

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Postoperative Immundepression und Sepsis:  
Risikoprädiktion anhand der Expression  
immunologisch relevanter Gene**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carl Friedrich Hinrichs

aus Düsseldorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk  
2. Prof. Dr. med. Herwig Gerlach  
3. Prof. Dr. med. Rüdiger von Baehr

Datum der Promotion: 27.03.2009

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
1.1	Klinische Definition der Sepsis und sepsisverwandter Erkrankungen.....	5
1.2	Entzündungsreaktion und Sepsis.....	8
1.3	Postoperative Immundepression als Risikofaktor für die Entstehung einer Sepsis .....	15
1.4	Immunomonitoring in septischen und postoperativen Patienten .....	16
1.5	Immunmodulatorische Strategien in der Sepsistherapie .....	18
1.6	Epidemiologie und Gesundheitsökonomische Bedeutung der Sepsis.....	19
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
3.1	Arbeitsmaterialien .....	23
3.2	Patienten .....	25
3.3	RNA-Präparation.....	26
3.4	Die cDNA (copyDNA)-Synthese.....	28
3.5	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	28
3.6	Statistische Auswertung .....	39
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
4.1	Patienten .....	41
4.2	Die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNFa und IL-18.....	46
4.3	Die Expression von T-Zell- und Natürlichen-Killerzell-Genen.....	49
4.4	Die Expression der Chemokine IL-8, MIP-1a, IP-10, PF4 und GRO-1 .....	52
4.5	Die Expression des antiinflammatorischen Zytokins TGF $\beta$ .....	56
4.6	Die Expression von Calgranulin A (S100A8).....	57
4.7	Risikoprädiktion anhand der Genexpression einzelner Gene .....	58
4.8	Der kombinierte Genexpressionstest zur Risikoprädiktion.....	61

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
5.1	Expression von proinflammatorischen Zytokinen .....	65
5.2	Expression von T-Zell- und NK-Zell-Genen .....	68
5.3	Expression von Chemokinen.....	71
5.4	Expression des antiinflammatorischen Zytokins TGF $\beta$ .....	73
5.5	Expression von Calgranulin A (S100A8).....	74
5.6	Vergleich des Kombinierten Genexpressionstests mit anderen Verfahren zum Immunomonitoring.....	75
5.7	Klinische Relevanz und Aussagekraft der gewonnenen Daten.....	77
5.8	Zusammenfassung und Ausblick .....	80
	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>83</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>87</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>99</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>100</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Klinische Definition der Sepsis und sepsisverwandter Erkrankungen

Ein Meilenstein in der Sepsisforschung war die Vereinbarung international gültiger Definitionen der Sepsis sowie von sepsisverwandten Erkrankungen [1]. Trotz einiger, in der Folge ausführlich diskutierter Nachteile der Definitionen haben sich diese international weitgehend durchgesetzt und tragen maßgeblich zum Erfolg der Sepsisforschung bei. Ein wesentlicher Fortschritt war dabei die Ablösung einer verwirrenden Vielfalt von Begriffen und Diagnosen, wodurch die Grundlagen für die internationalen Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen geschaffen wurde. Die Erkenntnis, dass ähnliche klinische und paraklinische Symptome nicht nur durch das Eindringen von Krankheitserregern, sondern auch durch sterile Traumata (wie z.B. chirurgische Eingriffe), Verbrennungen oder eine akute Pankreatitis ausgelöst werden können, führte zur Definition des Syndroms der Systemischen Entzündungsreaktion (SIRS). Das Krankheitsbild der Sepsis wurde je nach Auftreten eines typischen Organversagens in die Diagnosen Schwere Sepsis, Septischer Schock oder Sepsis im engeren Sinne unterteilt.

Diese Definitionen sind im Folgenden tabellarisch beschrieben und sind auch Grundlage der Diagnosestellung in der hier vorgelegten Arbeit.

<b>Klinische Kriterien für das Vorliegen eines SIRS</b>
Hyperthermie (>38,3°C oder Hypothermie <35,6°C)
Tachykardie (Herzfrequenz >90/min)
Tachypnoe (Atemfrequenz >20/min oder PaCO <sub>2</sub> <32 mmHg) oder maschinelle Beatmung
Leukozytose (>12000/μl) oder Leukopenie (<4000/μl) oder Linksverschiebung mit >10% unreifer Neutrophiler Granulozyten im Differentialblutbild

**Tabelle 1. SIRS-Kriterien gemäß der ACCP/SCCM-Konsensuskonferenz [1]**

Die Diagnose eines SIRS wird gestellt, wenn mindestens zwei der Kriterien der Tabelle 1 vorliegen. Eine Sepsis wird diagnostiziert, wenn zusätzlich zu den Symptomen eines SIRS der Nachweis oder ein hinreichender Verdacht auf eine Infektion vorliegt. In der vorliegenden Studie galt eine Infektion als nachgewiesen, wenn ein Kriterium der Tabelle 2 zutrif.

Kriterien für das Vorliegen einer Infektion
Nachweis von Granulozyten in normalerweise steriler Körperflüssigkeit
Durch positive Kultur oder Gram-Färbung nachgewiesene pathogene Mikroorganismen in Blut, Urin, Sputum oder sonst steriler Flüssigkeit
Augenscheinlich erkennbare Ursachen einer Infektion (z.B. Darmperforation mit freier Luft, in die Bauchhöhle ausgetretener Darminhalt, purulente Wundverhältnisse)
Sonstiger klinischer Nachweis einer Infektion – z.B. behandelte Pneumonie, Purpura fulminans etc.

**Tabelle 2. Die in der vorgestellten Studie verwandten Kriterien zum Nachweis einer Infektion. Modifiziert nach [1]**

Als Schwere Sepsis bezeichnet man eine Sepsis, die eine typische Organfunktionsstörung hervorruft. Besonders häufig betroffen sind dabei das Herz-Kreislauf-System, die Niere, die Lunge, die Leber sowie die Blutgerinnung.

Kriterien für das Vorliegen einer Organdysfunktion
Systolischer Blutdruck <90 mmHg oder Abfall des systolischen Blutdrucks von >40 mmHg vom Ausgangswert oder mittlerer arterieller Druck <70 mmHg für mindestens eine Stunde (trotz adäquater Volumensubstitution) und/oder Therapie mit Dopamin ( $\geq 5\mu\text{g/kgKG/min}$ ) oder jede Katecholamintherapie
Oligurie für mindestens eine Stunde (0,5ml/kgKG/h)
Arterielle Hypoxie ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 280$ ohne Pneumonie oder <200 mit Pneumonie)
Metabolische Azidose ( $\text{pH} < 7,3$ oder $\text{BE} \geq 5,0$ mmol/l) oder Laktat >2 mmol/l
Bewusstseinstrübung (GCS <14 oder akute Verschlechterung)
Thrombozytopenie (<100 000/ $\mu\text{l}$ )

**Tabelle 3. Kriterien anhand der die Diagnose eines Organversagens gestellt wurde [1]**

Verschiedene Punkte haben in der Vergangenheit zu Kritik an diesen Definitionen geführt. Zunächst einmal sind die Symptome nicht spezifisch, d.h. sie treten einzeln und in Kombination auch bei anderen infektiösen und nichtinfektiösen Erkrankungen auf. So kann zum Beispiel die Diagnose SIRS formal schon gestellt werden, wenn aufgrund eines grippalen Infektes Fieber und damit verbunden eine Tachykardie auftritt [2]. Somit setzt die Diagnose zumindest eine vernünftige Interpretation der erhobenen Parameter voraus. Darüber hinaus treten die klinischen Symptome im pathophysiologischen Prozess verhältnismäßig spät auf. Damit wird ein frühzeitiger Beginn einer Therapie verhindert, im Falle von immunmodulatorischen Verfahren ein Erfolg

möglicherweise sogar verhindert, da davon auszugehen ist, dass zum Zeitpunkt des Auftretens klinischer Sepsissymptome die Dysregulation des Immunsystems schon so weit fortgeschritten ist, dass eine Intervention schwierig oder nicht Erfolg versprechend ist [3]. Schließlich ist eine individuelle Prognosestellung anhand der beschriebenen Kriterien nur eingeschränkt möglich. So kann das Sterblichkeitsrisiko zweier Patienten mit den gleichen Sepsis-Symptomen unterschiedlich sein, da das Risiko maßgeblich von Vorerkrankungen abhängig ist.

Die beschriebenen Punkte führten nach Vorstellung der Sepsis-Definitionen zu intensiven Diskussionen [2,4]. Zehn Jahre nach der ersten Veröffentlichung fand deshalb eine erneute Begutachtung im Rahmen einer internationalen Expertenkonferenz statt, die die Nützlichkeit der beschriebenen Konzepte für Klinik und Forschung bestätigte [5]. Zwischenzeitlich gewonnene Erkenntnisse führten zu einer Erweiterung der Liste der Symptome, die die Diagnose Sepsis begründen. Zudem wurde eine Diagnose anhand von paraklinischen Markern als zukünftiges Ziel der Forschung befürwortet, um eine Verbesserung der bisher nur mäßigen Spezifität der Diagnoseparameter zu erreichen und den Zeitpunkt der Diagnosestellung nach vorne zu verlagern. Das Augenmerk der Forschung richtete sich dabei bisher hauptsächlich auf eine Diagnose anhand von Zytokinspiegeln oder der Zytokinsekretion von isolierten Leukozytenpopulationen [6-8]. Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher allerdings noch nicht gelungen, die bisher gültige klinische Diagnose zu ersetzen. Ein weiteres Ergebnis der Diskussion war die Anregung, ein Diagnosesystem zu entwerfen, das eine differenzierte Prognose sowie eine Individualisierung der Therapie ermöglicht. Unter dem Akronym PIRO wurde ein Grundriss für ein solches System entworfen, das diesen Ansprüchen gerecht werden soll. Das PIRO-System kategorisiert Patienten anhand der Dimensionen Prädisposition, Infektion, Reaktion des Immunsystems und Organfunktionsstörung und ist in Anlehnung an das erfolgreiche TNM-Klassifikations-System (TNM, Tumor-Node-Metastasis) der UICC (Union International Contre le Cancer) entstanden. Das PIRO-System soll der Erkenntnis Rechnung tragen, dass Patientenpopulationen, auf die eine Diagnose zutrifft (z.B. ‚Sepsis‘ oder ‚Schwere Sepsis‘), sehr heterogen hinsichtlich der Prognose und der geeigneten Therapie sind. So kann das Sterblichkeitsrisiko abhängig von Erreger, Alter, Vorerkrankungen und Immunstatus erheblich variieren, auch wenn der klinische Zustand verschiedener Patienten kaum Unterschiede zeigt. Eine Einschätzung der individuellen Prognose ist heute nur über Punktesysteme möglich, die basierend auf verschiedenen physiologischen Parametern ein Sterblichkeitsrisiko berechnen. Prominente Beispiele für Prognosescores sind APACHE-III- (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) [9], SAPS- (Simplified Acute Physiology Score) [10], sowie der SOFA-Score (Sepsis Related Organ Failure) [11]. Insbesondere die Ver-

gleichbarkeit von Studienergebnissen wird durch die Heterogenität von Studienpopulationen, die anhand eingangs beschriebener Kriterien rekrutiert werden, getrübt. Obwohl ein globaler Erfolg in der Sepsistherapie bisher ausblieb, haben verschiedene experimentelle Therapieansätze in Subpopulationen zu Erfolgen geführt [12]. Das führt zu dem Schluss, dass ein Problem der Sepsistherapie darin liegt, geeignete Patienten für eine entsprechende Behandlung auszuwählen. Ein geeignetes Diagnosewerkzeug ist also essentiell für eine erfolgreiche Evaluation neuer Therapieansätze. Insbesondere für immunmodulatorische Behandlungsansätze bieten sich Techniken an, die Patienten anhand des aktuellen Immunstatus identifizieren.

## **1.2 Entzündungsreaktion und Sepsis**

Eine funktionierende Abwehr eindringender Mikroorganismen ist für das Überleben unverzichtbar. Gleichzeitig kann eine überschießende, ungerichtete Immunantwort zur Bedrohung für den eigenen Organismus werden [13]. Die Pathophysiologie der Sepsis entwickelt sich im Grenzgebiet zwischen notwendiger Entzündungsreaktion, kompensatorischer Entzündungshemmung und den Folgen für die Infektabwehr und die körperliche Integrität.

### **1.2.1 Die Initialisierung der Entzündungsreaktion**

Die Schädigung des Organismus durch Trauma oder das Eindringen von Krankheitserregern wird lokal mit einer Entzündungsreaktion beantwortet. Diese hat das Ziel, beschädigtes Gewebe zu entfernen und Keime zu eliminieren. Zeitnah zu dieser Entzündungsreaktion wird eine antiinflammatorische Gegenreaktion initiiert, die auf eine zeitliche und räumliche Begrenzung der entzündlichen Reaktion zielt und der Vermeidung einer Schädigung von gesundem Gewebe dient. Als initiales Ereignis der Entzündungsreaktion wird der Kontakt von Krankheitserregern und Bestandteilen ihrer Zellwände mit Gewebsmakrophagen betrachtet. Typische Zellwandbestandteile sind Endotoxin (syn. Lipopolysaccharid, LPS) als Bestandteil der gram-negativen Zellwand, Lipoteichonsäure bei grampositiven Bakterien oder Peptidoglykan aus Pilzen.

Diese Bakterienantigene werden auch als pamp (pathogen-associated-patterns) bezeichnet und von Makrophagen mit Hilfe so genannter Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) erkannt. Eine Stimulation dieser Rezeptoren führt zur Phagozytose des betreffenden Pathogens. Anschließend werden die Erreger intrazellulär von Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies sowie durch Säure-



reeinwirkung abgetötet. Teile dieser inaktivierten Krankheitserreger werden an der Zelloberfläche präsentiert. Die Antigenpräsentation wird durch den MHC Klasse II vermittelt (MHC, Major Histocompatibility Complex) und führt zu einer Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems. Dabei ist die Fähigkeit der Makrophagen zur Antigenpräsentation abhängig von der Zahl an der Zelloberfläche vorhandener HLA-DR-Moleküle (die ein Bestandteil des MHCs sind). Über die Quantifizierung der HLA-DR-Expression mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine Messung der Monozytenfunktion möglich.

Neben der Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems über die Antigenpräsentation erfolgt eine Rekrutierung weiterer Immunzellen über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokinen.

### **1.2.2 Biologische Eigenschaften der Zytokine**

Eine entscheidende Rolle beim Anstoßen und Unterhalten des Krankheitsprozesses kommt den pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zu [14]. Zytokine sind Proteine oder Glykoproteine mit niedrigem Molekulargewicht. Sie sind an einer Vielzahl entzündungsassoziierter Signaltransduktionswege beteiligt und wirken sowohl autokrin als auch parakrin. Ihre wichtigsten Funktionen sind Regulation der Zellproliferation, -migration, -differenzierung und -aktivierung. Darüber hinaus modulieren sie das Verhältnis zwischen Entzündung und Entzündungshemmung. Anhand dieser Eigenschaft werden sie üblicherweise in pro- und antiinflammatorische Zytokine unterteilt, trotzdem sie pleiotrope, auch gegensätzliche Wirkungen zeigen können. Über intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen die Zytokine die Genexpression. Dies wird vor allem über den JAK-STAT- und den MAPK-Signaltransduktionsweg vermittelt [15]. Nach heutigem Kenntnisstand sind an Entzündungsvorgängen eine Vielzahl von Zytokinen, Hormonen, Lipidmediatoren und Neurotransmitter beteiligt, die ein Netz von Wechselwirkungen auf lokaler und systemischer Ebene miteinander verbindet. Insgesamt sind bisher über 80 Zytokine oder assoziierte Moleküle im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen beschrieben [16]. Das Verständnis der Entzündungsregulation wird neben der Vielzahl verschiedener Mediatoren dadurch erschwert, dass Zytokine je nach Mikromilieu entgegengesetzte Wirkungen zeigen können [17]. Trotzdem lassen sich Zytokine grob aufgrund ihrer Wirkung in pro- und antiinflammatorische Botenstoffe unterteilen. Die wichtigsten bekannten proinflammatorischen Zytokine sind TNF $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor alpha), IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ), IL-6 (Interleukin 6), IL-8 (Interleukin 8), auf der Seite der antiinflammatorischen Zytokine sind es IL-10 (Interleukin 10) und TGF $\beta$  (Transforming-Growth-Factor beta) [18].

Auf Makrophagen und T-Zellen vom Th1-Typ wirkt sowohl der Tumornekrosefaktor als auch IL-1 $\beta$  aktivitätssteigernd. So erzeugen diese Zytokine eine vermehrte Freisetzung der proinflammatorischen Interleukine 6 und 8 [19,20]. TNFa führt außerdem zu einer Aktivierung und Degranulation von neutrophilen Granulozyten [19]. Eine weitere Phänomen ist die Aktivierung der Gerinnung durch TNFa [21].

Die Interleukin 1 Familie besteht aus 3 Mitgliedern: IL-1a, IL-1 $\beta$  sowie dem antiinflammatorischen IL-1ra. Während IL-1a und IL-1 $\beta$  in vielen Bereichen synergistisch mit TNFa wirken, antagonisiert IL-1ra als Rezeptorantagonist die Effekte der beiden ersteren Interleukine. Ähnlich wie TNFa verstärkt IL-1 $\beta$  die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-6. Neben seiner synergistischen Wirkung mit dem Tumornekrosefaktor wirkt es zusätzlich stimulierend auf das Knochenmark, was zur Leuko- und Thrombozytose bei bakteriellen Entzündungen führt; im Gegensatz zu TNFa besitzt es allerdings keine direkte zytotoxische Potenz. Über eine vermehrte Prostaglandinsynthese im Hypothalamus wirkt IL-1 $\beta$  pyrogen. Am Gefäßendothel erzeugt es neben einer gesteigerten Stickstoffmonoxydproduktion eine Expression von Adhäsionsmolekülen und begünstigt so die Leukozytentransmigration [22,23].

Neben diesen ‚klassischen‘, seit längerem bekannten proinflammatorischen Zytokinen spielt die Gruppe der Chemokine eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von kleinen, (7-10 kDa) heparinbindenden Proteinen, deren Hauptfunktion in der Leukozytenmigration und –chemotaxis liegt. Die Chemokine lassen sich aufgrund charakteristischer Cystein-Positionen in der Aminosäuresequenz in vier Unterfamilien unterteilt, namentlich CCL, CXCL, CX3CL und XCL. Anhand der Familienzugehörigkeit sind die Chemokine systematisch benannt. Chemokine mit bekannter oder vermuteter Funktion in der Pathophysiologie der Sepsis finden sich in der CXCL-Gruppe sowie der CCL-Gruppe [24]. In der CXCL-Familie sind dies z.B. Interleukin 8 (IL-8; CXCL8), Interferon-Inducible-Peptid (IP-10; CXCL10), Plättchenfaktor 4 (PF4; CXCL4) und Growth-Related-Oncogen-alpha (GRO1; CXCL1).

Die wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine sind Interleukin 10 und TGF $\beta$ . IL-10 wirkt auf vielfältige Art immunmodulatorisch. Seine wichtigste Funktion ist die Begrenzung von Entzündungsreaktionen und damit die Verhinderung eines exzessiven Gewebstraumas durch proinflammatorische Mediatoren und reaktive Sauerstoffspezies. Ein wichtiges Ziel für die IL-10-Wirkung sind Monozyten. So reduziert IL-10 die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 und TNFa) [25], ebenso wie die der Chemokine IL-8, IP-10, GRO1 und MIP1a [26,27]. Gleichzeitig induziert IL-10 die Produktion antiinflammatorischer Mediatoren

wie IL-1ra und löslicher TNFa Rezeptoren [28]. Eine weitere wichtige Funktion von IL-10 ist die Regulation der Antigenpräsentation durch Reduktion der Zahl von HLA- [29], CD80 [30] und CD86-Molekülen [28] auf der Oberfläche von Makrophagen. Gleichzeitig wird jedoch die Phagozytose-Aktivität durch Induktion von Fc $\gamma$ -Rezeptoren verstärkt [28]. IL-10 Effekte auf T-Lymphozyten sind teilweise über die beschriebene Reduktion proinflammatorischer Zytokine vermittelt, darüber hinaus gibt es aber auch direkte Wirkungen: So unterdrückt IL-10 die Proliferation und Zytokinproduktion von CD4+ T-Zellen, während es die zytotoxische Aktivität und Vermehrung von CD8+ T-Zellen steigert [28]. TGF $\beta$  wird von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten produziert [31]. Es spielt wie IL-10 eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Entzündungsaktivität durch Unterdrückung der Makrophagenaktivität [32]. Die Inaktivierung erfolgt dabei sowohl über die Reduktion der Antigenpräsentation und HLA-DR-Expression, als auch über eine verminderte Freisetzung von Zytokinen wie TNFa und IL-1 $\beta$  sowie reaktiver Sauerstoffspezies [32]. Zudem hemmt TGF $\beta$  die Proliferation und Differenzierung sowohl von T- als auch B-Lymphozyten [31,33] und wirkt damit zusätzlich antiinflammatorisch.

