

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative  
Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss einer postoperativen Immunstimulation mit GM-CSF versus  
Placebo auf die CD4+-Subpopulation  
IFN- $\gamma$  produzierender Th1-Zellen unter Berücksichtigung der  
Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Fatima Yürek

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

*Meinen Kindern Halil und Asiye Firdevs*

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>2 Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>3 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Die Reaktion von Immunkomponenten nach einer Operation .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2 Funktion der Transkriptionsfaktoren <i>STAT1</i> und <i>T-bet</i> in der Entwicklung von Th1-Zellen .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3 Substitution von Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF).....</b>	<b>9</b>
<b>4 Studienziel.....</b>	<b>10</b>
<b>5 Methodik.....</b>	<b>11</b>
<b>5.1 Studiendesign .....</b>	<b>11</b>
<b>5.1.1 Randomisierung des Patientenkollektivs .....</b>	<b>12</b>
<b>5.2 Prüfmedikament .....</b>	<b>13</b>
<b>5.3 Screening des Patientenkollektivs .....</b>	<b>13</b>
<b>5.3.1 Einschlusskriterien.....</b>	<b>14</b>
<b>5.3.2 Ausschlusskriterien .....</b>	<b>14</b>
<b>5.4 Studienablauf .....</b>	<b>15</b>
<b>5.5 Material .....</b>	<b>17</b>
<b>5.6 Durchführung der Blutentnahme bei Studienpatienten .....</b>	<b>19</b>
<b>5.7 Bestimmung der Transkriptionsfaktoren <i>STAT1</i> und <i>T-bet</i> mittels Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....</b>	<b>19</b>
<b>5.7.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese .....</b>	<b>20</b>
<b>5.7.2 Messung der Transkriptionsfaktoren <i>STAT1</i> und <i>T-bet</i> mittels RT-PCR..</b>	<b>22</b>
<b>5.8 Isolierung und Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) .....</b>	<b>22</b>
<b>5.8.1 Bestimmung von IFN-<math>\gamma</math> produzierenden Th1-Zellen am Durchflusszytometer.....</b>	<b>24</b>
<b>5.9 Biometrie und statistische Auswertung der Messergebnisse.....</b>	<b>25</b>
<b>6 Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1 Analyse der Baseline-Charakteristika .....</b>	<b>27</b>

<b>6.2</b>	<b>Transkriptionsfaktoren.....</b>	<b>28</b>
6.2.1	<i>STAT1</i> .....	28
6.2.2	<i>T-bet</i> .....	29
<b>6.3</b>	<b>Anteil CD4+-Zellen.....</b>	<b>31</b>
<b>6.4</b>	<b>Th1-Zellen .....</b>	<b>33</b>
<b>6.5</b>	<b>HLA-DR-Expression .....</b>	<b>35</b>
<b>6.6</b>	<b>Multivariate nichtparametrische Analyse (MANOVA), multivariate nichtparametrische Kovarianzanalyse (MANCOVA) und univariate Analyse der Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
<b>6.7</b>	<b>Analyse der Outcome-Charakteristika.....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
7.1	Studienergebnisse .....	39
7.2	Limitationen .....	41
7.3	Perspektiven .....	43
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>49</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>52</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>55</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>56</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>57</b>

## 1 Zusammenfassung

**Einleitung:** Eine postoperative Immunsuppression führt zu einem erhöhten Risiko für infektiöse Komplikationen bei Patienten. Durch eine frühzeitige Erfassung von Risikopatienten können Maßnahmen, wie z.B. die Gabe immunstimulatorischer Medikamente eingeleitet werden. Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer Therapie mit GM-CSF auf T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) zu untersuchen. Th1-Zellen sind eine Untergruppe der T-Helferzellen (Th-Zellen) mit Funktionen in der Abwehr von Erregern und entzündlichen Prozessen.

**Methoden:** Untersucht wurden jeweils 10 Patienten der GM-CSF bzw. der Placebogruppe in einer randomisierten kontrollierten Studie, die sich elektiv einer Pankreas- oder Ösophagusresektion unterzogen und postoperativ eine Expression von HLA-DR unter 10.000 Antigene/Monozyt hatten. Die Bestimmung der Th1-Zellen erfolgte am Operationstag (OD) und an fünf postoperativen Tagen (POD1-5) durch Messungen der für die Th1-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet* mittels Real-time PCR, sowie durch Messung der Sezernierung des Zytokins IFN- $\gamma$  in T-helfer Zellen nach einer *ex vivo* Stimulation von isolierten PBMCs am Durchflusszytometer.

**Ergebnisse:** Die Studienergebnisse zeigten in der GM-CSF-Gruppe am zweiten ( $p=0.008$ ) und dritten postoperativen Tag ( $p=0.028$ ) eine signifikant erhöhte Genexpression des Transkriptionsfaktors *STAT1* im Vergleich zur Placebogruppe. Die Genexpression für *T-bet* und der Anteil an IFN- $\gamma$  sezernierenden Th1-Zellen zeigte in der GM-CSF Gruppe im postoperativen Verlauf einen Anstieg, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Placebogruppe.

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Effekt in der GM-CSF-Gruppe in der Expression des Transkriptionsfaktors *STAT1* im Vergleich zur Placebogruppe detektiert werden.

**Schlüsselwörter:** *STAT1*, *T-bet*, Th1-Zellen, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , HLA-DR

## 2 Abstract

**Introduction:** Postoperative immunosuppression leads to an increased risk of infectious complications in patients. Through early detection of patients at risk, measures such as the administration of immunostimulatory drugs, can be initiated. The aim of this study was to investigate the effect of GM-CSF treatment in T-helper cell type 1 (Th1) cells. Th1 cells are a subset of T-helper cells (Th), with functions in the defense against pathogens and inflammatory processes.

**Methods:** 10 patients from each of GM-CSF and placebo group were examined in a randomized controlled trial, who electively underwent pancreatic or esophageal resection and whose postoperative expression of HLA-DR antigens was below 10.000 antigen/monocyte. The determination of Th1 cells was carried out the day of surgery (OD) and at five postoperative days (POD1-5) by measurements of the Th1 cell-specific transcription factors *STAT1* and *T-bet* using real-time PCR, and by measuring secretion of cytokine IFN- $\gamma$  in Th cells after *ex vivo* stimulation of isolated PBMCs by flow cytometry.

**Results:** The study results showed a significantly increased expression of the transcription factor *STAT1* in the GM-CSF group on the second ( $p = 0.008$ ) and third postoperative day ( $p = 0.028$ ) compared to the placebo group. The expression of *T-bet* and the rate of IFN- $\gamma$  secreting Th1 cells showed an upsurge in the GM-CSF group during the postoperative period however without significant differences compared to the placebo group.

**Conclusion:** In the present work, a significant effect on the transcription factor *STAT1* expression in the GM-CSF group compared to the placebo group could be detected.

**Keywords:** *STAT1*, *T-bet*, Th1 cells, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , HLA-DR

## 3 Einleitung

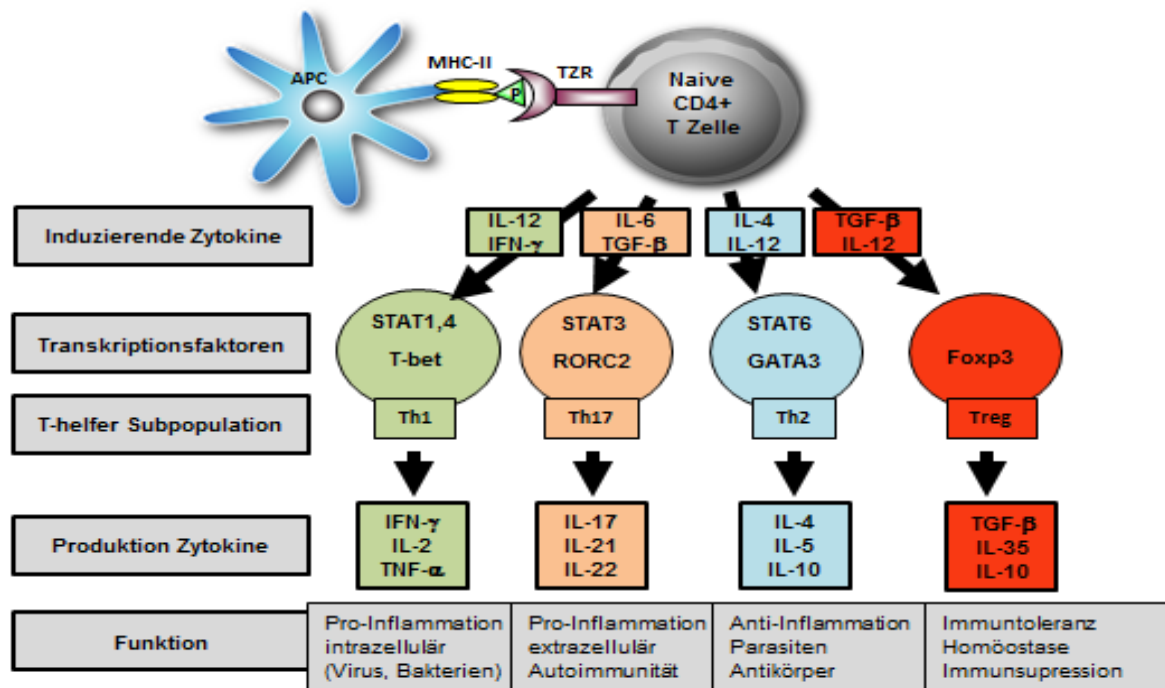
### 3.1 Die Reaktion von Immunkomponenten nach einer Operation

Das Immunsystem ist ein komplexes und bis ins Detail aufeinander abgestimmtes System von ineinander greifenden Prozessen zum Schutz des Organismus vor körperfremden und körpereigenen Pathogenen, die die Funktionalität des eigenen Organismus einschränken oder gefährden können. Eine Operation kann die Funktionalität einzelner Komponenten des Immunsystems in dem Maße beeinflussen, dass der Körper sich nicht mehr vor Pathogenen schützen kann. Bereits am ersten postoperativen Tag ist die zelluläre Immunantwort von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Helferzellen sowie von humanem Leukozytenantigen (HLA-DR) signifikant erniedrigt [1, 2]. Ist die Immunantwort direkt durch eine verminderte Expressionsfähigkeit der Zellen oder indirekt durch eine reduzierte Anzahl von Immunzellen vermindert oder inhibiert, kommt es zu einer Imbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen, die in einer Immunparalyse enden kann [3-5]. Diese Veränderungen in der T-Zell-vermittelten Immunantwort können zu einer Dysbalance der Th1/Th2-Zellantwort führen [6, 7]. Das kritische Zeitfenster, in dem sich der Patient während einer bestehenden oder progredienten Immunparalyse befindet, kann für das Outcome des Patienten entscheidend sein. Patienten, die sich in einer Immunparalyse befinden, sind anfälliger für Infektionen [8-13]. Infektionen erschweren eine schnelle klinische Besserung und führen regelhaft zu einer komplikationsreichen und längeren Krankenhausverweildauer [14].

### 3.2 Funktion der Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet* in der Entwicklung von Th1-Zellen

Die Transkriptionsfaktoren *STAT 1* und *T-bet* sind spezifisch für die Entwicklung einer naiven CD4<sup>+</sup>-T-Helferzelle (Th-Zelle) in eine CD4<sup>+</sup>-T-Helferzelle vom Typ 1 (Th1-Zelle). In dieser Form können die Zellen eine suffiziente Immunantwort leisten und den Körper vor Pathogenen schützen. Wird von der Th-Zelle vermehrt das signalvermittelnde Gen „*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*“ (*STAT1*) exprimiert, induziert es in der Th-Zelle die Expression des Transkriptionsfaktors „*T-box expressed in T-cells*“ (*T-bet*). Dieser stimuliert eine Untereinheit des Interleukin-12 (IL-12)-Rezeptors, dessen Interaktion mit dem

T-Zell-Rezeptor (TCR) über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *STAT4* zur Differenzierung der Th-Zelle in eine Th1-Zelle führt [15, 16] (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Entwicklung und Funktion der T-Helferzellen-Subpopulation aus einer naiven CD4+-T-Helferzelle nach Interaktion mit einer antigenpräsentierenden Zelle (APC). MHC II: Rezeptor auf APC, P: Pathogen, TZR: T-Zell-Rezeptor (modifiziert nach [16])

Diese Th1-Effektorzelle kann nach Antigenkontakt durch Produktion großer Mengen Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) die Differenzierung weiterer Th1-Zellen verstärken [17-19]. Th1-Zellen erfüllen eine wichtige Funktion in der Pro-Inflammation und Bekämpfung intrazellulärer Pathogene (Viren, Bakterien) [20-24], weil auch sie das Zytokin Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) exprimieren. Dadurch werden Makrophagen aktiviert und in Kombination mit anderen Leukinen die Zytotoxizität von CD8+-T-Zellen gesteigert [25]. Je mehr IFN- $\gamma$  von Th1-Zellen produziert wird, desto mehr Th1-Zellen können sich aus nativen CD4+-T-Helferzellen differenzieren. Diese autostimulierende Funktion der Th1-Zellen ist essentiell für die erfolgreiche Bekämpfung einer Infektion. Brune et al. wiesen in einer prospektiven Studie nach, dass die T-Zell Expression von Mediatoren des Immunsystems wie Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-2 (IL-2) bei Patienten nach laparoskopischer Cholezystektomie signifikant höher waren als in einer Gruppe, die sich einer offenen Cholezystektomie unterzogen hatte [26].



### **3.3 Substitution von Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF)**

Eine Substitution mit GM-CSF wirkt sich auf die Komponenten der zellulären Immunantwort stimulierend aus, indem es die Entwicklung von Monozyten und Neutrophilen aus hämatopoetischen Zellen anregt [27-31]. Insbesondere der Effekt auf dendritische Zellen (DC), die die Entwicklung von Th1-Zellen vorantreiben, ist hervorzuheben [32-34]. Präsentiert eine antigenpräsentierende Zelle (APC) ein Antigen über ein MHC-II-Molekül an eine Th-Zelle, bildet sie unter anderem IFN- $\gamma$ , Interleukine und GM-CSF. Über diese Mediatoren wird die Immunreaktion koordiniert und B-Zellen zur Antigenproduktion stimuliert [35]. GM-CSF bewirkt die vermehrte Bildung von Granulozyten, myeloischen dendritischen Zellen und Monozyten und steigert deren Immunkompetenz und Phagozytosefähigkeit [9, 36, 37]. Somit könnte eine unspezifische Immunstimulation mit GM-CSF eine Immundepression verhindern, indem es die Differenzierung der T-Zellen zu Th1-Zellen anregt. In den USA ist Leukine® (Wirkstoff: Sargramostim) als humanes rekombinantes GM-CSF bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nach myelosuppressiver Chemotherapie zur schnelleren Erholung der Neutrophilen zugelassen, um die Inzidenz schwerer lebensbedrohlicher Infektionen zu minimieren. GM-CSF kann Neutropenien bei Tumorpatienten nach einer Chemotherapie verhindern [31, 38-45]. In einer nicht randomisierten klinischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass GM-CSF die Antigenpräsentation über HLA-DR-Expression und die *ex vivo* Lipopolysaccharid-induzierte pro-inflammatorische Zytokinsekretion steigert. Dabei konnte eine postoperative Immundepression bzw. eine frühe Immunparalyse durch die Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten (mHLA-DR) detektiert werden [9].

