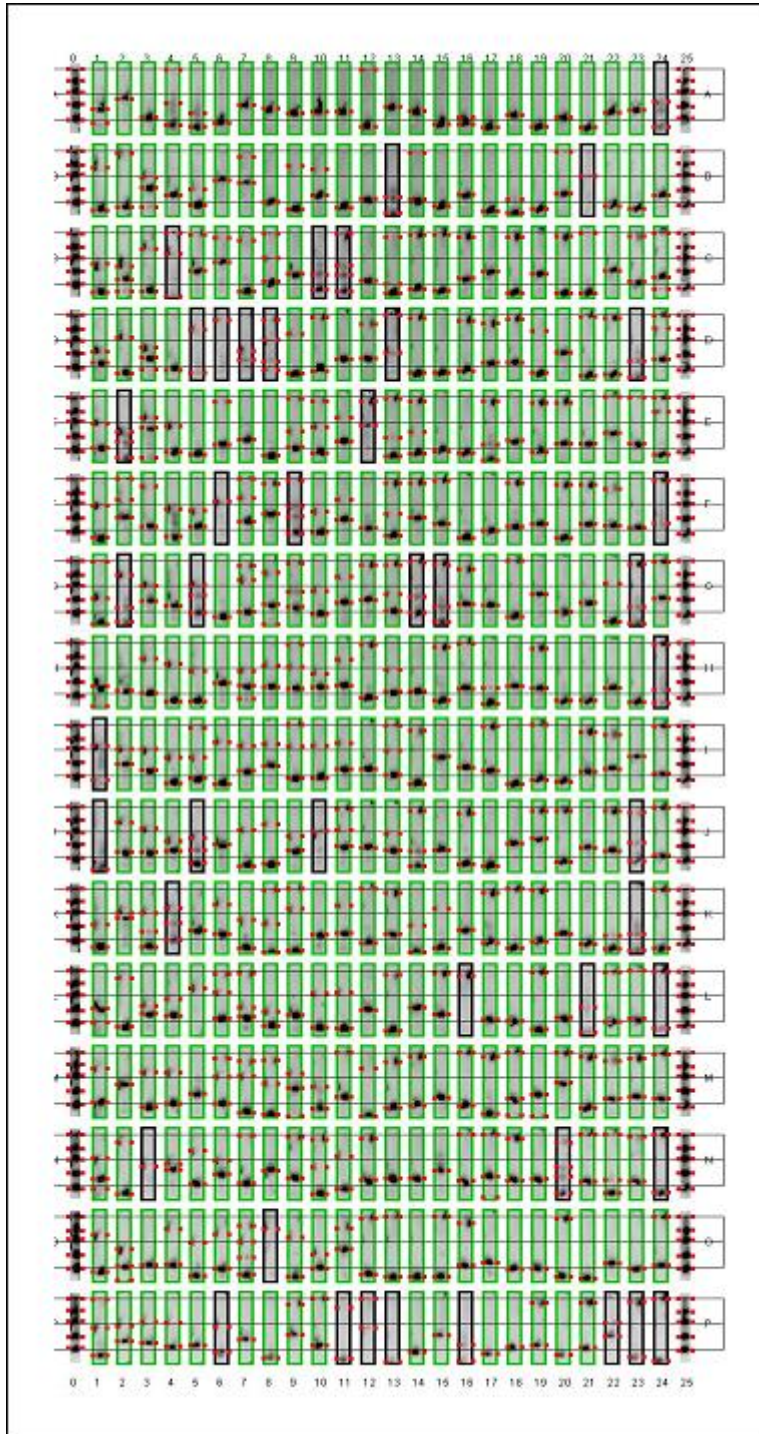


Abbildung B: Qualitätskontrolle von PCR-Produkten im 384-well Format. Es wurden Aliquots von PCR-Produkten einer amplifizierten cDNA-Bank gelelektrophoretisch aufgetrennt.

grün-markierte Spur: erfolgreiche Amplifikation

blau-markierte Spur: keine Amplifikation oder mehr als ein PCR-Produkt



Abbildung C: Echokardiographie in der Maus. Entsprechend der Ausrichtung des Mausherzens und des Schallkopfes entsteht ein zweidimensionales Bild (hier als Beispiel die Vierkammer Ansicht(A); Aufzeichnung im M-Mode(B)).

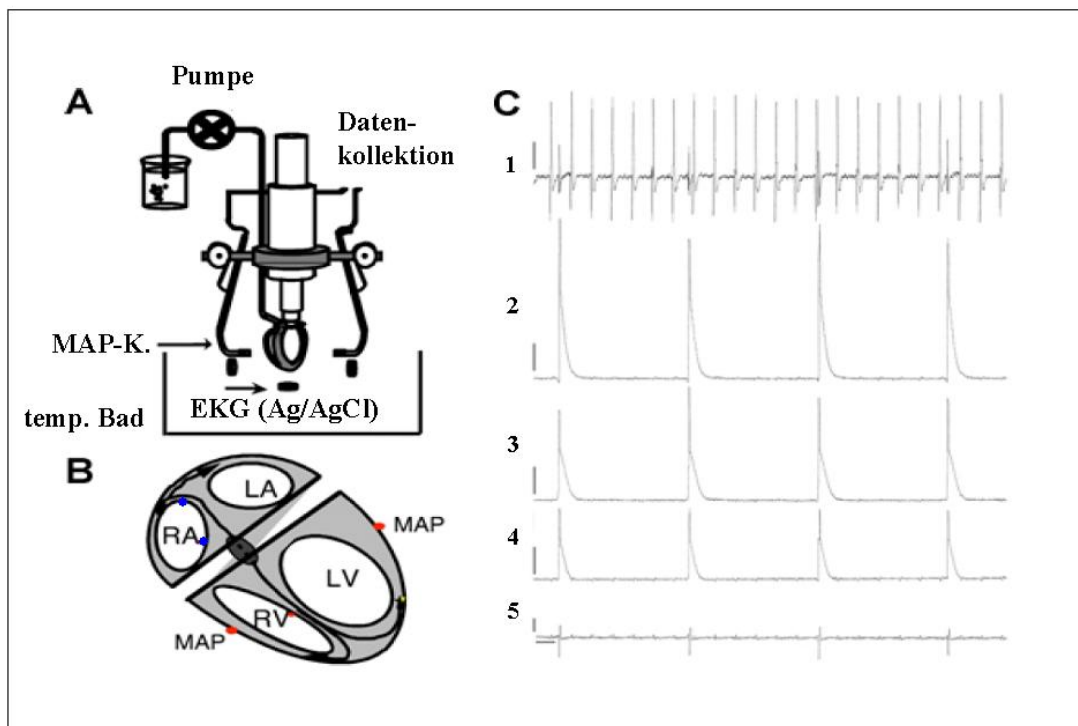


Abbildung D: Versuchsanordnung der Langendorff-Apparatur. Das isolierte Herz wurde an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und über eine Pumpe mit einer temperierten Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert (A). Mit einem oktapolaren elektrophysiologischen Mauselektrodenkatheter wurde über den rechten Vorhof stimuliert (B, blaue Markierungen). Die elektrokardiographischen Messungen erfolgten durch an das Epikard gedrückte Elektroden (EKG (Ag/AgCl)) und über drei MAP-Katheter wurden die monophasischen Aktionspotentiale aufgezeichnet (B, rote Markierungen; bzw. erhaltene Elektrogramme C). Elektrogramme (C):

- 1: MAP-Aufnahme des rechten Vorhofs
- 2: MAP-Aufnahme des rechten Ventrikels
- 3: MAP-Aufnahme der linksventrikulären freien Wand
- 4: MAP-Aufnahme des linksseitigen Septums
- 5: erste Ableitung des EKGs

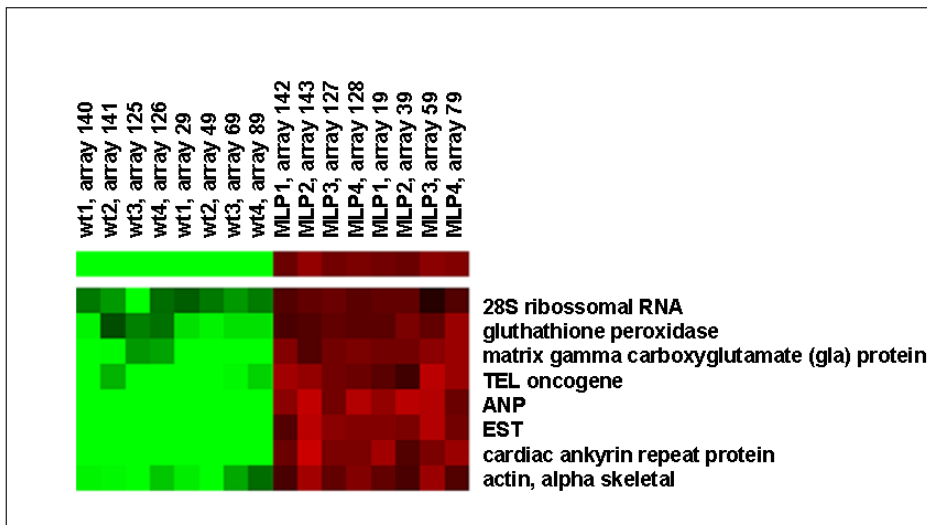


Abbildung E: Homogenität der Induktion der Genexpression in MLP *knockout* Mäusen.

Es wurden komplexe Hybridisierungen von je vier individuellen MLP *knockout* (MLP1-4) und Wildtyp-Mäusen (wt1-4) mit Makroarrays des Mouse Unigene Set I durchgeführt. Hierbei wurden sowohl selbst hergestellte (array 125-143) als auch vom RZPD hergestellte Arrays (array 19-89) genutzt. Für eine Auswahl an deregulierten Genen ergab sich eine weitgehend homogene Induktion der Genexpression in MLP *knockout* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Tabelle A: Deregulation von Hypertrophie-assoziierten Genen in trainierten heterozygoten Plakoglobin *knockout* Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Das angegebene Ratio wurde gebildet im Vergleich zu zwei untrainierten Mäusen (Wildtyp und heterozygoter *knockout*). Für das atriale natriuretische Peptid ist eine Vielzahl an Publikationen verfügbar; einen guten Überblick in verschiedenen Array-Datensätzen bietet das CardioGenomics-Projekt des National Heart, Lung and Blood Institute.

Gen	Ratio	Referenz
atriales natriuretisches Peptid	6,4	http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home
Early growth response 1	7,6	Rozich JD et al. J Mol Cell Cardiol. 1995;27(1):485-99. Kubisch C et al. FEBS Lett. 1993;335(1):37-40.
Mitogen-inducible gene 6	7,3	Makkinje A et al. J Biol Chem. 2000;275(23):17838-47.
Connective tissue growth factor	5,7	Kemp TJ et al. J Mol Cell Cardiol. 2004;37(2):603-6.
Cysteine rich protein 61	5,6	Hilfiker-Kleiner D et al. Circulation. 2004;109(18):2227-33.
PDZ and LIM domain 3	4,5	Lorenzen-Schmidt I et al. Ann Biomed Eng. 2005;33(7):888-96.
Dual specificity phosphatase 1	3,6	Hayashi D et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004;322(1):310-9.
Activating transkription factor 4	3,3	Blais A et al. Genes Dev. 2005;19(5):553-69.
PPAR gamma, coactivator 1 alpha	-2,1	Witt et al. J Mol Med. 2008;86(9):1013-24
pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	-2,1	Witt et al. J Mol Med. 2008;86(9):1013-24
HSP family, member 7 (cardiovascular)	-6,7	Krief S et al. J Biol Chem. 1999 Dec 17;274(51):36592-600.

9.2 Primer-Sequenzen

Maus

natriuretic peptide precursor A (Nppa):

for: CCT GTG TAC AGT GCG GTG TC

rev: CCT CAT CTT CTA CCG GCA TC

natriuretic peptide precursor B (Nppb):

for: GCA CAA GAT AGA CCG GAT CG

rev: CAG GCA GAG TCA GAA ACT GGA

Four and a half LIM domains 1 (Fhl1):

for :GAA GTG TGC TGG ATG CAA GA

rev: AGC AGT AGT CGT GCC AGG AT

matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein (Mglap):

for: CCT TTA TGT CCC CTC AGC AG

rev: GTA GTC ATC GCA GGC CTC TC

cardiac ankyrin repeat protein (Carp):

for: TTC GAC TCT TGA TGA CCT TCG

rev: TTT GGT TCC ACT CTG CCA GT

actin, alpha skeletal muscle (Acta1):

for: GCA TGC AGA AGG AGA TCA CA

rev: CCA CCG ATC CAC ACT GAG TA

hypoxanthin-phosphoribosyltransferase (Hprt):

for: TGT TGT TGG ATA TGC CCT TG

rev: TTG CGC TCA TCT TAG GCT TT

glyceraldehyd-3-phosphat- dehydrogenase (Gapdh):

for: TGG CAT CCT TGC TTA CAC AG

rev: GCA ATT CCA GCC TTA GCA TC

ribosomal protein P0 (P0):

for: CCA TCA TCA ATG GGT ACA AGC

rev: CAG ATG GAT CAG CCA GGA AG

myocyte enhancer factor 2C (Mef2C):

for: GCA GCA GCA GCA CCT ACA TA

rev: GAA GGC AGG GAG AGA TTT GA

WD repeat domain 1 (WDR1):

for: ACG CTG AGT GAC CCA GAG AC

rev: GAG GTG GTG ACC AGT GTG TG

transformation related protein (tp53):

for: AAA GGA TGC CCA TGC TAC AG

rev: GAT GGG AGC TAG CAG TTT GG

sodium channel protein type V, alpha subunit 3:

for: CCC TGC GCC ACT ATT ACT TC

rev: TGA TGT CGG AGA GGA CAG TG

connexin 43 (Cxn43):

for: CGT TTG ATT TCC CTG ACG AC

rev: AAG GTC GCT GAT CCA CGA TA

cyclin D1:

for: CCC AAC AAC TTC CTC TCC TG

rev: TCC AGA AGG GCT TCA ATC TG

collagen 1A1:

for: AAC GAG ATC GAG CTC AGA GG

rev: ATG ACT GTC TTG CCC CAA GT

collagen 3A1:

for: AGG CTG AAG GAA ACA GCA AA
rev: GGG TAG TCT CAT TGC CTT GC

CCAT enhancer-binding protein- α :

for: TGG TTT TGC TCT GAT TCT TGC
rev: CCC AAA CAT CCC TAA ACC AA

Ppar gamma:

for: TGT GGG GAT GTC TCA CAA TG
rev: TCA GCA GAC TCT GGG TTC AG

9.3 Listen der differentiell exprimierten Gene

9.3.1 kardialer Themenarray

humane DCM			
Klon ID / Gen Name	GenBank ID	Expressions-Ratio	FPR [%]
71E16 natriuretic peptide precursor A	AA121523	10,6	1,33
71E16 natriuretic peptide precursor A	AA121523	11,4	1,33
196F19 Ig heavy chain variable region 1	--	5,8	1,33
71E16 natriuretic peptide precursor A	AA121523	12,7	1,33
71E16 natriuretic peptide precursor A	AA121523	13,1	1,33
71E16 natriuretic peptide precursor A	AA121523	11,6	1,33
71E16 natriuretic peptide precursor A	AA121523	12,2	1,33
41J24 hemoglobin alpha 2	--	4,4	1,33
196C7 complement component 9	T64669	11,5	1,33
184M22 Ig gamma-1 chain C	AI631390	5,2	1,33
186O20 Ig kappa light chain	--	4,7	1,33
5J17 hemoglobin beta	T87393	4,3	1,33
180A24 Ig kappa constant region	--	3,6	1,33
169E11 Ig kappa constant region	AI439746	4,8	1,33
54O19 hemoglobin, beta	W03299	3,5	1,33
196O4	--	9,2	1,33
170K4 Ig kappa light chain	--	4,4	1,33
183G23 EST	AI674305	3,1	1,33
41K24 hemoglobin alpha 2	H71020	3,5	1,33
186F18 Ig lambda light chain	--	3,8	1,33
186E21 Ig kappa light chain	--	4,5	1,33
41B20 EST hemoglobin alpha 2	AI470803	3,1	1,33
154J24 Ig kappa constant region	AI802711	6,3	1,33
184G20 Ig gamma-1 chain c	AI635926	4,1	1,33
33I18 hemoglobin alpha 2	R88706	2,9	1,33
183H21 Ig lambda light chain	AI635925	3,8	1,33
21P6 lumican	AI205773	2,5	1,33
176J8 Ig rearranged H-chain	--	4,1	1,33
36A24	--	2,7	1,33
177I16 prolin arginine-rich end leucine-rich repeat protein	AI583397	2,4	1,33
169C19 EST	AI521382	3,8	1,33
190P3 Ig lambda light chain	AI791957	4,2	1,33
196C13 EST	--	3,8	1,33
188O15 Ig kappa light chain	--	5,1	1,33
169K3	--	4,0	1,33
41P16 p38gamma MAP kinase	H95599	2,0	1,33
188E20 Ig kappa light chain	--	9,2	1,33
42G2 EST	AI458386	3,4	1,33
171C18 Weakly similar to CLUS_HUMAN Clusterin precursor	AI572889	1,8	1,33
26M15 lumican	H27256	2,1	1,33
43J8 p38gamma MAP kinase	N58204	2,9	1,33
180J12	--	1,9	1,33
180O14 EST	--	2,1	1,33
54M4 p38gamma MAP kinase	W03125	2,1	1,33
38F18 cytochrome P450, family2, subfamily J, polypeptide 2	AI419141	1,8	1,33
184H1 clusterin	AI911868	1,9	1,33
165B23 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	AI354573	1,9	1,33
24O17 192 protein S-alpha (PROS1) gene	H02899	1,8	1,33
21M5 p38gamma MAP kinase	R64186	2,2	1,33
54D10 myosin, light polypeptide, regulatory, non-sarcomeric (20kD)	W01220	2,1	1,33
175A15 EST	--	1,9	1,33
189C5 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	AI926669	1,7	2,11