### **1.2.3 Das adaptive Immunsystem in der Entzündungsreaktion**

Neben den Zellen des angeborenen Immunsystems spielen Zellen des adaptiven Systems, namentlich T-Zellen, eine zentrale Rolle in der Modulation der Infektabwehr. In der Vergangenheit beruhte die pathophysiologische Vorstellung von T-Helfer (Th-) Zellen auf einem dichotomen Modell von Th1 und Th2; durch die bessere Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs), Th17 Zellen und Natürlicher Killer- (NK) bzw. Natürlicher Killer-T- (NKT) Zellen ist eine Erweiterung dieses Ansatzes möglich geworden.

Am besten untersucht ist nach wie vor die Funktion von Th1- und Th2-Zellen in der Abwehr von Krankheitserregern. T-Helfer Zellen vom Typ 1 werden durch die monozytäre TNFa- und IL-1 $\beta$ -Sekretion stimuliert und fördern ihrerseits die Makrophagenaktivität durch Sekretion von Interferon Gamma. NKT-Zellen werden durch die Freisetzung von IL-2 aus diesem Helferzelltyp aktiviert. Während Th1-Zellen synergistisch mit phagozytierenden Zellen wirken, begünstigen Th2-Zellen die humorale Infektabwehr. Dies wird über Interleukin 4 vermittelt, das B-Zellen stimuliert und auf Th1-, NKT- und Th17-Zellen supprimierend wirkt. Außerdem wird die Makrophagenaktivität über IL-4 und IL-10 gedrosselt. T-Helfer-Zellen vom Typ 17 sind durch eine Sekretion des proinflammatorischen IL-17 charakterisiert. Darüber hinaus sezernieren sie die Moleküle TNFa und IL-6, die zur Makrophagenaktivierung beitragen. IL-17 bewirkt, neben ei-

ner verstärkten Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen aus einer Vielzahl von Zellen, auch eine Chemotaxis von Neutrophilen Granulozyten und ist damit für die Bekämpfung von Eitererregern von Relevanz.

Der Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die antimikrobielle Immunantwort ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Verschiedenen Untersuchungen zeigen, dass diese Subgruppe der T-Lymphozyten an der Eindämmung überschießender Immunreaktionen beteiligt ist. Gleichzeitig kann eine zu starke Begrenzung der Entzündung auch eine effektive Erregerabwehr behindern. Die meisten Studien zu regulatorischen T-Zellen wurden allerdings an Parasiten und Viren durchgeführt, also keine typischen Sepsiserregern [34], so dass die Rolle von Tregs in der Sepsis weiter Gegenstand der Forschung ist.

Natürliche-Killerzellen (NK-Zellen) und Natürliche-Killer-T-Lymphozyten sind auf zwei Weisen in die Krankheitsabwehr einbezogen. Einerseits aktivieren sie Phagozyten über eine Freisetzung von IFN $\gamma$ , andererseits konnte eine direkte Hemmung verschiedener Bakterien und Pilze über spezifische Proteine wie Granulysin und Perforin nachgewiesen werden. Diese Proteine wirken tumorizid durch die Bildung von Poren in Zellmembranen, ein entsprechender Mechanismus wird auch bei der Mikrobenabwehr angenommen [35].

Im Verlauf einer erfolgreichen Abwehr von Mikroorganismen kommt es zur zeitlich und räumlich begrenzten Modulation der Immunfunktion. Dadurch wird eine effektive Erregerabwehr erreicht, ohne dass es zur exzessiven Schädigung von wirtseigenem Gewebe kommt. Die Wirkung der verschiedenen zellulären Bestandteile des Immunsystems wird dabei über den Austausch von Botenstoffen koordiniert, insbesondere den Zytokinen und Chemokinen kommt dabei eine wichtige Rolle zu. Die Funktion wesentlicher Zytokine und die Wechselwirkungen zwischen den Zellpopulationen des Immunsystems ist in Abbildung 1 dargestellt.

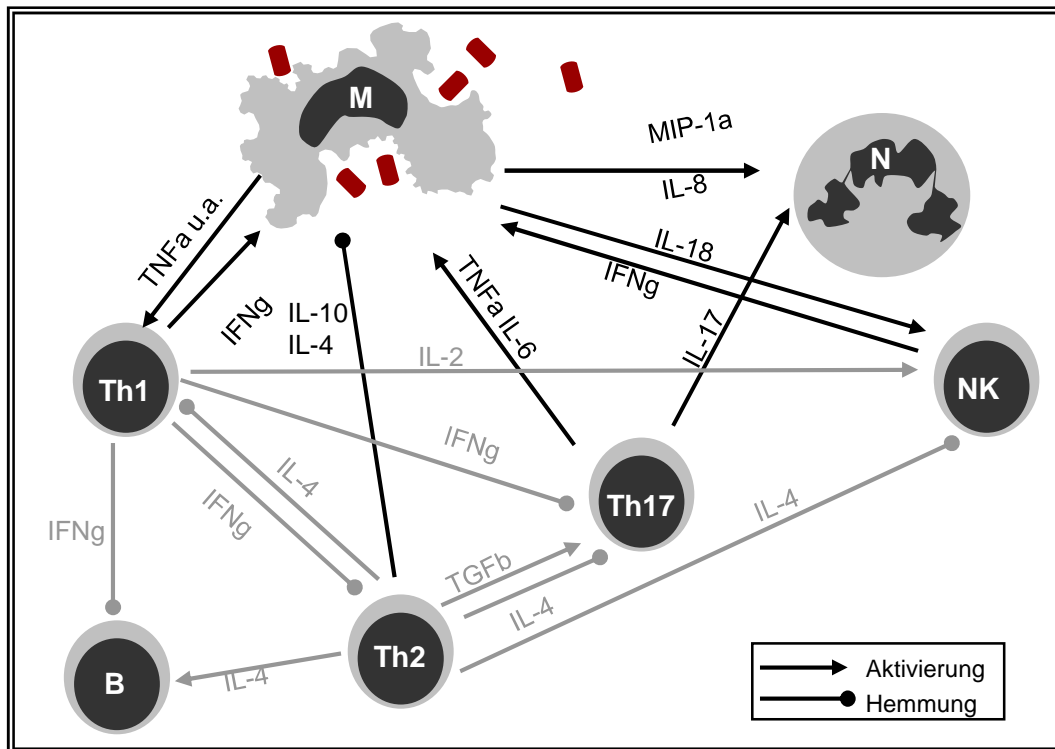
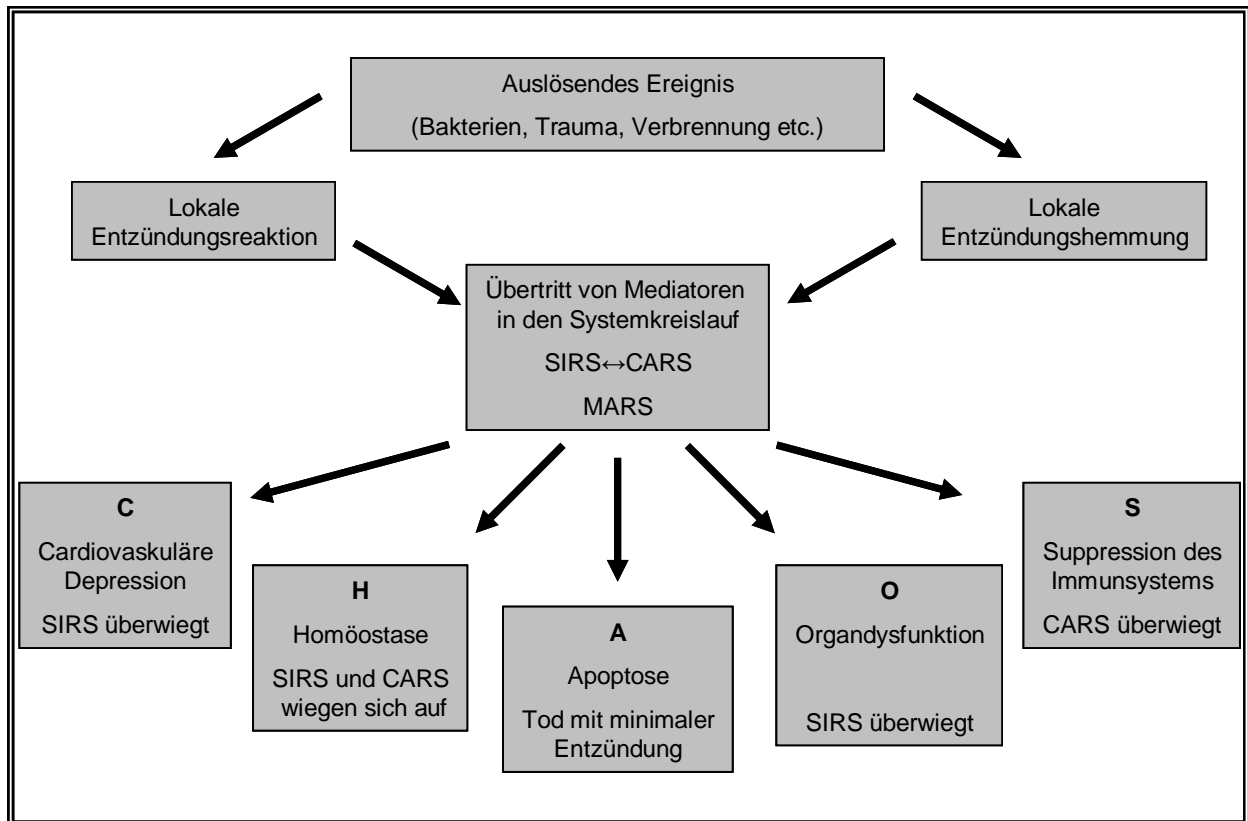


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung der Zell- zu Zell-Kommunikation zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Nicht dargestellt sind Wechselwirkungen zwischen Dendritischen Zellen und T-Lymphozyten. M: Makrophagen, N: Neutrophile Granulozyten, Th: T-Helferzellen, B: B-Lymphozyten, NK: Natürliche Killer T-Zellen, Treg: regulatorische T-Lymphozyten. Schwarz: Wechselwirkung zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem, Grau: Beziehung zwischen Lymphozyten

#### 1.2.4 Die immunologische Pathophysiologie der Sepsis

Nach heutigem Verständnis kommt es bei der Sepsis bzw. dem SIRS zu einer Deregulation der beschriebenen kompetitiven Mechanismen; im Körper herrscht ein Zustand, der sowohl Merkmale einer Hyperinflammation als auch einer Immundepression trägt. Diese immunologischen Dysregulation betrifft sowohl phagozytierende Zellen wie Gewebsmakrophagen bzw. Monozyten, als auch Zellen des adaptiven Immunsystems, hier vor allem T-Lymphozyten, und Natürliche Killerzellen. Während die Hyperinflammation durch die exzessive Freisetzung von Zytokinen gekennzeichnet ist, wird die Immundepression maßgeblich durch eine verminderte Antigenpräsentation durch Makrophagen sowie eine Verschiebung von T-Zell-Subpopulationen verursacht.



**Abbildung 2. Zwei komplementäre Funktionen des Immunsystems stehen sich bei der Sepsis gegenüber und sind für verschiedene klinisch-pathologische Folgen verantwortlich. Modifiziert nach [18]**

Potenzielle Quellen für eine Schädigung des Gesamtorganismus ergeben sich dabei über folgende Mechanismen: Erstens können die eindringenden Mikroorganismen oder Bestandteile von ihnen direkt einen toxischen Einfluss ausüben. Dies kann zum Beispiel durch Freisetzung proteolytischer Enzyme bei phlegmonösen Entzündungen der Fall sein. Zweitens können toxische Substanzen wie  $H_2O_2$  oder Proteasen, die von Leukozyten zur Erregerabwehr sezerniert werden, das umliegende Gewebe schädigen. Schließlich wirken Botenstoffe, die von diesen Zellen freigesetzt werden, toxisch auf andere Organsysteme.

Schon seit den achtziger Jahren ist bekannt, dass die Injektion bestimmter Mediatoren (wie IL1 und TNF $\alpha$ ) eine Reihe sepsistypischer Symptome wie Kreislaufdepression und Lungenödem auslösen kann [13,36]. Zudem wird die toxische Wirkung von Lipopolysaccharid zum Teil von TNF $\alpha$  vermittelt. So schützt die Applikation eines anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers Mäuse vor einem letalen Schock nach Endotoxininjektion [37]. Die Wirkung des Tumornekrosefaktors auf das Herzkreislaufsystem wird über die induzierbare NO-Synthase in Gefäßendothelzellen vermittelt. Die vermehrte NO-Produktion führt zu einer Senkung des peripheren Widerstandes. Zudem wird eine direkte kardiodepressive Wirkung diskutiert [38]. Die schockbedingte Sauerstoffmaldistri-

bution ist maßgeblich an der Schädigung der Endorgane in der Sepsis beteiligt [39]. Eine weitere Wirkung am Gefäßendothel ist ferner die Permeabilitätssteigerung sowie eine Verstärkung der Leukozytentransmigration [40]. Die prokoagulatorische Wirkung von TNF $\alpha$  führt in der Sepsis häufig zur Disseminierten Intravasalen Gerinnung. Dieser Vorgang wird zusätzlich durch Interleukin 6 und das bakterieneigene LPS begünstigt [21]. IL-1 $\beta$  wirkt in der Sepsis im wesentlichen synergistisch mit TNF $\alpha$  [22].

Aus der Gruppe der Chemokine ist insbesondere Interleukin 8 seit längerem als leukotaktisches Zytokin im Zusammenhang mit der Sepsis beschrieben. Diese Eigenschaft ist besonders bei der Sequestration von Neutrophilen in der Lunge und der Entwicklung des ARDS relevant [41].

Im pathophysiologischen Prozess kommt den antiinflammatorischen Zytokine eine maßgebliche Bedeutung bei der Entstehung der sepsistypischen Immundepression zu. Dabei kommt es zu einer Reduktion der monozytären HLA-DR-Expression und damit zur Verminderung der Antigenpräsentation.

Neben ihrem Einfluss auf Zellen des Immunsystems sind Zytokine an der Sepsis-bedingten Endorganschädigung beteiligt. Der genaue Mechanismus ist dabei derzeit noch Gegenstand der Forschung. Für Mediator-vermittelte Veränderungen am Endorgan (im Sinne einer Hibernation) spricht, dass die histologisch fassbare Organschädigung häufig nicht mit dem klinischen Ausmaß der Funktionsstörung übereinstimmt und es nach überlebter Sepsis häufig zu einer schnellen Verbesserung des klinischen Zustands kommt [42-44]. Bei den Sepsis-bedingten Organschäden spielt IL-18, ein Interferon gamma induzierendes Zytokin möglicherweise eine maßgebliche Rolle [45].

### **1.3 Postoperative Immundepression als Risikofaktor für die Entstehung einer Sepsis**

Wie bereits oben beschrieben, kann eine Immunantwort nicht nur auf das Eindringen eines Erregers in den Körper erfolgen, sondern auch durch primär sterile Entzündungsreize ausgelöst werden. Typische Beispiele sind z.B. große Weichteiltraumen, Verbrennungen, aseptische Pankreatitiden aber auch Operationstraumen [7]. Nach einer Operation kommt es zunächst zu einer Phase der Hyperinflammation, die sich z.B. in einem postoperativen Anstieg der TNF $\alpha$ - und IL-6-Plasmaspiegeln zeigt. Zur Begrenzung der überschießenden Entzündung wird fast parallel eine antientzündlichen Reaktion initiiert, die unter anderem durch eine vermehrte Sekretion von IL-10 charakterisiert ist [46]. Dies führt zu einer häufig lang anhaltenden Verminderung der HLA-DR-Expression auf Monozyten und einer reduzierten Sekretion proinflammatorischer Zy-

tokine [18]. Zusätzlich wird die T-Helfer-Zell-Population beeinflusst, insbesondere durch eine reduzierte Aktivität der Th1-Lymphozyten. Diese Zellen stimulieren durch Ausschüttung typischer Mediatoren wie z.B. TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  (Interferon gamma) die Aktivität phagozytierender Zellen.

Für eine optimale Antigenpräsentation und Aktivierung der Adaptiven Immunantwort ist neben CD54 eine ausreichende Expression des HLA-DR auf monozytären Zellen notwendig. Durch die postoperative Reduktion der Anzahl dieser Moleküle wird die Monozyten-vermittelte Aktivierung des Adaptiven Immunsystems behindert. Belege für die postoperative Immunsuppression und die beschriebenen Mechanismen liegen in verschiedener Form vor. So konnte z.B. nach einer offenen Cholezystektomie eine Suppression sowohl der Th1-Lymphozyten als auch der proinflammatorischen Zytokine gezeigt werden [47] und damit eine verminderte Resistenz gegen eindringende Keime [48]. Andere Studien wiesen eine gestörte T-Zell-Funktion (insbesondere der Th1-Funktion) und verminderte HLA-Expression auf Monozyten nach [49-51]. Die monozytäre HLA-Expression ist ein Marker für den Aktivitätszustand und verminderte HLA-Expression ist mit einer schlechten Prognose von Sepsispatienten verbunden [12,52,53]. Das funktionierende Zusammenarbeiten sowohl der Monozyten und Makrophagen als auch der Th1-Zellen ist für die erfolgreiche Bekämpfung von zellulären Krankheitserregern essentiell. Wie bereits oben beschrieben, nehmen Makrophagen eine Schlüsselrolle bei der Initialisierung der Immunantwort ein. Zum einen Bekämpfen sie eindringend Erreger direkt durch Phagozytose, zum anderen zählen sie mit den dendritischen Zellen zu den Antigen-Präsentierenden Zellen, deren Aufgabe es ist, die adaptive Immunantwort auszulösen. Zudem aktivieren sie andere Immunzellen durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Die Phagozytoseleistung von Monozyten und Makrophagen wird durch Th1-Zell-Mediatoren wie zum Beispiel IFN $\gamma$  unterstützt. Somit wirken Th1-Zellen und phagozytierende Zellen synergistisch. Die ausreichende Produktion proinflammatorischer Mediatoren ist für die erfolgreiche Bekämpfung eindringender Keime essentiell [54,55]. Dies zeigte sich unter anderem durch die enttäuschenden Therapieversuche mit verschiedenen gegen die Aktivität von TNF $\alpha$  gerichteten Agenzien [56-58]. Die verminderte prä- und postoperative Produktion dieser Mediatoren führt also zu einer verminderten Resistenz gegenüber eindringenden Keimen und damit zu einer Erhöhung des Risikos einer Sepsis [59].

#### **1.4 Immunomonitoring in septischen und postoperativen Patienten**

In der Vergangenheit hat es eine Vielzahl von Versuchen gegeben, in das immunologische Geschehen der Sepsis einzugreifen. Auch wenn dieser Ansatz im Tierversuch häufig erfolgreich



war, kam es bei Therapieversuchen am Menschen bis auf wenige Ausnahmen zu enttäuschenden Ergebnissen. In der Analyse kam man zu dem Ergebnis, dass verschiedene Ursachen für diesen Misserfolg verantwortlich sind.

So war der Krankheitsprozess lange Zeit ungenügend verstanden; unter der Vorstellung, dass eine überschießende Entzündung für die Sepsissymptome verantwortlich sei, zielten verschiedene Therapien einseitig auf eine Immunsuppression. Daneben können Therapien in experimentellen Modellen frühzeitig begonnen werden, während die Diagnose anhand klinischer Symptome erst gestellt wird, wenn die Immunfunktion schon nachhaltig gestört ist (Synopsis in [3]).

Aus dieser Erkenntnis ergab sich die Notwendigkeit zur Entwicklung von Werkzeugen zur Überwachung der Immunfunktion. Zwei grundsätzliche Strategien wurden dabei in der Vergangenheit verfolgt. Die eine basiert auf der Durchflusszytometrie (sogenannte FACS-Analyse), mit deren Hilfe die HLA-DR-Expression auf der Oberfläche im Blut zirkulierender Monozyten quantifiziert werden kann, die andere Strategie basiert auf der Messung von Zytokinen. Dies kann z.B. als Risikostratifizierung anhand von Zytokinplasmaspiegeln erfolgen, daneben wird auch die ex vivo-Sekretion von Zytokinen zur Prognosestellung herangezogen. [60,61].