## 4 Studienziel

Ziel dieser Studie war es, in einer randomisierten kontrollierten Studie den Zusammenhang einer postoperativen Gabe von GM-CSF oder Placebo auf CD4+-T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) bei immunsupprimierten Patienten mit einer verminderten HLA-DR-Expression nach einer elektiven Pankreas- oder Ösophagusresektion zu analysieren. Die Th1-Zellen wurden durch Messungen der für die Th1-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet* mittels Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sowie durch intrazelluläre Messung des Zytokins IFN- $\gamma$  nach einer *ex vivo* Stimulation von isolierten PBMCs im Durchflusszytometer bestimmt.

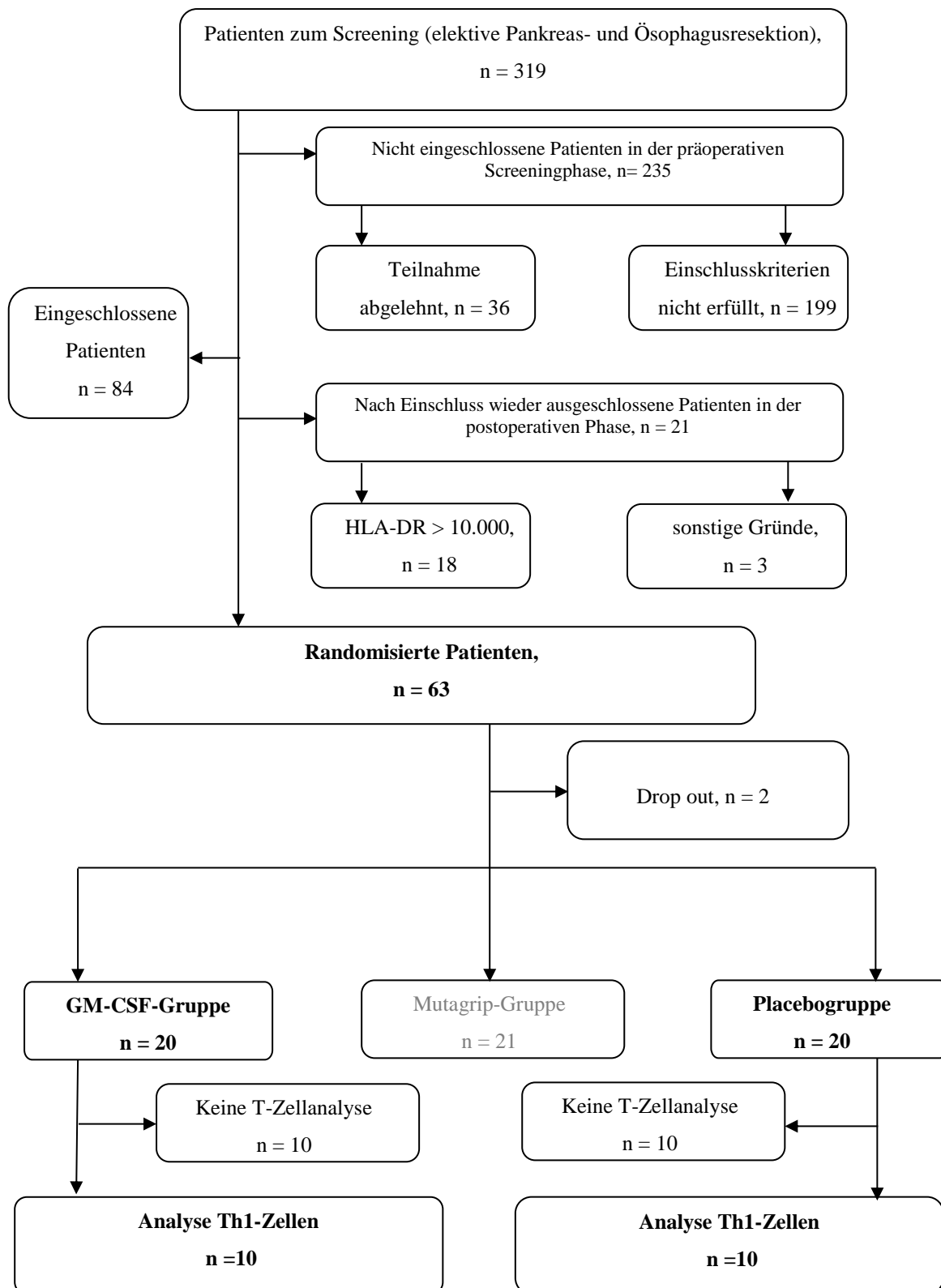
## 5 Methodik

### 5.1 Studiendesign

Im Studienzentrum der Charité – Universitätsmedizin Berlin Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin wurden die hier publizierten Daten in der klinischen Addiction Research Team VI – Studie „Einfluss einer postoperativen Vakzination oder Gabe von GM-CSF bei immunsupprimierten Patienten nach Pankreas- oder Ösophagusresektion auf den Verlauf einer Immunsuppression und die postoperative Infektionsrate“ erhoben (Kurztitel: ART VI, EudraCT-Nummer.: 2007-003111-31). Die Studie wurde als monozentrische, prospektive, dreiarmige, placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie im Double-Dummy-Design durchgeführt. Beginn und Ende der klinischen Prüfung erfolgte im Zeitraum vom 26.10.2008 bis zum 16.04.2011 (first patient first visit – last patient last visit).

Aus Gründen der Vollständigkeit wurde die Mutagrip-Gruppe aus der ART VI-Studie im Einschlussbaum (Abbildung 2) aufgeführt. Für die vorliegende Dissertationsarbeit wurden nur die Ergebnisse aus der Placebogruppe mit den Ergebnissen aus der GM-CSF-Gruppe verglichen und ausgewertet. Die Ergebnisse aus der Mutagrip-Gruppe sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 5.1.1 Randomisierung des Patientenkollektivs



**Abbildung 2:** Einschlussbaum der Addiction Research Team VI (ART VI) – Studie: Dreiarmlige, placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie im Double-Dummy-Design. Die Ergebnisse aus der Th1-Zellanalyse von je 10 Patienten aus der GM-CSF- und aus der Placebogruppe sind in die Auswertungen dieser Arbeit eingeflossen.

## 5.2 Prüfmedikament

Im Studienarm der GM-CSF-Gruppe erhielten alle Patienten eine postoperative Behandlung mit Sargramostim (Leukine®, Bayer Health Care™). Eine Ampulle Leukine® enthält 250 µg lyophilisiertes Leukine® (Pulver) (rekombinantes humanes Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor, GM-CSF). Das Medikament muss zu Injektionszwecken in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen werden. Das lyophilisierte Leukine® enthält außerdem 40 mg/ml Mannitol, 10 mg/ml Saccharose und 1,2 mg/ml Tromethamine. Die Dosierung für Leukine®: 250 µg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche; Aufbereitung des Medikamentes in 24 ml Lösung. Das Prüfpräparat wurde über 24 h intravenös (i.v.) als kontinuierliche Applikation über einen Perfusor mit einer Laufrate von 1 ml/h am ersten postoperativen Tag (POD1) und in Abhängigkeit der HLA-DR-Expression gegebenenfalls auch am POD2 bzw. POD3 injiziert. Im Studienarm der Placebogruppe erhielten alle Patienten gemäß Studienprotokoll isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, Braun™) i.v., 24 ml/24 h als kontinuierliche Applikation über einen Perfusor mit einer Laufrate von 1 ml/h am ersten postoperativen Tag (POD1) und in Abhängigkeit der HLA-DR-Expression gegebenenfalls auch am POD2 bzw. POD3.

## 5.3 Screening des Patientenkollektivs

Die chirurgische Intervention und der postoperative Aufenthalt aller Studienpatienten wurden in der Klinik für Allgemeinchirurgie und in der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin am Campus Charité Virchow-Klinikum im Zeitraum vom 26.10.2008 bis 16.04.2011 durchgeführt. Nach chirurgischer und anästhesiologischer Aufklärung der Patienten, die für eine elektive Pankreasresektion oder eine elektive Ösophagusresektion im oben genannten Zeitraum vorgesehen waren, wurden die Patienten auf die Studie aufmerksam gemacht, mündlich und schriftlich über die Inhalte der Studie und mit der Studienteilnahme verbundene mögliche Risiken und Nebenwirkungen durch den Studienarzt aufgeklärt. Das Aufklärungsgespräch und die Einwilligung wurden in schriftlicher Form dokumentiert, die Einwilligung vom Studienpatienten und vom Studienarzt unterschrieben. Eine Blutentnahme zur Feststellung möglicher Ausschlusskriterien wurde im Anschluss an das Aufklärungsgespräch durchgeführt.

### 5.3.1 Einschlusskriterien

Präoperativ mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt sein: Alter mindestens 18 Jahre, elektive Pankreasresektion respektive Ösophagusresektion, Vorliegen der schriftlichen Einwilligungserklärung gemäß AMG §40 (1) 3b), bei weiblichen Studienpatienten negativer Schwangerschaftstest ( $\beta$ -HCG im Urin) und eine postoperativ hocheffektive Kontrazeption bei Frauen (definiert als Pearl Index  $< 1$ ) bzw. anamnestisch mehr als 2 Jahre postmenopausal. Die HLA-DR-Expression auf Monozyten musste  $\leq 10.000$  Antigene/Monozyt am ersten postoperativen Tag (POD1) sein.

### 5.3.2 Ausschlusskriterien

Zu den Ausschlusskriterien der Studie zählten eine bekannte angeborene oder erworbene Bluterkrankung, eine Chemo- oder Radiotherapie innerhalb der letzten 28 Tage, eine nachgewiesene Infektion in den letzten 7 Tagen vor der Operation, Leukämie, eine bekannte Virusinfektion mit Hepatitis-B/Hepatitis-C oder positiver Labortest im Rahmen des Screenings, Autoimmunerkrankungen, die Einnahme von Immunsuppressiva bis zu vier Wochen vor Studieneinschluss. Instabile Angina pectoris, symptomatische Herzfehler, thrombembolische Ereignisse oder Laborwerte am präoperativen Tag (Tabelle 1) zählten ebenfalls zu den Ausschlusskriterien.

**Tabelle 1:** Bei Vorliegen mindestens einer der in der Tabelle aufgeführten Laborwerte am präoperativen Tag konnte kein Einschluss in die Studie erfolgen. ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase

Präoperative Laborwerte	Ausschlusskriterien erfüllt, wenn
Thrombozyten	$\leq 100.000/\mu\text{l}$
Neutrophile	$\leq 1.500/\mu\text{l}$
Hämoglobin	$\leq 8 \text{ g/dl}$
Bilirubin	$> 2 \text{ g/dl}$
Kreatinin	$> 1,5 \text{ g/dl}$
AST/ALT	$> 90 \text{ U/l}$

## 5.4 Studienablauf

Am Operationstag (OD) wurden alle Patienten, die einer Studienteilnahme zugesagt hatten und bei denen keine Ausschlusskriterien vorlagen, als potentielle Studienpatienten betrachtet und die Narkose nach Studienprotokoll gemäß den klinikinternen Standard Operating Procedures (SOPs) durchgeführt. Um 06:30 Uhr am OD wurde präoperativ eine Blutentnahme zur Bestimmung der Laborparameter durchgeführt. Die Screeningphase endete am ersten postoperativen Tag (POD1) mit Bestimmung der HLA-DR-Expression. Lag die HLA-DR-Expression am ersten postoperativen Tag (POD1)  $\leq 10.000$  Antigene/Monozyt, war das letzte Einschlusskriterium erfüllt und der Patient wurde für die Studie randomisiert. Ein Abfall der HLA-DR-Expression unter 10.000 Antigene/Monozyt wurde als klinisch unauffällige Immunparalyse interpretiert. Nach täglicher Bestimmung von HLA-DR wurde bei einer HLA-DR-Expression  $\leq 10.000$  Antigene/Monozyt das Studienmedikament am ersten postoperativen Tag (POD1) bis zum dritten postoperativen Tag (POD3) intravenös injiziert. Die Blutentnahmen am POD1 bis POD5 erfolgten täglich um ca. 06:30 Uhr  $\pm$  30 min. Das enge Zeitfenster wurde festgelegt, um mögliche Einflüsse durch die zirkadiane Rhythmik des Patienten zu minimieren. Am POD4 und POD5 wurden Blutentnahmen durchgeführt, jedoch kein Studienmedikament verabreicht, auch wenn die HLA-DR-Expression auf Monozyten  $\leq 10.000$  Antigene/Monozyt lag. Vom POD1 bis POD9 wurden die Patienten täglich durch das Studienpersonal visitiert und körperlich untersucht. Die Dokumentation aller erhobenen Daten, Befunde und Vitalparameter wurden in pseudonymisierter Form schriftlich im Case Report Form (CRF) erfasst und in der elektronischen Datenbank gespeichert. Alle Patienten wurden präoperativ für einen Periduralkatheter (PDK) aufgeklärt. Die präoperative Nüchternheit betrug 6 h Nahrungskarenz und 2 h Flüssigkeitskarenz. Die Narkoseeinleitung und Narkoseführung wurden gemäß Studienprotokoll durchgeführt:

- Gabe der Antibiotikaphylaxe in der Einleitung
- PDK Anlage; bei Vorliegen einer Kontraindikation für die PDK-Anlage wurde alternativ ein Remifentanil-Perfusor zur perioperativen Analgesie angeschlossen
- Desfluran als Narkosegas
- Bispektralindex® (BIS) Monitoring mit Zielwerten zwischen 40-60
- Wärmung des Patienten mit einer Warmluftfolie

- Intervention mit Enoximon bei Abweichen des Cardiac Index unter 2,5 (l/min)/m<sup>2</sup> Körperoberfläche
- Intervention mit Katecholaminen bei Hypotension
- Intervention mit Insulin und ggf. Kalium bei intraoperativen Blutglukosewerten über 150 mg/dl
- Transfusion von EKs nach Hb-Wert (<6 g/dl bzw. <8 g/dl bei Risikopatienten)
- wiederholte Gabe des Antibiotikums nach 3h
- Dokumentation des intraoperativen Blutverlustes.

**Tabelle 2:** Übersicht zum Behandlungsschema und Studienablauf nach Einschluss der Studienpatienten vom OD bis POD30. Am POD9 erfolgte die Abschlussvisite (AV) und am POD30 die Nachbefragung (NB) der Studienpatienten. „X“: Maßnahme durchgeführt. „-“: Maßnahme nicht durchgeführt.