136F21	--	1,9	2,11
185K7	--	1,8	2,11
169N13 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	--	1,8	3,33
60I6 p38gamma MAP kinase	W76043	1,8	3,33
184D20 major histocompatibility complex, class II, DP beta	AI818936	1,6	3,33
182C10	--	1,8	3,33
184H16	--	1,5	3,33
187F2	--	1,7	3,33
180K1 EST	AI683175	1,8	3,33
177H23	--	1,7	3,33
176P10 EST	AI567691	1,5	3,33
183M2	AI912410	1,7	3,33
104N15 cardiac ankyrin repeat protein	AA969184	2,1	3,33
183K18	--	1,7	3,33
170J19	--	1,8	3,33
121F24 EST	AI219584	2,0	3,33
176A15 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	--	1,8	3,33
169M9 EST	AI498570	1,8	3,33
2N22 CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility c)	T70375	1,8	3,33
64D16 putative ankyrin-repeat containing protein	H29337	1,9	3,33
169O18 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	AI471925	1,8	5,59
18J6 apolipoprotein D	R21179	1,9	5,59
171O17 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	AI475175	1,7	5,59
10L17 cardiac ankyrin repeat protein	AI028677	2,1	5,59
164L1p38gamma MAP kinase	N48671	5,7	5,59
60B13 EST	W77749	2,4	5,59
5K19 cardiac ankyrin repeat protein	AA702104	1,6	5,59
10L17 EST	R10975	2,0	5,59
42L5 N-acetyltransferase 8 (camello like)	N75734	2,0	5,59
171D1	--	1,8	5,59
170G5	--	2,0	5,59
42L18 axin 2 (conductin, axil)	H95839	1,6	5,59
175J8 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	AI564234	1,7	5,59
180D8 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	--	1,7	5,59
92G19 regenerating gene type IV	AI732541	1,7	8,82
169A17 Myosin regulatory light chain 2, non-sarcomeric	AI521385	1,7	8,82
190I15	--	5,2	8,82
172A15 EST	AI917524	1,5	8,82
167O6 EST	AI288102	2,4	8,82
183F10 Weakly similar to PRPP human salivary proline-rich protein II-1	AI630876	1,8	8,82
141O18 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	--	1,7	8,82
183I24 major histocompatibility complx, class II, DR beta 4	AI635608	1,6	8,82
183E20 bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	AI674297	1,7	8,82
86B6 sorbin and SH3 domain containing 1	AA459944	1,7	8,82
185G15	--	1,7	8,82
107K2 transcription cofactor vestigial-like 2	AI004234	1,9	8,82
60A20 p38gamma MAP kinase	R10287	1,6	8,82
167K24 EST	AI287487	2,1	8,82
5K19 troponin I, cardiac	T77359	1,5	8,82
16F17 gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	R51491	3,1	8,82
180E1	--	1,7	8,82
45J6 eukaryotic translation initiation factor 1 alpha 1	N20884	1,8	8,82
95E4 EST	AA648395	1,6	8,82
31D1 EST	AI336032	0,5	1,33
12K2 nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	R13231	0,4	1,33
130G1	--	0,5	1,33
73D3 p38gamma MAP kinase	AA282233	0,6	1,33
147A12 iroquois homeobox protein 1	AI654035	0,5	1,33
30O24 p38gamma MAP kinase	H19279	0,5	1,33
120E7 EST	AI939359	0,5	1,33
30J24 mRNA for bruno-like, RNA binding protein variant protein	AI201486	0,5	1,33
170F16 similar to junction-mediating and regulatory protein p300 JMY	AI581142	0,5	1,33

186F24	AI886176	0,6	1,33
140A23 EST	AI417957	0,5	1,33
68A18 EST	AI250871	0,6	1,33
90C15 EST	AA492486	0,4	1,33
73N19 down-regulated by Ctnnb1, a	AA282218	0,5	1,33
92J1	--	0,5	1,33
131G4	--	0,6	1,33
127N20 Weakly similar to SHB (Src homology 2 domain containing) adaptor protein	AI283047	0,5	1,33
61G14 contaminated	H75852	0,6	1,33
137K6 EST	AI475801	0,5	1,33
112F19	--	0,6	1,33
113M23 EST	AI084471	0,6	1,33
60C15 p38gamma MAP kinase	T86185 1	0,6	1,33
106I10	--	0,5	1,33
159A21 G protein-coupled receptor 54	AI819198	0,6	2,11
182N21 EST	AI758665	0,5	2,11
68I2 HSPC002 protein	AI249344	0,5	2,11
85K5 MUSK 9 6 muscle, skeletal	AA448972	0,6	2,11
2M22 EST	AA228907	0,6	2,11
159L6 POU domain, class 3, transcription factor 4	AI928745	0,6	2,11
73O3 EST	AA282888	0,6	2,11
116I11	--	0,5	2,11
139C6	--	0,6	2,11
20J18 pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	R68177	0,4	2,11
129O22	--	0,6	2,11
68M3 oxysterol binding protein-like 3	AI249926	0,5	2,11
64K4 p38gamma MAP kinase	AA705935	0,6	2,11
157F23 EST	AI760026	0,5	2,11
59G2 28S ribosomal RNA gene	AI927428	0,6	2,11
185C3	--	0,6	2,11
103K10 EST	AA954420	0,5	3,33
186A22 Weakly similar to SFPQ_HUMAN Splicing factor, proline- and glutamine-rich	AI890183	0,5	3,33
61E4 EST	W84606	0,5	3,33
186G15	--	0,6	3,33
82K2	--	0,6	3,33
91L13	--	0,5	3,33
182B1	--	0,6	3,33
83A6 LIM homeobox protein 1	AA425324	0,6	5,59
7A14 p38gamma MAP kinase	AA454564	0,6	5,59
91D19	--	0,6	5,59
73F21 EST	AA281719	0,6	5,59
68H11 EST	AI360654	0,6	5,59
93F18 EST	AA558560	0,6	5,59
55M2 cardiomyopathy associated 1	AI807389	0,5	5,59
19O19 p38gamma MAP kinase	AI631782	0,7	5,59
32C17 tumor necrosis factor, alpha, convrting enzyme	H30610	0,5	5,59
129J15 cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	AI266125	0,6	8,82
40P6 EST	AI400358	0,5	8,82
52D19 Moderately similar to NICA_HUMAN Nicastrin precursor	AI693668	0,6	8,82
88I20 N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment	AA459161	0,5	8,82
70O22	--	0,7	8,82
188B1 ESTs, Moderately similar to vesicle trafficking, beach and anchor containing	AI934291	0,7	8,82
181O3 EST	AI804808	0,6	8,82

9.3.2 cDNA Mikroarrays (Agilent)

MLP knockout			
Gen Name	GenBank ID	Expressions-Ratio	FPR [%]
natriuretic peptide precursor type A	AA755870	57.3	2.09
ankyrin-like repeat protein	AA792499	6.6	2.09
four and a half LIM domains 1	AI326574	7.1	2.09
actin, alpha 1, skeletal muscle	AA770902	3.4	2.09
RIKEN cDNA 3021401A05 gene	AI181682	5.5	2.09
biglycan	AA855996	4.1	2.09
natriuretic peptide precursor type B	W12084	7.9	2.09
matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein	W88093	6.3	2.09
RIKEN cDNA 3930401B19 gene	AI390138	3.7	2.09
microfibrillar associated protein 5	AA037995	3.2	2.09
enabled homolog (Drosophila)	AI893955	2.7	2.09
RIKEN cDNA 2600015J22 gene	AA536695	3.0	2.09
serine protease inhibitor 2-2	AA821980	2.7	2.09
apolipoprotein D	AI120641	2.5	2.09
benzodiazepine receptor, peripheral	AA711705	2.4	2.09
FBJ osteosarcoma oncogene	AA002910	2.6	2.09
transforming growth factor, beta 2	AA619890	3.4	2.09
calsequestrin 1	AA435278	3.0	2.09
dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	AA073904	3.0	2.09
A kinase anchor protein 2	AA638739	2.4	2.09
imprinted and ancient	AA770890	2.4	2.09
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor). member 1	AA727967	2.5	2.09
lumican	AW210283	2.8	2.09
RIKEN cDNA 2810423O19 gene	AI391240	2.7	2.09
ESTs	AA623175	2.6	2.60
small proline-rich protein 1A	AA028420	3.6	2.60
cysteine rich protein 61	AA466852	2.7	2.60
RIKEN cDNA 2210401F01 gene	AI605613	2.1	2.60
ESTs	AI553027	2.1	2.60
guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 3	AI325613	2.6	2.60
clusterin	AA210481	2.5	2.60
CD44 antigen	AA185112	2.3	2.60
ESTs, Weakly similar to unnamed protein product [H.sapiens]	AA444683	2.7	2.60
T-box 15	AA517906	2.7	2.60
kinesin family member 5B	AI508643	2.1	2.60
RIKEN cDNA 1110018M03 gene	AI425707	5.3	2.60
ESTs	AA725941	2.2	2.60
secreted phosphoprotein 1	AA563324	3.2	2.60
thrombospondin 4	AA003452	2.6	2.60
osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	W81878	3.0	2.60
latent transforming growth factor beta binding protein 2	AI099009	2.6	2.60
tissue inhibitor of metalloproteinase	AA184223	2.3	2.60
prion protein	AA656117	2.6	2.60
paraoxonase 2	W98586	2.3	2.60
ESTs	AI550186	2.0	6.35
Public domain EST	AA097101	2.4	6.35
DNA segment, Chr 3, Nuffield Department of Surgery 3	W09198	2.3	6.35
coactivator of 150 kD	AA062401	1.9	6.35
armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome	AA000495	2.0	6.35
Bcl-associated death promoter	W64107	1.9	6.35
platelet-derived growth factor, C polypeptide	AA028539	2.0	6.35
procollagen C-proteinase enhancer protein	AA770854	1.9	6.35
NPC derived proline rich protein 1	AA791966	2.2	6.35
esterase 1	AA760070	-5.3	2.09
RIKEN cDNA 1300016K07 gene	AA798371	-3.2	2.09
ESTs	AI197098	-3.0	2.09

RIKEN cDNA 1500001L03 gene	AA796749	-2.9	2.09
ESTs, Highly similar to dJ323M22.2 [H.sapiens]	AA571907	-4.6	2.09
RIKEN cDNA 0610025119 gene	AA108741	-2.6	2.09
tat-interacting protein 30 kDa	AA388037	-2.7	2.09
ESTs	W82097	-2.4	2.09
hydroxylacyl-Coenzyme A dehydrogenase	W53871	-2.4	2.09
RIKEN cDNA 0610011L04 gene	AA087441	-2.6	2.09
succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit	AA462048	-2.2	2.09
RIKEN cDNA 6330565B14 gene	A1121911	-2.7	2.09
CD59a antigen	AA162378	-2.5	2.09
claudin 8	AA080175	-2.1	2.09
RIKEN cDNA 4930552N12 gene	AA607041	-2.1	2.09
prostaglandin D2 synthase (21 kDa, brain)	AA462585	-2.5	2.09
succinate-Coenzyme A ligase, GDP-forming, beta subunit	AA062367	-2.1	2.09
major urinary protein 2	AA822105	-2.5	2.09
RIKEN cDNA 2310022B03 gene	AA794294	-2.3	2.09
ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL 47.9 KD PROTEIN B0303.3 IN CHROMOSOME III [Caenorhabditis elegans]	A1596600	-2.2	2.09
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	AA821917	-2.1	2.60
RIKEN cDNA 1700034P14 gene	AA416439	-2.5	2.60
isovaleryl coenzyme A dehydrogenase	AA543454	-2.0	2.60
selenium binding protein 1	W77429	-2.0	2.60
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	AA553242	-1.8	2.60
lectin, galactose binding, soluble 6	AA674809	-2.2	2.60
ESTs	AA467289	-1.8	2.60
RIKEN cDNA 2310034D06 gene	AA450902	-2.1	6.35
Public domain EST	AA710965	-2.0	6.35
carnitine palmitoyltransferase 2	AW209706	-1.9	6.35
Rhesus blood group-like	AA008551	-1.9	6.35
regulator of G-protein signaling 5	AA004108	-2.2	6.35
chondroitin sulfate proteoglycan 2	AA755868	-1.9	6.35
cathepsin H	W17422	-2.0	6.35

Plakoglobin *knockout*

Gen Name	GenBank ID	Expressions-Ratio	FPR [%]
platelet factor 4	A1120986	7.3	4.76
arachidonate 12-lipoxygenase	AA796544	3.9	4.76
RIKEN cDNA 2400003M24 gene	AA882184	5.9	4.76
src-like adapter protein	AA867150	4.2	4.76
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	AA177828	4.6	4.76
RIKEN cDNA 1200014I03 gene	A1037505	3.3	4.76
ESTs	A1430204	2.4	4.76
pleckstrin	A1604164	3.0	4.76
Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	W11251	3.0	4.76
integrin alpha 2b (Cd41b)	A1021345	3.9	4.76
RIKEN cDNA 2310021G14 gene	AA166304	2.4	4.76
RIKEN cDNA 3021401A05 gene	A1181682	2.2	4.76
interferon gamma inducible protein, 47 kDa	AA510689	2.3	4.76
thromboxane A synthase 1, platelet	AA821616	2.1	4.76
small proline-rich protein 1A	AA028420	4.4	4.76
proteoglycan, secretory granule	AA607483	2.6	4.76
cathepsin S	AA146437	2.0	4.76
mesothelin	AA673869	2.2	4.76
complement component 1, q subcomponent, c polypeptide	A1894016	2.3	4.76
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	AA590845	2.1	4.76
myeloperoxidase	AA031015	1.8	5.71
linker for activation of T cells	AA153591	2.8	5.71
RIKEN cDNA 5830405C08 gene	AA267733	2.0	5.71
glycoprotein 49 B	A1894044	2.3	5.71
RIKEN cDNA 1810003P21 gene	AA066615	1.8	5.71
lymphoid-restricted membrane protein	A1158088	1.9	5.71

glycoprotein Ib, beta polypeptide	AI614672	3.8	5.71
Mouse 19.5 mRNA	AI159179	1.8	5.71
cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	AA717167	1.8	5.71
FXYD domain-containing ion transport regulator 2	AA108723	2.0	5.71
retinal short-chain dehydrogenase/reductase 1	AA881922	1.9	5.71
natriuretic peptide precursor type B	W12084	1.8	5.71
cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	AA182308	2.1	5.71
lysosomal-associated protein transmembrane 5	AA739425	2.4	5.71
keratin complex 1, acidic, gene 19	AA028346	1.9	9.52
integrin beta 2 (Cd18)	AA915313	2.1	9.52
CD52 antigen	AA238062	1.9	9.52
inactive X specific transcripts	AI877091	2.1	9.52
potassium voltage gated channel, shaker related subfamily, member 3	AA982084	1.9	9.52
GATA-binding protein 1	AA185505	1.9	9.52
prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	W13004	1.6	9.52
alpha fetoprotein	AI324392	-14.8	4.76

ErbB2 knockout

Gen Name	GenBank ID	Expressions-Ratio	FPR [%]
inactive X specific transcripts	AI877091	5.8	3.70
RIKEN cDNA 1200016G03 gene	AI603997	2.2	3.70
cytochrome P450, 2e1, ethanol inducible	AI386063	2.4	3.70
Public domain EST	AA871265	2.7	3.70
carbonic anhydrase 3	AI386062	4.3	3.70
S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)	AA255025	2.4	3.70
potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1	AA667785	2.4	3.70
natriuretic peptide precursor type B	W12084	2.6	3.70
prostaglandin D2 synthase (21 kDa, brain)	AA462585	2.6	3.70
RIKEN cDNA 3021401A05 gene	AI181682	2.0	3.70
secreted phosphoprotein 1	AA563324	-8.0	3.70
small proline-rich protein 1A	AA028420	-5.9	3.70
tissue inhibitor of metalloproteinase	AA184223	-2.8	3.70
cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	AW210382	-2.4	3.70
RIKEN cDNA 2810429K17 gene	AA266871	-2.3	3.70
interleukin 15	AA709787	-2.0	3.70
procollagen, type I, alpha 2	AA798297	-2.0	3.70
RIKEN cDNA 2810429K17 gene	AA546857	-2.0	3.70
macrophage expressed gene 1	AA178272	-1.8	3.70
heme oxygenase (decycling) 1	AI324438	-2.2	3.70
clusterin	AA210481	-2.0	3.70
small inducible cytokine A7	AA711435	-1.9	3.70
tenascin C	W12942	-2.7	3.70
ESTs	AA590624	-1.8	3.70
myosin light chain, phosphorylatable, cardiac ventricles	AA795319	-1.7	3.70
osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	W81878	-1.8	3.70
coactivator of 150 kD	AA062401	-1.9	3.70
ESTs	AA472125	-1.7	7.14
procollagen, type I, alpha 1	AI425767	-2.1	7.14
lymphocyte antigen 86	AA138913	-1.7	7.14
ATPase, H+ transporting lysosomal (vacuolar proton pump), 9.2 kDa	AA755768	-1.6	7.14
aminolevulinic acid synthase 2, erythroid	AA880550	-1.7	7.14
RIKEN cDNA 3110023K12 gene	AA217878	-1.7	7.14
T-cell death associated gene	W59335	-2.0	7.14
platelet factor 4	AI120986	-1.6	7.14

ErbB4 knockout

--	--	--	--

Gen Name	GenBank ID	Expressions-Ratio	FPR [%]
natriuretic peptide precursor type A	AA755870	5.9	1.65
ankyrin-like repeat protein	AA792499	6.1	1.65
natriuretic peptide precursor type B	W12084	6.1	1.65
metallothionein 2	W36474	4.3	1.65
heat shock protein, 70 kDa 3	AA145895	6.9	1.65
serine protease inhibitor 2-2	AA821980	3.4	1.65
RIKEN cDNA 3930401B19 gene	AI390138	3.3	1.65
microfibrillar associated protein 5	AA037995	3.4	1.65
glucokinase activity	AI325384	3.1	1.65
chitinase 3-like 1	W10705	3.1	1.65
actin, alpha 1, skeletal muscle	AA770902	2.7	1.65
kallikrein binding protein	W14912	3.6	1.65
purine-nucleoside phosphorylase	AI390585	2.9	1.65
hemoglobin, beta adult major chain	AA106071	2.4	1.65
tissue inhibitor of metalloproteinase	AA184223	5.2	1.65
hemoglobin, beta adult major chain	W15809	2.4	1.65
glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	AI324398	2.2	1.65
apolipoprotein D	AI120641	2.3	1.65
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	AI326605	2.3	1.65
Down syndrome critical region homolog 1 (human)	AA450437	3.0	1.65
hyaluronidase 2	W83533	2.0	1.65
heat shock protein, 70 kDa 1	AA445731	1.9	1.65
annexin A2	AA760184	2.0	1.65
CD44 antigen	AA185112	2.3	1.65
ESTs, Moderately similar to F26L MOUSE 6PF-2-K/FRU-2,6-P2ASE LIVER ISOZYME [M.musculus]	AI529513	2.0	1.65
FXFD domain-containing ion transport regulator 5	AA718314	1.9	1.65
myelin basic protein	AI605718	2.2	1.65
metallothionein 1	AA638765	1.8	1.65
hemoglobin Z, beta-like embryonic chain	AW209707	2.0	1.65
FK506 binding protein 5 (51 kDa)	W53680	1.8	1.65
S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)	AA255025	2.2	1.65
glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3	AA050083	2.0	1.65
thrombospondin 4	AA003452	2.0	1.65
NPC derived proline rich protein 1	AA791966	1.7	1.65
regulator of G-protein signaling 5	AA004108	1.8	1.65
lymphocyte antigen 6 complex, locus C	AA762277	1.7	1.65
S100 calcium-binding protein A4	AI120885	2.2	1.65
fibrinogen-like protein 2	AI893899	2.0	1.65
RIKEN cDNA 2600015J22 gene	AA536695	1.8	1.65
hemoglobin Y, beta-like embryonic chain	AA624843	1.7	1.65
a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	AA711852	1.7	1.65
RIKEN cDNA 2900074L19 gene	AA958426	2.1	1.65
Bcl2-like	AI323048	1.7	1.69
RIKEN cDNA 2200009H22 gene	AA204090	2.0	1.69
lipocalin 2	AA087193	6.6	1.69
RIKEN cDNA 2310047C17 gene	AI173066	2.0	1.69
DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 435, expressed	AA756177	1.6	1.69
fibrillin 1	AW210317	1.7	1.69
four and a half LIM domains 1	AI326574	3.3	1.69
RIKEN cDNA 3021401A05 gene	AI181682	1.8	1.69
hemoglobin X, alpha-like embryonic chain in Hba complex	W56995	1.7	1.69
prostaglandin D2 synthase (21 kDa, brain)	AA462585	1.6	1.69
enabled homolog (Drosophila)	AI893955	1.7	1.69
t-complex testis expressed 1	W34143	1.7	1.69
FBJ osteosarcoma oncogene	AA002910	2.0	1.69
coagulation factor XII (Hageman factor)	W34349	1.7	1.69
ribosomal protein L12	W13748	1.6	1.98
actinin alpha 2 associated LIM protein	AA840053	1.6	1.98
phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	W16027	1.9	1.98
ESTs, Weakly similar to (defline not available 7493873) [S.cerevisiae]	AA388124	1.6	1.98
spleen tyrosine kinase	AA185105	1.6	1.98