Die Messung der Anzahl der HLA-DR-Moleküle auf der monozytären Zelloberfläche ist dabei das am besten etablierte System und ist in einer standardisierten Form verfügbar [62]. Beeinflusst wird die Expression dieses Bestandteils des MHC II von verschiedenen Faktoren. So üben z.B. pro- und antiinflammatorische Zytokine eine modulierende Wirkung auf die Molekülzahl aus [12,63]. In verschiedenen Studien konnte demonstriert werden, dass die FACS-Analyse der HLA-DR-Expression in der Lage ist, das Risiko für einen Sepsis vorherzusagen. So wurde eine Risikoprädiktion durch HLA-DR an Patienten nach Lebertransplantation [64], nach Kardiochirurgie mit Herz-Lungen-Maschine [65] sowie nach Trauma nachgewiesen [66]. Damit liegen für FACS-Analyse der HLA-DR-Expression die weitaus meisten klinischen Studien vor. Weitere Vorteile dieses Verfahrens sind die einfache klinische Handhabbarkeit und schnelle praktische Durchführbarkeit.

Weitere Verfahren zur Risikoprädiktion basieren auf der Messung von Zytokinspiegeln bzw. Zytokinsekretion isolierter Zellpopulationen oder der Bestimmung anderer Infektionsassoziierter Plasmaproteine wie Procalcitonin (PCT) und dem C-reaktiven Protein. So konnte eine Beziehung von erhöhten Plasmaspiegeln von IL-6 mit einer schlechten Prognose bei Schwerer Sepsis gezeigt werden [67]. Andere Studien untersuchten die Beziehung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie antiinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-10 als prädiktive Marker. Wenngleich für eine Vielzahl von Botenstoffen eine Assoziation mit der Prognose festgestellt werden konnte, hat sich bisher keins dieser Testverfahren in der klinischen Praxis durchsetzen können. Ein effektives

Biomedizinisches Diagnoseverfahren erfordert ein möglichst hohe Sensitivität und vor allem Spezifität um die Zahl der Fehldiagnosen gering zu halten. Bisher konnte keines der publizierten Zytokin-basierten Verfahren diesen Anforderungen gerecht werden [60,68-70].

In der letzten Zeit ist die Evaluation der Genexpression als weitere Möglichkeit greifbar geworden. Dazu steht neben der Verwendung von so genannten DNA-Mikroarray-Untersuchungen auch die Verwendung der rt-PCR zur Verfügung [71,72]. Seit ihrer Einführung in die medizinische und naturwissenschaftliche Forschung hat sich die rt-PCR als nützliches Verfahren zur Quantifizierung von mRNA in Proben verschiedenster Natur bewährt. Seit einigen Jahren kommt die rt-PCR auch als Diagnostikum in verschiedenen Bereichen der Medizin zum Einsatz, so z.B. bei der Messung von Virustranskripten [73-75]. In der Sepsisdiagnostik könnte sich dabei insbesondere die Möglichkeit zur Evaluierung der Expression von Genen aus verschiedenen Teilen des Immunsystems als Vorteil erweisen. Während sich die FACS-Analyse nur auf die Monozytenfunktion stützt, könnte so auch die Funktion von T-Lymphozyten zur Prognosestellung herangezogen werden. Darüber hinaus bietet die PCR den Vorteil einer einfachen klinischen Handhabbarkeit. Die vorliegende Arbeit verwendet die PCR-gestützte Quantifizierung von mRNA aus Vollblutproben zur Entwicklung eines Testverfahrens zur Risikoprädiktion einer postoperativen Sepsis.

### **1.5 Immunmodulatorische Strategien in der Sepsistherapie**

Bisher wurden in der Behandlung der Sepsis verschiedene Verfahren zur Beeinflussung des Immunsystems erprobt. Dabei unterscheidet sich ein pro- und ein antiinflammatorischer Therapieansatz. Während der Einsatz von TNF $\alpha$ -Antagonisten, IL-1-Rezeptorantagonisten, anti-Endotoxin-Antikörpern und eine hochdosierte Kortikoidgabe auf eine Begrenzung der überschießenden Entzündungsreaktion abzielten, richtet sich die Stimulation durch IFN $\gamma$  oder GM-CSF primär gegen die in zahlreichen Sepsispatienten beobachtete Monozytenanergie [12,76].

Basierend auf der Beobachtung, dass Substanzen, die die Wirkung proinflammatorischer Botenstoffe antagonisieren, in tierexperimentellen Sepsismodellen die Sterblichkeit maßgeblich senkten, wurde eine Reihe von klinischen Studien an Patienten durchgeführt. Dabei konnten die günstigen Ergebnisse der Tierversuche am Menschen nicht bestätigt werden. Als Ursache wird angenommen, dass die verwendeten Sepsismodelle der Situation am Patienten nicht gerecht wurden. So vernachlässigt z.B. das Endotoxinschock-Modell die Erkenntnis, dass proinflammatorische Mediatoren in der Bekämpfung von lebenden Mikroorganismen unerlässlich sind. Auch das wesentlich realistischere CLP-Modell (Zäkum-Ligatur und Punktion) einer bakteriellen Peri-

tonitis kommt dem tatsächlichen pathophysiologischen Prozess nicht nahe genug, unter anderem, weil bei einer experimentellen Sepsis der genaue Zeitpunkt des Krankheitsbeginns bekannt ist und so eine zeitlich genau abgestimmte Therapie mit frühzeitigem Beginn möglich ist [3,55]. Im Menschen ist die Sepsis ein mehrzeitiges Geschehen, mit wiederholtem Kontakt von Immunzellen mit LPS sowie verschiedenen therapeutischen Interventionen, was in den beschriebenen Modellen nur unzureichend repräsentiert wird.

Ausgehend von der Erkenntnis, dass Monozyten von septischen Patienten durch eine reduzierte HLA-DR-Expression an der Zelloberfläche und damit verbunden eine reduzierte Antigen-Präsentation charakterisiert sind, entstanden Therapieansätze die auf eine Aufhebung dieser so genannten Monozytenanergie zielten. So lässt sich die Aktivität von Monozyten durch in-vitro-Stimulation durch IFN $\gamma$  wirksam steigern [12]. Auch GM-CSF ist eine viel versprechende Substanz. Wichtige Voraussetzung für eine immunstimulatorischen Therapien ist allerdings ein entsprechendes Diagnostikum, das es erlaubt, geeignete Patienten auszuwählen, da nicht bei allen Erkrankten und nicht zu jedem Zeitpunkt mit einer eingeschränkten Monozytenfunktion zu rechnen ist.

## **1.6 Epidemiologie und Gesundheitsökonomische Bedeutung der Sepsis**

Die Sepsis stellt in Deutschland die dritthäufigste Todesart nach bösartigen Neubildungen und dem Myokardinfarkt dar. Einer in jüngerer Zeit publizierter Studie zufolge beträgt die Inzidenz in Deutschland etwa 116 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr, für die Schwere Sepsis zusätzlich 110 Neuerkrankungen/100 000 Einwohner/a [77]. In der amtlichen Todesursachenstatistik liegt diese Zahl allerdings deutlich geringer, wohl auch weil die Sepsis selten als alleinige Todesursache vorkommt, sondern zumeist in Kombination mit anderen die Lebenserwartung limitierenden Erkrankungen. In anderen Industriestaaten wie den USA und Frankreich sind die Fallzahlen vergleichbar [78-80]. Die Mortalität der Sepsis ist trotz Fortschritten in der Behandlung immer noch unakzeptabel hoch [81]; eine Studie des Deutschen Kompetenznetzes Sepsis ermittelte eine Letalität der Schwere Sepsis von 54%. Die Behandlungskosten belaufen sich in Deutschland auf etwa 1,77 Mrd. Euro pro Jahr, das entspricht etwa 30% des Budgets für Intensivmedizin [77]. Damit stellt die Sepsis nicht nur eine lebensbedrohliche Erkrankung dar, sondern auch eine erhebliche Belastung des Gesundheitshaushaltes. In dem Spannungsfeld von lebensnotwendiger Behandlung und in zunehmendem Maße auch von ökonomischen Aspekten

beeinflussten ärztlichen Entscheidungen entwickelt sich nicht nur die Therapie sondern auch die Forschung auf diesem Gebiet.

Als typische Risikofaktoren für die Entwicklung einer Sepsis gelten vor allem Erkrankungen, die das Auftreten einer schweren Infektion begünstigen, insbesondere sind zu nennen: Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, eine HIV-Infektion sowie maligne Neubildungen [82]. Daneben ist auch das Alter ein wichtiger Risikofaktor. Nach einem Gipfel in der Neonatalperiode fällt die Inzidenz bis zum 4. Lebensjahr parallel mit der Entwicklung eines schlagkräftigen Immunsystems stark ab und steigt dann mit zunehmendem Alter wieder stetig an [78]. Aufgrund der zu erwartenden Alterung der Gesellschaft in den Industriestaaten, der steigenden Häufigkeit invasiver Eingriffe sowie die Zunahme der Zahl immunkompromittierter Patienten (z.B. infolge von Organtransplantationen) in der Bevölkerung muss mit weiter zunehmenden Fallzahlen gerechnet werden [80]. So berechnet eine Studie, die 2001 in den USA durchgeführt wurde, eine Steigerungsrate der Inzidenz um 1,5 Prozent pro Jahr in den Vereinigten Staaten [78]. Bedenklich ist außerdem die allgemein ansteigende Zahl von Infektionen mit Pilzen und multiresistenten Bakterien, was die Anwendbarkeit von Antibiotika zunehmend einschränkt und die Entwicklung neuer Therapieansätze, die die Wirtsantwort auf eindringende Erreger modulieren, erforderlich macht.

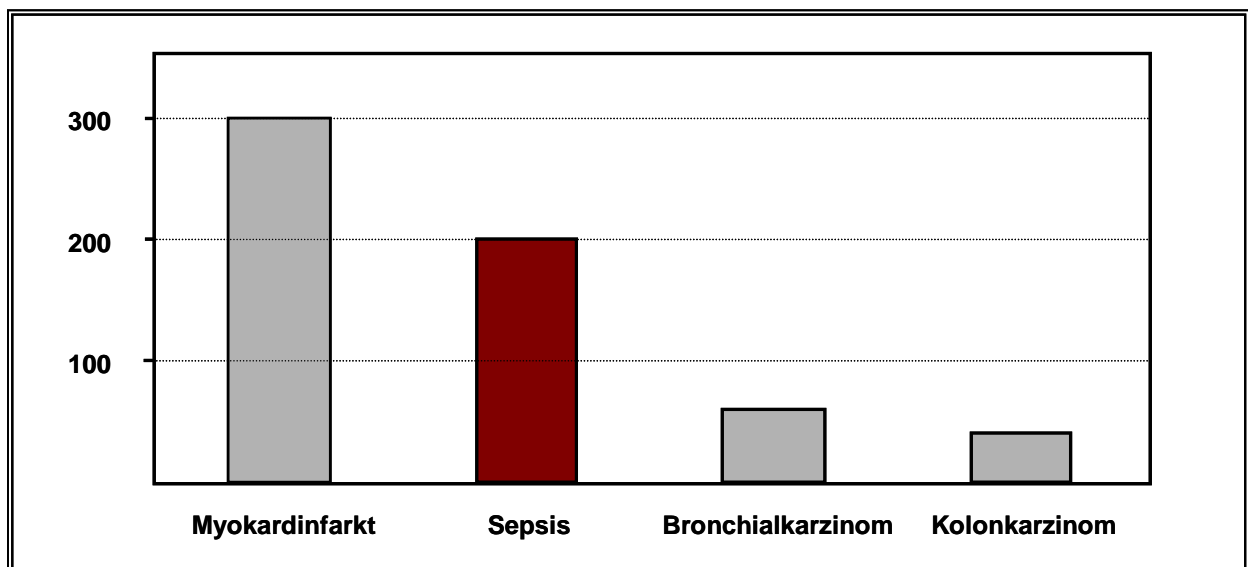


Abbildung 3. Die Inzidenz der Sepsis liegt noch vor häufigen Krankheiten wie dem Bronchial- und Kolonkarzinom. Angabe bezogen auf 100 000 Einwohner und Jahr

## 2 FRAGESTELLUNG

Mit einer Inzidenz von über 200/100 000 Einwohner und Jahr ist die Sepsis eine der Haupttodesursachen nach chirurgischen Eingriffen. Die Inzidenz liegt dabei deutlich höher als für häufige maligne Neoplasien wie dem Bronchialkarzinom, dem Mammakarzinom oder kolorektalen Neubildungen. Neben der Bedrohung für die betroffenen Patienten sind die ökonomischen Folgen der Behandlung der Sepsis von erheblicher Bedeutung für das Gesundheitssystem und die gesamte Gesellschaft. Daher ist es dringend erforderlich, neue Mittel zur Therapie und Prophylaxe der Sepsis zu entwickeln. Auf dem Weg zu neuen immunmodulatorischen Therapien ist es von erheblicher Bedeutung, den aktuellen Funktionszustand des Immunsystems des Patienten erfassen zu können.

Zum Nachweis einer Infektion dienen heute im Wesentlichen die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahlen und des Plasmaspiegels des C-reaktiven Proteins (CRP). In jüngerer Zeit wurde auch das Procalcitonin (PCT), ein Vorläuferpeptid des Calcitonins, als spezifischer Marker für eine bakterielle Entzündung etabliert. Für speziellere Fragestellungen werden außerdem die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit und das Differentialblutbild herangezogen. Diesen traditionellen Verfahren haftet allerdings der Nachteil einer geringen Spezifität und Sensitivität an. Vor allem perioperativ ist dies von Bedeutung, da das Gewebstrauma durch den chirurgischen Eingriff regelhaft zu einem Anstieg der genannten Parameter führt, ohne dass tatsächlich eine Infektion vorliegt. Daher besteht weiterhin der Bedarf an neuen Techniken, um die Funktion des Immunsystems zu überwachen und eine möglichst akkurate individuelle Risikoeinschätzung des jeweiligen Patienten zu treffen. Neue Verfahren könnten die diagnostische Treffsicherheit verbessern und einen genaueren Einblick in die Funktion der verschiedenen Komponenten des Immunsystems liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie an Patienten, die sich einem größeren allgemein- oder thoraxchirurgischen Eingriff unterzogen, durchgeführt. Dabei wurden 20 Patienten untersucht, die innerhalb von 14 Tagen postoperativ Zeichen einer Sepsis aufwiesen. Aus 183 Patienten mit unkompliziertem Verlauf wurde jedem Mitglied der Fallgruppe ein Kontrollpatient mit ähnlicher Anamnese (matched pairs) zugeordnet. Allen Patienten wurde präoperativ sowie am ersten und zweiten postoperativen Tag eine Blutprobe entnommen. Anhand der perioperativen Genexpression von 24 immunologisch relevanten Genen sollte ein Testverfahren entwickelt werden, das zur Identifikation von Risikopatienten für eine septische Komplikation dienen könnte.

Die untersuchten Gene setzten sich dabei folgendermaßen zusammen:

- pro- und antiinflammatorische Zytokine, die als Mediatoren der Entzündungsreaktion eine maßgebliche Rolle in der Sepsis spielen.
- NK- und T-Zellspezifische Gene. Ergänzend zu angeborenen Komponenten des Immunsystems wurde auch der adaptive Teil der körpereigenen Abwehr untersucht.
- Chemokine und weitere Mediatoren, die im Zusammenhang mit Entzündungsvorgängen oder septischen Krankheitsbildern bereits beschrieben wurden.

Ein neues Verfahren zur Überwachung der Immunfunktion könnte dazu dienen, die Aussagekraft der HLA-DR-Quantifizierung mittels FACS-Analyse zu steigern oder zu ersetzen. Zudem würde eine Evaluation verschiedener Komponenten des Immunsystems eine genauere Aussage über den tatsächlichen Funktionszustand der körpereigenen Abwehr eines Patienten ermöglichen. Darüber hinaus macht die präanalytische Instabilität der HLA-DR-Expression nach Gewinnung der Probe eine Ergänzung dieses Verfahrens notwendig. Im Rahmen dieser Untersuchung der Genexpression in Vollblutproben sollten folgende Teilfragen beantwortet werden:

- Wie verhält sich die perioperative Expression von immunologisch relevanten Genen in Vollblutproben?
- Ergeben sich Unterschiede in der Genexpression zwischen Patienten, die im postoperativen Verlauf eine Sepsis entwickeln, zu Patienten ohne infektiöse Komplikation?
- Lassen sich anhand der gewonnenen Daten prä- oder frühzeitig postoperativ Risikopatienten identifizieren?
- Ist die verwendete Methode klinisch anwendbar und in welchem Bereich müssen eventuelle Grenzwerte für ein Testverfahren festgelegt werden?

### 3 MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1 Arbeitsmaterialien

<b>Geräte</b>	
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, D
Kühlzentrifuge GR 422	Jouan; Saint Nazaire, F
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
GeneAmp 5700 Sequenz Detection System	Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies; Waldbronn, D
Thermal reactor	Hybaid LTD, Teddington, UK
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Inc., Wellesley, USA
Pipetus Standard Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, D

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
PAXgene® Blood RNA Tubes	Qiagen GmbH, Hilden, D
Pipettenspitzen 10 µl, 1000µl	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, D
Pipettenspitzen 100µl	Greiner bioone, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
rt-PCR Optical Tubes 0,2ml	Stratagene, Cedar Creek, USA
rt-PCR Optical Caps	Stratagene, Cedar Creek, USA
Reaktionsgefäße 10ml, 50ml	Becton Dickinson; San Jose, USA
Transferpipette	Sarstaedt AG, Nürnberg, D
24-well Platte	Becton Dickinson; San Jose, USA
Einweg-Pipetten 5, 10, 25ml	Becton Dickinson; San Jose, USA

<b>Testkits</b>	
QiaAmp® Blood RNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quantitect® Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quantitect® Probe PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quantitect® Sybr Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D

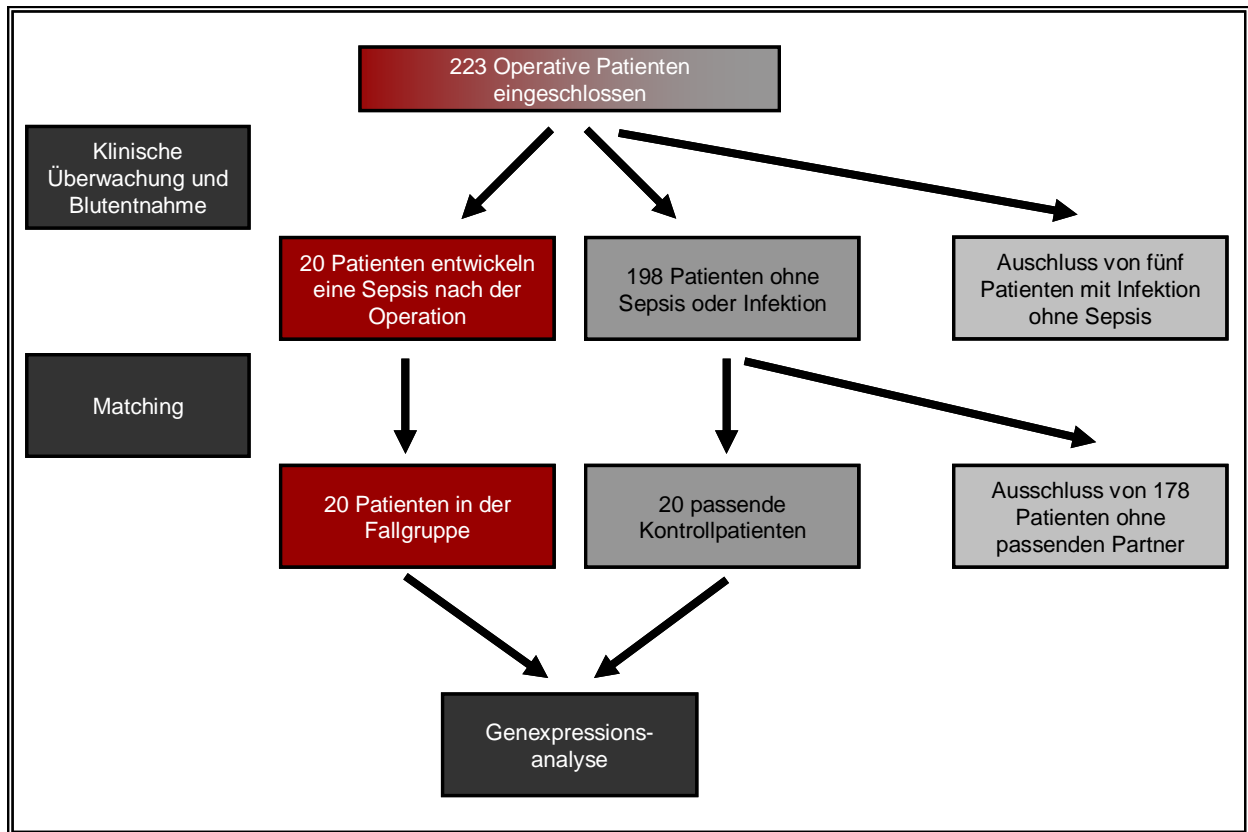
<b>Reagenzien</b>	
Ethanol 99%	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
RNAse-away	Molecular Bio Products Inc., San Diego, USA
RNA-Ladder	Agilent Technologies; Waldbronn, D
RNA Nano Marker	Agilent Technologies; Waldbronn, D
Gel-Dye-Mix	Agilent Technologies; Waldbronn, D
PBS	PAA GmbH, Pasching, A
Ficoll	Amersham Biosciences AB, Uppsala, SV