	OD	POD1	POD2	POD3	POD4	POD5	POD6-9	POD30
<b>Visite</b>	X	X	X	X	X	X	X (AV)	X+NB
<b>Intervention mit Studienmedikament, wenn HLA-DR&lt;10.000AG/M</b>	-	X	X	X	-	-	-	-
<i>STAT1</i>	X	X	X	X	X	X	-	-
<i>T-bet</i>	X	X	X	X	X	X	-	-
<b>T-Helferzellen</b>	X	X	X	X	X	X	-	-
<b>Th1-Zellen</b>	X	X	X	X	X	X	-	-
<b>HLA-DR (AG/M)</b>	X	X	X	X	X	X	-	-



## 5.5 Material

**Tabelle 3:** Auflistung der Materialien mit Materialbezeichnung und Bezugsquelle

	<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Lösungen, Puffer, Reagenzien</b>	BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
	BD FACS Lysing solution	BD Biosciences, Heidelberg
	BD FACS shutdown solution	BD Biosciences, Heidelberg
	BD FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
	Biocoll Separating solution, (Isotonic Solution, Density 1,077g/ml)	Biochrom AG, Berlin
	Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
	Essigsäure (3%)	Merck, Darmstadt
	Ethanol unvergällt	Merck, Darmstadt
	Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
	Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)	Invitrogen, Karlsruhe
	Recombinant RNasin	Promega, Mannheim (Ribonuclease-Inhibitor)
	TaqMan: Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
<b>Kits</b>	BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/ Permeabilization Kit with BD GolgiStop™	BD Biosciences, Heidelberg
	PAXgene Blood RNA Kit	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
<b>Geräte</b>	7500 Real-time-PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
	BD FACS Canto II, Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
	Centrifuge 5415 R, mit Kühlfunktion	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
	CO <sub>2</sub> -Inkubator	SANYO, Osaka, Japan
	HeraSafe Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau
	Lichtmikroskop, Type 090/131001	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
	Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau
	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
	Vortex	Janke & Kunkel, Staufen
	Neubauer Zählkammer	Braun™, Melsungen

Fortsetzung Tabelle 3

	<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Arbeitsmaterialien</b>	1°C Freezing Container	Nalgene®, Rochester, USA
	Eindrückstopfen, farblos	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	FALCON Multiwell, 24 well	BD Biosciences, Heidelberg
	FALCON 5 ml Polystyrene	BD Biosciences, Heidelberg
	FALCON Cell Strainer	BD Biosciences, Heidelberg
	FALCON Röhrchen mit Schraubverschluss (steril), 15 ml und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
	FALCON Serological Pipet, sterile 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg
	Flächendesinfektionsmittel, Decosept	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen
	Latex Examination Gloves, Powderfree	Charité Berlin, Made in Malaysia
	Micro tube 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	MicroAmp, Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
	MicroAmp, Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
	PCR Compatible, DNA/RNA/RNase free, Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
	Pipettenspitzen 10 µl	Greiner bio-one, Deutschland
	Pipettenspitzen 100 µl	Greiner bio-one, Deutschland
	Pipettenspitzen 200, 1000, 5000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	Research Pipette 10, 100, 500, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Safe Seal Microtube, 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	Transferpipette, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<b>Antikörper</b>	anti-Human CD3 Pacific Blue Maus, monoclonal	BD Biosciences, Heidelberg
	anti-Human CD8 APC Maus, monoclonal	BD Biosciences, Heidelberg
	anti-Human IFN-γ FITC Maus, monoclonal FITC isotyp mouse IgG1	BD Biosciences, Heidelberg

**Tabelle 4:** Verwendete Sequenzen der Primer und Sonden der humanen Transkriptionsfaktoren *T-bet* und *STAT1* sowie für das Haushaltsgen humanes *HPRT* (=Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase)

Gen		Oligonukleotidsequenzen von 5'-3' Sonden 5'-Fam+3'-Tamra	Verdünnung
human <i>HPRT</i>	fw	AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G	300
	rev	GAC TTT GCT TTC CTT GGT CAG G	300
	Sonde	TTT CAC CAG CAA GCT TGC GAC CTT GA	
human <i>t-bet</i>	fw	GAG GGZ CGC GCT CAA CAA	300
	rev	TTG CAC AGT AAA TGA CAG GAA TG	300
	Sonde	CAC CTG TTG TGG TCC AAG TTT AAT CAG CAC C	
		<b>Assay ID</b>	
human <i>STAT1</i>		Hs01014002_m1	

## 5.6 Durchführung der Blutentnahme bei Studienpatienten

Alle Blutentnahmen zur Bestimmung der Zielparameter wurden am Operationstag (OD) präoperativ um 06:30 Uhr und am POD1 bis POD5 täglich zwischen 06:30 Uhr  $\pm$  30 min entnommen. Die Blutentnahme wurde unter Berücksichtigung der Hygienevorschriften gemäß klinikinterner SOPs durch das Studienpersonal durchgeführt. Abnahmeort für die Blutentnahmen waren periphere Zugänge oder ZVK (zentralvenöser Katheter) bzw. falls vorhanden ein arterieller Zugang. Die Proben für die HLA-DR Bestimmung wurden nach Abnahme direkt innerhalb eines Zeitfensters von 60 min zur weiteren Bearbeitung in das Immunologielabor der Charité Campus Mitte gebracht. Die Blutröhrchen für die Bestimmung der restlichen Zielparameter wurden nach Abnahme direkt im internen Forschungslabor der Charité Campus Virchow-Klinikum bearbeitet und die Messungen durchgeführt.

## 5.7 Bestimmung der Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet* mittels Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine schnelle und sehr sensitive Methode zur Analyse von Desoxyribonukleinsäure (DNA) - Abschnitten. Es handelt sich

dabei um eine durch spezifische Primer definierte enzymatische *in vitro* Replikation. Um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen, wurde ein homogener Essay entwickelt, bei dem Amplifikation und Spezifitätsnachweis eines PCR-Produktes in einem Reaktionsgefäß abläuft. Die quantitative Aussagekraft der Methode hängt maßgeblich von der Qualität und Quantität der vorausgegangenen Arbeitsschritte ab. Hierbei spielt der Probenaufschluss, die Reinheit der präparierten RNA, die Effizienz der komplementären Desoxynukleinsäure (cDNA) -Synthese und die Qualität der amplifizierten Produkte eine wichtige Rolle. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die während des PCR-Zyklus erfasst werden, findet die Quantifizierung statt. Dazu werden Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden verwendet. Sie können sich sequenzspezifisch zwischen den Primern an die Ziel-DNA anlagern.

### 5.7.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Ribonukleasen sind sehr stabile Enzyme, die das Autoklavieren überstehen und RNA in kurzer Zeit degradieren können. Deshalb wurden folgende Richtlinien bei der manuellen RNA-Isolation stets beachtet:

- stationärer RNA-Arbeitsplatz, der mit Pipettensätzen ausgestattet ist, die nur für das Arbeiten mit RNA zu verwenden sind.
- Tragen von Handschuhen bei allen Arbeitsschritten
- Benutzung von Materialien und Geräten, die keinen Kontakt mit anderen biologischen Materialien hatten.

Als Kit für die RNA-Extraktion wurde das „PAXgene Blood RNA Kit“ der Firma PreAnalytiX verwendet. Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer und Lösungen ist, sofern vom Hersteller angegeben, auch hier aufgeführt.

Für die RNA-Extraktion wurden jeweils 2,5 ml Vollblut in PAX-Gene Tubes verwendet. Die Blutproben wurden gemäß der Beschreibung aus Kapitel 3.6 beim Patienten abgenommen. Die PAX-Gene Tubes sind vom Hersteller mit einem RNA-stabilisierenden Additiv befüllt und zur Isolation intrazellulärer RNA aus Vollblut für das RT-PCR-Verfahren bestimmt. Die Proben wurden nach Abnahme bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert und im Anschluss für 24 Stunden in einem -20 °C Tiefkühlschrank gelagert. Bis zur Bearbeitung lagerten die Tubes bei -80 °C. Die Lagerungshöchstdauer von 24 Monaten bis zur Bearbeitung der Proben wurde dabei nicht überschritten. Am Vortag der RNA-Extraktion wurden die Proben aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen. Zu Beginn der Bearbeitung

der RNA-Extraktion wurden die PAXgene Tubes geschwenkt, anschließend bei 4000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das entstandene Sediment wurde in 5 ml RNase freiem Wasser resuspendiert und bis zum vollständigen Auflösen des Sediments geschüttelt. Anschließend wurde erneut für 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert, das Sediment in 360 µl BR1-Puffer resuspendiert und in Reaktionsgefäße (1,5 ml Volumen) überführt. Zur Aufreinigung der Probe erfolgte die Zugabe von 300 µl BR2-Puffer und 40 µl Proteinkinase K. Proteinkinase K ist eine Protease mit endo- und exoproteolytischer Aktivität und wird für den Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäuren verwendet. Die Probe wurde in einem Thermomixer bei 55 °C für insgesamt 10 min geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 16000 g für 10 min. Der Überstand wurde in einem Reaktionsgefäß mit 350 µl Ethanol absolut versehen und gemischt. In zwei Pipettiervorgängen wurden je 700 µl des Lysat-Ethanol-Gemisches auf eine Extraktionssäule pipettiert und diese jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt, indem das Gemisch 1 min lang bei 16000 g zentrifugiert wurde. Bei diesem Arbeitsschritt absorbierte die RNA an die Matrix der Extraktionssäule. 350 µl BR3 Puffer wurden danach auf die Extraktionssäule pipettiert und bei 16000 g zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA von möglichen Verunreinigungen befreit. Um die RNA von der Extraktionssäule zu resorbieren, wurde ein DNase-Mix aus 10 µl DNase + 70 µl RDD (=Puffer, im Kit enthalten, Zusammensetzung urheberrechtlich geschützt und wird vom Hersteller nicht angegeben) vorbereitet und dieser auf die Extraktionssäule pipettiert. Die Proben inkubierten für mindestens 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln und wurden im Anschluss zur Aufreinigung mit 350 µl BR3 und zwei weiteren Waschvorgängen mit je 500 µl BR4 Puffer unterzogen. Auf jeden Pipettiervorgang erfolgte die Zentrifugation bei 16000 g für 1 min. Die Eluierung der RNA von der Matrix erfolgte in zwei Schritten mit 30 µl bzw. 20 µl BR5 Puffer und dem Zentrifugieren der Proben. Die extrahierten RNAs lagerten bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C. Alle Arbeitsschritte außerhalb des Thermocyclers wurden auf Eis durchgeführt. Für das quantitative RT-PCR-Verfahren musste die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurden 21,5 µl der isolierten RNA mit 2 µl Oligo-dT-Nukleotid-Primer in einem Reaktionsgefäß für 10 min bei 75 °C im Thermocycler erhitzt. Im Anschluss wurden 8 µl Reaktionspuffer (RB), 4 µl dNTP, 2 µl DNase und 0,5 µl Ribonuclease Inhibitor (RI) hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Zum Inaktivieren der DNase erfolgte eine finale Inkubation für 5 min bei 75 °C. Im

Anschluss wurde 1 µl Ribonuclease Inhibitor (RI) und 1 µl Reverse-Transkriptase zugefügt und für 60 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Abschließend wurde eine Inkubation der Proben für 5 min bei 94 °C durchgeführt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **5.7.2 Messung der Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet* mittels RT-PCR**

Für jeden TaqMan-Ansatz wurden Doppelwerte nach folgendem Pipettierschema generiert:

6,25 µl TaqMan-Master Mix

3,0 µl Primermix (*STAT1* bzw. *T-bet*)

3,25 µl cDNA

0,5 µl Sonde

---

$\Sigma=13 \mu\text{l}$

Die Standardkurve wurde im 96-Well-Format 2-fach pipettiert und mit dem zu untersuchenden Panel und dem entsprechenden Kontrollgen (Haushaltsgen humanes *HPRT* (=Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase)) amplifiziert. Nach erfolgter RT-PCR wurden die Mittelwerte der cycle threshold (Ct) zur Auswertung verwendet. Eine Abweichung der Doppelwerte um maximal 0,5 Ct wurde toleriert.

Die Zielsequenz wurde zu der Expression des Kontrollgens ins Verhältnis gesetzt. Das dimensionslose Ergebnis wurde für die Auswertung wie folgt berechnet:

1. Bildung des  $\Delta\text{Ct}$ -Wertes:  $\Delta\text{Ct} = \text{Mittelwert Ct der Zielsequenz} - \text{Mittelwert Ct des Kontrollgens}$
2. Berechnung des dimensionslosen Ergebnisses mit der Formel:  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  [46].

## **5.8 Isolierung und Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)**

Zu den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)) zählen vor allem B- und T-Lymphozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-

Zellen) und Thrombozyten. Sie können mittels Dichtegradzentrifugation unter Zugabe von Biocoll (Ficoll), einem Zellseparationsmedium, von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt werden. Die Biocoll Trennlösung hat mit 1,077 g/ml eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, dafür aber geringer als die von Erythrozyten und Granulozyten, so dass diese Zellen am Gefäßboden pelletieren. Die Isolierung der PBMCs erfolgte gemäß dem standardisierten klinikinternen Laborprotokoll. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Nach der Blutentnahme wurden 18 ml Citrat-Vollblut im Verhältnis 1:1 mit sterilem, Phosphate Buffered Saline (PBS) bei Raumtemperatur verdünnt. Anschließend wurden in vier 15 ml Röhrchen je 3 ml Biocoll vorgelegt, mit 9 ml des Blut-PBS-Gemisches vorsichtig überschichtet und für 20 min bei 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das synthetische Polysaccharid Biocoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharose-Monomeren. Monozyten und Lymphozyten sammeln sich aufgrund ihres geringen Gewichts in der Interphase zwischen Medium und Plasma, wo sie mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt wurden. Die PBMCs wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. 10 µl der PBMC Zellsuspension wurden mit 190 µl Essigsäure (3%) verdünnt und gründlich durchmischt. Danach erfolgte das Auszählen der Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Es wurden vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt, deren Mittelwert gebildet und dieser mit dem Verdünnungsfaktor 20 sowie dem Dimensionsfaktor 1000 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro Milliliter Zellsuspension zu berechnen.

Das Kultivieren der Zellen erfolgte in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in einer 24-Well Zellkulturplatte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit 10 µl Phorbol-12-Myristat-13-Acetat [25 ng/ml] (PMA) und 20 µl Ionomycin [500 ng/ml] stimuliert. PMA simuliert hierbei eine T-Zellrezeptor (TCR)-Stimulation durch Aktivierung des Signaltransduktionsweges des TCR. Ionomycin führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und der intrazellulären Calciumfreisetzung. Dadurch wurden die T-Zellen aktiviert und zur Zytokinproduktion angeregt. Dabei handelte es sich um eine rezeptorunabhängige Stimulation. Um zu verhindern, dass es zur Sekretion von Zytokinen über die Zellmembran kommt und um eine Anreicherung aller Zytokine in der Zelle zu erreichen, wurde den Zellen nach zweistündiger Inkubation 2 µl Golgi-Stop (Monensin)/Well zugesetzt und für weitere 2 h inkubiert.