cysteine rich intestinal protein	AI385503	1.6	1.98
Mouse 19.5 mRNA	AI159179	1.8	2.36
synuclein, alpha	AI510034	1.8	2.36
Public domain EST	AA437677	1.8	2.61
ESTs	AA117388	1.7	3.79
RIKEN cDNA 1810009M01 gene	AA624578	1.5	3.79
RIKEN cDNA 2700050C19 gene	AA881328	2.6	3.79
calcium binding protein A11 (calgizzarin)	AA616998	1.6	3.79
RIKEN cDNA 1200016G03 gene	AI603997	2.3	4.13
RIKEN cDNA 2810036M19 gene	AI595030	1.8	4.13
protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	AA623663	1.6	4.90
insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit	AA250132	1.6	4.90
heat shock protein, 86 kDa 1	AA529377	1.6	4.90
phospholipase c neighboring	W34154	1.6	4.90
pituitary tumor-transforming 1	AI549649	1.7	5.07
purine-nucleoside phosphorylase	AW209875	1.6	5.07
matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein	W88093	2.2	5.07
cytochrome P450, 2b10, phenobarbital inducible, type b	AI325330	2.6	5.07
cytochrome P450, 2d9	AI893895	1.6	5.07
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	AA517353	1.5	5.07
wingless related MMTV integration site 2b	W44010	1.6	5.46
CD24a antigen	AI120876	2.3	5.46
dihydropyrimidinase-like 3	AA062324	1.5	5.46
serine protease inhibitor 2-1	AA727334	1.6	5.46
gap junction membrane channel protein beta 5	AI894067	1.6	5.46
insulin-like growth factor binding protein 6	W15804	1.5	5.46
RIKEN cDNA 3230402E02 gene	AI552932	1.8	5.90
ESTs	AA840125	1.7	5.90
eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	W30045	1.5	6.76
ESTs	AA168416	1.8	6.76
SRY-box containing gene 10	AA879915	1.5	6.76
ESTs	AA162746	1.8	6.76
inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	AA049060	1.9	6.87
Mouse housekeeping DXS253E (P3) and DXS254E (GdX) genes, 3' end, and complete cds	AA061673	1.5	7.51
DNA segment, Chr 3, Nuffield Department of Surgery 3	W09198	1.6	8.10
Public domain EST	AA435311	1.5	8.10
ESTs	AA212925	1.5	8.10
wingless-related MMTV integration site 5B	AA218013	1.5	8.53
calcium channel beta 3 subunit	W54062	1.6	9.45
ESTs, Weakly similar to MDP1 MOUSE MICROSOMAL DIPEPTIDASE PRECURSOR [M.musculus]	AA444538	2.0	9.45
peroxisome proliferator activated receptor gamma	W34083	1.6	9.45
ESTs	AI536345	1.6	9.45
RIKEN cDNA A930008K15 gene	AI552154	1.7	9.45
ESTs	AA433722	-2.5	1.65
ESTs	AI390824	-2.2	1.65
ephrin B3	AI510011	-2.0	1.65
ESTs, Highly similar to 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT PRECURSOR [Homo sapiens]	AI322289	-2.1	1.65
ESTs	AA762383	-2.2	1.65
ephrin B3	AA178037	-2.0	1.65
RIKEN cDNA 6530404A22 gene	AA529656	-2.5	1.65
VPS10 domain receptor protein SORCS 2	W76988	-2.2	1.65
period homolog 3 (Drosophila)	AA105367	-2.0	1.65
interleukin 15	AA709787	-1.8	1.65
ESTs	AA793372	-2.0	1.65
RIKEN cDNA 1810005K14 gene	AA450917	-2.0	1.69
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 13	AA413194	-1.9	1.69
ESTs	AA028359	-2.0	1.69
RIKEN cDNA 2310046B19 gene	AA217009	-1.7	1.69
interferon-inducible GTPase	AA260490	-2.1	1.69
myosin light chain, phosphorylatable, cardiac ventricles	AA795319	-1.8	1.69
fumarylacetoacetate hydrolase	AI180932	-1.8	1.69

kinase insert domain protein receptor	W85664	-1.9	1.69
adenylate kinase 4	AI594232	-1.7	1.69
ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	AA437485	-1.7	1.69
ESTs	AA146572	-1.9	1.69
RIKEN cDNA 1110060O10 gene	AI585414	-1.7	1.69
tissue factor pathway inhibitor	AA437788	-1.7	1.69
inositol polyphosphate phosphatase-like 1	AA711654	-1.7	1.69
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2	W57231	-1.9	1.69
ESTs	AA624553	-1.7	1.69
serine protease inhibitor, Kunitz type 2	AA617562	-1.7	1.69
cellular repressor of E1A-stimulated genes	AA544212	-1.7	1.69
vesicle-associated membrane protein 2	AA014530	-1.6	1.69
rod outer segment membrane protein 1	AA444932	-1.7	1.69
T-cell death associated gene	W59335	-1.8	1.69
solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	AI391105	-1.6	1.69
RIKEN cDNA 0610025I19 gene	AA108741	-1.6	1.69
ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	AA003458	-1.7	1.69
RIKEN cDNA 1110018J23 gene	AA462012	-1.6	1.69
ESTs	AA475186	-1.8	1.69
ESTs	AI592302	-1.8	1.69
DNA methyltransferase (cytosine-5) 1	AA499666	-1.7	1.69
ESTs, Highly similar to UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2-17 KD [Caenorhabditis elegans]	AI508600	-1.7	1.69
RAS-like protein expressed in many tissues	AA466324	-1.7	1.69
RIKEN cDNA 5330433G13 gene	AA529300	-1.6	1.69
B-cell leukemia/lymphoma 6	AI464594	-1.9	1.69
ESTs	AA266447	-1.7	1.69
ELK1, member of ETS oncogene family	AI663752	-1.7	1.69
sphingomyelin phosphodiesterase 2, neutral	AA432637	-1.6	1.69
RIKEN cDNA 2610034E13 gene	AA399827	-1.6	1.69
ESTs, Moderately similar to KIAA0977 protein [H.sapiens]	AA125312	-1.6	1.69
ESTs, Highly similar to similar to human ankyrin 1(S08275) [H.sapiens]	AI120792	-1.7	1.98
DNA segment, Chr 15, Kozak 1	AW210138	-1.7	1.98
ESTs	AI552954	-1.6	1.98
DNA segment, Chr 6, ERATO Doi 349, expressed	AA500807	-1.7	1.98
ADP-ribosyltransferase 5	W12489	-1.6	1.98
protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha	AA261433	-1.6	1.98
RIKEN cDNA 1600012F09 gene	AA789636	-1.7	1.98
ryanodine receptor 2, cardiac	AA462877	-1.5	1.98
PCTAIRE-motif protein kinase 3	AA123333	-1.9	2.36
ESTs	AI605635	-1.6	2.36
gene trap ankyrin repeat	AA242653	-1.6	2.36
RIKEN cDNA 1010001P06 gene	AA512317	-1.6	2.36
ESTs, Moderately similar to unnamed protein product [H.sapiens]	AI536299	-1.6	2.36
basic FGF repressed, Zic binding protein	AA438130	-1.5	2.36
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	AI553043	-1.6	2.36
ESTs, Weakly similar to (defline not available 7506674) [C.elegans]	AA571365	-1.6	2.36
catenin alpha 1	AA434955	-1.5	2.36
RIKEN cDNA 6330514J04 gene	AI425845	-1.8	2.36
ESTs	AI390325	-1.7	2.36
transmembrane protein 6	AA718842	-1.7	2.36
ESTs	AA575550	-1.7	2.36
mitogen activated protein kinase 14	W78296	-1.6	2.36
ESTs	AI549703	-1.7	2.36
ESTs, Highly similar to ELONGATION FACTOR TU, MITOCHONDRIAL PRECURSOR [Bos taurus]	AI892239	-1.6	2.36
osteoglycin	AA518187	-1.5	2.36
ESTs, Moderately similar to dJ967N21.4 [H.sapiens]	AA638578	-1.5	2.36
RIKEN cDNA 1110020B03 gene	AA230387	-1.5	2.36
amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	AA016732	-1.6	2.36
adaptor protein complex AP-1, sigma 1	AA049247	-1.6	2.36
RIKEN cDNA 3110038L01 gene	AA546346	-1.5	2.36
EST AI425994	AA396777	-1.7	2.36

ESTs	AA388323	-1.7	2.36
ESTs	AA473209	-1.6	2.36
sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminyl 2,3-betagalactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase) F	AA790409	-1.5	2.36
cyclin D1	AA117547	-1.5	2.36
Mus musculus APC-binding protein EB2 mRNA, partial cds	AI323100	-1.5	2.36
RIKEN cDNA 5031439A09 gene	AA450518	-1.6	2.36
musculin	AI595213	-1.9	2.36
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	AI663904	-1.8	2.36
ESTs	AI592555	-1.8	2.36
RIKEN cDNA 0610043A03 gene	AA518560	-1.6	2.36
ESTs	AA003774	-1.6	2.36
ESTs	AI508480	-1.6	2.36
guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide	AA015481	-1.6	2.36
ESTs, Weakly similar to BRCA1-associated RING domain protein [M.musculus]	AA529326	-1.6	2.36
C-terminal binding protein 1	AA437639	-1.5	2.36
ESTs	AI390588	-1.6	2.36
von Hippel-Lindau binding protein 1	AA450464	-1.6	2.36
ESTs	AI604488	-1.6	2.36
ESTs	AA178388	-1.6	2.36
RIKEN cDNA 2810425J22 gene	AI551973	-1.7	2.36
ESTs	AA475858	-1.5	2.61
ESTs	AA450530	-1.5	2.61
ESTs	AI391308	-1.6	2.61
ESTs	AA607255	-1.5	2.61
ESTs	AI605673	-1.6	2.61
ESTs	AA636906	-1.6	3.79
ESTs	AI608143	-1.6	3.79
ESTs, Weakly similar to A55817 cyclin-dependent kinase p130-PITSLRE - mouse [M.musculus]	AA396195	-1.7	3.79
RAD21 homolog (S. pombe)	AI154347	-1.6	3.79
RIKEN cDNA 4833412N02 gene	AA606983	-1.5	3.79
ESTs	AA273297	-1.7	3.79
RIKEN cDNA 6330411F21 gene	AI154671	-1.7	3.79
GTP binding protein 1	AA386616	-1.5	4.13
wingless-related MMTV integration site 5A	AA388110	-2.0	4.13
adenylate cyclase 8	AI152525	-1.5	4.13
ESTs	AI152538	-1.7	4.13
ESTs, Weakly similar to cDNA EST yk325c7.5 comes from this gene [C.elegans]	AA624872	-1.9	4.13
YME1-like 1 (S. cerevisiae)	AA671297	-1.6	4.13
RIKEN cDNA 2700026H11 gene	AA451048	-1.5	4.13
ATPase, H+ transporting lysosomal (vacuolar proton pump), 9.2 kDa	AA755768	-1.7	4.13
fatty acid binding protein 5, epidermal	AA591215	-1.5	4.13
ESTs	AI390759	-1.7	4.13
programmed cell death 4	AA177698	-1.6	4.13
Public domain EST	AA163644	-1.6	4.13
lectin, galactose binding, soluble 6	AA674809	-1.6	4.13
ESTs	AA638368	-1.5	4.13
cyclin-dependent kinase 5	AI385450	-1.5	4.13
mesenchyme homeobox 2	AI324355	-1.7	4.13
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	AA691743	-1.7	4.13
ESTs	AA472082	-1.5	4.13
solute carrier family 31, member 1	AA606611	-1.7	4.13
small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10	AI158236	-1.5	4.13
Public domain EST	AA051479	-1.5	4.13
ESTs	AA138861	-1.7	4.13
DNA segment, Chr 9, Brigham & Women's Genetics 0185 expressed	AI390890	-1.8	4.13
ESTs	AA608224	-1.6	4.13
ESTs	AA289146	-1.7	4.90
RIKEN cDNA C920006C10 gene	AI591660	-1.5	4.90
plasminogen activator, urokinase	AA510298	-1.8	4.90

eleven-nineteen lysine-rich leukemia gene	AI121419	-1.6	4.90
ESTs	AA591081	-1.6	4.90
ESTs	AI425340	-1.6	4.90
fibroblast growth factor 1	AA261582	-1.5	4.90
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	AA087098	-1.6	4.90
yolk sac gene 2	W11483	-1.6	4.90
emerin	AA414844	-1.6	5.07
thymidylate kinase family LPS-inducible member	AI117832	-1.7	5.07
epidermal growth factor	AI326499	-1.6	5.07
wingless-related MMTV integration site 11	AA183414	-1.9	5.07
ESTs	AI152670	-1.7	5.07
calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 1	AA815611	-1.6	5.07
RAB9, member RAS oncogene family	AA212042	-1.5	5.07
ESTs	AI640067	-1.8	5.07
Public domain EST	AI154560	-1.6	5.07
H2.0-like homeo box gene	AI121405	-1.5	5.07
ESTs, Weakly similar to KIAA0167 protein [H.sapiens]	AA667334	-1.6	5.07
ESTs	AA000564	-1.6	5.07
ESTs	AI464600	-1.5	5.07
RIKEN cDNA 2900028O21 gene	AA451250	-1.6	5.07
glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 4	AA823200	-1.5	5.07
procollagen, type IX, alpha 1	W53670	-1.7	5.07
zinc finger protein 62	AA146501	-1.6	5.31
trefoil factor 3, intestinal	AI894059	-1.5	5.31
RIKEN cDNA 1110021E09 gene	AI509487	-1.5	5.31
Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4921528E07, full insert sequence	AI036466	-1.5	5.31
formin-like	AI509558	-1.7	5.31
ESTs, Highly similar to METHIONYL-TRNA SYNTHETASE [Bacillus stearothermophilus]	AI385460	-1.5	5.31
insulin-like 5	AA692587	-1.5	5.46
ESTs	AA399725	-1.5	5.46
ESTs	AI550977	-1.7	5.46
cleavage and polyadenylation specific factor 2, 100kD subunit	AA822789	-1.5	5.46
ESTs	AA178450	-1.5	5.46
ESTs	AA606601	-1.5	5.46
RIKEN cDNA 1700021K02 gene	AI587887	-1.6	5.46
RIKEN cDNA 3110003A22 gene	AA185989	-1.6	5.90
ESTs	AA124744	-1.5	5.90
RIKEN cDNA 4833414E09 gene	AA498682	-1.7	5.90
ESTs	W82016	-1.6	5.90
X-linked lymphocyte-regulated complex	AA623498	-1.6	6.76
RIKEN cDNA 5730552E08 gene	AI606549	-1.6	6.76
ESTs	AA107718	-1.6	6.76
a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	AI553108	-1.5	6.76
casein beta	AI157135	-1.6	6.76
ESTs	AA544570	-1.5	6.87
ESTs	AA177358	-1.5	6.87
ESTs	AA500978	-1.5	6.87
ESTs	AI429017	-1.5	6.87
ESTs	W34216	-1.5	6.87
ESTs	AA437812	-1.5	6.87
RIKEN cDNA 2610524K04 gene	AA474300	-1.6	7.51
ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 4 polypeptide	AA509743	-1.5	7.51
ESTs	AI450507	-1.5	7.51
ESTs, Highly similar to NPL4 PROTEIN [Saccharomyces cerevisiae]	AA020051	-1.5	7.51
ESTs	AI640053	-1.5	8.10
Doxorubicin-behandelt			