<b>Software</b>	
SPSS 12.0 für Windows	SPSS Inc.; Chicago, USA
Microsoft Office 2002	Microsoft; Redmont, USA
Corel Draw 10	Corel Corporation, Ottawa, Ca
GeneAmp 5700 SDS 1.3	Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D
GeneAmp 7500 SDS 1.3	Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D
Primer Express 2.0	Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D
Sigmaplot 8.0	SPSS Inc.; Chicago, USA
Endnote 9.0	ISI Research Soft, Berkeley, USA
SAS 9.0 für Windows	SAS Institute Inc., Cary, USA
Agilent Bioanalyzer Software	Agilent Technologies; Waldbronn, D



### **3.2 Patienten**

In der Zeit zwischen Oktober 2003 und April 2005 wurden 209 Patienten der Charité Universitätsmedizin Campus Virchow-Klinikum, des Campus Mitte sowie des Vivantes Klinikum Neukölln in die Studie eingeschlossen. Als Einschlusskriterien wurden ein größerer abdominal- oder thoraxchirurgischer Eingriff (z.B. Lungenlappenresektion, Duodenopankreatektomie (OP nach Whipple), größere Aorten Chirurgie) sowie die Einwilligungsfähigkeit festgelegt. Ausschlusskriterien waren das Fehlen einer Einwilligung, Minderjährigkeit, sowie ein moribunder Status. Die Einwilligung erfolgte nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung über Ziel und Ablauf der Studie, Datenschutz und mögliche Risiken. Der Studienplan wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Charité am Campus Virchow-Klinikum genehmigt. Bei den Patienten erfolgte präoperativ sowie am 1. und 2. postoperativen Tag eine Blutentnahme von 2,5 ml Vollblut in ein Paxgene® Blood RNA Tube zur RNA-Gewinnung sowie 1,5 ml Vollblut in EDTA zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl. Außerdem wurde nach der Operation über 14 Tage eine tägliche klinische Verlaufskontrolle vorgenommen. Dabei wurden die Patienten nach den Kriterien der Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians sowie der Society for Critical Care Medicine auf das Vorliegen einer Infektion, einer Sepsis bzw. einer Schwere Sepsis untersucht. Waren die Sepsis-Kriterien erfüllt, wurde außerdem der SAPS beziehungsweise der SOFA-Score erhoben. Anhand der gewonnenen Daten wurden 20 Sepsisfälle identifiziert, davon 16 Patienten mit Schwere Sepsis. Den Patienten aus der Fallgruppe wurde aus der Gruppe der Patienten ohne Komplikation anhand einer Matchingliste jeweils ein Kontrollpatient mit ähnlicher Anamnese zugeordnet als Matching-Kriterien wurden festgelegt: Alter, Geschlecht, Diagnose und Operation, relevante Nebendiagnose sowie der präoperative ASA- (American Society of Anaesthesiologists) Score.



**Abbildung 4.** Schematische Darstellung des Studienaufbaus. Es handelt sich um eine Fall-Kontrollstudie, bei der der Vergleich der Genexpression zwischen einer Fallgruppe und einer retrospektiv gebildeten Kontrollgruppe erfolgte.

### 3.3 RNA-Präparation

Die Blutentnahme wurde mit Hilfe eines Paxgene® Blood RNA Tubes vorgenommen. Dieses Röhrchen enthält 7,5 ml eines Lysis-Puffers und erlaubt die Entnahme von 2,5 ml Vollblut mittels handelsüblicher Blutentnahmebestecke. Der Puffer dient zur Lyse zellulärer Bestandteile und verhindert die Degradation der mRNA nach erfolgter Blutabnahme. Die RNA-Präparation erfolgte mit dem QuiaAmp® Blood RNA Kit und den darin enthaltenen Reagenzien nach den Vorgaben des Herstellers. Das Verfahren basiert auf einer silikamaterialbeschichteten Säule, die in Gegenwart von chaotropen Salzen RNA bindet. Da RNA extrem anfällig für Degradation durch ubiquitär vorhandene RNAsen ist, werden nur RNase-freie oder mit DEPC-H<sub>2</sub>O inaktivierte Reagenzien verwendet. RNAsen sind sehr stabile Enzyme, die keinerlei Kofaktoren bedürfen, deshalb ist bei der Präparation große Sorgfalt nötig. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei 13200 U/min. Zuerst wurden die bei -80 gelagerten Proben bei 37°C für 40 min aufgetaut und anschließend 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Umfüllen in ein 10ml Reaktionsgefäß erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 4000 G, Dekantieren und Verwerfen des Überstandes, Resuspension des Pellets in 5ml RNase-freiem Wasser und

erneute Zentrifugation bei 4000 G für zehn Minuten. Der Überstand wurde abermals verworfen. Das Pellet wurde in 350 µl Resuspensions-Puffer aufgenommen und mit 300 µl Bindungs-Puffer und 40 µl Proteinase K versetzt. Anschließend erfolgte eine zehnminütiger Proteindegradation bei 42°C und 1200 Umdrehungen im Thermomixer. Die Probe wurde jetzt auf eine Säule gegeben, die zur Entfernung von Zelldebris dient (Shredder-Column) und für 3 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein 2ml Reaktionsgefäß übertragen. 350µl 96%igem Ethanol wurden hinzugefügt. Nach Durchmischung wurde die Flüssigkeit in 700µl-Portionen auf die RNA-Spin-Säule, die sich in einem 2ml Reaktionsgefäß befand, pipettiert und anschließend für eine Minute zentrifugiert. Soweit nicht anders angegeben wurde in diesen und den weiteren Zentrifugationsschritten die Durchflussfraktion jeweils verworfen und die RNA-Spin-Säule in ein sauberes 2ml Reaktionsgefäß umgesetzt. Nach vollständigem Durchsatz der Probe wurde die RNA-Spin-Säule mit 350 µl niedrig konzentriertem Salz-Puffer gewaschen und eine Minute zentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Verdünnung von 10µl RNase-freie DNase mit 70µl DNA-Digestions-Puffer. Anschließend wurde die DNase auf die Säule pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten jeweils ein Waschschriff mit 350 µl niedrig konzentriertem Salz-Puffer, 500µl hoch konzentriertem Salz-Puffer (jeweils 1 min Zentrifugation), 500µl hoch konzentriertem Salz-Puffer (3 min Zentrifugation). Danach wurde die RNA-Spin-Säule erneut in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, 1 Minute trocken zentrifugiert und in ein 2 ml Elutionsgefäß gesetzt. Abschließend erfolgten zwei Elutionsschritte mit 40µl bzw. 30µl Elutionspuffer, nach denen jeweils 1 Minute zentrifugiert wurde. Die Durchflussfraktion enthielt jetzt die gereinigte RNA und wurde nicht verworfen. Die RNA-Spin-Säule wurde nach erfolgter Elution entnommen und entsorgt. Die gewonnene RNA wurde bei 65°C fünf Minuten im Heizblock denaturiert. Die Proben wurden entweder direkt bei -80°C eingefroren oder zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert [83].

Zur Quantifizierung der RNA-Konzentration vor der cDNA-Synthese wurde der Agilent Bioanalyzer 2100 eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein computergestütztes Verfahren, welches auf dem Prinzip der Elektrophorese basiert. Auf einem, mit einem Gel befüllten Chip wurden jeweils 12 der gewonnenen RNA-Proben aufgetragen, ein 13. Ansatz enthielt eine Referenzprobe, die sich aus verschiedenen RNA-Molekülen bekannter Konzentration zusammensetzte (RNA 6000 Ladder). Zusätzlich wurde ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt und als dreizehnter Ansatz eine Referenzprobe. Diese Referenz enthielt sechs RNA-Fragmente unterschiedlicher Länge (zwischen 0,2 und 6 kb) in fester Konzentration. Auf dem Chip befanden sich Kapillarkanäle, durch welche die RNA nach Anlegen einer Spannung wanderte und durch Fluoreszenzmessung (zwischen 670 und 700nm Wellenlänge) detektiert werden konnte. Durch Messung der Durch-

laufzeit konnte auf die Größe der RNA-Fragmente und durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität auf die jeweilige RNA-Menge einer bestimmten Fragment-Länge geschlossen werden.

### **3.4 Die cDNA (copyDNA)-Synthese**

Zur Analyse der mRNA-Quantität in den gewonnenen Proben mittels rt-PCR müssen diese zunächst in DNA transkribiert werden. Die gewonnene DNA wird als cDNA (copy-DNA) bezeichnet und von genomischer DNA (gDNA) unterschieden. Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des Quantitect® Reverse Transcription Kits nach Vorschrift des Herstellers und mit im Kit enthaltenen Reagenzien durchgeführt. Sie bestand aus zwei Arbeitsschritten; im ersten Schritt fand eine Reaktion zur Elimination von gDNA statt, im zweiten die Reverse Transkription von RNA in cDNA.

Zunächst wurde in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß die RNA vorgelegt, dabei wurden bis zu 12µl Lösung eingesetzt, maximal jedoch 1µg RNA. Anschließend erfolgte der Zusatz von soviel RNase-freiem Wasser bis der Reaktionsansatz 12µl Gesamtvolumen enthielt. Es wurden pro Ansatz 2µl gDNA-Degradationspuffer hinzugefügt, die Proben durchmischt und für 8 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend Zusatz von 4µl RT-Puffer, sowie je 1µl Primermix und Reverse Transkriptase. Der RT-Puffer schaffte optimierte Umgebungsbedingungen für die Transkription und enthielt DNA-Nukleotide. Der Primermix enthielt eine Mischung aus Oligo-dT und random-Primer, wodurch eine Transkription aller RNA-Spezies erreicht wurde. Parallel wurde ein Ansatz ohne Zusatz von Reverser Transkriptase mitgeführt, hier wurde das Enzym durch RNase-freies Wasser ersetzt. Dieser Ansatz diente als Kontaminationskontrolle auf genomische DNA. Sie wurde mittels rt-PCR mit einer auf gDNA reagierenden Primer/Sonden-Kombination getestet, zeigte sich hier ein Anstieg der Fluoreszenz, wurde die Probe als kontaminiert betrachtet und verworfen.

Schließlich wurden die Proben für 28 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend die Reaktion durch Hitzeinaktivierung der Enzyme (3 Minuten bei 95°C) beendet. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung der gewonnenen cDNA bei -20°C [84].

### **3.5 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Seit ihrer Erstbeschreibung durch Mullis und Faloona [85] ist die PCR zu einem Standardverfahren der Molekularbiologie geworden. Die konventionelle Polymerase Chain Reaction, die die effiziente Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA ermöglicht, hat ihre Erweiterung in der rt-

PCR (realtime-, Echtzeit-PCR) gefunden, die zusätzlich eine Quantifizierung der ursprünglich im Probenansatz enthaltene DNA-Menge erlaubt.

### 3.5.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle basiert auf der enzymgesteuerten Vervielfältigung von genomischer (gDNA) oder cDNA. Dabei wird der Reaktionsablauf zyklisch wiederholt, so dass die Produkte eines Reaktionsschrittes jeweils als Substrat für den folgenden Schritt dienen. So kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Ausgangsmoleküls. Die Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte erfolgt dabei temperaturgesteuert. Durchgeführt wird die PCR in einem so genannten Thermocycler, einem Reaktor, der exakt und mit kurzen Aufwärm- und Abkühlzeiten die entsprechenden Temperaturen erzeugen kann.

Aus Reaktionsteilnehmer werden folgende Substanzen benötigt:

- Zu vervielfältigende DNA (Template)
- Primer
- Nukleotide
- Hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase
- $Mg^{++}$ -Ionen
- Puffer

Da die verwendeten hitzebeständigen DNA-Polymerasen DNA-abhängig arbeiten ist es erforderlich, mRNA zunächst in cDNA zu transkribieren. Als Primer finden DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 16-30 Basenpaaren Verwendung. Sie dienen der DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für das Kopieren der DNA und sind aufgrund der 5'-3'-Syntheserichtung des Enzyms komplementär zu einem Abschnitt am 5'-Ende der Ursprungs-DNA. In einem Reaktionsansatz wird jeweils ein Primer für jeden der beiden komplementären Stränge der DNA verwendet. Sie bezeichnet man auch als Vorwärts- (Forward-) und Rückwärts- (Reverse-) Primer. Je länger die Primer sind, desto spezifischer wird ein bestimmter Abschnitt der Ursprungs-DNA vervielfältigt. Ab einer Länge von 16 Basen kommt jede mögliche Kombination statistisch gesehen nur ein Mal im menschlichen Genom vor. Da im Reaktionsablauf der PCR bis zu 95°C erreicht werden, muss die verwendete DNA-Polymerase thermostabil sein. Man verwendet in der Regel Enzyme von thermophilen Bakterien (z.B. *Thermophilus aquaticus*), bzw. gentechnisch hergestellte Analoga dieser Proteine. Sie benötigen  $Mg^{++}$  Ionen als Koenzym.

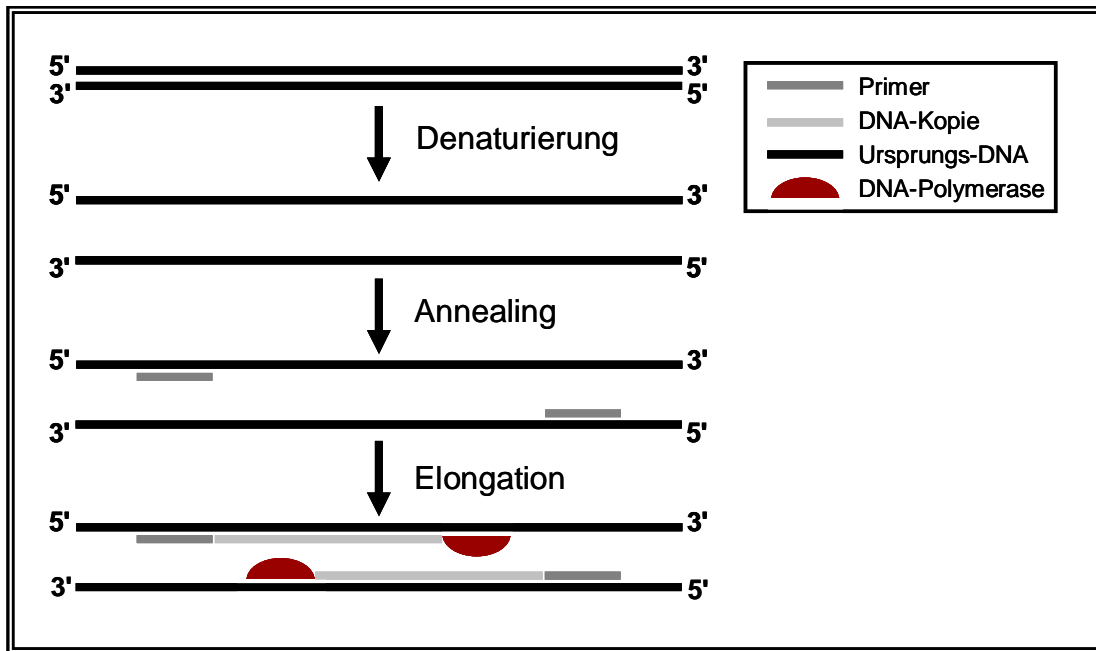


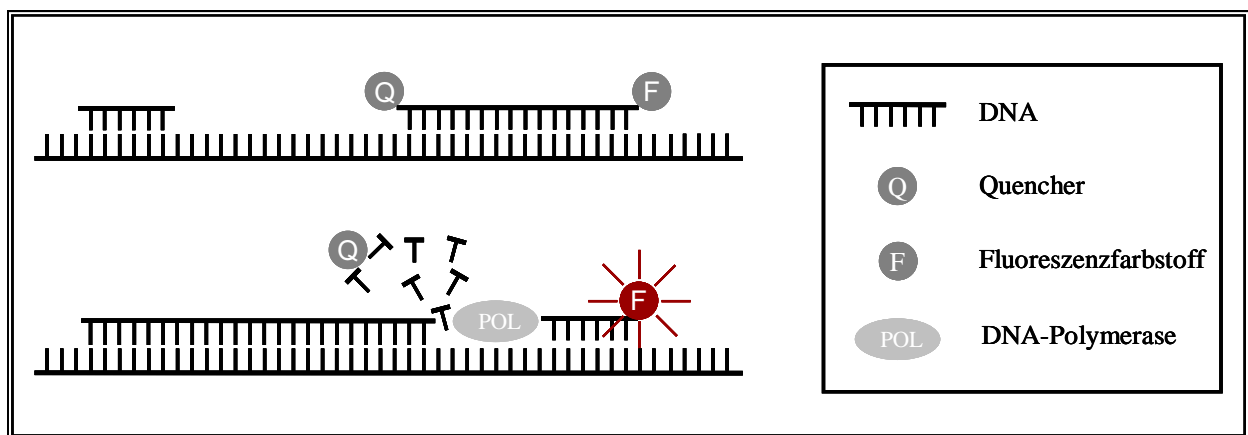
Abbildung 5 Ablauf der konventionellen PCR. Diese besteht aus drei Reaktionsschritten: Zunächst thermische Auftrennung (Denaturierung) der Doppelstrang-DNA, anschließend Anlagerung (Annealing) der Primer. Abschließend Neusynthese der DNA-Kopien (Elongation)

Während der Denaturierung wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt, dadurch kommt es zur Auftrennung der normalerweise als Doppelhelix vorliegende DNA (dsDNA). Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Schmelzen (melting) der DNA. Im zweiten Schritt bei 60°C erfolgt die Anlagerung der Primer an die ssDNA. Schließlich findet bei 60°C die Elongation des neuen DNA-Stranges statt [85,86].

### 3.5.2 Echtzeit-PCR (rt-PCR)

Der Reaktionsablauf der rt-PCR entspricht im Prinzip der konventionellen PCR; erlaubt allerdings die Berechnung der DNA-Ausgangsmenge. Bei der rt-PCR wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, dessen Intensität proportional mit der Zahl der erstellten Kopien der DNA zunimmt. Dies erfordert die technische Erweiterung des Thermocyclers um eine Lichtquelle und eine CCD-Kamera zur Detektion von Fluoreszenzsignalen, außerdem den Zusatz eines Fluoreszenzfarbstoffes zum Reaktionsansatz. Neben Farbstoffen, die sich in den neu synthetisierten Doppelstrang einlagern (z.B. Sybr-Green®), finden fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonukleotide (Sonden) Verwendung. In der vorgestellten Studie wurde die rt-PCR mit Primer/Sondenkombinationen durchgeführt, daher bezieht sich die Beschreibung auf dieses Verfahren. Primer und Sonde liegen bei der Reaktion in wässriger Lösung vor, deren Konzentration bei der sog. Etablierung der Primer/Sondenkombination (siehe Kapitel 3.5.5) festgelegt

wird. Die Sonde besteht aus einem DNA-Oligonukleotid (Sonde), das am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und am 3'-Ende einen Unterdrückerfarbstoff (Quencher) trägt. Wird der Fluoreszenzfarbstoff durch Lichtabsorption aktiviert, kommt es in Gegenwart des Quenchers (d.h. bei intakter Sonde) zu einem Energietransfer vom Reporter zum Quencher. In Abwesenheit des Quenchers (bei degradiertem Sonde) wird die Energie in Form von Fluoreszenzlicht abgegeben. Die Sonde ist komplementär zu einem Abschnitt des zu vervielfältigenden Gens (d.h. sie liegt zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer) und lagert sich während der Annealingphase analog der Primer an die DNA-Matrize an. Da die im SONDENSYSTEM verwendete Taqman®-DNA-Polymerase eine 5'-3' Exonukleaseaktivität besitzt, wird die an die Ursprungs-DNA gebundene Sonde während der Elongation degradiert. Dadurch kommt es zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und zur Emission von Fluoreszenzlicht. Da pro DNA-Molekül und Reaktionsschritt genau eine Sonde angelagert und degradiert wird, steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Zahl der erstellten Kopien.