### 5.8.1 Bestimmung von IFN- $\gamma$ produzierenden Th1-Zellen am Durchflusszytometer

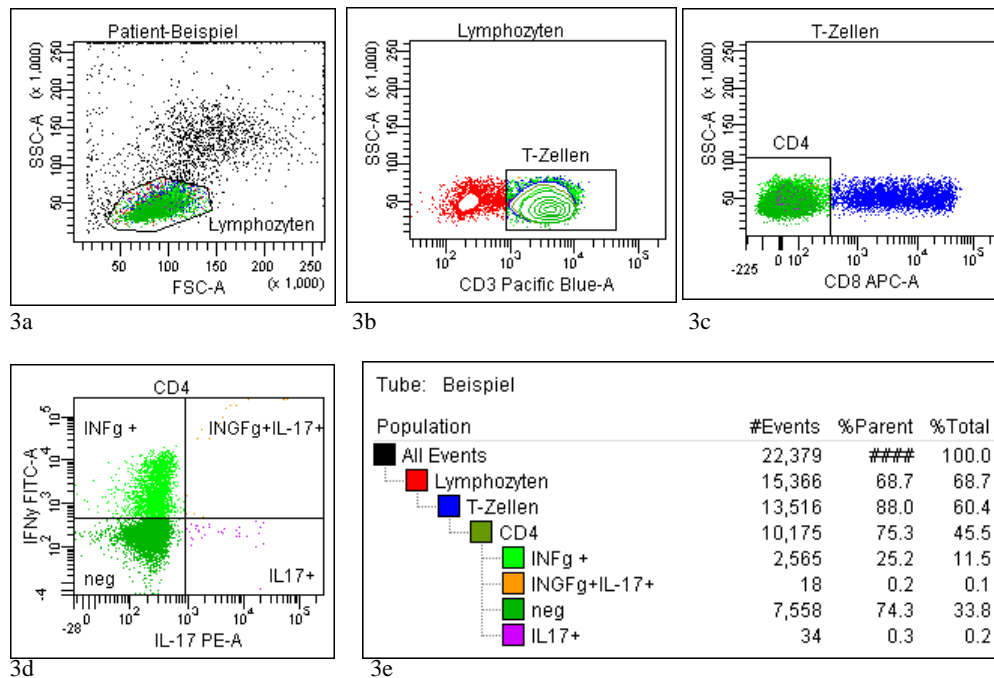
Die Durchflusszytometrie ist eine Methode um parallel verschiedene physikalische Parameter von Zellen in Lösung, welche in hohem Tempo einzeln an einem Lichtstrahl vorbei fließen, zu analysieren. Aus dem resultierenden Streulicht und den Fluoreszenzemissionen können die Eigenschaften der Zelle abgeleitet werden.

Nach vier Stunden Inkubationszeit wurde die Zellsuspension aus der Platte entfernt, in ein 50 ml Röhrchen pipettiert, mit sterilem PBS versehen und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml PBS resuspendiert, die Zellen mit einer 1:5 Verdünnung gezählt und das Pellet nach wiederholtem Zentrifugieren so aufgenommen, dass  $2 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS enthalten waren. Je 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und für die Oberflächenfärbung mit 3  $\mu$ l des Antikörpers CD3 Pacific Blue und 5  $\mu$ l des CD8 APC für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Da es durch die Stimulation mit PMA/Ionomycin zu einer Degradierung der CD4-Oberflächenmoleküle kommen kann, erfolgte der Nachweis von CD4<sup>+</sup>-Zellen über die Färbung der CD8- Moleküle. Alle Zellen, die CD3-positiv- und CD8-negativ waren, wurden dadurch als CD4<sup>+</sup>-Zellen definiert (Abbildung 3).

Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dies wurde durch die Zugabe von 0,5 ml FACS<sup>TM</sup>-Fix/Perm Solution und einer Inkubation von 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur erreicht. Nach einer Zentrifugation bei 200 g wurden die sedimentierten Zellen mit 1 ml FACS<sup>TM</sup>-Perm/Wash Solution resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Hierauf folgte eine weitere Zentrifugation und ein weiterer Waschschrift mit 100  $\mu$ l FACS<sup>TM</sup>-Perm/Wash Lösung. Im Folgeschritt wurde den Zellen zur intrazellulären Färbung von IFN- $\gamma$  insgesamt 1  $\mu$ l der Antikörperlösung IFN- $\gamma$ -FITC zugegeben und für 30 min lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Perm/Wash Lösung gewaschen, in 200  $\mu$ l FACS<sup>TM</sup>-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen. Um sicherzustellen, dass die verwendeten Antikörper nicht unspezifisch binden, wurden regelmäßig Isotypenkontrollen mitgeführt. Die FITC-konjugierte Isotypen-Kontrolle (IG61 FITC) wurde mit der gleichen Konzentration eingesetzt und entspricht demselben Immunglobulin-Isotyp wie der spezifische Antikörper, bindet aber nicht spezifisch an humane Antigene. Von jeder Probe wurde zu jeder Messung eine Kontrolle durchgeführt, bei der die Zellen nicht intrazellulär gefärbt wurden, um ein falsches



positives Ergebnis durch die Eigenfluoreszenz der Zellen bei der Messung auszuschließen. Die durchflusszytometrische Analyse der Th1-Zellen erfolgte am FACS<sup>TM</sup>Canto II Durchflusszytometer unter Verwendung der Software BD-FACSDiva<sup>TM</sup> (Version 6.1.1) der Firma BD Biosciences.



**Abbildung 3:** Exemplarische Darstellung einer Messung von Th1-Zellen am Durchflusszytometer. 3a: Lymphozytenpopulation, 3b: T-Zellen, 3c: CD4+-T-Helferzellen, 3d: IFN- $\gamma$  sezernierende Th1-Zellen, 3e: Statistik der Populationen.

## 5.9 Biometrie und statistische Auswertung der Messergebnisse

Alle Zielgrößen (primäre und sekundäre Zielgrößen) wurden zunächst mit Methoden der exploratorischen Datenanalyse untersucht und deskriptiv ausgewertet. Gruppenvergleiche (GM-CSF versus Placebo) für stetige Merkmale wurden mit dem exakten Mann-Whitney U-Test und für qualitative Merkmale mit dem exakten Fisher-Test durchgeführt. Um (multivariat) Einflüsse von Risikofaktoren auf ausgewählte dichotome Outcome-Parameter zu analysieren, wurde eine multivariate logistische Regressionsanalyse eingesetzt. Klinische Parameter, die in einem Zeitverlauf gemessen wurden, wurden mit Hilfe einer multivariaten nichtparametrischen Analyse für longitudinale Daten in einem zweifaktoriellen Design (1.Faktor (unabhängig): Behandlung, 2. Faktor (abhängig): zeitliche Wiederholungen) analysiert. Statistische Maßzahlen wie Mittelwert und Standardabweichung (metrisch skalierte und normalverteilte Merkmale), Median und Interquartilsdifferenz (kategoriale

sowie nicht normalverteilte metrische Merkmale) bzw. Häufigkeiten und Proportionen (qualitative Merkmale) wurden dabei ermittelt. Im Rahmen der explorativen Datenanalyse erfolgte ebenfalls die Überprüfung der Strukturgleichheit (Homogenität) der Behandlungsgruppen und die Prüfung der Verteilungen auf Normalität. Ein eventueller Unterschied in den Behandlungsgruppen wurde wegen möglicher Abweichungen von der Normalverteilung als Differenztest über den nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test analysiert. In der nichtparametrischen longitudinalen Analyse wurden die Ergebnisse auf folgende Hypothesen getestet: Unterschiede zwischen den Gruppen (über die Zeit), systematische Änderungen in der Zeit (über die Gruppen), sowie Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Zeit (Frage nach Unterschieden im Zeitverlauf bezüglich der betrachteten Gruppen; Identifizierung bestimmter Zeitabschnitte, in denen sich besondere Gruppenunterschiede zeigen). Die systematischen Änderungen in der Zeit für jede Gruppe wurden in einer multivariaten nichtparametrischen Analyse (MANOVA) ermittelt. Für alle Ausgangswerte der Messungen (Baseline) wurde zusätzlich eine multivariate nichtparametrische Kovarianzanalyse (MANCOVA) für wiederholte Messungen mit der Baseline als Kovariate verwendet. Darin wurden die auf die Baseline adjustierten Werte in Hinblick auf die gleichen ersten drei Hypothesen [Gruppe, Zeit, Wechselwirkungen] und der Einfluss der Kovariaten geprüft (siehe Kapitel 4.6). Sämtliche Tests wurden zweiseitig, mit einem Fehler 1. Art  $\alpha = 5\%$  durchgeführt. Die erzielten p-Werte für alle Endpunkte verstehen sich als explorativ, so dass keine alpha-Adjustierung für multiples Testen durchgeführt wurde. Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistik Programm IBM© SPSS© Statistics, Version 20, © Copyright 1989, 2010 SPSS Inc., an IBM Company und SAS, Version 9.1, Copyright by SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA durchgeführt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Analyse der Baseline-Charakteristika

Der Vergleich der Patientenprofile in beiden Gruppen bezüglich der Baseline-Charakteristika zeigte in der Auswertung von Altersspektrum, Geschlecht, Operationsart und -dauer, Body Mass Index (BMI), Gewichtsklassifikation nach DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.), ASA (American Society of Anesthesiologists) Klassifikation, Rauchverhalten und Nebenerkrankungen bei den Patienten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 5). In beiden Randomisierungsgruppen war das Altersspektrum zwischen 54 und 70 Jahren. Die Patienten waren in beiden Gruppen überwiegend männlichen Geschlechts. Die durchgeführte Operationsart war fast zu gleichen Teilen auf Pankreasresektion und Ösophagusresektion innerhalb der Gruppen verteilt.

**Tabelle 5:** Signifikanzniveau der Baseline-Charakteristika, Auswertung mit exaktem Mann-Whitney-U-Test bzw. exaktem Chi-Quadrat-Test.

Parameter	GM-CSF-Gruppe (n=10)	Placebogruppe (n=10)	Signifikanz- niveau
<b>Alter [in Jahren]: Median (25. und 75. Perzentilen)</b>	64,0 (54,3-68,5)	61,5 (55,0-69,3)	p=0,791
<b>Geschlecht (weiblich/männlich)</b>	1/9	3/7	p=0,582
<b>Operation (Ösophagus/Pankreas)</b>	4/6	6/4	p=0,656
<b>Operationsdauer [min]: Median (25. und 75. Perzentilen)</b>	390 (322-449)	360 (304-421)	P=0,733
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]: Median (25. und 75. Perzentilen)</b>	25,8 (23,3-28,0)	25,5 (24,2-27,5)	p=0,880
<b>Gewichtsklassifikation DGE (Normal/Übergewicht/Adipositas)</b>	4/6/0	3/6/1	p=1,000
<b>ASA-Score (1/2/3/4)</b>	0/5/5/0	0/7/3/0	p=0,650
<b>Rauchverhalten (Raucher/Nichtraucher/Nieraucher)</b>	3/6/1	3/4/3	p=0,632
<b>KHK</b>	3	2	p=1,000
<b>Arterielle HTN</b>	6	6	p=1,000
<b>Diabetes mellitus</b>	2	1	p=1,000
<b>COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)</b>	1	1	p=1,000

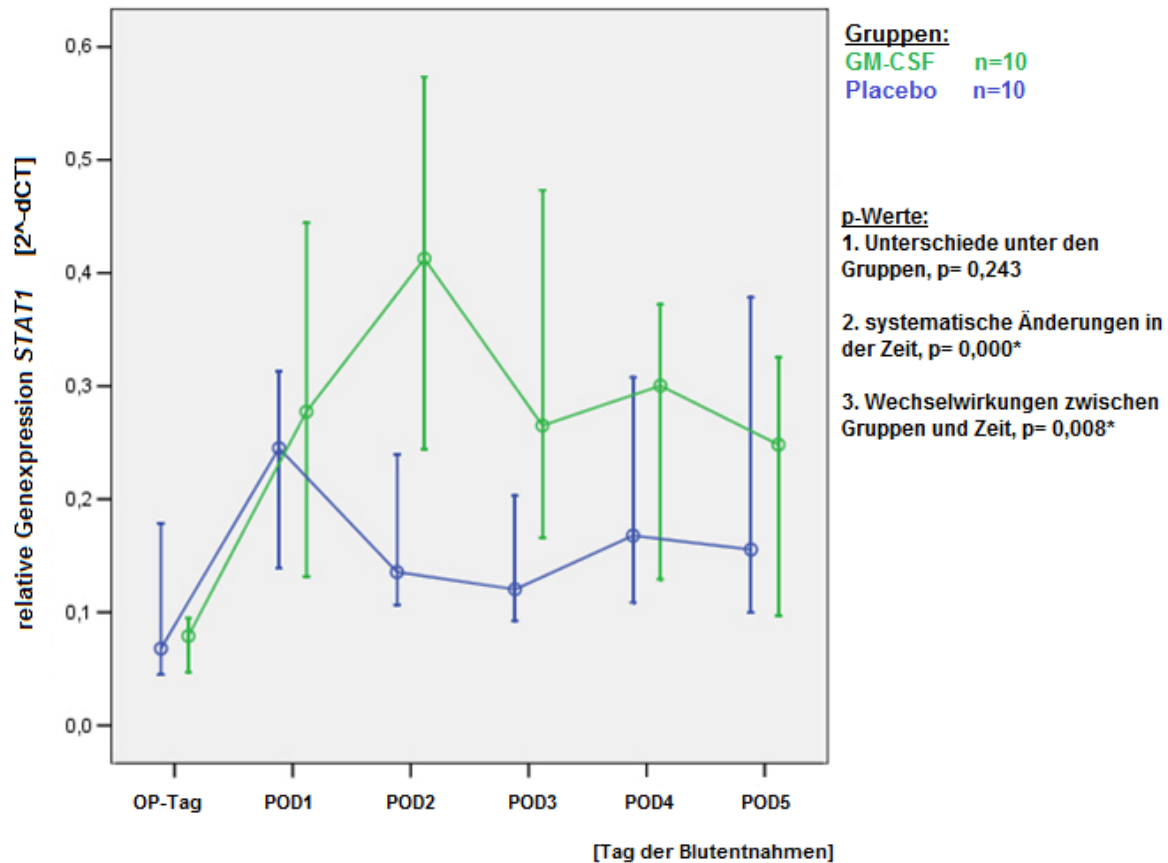
## 6.2 Transkriptionsfaktoren

### 6.2.1 *STAT1*

Die univariate Signifikanzanalyse mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in der Genexpression des Transkriptionsfaktors *STAT1* am POD2 ( $p=0,008$ ) und POD3 ( $p=0,028$ ). Ebenso waren die Ergebnisse der longitudinalen Analyse über die Zeit ( $p<0,0001$ ) und die Wechselwirkungen zwischen den Gruppen und der Zeit ( $p=0,008$ ) signifikant. Die Gruppenunterschiede für *STAT1* in der longitudinalen Analyse waren nicht signifikant ( $p=0,243$ ). Am POD2, also annähernd 24 Stunden nach der ersten Gabe des Studienmedikamentes, war der Median für die *STAT1*-Expression in der GM-CSF-Gruppe auf 0,413 angestiegen und in der Placebogruppe von 0,245 (POD1) auf 0,136 abgesunken. Der Median in der GM-CSF-Gruppe war am POD2 um über 33% des POD1 Wertes weiter angestiegen, während es in der Placebogruppe am POD2 zu einem Abfall in der *STAT1*- Expression um 60% gegenüber dem Median am POD1 kam (Abbildung 4, Tabelle 6). Am POD 3 war in der Placebogruppe der Median für die *STAT1*-Expression im Vergleich zum POD2 abgesunken; am POD4 zeigte sich in der Placebogruppe ein geringfügiger Anstieg der *STAT1*-Expression. Auch in der GM-CSF-Gruppe war in der *STAT1*-Expression am POD4 ein Anstieg zu vermerken.

**Tabelle 6:** Deskriptive Analyse der *STAT1* Expression und Signifikanzanalyse mit exaktem Mann-Whitney-U-Test zwischen beiden Randomisierungsgruppen, Angabe von *STAT1* als  $2^{-dCT}$ -Wert, Zeitraum: OP-Tag bis POD5. \*Signifikante p-Werte.