Gen Name	GenBank ID	Expressions-Ratio	FPR [%]
natriuretic peptide precursor type B	W12084	8.3	0.60
heat shock protein, 70 kDa 3	AA145895	20.9	0.60
heat shock protein, 70 kDa 1	AA445731	6.9	0.60
RIKEN cDNA 1810061110 gene	W35987	4.8	0.60
a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	AA711852	4.2	0.60
Down syndrome critical region homolog 1 (human)	AA450437	3.5	0.60
ESTs	AI627143	4.4	0.60
glucokinase activity	AI325384	3.8	0.60
Bcl2-like	AI323048	3.2	0.60
RIKEN cDNA 2010306G19 gene	AA518878	3.2	0.60
RIKEN cDNA 2810423O19 gene	AI391240	3.2	0.60
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	AI425818	2.9	0.60
ESTs, Weakly similar to unnamed protein product [H.sapiens]	AA444683	3.3	0.60
cardiac morphogenesis	AA501052	3.1	0.60
FK506 binding protein 5 (51 kDa)	W53680	2.8	0.60
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	AI326605	3.0	0.60
ESTs	W82565	2.7	0.60
heparin binding epidermal growth factor-like growth factor	AI595201	4.7	0.60
Public domain EST	AA184852	2.9	0.60
FBJ osteosarcoma oncogene	AA002910	5.6	0.60
RIKEN cDNA 1110033O09 gene	AA795793	2.7	0.60
nuclear factor, interleukin 3, regulated	AA060731	3.4	0.60
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	AA657278	2.6	0.60
RIKEN cDNA 2210401F01 gene	AI605613	2.4	0.60
DNA segment, Chr 9, Brigham & Women's Genetics 0185 expressed	AI390890	4.8	0.60
myelocytomatosis oncogene	AA608146	2.9	0.60
serum/glucocorticoid regulated kinase	AI120968	2.2	0.60
ESTs	AA529248	2.3	0.60
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 5	AA462037	2.2	0.60
pyruvate dehydrogenase kinase 4	AI322278	2.4	0.60
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	AA596779	2.2	0.60
ESTs	AA725941	2.3	0.60
heme oxygenase (decycling) 1	AI324438	2.2	0.60
Public domain EST	AA066442	2.1	0.60
RIKEN cDNA 1110058E16 gene	AI592069	2.3	0.60
RIKEN cDNA 2610028E05 gene	AA615286	2.2	0.60
S-adenosylmethionine decarboxylase 2	AA615119	2.0	0.60
heat shock protein, 86 kDa 1	AA529377	2.0	0.60
alcohol dehydrogenase family 1, subfamily A1	AA791665	2.3	0.60
ESTs, Highly similar to p53 regulated PA26-T2 nuclear protein [H.sapiens]	AA596529	2.1	0.60
cysteine rich protein 61	AA466852	3.5	0.60
phosphodiesterase 7A	AA265221	2.2	0.60
S-adenosylmethionine decarboxylase 1	AI552765	2.0	0.60
ESTs	AI627139	2.3	0.60
ESTs	AA822744	2.9	0.60
ESTs, Weakly similar to T17453 ERG-associated protein ESET - mouse [M.musculus]	AA197701	2.1	0.60
core promoter element binding protein	AA895718	1.9	0.60
ESTs	AA212925	2.0	0.60
interferon-related developmental regulator 1	AI324408	1.9	0.60
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	AI155236	2.0	0.60
plexin 2	AA212820	2.0	0.60
ankyrin-like repeat protein	AA792499	2.0	0.60
RIKEN cDNA 4933440H19 gene	AA387364	2.1	0.60
glutamine synthetase	AA450534	1.9	0.60
tissue inhibitor of metalloproteinase 3	AA145784	1.9	0.60
ESTs	AI451747	1.9	0.60
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	AA437931	2.0	0.60
branched chain aminotransferase 2, mitochondrial	AA387185	2.1	0.60
RIKEN cDNA 2610318G08 gene	AA596602	1.9	0.60

fumarylacetoacetate hydrolase	AI180932	1.9	0.60
purine-nucleoside phosphorylase	AW209875	1.8	0.60
RIKEN cDNA 5033421K01 gene	AI553048	2.3	0.60
glutamine synthetase pseudogene 1	AI019469	1.8	0.60
carbonic anhydrase 4	AA106894	1.8	0.60
transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	AI549669	1.9	0.60
plasma membrane associated protein, S3-12	AA711925	1.8	0.60
RecQ protein-like	AI390823	1.9	0.60
metallothionein 1	AA638765	1.7	0.60
cytochrome P450, 1b1, benz[a]anthracene inducible	AA267178	1.9	0.60
period homolog 2 (Drosophila)	AA475629	1.8	0.60
activating transcription factor 4	AA608326	1.8	0.60
Public domain EST	AA681693	1.9	0.60
enabled homolog (Drosophila)	AI893955	1.7	0.60
receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	AA063790	1.9	0.60
Kruppel-like factor 15	AA060858	1.7	0.60
neuronal tyrosine/threonine phosphatase 1	AA709718	2.2	0.60
myosin light chain, alkali, fast skeletal muscle	AA822257	1.7	0.60
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	W18822	1.7	0.60
ESTs	AI508523	2.0	0.60
cytochrome P450, 2b9, phenobarbital inducible, type a	AA656694	1.8	0.60
A kinase anchor protein 2	AA638739	1.7	0.60
ESTs	AA062427	1.6	0.60
purine-nucleoside phosphorylase	AI390585	1.8	0.60
laminin, gamma 2	AI390151	1.8	0.60
Public domain EST	AA501315	1.8	0.60
small inducible cytokine A9	AA646314	2.2	0.60
ESTs	AI153921	1.6	0.60
Tcfcp2-related transcriptional repressor 1	AA795144	1.6	0.74
MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	AA617224	1.7	0.74
ESTs	AA671194	1.7	0.74
dipeptidase 1 (renal)	AI323162	1.6	0.74
solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	AI120403	1.6	0.74
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	AA209882	1.8	0.74
metallothionein 2	W36474	1.6	0.74
Kruppel-like factor 2 (lung)	AI606037	1.6	0.74
ESTs	AA274740	1.7	0.74
prostaglandin D2 synthase (21 kDa, brain)	AA462585	1.7	0.74
Public domain EST	AA521693	1.8	0.74
xanthine dehydrogenase	AA472074	1.8	0.74
aquaporin 1	AA241281	1.7	0.74
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	AA517353	1.6	0.74
thrombospondin 1	AI180914	1.9	0.74
phospholipase c neighboring	W34154	1.8	0.74
solute carrier family 20, member 1	AW210425	1.6	0.74
ESTs	AA437577	1.6	0.86
ESTs, Moderately similar to T12543 hypothetical protein DKFZp434M154.1 [H.sapiens]	AI587963	1.6	0.86
microfibrillar associated protein 5	AA037995	1.6	0.86
ESTs	AI591743	1.6	0.86
bone morphogenetic protein 6	AA718365	1.6	0.86
meprip 1 alpha	AA290091	1.6	0.86
ESTs, Weakly similar to ELL MOUSE RNA POLYMERASE II ELONGATION FACTOR ELL [M.musculus]	AA545429	1.9	0.86
RIKEN cDNA 4632435C11 gene	AA690480	1.6	0.86
ESTs	AI430293	1.8	0.86
rhotekin	AA034678	1.6	0.86
ESTs	AI552207	1.8	0.86
RIKEN cDNA 5730438N18 gene	AA474460	1.7	1.26
transglutaminase 2, C polypeptide	AI892437	1.6	1.26
cytochrome P450, 2b10, phenobarbital inducible, type b	AI325330	1.8	1.26
double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1	AA116787	1.5	1.26
Fc receptor, IgG, low affinity III	AA105303	1.6	1.26
RIKEN cDNA 2310012M09 gene	AA108210	1.5	1.26
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	AI663904	1.6	1.26

four and a half LIM domains 1	AI326574	1.8	1.26
ESTs	AA675602	2.5	1.26
solute carrier family 31, member 2	AA760255	1.6	1.26
heat shock protein, 105 kDa	AA624532	1.5	1.26
ESTs	AI595618	1.9	1.26
ESTs	AI596897	1.6	1.26
ESTs	AA154838	1.6	1.26
heat shock protein cognate 70, testis	AA433639	1.6	1.26
ESTs	AI464795	1.7	1.26
nuclear factor, erythroid derived 2, like 3	AA871687	1.6	1.26
mucin 3, intestinal	AA688695	1.6	1.26
ESTs	AA466922	1.6	1.26
cyclin E	AA437868	1.6	1.26
ESTs	AA839578	1.6	1.39
aquaporin 8	AA272836	1.8	1.39
ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide	AA415192	1.5	1.39
polyomavirus enhancer activator 3	AA959284	1.8	1.39
ESTs	AA727504	1.6	1.39
RIKEN cDNA 1810033A19 gene	AA815772	1.6	1.39
ESTs	AI037598	1.7	1.39
homolog of human MLLT2 unidentified gene	AA549636	1.7	1.39
aplysia ras-related homolog B (RhoB)	AA437783	1.6	1.39
ESTs, Moderately similar to I38228 Shb protein [H.sapiens]	AA387935	1.5	1.39
alcohol dehydrogenase 1, complex	AI507919	1.7	1.39
immediate early response, erythropoietin 1	AA067146	1.5	1.39
fatty acid amide hydrolase	AA822583	1.6	1.39
RIKEN cDNA 9130011J04 gene	AA184207	1.5	1.39
ESTs	AA222016	1.5	1.39
RIKEN cDNA 2310034C04 gene	AA426833	1.6	1.39
RIKEN cDNA 1190002H23 gene	AA066016	1.5	1.39
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	AI894009	1.6	1.39
bone morphogenetic protein 15	AA422665	1.7	1.39
ESTs	AA289072	1.5	1.39
ESTs	AA574904	1.6	1.39
ESTs	AA549181	1.6	1.39
Public domain EST	AA866949	1.6	3.06
ESTs	AA519023	1.6	3.06
ESTs	AA237974	1.6	3.06
ESTs	AI430084	1.6	3.06
RIKEN cDNA 3021401A05 gene	AI181682	1.6	3.06
ESTs	AA675478	1.9	3.06
ESTs	AA002937	1.8	3.06
ESTs	AA619836	2.2	3.06
ESTs	AA211956	2.4	3.06
serine/threonine kinase 2	AA795165	1.5	3.06
ESTs	AA880056	1.9	3.06
ESTs	AA422617	1.6	3.06
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	AA114539	1.5	3.06
ESTs	AA547535	1.9	3.87
ESTs	AA426806	1.5	3.87
ESTs, Moderately similar to N-copine [M.musculus]	AA717161	1.6	3.87
solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	AA066694	1.6	3.87
ESTs	AA413651	2.0	3.87
ESTs	AA253844	1.6	3.87
interferon activated gene 204	AA472976	1.6	3.87
ESTs	AA683926	1.6	3.87
RIKEN cDNA 2810454G14 gene	AA619828	1.6	3.87
ESTs	AI573559	1.5	3.87
SNF1-like kinase	AA855274	1.5	3.87
myeloid differentiation primary response gene 116	AA684447	1.6	3.87
ESTs, Weakly similar to 2013347A huckebein gene [D.melanogaster]	AA415189	1.8	3.87
solute carrier family 4 (anion exchanger), member 8	AA684011	1.7	3.87
claudin 8	AA080175	1.5	3.87
Public domain EST	AW209264	1.5	3.87

ESTs, Weakly similar to G7A [M.musculus]	AI046955	1.5	5.27
ESTs	AI508703	1.6	5.27
frizzled homolog 4 (Drosophila)	AA717541	1.6	5.27
vascular cell adhesion molecule 1	AA189527	1.7	5.27
hypothetical protein, MNCb-4193	AA422756	1.8	5.27
keratin-associated protein 5-4	AA739024	1.7	5.27
ESTs	AA597125	1.5	5.27
ESTs	AI594378	1.5	5.27
selectin, lymphocyte	AA798766	1.6	5.27
cytochrome P450, 4a10	AA755385	1.6	5.27
ESTs, Moderately similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	AA684092	2.3	5.27
NTF2-related export protein 1	AA547141	1.6	5.27
glial cell line derived neurotrophic factor	W45748	1.8	5.27
ESTs	AI428586	1.7	5.27
ESTs	AA940445	1.5	6.36
ESTs	AA422810	1.9	6.36
RIKEN cDNA 2810013C04 gene	AA616343	1.6	6.36
RIKEN cDNA 2700050C19 gene	AA881328	1.5	6.36
ESTs	AI597095	1.7	6.36
protein tyrosine phosphatase, receptor type, T	AI390812	1.7	6.36
RIKEN cDNA 9430073N08 gene	AI604172	1.7	6.36
guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2	W34424	2.7	6.36
RIKEN cDNA 2200009H22 gene	AA204090	2.0	6.36
ESTs	AI019266	1.9	6.36
ESTs	AI594566	1.6	6.36
RIKEN cDNA 2900056N03 gene	AA163793	1.8	6.36
ESTs	AA546474	1.7	6.36
ESTs, Moderately similar to RRE1_HUMAN RAS-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1 [H.sapiens]	AA466934	1.8	7.84
diaphanous homolog 3 (Drosophila)	AA415402	1.7	7.84
ESTs	AA422198	1.5	7.84
uromodulin	AA089188	1.6	7.84
ESTs	AA547487	1.8	7.84
ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL MYELOID CELL LINE PROTEIN 6 [Homo sapiens]	AA209699	1.5	7.84
period homolog (Drosophila)	AA866683	1.5	7.84
ESTs	AI426638	1.7	7.84
kallikrein 26	W34620	1.6	7.84
ESTs	AA691094	1.6	7.84
apolipoprotein CII	AA617232	1.5	7.84
G1 to phase transition 2	AA218194	1.6	7.84
ESTs	AA763211	1.8	7.84
zinc finger protein 42	AA432569	2.4	7.84
RIKEN cDNA 0610012P18 gene	AI552731	1.8	9.13
cytochrome P450, 2a5	AA674177	1.9	9.13
ESTs	AA415361	1.5	9.13
keratin complex 1, acidic, gene 12	AA684158	1.8	9.13
DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 580, expressed	AA681114	2.8	9.13
ESTs	AA681098	1.8	9.13
intercellular adhesion molecule	W08586	1.5	9.13
ESTs, Weakly similar to RINI RAT RIBONUCLEASE INHIBITOR [R.norvegicus]	AA426919	1.6	9.13
ESTs	AA718696	1.8	9.13
RIKEN cDNA 1700025E21 gene	AA414286	1.7	9.13
ESTs	AA624059	1.5	9.13
thrombospondin 4	AA003452	1.6	9.13
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	W08730	1.6	9.13
ESTs	AA880559	1.5	9.13
plasmacytoma variant translocation 1	AA606860	1.5	9.13
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	AA914420	1.5	9.13
Public domain EST	AA466295	2.1	9.13
Public domain EST	AA549056	1.6	9.13
ESTs, Weakly similar to DRR1 [H.sapiens]	AI158650	1.5	9.13
RIKEN cDNA 0610007D04 gene	AA498574	1.5	9.13
ESTs	AA241939	1.6	9.13
RIKEN cDNA 2310012G06 gene	AA616984	1.7	9.13

troponin T3, skeletal, fast	AA770924	1.7	9.13
ESTs	AA000564	-3.0	0.60
RIKEN cDNA 1010001P06 gene	AA512317	-2.9	0.60
hemoglobin, beta adult major chain	W15809	-2.6	0.60
interferon-inducible GTPase	AA260490	-2.8	0.60
RIKEN cDNA 6530404A22 gene	AA529656	-3.5	0.60
ESTs, Moderately similar to F26L MOUSE 6PF-2-K/FRU-2,6-P2ASE LIVER ISOZYME [M.musculus]	AI529513	-2.4	0.60
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 2	AA123837	-2.7	0.60
hemoglobin, beta adult major chain	AA106071	-2.4	0.60
glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	AI324398	-2.6	0.60
S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)	AA255025	-2.4	0.60
calsequestrin 1	AA435278	-2.1	0.60
interferon-g induced GTPase	AA275144	-2.4	0.60
T-cell specific GTPase	AI060720	-2.2	0.60
WNT1 inducible signaling pathway protein 2	AA754979	-2.0	0.60
RIKEN cDNA 9430098E02 gene	AA754903	-2.0	0.60
hemoglobin Z, beta-like embryonic chain	AW209707	-2.0	0.60
cytochrome P450, 2d9	AI893895	-2.0	0.60
arachidonate 12-lipoxygenase	AA796544	-2.3	0.60
RIKEN cDNA 2400003M24 gene	AA882184	-2.1	0.60
ecotropic viral integration site 2	AA124623	-2.2	0.60
ESTs	AA107718	-2.1	0.60
RIKEN cDNA 4921532K09 gene	AI550556	-2.1	0.60
fibrillin 1	AW210317	-2.0	0.74
Socs-5	AI425448	-1.9	0.74
DNA segment, Chr 15, Kozak 1	AW210138	-1.8	0.74
RIKEN cDNA 2900019C14 gene	AA673894	-1.9	0.74
small inducible cytokine A12	AA174647	-2.2	0.74
regulator of G-protein signaling 2	AA221794	-1.8	0.74
ESTs	AA412912	-1.9	0.86
transferrin receptor	AA413490	-1.7	0.86
solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	AA607205	-2.1	0.86
ESTs	AA216849	-1.8	0.86
fatty acid binding protein 5, epidermal	AA591215	-1.8	0.86
tumor rejection antigen gp96	AA469667	-1.8	0.86
lectin, galactose binding, soluble 6	AA674809	-1.7	0.86
ESTs	AA415717	-1.8	0.86
RIKEN cDNA 2010004M01 gene	W98251	-1.7	0.86
glutathione S-transferase, theta 2	AA511089	-1.9	1.26
interferon gamma induced GTPase	AA596514	-1.7	1.26
matrix metalloproteinase 11	AI120903	-1.8	1.26
neutrophilic granule protein	AA060282	-2.2	1.26
RIKEN cDNA 3230402M22 gene	AA726855	-1.8	1.26
butyrophilin-like 2	AA199011	-1.7	1.26
splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS)	AI120315	-1.8	1.26
phosphodiesterase 4A, cAMP specific	AI510059	-1.8	1.26
DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 435, expressed	AA756177	-1.8	1.26
regulatory protein, T lymphocyte 1	AI614435	-1.7	1.39
heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)	AA450922	-1.7	1.39
integrin alpha 6	AA088968	-1.6	1.39
human EST 573010	AA755846	-1.7	1.39
adducin 3 (gamma)	AA142685	-1.7	1.39
histocompatibility 2, class II antigen E beta	AA792785	-1.7	1.39
ESTs	AI390325	-1.8	1.39
glycoprotein 49 B	AI894044	-1.6	3.06
histocompatibility 2, L region	AA538511	-1.7	3.06
interferon gamma inducible protein, 47 kDa	AA510689	-1.9	3.06
RIKEN cDNA 5730454C12 gene	AA161828	-1.7	3.87
RIKEN cDNA 1810033K05 gene	W41045	-2.1	3.87
ESTs	AI592278	-1.9	3.87
LIM domain binding 2	W44251	-1.7	5.27
ESTs, Weakly similar to PN0099 son3 protein [H.sapiens]	AA432428	-1.6	5.27
serine protease inhibitor 2-2	AA821980	-1.6	5.27
hemoglobin X, alpha-like embryonic chain in Hba complex	W56995	-1.7	5.27

RIKEN cDNA 1200013A08 gene	AA200877	-1.6	5.27
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2)	AA822485	-1.6	5.27
neuropilin	W44262	-1.6	6.36
immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	AA754696	-1.7	7.84
RIKEN cDNA 1810054O13 gene	W47900	-1.6	7.84
phosphodiesterase 1C	AA856411	-1.7	7.84
RIKEN cDNA 1300006L01 gene	AA521580	-1.6	9.13
ErbB4 knockout + Doxorubicin-behandelt			
Gen Name	GenBank ID	Expressions-Ratio	FPR [%]
RIKEN cDNA 2010306G19 gene	AA518878	2.8	1.52
S-adenosylmethionine decarboxylase 1	AI552765	2.0	1.52
interferon-related developmental regulator 1	AI324408	1.9	1.52
ESTs, Weakly similar to unnamed protein product [H.sapiens]	AA444683	3.1	1.52
ESTs	AA212925	2.0	1.52
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	AA437931	1.8	1.52
natriuretic peptide precursor type B	W12084	6.3	1.52
ESTs	AI451747	1.9	1.52
glucokinase activity	AI325384	3.7	1.52
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 5	AA462037	2.2	1.52
ankyrin-like repeat protein	AA792499	2.4	1.52
heat shock protein, 86 kDa 1	AA529377	1.9	1.52
ESTs	AA734158	3.4	1.52
a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	AA711852	3.5	1.52
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	W08730	2.0	1.52
period homolog 2 (Drosophila)	AA475629	2.3	1.52
purine-nucleoside phosphorylase	AW209875	1.7	1.52
metallothionein 1	AA638765	1.8	1.52
RIKEN cDNA 2210401F01 gene	AI605613	3.3	1.52
RIKEN cDNA 4632435C11 gene	AA690480	1.7	1.52
laminin, gamma 2	AI390151	1.7	1.52
ESTs	AI595145	1.6	1.52
matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein	W88093	1.7	1.52
serum/glucocorticoid regulated kinase	AI120968	2.0	1.52
RIKEN cDNA 4921519C19 gene	AI036797	2.6	1.52
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	W18822	1.9	1.52
ESTs	AI645199	2.6	1.52
cytochrome P450, 1b1, benz[a]anthracene inducible	AA267178	2.5	1.52
microfibrillar associated protein 5	AA037995	1.8	1.52
NPC derived proline rich protein 1	AA791966	1.7	1.52
mesothelin	AA673869	2.0	1.52
chloride channel calcium activated 1	AI640041	1.9	1.52
glutamine synthetase pseudogene 1	AI019469	1.7	1.52
cardiac morphogenesis	AA501052	2.4	2.05
alcohol dehydrogenase family 1, subfamily A1	AA791665	1.9	2.05
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	AI326605	2.7	2.05
ESTs, Weakly similar to Z177_HUMAN ZINC FINGER PROTEIN 177 [H.sapiens]	AA445023	1.5	2.05
calcium binding protein A11 (calgizzarin)	AA616998	1.5	2.05
zinc finger protein 26	AA170260	2.9	2.05
heat shock protein, 70 kDa 1	AA445731	3.6	2.05
ESTs	AA267882	1.5	2.05
RIKEN cDNA 9130011J04 gene	AA184207	1.4	2.05
ESTs	AI627143	3.4	2.05
ESTs, Weakly similar to 2013347A huckebein gene [D.melanogaster]	AA415189	1.4	2.05
ESTs	AA435317	1.4	2.05
heat shock protein, 70 kDa 3	AA145895	10.6	2.05
metallothionein 2	W36474	2.5	2.05
RIKEN cDNA 5730438N18 gene	AA474460	1.6	2.05
sequestosome 1	AA690750	1.4	2.05
ESTs	AA153663	1.5	2.05
RIKEN cDNA 2810454G14 gene	AA619828	1.8	2.05
ESTs	AA422771	1.5	2.05
RIKEN cDNA 1110033O09 gene	AA795793	2.1	2.05