**Abbildung 6. In der Elongationsphase wird die an die Ursprungs-DNA gebundene Sonde degradiert. Dadurch wird der Quencher von dem Reporter räumlich getrennt und dieser beginnt zu fluoreszieren.**

Mit Hilfe der CCD-Kamera lässt sich die Fluoreszenzintensität kontinuierlich messen. Als Ergebnis der Messung erhält man eine Funktion, die die Fluoreszenzintensität auf die Zahl der bereits abgelaufenen Reaktionszyklen bezieht. Im linear ansteigenden Bereich des Graphen wird die Reaktionsgeschwindigkeit von dem im Unterschuss vorliegenden DNA-Template bestimmt. Unter optimalen Bedingungen wird pro Reaktionsschritt jedes Template einmal kopiert, d.h. pro Schritt verdoppelt sich die DNA-Menge.

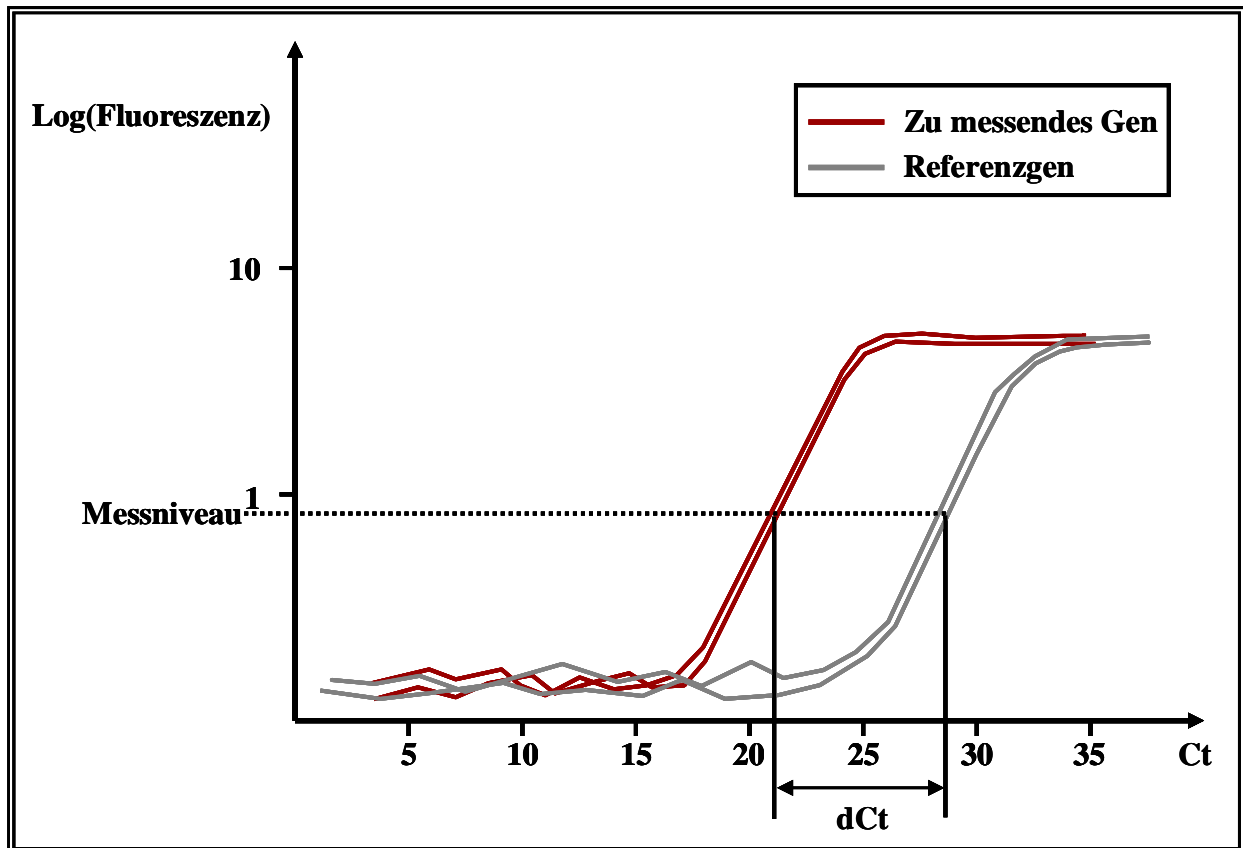


Abbildung 7 Ergebnis der rt-PCR. Das Messniveau wird oberhalb der irregulären Hintergrundfluoreszenz und im linear ansteigenden Bereich der Kurven gesetzt. Am Messniveau werden die Reaktionszyklen Ct abgelesen und durch Differenzbildung und Potenzierung die relative Menge an cDNA bestimmt. Zur Erhöhung und Überwachung der Messgenauigkeit werden jeweils Doppelwerte gemessen. Liegen die Doppelmessungen mehr als 0,5 Zyklen auseinander, wird die Messung wiederholt

Zur Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge stehen zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung. Bei der Absoluten Quantifizierung wird der gemessene Ct-Wert der Proben auf eine gleichzeitig gemessene Standardkurve bezogen, die aus logarithmischen Verdünnungen einer Referenzprobe bekannter DNA-Konzentration besteht.

Bei der relativen Quantifizierung wird zusätzlich zur Bestimmung des jeweiligen Gens bei jedem Messvorgang die Genexpression eines konstitutiv exprimierten Referenzgens (englisch House-keeping-Gen) gemessen und durch Differenzbildung der Ct-Werte die relative Menge an Genprodukt bestimmt. Durch diese Verwendung eines „internen Standards“ können Einflussfaktoren wie z.B. die unterschiedliche Konzentration verschiedener Proben eliminiert werden. Bei der hier beschriebenen Studie wurde das Verfahren der Relativen Quantifizierung angewandt, unter anderem weil in Vollblutproben durch unterschiedliche Leukozytenzahlen unterschiedliche



Mengen an DNA vorhanden sein können. Der mathematische Hintergrund dieses Verfahrens ist unten beschrieben.

### 3.5.3 Das $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Verfahren zur Quantifizierung der cDNA[87]

Die Vervielfältigung der cDNA während der PCR kann durch folgende Exponentialfunktion beschrieben werden:

$$\text{Gleichung 1: } X_n = X_0 \cdot (1 + E_x)^n$$

mit  $X_n$ = Anzahl der Moleküle nach n Reaktionszyklen,  $X_0$  Anzahl der Moleküle zum Zeitpunkt 0,  $E_x$ =Effizienz der Amplifikation

oder mit  $X_T$ = Anzahl der Moleküle,  $C_{T,x}$  = Zykluszahl der zum Erreichen des Thresholds nötig ist und  $K_x$  als Reaktionsspezifische Konstante

$$\text{Gleichung 2: } X_T = X_0 \cdot (1 + E_x)^{C_{T,x}} = K_x$$

Analog dazu gilt für die interne Referenz (house-keeping-Gen):

$$\text{Gleichung 3: } R_T = R_0 \cdot (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

mit  $R_T$ = Anzahl der Moleküle der Referenz bei Erreichen des Thresholds,  $R_0$ = Anzahl zum Zeitpunkt 0,  $E_R$ = Amplifikationseffizienz der Referenz,  $C_{T,R}$ = Zykluszahl der zum Erreichen des Thresholds nötig ist,  $K_R$ = Konstante.

Aus Gleichung 2 und Gleichung 3 ergibt sich der Quotient:

$$\text{Gleichung 4: } \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \cdot (1 + E_x)^{C_{T,x}}}{R_0 \cdot (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K$$

Bei der rt-PCR hängen  $X_T$  und  $R_T$  von verschiedenen Faktoren ab. Dazu gehören beispielsweise der verwendete Reporterfarbstoff, die SONDENSEQUENZ, Effizienz der SONDENDEGRADATION, Reinheit der Reagenzien und die Höhe des Thresholds. Sind die Amplifikationseffizienzen für das gemessene Gen und das Referenzgen gleich (was bei der Etablierung angestrebt wird), so gilt:

$$\text{Gleichung 5: } E_x = E_R = E ,$$

eingefügt in Gleichung 4 und vereinfacht ergibt sich:

$$\text{Gleichung 6: } \frac{X_0}{R_0} \cdot (1 + E)^{C_{T,x} - C_{T,R}} = K$$

beziehungsweise

$$\text{Gleichung 7: } X_N \cdot (1 + E)^{\Delta C_T} = K, \text{ mit } X_N = \frac{X_0}{R_0} \text{ und } \Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$$

Umformung nach  $X_N$  ergibt:

$$\text{Gleichung 8: } X_N = K \cdot (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Schließlich kann man die Gleichung für eine Probe q in Bezug auf eine Kontrolle cb erweitern, so dass sich der Quotient

$$\text{Gleichung 9: } \frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \cdot (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \cdot (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}, \text{ mit } \Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$$

Bei der Etablierung einer Kombination aus Primern und passender Sonde strebt man eine Effizienz von 1 an. Ist diese Voraussetzung gegeben, so gilt für die Menge an Zieltranskript  $Z_X$ , die auf ein Referenzmolekül normalisiert und auf eine Kontrollgruppe relativiert worden ist:

$$\text{Gleichung 10: } Z_X = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

### 3.5.4 Durchführung der rt-PCR

Pro Reaktionsansatz werden 0,5 µl Sonde, 2,25 µl aqua dest, 3 µl Primermix, sowie 6 µl Mastermix vermischt. In der hier vorgestellten Studie wurde FAM/TAMRA-Farbstoffkombinationen zur Markierung der Sonde verwendet. Der Mastermix enthält neben der Taqman® Polymerase Nukleotide,  $Mg^{++}$ - Ionen sowie einen Puffer um die notwendigen Reaktionsbedingungen herzustellen. 12µl der Mischung wird zu 1µl in einem speziellen Reaktionsgefäß (Optical Tube) vorgelegten cDNA gegeben. Jeweils 96 Reaktionsgefäße können auf einer Reaktionsplatte zu einem Messansatz kombiniert werden und gleichzeitig gemessen werden. Da die rt-PCR ein hochempfindliches Messverfahren ist, ist es erforderlich, Negativkontrollen mitzuführen. So wird pro Messvorgang 12µl der Mischung ohne cDNA als sog. No-Template-Control (NTC) mitgemessen, um eine eventuelle Kontamination der Reagenzien auszuschließen.

Das Reaktionsgefäß wird mit einem Verschluss aus durchsichtigem Plexiglas (Optical Cap) fest verschlossen und kurz zentrifugiert, um Luftblasen im Gefäß zu entfernen. Anschließend wird die Reaktionsplatte in den PCR-Thermocycler gestellt und die Messung gestartet.

Das verwendete PCR-Protokoll enthält folgende Schritte

1. 2 Minuten 50°C
2. 10 Minuten 95°C
3.  $\left. \begin{array}{l} 15 \text{ Sekunden } 95^\circ\text{C} \\ 1 \text{ Minute } 60^\circ\text{C} \end{array} \right\} \times 40 \text{ Zyklen}$

Nach Ablauf der rt-PCR werden die gewonnenen Daten digital gespeichert und die verwandten Proben verworfen. Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Ausgangsmenge wird das oben beschriebene Verfahren herangezogen.

### **3.5.5 Etablieren einer Primer/Sondenkombination für die rt-PCR**

#### *3.5.5.1 Hintergrund*

Die Messung der Expression eines Gens setzt die Existenz einer für dieses Gen spezifischen Kombination aus Vorwärts- und Reverse-Primer sowie der entsprechenden Sonde. Das Erstellen und Testen (sog. Etablieren) Primer/Sondenkonzentration wird im Folgenden beschrieben.

Zunächst wird über öffentlich zugängliche Datenbanken (National Center for Biotechnology Information) [88] die Nukleotidsequenz der entsprechenden cDNA ermittelt und durch Vergleich der Sequenz von cDNA und der entsprechenden genomischen DNA die Exon-Intron-Grenzen des Gens bestimmt. Anschließend wird die Sequenz der cDNA in ein Programm eingelesen, das automatisch Vorschläge für mögliche Primer- und SONDENSEQUENZEN anbietet. Dabei müssen zwei wesentliche Voraussetzungen erfüllt sein: erstens muss die Vervielfältigung der cDNA mit einer möglichst optimalen Effizienz stattfinden und zweitens sollte die Primer/Sondenkonzentration spezifisch auf cDNA reagieren, d.h. bei der RNA-Präparation evtl. verbliebene Reste von gDNA sollten nicht vervielfältigt werden. Da Introns nur in der genomischen DNA vorhanden sind, kommt es im Bereich der Exon-Intron-Grenzen zu einer Abweichung der Basensequenz von cDNA und gDNA. Gestaltet man die Sonde so, dass sie diese Grenzen überlappt, kann eine Kreuzreaktivität mit gDNA vermieden und Selektivität für cDNA erreicht werden.

Zur Maximierung der Effizienz einer Kombination aus Primer und Sonde müssen diese zudem über bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften verfügen. Die Länge der Primer sollte etwa 18-25 Basenpaare betragen. Eine Mindestlänge von 16 Nukleotiden ist erforderlich, um eine Spezifität für einen Abschnitt der DNA zu erreichen. Die Maximallänge wird durch die

Schmelztemperatur bestimmt. Als Schmelztemperatur bezeichnet man die Temperatur, bei der ein DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge zerfällt (Denaturierung). Die Denaturierung ist Voraussetzung für die Primerbindung. Folglich sollte die Schmelztemperatur der Primer bei etwa 60°C liegen, der Temperatur, bei der im verwendeten PCR-Protokoll die Denaturierung vorgenommen wird. Zur Abschätzung der Schmelztemperatur existieren verschiedene Faustformeln (Synopsis in[86]). Darüber hinaus existieren Computerprogramme, die bei der Schmelztemperaturberechnung auch andere Faktoren wie das Ausbilden von haarnadelartigen Faltungen des Moleküls (hairpins) und Schleifen (loops) berücksichtigen. Zur Vermeidung von Primer-Dimeren sollten die Primer möglichst keine längeren komplementären Sequenzen aufweisen, insbesondere keine Bindungen am 3' Ende, da sonst die Effizienz der Amplifikation eingeschränkt sein kann. Der Anteil an Guanin und Cytosin sollte etwa 50% betragen. Schließlich sollten die Primer keine Poly-T Bereiche enthalten. Die Sonde sollte maximal 20-30 Basenpaare enthalten, ihre Schmelztemperatur liegt idealerweise 7- 10°C über der des Primers. Um eine cDNA-spezifische Amplifikation zu erreichen sollte die Sonde mittig oder zum 3'-Ende versetzt über der Exon-Exon-Grenze liegen. Um den Energietransfer zu begünstigen sollte das 5' Ende der Sonde in der Nähe des 3' Ende des Primers liegen. Da Guanin hemmend auf die Fluoreszenz wirkt, sollte es in der Nähe des 5' Endes der Sonde vermieden werden, da hier der Fluoreszenzfarbstoff bindet. Es dürfen nicht mehr als 2 gleiche Basen aufeinander folgen, insbesondere keine Poly-G's. Bereits kurze Folgen von Guanin können das Ausbilden von Haarnadelstrukturen in der Sonde verursachen und somit die Bindungsfähigkeit an die DNA verringern. Der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte 60% nicht übersteigen. Schließlich wird von den zwei komplementären Sonden immer die mit dem geringeren Gehalt an Guanin verwendet. Aufgrund der genannten Anforderungen ist es oftmals schwierig, eine optimale Primer-Sonden-Kombinationen zu konstruieren. Deshalb ist es notwendig, die jeweilige Kombination vor Benutzung zu testen.

#### *3.5.5.2 Praktische Durchführung*

Die Durchführung wird hier am Beispiel des Frühen-T-Zell-Aktivierungs-Antigens (CD69) beschrieben. Als erstes sucht man in einer öffentlich zugänglichen Datenbank [88] die Sequenz der entsprechenden cDNA heraus und bestimmt durch Vergleich der Sequenz mit der genomischen DNA die Exon-Intron-Grenzen. Anschließend werden mithilfe des Programms Primer-Express 2.0 der Firma Applied Biosystems zu der Sequenz ein Primerpaar und eine Sonde gesucht. Da das Programm nicht zwangsläufig eine passende Kombination ausgibt, müssen die Nukleotidsequenzen von Primern und Sonden manuell angepasst werden.

<b>Sequenzen von Primern und Fluoreszenzsonde für CD69</b>			
<b>CD69</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Länge</b>	<b>Schmelztemperatur</b>
<b>Vorwärts-Primer</b>	CCATGGAAGTGGTCAAATGGC	21 Basen	61,1°C
<b>Rückwärts-Primer</b>	TCCATGCTGCTGACCTCTGTG	21 Basen	61°C
<b>Sonde</b>	CACTTGTCAGACCCTGTAACGTTGAACCAGT	31 Basen	68,4°C

**Tabelle 4. Manuell angepasste Sequenzen für Primer und Sonden. Durch Überlappung mit einer Exon-Intron-Grenze wurde Selektivität für cDNA erreicht. Die Primer sind spezifisch für einen DNA-Abschnitt des menschlichen Genoms. Die Schmelztemperatur der Sonde liegt einige Grad oberhalb der Schmelztemperatur der Primer.**

Zur Testung der Effizienz wird eine cDNA-Probe benötigt, in der CD69 in hoher Konzentration vorliegt. Eine solche cDNA kann durch Stimulation von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PMBCs) mit einer Mischung aus aktivierenden CD28 und OKT3 Antikörpern. Diese führen zu einer Aktivierung von Leukozyten und damit zur vermehrten Transkription des gewünschten DNA-Abschnittes.

Alle Arbeiten nach der Blutabnahme wurden unter einem Abzug mit laminarer Strömung und aseptischen Kautelen durchgeführt. Zunächst wurde eine Citrat-antikoagulierte Vollblutprobe entnommen (etwa 20 ml oder zwei 10ml Monovetten). Diese wurden gepoolt und im Verhältnis 2,5:1 mit PBS-Puffer verdünnt. In drei 10ml Reaktionsgefäßen wurden je 3 ml Ficoll vorgelegt. Anschließend erfolgte die Überschichtung des Ficolls mittels einer Pipettierhilfe mit je etwa 10ml der verdünnten Vollblutprobe, dabei war die Durchmischung von Ficoll und Blut möglichst gering zu halten. Danach wurden die Ansätze 40 Minuten bei 1400 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert, wobei die Zentrifugenbremse deaktiviert sein musste (um eine Vermischung durch zu starke Verzögerung zu vermeiden). Dabei wanderten Erythrozyten und Granulozyten durch das Ficoll hindurch, während sich die PBMCs als weißer Ring zwischen Ficoll und Serum absetzten. Mit Hilfe einer Transferpipette wurde nun dieser Ring von oben abgenommen. Dabei war die Menge an übertragenen Serum und Ficoll möglichst gering zu halten. Die gewonnene Zellsuspensionen wurden nun in ein 50ml Reaktionsgefäß gegeben und mindestens 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde für fünf Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Dekantierung des Überstandes und die Zentrifugation unter Zugabe von frischem PBS. Der Überstand wurde erneut verworfen und das gewonnene Pellet in Medium (etwa 7ml) aufgenommen (RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer. Zur

Stimulation der Zellen wurde eine 24 well-Platte (Plastiktablett mit 24 Reaktionsvertiefungen) verwendet. Für jeden Stimulationsansatz wurde jede Vertiefung mit der Antikörpermischung beschichtet (CD28/OKT3 jeweils 1 mg/ml) und für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper mit einer Pipette entfernt und die Reaktionsmulden mit PBS einmal gewaschen. Nun wurden jeweils  $2 \cdot 10^5$  Zellen in die Vertiefungen gegeben und für 4 Stunden stimuliert.

Nach der cDNA-Synthese, die nach oben beschriebenen Protokoll erfolgte, wurden die Primer mit Hilfe der konventionellen PCR getestet. Dazu wurden die lyophilisierten (gefriergetrockneten) Primer zunächst in RNase-freiem Wasser gelöst und auf eine Arbeitsverdünnung von 10 pmol/ $\mu$ l eingestellt. Anschließend erfolgte die Durchführung einer konventionellen PCR bei 60°C und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> für 40 Zyklen. Dabei wurden die für CD69 stark positive cDNA, eine Probe aus genomischer DNA zum Ausschluss einer Kreuzreaktivität und eine Negativprobe ohne DNA als Kontaminationskontrolle getestet. Ein Ansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 17,9 $\mu$ l steriles Wasser
- 2,5 $\mu$ l PCR-Puffer
- 1,5 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (5 mM)
- 1,0 $\mu$ l dNTPs (2,5mM)
- 0,5 $\mu$ l Forward Primer
- 0,5 $\mu$ l Reverse Primer
- 0,1 $\mu$ l Taq Polymerase
- 1 $\mu$ l CD69+-cDNA, gDNA oder H<sub>2</sub>O

Das PCR-Protokoll für die konventionelle PCR bestand aus drei Segmenten:

1. 5 Minuten 94°C
2. 