Tag der Blutentnahme		<i>STAT1</i> Expression [ $2^{-dCT}$ ] GM-CSF-Gruppe n=10	<i>STAT1</i> Expression [ $2^{-dCT}$ ] Placebogruppe n=10
OD	Median	0,079	0,068
	p-Wert	0,905	
POD1	Median	0,277	0,245
	p-Wert	0,661	
POD2	Median	0,413	0,136
	p-Wert	0,008*	
POD3	Median	0,265	0,120
	p-Wert	0,028*	
POD4	Median	0,300	0,168
	p-Wert	0,436	
POD5	Median	0,248	0,156
	p-Wert	0,931	



**Abbildung 4:** Darstellung der quantitativen Messwerte des Transkriptionsfaktors *STAT1*. Dargestellt ist die relative Genexpression ( $2^{-dCT}$ ); Zeitraum OD bis POD5, dargestellt als Mediane (o) und 25. bzw. 75. Perzentile (-). \*statistisch signifikantes Ergebnis in der longitudinalen Analyse

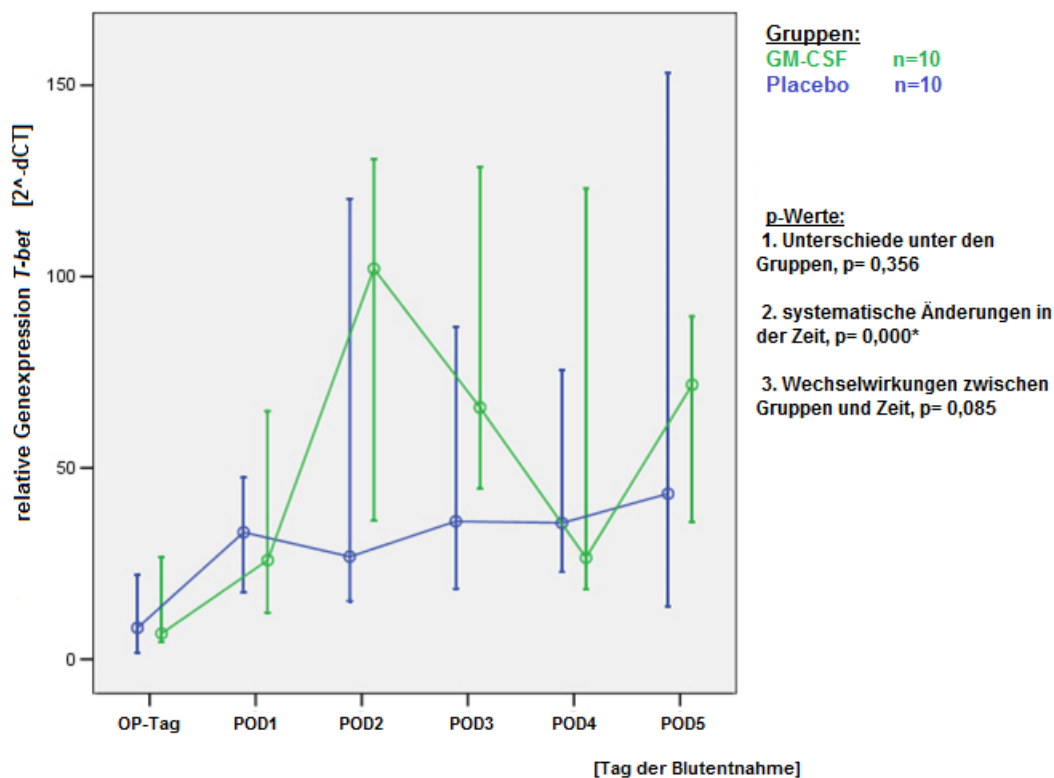
### 6.2.2 *T-bet*

Für die Genexpression des Transkriptionsfaktors *T-bet* ergab die Signifikanzanalyse mit dem Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Randomisierungsgruppen GM-CSF und Placebo für die Expression des Transkriptionsfaktors *T-bet* im Zeitraum OD bis POD5. Die Gruppenunterschiede für *T-bet* sind in der longitudinalen Analyse ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,356$ ). Die Abbildung 10 zeigt die quantitative Expression des Transkriptionsfaktors *T-bet* ( $2^{-dCT}$ ) über den Zeitraum vom OD bis zum POD5 für die GM-CSF-Gruppe und die Placebogruppe als Mediane (o) und als 25.- bzw. 75.-Perzentile (-). Der Median für die Expression von *T-bet* lag am OD in beiden Gruppen unter 10, in der GM-CSF-Gruppe bei 6,751 und in der Placebogruppe bei 8,218. Am POD1 war in beiden Gruppen ähnlich wie bei der *STAT1*-Expression ein Anstieg der *T-bet*-Expression zu sehen. Dabei war am POD1 der Median in der Placebogruppe bei 33,181 und in der GM-CSF-Gruppe bei 25,902 gemessen worden. Am POD2 war der Median für *T-bet* in der Placebogruppe auf 26,813 abgesunken. In der GM-CSF-Gruppe stieg der Medianwert für

*T-bet* am POD2 auf über 100 an und fiel am POD3 auf 65,799 ab. Am POD3 war in der Placebogruppe der Medianwert auf 36,044 wieder etwas angestiegen und lag auch am POD4 beinahe unverändert bei 35,629. Am POD5 war in der Placebogruppe der Median für *T-bet* mit 43,261 wieder etwas angestiegen (Abbildung 5, Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Deskriptive Analyse der *T-bet* Expression und Signifikanzanalyse mit exaktem Mann-Whitney-U-Test zwischen beiden Randomisierungsgruppen, Angabe von *T-bet* als  $2^{\Delta\text{-dCT}}$ -Wert, Zeitraum: OP-Tag bis POD5.

Tag der Blutentnahme		<i>T-bet</i> Expression [ $2^{\Delta\text{-dCT}}$ ] GM-CSF-Gruppe n=10	<i>T-bet</i> Expression [ $2^{\Delta\text{-dCT}}$ ] Placebogruppe n=10
OD	Median	6,751	8,218
	p-Wert	0,604	
POD1	Median	25,902	33,181
	p-Wert	0,905	
POD2	Median	102,064	26,813
	p-Wert	0,079	
POD3	Median	65,799	36,044
	p-Wert	0,156	
POD4	Median	26,538	35,629
	p-Wert	0,730	
POD5	Median	71,755	43,261
	p-Wert	0,436	



**Abbildung 5:** Darstellung der quantitativen Messwerte des Transkriptionsfaktors *T-bet*. Dargestellt ist die relative Genexpression ( $2^{\Delta\text{-dCT}}$ ); OD bis POD5, dargestellt als Mediane (o) und 25. bzw. 75. Perzentile (-). \*statistisch signifikantes Ergebnis in der longitudinalen Analyse.

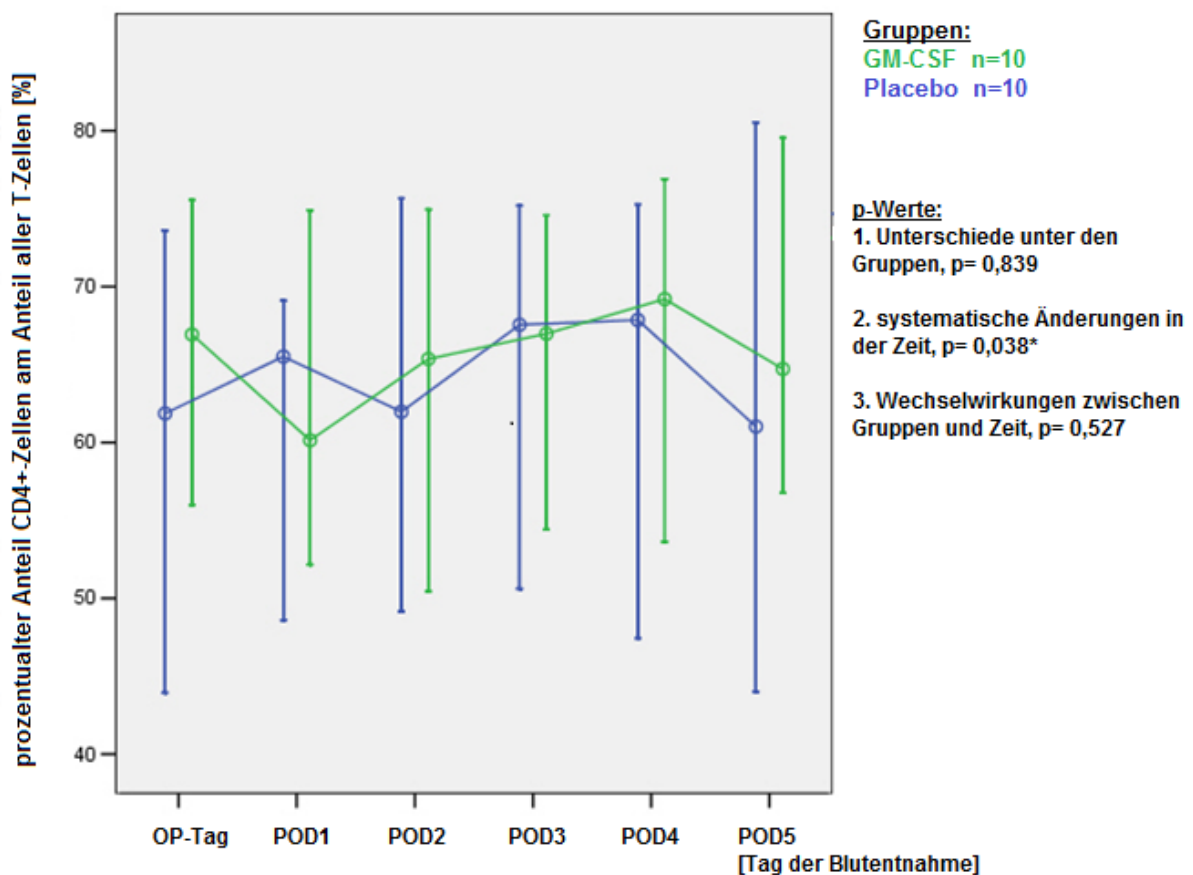
In der GM-CSF-Gruppe war am POD3 und POD4 die Entwicklung in der *T-bet*-Expression tendenziell abfallend. Der Median am POD4 lag trotz abfallender Werte dennoch bei 26,538 und mit diesem Medianwert noch über der *T-bet*-Expression am POD1 (25,902) in dieser Gruppe. Am POD5 kam es in der GM-CSF-Gruppe wieder zu einem Anstieg des Medianwertes auf 71,755. In beiden Gruppen kam es nicht zu einem Abfall der *T-bet*-Expression unter den Medianwert des OD.

### 6.3 Anteil CD4+-Zellen

Die Gruppenunterschiede in der longitudinalen Analyse für die Anzahl der CD4+-Zellen sind nicht signifikant ( $p=0,839$ ). Die Entwicklung der CD4+-Zellen ist in der Abbildung 6 dargestellt. Die deskriptive Analyse der CD4+-Zellen mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Randomisierungsgruppen GM-CSF und Placebo im Beobachtungszeitraum ab dem OD bis POD5. Die Werte in der Abbildung 6 beziehen sich auf den prozentualen Anteil der CD4+-Zellen am Anteil aller T-Zellen. Am OD lag in der GM-CSF-Gruppe der Median für den prozentualen Anteil der CD4+-Zellen an der Gesamtmenge aller T-Zellen bei 66,93% und in der Placebogruppe bei 61,86%. In den darauffolgenden Tagen lagen die Medianwerte für den Anteil CD4+-Zellen in der GM-CSF-Gruppe und in der Placebogruppe in einem engen Intervall zwischen 60% und 70%. Am POD1 stieg in der Placebogruppe der prozentuale Anteil im Median leicht an auf 65,51%. In den Folgetagen ab dem POD2 blieben die Werte für den Median in der Placebogruppe bis zum POD5 zwischen 61% und 68% stationär. In der GM-CSF-Gruppe erreichte am POD1 der prozentuale Anteil CD4+-Zellen im Median seinen niedrigsten Wert von 60,14% im Beobachtungszeitraum. Ab dem POD2 war in der GM-CSF-Gruppe ein kontinuierlicher Anstieg der Medianwerte auf bis zu 69,20% der CD4+-Zellen am POD4 zu beobachten. Der Median am POD5 war in der GM-CSF-Gruppe mit einem leichten Rückgang auf 64,72% zu verzeichnen (Abbildung 6, Tabelle 8). Sowohl in der GM-CSF-Gruppe als auch in der Placebogruppe lagen die Werte für den Median am POD5 unterhalb des Medianwertes vom OD. Der Verlauf der prozentualen Entwicklung zeigt, dass die Medianwerte in ihrem prozentualen Intervall stabil sind. Die Standardabweichungen befinden sich vom OD bis einschließlich zum POD4 zwischen 15% und 19%. Eine größere Standardabweichung gab es nur am POD5 in der Placebogruppe.

**Tabelle 8:** Deskriptive Analyse der CD4+-T-Zellen [%] und Signifikanzanalyse mit exaktem Mann-Whitney-U-Test zwischen beiden Randomisierungsgruppen, Angabe der CD4+-T-Zellen als prozentualer Anteil an der Gesamtmenge aller T-Zellen, Zeitraum: OD bis POD5

Tag der Blutentnahme		CD4+-T-Zellen, Anteil in der Gesamtmenge aller T-Zellen [%] GM-CSF-Gruppe n=10	CD4+-T-Zellen, Anteil in der Gesamtmenge aller T-Zellen [%] Placebogruppe n=10
OD	Median	66,93	61,86
	p-Wert	0,631	
POD1	Median	60,14	65,51
	p-Wert	1,000	
POD2	Median	65,36	61,97
	p-Wert	1,000	
POD3	Median	66,98	67,56
	p-Wert	0,912	
POD4	Median	69,20	67,86
	p-Wert	0,853	
POD5	Median	64,72	61,02
	p-Wert	0,720	



**Abbildung 6:** Prozentualer Anteil der CD4+-Zellen am Anteil aller T-Zellen, Zeitraum OD bis POD5, dargestellt als Mediane (o) und 25. bzw. 75. Perzentilen (-). \*statistisch signifikantes Ergebnis in der longitudinalen Analyse.