ESTs	AI464593	2.0	2.05
ESTs	AI552317	1.4	2.05
ESTs	W82565	2.0	2.67
ESTs	AA189494	2.0	2.67
formin	AI173036	2.0	2.67
procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha 1 polypeptide	AA518751	1.4	2.67
ESTs	AI390603	1.4	2.67
Bcl2-like	AI323048	2.2	2.67
aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A4	AA122814	3.3	3.30
cytochrome P450, 39a1 (oxysterol 7alpha-hydroxylase)	AI451832	1.4	3.30
Public domain EST	AA435311	1.3	3.30
cytochrome P450, 2b10, phenobarbital inducible, type b	AI325330	2.3	3.30
RIKEN cDNA 2600015J22 gene	AA536695	1.4	3.30
centrin 1	AI326525	1.4	3.30
prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	W13004	1.3	3.30
S-adenosylmethionine decarboxylase 2	AA615119	1.6	3.30
aquaporin 1	AA241281	1.4	3.30
purine-nucleoside phosphorylase	AI390585	1.6	3.30
RIKEN cDNA 4731402B04 gene	AA546928	1.5	3.30
RIKEN cDNA 2610318G08 gene	AA596602	1.5	3.30
ribosomal protein S6	AI553232	1.4	3.30
natriuretic peptide precursor type A	AA755870	2.9	3.30
ESTs	AI591743	1.5	3.30
Fc receptor, IgG, low affinity III	AA105303	1.4	3.30
neurofilament, medium polypeptide	W64752	1.7	3.30
Public domain EST	AA422593	1.6	3.30
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	AA657278	1.9	3.30
ESTs	AA725941	1.8	3.30
transglutaminase 2, C polypeptide	AI892437	1.4	3.48
RIKEN cDNA 4921531D01 gene	AA538062	1.3	3.48
ESTs	AI646187	1.3	3.48
ESTs	AA438045	1.3	3.48
lymphocyte antigen 6 complex, locus C	AA762277	1.3	3.48
ESTs	AA545611	2.2	3.48
crystallin, mu	AA733693	1.4	3.48
ESTs	AA727504	1.4	3.48
small inducible cytokine A9	AA646314	1.9	3.48
heat shock 10 kDa protein 1 (chaperonin 10)	AA450526	1.2	3.48
BANP homolog	AA387967	1.4	3.48
decorin	AA755007	1.5	4.26
calpain 2	AI391241	1.3	4.26
RecQ protein-like	AI390823	1.7	4.26
tissue inhibitor of metalloproteinase 3	AA145784	1.7	4.26
phospholipase A2, group IIC	AA061920	1.7	4.26
glutamate-cysteine ligase , modifier subunit	AA008956	1.8	4.26
ESTs	AI592307	2.0	4.26
immediate early response, erythropoietin 1	AA067146	1.4	4.26
ninjurin 1	AI036381	1.3	4.26
odorant-binding protein Ia	AA822346	1.6	4.26
mannose receptor, C type 1	AA462138	1.5	4.26
hyaluronidase 2	W83533	1.4	4.26
ESTs	AI627139	1.6	4.26
RIKEN cDNA 1810061110 gene	W35987	5.5	4.26
ESTs	AA414733	1.4	4.26
vascular cell adhesion molecule 1	AA189527	1.3	4.26
bone morphogenetic protein 6	AA718365	1.3	4.26
ESTs	AA822744	3.3	4.26
myosin light chain, alkali, cardiac atria	AA756112	1.5	4.26
AMP deaminase 3	AA277972	1.3	4.26
ESTs	AA245289	4.5	4.26
ESTs	AA675478	2.0	4.26
ESTs, Weakly similar to MAJOR URINARY PROTEIN 4 PRECURSOR [M.musculus]	AI391171	4.5	4.26
RIKEN cDNA 5830472M02 gene	AA475590	1.4	4.26
ESTs	AA168416	3.2	4.26
transforming growth factor, beta induced, 68 kDa	AA268592	1.4	4.26
ESTs	AA475186	1.3	4.26
RIKEN cDNA 2610017M01 gene	AA117356	1.3	4.26
ESTs, Weakly similar to cDNA EST yk474g3.5 comes from this gene [C.elegans]	AA789810	1.9	4.26

hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	AI552130	1.2	4.26
xanthine dehydrogenase	AA472074	1.3	4.26
oncostatin receptor	AA265259	1.3	4.26
Public domain EST	AA066442	1.6	4.78
integral membrane protein 2	AA387218	1.3	4.78
ESTs	AA824068	1.3	4.78
actin-like 7b	AA064431	1.2	4.78
ESTs	AI463731	1.4	4.78
lectin, galactose binding, soluble 3	AA066647	1.7	4.78
wee 1 homolog (S. pombe)	AW209546	1.4	4.78
FMS-like tyrosine kinase 1	AI326556	1.4	4.78
matrix metalloproteinase 7	AA689037	1.9	4.78
SH3 domain protein 5	AA718587	1.3	4.78
RIKEN cDNA 5031422109 gene	AA087440	1.3	4.78
solute carrier family 20, member 1	AW210425	1.4	4.78
RIKEN cDNA 1700019G17 gene	AI466969	2.2	4.78
RIKEN cDNA 2310012M09 gene	AA108210	1.7	5.44
ESTs	AA415428	1.4	5.44
actin, alpha 1, skeletal muscle	AA770902	1.7	5.44
troponin T3, skeletal, fast	AA770924	3.6	5.44
ESTs	AA107637	1.3	5.44
Public domain EST	AA067214	1.4	5.44
ESTs	W98004	1.5	5.44
SAR1a gene homolog (S. cerevisiae)	AA066667	1.2	5.44
hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 9	AI425345	1.8	5.44
ESTs	AI153921	1.6	5.44
RIKEN cDNA 4933429E06 gene	AI425662	2.6	5.44
RIKEN cDNA 2610101J03 gene	AA536772	1.7	5.44
numb gene homolog (Drosophila)	AA596565	1.2	5.44
crystallin, alpha 2	AI325730	1.3	5.44
growth associated protein 43	AI323051	1.8	5.44
ESTs, Weakly similar to AF151865 1 CGI-107 protein [H.sapiens]	AA624597	1.8	5.44
RIKEN cDNA 1600021C16 gene	AA265101	1.4	5.44
ESTs, Weakly similar to MDP1 MOUSE MICROSOMAL DIPEPTIDASE PRECURSOR [M.musculus]	AA444538	1.4	5.44
ubiquitin-like 1	AA896203	1.2	5.44
ESTs, Moderately similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	AA684092	4.3	5.44
ESTs	AA422810	4.1	5.44
RIKEN cDNA 2600006O07 gene	AA079916	1.3	5.44
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor). member 1	AA727967	1.2	5.44
RIKEN cDNA 3930401B19 gene	AI390138	2.0	6.02
RIKEN cDNA 6330406I15 gene	AI552496	2.2	6.02
four and a half LIM domains 1	AI326574	1.5	6.02
ESTs, Moderately similar to KIAA0879 protein [H.sapiens]	AA474449	1.3	6.02
ESTs	AA684477	1.7	6.02
ESTs	AA434887	1.3	6.02
Public domain EST	AI156249	1.2	6.02
RIKEN cDNA 1300003P13 gene	AA623569	1.3	6.02
ESTs, Weakly similar to ELL MOUSE RNA POLYMERASE II ELONGATION FACTOR ELL [M.musculus]	AA545429	1.8	6.02
ESTs	AI197423	1.9	6.02
RIKEN cDNA 1300019I03 gene	AA600596	1.3	6.02
RIKEN cDNA 3110002K08 gene	AA469646	1.2	6.02
RIKEN cDNA 1810043M20 gene	AA589966	1.9	6.62
RIKEN cDNA 0610007P06 gene	AA106618	1.2	6.62
RIKEN cDNA 2010013H22 gene	AI592831	1.9	6.62
myelocytomatosis oncogene	AA608146	2.2	6.62
ESTs, Weakly similar to I48668 zinc finger protein 51 - mouse [M.musculus]	AI118879	1.5	6.62
ESTs	AA693297	1.2	6.62
ESTs	AI464653	1.8	6.62
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	AA217253	1.3	6.62
RIKEN cDNA 6330406P08 gene	AI594945	1.7	6.62
ESTs	AA451444	1.5	6.62
heat-responsive protein 12	AA106879	1.3	6.62
ESTs	W76731	8.2	6.62
RIKEN cDNA 2410004L22 gene	AI430652	1.4	6.62
ESTs	AI640056	2.6	6.62

T-box 15	AA517906	1.6	6.62
ESTs	A1664340	1.5	6.62
RIKEN cDNA 1110055A02 gene	AA416367	1.2	6.62
ESTs, Weakly similar to unknown [H.sapiens]	AA073247	1.3	6.62
Yamaguchi sarcoma viral (v-yes) oncogene homolog	AA606937	1.2	6.62
RIKEN cDNA 1110007F23 gene	AA815777	1.3	6.62
LIM homeobox protein 2	AA259281	1.3	6.62
DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 580, expressed	AA681114	1.3	6.62
RIKEN cDNA 1810009A17 gene	AA717025	1.4	6.62
cyclin-dependent kinase 2	AA413873	1.3	6.62
RIKEN cDNA 2810423O19 gene	A1391240	2.0	6.62
cytochrome c, somatic	A1892244	1.2	6.62
ESTs	AA500978	2.4	6.62
RIKEN cDNA 1700019N19 gene	AA066063	1.3	6.62
RIKEN cDNA 2610027H02 gene	AA624568	1.2	6.62
silica-induced gene 41	AA624487	1.4	6.62
mannosidase 2, alpha 1	AA414150	1.3	6.62
non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1	AA289435	1.4	6.62
t-complex testis expressed 1	W34143	1.4	6.62
sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila)	A1047561	2.1	6.62
kinesin family member 5B	A1508643	1.4	6.62
ESTs	AA606427	1.2	6.62
ESTs	A1552207	1.6	6.62
Kruppel-like factor 5	AA607027	1.6	6.62
ESTs	A1591893	2.1	6.62
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9	AA518954	1.4	6.62
transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	A1549669	1.6	6.62
chemokine orphan receptor 1	AA874277	1.3	6.62
ESTs	AA432563	1.3	6.62
ESTs	A1594426	2.8	6.62
ESTs, Highly similar to nonmuscle myosin heavy chain-B [R.norvegicus]	AA710484	4.1	6.62
annexin A4	W36433	2.2	6.62
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2	AA176009	1.2	6.62
ESTs	AA688795	1.3	6.62
Bcl-associated death promoter	W64107	1.3	6.94
ESTs, Moderately similar to AF231110 1 muscleblind [M.musculus]	AA106833	1.2	6.94
ESTs	A1550186	1.2	6.94
ESTs, Moderately similar to Pro-Pol-dUTPase polyprotein [M.musculus]	A1551391	1.4	6.94
RIKEN cDNA 1110056P05 gene	AA416264	1.3	6.94
Public domain EST	AA791769	1.3	6.94
ESTs	AA673522	1.2	6.94
ESTs	A1047049	1.3	6.94
thrombospondin 4	AA003452	1.5	6.94
small proline-rich protein 1A	AA028420	1.6	6.98
Public domain EST	AA097101	1.2	6.98
ESTs, Moderately similar to MHC-TLA-T13a [M.musculus]	A1173114	2.3	6.98
expressed in non-metastatic cells 4, protein (NM23-M4)(nucleoside diphosphate kinase)	A1892129	1.2	6.98
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	AA596779	1.6	6.98
ESTs	A1594566	1.3	6.98
ESTs	W33467	1.9	6.98
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	A1425818	1.9	6.98
ESTs	A1046527	1.4	6.98
Public domain EST	AA543848	1.2	6.98
angiotensin converting enzyme	A1036411	1.8	6.98
ESTs	AA183287	1.4	6.98
ESTs	AA764531	1.7	6.98
ESTs, Highly similar to PINCH PROTEIN [Homo sapiens]	A1593658	1.2	6.98
RIKEN cDNA 2700033A15 gene	AA693061	1.3	6.98
phosphodiesterase 7A	AA265221	1.6	6.98
ESTs, Highly similar to T08741 hypothetical protein DKFZp586G0518.1 [H.sapiens]	AA209628	1.3	6.98
RIKEN cDNA 2610511F20 gene	A1596789	1.4	6.98
Bcl2-associated athanogene 3	AA245702	1.3	6.98
RIKEN cDNA 2610028E05 gene	AA615286	2.0	6.98
ESTs	A1390388	3.7	6.98

ESTs, Weakly similar to hypothetical protein [H.sapiens]	AI551028	1.2	6.98
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter, member 15)	AI390319	2.0	6.98
RIKEN cDNA 2900002H16 gene	AA413600	1.2	6.98
ESTs, Weakly similar to MTR1_MOUSE	AA638747	1.4	6.98
MYOTUBULARIN-RELATED PROTEIN 1 [M.musculus]			
kinesin family member 5B	AA791685	1.3	6.98
ESTs, Weakly similar to C46027 neurotransmitter transporter - mouse [M.musculus]	AI506717	1.7	6.98
chitinase 3-like 1	W10705	1.6	6.98
glutathione peroxidase 1	AA562552	1.2	6.98
EST	AI481982	1.3	6.98
carboxyl ester lipase	AI876997	1.5	6.98
RIKEN cDNA 1600019O04 gene	AA437441	1.3	6.98
ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	AA608153	1.2	6.98
dipeptidase 1 (renal)	AI323162	1.3	6.98
tolloid-like	AI197263	1.4	6.98
RIKEN cDNA 1110018M03 gene	AI425707	1.5	6.98
tissue inhibitor of metalloproteinase	AA184223	1.2	6.98
thioredoxin-like (32kD)	AA066178	1.2	6.98
enabled homolog (Drosophila)	AI893955	1.6	6.98
dopachrome tautomerase	W29342	3.1	6.98
Public domain EST	AA681693	1.5	6.98
ESTs, Weakly similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	AI642419	1.3	6.98
ESTs, Weakly similar to CARG-BINDING FACTOR-A [Mus musculus]	AA655041	1.3	6.98
prion protein	AA656117	1.2	6.98
COMPLEMENT FACTOR H PRECURSOR	AA106098	1.3	6.98
RIKEN cDNA 4932442K08 gene	W62706	1.4	6.98
RIKEN cDNA 2310012G06 gene	AA616984	1.7	6.98
DNA primase, p49 subunit	AI324469	1.4	6.98
Mus musculus, Similar to phosphoserine phosphatase, clone MGC:7574, mRNA, complete cds	AA066981	4.8	6.98
G protein-coupled receptor 37	AA289047	1.4	6.98
RIKEN cDNA 2810003F23 gene	AI464648	2.5	6.98
pre-B-cell colony-enhancing factor	AA162217	1.3	6.98
actin, alpha, cardiac	AI325745	1.2	6.98
glutamine synthetase	AA450534	1.4	6.98
ESTs	AA537410	2.0	6.98
complement component 4 (within H-2S)	AA739125	1.2	6.98
SH3-binding domain glutamic acid-rich protein	AI120826	1.3	6.98
ESTs	AA266018	1.9	6.98
ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	AA855703	1.2	6.98
U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF), 35 kDa, related sequence 1	AA050756	1.8	7.60
fibrinogen-like protein 2	AI893899	4.7	7.60
guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 3	AI325613	1.2	7.60
plasma membrane associated protein, S3-12	AA711925	1.5	7.60
RIKEN cDNA 4921511116 gene	AA437668	4.0	7.60
ESTs, Moderately similar to RRE1_HUMAN RAS-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1 [H.sapiens]	AA466934	1.3	7.60
FK506 binding protein 5 (51 kDa)	W53680	2.1	7.60
malic enzyme, supernatant	AA067147	1.2	7.60
T-cell acute lymphocytic leukemia 1	AI390473	3.0	7.60
annexin A1	W17847	1.2	7.60
ESTs	AA509560	1.4	7.60
acyl-Coenzyme A thioesterase 3, mitochondrial	AI595148	1.3	7.62
ESTs, Moderately similar to AF231110 1 muscleblind [M.musculus]	AA068812	1.2	7.62
lymphoid blast crisis-like 1	AA770840	1.2	7.62
G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	W12945	1.2	7.62
rhotekin	AA034678	1.3	7.62
heat shock protein cognate 70, testis	AA433639	1.4	7.62
nuclear receptor coactivator 2	AA939852	1.7	7.62
elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1	AA726040	1.3	7.62
testis specific gene 1	AI046576	1.9	7.62
ESTs	AI390228	4.3	7.62
RIKEN cDNA 9430059D04 gene	AA072751	1.5	7.62