30 Sekunden 94°C	} 40 Zyklen
30 Sekunden 60°C	
60 Sekunden 72°C	
3. 10 Minuten 72°C

Nach erfolgter PCR wurden die Proben mit 5 $\mu$ l Ladepuffer vermischt und auf ein 2%iges „Small-Fragment“- Agarosegel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich Kreuzreaktivität, Reinheit der Probe und Kontrolle der theoretischen Produktgröße. Nach erfolgreicher Testung der Primer wurde die Sonde in sterilem Wasser aufgelöst und auf eine Konzentration von 5 pmol/ $\mu$ l eingestellt. Anschließend erfolgte die Primertitration. Dazu wurden die Primer auf 3 Verdünnungsstufen eingestellt (50, 300, 900 nM) und die sich ergebenden Kombinationen für

Vorwärts- und Rückwärts-Primer mit der stark positiven cDNA getestet. Im Sondensystem werden grundsätzlich die Primerkonzentrationen verwendet, die den frühesten Fluoreszenzanstieg und die höchste -intensität liefern.

Als letzten Schritt der Testung erfolgte die Effizienzbestimmung mittels Standardkurvengenerierung. Zunächst erstellte man aus CD28/OKT3 stimulierter cDNA eine geometrische Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:4 in 5 Stufen. Anschließend wurden die Verdünnungen jeweils mit dem Referenz-Gen (Housekeeping-Gen) und der zu testenden Primer-Sondenkonzentration gemessen (jeweils Doppelwerte). Anschließend wurden die dCt-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufen aufgetragen und ein Funktionsgraph (linear) erstellt. Ist die Steigung dieser Geraden kleiner als 0,1 wird die neue Kombination aus Primern und Sonde als etabliert betrachtet, die Replikationseffizienz ist mit der des Housekeeping-Gen vergleichbar.

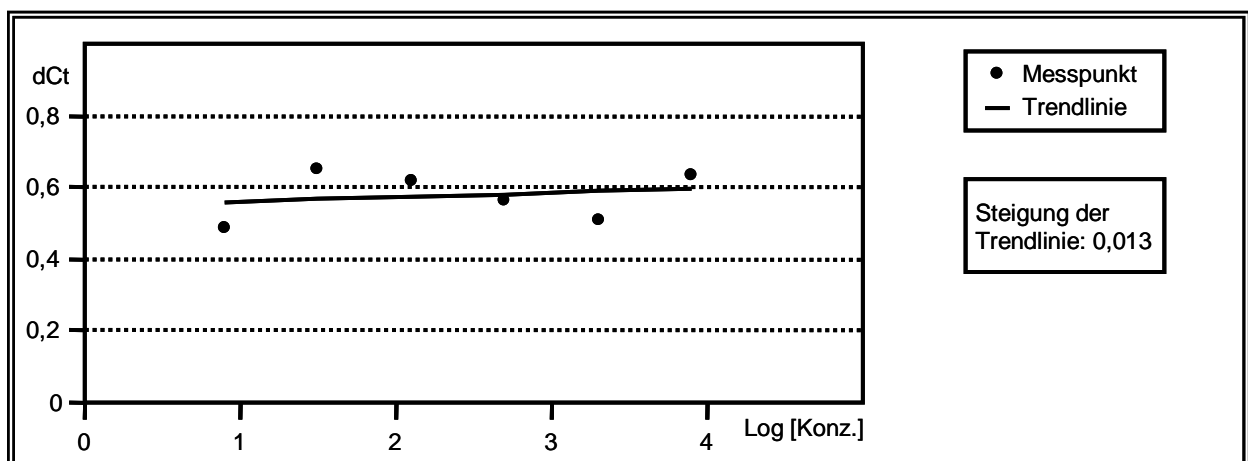


Abbildung 8. Standardkurve für CD69

In Abbildung 8 zeigt sich eine niedrige Steigung der Trendlinie, d.h. dass unabhängig von der Ausgangskonzentration eine der des Referenzgens vergleichbare Replikationseffizienz erreicht werden konnte. Damit ist die oben gezeigte Kombination aus Primern und Sonde geeignet zur Bestimmung der CD69-mRNA-Konzentration in Relation zu dem gewählten Housekeeping-Gens.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 12.0 (SPSS Corporation, Chigaco, USA) sowie mit SAS 9.0 und dem Makro LD\_F2 für longitudinale Analysen (Brunner et al.) nichtparametrischer Daten. Zunächst wurde mit diesem SAS-Makro eine longitudinale

Analyse durchgeführt. Dabei wurde die in dem Makro enthaltene ANOVA-type-Statistik angewandt. Das Makro ermöglicht eine Aussage, ob a) ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen besteht, b) zwischen den Untersuchungszeitpunkten und c) einer Kombination beider Messdimensionen. Das Verfahren nach Bonferoni und Holme wurde zur Korrektur der p-Werte bei multiplem Testen verwendet. Für die ANOVA-Statistik wurde ein Signifikanzniveau von  $p=0,05/24$  für den minimalen p-Wert eingesetzt, da insgesamt 24 Gene in der Studie untersucht wurden. Die folgenden Signifikanzniveaus wurden entsprechend des erwähnten Verfahrens gesetzt. Post hoc wurde, bei nicht normalverteilten Ergebnissen, der nichtparametrische Wilcoxon-Test angewandt um 1.) postoperativ zwischen den Studiengruppen und 2.) die postoperativen Messzeitpunkte mit dem präoperativen Ausgangswert zu vergleichen. Dabei wurden die Signifikanzniveaus entsprechend der Anzahl der verglichenen Subgruppen nach Bonferoni und Holmes angepasst. In den Abbildungen sind signifikante Unterschiede mit den Symbolen # und \* markiert.

Die Gene, die am ersten postoperativen Tag einen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen zeigten wurden mittels ROC (Receiver Operating Characteristics)-Kurvenanalyse (SPSS 12.0, SPSS Corp., Chicago, USA) hinsichtlich ihres prädiktiven Potentials zur Identifikation von Risikopatienten untersucht. Die ROC-Kurvenanalyse ordnet tabellarisch Grenzwerten (cutoffs) eine Sensitivität und eine Spezifität zu. Zusätzlich wird ein Graph erzeugt, der Sensitivitäten und Spezifitäten gegeneinander abbildet. Maßstab für die Güte der ROC-Kurvenanalyse ist die Fläche unter der Kurve (AUC, Area Under the Curve), die im optimalen Fall den Wert 1 annimmt. Zusätzlich wird ein Konfidenzintervall für die AUC angegeben und mittels eines Rangsummentests ein Signifikanzniveau angegeben.

Drei dieser Gene wurden anschließend für eine logistische Regressionsanalyse ausgewählt. Hierbei handelt es sich um mathematisches Verfahren, das aus den Messwerten der einzelnen Gene und rechnerischer Faktoren eine Gleichung erstellt, die jedem untersuchten Patienten eine Wahrscheinlichkeit zuordnet, Teil der Risikogruppe zu sein. Die errechneten Wahrscheinlichkeitswerte dienten als Grundlage für eine erneute ROC-Kurvenanalyse, die zur Bestimmung eines Grenzwerts zur Unterscheidung zwischen Risiko- und Nicht-Risikopatienten diente.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Patienten

In der Zeit zwischen Oktober 2003 und April 2005 wurden 209 Patienten des Campus Virchow-Klinikum der Charité, des Campus Mitte der Charité sowie des Vivantes® Klinikum Neukölln in die Studie eingeschlossen. 20 von diesen Patienten entwickelten im Verlauf eine Sepsis, 16 davon erfüllten die Kriterien einer Schwere Sepsis gemäß der eingangs beschriebenen Definition. Zu diesen zwanzig Patienten, die die Fallgruppe formten, wurden 20 Patienten mit ähnlicher Anamnese als Kontrollgruppe ausgewählt. 34 und damit der weitaus größte Teil der Patienten litt an einem Malignom als Grunderkrankung. Es handelte sich dabei in der Mehrzahl um bösartige Geschwulste des Gastrointestinaltraktes. Seltener war eine komplizierte Entzündung Anlass für den operativen Eingriff. Demzufolge wurde in der Mehrzahl der Patienten eine radikale Tumoresektion mit kurativer Intention durchgeführt. Eine Übersicht über wichtige Patientendaten liefert die Tabelle 5.

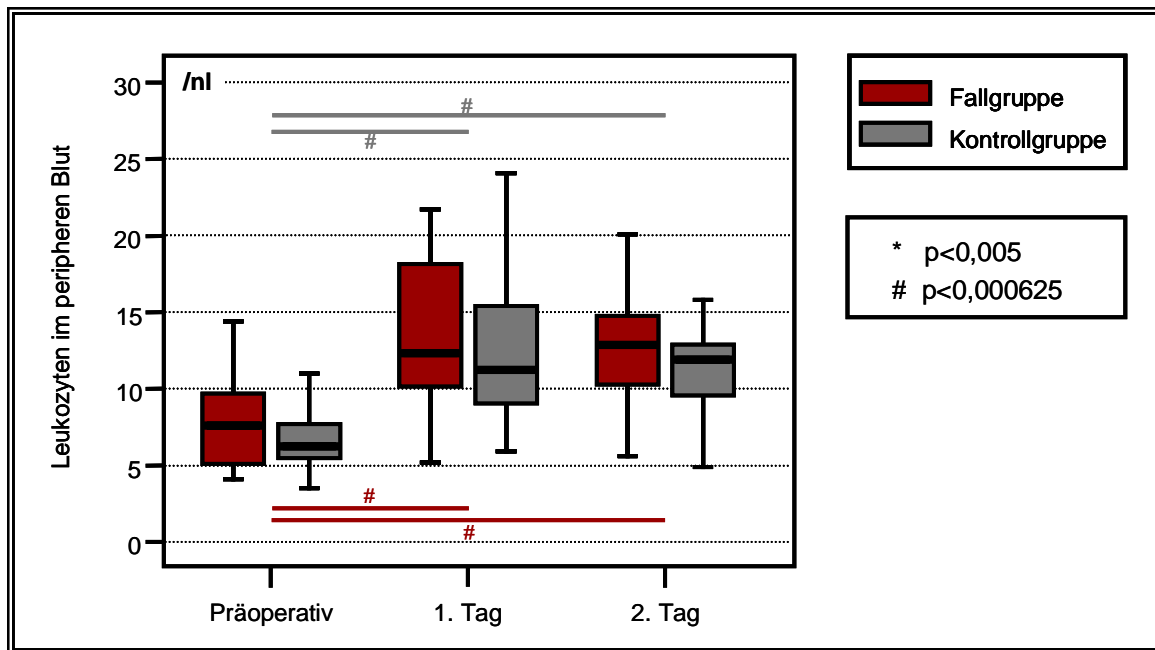
Übersicht über wichtige Parameter der Studienpatienten						
Nr.	Ge- schlecht	Al- ter	ASA	Diagnose	Operation	Nebendiagnosen
1f	m	73	3	Pankreaskarzinom	PPPD	HTN, COPD
1k	m	77	3	Pankreaskarzinom	PPPD	HTN, DM
2f	m	68	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	HTN, COPD
2k	m	68	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	HTN, COPD, DM
3f	w	75	3	Pankreaskarzinom	Pankreasresektion	HTN, DM, KHK
3k	w	68	3	Pankreaskarzinom	PPPD	HTN, DM
4f	m	86	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	HTN, Lungenemphysem
4k	m	75	2	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	HTN, KHK
5f	m	71	3	Pankreaskarzinom	PPPD	COPD, DM, Apoplex
5k	m	75	3	Pankreaskarzinom	PPPD	HTN, KHK
6f	m	46	3	Pankreatitis	PPPD	Alkoholabusus, Leberzirrhose
6k	m	45	3	Pankreatitis	PPPD	Alkoholabusus
7f	w	46	3	Biliodigest. insuff.	Biliodigestive Anastomose	HTN, Adipositas per magna
7k	w	59	3	Chron. cholangitis	Biliodigestive Anastomose	Rektumkarzinom
8f	m	67	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	HTN, COPD, Leberzirrhose
8k	m	54	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	HTN, PAVK

Fortsetzung						
9f	w	55	3	Magenkarzinom	Gastrektomie	COPD
9k	w	58	3	Magenkarzinom	Gastrektomie	HTN, Aortenaneurysma, HRST
10f	m	71	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	COPD, HTN, PAVK
10k	m	79	3	Kardiakarzinom	Gastrektomie/ dist.Ösophagusresektion	COPD, Hyperthyreose
11f	m	68	3	Rektumkarzinom	Rektumresektion	HTN, PAVK
11k	m	62	3	Rektumkarzinom	Rektumresektion	COPD, KHK
12f	m	63	4	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	HTN, HRST, Hypothyreose
12k	m	57	3	Kardiakarzinom	Gastrektomie/dist. Ösophagusresektion	Pleurakarzinose
13f	m	66	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	KHK, DM
13k	m	57	2	Kardiakarzinom	Gastrektomie/ dist.Ösophagusresektion	Alkoholabusus
14f	m	52	3	Bronchialkarzinom	Pneumektomie	COPD, Alkoholabusus
14k	m	69	3	Bronchialkarzinom	Lungenlappenresektion	KHK, HTN
15f	w	88	3	Kardiakarzinom	Gastrektomie	Aortenklappeninsuffizienz
15k	w	80	3	Magenkarzinom	Gastrektomie	DM, KHK, HTN
16f	m	61	3	Bronchialkarzinom	Thorakotomie	COPD, HTN, DM
16k	m	60	2	Pankreaskarzinom	Laparatomie	
17f	m	58	2	Rektumkarzinom	Rektumresektion	Divertikulitis
17k	m	57	2	Rektumkarzinom	Rektumresektion	
18f	m	68	2	Magenkarzinom	PPPD	CA
18k	m	76	3	Pankreaskarzinom	Biliodigestive Anastomose	HTN, DM
19f	m	49	3	Lungenemphysem	Lungenlappenresektion	COPD, HRST
19k	m	30	2	Hämophysen	Lungenlappenresektion	
20f	m	64	3	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	COPD, HTN, PAVK
20k	m	56	2	Ösophaguskarzinom	Ösophagusresektion	Alkoholabusus

Nr.: Patientenummer, ASA American Society of Anaesthesiologist Risikoindex, PPPD: Pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie, COPD: Chronische obstruktive Lungenerkrankung, HTN: arterielle Hypertonie, DM: Diabetes mellitus, KHK: Koronare Herzkrankheit, PAVK: Periphere Arterielle Verschlusskrankheit, HRST: Herzrhythmusstörungen

**Tabelle 5. Jedem Patienten, der im Verlauf eine Sepsis entwickelt ist ein Kontrollpatient zugeordnet, der ähnliche Eigenschaften bezüglich Hauptdiagnose, durchgeführtem Eingriff, Geschlecht, Vorerkrankungen und Alter aufweist. Patienten der Fallgruppe sind mit f, die der Kontrollgruppe (matched pairs) mit k gekennzeichnet.**

Neben der Genexpressionsanalyse wurde die Messung von konventionellen Entzündungsparametern durchgeführt. Weder die Leukozytenzahlen (Abbildung 9) noch die Messungen des C-reaktiven Proteins (Daten nicht dargestellt) unterschieden sich signifikant zwischen den beiden Gruppen.



**Abbildung 9. Leukozytenzahlen der Studienpatienten.** Boxplot für den gesamten Messzeitraum. Postoperativ signifikanter Anstieg der Gesamtleukozytenzahlen, allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe.

Das CRP stieg in der Fallgruppe von einem präoperativen Ausgangsmedian von 0,95 mg/l auf 9,63 mg/l bzw. 18,64 mg/l am ersten bzw. zweiten postoperativen Tag an. In der Kontrolle war der Ausgangswert 0,9 mg/l. Am ersten postoperativen Tag lag der Median hier bei 6,92 mg/l, am zweiten bei 15,21 mg/l.

In Tabelle 6 sind die in der Fallgruppe aufgetretenen Infektionen zusammengefasst und charakterisiert. 16 von 20 Patienten entwickelten eine Schwere Sepsis, während 4 Patienten die Sepsiskriterien erfüllten, ohne dass eines der definierten Anzeichen eines sepsistypischen Organversagens vorlag. 6 der Patienten entwickelten eine intraabdominelle Infektion, wie z.B. eine Peritonitis. Bei 11 der Patienten wurde eine Pneumonie diagnostiziert. Jeweils einmal wurden das Mediastinum und der Urogenitaltrakt als Infektionsquelle identifiziert. Ebenfalls einmal gelang ein Erregernachweis aus einer Blutkultur, ohne dass ein lokalisierter Infektionsherd gefunden wurde. Das Erregerspektrum bestand überwiegend aus gramnegativen Bakterien des Magen-Darm-Traktes, zahlreiche Patienten litten auch an einer Infektion mit Sprosspilzen der Candida-Familie oder Mischinfektionen. Grampositive Erreger wurden seltener als Krankheitsverursacher identifiziert, der weit verbreitete *Staphylococcus aureus* nur in einem einzigen Fall. In zwei Fällen konnte kein Erreger nachgewiesen werden, obwohl klinisch oder paraklinisch ein Anhalt für eine Infektion vorlag (Für Kriterien für das Vorliegen einer Infektion siehe Tabelle 2).

In 14 von 20 Fällen erfolgte die Diagnose der Sepsis nach dem 2. postoperativen Tag. Der mittlere SAPS in der Sepsisgruppe betrug 36,5 mit einem Maximum von 69 und einem Minimum von 4. Der durchschnittliche SOFA-Punktwert lag bei 6,35 Punkten bei einem Höchstwert von 15 und einem niedrigsten Wert von 0 Punkten.

Übersicht über die aufgetretenen Infektionen in der Sepsis-Gruppe						
Nr.	Komplikation	Infektionsquelle	Mikrobiologie	Tag	SAPS	SOFA
1f	Schwere Sepsis	Abdomen	E. coli, Enterococcus	6	46	10
2f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Enterococcus, Candida	8	38	5
3f	Schwere Sepsis	Abdomen	Enterobacter	2	43	6
4f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Candida	2	58	8
5f	Schwere Sepsis	Abdomen	Candida, Enterococcus	12	56	6
6f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Pseudomonas	6	33	5
7f	Schwere Sepsis	Abdomen	negativ	14	5	11
8f	Schwere Sepsis	Pneumonie	E. coli, Proteus vulgaris,	3	4	9
9f	Schwere Sepsis	Abdomen	Candida	2	47	4
10f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Pseudomonas	9	49	11
11f	Schwere Sepsis	Abdomen	Enterococcus, Candida	6	33	3
12f	Schwere Sepsis	Mediastinum	E. coli	2	30	5
13f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Pseudomonas	14	52	12
14f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Klebsiella, Proteus spec.	10	47	7
15f	Schwere Sepsis	Urogenitaltrakt	E. coli, Enterococcus	7	69	15
16f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Staph. aureus	1	36	7
17f	Sepsis	Pneumonie	Candida	9	32	1
18f	Sepsis	Blut	Candida	12	28	0
19f	Sepsis	Pneumonie	Enterobacter	3	7	1
20f	Sepsis	Pneumonie	negativ	2	26	1

SAPS: Severe Acute Physiology Score, SOFA: Sepsis Organ Failure Assessment, Tag: Tage zwischen Operation und Beginn der klinischen Sepsissymptome

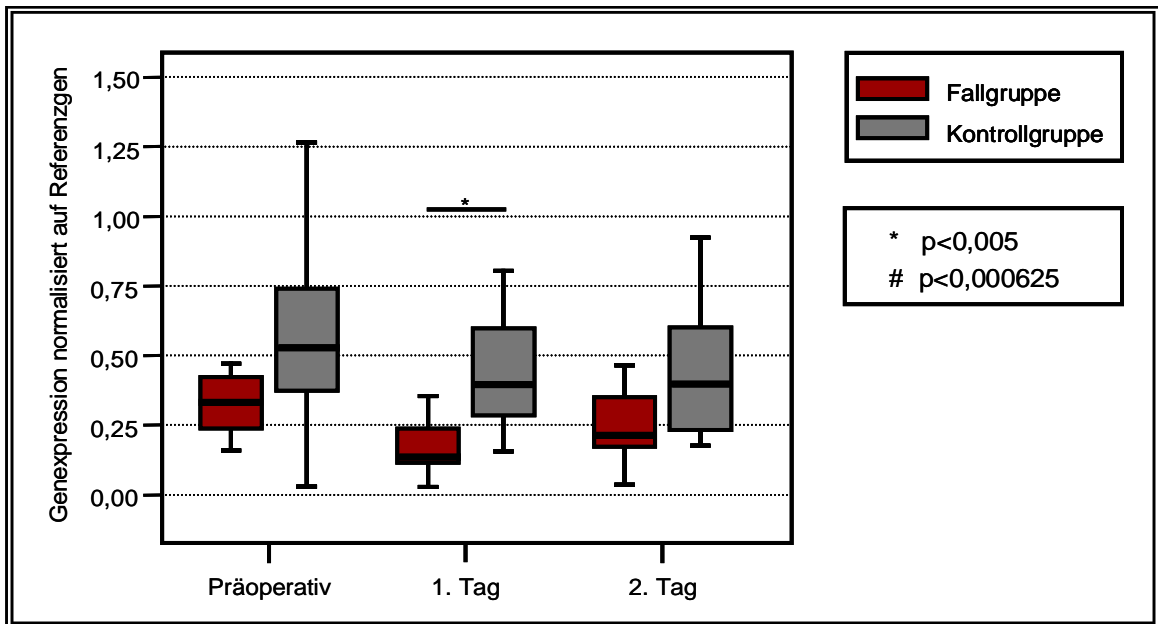
**Tabelle 6. Übersicht über die Infektionen, die in der Sepsisgruppe auftraten.** Ein breites Spektrum von häufigen grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie Pilzen war in als Erreger vertreten. Die Lokalisationen der Infektionen bilden die typischen postoperativen Prädispositionsstellen ab.