## 6.4 Th1-Zellen

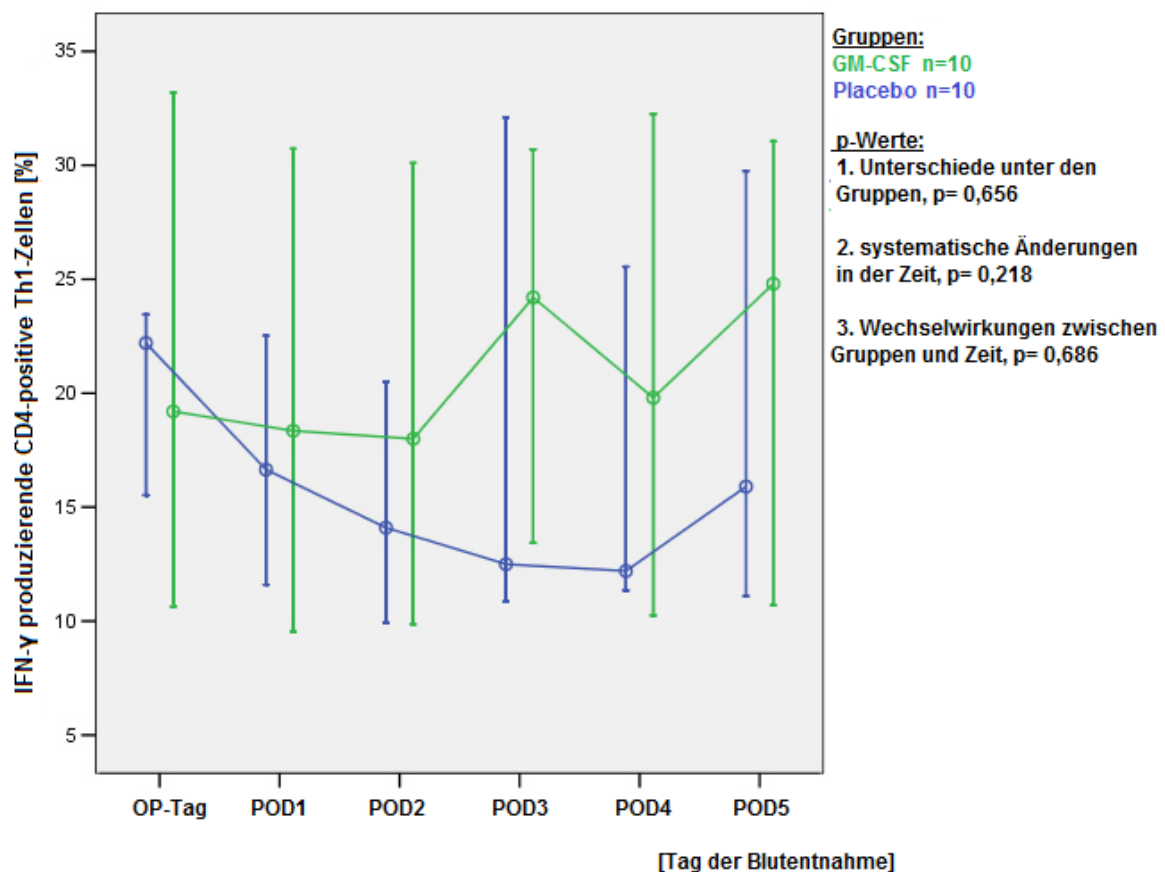
Die Gruppenunterschiede in der longitudinalen Analyse für Th1-Zellen (IFN- $\gamma$  produzierende CD4+-T-Helferzellen vom Typ 1) sind nicht signifikant ( $p=0,656$ ). Die Abbildung 7 zeigt den prozentualen Anteil an Th1-Zellen. Die deskriptive Analyse der Th1-Zellen mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Randomisierungsgruppen GM-CSF und Placebo im Beobachtungszeitraum ab dem OD bis POD5.

Die Werte für den prozentualen Anteil an Th1-Zellen wurden am OD im Median in der GM-CSF-Gruppe bei 19,20% und in der Placebogruppe bei 22,20% gemessen (Abbildung 7). In der GM-CSF-Gruppe war am POD1 der prozentuale Anteil an Th1-Zellen geringfügig abgefallen; hier lag der Median am POD1 bei 18,35%. Am POD2 war in der GM-CSF-Gruppe der Median auf 18,00% weiter abgesunken. Ein deutlicher Anstieg in der GM-CSF-Gruppe konnte am POD3 beobachtet werden; hier war der prozentuale Anteil an Th1-Zellen im Median auf 24,20% angestiegen. Am POD4 kam es in der GM-CSF-Gruppe zwar zu einem Abfallen des prozentualen Anteils an Th1-Zellen auf einen Median von 19,80%. Dieses Ereignis wiederholte sich in der GM-CSF-Gruppe aber nicht am POD5, sondern es kam erneut zu einem Anstieg des prozentualen Anteils an Th1-Zellen, so dass der Median mit 24,80% über dem Wert vom POD3 lag und insgesamt betrachtet der höchste Wert im Beobachtungszeitraum war (Abbildung 7, Tabelle 9).

Am POD1 war in der Placebogruppe der prozentuale Anteil an Th1-Zellen im Median auf 16,65% deutlich stärker als in der GM-CSF-Gruppe abgesunken. Auch an den Folgetagen POD2 und POD3 sank in der Placebogruppe der Anteil an Th1-Zellen weiter ab (Abbildung 7, Tabelle 9). Der niedrigste Medianwert von 12,20% wurde in der Placebogruppe am POD4 gemessen, bevor er schließlich am POD5 erstmals im Beobachtungszeitraum wieder angestiegen war und einen prozentualen Anteil an Th1-Zellen von 15,90% erreichte, mit diesem Wert aber noch deutlich unter dem Wert des OD lag.

**Tabelle 9:** Deskriptive Analyse der Th1-Zellen und Signifikanzanalyse mit exaktem Mann-Whitney-U-Test zwischen beiden Randomisierungsgruppen, Angabe der Th1-Zellen in %, Zeitraum: OD bis POD5

Tag der Blutentnahme		Th1-Zellen [%] GM-CSF-Gruppe n=10	Th1-Zellen [%] Placebogruppe n=10
OD	Median	19,20	22,20
	p-Wert	0,912	
POD1	Median	18,35	16,65
	p-Wert	0,912	
POD2	Median	18,00	14,10
	p-Wert	0,573	
POD3	Median	24,20	12,50
	p-Wert	0,541	
POD4	Median	19,80	12,20
	p-Wert	0,666	
POD5	Median	24,80	15,90
	p-Wert	0,796	

**Abbildung 7:** Prozentualer Anteil IFN- $\gamma$  produzierender CD4+-Th1-Zellen (Th1-Zellen), Zeitraum OD bis POD5, dargestellt als Mediane (o) und 25. bzw. 75. Perzentile (-).

## 6.5 HLA-DR-Expression

Die Messung der HLA-DR-Expression erfolgte im Immunologie Labor der Charité Campus Mitte. Die Ergebnisse der HLA-DR-Expression wurden bereits am 27.02.2015 in der Dissertationsarbeit meines Kollegen und Mitdoktoranden Herrn Dr. med. Johannes Kurth veröffentlicht [47]. Am Operationstag (OD) ergab die Messung aus der präoperativen Blutentnahme bei allen eingeschlossenen Patienten (n=20) eine HLA-DR-Expression von über 10.000 Antigene/Monozyt (AG/M). Bei der univariaten Analyse der HLA-DR-Expression zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der GM-CSF- und der Placebogruppe am zweiten postoperativen Tag (POD2,  $p < 0,0001$ ), sowie am dritten (POD3,  $p = 0,003$ ) und vierten postoperativen Tag (POD4,  $p = 0,049$ ). Die HLA-DR-Expression am OD, POD1 und POD5 waren nicht signifikant [47]. Am POD4 und POD5 erhielten die Patienten gemäß dem Studienprotokoll kein Studienmedikament, auch wenn die HLA-DR-Expression unter 10.000 AG/M gemessen wurde.

## 6.6 Multivariate nichtparametrische Analyse (MANOVA), multivariate nichtparametrische Kovarianzanalyse (MANCOVA) und univariate Analyse der Ergebnisse

In der multivariaten nichtparametrischen Analyse (MANOVA) wurden die klinischen Parameter, die im Beobachtungszeitraum OD bis POD5 erhoben wurden, in einem zweifaktoriellen Design analysiert. Der erste Faktor war die Randomisierungsgruppe (GM-CSF oder Placebo) und galt als unabhängiger Faktor. Als zweiten Faktor, der abhängig war, wurden die zeitlichen Wiederholungen genommen. Die Ergebnisse aus dieser Analyse wurden in einer multivariaten nichtparametrischen Kovarianzanalyse (MANCOVA) erneut analysiert, sofern davon ausgegangen wurde, dass der Ausgangswert der Messungen (Baseline-Parameter = Ergebnisse der Messungen am OD) für die nachfolgenden Werte von Bedeutung war. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse aus der MANOVA und MANCOVA dargestellt. Folgende Hypothesen wurden getestet:

1. Unterschiede zwischen den Gruppen (über die Zeit),
2. Systematische Änderungen in der Zeit (über die Gruppen),

3. Wechselwirkungen (WW) zwischen Gruppe und Zeit, d.h. ist der Zeitverlauf unterschiedlich in den betrachteten Gruppen? Gibt es also bestimmte Zeitabschnitte, in denen sich besondere Gruppenunterschiede zeigen?
4. Systematische Änderungen in der Zeit für jede Gruppe einzeln
5. Prüfen der auf die Baseline adjustierten Werte in Hinblick auf die ersten zwei Hypothesen [Gruppe, Zeit]
6. Prüfen des Einflusses der Kovariaten/ Kovariate = Baseline-Werte

In der multivariaten nichtparametrischen Analyse sind für die Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet* signifikante Ergebnisse über die Gruppen in der systematischen Änderung in der Zeit (Hypothese 2) gezeigt worden. Des Weiteren sind für beide Transkriptionsfaktoren die systematischen Änderungen bei Betrachtung jeder einzelnen Gruppe und der Einfluss der Kovariate, die das Messergebnis am OD darstellt, ebenfalls signifikant. Für den Transkriptionsfaktor *STAT1* ist zusätzlich das Ergebnis der Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Zeit signifikant. CD4+-T-Helferzellen als prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der T-Zellen haben bei Betrachtung der systematischen Änderung in der Zeit und bei der Untersuchung des Einflusses der Kovariate signifikante Ergebnisse. Th1-Zellen (IFN- $\gamma$  produzierende CD4+-T-Helferzellen vom Typ 1) hatten bei der Untersuchung des Einflusses der Kovariate signifikante Ergebnisse. Für HLA-DR bezüglich der Hypothesen 1-5 war ein hochsignifikanter Unterschied zu sehen. Der Einfluss der Kovariate war für HLA-DR nicht signifikant.

**Tabelle 10:** Multivariate nichtparametrische Analyse (MANOVA) und multivariate nichtparametrische Kovarianzanalyse (MANCOVA) für die Parameter *STAT1*, *T-bet*, CD4+-T-Helferzellen als prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der T-Zellen (CD4+-T-Helferzellen [%]) und Th1-Zellen [%]. Für die Analyse berücksichtigter Zeitraum: Operationstag (OD) bis POD5.

	<i>STAT1</i> [2 <sup>-d</sup> CT]	<i>T-bet</i> [2 <sup>-d</sup> CT]	CD4+-T- Helferzellen [%]	Th1-Zellen [%]
<b>Unterschiede zwischen den Gruppen (über die Zeit), p-Wert</b>	0,243	0,356	0,839	0,656
<b>Systematische Änderungen in der Zeit (über die Gruppen), p-Wert</b>	0,000	0,000	0,038	0,218
<b>WW zwischen Gruppe und Zeit, p-Wert</b>	0,008	0,085	0,527	0,686
<b>Systematische Änderungen in der Zeit für Placebogruppe, p-Wert</b>	0,001	0,000	0,295	0,137
<b>Systematische Änderungen in der Zeit für GM-CSF- Gruppe, p-Wert</b>	0,000	0,000	0,503	0,636
<b>MANCOVA Gruppe: p-Wert</b>	0,085	0,620	0,431	0,740
<b>MANCOVA Zeit: p-Wert</b>	0,096	0,023	0,017	0,093
<b>Kovariate</b>	0,018	0,001	0,000	0,005

## 6.7 Analyse der Outcome-Charakteristika

In Tabelle 11 sind die Outcome-Charakteristika für die Randomisierungsgruppen GM-CSF und Placebo dargestellt. Untersucht wurde das Auftreten mindestens einer Infektion nach CDC-Kriterien (Center for Disease Control, standardisierte Diagnostische Kriterien), Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), die Liegedauer auf ITS, die Gesamtliegedauer im Krankenhaus und die Anzahl der verstorbenen Patienten im

Beobachtungszeitraum (OD bis POD9). In der GM-CSF-Gruppe lag die Anzahl der Patienten, die mindestens eine Infektion hatten, bei insgesamt 5 von 10 Patienten. In der Placebogruppe hingegen war bei 6 von 10 Patienten mindestens eine Infektion nach CDC-Kriterien innerhalb des Beobachtungszeitraumes aufgetreten. Ein SIRS entwickelten in der GM-CSF-Gruppe 3 von 10 Patienten, in der Placebogruppe waren es 2 von 10 Patienten. Die Liegedauer auf der ITS lag im Median bei 4,0 Tagen in der GM-CSF-Gruppe und bei 3,2 Tagen in der Placebogruppe. Die Gesamtliegedauer im Krankenhaus war im Median bei 16,9 Tagen in der GM-CSF-Gruppe und bei 14,4 Tagen in der Placebogruppe gemessen worden. Eine Signifikanzanalyse wurde mit dem exakten Fisher-Test bzw. dem exakten Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei zeigte sich für die untersuchten Outcome-Charakteristika zwischen den Randomisierungsgruppen kein signifikanter Unterschied.

**Tabelle 11:** Signifikanzniveau der Outcome-Charakteristika in der GM-CSF-Gruppe und in der Placebogruppe

	<b>GM-CSF-Gruppe (n=10)</b>	<b>Placebogruppe (n=10)</b>	<b>Signifikanzniveau p</b>
<b>Mindestens eine Infektion [n]</b>	5	6	1,000
<b>SIRS [n]</b>	3	2	1,000
<b>Liegedauer ITS [d] Mediane (25. und 75. Perzentile)</b>	4,0 (0,8-10,4)	3,2 (2,4-4,9)	0,880
<b>Liegedauer gesamt [d] Mediane (25.und 75. Perzentile)</b>	16,9 (11,8-30,0)	14,4 (11,5-20,6)	0,364
<b>Verstorben [n]</b>	1	0	1,000

## 7 Diskussion

### 7.1 Studienergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang einer postoperativen unspezifischen Immunstimulation mit GM-CSF auf Th1-Zellen (CD4+-T-Helferzellen vom Typ 1) bei immunsupprimierten Patienten, welche postoperativ eine HLA-DR-Expression unter 10.000 AG/M aufwiesen, placebokontrolliert analysiert. Zum eingeschlossenen Patientenkollektiv zählten solche Patienten, die sich aufgrund ihrer Erkrankung einer elektiven Pankreas- oder Ösophagusresektion unterzogen. Die Regulation der Th1-Zellen wurde durch Messungen der für die Th1-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet*, sowie durch intrazelluläre Messung des Zytokins IFN- $\gamma$  nach *ex vivo* Stimulation von PBMCs ergänzt. Andere Studien, die die gleiche Fragestellung thematisieren, liegen zum Vergleich nicht vor. Die wichtigsten Aussagen bei der Beurteilung der Ergebnisse sind die signifikanten Unterschiede in der univariaten Analyse bezüglich der *STAT1*-Expression am POD2 und POD3 in der GM-CSF-Gruppe. Mittels Real-time-PCR (RT-PCR) Untersuchungen konnte für *STAT1* und *T-bet* in der GM-CSF-Gruppe gezeigt werden, dass die unspezifische Immunstimulation mit GM-CSF eine signifikant erhöhte Genexpression von *STAT1* am POD2 und am POD3, sowie eine erhöhte, jedoch nicht signifikante Genexpression von *T-bet* an POD2 und POD3 im Vergleich zur Placebogruppe induzierte. Um die Differenzierung der T-Helferzellen in die Subpopulation von Th1-Zellen zu bestimmen, wurde die intrazelluläre Produktion von IFN- $\gamma$  nach *ex vivo* Stimulation isolierter PBMCs mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Ausgewertet wurden der prozentuale Anteil CD4+-T-Helferzellen am Anteil aller T-Zellen und der prozentuale Anteil an Th1-Zellen. Der Median für den prozentualen Anteil an CD4+-T-Helferzellen lag in beiden Gruppen annähernd gleich hoch. Dagegen zeigte der Anteil an T-Helferzellen, die nach Stimulation IFN- $\gamma$  produzierten und damit als Th1-Zellen identifiziert wurden, zwischen den Gruppen am POD2 und POD3 deutliche, wenn auch keine signifikanten Unterschiede. Eine Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors *T-bet* vom Transkriptionsfaktor *STAT1* ist aus vorangegangenen Studien bekannt [48-53]. Die signifikanten Ergebnisse für *STAT1* könnten hinweisend auf einen indirekten Effekt von GM-CSF auf den Transkriptionsfaktor sein. Szabo et al. zeigten, dass die Regulation von *T-bet* auch dem Signal des T-Zell-Rezeptors (TCR) folgt [54, 55]. Zudem hat *T-bet* einen direkten Effekt auf die Expression von Natürlichen Killerzellen (NK)