ESTs, Weakly similar to C1TC RAT C-1-TETRAHYDROFOLATE SYNTHASE, CYTOPLASMIC [R.norvegicus]	AI551722	1.4	7.62
Public domain EST	AA110044	1.3	7.62
chromobox homolog 1 (Drosophila HP1 beta)	AA823935	1.2	7.62
ESTs	AI594517	1.2	7.62
ESTs	AA547487	1.6	7.62
heme-binding protein	AA022130	1.5	7.62
RIKEN cDNA 3526402H21 gene	AA734109	1.2	7.62
ESTs	W53394	1.6	7.62
heat shock protein, 110 kDa	AA671121	1.2	7.62
hydroxysteroid dehydrogenase-3, delta<5>-3-beta	AA245848	1.7	7.62
hepatic nuclear factor 4	AI893936	1.8	7.62
ESTs	AI430641	2.3	7.62
pyruvate dehydrogenase kinase 4	AI322278	1.8	7.62
zinc finger protein 42	AA432569	3.3	7.62
RIKEN cDNA 6330412C24 gene	AI591753	1.3	7.62
RIKEN cDNA 1810003P21 gene	AA066615	1.4	7.62
cerebellar degeneration-related 2	AA438015	1.5	8.04
IG ALPHA CHAIN C REGION	AI481911	1.5	8.04
ESTs	AA415510	1.4	8.04
phosphatidylethanolamine binding protein	AA607128	5.8	8.04
ESTs	AA529248	1.5	8.04
RIKEN cDNA 4930426D05 gene	AI463758	2.6	8.04
phosphodiesterase 7B	AI006099	1.9	8.04
ESTs, Highly similar to SH3-containing protein p4015 [R.norvegicus]	AA396100	1.3	8.04
zinc finger protein 288	AA930334	1.2	8.04
gene trap ROSA 26, Philippe Soriano	AA178020	2.7	8.04
RIKEN cDNA A330103N21 gene	AI006445	1.4	8.04
procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha II polypeptide	AA388310	1.2	8.04
testis specific protein, Ddc8	AI037719	1.6	8.04
zinc finger protein 207	AA474132	1.2	8.04
ESTs	AA547137	1.3	8.04
ESTs	AA051010	1.4	8.04
cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3	AA230454	2.0	8.04
ESTs	AI592788	1.6	8.04
LIM and cysteine-rich domains 1	AA470244	1.5	8.04
ESTs	AA241939	1.8	8.04
profilin 2	AA474438	1.2	8.04
ESTs, Weakly similar to NPT1 MOUSE RENAL SODIUM-DEPENDENT PHOSPHATE TRANSPORT PROTEIN 1 [M.musculus]	AI552795	1.6	8.04
Jun proto-oncogene related gene d1	AA098137	1.2	8.04
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	AA105298	1.2	8.04
cofilin 1, non-muscle	AA065624	1.3	8.04
core promoter element binding protein	AA895718	1.4	8.04
keratin complex 1, acidic, gene 19	AA028346	1.2	8.04
RIKEN cDNA 2610033C09 gene	AA624606	3.0	8.04
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	AA437761	1.2	8.04
CD53 antigen	AA646061	1.2	8.04
transforming growth factor alpha regulated gene 4	AA450513	1.2	8.04
ESTs	AA606601	1.3	8.04
zinc finger protein 185	AI159217	1.8	8.04
dystrophin, muscular dystrophy	AA437900	1.2	8.04
endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	W08198	1.3	8.04
ESTs	AA166546	1.3	8.04
ESTs	AA189220	1.5	8.04
hippocampus abundant gene transcript 1	AA414014	1.4	8.04
solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	W34988	1.4	8.04
ESTs, Weakly similar to glycine tyrosine-rich hair keratin protein [M.musculus]	AA763224	1.3	8.04
ESTs	AA683639	1.3	8.04
complement factor H-related protein	AA244704	1.3	8.04
syntaxin binding protein 2	AA106765	1.2	8.04
chaperonin subunit 5 (epsilon)	AI325795	1.1	8.04
RIKEN cDNA 0910001O23 gene	AI550176	1.3	8.04
EST	AI481639	5.0	8.04

alkaline phosphatase 5	AA693081	1.3	8.04
ESTs, Highly similar to translation initiation factor IF2 [H.sapiens]	AA547684	1.2	8.04
sex-lethal interactor homolog (Drosophila)	AA624873	1.5	8.04
NTF2-related export protein 1	AA547141	1.2	8.04
homeo box A2	AA929366	1.8	8.04
defensin beta 1	AA065510	1.6	8.04
ESTs	AA597135	1.9	8.04
ESTs	AA174340	1.6	8.88
solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), member 1	AI508944	2.8	8.88
ESTs	AI594395	1.9	8.88
telomerase binding protein, p23	AA562974	1.2	8.88
carboxylesterase 1	AI451839	1.7	8.88
heat shock 70 kDa protein 4	AA645750	1.1	8.88
gamma-glutamyl hydrolase	AA451458	1.2	8.88
calcium binding protein, 39 kDa	AA450759	1.2	8.88
phosphatidylcholine transfer protein	AA066072	4.5	8.88
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	AA212150	1.2	8.88
RIKEN cDNA 2610017J16 gene	AA415408	1.3	8.88
ESTs	AA619836	1.6	8.88
Public domain EST	AA413765	1.3	8.88
B lymphoid kinase	AA204265	2.4	8.88
ESTs	AA450992	1.9	8.88
ESTs	AA789723	1.6	8.88
RIKEN cDNA 1110063B05 gene	AW210319	1.9	8.88
peroxiredoxin 1	AA245310	1.3	8.88
glutathione synthetase	AA536773	1.2	8.88
proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3	W12636	1.3	8.88
ESTs	AA798960	1.3	8.88
patched homolog 2	W40842	1.6	8.88
ESTs	W65070	1.6	8.88
FBJ osteosarcoma oncogene	AA002910	2.2	8.88
ESTs	AI464942	1.4	8.88
ESTs	AI594111	1.5	8.88
dystrobrevin alpha	AA386892	1.2	8.88
ligase I, DNA, ATP-dependent	AA684487	1.4	8.88
ESTs	AA692621	1.2	8.88
RIKEN cDNA 4933440H19 gene	AA387364	1.8	8.88
proviral integration site 1	AA108991	1.2	8.88
RIKEN cDNA 2700038B03 gene	AA414419	1.1	8.88
RIKEN cDNA 1810011O16 gene	AA217311	4.8	8.88
forkhead box A2	AA212144	1.5	8.88
close homolog of L1	AI527646	1.7	9.01
prostaglandin D2 synthase (21 kDa, brain)	AA462585	1.4	9.01
RIKEN cDNA 2010305C02 gene	AA473948	1.4	9.01
ESTs	AI429031	2.9	9.01
ESTs	AA681098	4.6	9.01
Public domain EST	AA473975	1.2	9.01
ESTs	AI595606	1.4	9.01
ESTs	AI646672	4.2	9.01
peroxisome proliferator activated receptor alpha	W10495	1.3	9.01
RIKEN cDNA 1700013G20 gene	AA555970	1.2	9.01
ESTs	AI604277	2.2	9.01
Mus musculus proteasome beta-subunit C5 (Psmb1) mRNA, partial cds	AA185248	1.4	9.01
coronin, actin binding protein 1A	AA140511	1.1	9.01
DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 585, expressed	AA254875	1.3	9.01
ESTs	AA791555	1.2	9.01
ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3 (Hu antigen C)	W83106	3.8	9.01
plexin 2	AA212820	1.5	9.01
protein C	W10700	2.2	9.01
RIKEN cDNA 9030418M05 gene	AA072834	1.2	9.01
golgi vesicular membrane trafficking protein p18	W18376	1.2	9.01
transducer of ErbB-2.1	AA166386	1.2	9.01
ESTs	AI152150	1.7	9.01
signal recognition particle receptor, B subunit	AI529445	2.2	9.01
ESTs	AA681211	1.2	9.01
ESTs, Highly similar to S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE GAMMA FORM [Rattus norvegicus]	AA555793	1.2	9.01

large tumor suppressor 2	W47897	1.2	9.01
RIKEN cDNA 2310050F24 gene	AA065739	1.1	9.01
schlafen 1	AA273820	1.4	9.01
RIKEN cDNA 2610036L11 gene	AW210432	1.6	9.01
poly (A) polymerase alpha	AA073307	1.4	9.01
ribosomal protein S15	AA600597	1.3	9.01
ESTs	AA062427	1.3	9.01
torsin family 3, member A	AA791729	1.2	9.01
ESTs	A1466982	1.9	9.01
cyclin G2	AA413576	1.2	9.01
ESTs	A1627109	1.6	9.01
ESTs, Weakly similar to nuclear dual-specificity phosphatase [H.sapiens]	AA619736	1.3	9.01
RIKEN cDNA 1810060K07 gene	AA517720	1.2	9.01
Public domain EST	AA413822	1.5	9.01
ESTs	AA547096	1.3	9.01
RIKEN cDNA 5033415K03 gene	A1592213	1.2	9.01
glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	A1892747	1.2	9.01
spermidine synthase	AA517328	1.7	9.01
ESTs	AA254541	1.4	9.01
src homology 2 domain-containing transforming protein D	A1425730	3.2	9.01
ESTs	AA711038	1.7	9.01
osteomodulin	A1157520	1.5	9.01
interferon activated gene 203	AA238257	1.4	9.01
trophoblast specific protein	AA220024	2.2	9.01
homer, neuronal immediate early gene, 2	AA434982	1.2	9.01
erythrocyte protein band 4.2	AA388664	2.2	9.01
ESTs	AA267319	1.4	9.01
Kruppel-like factor 15	AA060858	1.4	9.01
RIKEN cDNA 1810005K14 gene	AA450917	1.2	9.01
RIKEN cDNA 1110008B24 gene	AA437999	1.2	9.01
TEA domain family member 2	AA617316	2.4	9.01
telomeric repeat binding factor 2	AA098594	1.3	9.25
ESTs	AA423358	1.9	9.25
ethanol decreased 2	AA184893	1.2	9.25
conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	AA462677	1.2	9.25
RIKEN cDNA 2210013M04 gene	AA087651	1.2	9.25
zinc finger protein 216	AA437578	1.1	9.25
ESTs	AA200256	1.4	9.25
RIKEN cDNA 1200014J04 gene	AA087674	1.2	9.25
fumarylacetoacetate hydrolase	A1180932	1.4	9.25
immunoglobulin heavy chain 1 (serum IgG2a)	AA182334	1.4	9.25
ESTs, Weakly similar to matrin cyclophilin [R.norvegicus]	A1154653	2.3	9.25
leukotriene A4 hydrolase	A1324333	1.3	9.25
ESTs	A1594906	2.4	9.25
ESTs	AA756333	1.3	9.25
inhibin beta-B	AA791253	1.4	9.25
acetylcholine receptor epsilon	A1385975	1.4	9.25
Public domain EST	A1390725	1.3	9.25
uroporphyrinogen III synthase	AA061691	1.6	9.25
coagulation factor X	AA270769	1.5	9.25
ESTs	AA253967	1.3	9.25
RIKEN cDNA 3110023F06 gene	AA415629	1.2	9.25
ESTs	AA097941	1.3	9.25
ESTs	AA575550	1.2	9.25
ESTs	A1390606	2.6	9.25
paired related homeobox 2	W97877	1.4	9.25
zyxin	AA617310	1.9	9.25
trypsin 4	A1386046	1.3	9.25
ESTs, Weakly similar to CENE_HUMAN CENTROMERIC PROTEIN E [H.sapiens]	A1594295	1.4	9.25
ESTs, Highly similar to unnamed protein product [H.sapiens]	AA549656	1.3	9.25
ESTs, Highly similar to NR52 MOUSE ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR NR5A2 [M.musculus]	A1156982	2.6	9.25
COP9 (constitutive photomorphogenic, subunit 2 (Arabidopsis))	A1036503	1.2	9.25
inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145 kDa	AA125192	2.9	9.25
ESTs	A1430293	2.0	9.25
ESTs	A1596897	1.5	9.25
vanin 1	A1597120	1.4	9.25

ESTs	W34216	1.2	9.25
myogenic differentiation 1	AA437694	1.7	9.25
RIKEN cDNA 2810454G14 gene	AA673963	1.2	9.66
calpain 6	AA073358	1.4	9.66
ESTs	AA242024	1.8	9.66
ESTs	AA438010	1.1	9.66
interferon gamma receptor	A1158816	1.2	9.66
RIKEN cDNA 2410019A14 gene	AA422788	1.3	9.66
POU domain, class 5, transcription factor 1	AA624527	1.4	9.66
glutathione peroxidase 2	AA980349	1.2	9.66
DNA Segment, Chr 6, human D12S2489E	AA174479	1.9	9.66
ESTs	AA675566	1.4	9.66
poliovirus receptor-related 3	AA466550	6.2	9.66
heat shock protein, 105 kDa	AA624532	1.2	9.66
ESTs	AA061744	2.3	9.66
complement factor H-related protein	AA237589	1.3	9.66
RIKEN cDNA 4921524J17 gene	A1552488	1.4	9.66
ESTs	A1036198	2.5	9.66
U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF), 35 kDa, related sequence 2	AA388471	1.3	9.66
ESTs, Highly similar to p53 regulated PA26-T2 nuclear protein [H.sapiens]	AA596529	1.7	9.66
hypothetical protein, I54	AA261489	1.5	9.66
ESTs	A1463748	3.9	9.66
FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	AA210345	1.1	9.66
RIKEN cDNA 1110021E09 gene	AA106222	1.3	9.66
baculoviral IAP repeat-containing 6	AA547134	1.2	9.66
peripheral myelin protein, 22 kDa	W56983	1.2	9.66
RIKEN cDNA 1700012N19 gene	A1594303	1.2	9.66
three prime repair exonuclease 1	A1182180	1.2	9.66
RIKEN cDNA 9130023F12 gene	AA072758	2.0	9.66
ESTs	W47917	1.2	9.66
ESTs, Weakly similar to TKT MOUSE TRANSKETOLASE [M.musculus]	A1156310	1.3	9.66
heme oxygenase (decycling) 1	A1324438	1.5	9.66
ESTs, Weakly similar to T46358 hypothetical protein DKFZp434I0916.1 [H.sapiens]	AA183431	3.3	9.66
RIKEN cDNA 2700059C12 gene	A1892297	1.2	9.66
ESTs, Weakly similar to SODIUM/SULFATE COTRANSPORTER [R.norvegicus]	AA021940	1.6	9.66
ESTs, Weakly similar to C1q-related factor [M.musculus]	AA537246	1.7	9.66
RIKEN cDNA 2610020K06 gene	AA414079	1.3	9.66
RIKEN cDNA 2900026B15 gene	AA624525	1.7	9.66
ESTs	AA413869	1.2	9.66
ESTs	A1464778	-3.5	1.52
RIKEN cDNA 1010001P06 gene	AA512317	-2.7	1.52
histocompatibility 2, Q region locus 7	AA122791	-1.5	1.52
DNA segment, Chr 15, Kozak 1	AW210138	-1.8	1.52
RIKEN cDNA 2900055D14 gene	AA008331	-2.2	1.52
lectin, galactose binding, soluble 6	AA674809	-1.8	1.52
ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1	A1894000	-2.1	1.52
metallothionein 3	AA049749	-1.9	1.52
ESTs	A1117381	-1.6	1.52
ESTs	AA000564	-2.4	1.52
splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS)	A1120315	-1.7	2.05
RIKEN cDNA 3230402M22 gene	AA726855	-1.7	2.05
ESTs	AA760067	-1.6	2.05
ESTs	A1465811	-1.9	2.05
fibrillin 1	AW210317	-1.5	2.05
ESTs	A1120109	-1.7	2.05
RIKEN cDNA 5730568A12 gene	AA718881	-1.6	2.05
retinol binding protein 2, cellular	A1385457	-2.0	2.05
colony stimulating factor 1 (macrophage)	AA162153	-1.4	2.05
RIKEN cDNA 5730583A19 gene	A1509974	-1.5	2.05
interferon-inducible GTPase	AA260490	-2.5	2.05
ESTs	AA624553	-1.5	2.05
septin 6	A1122472	-1.8	2.05
nel-like 2 homolog (chicken)	AA003877	-1.9	2.05
ESTs	A1552476	-1.6	2.05
ESTs, Moderately similar to unc-93 related protein [M.musculus]	AA185873	-1.7	2.05

ESTs, Moderately similar to ZINC FINGER PROTEIN MFG1 [Mus musculus]	AA119564	-1.6	2.05
microsomal triglyceride transfer protein	AA276406	-1.9	2.05
ESTs, Highly similar to OOCYTE ZINC FINGER PROTEIN XLCOF28 [Xenopus laevis]	AA049357	-1.5	2.05
RIKEN cDNA 1300006L01 gene	AA521580	-1.6	2.05
ESTs	AA154872	-1.8	2.05
T-cell specific GTPase	AI060720	-1.8	2.05
lymphocyte antigen 6 complex, locus E	AI326722	-1.4	2.05
neuropilin	W44262	-1.4	2.05
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2)	AA822485	-1.5	2.05
ESTs	AA646765	-1.5	2.05
ESTs	AI553118	-1.6	2.05
regulator of G-protein signaling 2	AA221794	-1.6	2.05
ESTs	AI550151	-1.8	2.05
ESTs, Highly similar to calcium-independent alpha-latrotoxin receptor homolog 2 [R.norvegicus]	AI390472	-1.4	2.05
cold inducible RNA-binding protein	AA050300	-1.3	2.05
ESTs	AA545589	-1.5	2.05
ESTs	AA387017	-1.4	2.05
ESTs	W19015	-1.7	2.05
ESTs	AA107718	-1.6	2.05
ESTs	AA216849	-2.0	2.05
RIKEN cDNA 0610030H11 gene	AI391026	-1.4	2.05
RIKEN cDNA 2810432L12 gene	AA727248	-1.3	2.05
ESTs	AI425772	-1.7	2.05
RIKEN cDNA 0610009M14 gene	AI549681	-1.4	2.05
flotillin 2	AA444808	-1.3	2.05
huntingtin-associated protein 1	W81952	-1.7	2.05
phosphorylase kinase gamma	AA798637	-1.6	2.05
ESTs	AA616077	-1.8	2.05
apolipoprotein B editing complex 2	AA061902	-1.3	2.05
RIKEN cDNA 6330514J04 gene	AI425845	-1.4	2.05
nucleotide binding protein 1	AA152999	-1.3	2.05
Eph receptor A4	AI325333	-1.5	2.05
ESTs	AI614783	-1.7	2.05
Public domain EST	AA051479	-1.4	2.05
CD8beta opposite strand	AI594243	-1.3	2.05
natriuretic peptide receptor 1	W13098	-2.2	2.05
smoothelin	AA798974	-1.5	2.05
solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	AI391105	-1.4	2.05
RIKEN cDNA 3110031B13 gene	AA155249	-1.4	2.05
regulator of G-protein signaling 16	AA390086	-1.8	2.05
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	AI553043	-1.4	2.05
mage-d2 protein	AA210242	-1.4	2.05
glycoprotein 49 B	AI894044	-1.4	2.05
RIKEN cDNA 6330403N15 gene	AA215268	-2.1	2.05
ESTs	AA125010	-1.7	2.05
ESTs	AI428626	-1.8	2.05
potassium large conductance pH-sensitive channel, subfamily M, alpha member 3	AA072586	-1.4	2.05
Public domain EST	AI508714	-1.4	2.05
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	AA434922	-1.4	2.05
histocompatibility 2, T region locus 10	AA067069	-1.5	2.67
fatty acid binding protein 5, epidermal	AA591215	-1.5	2.67
ESTs, Weakly similar to PTPL1-associated RhoGAP [H.sapiens]	AA798970	-1.4	2.67
RIKEN cDNA 1100001I23 gene	AA666505	-1.4	2.67
ephrin B3	AA178037	-1.4	2.67
ESTs	AI596889	-1.3	2.67
RIKEN cDNA 1200009K17 gene	W75009	-1.3	2.67
ESTs	AI646624	-1.6	2.67
RIKEN cDNA 2310046B19 gene	AA217009	-1.3	2.67
ESTs	AA265096	-2.0	2.67
CD151 antigen	AA003005	-1.3	2.67
RIKEN cDNA 6130400H19 gene	AA881315	-1.8	2.67
regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein	AA146531	-1.3	2.67
apyrase 1, homolog (C. lectularius)	AI121485	-1.4	2.67