#### 4.2 Die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNFa und IL-18

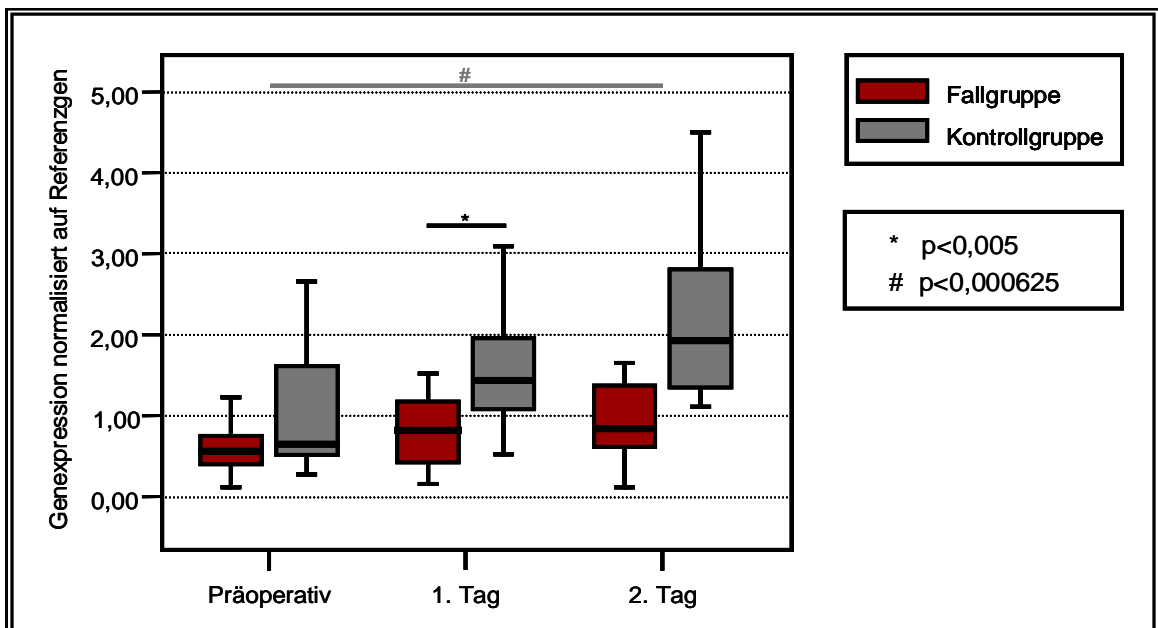
Bereits seit vielen Jahren ist die Bedeutung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNFa in der Pathophysiologie der Sepsis bekannt [14]. Dabei lassen sich durch die Zytokinwirkung direkte, Sepsis-typische Organschädigungen sowie die Entstehung des Septischen Schockes erklären [13]. Auf der anderen Seite sind proinflammatorischen Zytokine für eine effektive Erregerbeseitigung notwendig [21]. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie die Genexpression von Interleukin 1 $\beta$ , TNFa und IL-18 untersucht (Tabelle 7, Abbildung 10-12). Die Expression von IL-1 $\beta$  stieg postoperativ in der Kontrollgruppe signifikant an, während dieser Anstieg in der Sepsisgruppe kaum ausgeprägt war. Dadurch kam es postoperativ zu einer signifikant geringeren mRNA-Menge in der Sepsisgruppe im Vergleich zu den Kontrollen. TNFa und IL-18 zeigen keinen perioperativen Anstieg, wobei die TNFa-Expression insgesamt in der Risikogruppe geringer ausfiel als in den Patientengruppen mit unkompliziertem postoperativem Verlauf.

Die Expression der proinflammatorischen Zytokine				
		Präoperativ	1. Postoperativer Tag	2. Postoperativer Tag
IL-1 $\beta$	Fälle	0,57 (0,11-2,57)	0,82 (0,15-1,52)	0,83 (0,11-4,44)
	Kontrollen	0,64 (0,27-2,66)	1,44 (0,52-4,14)	1,93 (1,11-4,5)
TNFa	Fälle	0,33 (0,16-0,85)	0,14 (0,03-0,52)	0,21 (0,04-0,46)
	Kontrollen	0,53 (0,03-1,62)	0,39 (0,16-0,8)	0,4 (0,18-0,92)
IL-18	Fälle	0,26 (0,15-5,8)	0,24 (0,07-56)	0,29 (0,11-0,62)
	Kontrollen	0,33 (0,13-0,69)	0,32 (0,11-0,65)	0,3 (0,12-0,91)

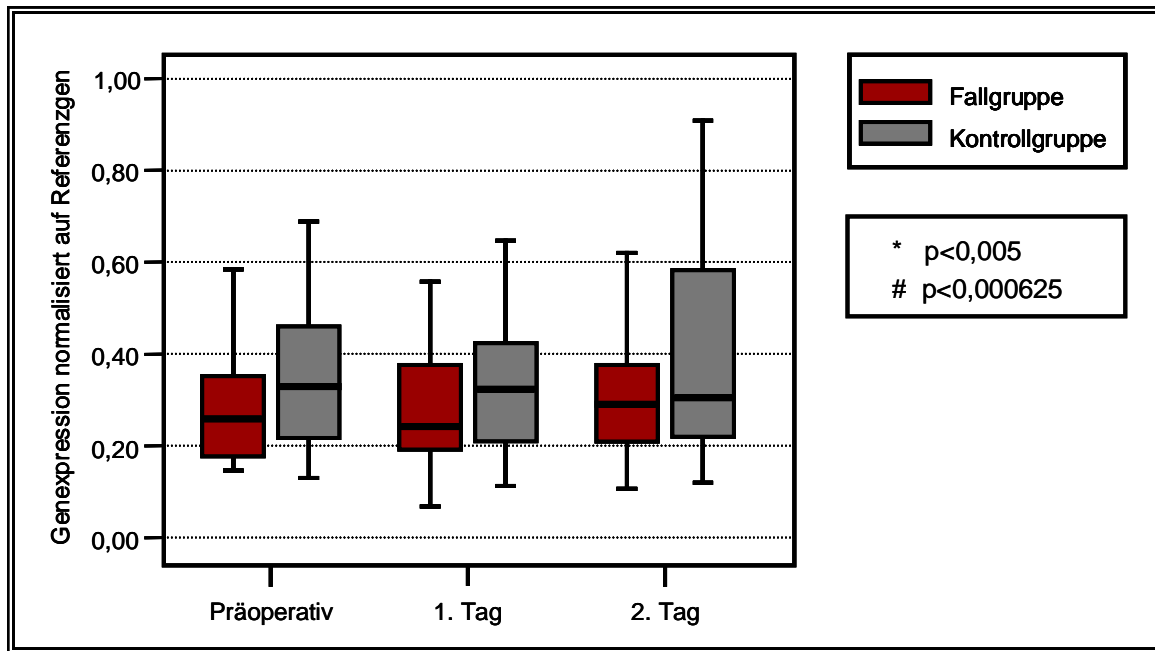
**Tabelle 7. Tabellarische Auflistung der Expression proinflammatorischer Zytokine.** Bestimmt wurden auf HPRT normalisierte Expressionswerte. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Minimal- und Maximalwert (in Klammern).



**Abbildung 10. Genexpression von TNF $\alpha$  über den gesamten Untersuchungszeitraum.** Am ersten postoperativen Tag zeigt sich in der Sepsisgruppe eine signifikant geringere Expression als in der Kontrollgruppe. Präoperativ und am zweiten postoperativen Tag zeigte sich dieser Unterschied als Trend. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



**Abbildung 11. Genexpression von IL-1 $\beta$  über den gesamten Untersuchungszeitraum.** Am ersten postoperativen Tag lag in der Fallgruppe eine signifikant geringere Expression vor. Am zweiten postoperativen Tag lag die Genexpression in der Kontrollgruppe deutlich oberhalb des präoperativen Ausgangswert, während in der Fallgruppe keine signifikante Kinetik nachweisbar war. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



**Abbildung 12. Genexpression von Interleukin 18 über den gesamten Untersuchungszeitraum.** Weder zwischen den Gruppen noch zwischen den Untersuchungszeitpunkten ergab sich ein signifikanter Unterschied. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.

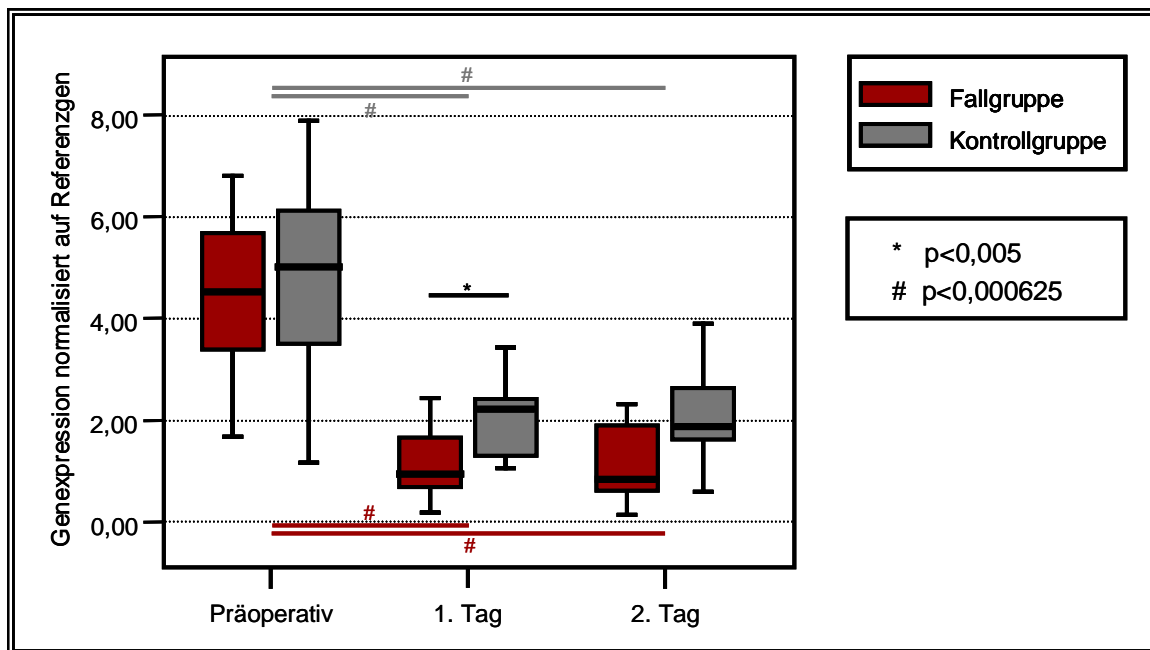


### 4.3 Die Expression von T-Zell- und Natürlichen-Killerzell-Genen

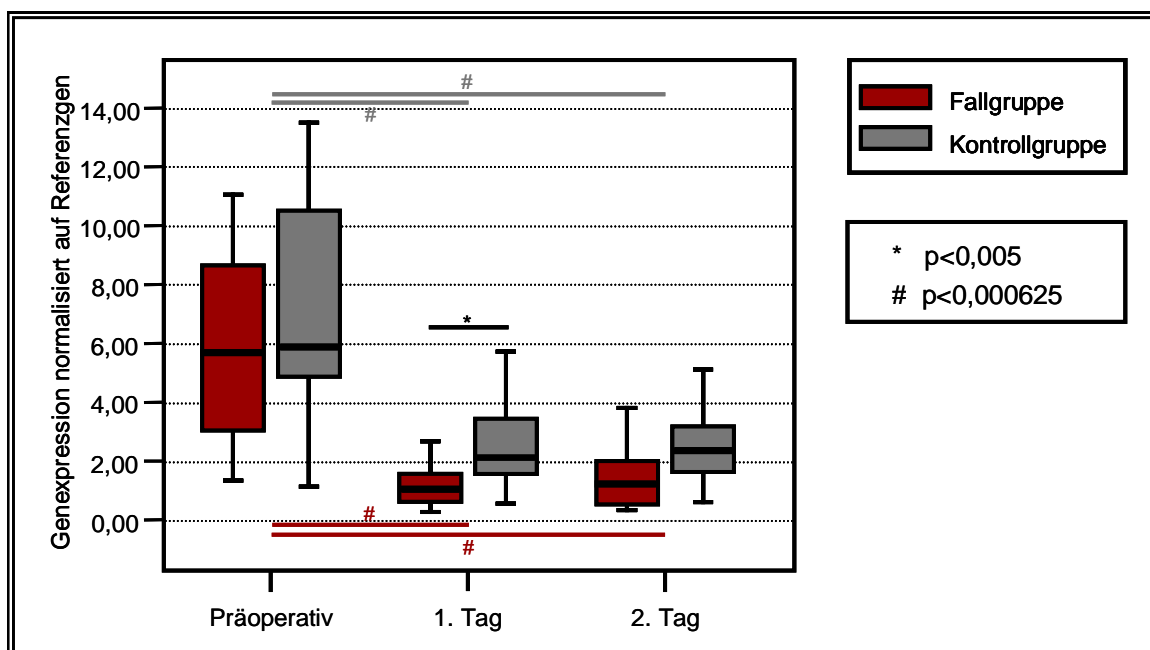
Neben einer Unterstützung der Phagozytoseleistung von Makrophagen üben NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auch eine direkte mikrobizide Wirkung aus [35]. In der hier vorgestellten Studie wurden die Genexpression des CD3-Antigens (als Marker für zirkulierende T-Zellen), des zytotoxischen Proteins Perforin, des Lymphozytenaktivierungsmarkers CD69 sowie des Chemokinrezeptors CCR3 (der insbesondere von T-Zellen mit Th2-Differenzierung exprimiert wird) gemessen. Alle Gene zeigten eine ähnliche Kinetik mit einer postoperativen Abnahme der Expression. Eine geringere mRNA-Menge in der Fallgruppe war für alle Gene als Trend vorhanden, in CD3 und Perforin war dieser Unterschied am ersten postoperativen Tag signifikant. Diese Beobachtung spricht für einen postoperativen Verlust zirkulierender T-Lymphozyten mit Killer-Effektorfunktion.

Die Expression der NK- und T-Zellspezifischen Gene				
		Präoperativ	1. Postoperativer Tag	2. Postoperativer Tag
CD3	Fälle	4,52 (1,68-10,89)	0,94 (0,18-2,44)	0,84 (0,14-12,64)
	Kontrollen	5,01 (1,17-7,89)	2,22 (1,05-4,42)	1,87 (0,59-4,5)
CD69	Fälle	0,29 (0,1-0,62)	0,12 (0,03-0,4)	0,13 (0,03-0,25)
	Kontrollen	0,29 (0,09-0,76)	0,18 (0,06-0,54)	0,18 (0,06-0,43)
CCR3	Fälle	1,7 (0,46-8,08)	0,17 (0,01-1,45)	0,34 (0,01-2,14)
	Kontrollen	1,91 (0,29-6,21)	0,45 (0,03-0,88)	0,96 (0,04-3,69)
Perforin	Fälle	5,69 (1,34-11,04)	1,06 (0,26-5,01)	1,23 (0,33-11,47)
	Kontrollen	5,89 (1,12-13,5)	2,12 (0,55-9,48)	2,36 (0,61-9,85)

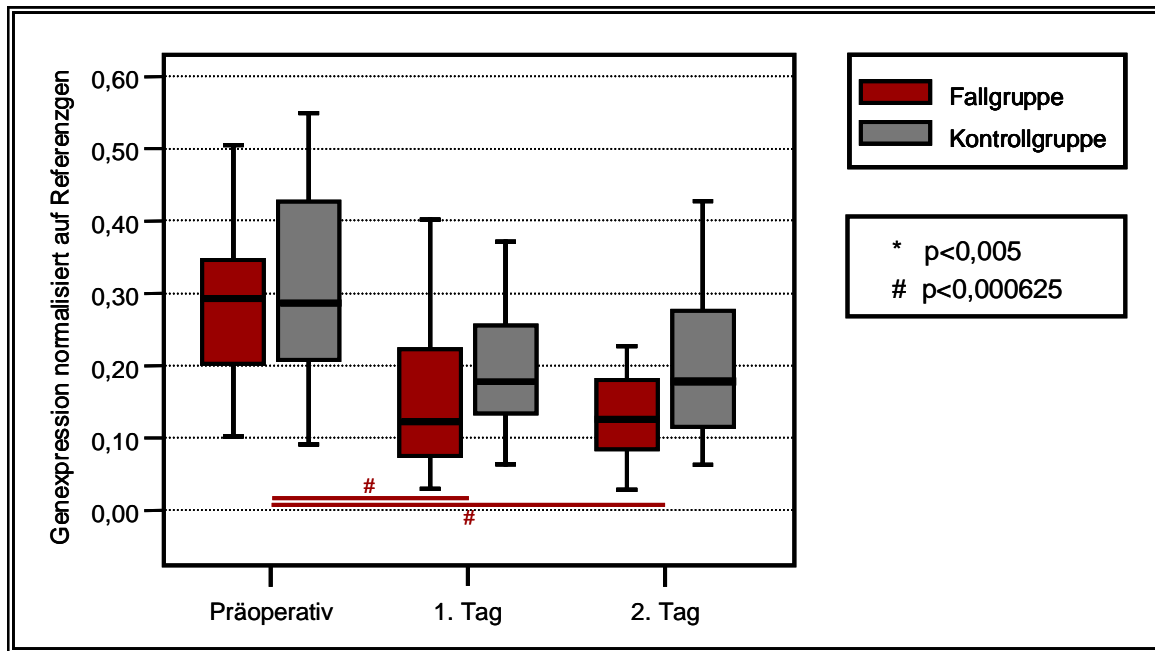
**Tabelle 8. Zusammenfassung der Expression von NK- und T-Zellspezifischen Genen.** Bestimmt wurden auf HPRT normalisierte Expressionswerte. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Minimal- und Maximalwert (in Klammern).