[56] und einen *STAT4* unabhängigen Effekt auf die Th1-Zellentwicklung [57]. Eksioğlu EA. et al. konnten eine erhöhte Expression der Zytokine IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in PBMCs, T-Lymphozyten und APC nach Stimulierung mit GM-CSF messen und bezeichneten GM-CSF als „klinisches Agens für die Immunstimulation“ [58]. Eine Korrelation der Serumkonzentration von GM-CSF und T-Helferzellen beobachteten Moser et al. in einer klinischen Studie bei Patienten mit zystischer Fibrose und chronischer Lungeninfektion. Dabei war die Expression von IFN- $\gamma$  immer dann erhöht, wenn auch GM-CSF im Serum erhöht war [59]. In einer Studie an Mäusen mit ausgeschalteter GM-CSF Expression konnte gezeigt werden, dass diese nach einer Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis* verstarben, aufgrund ihrer Unfähigkeit, eine Th1-Zellantwort aufrecht zu erhalten [60]. Es liegt nahe, dass die Intervention mit GM-CSF die Expression von *T-bet* und von *STAT1* beeinflusst und daher auch die IFN- $\gamma$  produzierenden Th1-Zellen in der GM-CSF-Gruppe erhöht sind (systematische Änderungen in der Zeit  $p=0,038$ ). Betrachtet man die Ergebnisse der intrazellulären IFN- $\gamma$  Expression in den Th1-Zellen, hatten diese den höchsten Median in der GM-CSF-Gruppe am POD3, der höchste Median für die Genexpression von *STAT1* und *T-bet* war in dieser Gruppe bereits am POD2 erreicht worden. Die erhöhte Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender Th1-Zellen nach *ex vivo* Stimulation korrelierte demzufolge mit einer vorangegangenen erhöhten Genexpression von *STAT1* und *T-bet*. Im Zuge der ART VI-Studie wurden auch andere T-Helferzellen-Subpopulationen untersucht und sind in der Arbeit von Herrn Dr. med. Johannes Kurth beschrieben [47]. Herr Kurth untersuchte das Verhältnis von Th17-Zellen zu regulatorischen T-Zellen, welches am zweiten postoperativen Tag in der GM-CSF Gruppe signifikant höher war als in der Placebo-Gruppe ( $p=0,041$ ). Die Ergebnisse der ART VI-Studie zeigten auch, dass in der GM-CSF-Gruppe die unspezifische Immunstimulation mit GM-CSF einen signifikant messbaren Anstieg der HLA-DR-Expression am zweiten und dritten postoperativen Tag bewirkt hatte, nachdem die HLA-DR-Expression am POD1 unter 10.000 AG/M abgefallen war [47]. Meisel et al. zeigten bei Patienten mit einer Sepsis-assoziierten Immunsuppression, dass eine Behandlung mit GM-CSF die monozytäre HLA-DR-Expression wiederherstellen konnte [9]. Bei der Analyse klinischer Studien, die die Expression von HLA-DR auf Monozyten bei Patienten nach einem elektiven chirurgischen Eingriff untersuchten, war die Expression von HLA-DR im postoperativen Verlauf abgefallen [2, 61-64]. Hierbei korrelierte das Ausmaß des chirurgischen Traumas mit der quantitativen Expression von HLA-DR [65-71]. Zwar unterscheiden sich das Patientenkollektiv bzw. die durchgeführten Operationen, wodurch der



Vergleich der Studien erschwert wird. Dennoch bleibt allen gemeinsam, dass die Expression von HLA-DR auf Monozyten als Reaktion auf ein chirurgisches oder akzidentielles Trauma unterhalb eines für den Patienten kritischen Niveaus abfällt und der klinische Verlauf wie auch die Immunantwort unmittelbar beeinflusst wurden. Immunmodulierende Effekte sind bei klinischen Studien ein Ansatz, um postoperative Komplikationen zu verhindern, Patienten vor Infektionen zu schützen oder insgesamt das Outcome des Patienten klinisch zu verbessern [72, 73].

## 7.2 Limitationen

Limitierende Faktoren dieser Dissertationsarbeit sind die niedrige Patientenzahl von insgesamt  $n=20$ . Einmalig lehnte am POD5 ein Studienpatient die Blutentnahme ab. Dadurch reduzierte sich die Summe der Blutproben für die Auswertung am POD5 auf  $n=19$ . Durch geringe Fallzahlen wird der statistische Nachweis erschwert und so können gemessene Effekte als nicht signifikant erscheinen. Die Labordiagnostik für die Transkriptionsfaktorenbestimmung wurde unter Verwendung vorgefertigter Kits gemäß klinikinterner standardisierter und etablierter Methoden durchgeführt. Für die Transkriptionsfaktorenbestimmung erfolgte eine mehrtägige Einweisung durch Frau Birgit Brandt (MTA) in die Methodik des RT-PCR-Verfahrens. Durch die aufeinanderfolgenden Arbeitsschritte (mRNA-Extraktion, Umschreiben der mRNA in cDNA, Durchführung der PCR) ist das manuelle Verfahren arbeitsintensiv und die Methodik sehr empfindlich gegenüber kleinsten externen Veränderungen (Lagerung, Temperatur, Kontamination der Proben mit Fremd-RNA). Trotz höchster Sorgfalt in der Durchführung der Methodik und umsichtigem Umgang mit den Proben könnten die Messergebnisse durch unbeabsichtigte externe Einflussfaktoren beeinträchtigt worden sein. Bei Verdacht beispielsweise der Kontamination der Proben, wurden die Versuche gegebenenfalls wiederholt. Die Stimulierung und Bestimmung der CD4<sup>+</sup>-Subpopulation aus den PBMCs wurde vom Studienpersonal nach einer ausführlichen Einarbeitung in die Methodik, gemäß standardisiertem klinikinternem Protokoll durchgeführt. Begleitet wurde die Laborarbeit der Doktoranden von erfahrenen medizinisch technischen Laborassistentinnen (MTA). Die Gewinnung der PBMCs aus Vollblutproben sowie die Stimulierung und Messung der Zellen war nur durch die sehr gut aufeinander abgestimmte Zusammenarbeit aller Doktoranden möglich. Folglich können durch wechselndes Laborpersonal trotz höchster Sorgfalt und

standardisiertem Protokoll Ungenauigkeiten in den Messergebnissen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Verabreichung des Studienmedikamentes war in dieser klinischen Interventionsstudie von der HLA-DR-Expression am POD1 bis POD3 abhängig und die cut-off-Grenze für HLA-DR bei 10.000 AG/M festgelegt. In der GM-CSF-Gruppe zeigte die einmalige Gabe von GM-CSF am POD1 bei 80% der Patienten einen langfristigen Effekt, der eine weitere Gabe von GM-CSF am POD2 und POD3 unnötig machte, weil die HLA-DR-Expression auch noch nach dem POD3 weiterhin über 10.000 Antigene/Monozyt lag. Ob postoperativ die cut-off-Grenze an eine für den Patienten individuelle Grenze angepasst werden sollte, ist eine noch zu klärende Fragestellung, die es in einer Folgestudie mit größerer Fallzahl noch zu untersuchen gilt.

Die Betrachtung einzelner Laborparameter ist bei der Komplexität des Immunsystems nur wenig aussagekräftig, weil die aufeinander folgenden Reaktionen kaskadenartig ablaufen, so dass nicht alle Laborparameter gleichermaßen erhöht oder erniedrigt sind. Vielmehr ist es ein situationsabhängiger Verlauf von aufeinander abgestimmten und ineinander greifenden Prozessen, die sehr sensibel auf eine Immunimbalance im intrinsischen wie auch extrinsischen System reagieren.

### 7.3 Perspektiven

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer postoperativen unspezifischen Immunstimulation mittels GM-CSF auf Th1-Zellen bei Patienten mit einer postoperativen verminderten HLA-DR-Expression zu analysieren. Hierfür wurde am Operationstag präoperativ sowie an weiteren fünf postoperativen Tagen die Messung der für Th1-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet* mittels Real-time-PCR durchgeführt. Für die Messung der Th1-Zellen wurde die intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Produktion in CD4+-T-Helferzellen nach einer *ex vivo* Stimulation von isolierten PBMCs am Durchflusszytometer verwendet. Untersucht wurden jeweils 10 Patienten aus der GM-CSF-Gruppe und der Placebogruppe. Die unspezifische Stimulation des Immunsystems mit humanem rekombinanten GM-CSF bewirkte, dass eine Immunantwort durch Th1-Zellen induziert wurde. Zusätzlich konnte ein signifikanter Effekt nach der Gabe von GM-CSF auf den Transkriptionsfaktor *STAT1* im Vergleich zur Placebogruppe detektiert werden. Sollte das kritische Moment der postoperativen Immunparalyse bei Patienten in der Praxis durch die Gabe von GM-CSF abwendbar sein, könnte das eine therapeutische Innovation bei der Prophylaxe von Infektionen bedeuten. Denkbar wäre eine prophylaktische Intervention mit GM-CSF bei immunsupprimierten Patienten, um die zelluläre Immunantwort in dieser vulnerablen Gruppe zu unterstützen. Um abschließend zu klären, ob eine prophylaktische Substitution mit GM-CSF die klinischen Outcome-Charakteristika signifikant verbessern kann, bedarf es einer Folgestudie mit größerer Patientenzahl.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Han, S.A., et al., *Comparison of immunologic outcomes of laparoscopic vs open approaches in clinical stage III colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2010. **25**(5): p. 631-8.
2. Handy, J.M., et al., *HLA-DR expression and differential trafficking of monocyte subsets following low to intermediate risk surgery*. Anaesthesia, 2010. **65**(1): p. 27-35.
3. Beloborodova, N.V., I.B. Dmitrieva, and E.A. Chervenskaia, [*Sepsis-induced immune paralysis: pathogenesis, diagnosis, and possible modes of correction*]. Anesteziol Reanimatol, 2008(6): p. 42-8.
4. Haupt, W., et al., *Monocyte function before and after surgical trauma*. Dig Surg, 1998. **15**(2): p. 102-4.
5. Menger, M.D. and B. Vollmar, *Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression?* Langenbecks Arch Surg, 2004. **389**(6): p. 475-84.
6. Spies, C.D., et al., *Altered cell-mediated immunity and increased postoperative infection rate in long-term alcoholic patients*. Anesthesiology, 2004. **100**(5): p. 1088-100.
7. Berguer, R., et al., *Major surgery suppresses maximal production of helper T-cell type 1 cytokines without potentiating the release of helper T-cell type 2 cytokines*. Arch Surg, 1999. **134**(5): p. 540-4.
8. Grimminger, F., K. Mayer, and W. Seeger, [*Is there a reliable immunotherapy in infection?*]. Internist (Berl), 1997. **38**(6): p. 541-52.
9. Meisel, C., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(7): p. 640-8.
10. Cohen, J., S. Opal, and T. Calandra, *Sepsis studies need new direction*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(7): p. 503-5.
11. Hall, M.W., et al., *Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome*. Intensive Care Med, 2011. **37**(3): p. 525-32.
12. Boomer, J.S., et al., *Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure*. JAMA, 2011. **306**(23): p. 2594-605.
13. Das, U., *HLA-DR expression, cytokines and bioactive lipids in sepsis*. Arch Med Sci, 2014. **10**(2): p. 325-35.
14. Gastmeier, P., F. Daschner, and H. Rüdén, *Reduktion nosokomialer Infektionen durch Surveillance Nationale Referenzdaten durch das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System*. Dtsch Arztebl, 2005: p. 102(30)
15. O'Garra, A., *Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 275-83.
16. O'Garra, A., B. Stockinger, and M. Veldhoen, *Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta!* Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 588-90.
17. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
18. Veldhoen, M., et al., *Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6202-10.
19. Stockinger, B., C. Bourgeois, and G. Kassiotis, *CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 39-48.

20. Schiavoni, I., et al., *Live attenuated B. pertussis BPZE1 rescues the immune functions of Respiratory Syncytial virus infected human dendritic cells by promoting Th1/Th17 responses*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100166.
21. Palavecino, C.E., et al., *Immunization with a recombinant bacillus Calmette-Guerin strain confers protective Th1 immunity against the human metapneumovirus*. J Immunol, 2014. **192**(1): p. 214-23.
22. Skibinski, D.A., et al., *Enhanced neutralizing antibody titers and Th1 polarization from a novel Escherichia coli derived pandemic influenza vaccine*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76571.
23. Aghasadeghi, M.R., et al., *Application of outer membrane vesicle of Neisseria meningitidis serogroup B as a new adjuvant to induce strongly Th1-oriented responses against HIV-1*. Curr HIV Res, 2011. **9**(8): p. 630-5.
24. Sereinig, S., et al., *Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(8): p. 898-904.
25. Badovinac, V.P. and J.T. Harty, *Intracellular staining for TNF and IFN-gamma detects different frequencies of antigen-specific CD8(+) T cells*. J Immunol Methods, 2000. **238**(1-2): p. 107-17.
26. Brune, I.B., et al., *Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery*. Am J Surg, 1999. **177**(1): p. 55-60.
27. Hornell, T.M., et al., *Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2374-83.
28. Kiertscher, S.M., et al., *Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4 expand and activate type-1 dendritic cells (DC1) when administered in vivo to cancer patients*. Int J Cancer, 2003. **107**(2): p. 256-61.
29. Eksioglu, E.A., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the proportion of circulating dendritic cells after autologous but not after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Cytotherapy, 2011. **13**(7): p. 888-96.
30. Nierhaus, A., et al., *Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis*. Intensive Care Med, 2003. **29**(4): p. 646-51.
31. Waller, E.K., *The role of sargramostim (rhGM-CSF) as immunotherapy*. Oncologist, 2007. **12 Suppl 2**: p. 22-6.
32. Lonial, S., et al., *A randomized trial comparing the combination of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus granulocyte colony-stimulating factor versus granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of dendritic cell subsets in hematopoietic progenitor cell products*. Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(12): p. 848-57.
33. Lonial, S., *Immunomodulation: the role of hematopoietic cytokines*. Support Cancer Ther, 2004. **1**(2): p. 80-8.
34. Wei, W.C., et al., *GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells*. Cytokine, 2011. **55**(1): p. 79-89.
35. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
36. Moldenhauer, L.M., et al., *GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 7085-96.