RIKEN cDNA 3632410F03 gene	AA881375	-1.6	3.30
ets variant gene 6 (TEL oncogene)	AA497592	-1.3	3.30
RIKEN cDNA 6530404A22 gene	AA529656	-2.4	3.30
programmed cell death 4	AA177698	-1.3	3.30
teratocarcinoma expressed, serine rich	AA116831	-1.3	3.30
RIKEN cDNA 2900019C14 gene	AA673894	-1.5	3.30
RIKEN cDNA 4930471A21 gene	AI606595	-1.5	3.30
protease (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	AA794081	-1.4	3.30
DNA segment, Human S2298E	AI509041	-2.0	3.30
ESTs	AA212102	-1.4	3.30
ESTs, Weakly similar to JAK3 MOUSE TYROSINE- PROTEIN KINASE JAK3 [M.musculus]	AI604265	-1.7	3.30
RIKEN cDNA 0910001L24 gene	AA260011	-1.4	3.30
histocompatibility 2, L region	AA538511	-1.4	3.30
ESTs	AA237735	-1.3	3.30
solute carrier family 4 (anion exchanger), member 3	AA855923	-1.3	3.30
DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 435, expressed	AA756177	-1.5	3.30
laminin, alpha 5	AA879966	-1.4	3.30
RIKEN cDNA 1700037H04 gene	AI552950	-1.3	3.30
ESTs	AI036406	-1.7	3.30
ESTs	AI549703	-1.4	3.30
0-6-methylguanine-DNA methyltransferase	AA097896	-1.4	3.30
RIKEN cDNA 2610028M21 gene	AA863680	-1.3	3.30
myosin VIIa	AI019905	-1.5	3.30
ESTs	AA189409	-1.5	3.30
ESTs, Weakly similar to collagen alpha 1 type X [R.norvegicus]	AI019893	-1.4	3.30
heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)	AA450922	-1.5	3.30
myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	AA089025	-1.4	3.30
RIKEN cDNA 2010004M01 gene	W98251	-1.5	3.30
semaF cytoplasmic domain associated protein 2	AA691592	-1.6	3.30
ephrin B3	AI510011	-1.3	3.30
ESTs	AA386845	-1.5	3.30
ESTs	AA543690	-1.3	3.30
myocyte enhancer factor 2C	AI325323	-1.4	3.48
ESTs, Weakly similar to alpha glucosidase II, alpha subunit [M.musculus]	AI592178	-1.7	3.48
ESTs	AI550098	-1.8	3.48
recombination activating gene 1 gene activation	W71636	-1.3	3.48
ESTs	AA003923	-1.5	3.48
ESTs	AI645441	-1.3	3.48
Public domain EST	AA612377	-1.2	3.48
nitric oxide synthase 3, endothelial cell	AA177240	-1.3	3.48
ESTs	AA118384	-1.5	3.48
protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	AI528928	-1.7	3.48
ecotropic viral integration site 2	AA124623	-1.9	3.48
sialyltransferase 4C (beta-galactosidase alpha-2,3- sialyltransferase)	AA798202	-1.4	3.48
ESTs, Highly similar to rA1 [R.norvegicus]	W54651	-1.5	3.48
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	AA049003	-1.5	3.48
ESTs	AI194684	-1.9	3.48
RIKEN cDNA 4933433B15 gene	AA510671	-1.3	3.48
RIKEN cDNA 2610002D05 gene	AA545032	-1.2	3.48
syntaxin binding protein 1	AA004089	-1.3	4.26
angiotensinogen	AA571053	-1.5	4.26
ESTs	AA797632	-1.8	4.26
RIKEN cDNA 2610034E13 gene	AA399827	-1.4	4.26
early B-cell factor	AA543172	-1.5	4.26
iroquois related homeobox 3 (Drosophila)	AA268059	-1.6	4.26
calreticulin	AA562976	-1.3	4.26
ESTs	AA981343	-1.4	4.26
calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	AA939631	-1.2	4.26
ESTs	AI645157	-1.3	4.26
prenylated SNARE protein	AI020451	-1.3	4.26
ESTs	AA450488	-1.3	4.26
ESTs	AI428744	-1.9	4.26
stromal cell derived factor 1	AA066069	-1.3	4.26
vascular endothelial zinc finger 1	AA874240	-1.3	4.26
Public domain EST	AA199056	-1.4	4.26
RIKEN cDNA 3110031B13 gene	AI595033	-1.3	4.26

RIKEN cDNA 2610009E16 gene	AA122581	-1.3	4.26
NK6 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)	AA762709	-1.5	4.26
ESTs, Weakly similar to myosin-binding C-protein [R.norvegicus]	AA123061	-1.4	4.26
ESTs, Weakly similar to B48205 All-1 protein -GTE form - mouse [M.musculus]	AI122193	-1.3	4.26
ESTs	AI592084	-1.8	4.26
laminin, beta 2	AA048030	-1.2	4.26
human EST 573010	AA755846	-1.4	4.26
t-complex testis-expressed 3	AA414787	-1.3	4.26
ESTs, Highly similar to PROBABLE SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE YIL095W [Saccharomyces cerevisiae]	AA036255	-1.4	4.26
splicing factor 3a, subunit 2, 66kD	AI323047	-1.3	4.26
small inducible cytokine A8	AI604201	-1.4	4.26
RIKEN cDNA 4933400E14 gene	AA867162	-1.5	4.26
RIKEN cDNA 3010033I09 gene	AI591914	-1.5	4.26
dystrophia myotonica kinase, B15	AA050380	-1.2	4.26
ESTs	AI530648	-1.4	4.26
intestinal cell kinase	AI530567	-1.6	4.26
RIKEN cDNA 2810021M11 gene	AA771616	-1.7	4.26
selenium binding protein 1	W77429	-1.3	4.26
RIKEN cDNA 1600012F09 gene	AA789636	-1.2	4.26
ESTs	AI592302	-1.3	4.26
septin 1	W16222	-1.6	4.26
ESTs	AI508699	-1.7	4.26
FK506 binding protein 4 (59 kDa)	AA671029	-1.3	4.26
vesicle-associated membrane protein 2	AA014530	-1.3	4.26
gene trap ankyrin repeat	AA242653	-1.2	4.26
RIKEN cDNA 2310046G15 gene	AI536198	-1.4	4.26
ESTs	AA415717	-1.5	4.26
ESTs	AI509615	-1.3	4.26
thromboxane A synthase 1, platelet	AA821616	-1.5	4.26
CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	AA791990	-1.2	4.26
activin receptor IIB	AA617503	-1.5	4.26
ESTs	AA184025	-1.5	4.26
ESTs, Moderately similar to interferon-g induced GTPase [M.musculus]	AA608395	-1.5	4.26
target of myb1 homolog (chicken)	AA727299	-1.3	4.26
procollagen, type IV, alpha 1	AA760135	-1.3	4.26
ESTs	AA793372	-1.4	4.26
RAB23, member RAS oncogene family	AI573485	-1.6	4.26
RIKEN cDNA 2210410L06 gene	AI536309	-2.2	4.26
eosinophil-associated ribonuclease 3	AA124831	-1.6	4.26
vascular endothelial growth factor B	W50682	-1.2	4.26
immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	AA754696	-1.5	4.26
ESTs	AI428661	-1.2	4.26
ESTs, Highly similar to T00353 hypothetical protein KIAA0697 [H.sapiens]	AA497520	-1.4	4.26
ESTs, Highly similar to SU(VAR)3-9 PROTEIN [Drosophila melanogaster]	W64167	-1.3	4.26
ESTs	AI509398	-1.6	4.26
RIKEN cDNA 1110001I24 gene	AA068436	-1.2	4.26
RIKEN cDNA 1810059G22 gene	AA437807	-1.3	4.26
CD 81 antigen	AA276336	-1.2	4.26
ESTs	AA184357	-1.6	4.26
histocompatibility 2, T region locus 23	AI098976	-1.7	4.26
coxsackievirus and adenovirus receptor	AA560303	-1.7	4.26
G protein gamma 3 linked gene	AA067122	-1.2	4.78
matrix metalloproteinase 15	AA726630	-1.3	4.78
surfeit gene 4	AA606969	-1.2	4.78
ESTs	AI390230	-1.6	4.78
calcium channel beta 3 subunit	W54062	-1.4	4.78
synaptophysin	AA716807	-1.2	4.78
ESTs, Moderately similar to CYTOCHROME P450 IVF3 [Homo sapiens]	W64560	-1.4	4.78
N-acetylglucosamine kinase	AA061835	-1.5	4.78
ESTs, Weakly similar to polypeptide GalNAc transferase-T1 [M.musculus]	AA611977	-1.4	4.78
ESTs	AA080122	-1.3	4.78
ESTs	AA510688	-1.3	4.78

ESTs	AA119030	-1.5	4.78
nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage	AA512708	-1.5	4.78
RIKEN cDNA 1110039C07 gene	AI450518	-1.3	4.78
zinc finger protein 46	AA269904	-1.4	4.78
linker of T-cell receptor pathways	AI553101	-1.4	4.78
protein tyrosine phosphatase 4a3	W13832	-1.3	4.78
transcription factor E2a	W77622	-1.3	4.78
ESTs	AA546740	-1.8	4.78
ESTs	AA426902	-1.3	4.78
ESTs	AI530453	-1.6	4.78
ESTs, Highly similar to AF214737 1 C9orf10a [H.sapiens]	AA106962	-1.4	5.44
RIKEN cDNA 2410016A19 gene	AA437947	-1.6	5.44
ESTs	AI427062	-1.2	5.44
GTP binding protein 1	AA386616	-1.3	5.44
RIKEN cDNA 1810036J22 gene	AI551485	-1.3	5.44
RIKEN cDNA 2210013I18 gene	AA386910	-1.3	5.44
ESTs, Weakly similar to SH3B_MOUSE SH3 DOMAIN-BINDING GLUTAMIC ACID-RICH PROTEIN (SH3BGR PROTEIN) [M.musculus]	AA771615	-1.5	5.44
ESTs	AA764465	-1.2	5.44
DNA segment, Chr 2, Brigham & Women's Genetics 1423 expressed	W83739	-1.3	5.44
ESTs, Highly similar to dJ323M22.2 [H.sapiens]	AA571907	-1.3	5.44
plexin 1	AA414276	-1.8	5.44
ESTs	AA041819	-1.9	5.44
mini chromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)	AW210222	-1.3	5.44
Mus musculus reticulon 3 (Rtn3) mRNA, complete cds	AA450462	-1.2	5.44
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	AA517184	-1.4	5.44
ESTs	AA444220	-1.4	5.44
ubiquitin specific protease 18	AA396056	-1.4	5.44
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	AA087098	-1.5	5.44
histocompatibility 2, D region locus 1	AI594174	-1.3	5.44
serum response factor	AA415341	-1.2	6.02
RIKEN cDNA 2310003C10 gene	AA123484	-1.4	6.02
ESTs	AA472082	-1.2	6.02
faciogenital dysplasia homolog	AA437519	-1.4	6.02
RIKEN cDNA 2610018O07 gene	AA738934	-1.3	6.02
ESTs, Weakly similar to putative phosphoinositide 5-phosphatase type II [M.musculus]	AA267017	-1.2	6.02
RIKEN cDNA 1700020E22 gene	AI430413	-1.2	6.02
ESTs	AA162996	-1.4	6.02
Ia-associated invariant chain	AA759679	-1.3	6.02
signal recognition particle receptor, B subunit	AA671503	-1.2	6.02
ESTs	AI605635	-1.4	6.02
DNA cross-link repair protein (S. cerevisiae)	AA122530	-1.3	6.02
phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)	AA033042	-2.4	6.02
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3	AI594932	-1.5	6.02
N-acylsphingosine amidohydrolase 2	AI592172	-1.4	6.02
RIKEN cDNA 1700123A16 gene	AA458440	-1.3	6.02
cleft lip and palate associated transmembrane protein 1	AA619756	-1.2	6.02
caveolin, caveolae protein, 22 kDa	AA798948	-1.2	6.02
caspase 6	AA183198	-1.2	6.02
POU domain, class 2, transcription factor 1	AA711419	-1.5	6.02
RIKEN cDNA 2010004B12 gene	AA616180	-1.7	6.02
ESTs	AA116742	-1.2	6.02
RIKEN cDNA 9130019O22 gene	AA000018	-1.2	6.02
butyrophilin-like 2	AA199011	-1.4	6.02
ESTs	AI530538	-1.5	6.02
ESTs, Weakly similar to UBP2_MOUSE UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE 2 (UBIQUITIN THIOLESTERASE 2) (UBIQUITIN-SPECIFIC PROCESSING PROTEASE 2) (DEUBIQUITINATING ENZYME 2) (41 KDA UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE) [M.musculus]	AA760172	-1.5	6.02
FMS-like tyrosine kinase 3 ligand	AI159345	-1.5	6.02
RIKEN cDNA 2510039O18 gene	AA727383	-1.2	6.62
DNA segment, Chr 16, human D22S1738E	AI020447	-1.3	6.62
serine protease inhibitor 1-5	W13979	-1.6	6.62

ESTs	AA879701	-1.2	6.62
RIKEN cDNA 2700063A19 gene	AA537130	-1.3	6.62
pale ear	AA600571	-1.3	6.62
RIKEN cDNA 1700001E04 gene	AI595533	-1.3	6.62
ESTs	AA589092	-1.3	6.62
mitogen activated protein kinase 14	AA549577	-1.2	6.62
RIKEN cDNA 2610101M19 gene	AA120675	-1.4	6.62
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	AA727208	-1.2	6.62
breast cancer 2	AA123045	-1.2	6.62
ESTs	AA869784	-1.3	6.62
vitronectin	AA980366	-1.2	6.62
myxovirus (influenza virus) resistance 1	AA138836	-1.5	6.62
ESTs, Highly similar to GASTRULA ZINC FINGER PROTEIN XLCGF58.1 [Xenopus laevis]	AA154358	-1.2	6.62
interferon consensus sequence binding protein	AI386405	-1.4	6.62
ESTs	AI604488	-1.5	6.62
ESTs	AI183169	-1.5	6.62
ESTs	AA146572	-1.3	6.62
thioether S-methyltransferase	W18463	-1.3	6.62
ephrin A1	AA738854	-1.2	6.62
ESTs	AI508692	-1.2	6.62
ESTs	AI390830	-1.4	6.62
RIKEN cDNA 2810403B03 gene	AA461681	-1.5	6.62
NADH dehydrogenase flavoprotein 1	AA051567	-1.2	6.62
distal-less homeobox 1	AA437933	-1.3	6.62
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6	AA638277	-1.2	6.62
RIKEN cDNA 1300003A17 gene	AI508487	-1.3	6.62
interferon activated gene 203	AA399859	-1.4	6.62
antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	AI322380	-2.6	6.62
RIKEN cDNA 2610024P03 gene	AI036374	-1.3	6.62
RIKEN cDNA 2600009M07 gene	AA756009	-1.2	6.62
ESTs, Highly similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	AA616549	-1.5	6.62
FSDH region gene 1	AW209777	-1.3	6.62
ESTs	AA881395	-1.3	6.62
ESTs, Weakly similar to non-receptor protein tyrosine kinase Ack [M.musculus]	AA815521	-1.3	6.62
ESTs, Weakly similar to ANKYRIN, BRAIN VARIANT 2 [Homo sapiens]	AA867157	-1.6	6.62
epsin 1	AA011791	-1.4	6.62
adducin 3 (gamma)	AA142685	-1.3	6.62
phospholipase D2	W61990	-1.2	6.62
lymphocyte antigen 68	AA145088	-1.3	6.62
inositol polyphosphate phosphatase-like 1	AA711654	-1.2	6.62
nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	AA220156	-1.3	6.94
vacuolar protein sorting 45 (yeast)	AI324447	-1.2	6.94
ESTs, Highly similar to AF257319 1 SH3-containing protein SH3GLB2 [H.sapiens]	AA123176	-1.3	6.94
Public domain EST	AI466577	-1.2	6.94
X-linked myotubular myopathy gene 1	AI121593	-1.3	6.94
ESTs	AI592555	-1.3	6.94
RIKEN cDNA 1700037C18 gene	AA063830	-1.4	6.94
ESTs, Highly similar to DNA-REPAIR PROTEIN COMPLEMENTING XP-B CELLS HOMOLOG [Mus musculus]	AI509373	-1.2	6.94
transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	AI098476	-1.6	6.94
Public domain EST	AI549621	-1.2	6.94
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	AI509048	-1.2	6.94
DNA segment, Chr 4, Wayne State University 24, expressed	AI595325	-1.4	6.94
cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2	AI892132	-1.2	6.94
ESTs	AA543485	-1.4	6.94
ESTs	AI645262	-1.3	6.94
RIKEN cDNA 2010004N24 gene	AW210416	-1.3	6.94
vesicle-associated membrane protein 1	AI450533	-1.4	6.94
bone morphogenetic protein 1	AA000813	-1.4	6.94
nuclear transcription factor-Y gamma	AA073194	-1.2	6.94
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 1	AA606845	-1.4	6.94

ESTs, Highly similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	AA145093	-1.5	6.94
Socs-5	AI425448	-1.5	6.94
FXVD domain-containing ion transport regulator 1	AA002987	-1.2	6.94
ESTs	AA867614	-1.2	6.94
myeloid-associated differentiation marker	AA606711	-1.2	6.94
RIKEN cDNA 2700026H11 gene	AA451048	-1.2	6.94
histocompatibility 2, class II antigen E beta	AA792785	-1.4	6.94
phospholipase C-like protein	AA522203	-1.2	6.94
platelet derived growth factor, alpha	AI893970	-1.5	6.94
Y box protein 1	AA450785	-1.2	6.94
regulatory protein, T lymphocyte 1	AI614435	-1.6	6.94
RIKEN cDNA 4931420H10 gene	AA445521	-1.3	6.94
ESTs, Weakly similar to S28183 aryl sulfotransferase [M.musculus]	AI595193	-1.2	6.94
polypyrimidine tract binding protein	AA549391	-1.2	6.94
RIKEN cDNA 1500031M19 gene	AI594067	-1.4	6.94
interferon gamma induced GTPase	AA596514	-1.3	6.94
RIKEN cDNA 3000003F02 gene	AI613612	-1.8	6.94
sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminy 2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase) B	AA444639	-1.2	6.94
neighbor of Punc E11	AA177505	-1.2	6.94
peptidylprolyl isomerase C	AA212126	-1.2	6.94
Mus musculus Gdi-1 mRNA for RhoGDI-1, complete cds	AA105950	-1.2	6.94
RIKEN cDNA 2610209L21 gene	AA873958	-1.2	6.94
arachidonate 12-lipoxygenase	AA796544	-1.6	6.94
procollagen, type IV, alpha 2	W53787	-1.2	6.94
insulin-like growth factor 2 receptor	AA755961	-1.2	6.94
GTF2I repeat domain-containing 1	AA874222	-1.3	6.94
RIKEN cDNA 2310001A20 gene	AA549326	-1.2	6.94
ESTs, Weakly similar to transin-1 [M.musculus]	AA716836	-1.5	6.94
RIKEN cDNA C330026P08 gene	AA414248	-1.6	6.94
suppressor of Lec15 homolog (C.griseus)	AA254930	-1.3	6.94
RIKEN cDNA 2410001E19 gene	AA387252	-1.2	6.94
pyruvate dehydrogenase 2	AA399773	-1.3	6.94
RIKEN cDNA 1300018P11 gene	AA690645	-1.6	6.94
cathepsin H	W17422	-1.3	6.98
ESTs	AA420047	-1.4	6.98
RIKEN cDNA 1190005P08 gene	AA606873	-1.2	6.98
RIKEN cDNA 9030612K14 gene	AA185231	-1.2	6.98
RIKEN cDNA 9130014I08 gene	AA612076	-1.2	6.98
ESTs, Weakly similar to T00025 PSD-95 binding protein - rat [R.norvegicus]	AI464317	-1.5	6.98
sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide	AI156705	-1.6	6.98
RIKEN cDNA 1200017E07 gene	AA072083	-1.2	6.98
feminization 1 a homolog (C. elegans)	W14831	-1.4	6.98
RIKEN cDNA 2810451A06 gene	AI593610	-1.6	6.98
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	AI892400	-1.2	6.98
insulin-like growth factor binding protein 1	AI892189	-1.5	6.98
ESTs	W14850	-1.4	6.98
ESTs, Weakly similar to (defline not available 2131682) [S.cerevisiae]	AA600536	-1.2	6.98
ESTs	AA185212	-1.2	6.98
ESTs	AI549693	-1.4	6.98
ESTs	AI121941	-1.4	6.98
ESTs, Moderately similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	AI592809	-1.5	6.98
hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 7	AI154030	-1.2	6.98
ESTs, Weakly similar to myosin-Va [R.norvegicus]	AI121707	-1.5	6.98
ESTs, Weakly similar to I48722 zinc finger protein - mouse [M.musculus]	AI530568	-1.3	6.98
ESTs	W82199	-1.5	6.98
ESTs, Highly similar to KIAA0456 protein [H.sapiens]	AI605614	-1.4	6.98
laminin B1 subunit 1	AI551931	-1.2	6.98
ESTs	AA874187	-1.3	6.98
ESTs, Weakly similar to T46257 hypothetical protein DKFZp761O031.1 [H.sapiens]	AI614843	-1.3	6.98
double C2, gamma	AA467531	-1.2	6.98
mannose-6-phosphate receptor, cation dependent	AA638917	-1.2	6.98

RIKEN cDNA 0610039P13 gene	AA200703	-1.4	6.98
engrailed 1	AA711901	-1.5	6.98
kinase insert domain protein receptor	W85664	-1.3	6.98
mitogen-activated protein kinase 7	A1430199	-1.3	6.98
ESTs, Weakly similar to T15823 hypothetical protein C52E12.3 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [<i>C.elegans</i>]	AA591537	-1.2	6.98
Mus musculus unknown protein mRNA, partial cds	AA182981	-1.3	6.98
RIKEN cDNA 4931406I20 gene	AA612147	-1.2	7.60
annexin A6	AA671168	-1.2	7.60
ESTs, Weakly similar to F-box protein FBX13 [<i>M.musculus</i>]	AA498791	-1.3	7.60
syntrophin, basic 1	A1180768	-1.4	7.60
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2	W57231	-1.3	7.60
ESTs	A1550101	-1.6	7.60
ESTs	AA399725	-1.4	7.60
ESTs, Highly similar to KIAA1223 protein [<i>H.sapiens</i>]	AA068501	-1.2	7.60
ubiquitin-conjugating enzyme 4	AA591129	-1.2	7.60
RIKEN cDNA 2610304F09 gene	AW210206	-1.3	7.60
myosin Vb	A1020338	-1.2	7.60
eleven-nineteen lysine-rich leukemia gene	A1121419	-1.3	7.60
dual specificity phosphatase 10	A1429029	-1.5	7.60
RIKEN cDNA 6530406A20 gene	AA739088	-1.2	7.60
ESTs, Weakly similar to cDNA EST yk325c7.5 comes from this gene [<i>C.elegans</i>]	AA624872	-1.2	7.60
CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	AA770801	-1.2	7.60
nuclear factor I/A	AA690418	-1.2	7.60
homeodomain interacting protein kinase 2	AA549549	-1.2	7.60
Public domain EST	A1019760	-1.2	7.60
H1 histone family, member 2	W17615	-1.2	7.60
ESTs	AA789647	-1.3	7.60
ESTs	AA276747	-1.3	7.60
RIKEN cDNA 4930470O13 gene	AA790309	-1.3	7.60
mini chromosome maintenance deficient (<i>S. cerevisiae</i>)	A1645415	-1.3	7.60
ELKL motif kinase	AA606985	-1.2	7.60
ESTs, Highly similar to KIAA0169 protein [<i>H.sapiens</i>]	A1509457	-1.2	7.60
Public domain EST	A1047903	-1.2	7.60
ESTs	AA823478	-1.3	7.60
RIKEN cDNA 2310005E10 gene	A1390242	-1.2	7.60
hypothetical protein MGC7002	AA174774	-1.3	7.60
mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	AA822046	-1.2	7.60
ESTs	AA689758	-1.5	7.60
RIKEN cDNA 2310076G13 gene	AA068212	-1.4	7.60
RIKEN cDNA 1810024J13 gene	AA544844	-1.2	7.60
epimorphin	AA048759	-1.5	7.60
ESTs, Weakly similar to SMD1_HUMAN SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN SM D1 [<i>M.musculus</i>]	W88137	-1.1	7.60
ESTs	AA472455	-1.5	7.60
gene rich cluster, C3f gene	W48119	-1.3	7.60
RPB5-mediating protein	AA145326	-1.3	7.60
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	A1323199	-1.3	7.60
ESTs	AA288278	-1.6	7.60
ESTs	A1552098	-1.2	7.60
RIKEN cDNA 1100001A21 gene	A1605022	-1.6	7.60
reduced expression 2	AA474825	-1.3	7.60
ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein	AA606940	-1.2	7.60
RIKEN cDNA 1110020M21 gene	AA063845	-1.3	7.60
growth factor independent 1B	A1463842	-1.5	7.60
ESTs, Highly similar to KIAA0808 protein [<i>H.sapiens</i>]	AA184909	-1.6	7.62
insulin-like growth factor binding protein 5	W89253	-1.5	7.62
ESTs, Weakly similar to NED4 MOUSE NEDD-4 PROTEIN [<i>M.musculus</i>]	A1120198	-1.5	7.62
ESTs, Weakly similar to NAH1 MOUSE SODIUM/HYDROGEN EXCHANGER 1 [<i>M.musculus</i>]	A1606379	-1.1	7.62
ESTs	A1508693	-1.4	7.62
ESTs	AA472307	-1.4	7.62
alpha glucosidase 2, alpha neutral subunit	A1180958	-1.2	7.62
mitogen activated protein kinase 14	W78296	-1.2	7.62
exostoses (multiple) 1	AA710704	-1.6	7.62
RIKEN cDNA 2210011C24 gene	AA529486	-1.3	7.62
ESTs	AA433721	-1.6	7.62
prosaposin	AA606949	-1.1	7.62
ESTs	AA117283	-1.4	7.62

glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial	AA450847	-1.1	7.62
ESTs, Weakly similar to MLZ4 MOUSE ZINC FINGER PROTEIN MLZ-4 [M.musculus]	AI509698	-1.9	7.62
Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog	AA049131	-1.3	7.62
RIKEN cDNA 3010027G13 gene	AA606955	-1.2	7.62
ESTs	AA138861	-1.4	7.62
ESTs	AA260592	-1.3	7.62
Mouse complement factor H-related protein mRNA, complete cds, clone 9C4	AA570965	-1.4	7.62
RIKEN cDNA 2600017P10 gene	AI429838	-1.2	7.62
RIKEN cDNA 2310012N15 gene	AA117292	-1.2	7.62
hepatocyte growth factor	AI225823	-1.4	7.62
ESTs, Moderately similar to KIAA0946 protein [H.sapiens]	AI591829	-1.3	7.62
RIKEN cDNA 0610011L04 gene	AA087441	-1.2	7.62
cellular repressor of E1A-stimulated genes	AA544212	-1.2	7.62
RIKEN cDNA 4932434G09 gene	AI613719	-1.5	7.62
ESTs	AI614581	-1.2	7.62
RIKEN cDNA 2310066E14 gene	AA003561	-1.1	7.62
RIKEN cDNA 2610314I24 gene	AI606392	-1.2	7.62
SWAP complex protein, 70 kDa	AA437805	-1.3	7.62
solute carrier family 12, member 7	AI158743	-1.2	7.62
ESTs, Moderately similar to DRPLA [H.sapiens]	AI643212	-1.2	7.62
klotho	AA162364	-1.6	8.04
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	AA619114	-1.3	8.04
ESTs	AI594323	-1.6	8.04
RIKEN cDNA 1700023M09 gene	AA060880	-1.2	8.04
signal recognition particle 54 kDa	AA982259	-1.2	8.04
kinesin family member 21B	AI645902	-1.5	8.04
otoconin 90	AA437800	-1.6	8.04
ESTs	AA880094	-1.2	8.04
ESTs, Highly similar to KIAA0169 protein [H.sapiens]	AA118619	-1.2	8.04
RIKEN cDNA 2810036M19 gene	AI595030	-1.2	8.04
RIKEN cDNA 1810073E21 gene	AA754886	-1.1	8.04
cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle)	AA596914	-1.6	8.04
ESTs, Weakly similar to S22934 testis-specific protein [M.musculus]	AA184365	-1.2	8.04
adaptor protein complex AP-1, sigma 1	AA049247	-1.2	8.88
ESTs	AA759494	-1.4	8.88
RIKEN cDNA 2700063N13 gene	AA399805	-1.2	8.88
resistin like alpha	AA712003	-1.4	8.88
RIKEN cDNA 2310066H07 gene	AA983004	-1.3	8.88
RIKEN cDNA 2810475J17 gene	AA656067	-1.1	8.88
ESTs	AI450423	-1.4	8.88
cofilin 1, non-muscle	AA562691	-1.2	8.88
ESTs	AI390325	-1.4	8.88
ESTs	AI592195	-1.2	8.88
CDC like kinase 4	AA444586	-1.4	8.88
RIKEN cDNA 2700018N07 gene	AI120958	-1.2	8.88
DEAD (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polypeptide, Y chromosome	AI510645	-1.3	8.88
histocompatibility 2, T region locus 17	AA423123	-1.3	8.88
ESTs, Moderately similar to KIAA1313 protein [H.sapiens]	AA388290	-1.5	8.88
serine protease inhibitor 6	AA189231	-1.2	8.88
schlafen 2	W36524	-1.3	8.88
ESTs	AA289146	-1.2	8.88
interleukin 15	AA709787	-1.2	8.88
DNA segment, Chr 7, ERATO Doi 684, expressed	AI592230	-1.3	8.88
FK506 binding protein 8 (38 kDa)	AA450783	-1.1	8.88
RIKEN cDNA 5730403B10 gene	AA624498	-1.1	8.88
RIKEN cDNA 1110060O10 gene	AI585414	-1.1	8.88
RIKEN cDNA 4430402G14 gene	AA619848	-1.2	8.88
ESTs	AA060306	-1.2	8.88
Public domain EST	AA684309	-1.6	8.88
ESTs	AA240290	-1.3	8.88
ESTs, Highly similar to EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4 GAMMA [Homo sapiens]	AA684461	-1.2	8.88
ESTs, Moderately similar to p63 [H.sapiens]	AA183016	-1.1	8.88
ESTs	AI552710	-1.2	8.88
ESTs	AI509666	-1.4	8.88
geranylgeranyl diphosphate synthase 1	AI118639	-1.5	8.88

endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor 4	AI550109	-1.2	8.88
RIKEN cDNA 2610016A03 gene	AI425770	-1.2	8.88
ESTs	AA124744	-1.2	9.01
repeat family 3 gene	AA517682	-1.1	9.01
solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	AA397253	-1.2	9.01
protein kinase inhibitor, gamma	AA210230	-1.2	9.01
RIKEN cDNA 1810036E22 gene	AA562577	-1.2	9.01
RIKEN cDNA 1700029I08 gene	AI882327	-1.7	9.01
Mus musculus unknown protein mRNA, partial cds	AI550227	-1.2	9.01
interleukin 1 receptor, type I	AA543982	-1.2	9.01
ESTs	AI508570	-1.4	9.01
guanine nucleotide binding protein, alpha 12	AA561797	-1.1	9.01
RIKEN cDNA 0610012J09 gene	AA036434	-1.1	9.01
ESTs	AI530741	-1.4	9.01
Mus musculus nucleolar protein ANKT mRNA, complete cds	AA920753	-1.3	9.01
ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	AI121701	-1.4	9.01
ribosomal protein L41	AI120332	-1.6	9.01
ESTs	AA881377	-1.2	9.01
ESTs	AA674781	-1.3	9.01
syntaxin binding protein 4	AA919678	-1.2	9.01
ESTs, Weakly similar to putative protein kinase [M.musculus]	AI553059	-2.4	9.01
fibroblast growth factor 1	AA261582	-1.3	9.01
phosphodiesterase 1C	AA856411	-1.3	9.01
guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating, extra large	AI180799	-1.1	9.01
RIKEN cDNA 5730555F13 gene	AI552364	-1.4	9.01
RIKEN cDNA 9530089B04 gene	AA267871	-1.2	9.01
homeo box A10	AA475215	-1.3	9.01
ESTs	AA738913	-1.2	9.01
ESTs	AI596800	-1.3	9.01
glucosamine-6-phosphate deaminase	AA438071	-1.2	9.01
src associated in mitosis, 68 kDa	AA444584	-1.1	9.01
Bcl-2-related ovarian killer protein-like-pending	W65005	-1.2	9.01
RIKEN cDNA 3110002L15 gene	AA474398	-1.2	9.01
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21	AA607174	-1.4	9.01
RIKEN cDNA 0610011J09 gene	AI645425	-1.2	9.01
RIKEN cDNA 2810481F14 gene	AA162701	-1.3	9.01
ESTs, Weakly similar to ODPB_HUMAN PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT BETA SUBUNIT, MITOCHONDRIAL PRECURSOR [H.sapiens]	AI391020	-1.3	9.01
ESTs	AI391178	-1.4	9.25
ESTs	AI664114	-1.7	9.25
latent transforming growth factor beta binding protein 2	AI099009	-1.4	9.25
ESTs	AA880254	-1.3	9.25
RIKEN cDNA 4933435A13 gene	AA210243	-1.3	9.25
immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	AI892179	-1.4	9.25
synaptotagmin 13	AI050367	-1.3	9.25
neutrophilic granule protein	AA060282	-1.7	9.25
RIKEN cDNA 2810425J22 gene	AI551973	-1.2	9.25
high mobility group nucleosomal binding domain 1	W14418	-1.6	9.25
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7A	AI607683	-1.2	9.25
ESTs, Weakly similar to BcDNA:LD21720 gene product [D.melanogaster]	AA764450	-1.2	9.25
RIKEN cDNA 1700052N19 gene	AA457882	-1.2	9.25
ESTs	AI391308	-1.2	9.25
RIKEN cDNA 1300019I11 gene	AI509969	-1.3	9.25
ESTs	AI450530	-1.3	9.25
ESTs, Highly similar to EVI2B PROTEIN PRECURSOR TROPIC VIRAL INTEGRATION SITE 2B PROTEIN) [Homo sapiens]	AI893742	-1.5	9.25
matrix metalloproteinase 11	AI120903	-1.4	9.25
ESTs	AI430575	-1.2	9.25
DNA segment, Chr 11, Brigham & Women's Genetics 0554 expressed	AA590095	-1.1	9.25
Part of messenger RNA for mouse delta-immunoglobulin (codes for part of exon 8 - one of two alternate C-termini)	AA444443	-1.3	9.25

SEC61, alpha subunit 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	AI550200	-1.3	9.25
ESTs, Moderately similar to ATPD RAT ATP SYNTHASE DELTA CHAIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR [<i>R.norvegicus</i>]	AA412831	-1.2	9.25
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1	W84225	-1.2	9.66
guanylate nucleotide binding protein 2	AI180927	-1.2	9.66
ESTs, Weakly similar to nuclear protein np95 [<i>M.musculus</i>]	AA387951	-1.1	9.66
hepatoma-derived growth factor, related protein 2	AA387018	-1.1	9.66
RIKEN cDNA 1300011P19 gene	AA608348	-1.2	9.66
neurochondrin	AA018015	-1.2	9.66
gene trap locus 3	AA432483	-1.2	9.66
RIKEN cDNA 4833416I09 gene	AA450767	-1.1	9.66
ESTs	AA145508	-1.5	9.66
wingless-related MMTV integration site 5A	AA388110	-1.5	9.66
ESTs	AA881666	-1.8	9.66
RIKEN cDNA 2900016D05 gene	AI627138	-1.2	9.66
MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 1	AA655158	-1.1	9.66
insulin-like growth factor 1	AI604642	-1.8	9.66
RIKEN cDNA 1810027O10 gene	AA544415	-1.1	9.66
ESTs	W62237	-1.2	9.66
ESTs	AI530466	-1.2	9.66
ESTs	AA289639	-1.7	9.66
dynein, axon, light chain 4	AA675540	-1.3	9.66
RIKEN cDNA 5730454C12 gene	AA161828	-1.3	9.66
guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating, extra large	AI550047	-1.1	9.66
squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	AA437564	-1.2	9.66
ESTs	AA119371	-1.4	9.66
RIKEN cDNA 6620401D04 gene	AA139038	-1.4	9.66
ESTs, Weakly similar to muscle glycogen synthase [<i>M.musculus</i>]	AI465768	-1.4	9.66
delta-like 1 homolog (<i>Drosophila</i>)	AA015264	-1.6	9.66
Mus musculus 13 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:3100001E17, full insert sequence	AI390861	-1.5	9.66
ESTs	AA285835	-1.2	9.66
ESTs	AA596866	-1.5	9.66
annexin A7	AA616992	-1.4	9.66
transmembrane domain protein regulated in adipocytes 40 kDa	AA839984	-1.1	9.66
ESTs, Weakly similar to I49441 Mouse 19.5 mRNA, complete cds - mouse [<i>M.musculus</i>]	AA789551	-1.3	9.66
RIKEN cDNA 2310047B19 gene	W83611	-1.2	9.66
procollagen, type XI, alpha 1	AA268923	-1.4	9.66
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	AA066475	-1.2	9.66