37. Reed, S.G., et al., *Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit Trypanosoma cruzi and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma.* J Exp Med, 1987. **166**(6): p. 1734-46.
38. Weycker, D. and R.L. Barron, *Comparison of hospitalization risk and associated costs among patients receiving sargramostim, filgrastim, and pegfilgrastim for chemotherapy-induced neutropenia.* Cancer, 2010. **116**(12): p. 3073; author reply 3073-4.
39. Weycker, D., et al., *Comparative effectiveness of filgrastim, pegfilgrastim, and sargramostim as prophylaxis against hospitalization for neutropenic complications in patients with cancer receiving chemotherapy.* Am J Clin Oncol, 2012. **35**(3): p. 267-74.
40. Amato, R.J., S. Saxena, and M. Stepankiw, *Phase II trial assessing granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, ketoconazole plus mitoxantrone in metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatments.* Cancer Invest, 2013. **31**(3): p. 177-82.
41. Tada, F., et al., *Phase I/II study of immunotherapy using tumor antigen-pulsed dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma.* Int J Oncol, 2012. **41**(5): p. 1601-9.
42. Sato, T., et al., *Immunoembolization of malignant liver tumors, including uveal melanoma, using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5436-42.
43. Thakur, A., et al., *Induction of specific cellular and humoral responses against renal cell carcinoma after combination therapy with cryoablation and granulocyte-macrophage colony stimulating factor: a pilot study.* J Immunother, 2011. **34**(5): p. 457-67.
44. Cheng, Y.C., et al., *Addition of GM-CSF to trastuzumab stabilises disease in trastuzumab-resistant HER2+ metastatic breast cancer patients.* Br J Cancer, 2010. **103**(9): p. 1331-4.
45. Norell, H., et al., *Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial.* J Transl Med, 2010. **8**: p. 53.
46. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.* Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
47. Kurth, J., *Einfluss einer Therapie mit GM-CSF auf die Konzentrationen von IL-17 produzierenden Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit postoperativer Immunsuppression.* 2015.
48. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells.* Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
49. Hibbert, L., et al., *IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells.* J Interferon Cytokine Res, 2003. **23**(9): p. 513-22.
50. Kamiya, S., et al., *An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells.* J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3871-7.
51. Lighvani, A.A., et al., *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15137-42.
52. Siebler, J., et al., *A key pathogenic role for the STAT1/T-bet signaling pathway in T-cell-mediated liver inflammation.* Hepatology, 2003. **38**(6): p. 1573-80.
53. Xu, W. and J.J. Zhang, *Stat1-dependent synergistic activation of T-bet for IgG2a production during early stage of B cell activation.* J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7419-24.

54. Szabo, S.J., et al., *Pillars Article: A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment*. *Cell*. 2000. **100**: 655-669. *J Immunol*, 2015. **194**(7): p. 2961-75.
55. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. *Cell*, 2000. **100**(6): p. 655-69.
56. Robbins, S.H., et al., *Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(3): p. 757-65.
57. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. *Science*, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
58. Eksioglu, E.A., et al., *GM-CSF promotes differentiation of human dendritic cells and T lymphocytes toward a predominantly type 1 proinflammatory response*. *Exp Hematol*, 2007. **35**(8): p. 1163-71.
59. Moser, C., et al., *Serum concentrations of GM-CSF and G-CSF correlate with the Th1/Th2 cytokine response in cystic fibrosis patients with chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection*. *APMIS*, 2005. **113**(6): p. 400-9.
60. Gonzalez-Juarrero, M., et al., *Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control Mycobacterium tuberculosis infection*. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(6): p. 914-22.
61. Spies, C.D., et al., *Influence of vaccination and surgery on HLA-DR expression in patients with upper aerodigestive tract cancer*. *J Int Med Res*, 2008. **36**(2): p. 296-307.
62. Kawasaki, T., et al., *Effects of epidural anaesthesia on surgical stress-induced immunosuppression during upper abdominal surgery*. *Br J Anaesth*, 2007. **98**(2): p. 196-203.
63. Wakefield, C.H., et al., *Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery*. *Br J Surg*, 1993. **80**(2): p. 205-9.
64. Decker, D., et al., *[Changes in the cytokine concentration (Il-6, Il-8, Il-1ra) and their cellular expression of membrane molecules (CD25, CD30, HLA-DR) after surgical trauma]*. *Zentralbl Chir*, 1997. **122**(3): p. 157-63; discussion 163-4.
65. Kloosterman, T., et al., *Unimpaired immune functions after laparoscopic cholecystectomy*. *Surgery*, 1994. **115**(4): p. 424-8.
66. Carlei, F., et al., *Effects of laparoscopic and conventional (open) cholecystectomy on human leukocyte antigen-DR expression in peripheral blood monocytes: correlations with immunologic status*. *World J Surg*, 1999. **23**(1): p. 18-22.
67. Schietroma, M., et al., *Evaluation of immune response in patients after open or laparoscopic cholecystectomy*. *Hepatogastroenterology*, 2001. **48**(39): p. 642-6.
68. Schietroma, M., et al., *[The influence of laparoscopic cholecystectomy vs laparotomy on the monocyte antigen expression (HLA-DR)]*. *Ann Ital Chir*, 1998. **69**(5): p. 619-23; discussion 623-6.
69. Chopra, S.S., et al., *Postoperative immunosuppression after open and laparoscopic liver resection: assessment of cellular immune function and monocytic HLA-DR expression*. *JSLs*, 2013. **17**(4): p. 615-21.
70. Klava, A., et al., *Monocyte activation after open and laparoscopic surgery*. *Br J Surg*, 1997. **84**(8): p. 1152-6.
71. Liu, C., J. Liu, and S. Zhang, *Laparoscopic versus conventional open surgery for immune function in patients with colorectal cancer*. *Int J Colorectal Dis*, 2011. **26**(11): p. 1375-85.
72. Han, L.N., et al., *Effect of immune modulation therapy on cardiac function and T-bet/GATA-3 gene expression in aging male patients with chronic cardiac insufficiency*. *Immunotherapy*, 2013. **5**(2): p. 143-53.

73. Aida, T., et al., *Preoperative immunonutrition decreases postoperative complications by modulating prostaglandin E2 production and T-cell differentiation in patients undergoing pancreatoduodenectomy*. *Surgery*, 2014. **155**(1): p. 124-33.



## 9 Abkürzungsverzeichnis

AG/M	Antigene/Monozyt
AMG	Arzneimittelgesetz
APC	antigen-presenting cells = antigenpräsentierende Zellen
ART-VI	Addiction Research Team VI
β-HCG	humanes Choriongonadotropin
BD	Becton Dickinson
BGA	Blutgasanalyse
BIS	Bispektralindex®, Neuromonitoring
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
CDC-Kriterien	Center for Disease Control, standardisierte Diagnostische Kriterien
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (englisch: complementary Desoxyribonucleinacid)
Ct	cycle threshold, englische Abkürzung für Schwellenwert-Zyklus
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleinacid, englisch für Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid, <span style="float: right;">englisch</span> <span style="float: right;">für</span> Ethylenediamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
g	Kontextabhängig: als Mengenangabe in Gramm oder als Angabe der maximalen Beschleunigung um den Faktor der Erdbeschleunigung beim Zentrifugieren
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
h	hour, englisch für Stunde
HLA	humanes Leukozytenantigen
HLA-DR	Unterform des humanen Leukozytenantigens (HLA)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN-γ	Interferon-gamma

IL	Interleukin
ITS	Intensivstation
i.v.	intravenös
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute, Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonucleic acid, englisch für Boten-Ribonukleinsäure
n	Stichprobengröße/Fallzahl, hier: Anzahl der Patienten
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
OD	Operationstag
p-Wert	Signifikanzwert
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase Chain Reaction, englisch für Polymerase-Kettenreaktion
PDK	Periduralkatheter
POD	postoperative day = postoperativer Tag
RI	Ribonuclease Inhibitor
RNA	Ribonucleic acid, englisch für Ribonukleinsäure
RT-PCR	hier: Real-time-Polymerase-Kettenreaktion
RDD	Bezeichnung für Puffer im PAXgene Blood RNA Kit von QIAGEN
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOP	Standard Operating Procedure
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
<i>STAT</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
<i>T-bet</i>	<i>T-box expressed in T-cells</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helferzelle
Th1-Zelle	T-Helferzelle vom Typ 1

Th2-Zelle	T-Helferzelle vom Typ 2
Th17-Zelle	T-Helferzelle vom Typ 17
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg	regulatorische T-Zelle
U	Units, englisch für Einheiten
vs.	versus
ZVK	zentralvenöser Katheter

## 10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Fatima Yürek, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss einer postoperativen Immunstimulation mit GM-CSF versus Placebo auf die CD4+-Subpopulation IFN- $\gamma$  produzierender Th1-Zellen unter Berücksichtigung der Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autorin bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 03.09.2015

---

Fatima Yürek

## Ausführliche Anteilserklärung an der klinischen Studie

Frau Fatima Yürek hatte folgenden Anteil an der klinischen Studie EudraCT Number: 2007-003111-31: Einfluss einer postoperativen Vakzination oder GM-CSF bei immunsupprimierten Patienten nach Pankreas- oder Ösophagusresektion auf den Verlauf einer Immunsuppression und die postoperative Infektionsrate. Eine randomisierte, dreiarmige, placebokontrollierte, doppelblinde Pilotstudie im Double-Dummy-Design, (Kurztitel: ART VI).

Beitrag im Einzelnen: als Doktorandin in der klinischen Studie ART VI war Frau Fatima Yürek an der Datenerhebung bei Studienpatienten maßgeblich beteiligt. Dazu gehörte die präoperative Blutentnahme bei den Studienpatienten, die Begleitung der Narkoseeinleitung, der gesamten Operation und der Narkoseausleitung zur Erhebung intraoperativer Daten, die postoperative Studienvisite täglich auf Intensiv- und auf der Normalstation bis zum neunten postoperativen Tag. Zum Aufgabenfeld von Frau Yürek zählten auch die täglichen Blutentnahmen bis zum fünften postoperativen Tag sowie die Analysen der Blutproben im klinikinternen Forschungslabor. Die RNA- und cDNA-Analysen mit Bestimmung der Transkriptionsfaktoren aus Blutproben der Studienpatienten wurden vollständig von Frau Fatima Yürek übernommen und gemessen. Außerdem war Frau Fatima Yürek an der Erstellung der Datenbank, Eingabe der Studienpatientendaten in die Datenbank und in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Wernecke und Frau Prof. Spies an der Auswertung der Daten beteiligt.

Frau Fatima Yürek hat in ihrer Monographie mit dem Titel „Einfluss einer postoperativen Immunstimulation mit GM-CSF versus Placebo auf die CD4+-Subpopulation IFN- $\gamma$  produzierender Th1-Zellen unter Berücksichtigung der Transkriptionsfaktoren *STAT1* und *T-bet*“ die im Titel befindlichen Variablen, deren Relevanz sie selbstständig als Thema erarbeitet hat, alleine unter Supervision bestimmt.

Das Hauptpaper wurde bei „PLOS ONE“ (ohne die Ergebnisse aus der Dissertationsarbeit von Frau Fatima Yürek zu CD4+-Subpopulation INF- $\gamma$  produzierender Th1-Zellen, *STAT1* und *T-bet*) eingereicht:

„Influence of Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor or influenza vaccination on HLA-DR, infection and delirium days in immunosuppressed surgical patients”

Claudia Spies<sup>1</sup>, MD; Alawi Lütz<sup>1</sup>, MD; Gunnar Lachmann<sup>1</sup>, MD; Markus Renius<sup>1</sup>, MD; Clarissa von Haefen<sup>1</sup>, PhD; Klaus-Dieter Wernecke<sup>2</sup>, PhD; Marcus Bahra<sup>3</sup>, MD, Alexander Schiemann<sup>1</sup>, MD; Marco Paupers<sup>1</sup>, MD; Christian Meisel<sup>4</sup>, MD

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Campus Charité Mitte and Campus Virchow-Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

<sup>2</sup>Sostana GmbH Berlin, Germany

<sup>3</sup>Department of General, Abdominal and Transplantation Surgery, Campus Virchow-Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

<sup>4</sup>Institute of Medical Immunology, Campus Virchow-Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

Weitere Publikationen sind nach Primärpublikation der oben genannten Hauptarbeit geplant.

Berlin, 03.09.2015

---

Fatima Yürek (Doktorandin)

---

Frau Prof. Dr. C. Spies (Doktormutter)

## **11 Lebenslauf**

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.

## 12 Publikationsliste

### Posterpräsentation / Abstract:

Yürek F, Weiss B, von Haefen C, Wernecke KD, Spies C: Postoperative Immunstimulation zeigt signifikanten Effekt auf die Expression des Transkriptionsfaktors *STAT1*, Hauptstadtkongress der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, 2015

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung, Erstellung der Datenbank & Auswertung, Verfassen des Abstracts, Erstellung des Posters, Präsentation des Posters



## 13 Danksagung

Mein herzlichster Dank gebührt meiner Doktormutter Frau Universitäts-Prof. Dr. med. Claudia Spies für das Promotionsthema und die Schaffung der Rahmenbedingungen für die umfangreiche Laborarbeit, ihren reichhaltigen Ideenpool und ihre konstruktiven Ratschläge.

Herrn Markus Renius danke ich für seine Betreuung unserer Arbeitsgruppe. Allen Doktoranden von Addiction Research Team VI (ART VI) insbesondere Carolyn Geipel, Siven Relindise, Sara Schillo, Johannes Kurth und Kay Dittrich danke ich vielmals für den starken Zusammenhalt in der Gruppe und die gegenseitige Unterstützung. Die Zusammenarbeit war eine Bereicherung und unverzichtbar für den reibungslosen Ablauf der gesamten Studie.

Mein weiterer Dank gilt Frau Kathrin Scholtz für das Monitoring der Studie, sowie Frau Siebert und Herrn Prof. Dr. Wernecke für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und die konstruktive Zusammenarbeit. Frau Dr. Clarissa von Haefen und Herrn Dr. Marco Sifringer danke ich für die kritische Begutachtung meiner Arbeit und ihre Hilfe bei der Interpretation der Messergebnisse. Herrn Dr. Meisel danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei der Bestimmung der Immunparameter. Außerdem danke ich herzlichst Frau Birgit Brandt und Frau Daniela Bayerl (†), die mir als fachkundige MTAs tatkräftig während meiner praktischen Arbeit im Labor zur Seite standen. Alle nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen, die an der Entstehung und Durchführung der Studie mitgewirkt haben, gilt ebenfalls mein besonderer Dank. Jedem unserer Studienpatienten, die sich trotz ihrer schweren Erkrankung aus freien Stücken für die Teilnahme an der Studie entschlossen hatten, gilt meine größte Hochachtung und inständiger Dank.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung. Insbesondere danke ich meinen beiden Kindern Halil und Asiye Firdevs Yürek für ihre Ausdauer und ihr unendliches Verständnis gegenüber meiner Arbeit. Sie sind wahrhaftig das Beste, was mir im Leben passieren konnte.