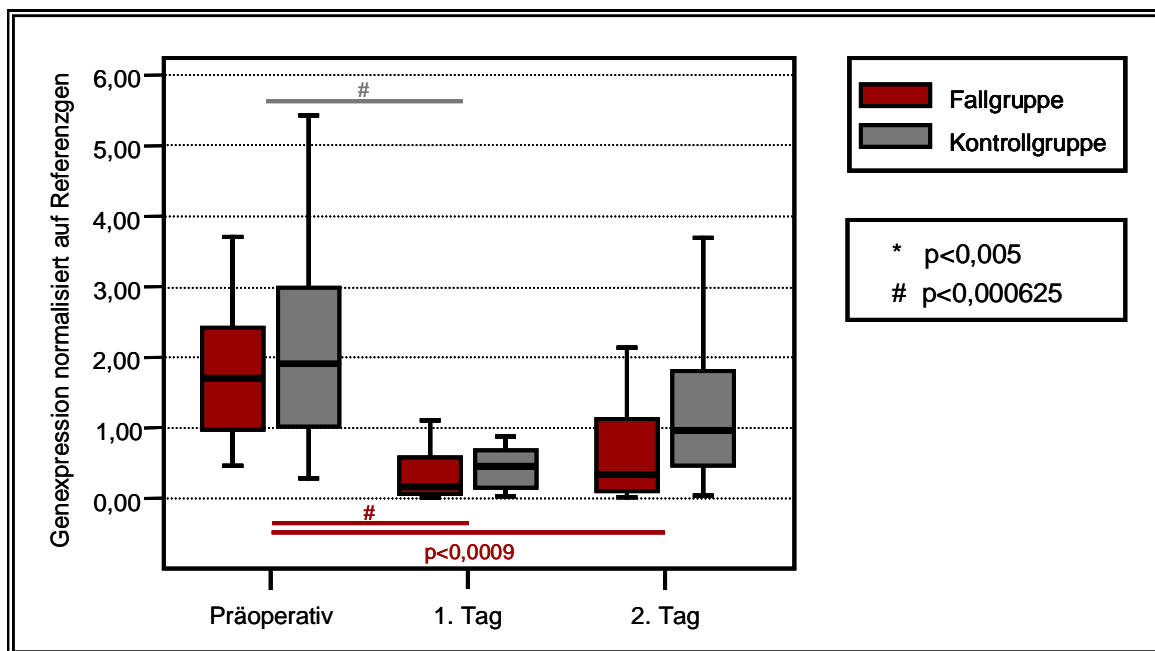
**Abbildung 13. Genexpression von CD3 über den gesamten Messzeitraum.** Postoperativ ist die Transkriptmenge in beiden Gruppen signifikant geringer als präoperativ. Zusätzlich wird CD3 am ersten postoperativen Tag in der Fallgruppe signifikant geringer als in den Kontrollen exprimiert. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta C_T}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



**Abbildung 14. Genexpression von Perforin.** Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied am ersten postoperativen Tag zwischen den beiden Patientengruppen. Nach dem operativen Eingriff ist die gemessene mRNA-Menge im Verhältnis zum Ausgangswert deutlich reduziert. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta C_T}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



**Abbildung 15. Genexpression von CD69 über den gesamten Untersuchungszeitraum.** Nach dem Eingriff tritt in der Fallgruppe eine verminderte Expression auf. Zwischen den Untersuchungsgruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



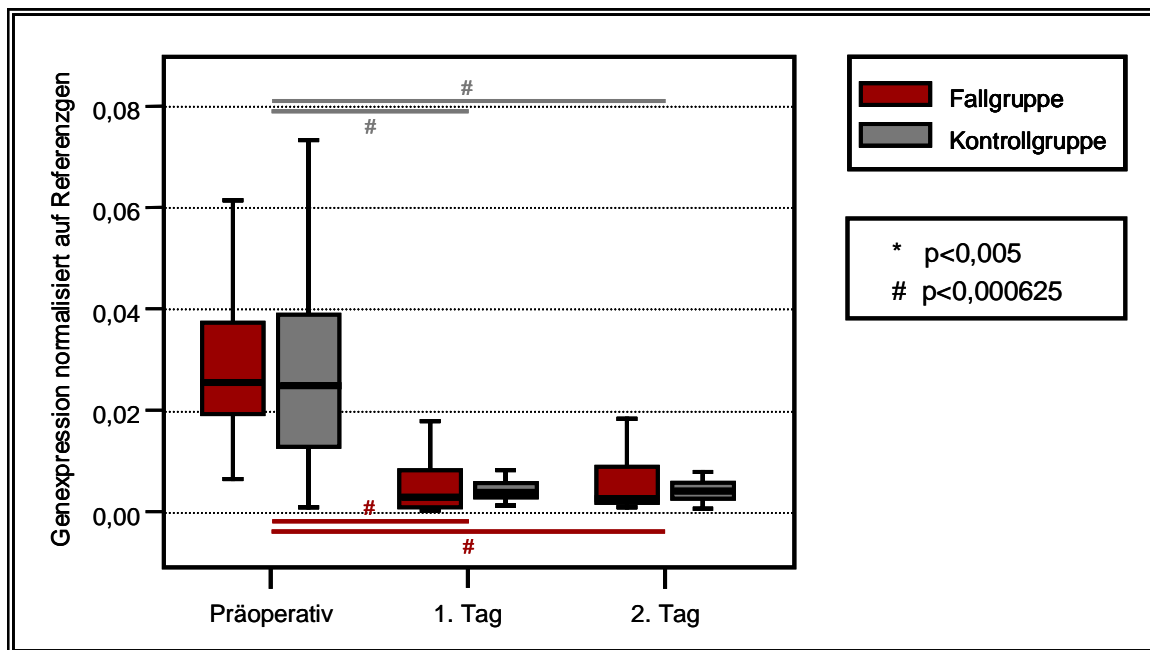
**Abbildung 16. Genexpression von CCR3 im gesamten Beobachtungszeitraum.** Während zwischen den beiden Studiengruppen kein Unterschied messbar war, kam es postoperativ zu einer Reduktion der Expression in beiden Untersuchungsgruppen. Dieser Effekt war am ersten postoperativen Tag in beiden Gruppen, am zweiten nur in der Fallgruppe signifikant nachweisbar. Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.

#### 4.4 Die Expression der Chemokine IL-8, MIP-1a, IP-10, PF4 und GRO-1

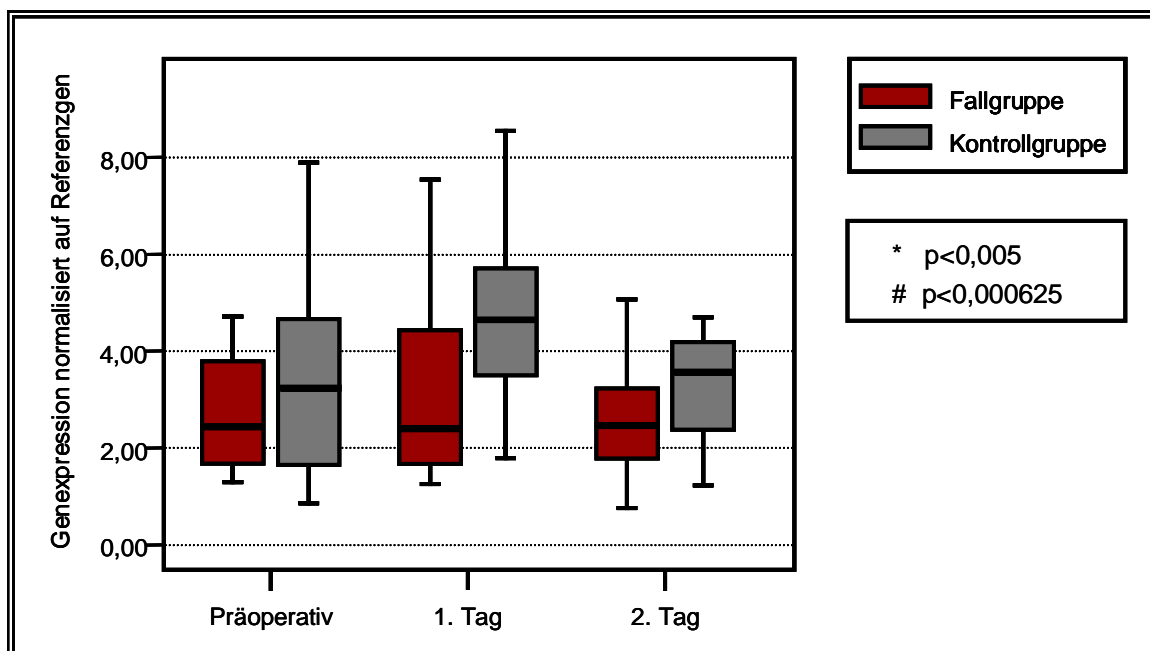
Eine weitere Gruppe von Genen, die untersucht wurden, bestand aus den Chemokinen IL-8 (synonym CXCL8), MIP-1a (synonym CCL3), IP-10 (CXCL10), PF4 (CXCL4) und GRO-1 (CXCL1). Insbesondere IL-8 ist im Zusammenhang mit septischen Krankheitsbildern sowie verwandten Pathologien wie dem ARDS vielfach beschrieben [41,61,89]. Auch die anderen Chemokine zeigten in einer Microarray-Studie an septischen Patienten eine veränderte Genexpression [71]. In der Tat fanden wir für IP-10, MIP-1a und IL-8 eine signifikante postoperative Veränderung, die sich allerdings nicht zwischen den Gruppen unterschied. Die anderen beiden Chemokine zeigten nur kaum ausgeprägte Veränderungen sowohl im zeitlichen Verlauf als auch im Vergleich zwischen den Patientenpopulationen.

Die Expression von CXCL und CCL-Chemokinen				
		Präoperativ	1. Postoperativer Tag	2. Postoperativer Tag
MIP1a (CCL3)	Fälle	0,2 (0,08-0,59)	0,08 (0,01-0,59)	0,1 (0,01-0,31)
	Kontrollen	0,26 (0,12-0,68)	0,12 (0,05-0,37)	0,19 (0,05-0,64)
IL-8 (CXCL8)	Fälle	0,2 (0,02-0,69)	0,04 (0,00-0,84)	0,03 (0,01-0,19)
	Kontrollen	0,12 (0,02-0,35)	0,06 (0,02-0,3)	0,05 (0,01-0,34)
IP-10 (CXCL10)	Fälle	0,026 (0,006-0,129)	0,003 (0,000-0,018)	0,003 (0,001-0,023)
	Kontrollen	0,025 (0,001-0,105)	0,004 (0,001-0,031)	0,004 (0,001-0,031)
PF4 (CXCL4)	Fälle	60,87 (5,13-401,71)	68,48 (22,39-188,05)	82,36 (30,27-217,52)
	Kontrollen	77,38 (25,63-233,13)	74,54 (33,24-350,92)	88,36 (27,19-173,65)
GRO-1 (CXCL1)	Fälle	2,44 (1,29-14,67)	2,4 (1,25-9,58)	2,46 (0,75-7,11)
	Kontrollen	3,24 (0,86-7,89)	4,65 (1,78-10,3)	3,57 (1,23-8,88)

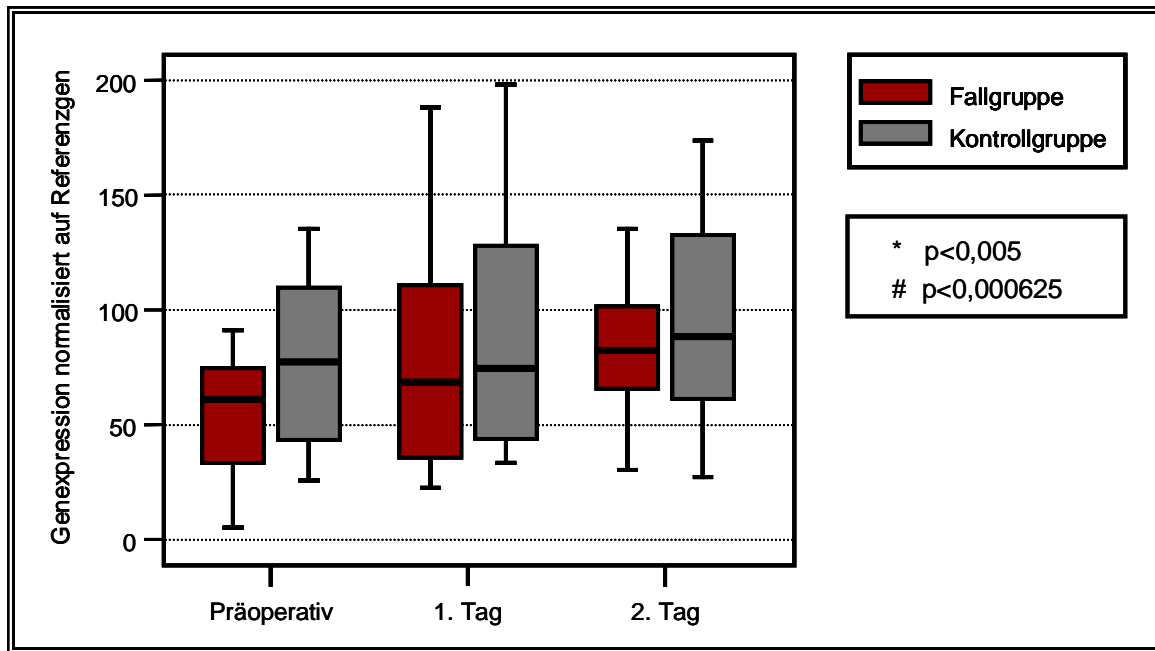
**Abbildung 17. Expression verschiedener Chemokine.** Bestimmt wurden auf HPRT normalisierte Expressionswerte. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Minimal- und Maximalwert (in Klammern).



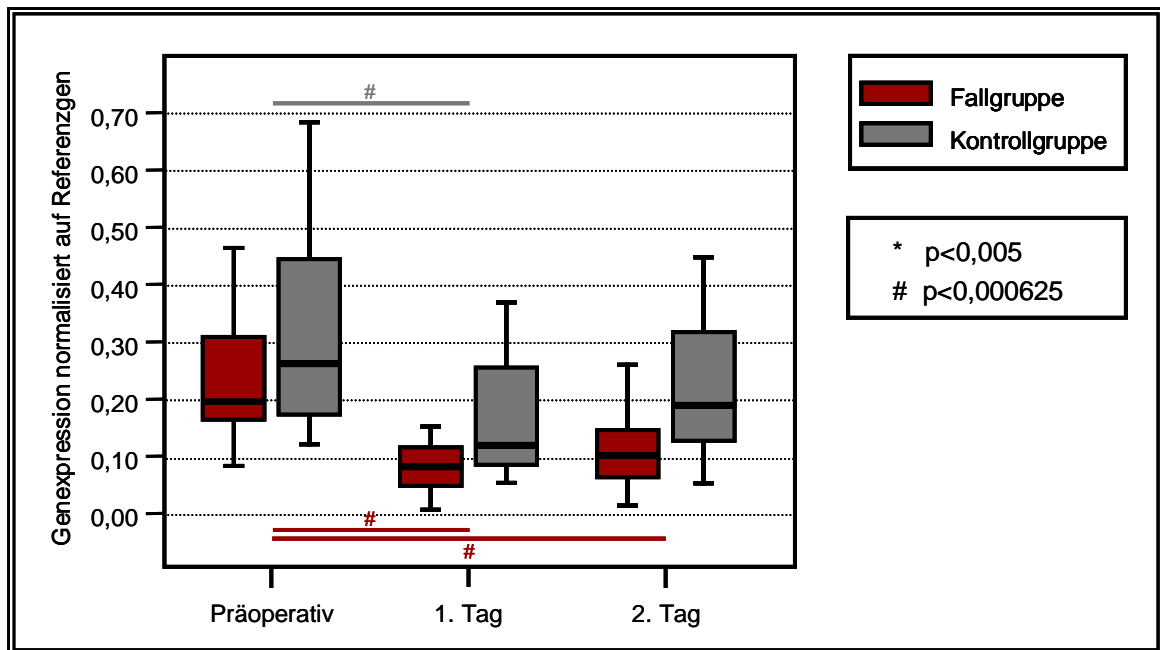
**Abbildung 18. Genexpression von IP-10 (CXCL10).** Postoperativ zeigt sich in beiden Gruppen eine hochsignifikante Abnahme der Transkriptmenge. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



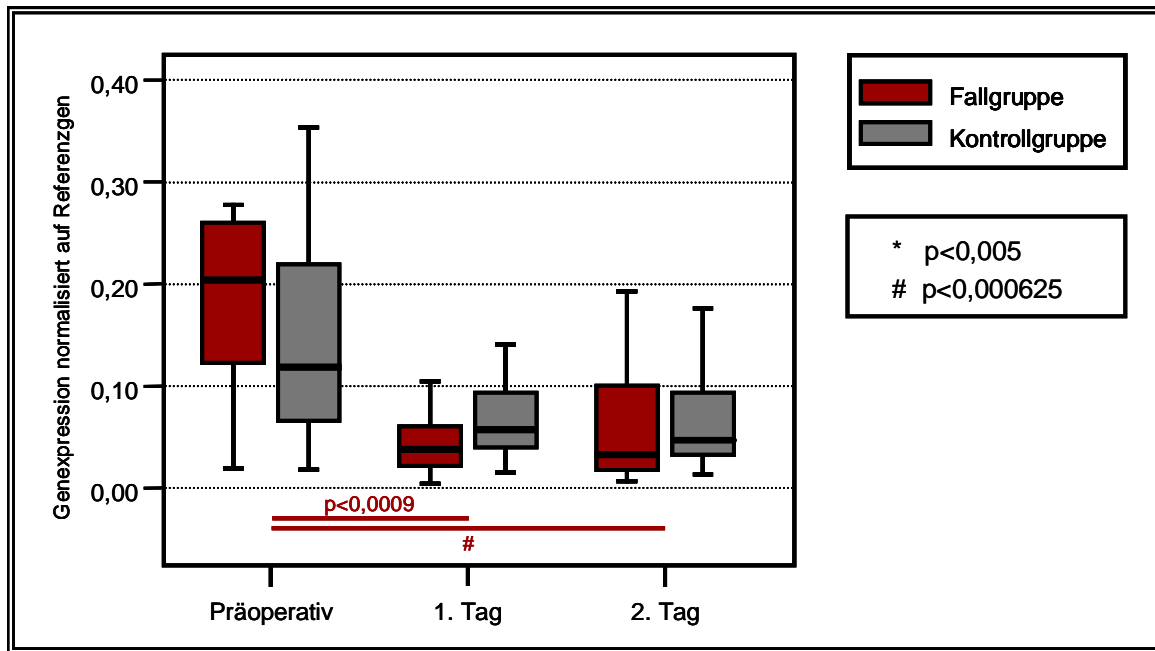
**Abbildung 19. Genexpression von GRO-1 (CXCL1).** Weder zwischen den Untersuchungszeitpunkten noch zwischen den Patientengruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



**Abbildung 20. Genexpression von PF4 (CXCL4).** Kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Zusammenhang sowie zwischen den beiden Studienpopulationen. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta C_T}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



**Abbildung 21. Genexpression von MIP-1a (CCL3).** Während zwischen den beiden Studiengruppen kein Unterschied messbar war, kam es postoperativ zu einer Reduktion der Expression in beiden Untersuchungsgruppen. Dieser Effekt war am ersten postoperativen Tag in beiden Gruppen, am zweiten nur in der Fallgruppe signifikant nachweisbar. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta C_T}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.



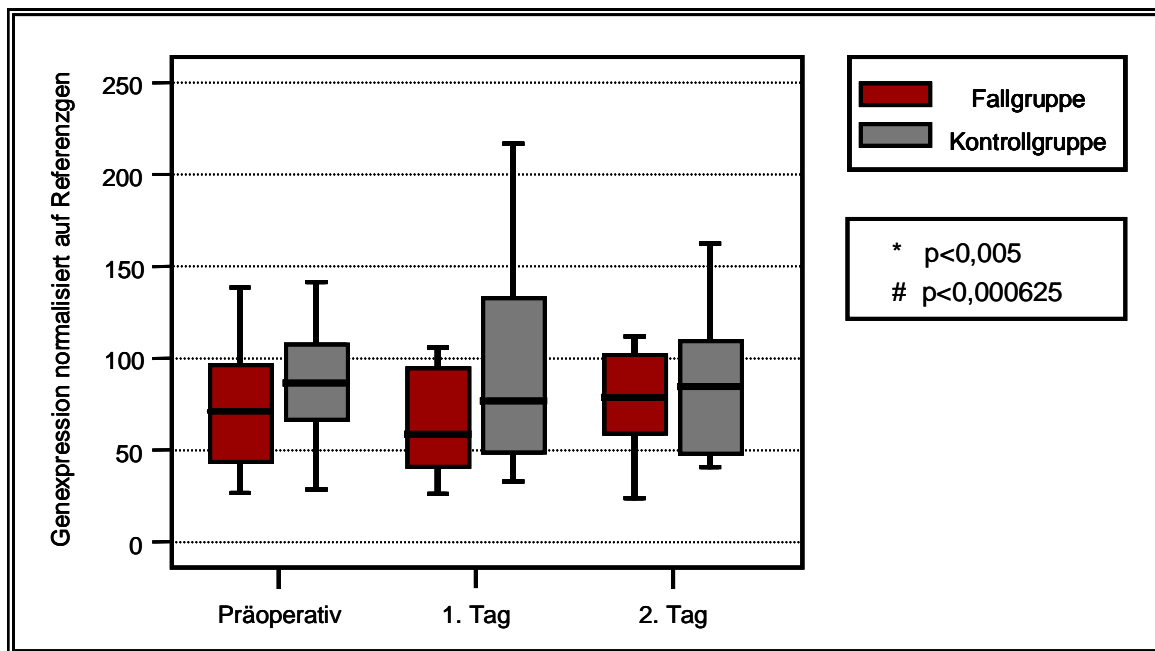
**Abbildung 22. Genexpression von Interleukin 8 (CXCL8).** Nach dem Eingriff zeigte sich eine verminderte mRNA-Menge im Verhältnis zum Ausgangswert. In der Kontrollgruppe war keine signifikante Änderung nachweisbar. Zwischen den Gruppen lagen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede vor. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.

#### 4.5 Die Expression des antiinflammatorischen Zytokins TGFβ

Neben den oben beschriebenen proinflammatorischen Zytokinen haben auch antiinflammatorische Zytokine eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung einer Homöostasestörung im Rahmen der Sepsis. Eines dieser Zytokine, das stark supprimierend auf die Monozytenaktivität wirkt, ist der Transforming Growth Factor beta. Die Unterschiede, die sich zwischen den Gruppen und im zeitlichen Verlauf zeigten, waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Die Expression von TGFβ				
		Präoperativ	1. Postoperativer Tag	2. Postoperativer Tag
TGFβ	Fälle	71,26 (26,54-346,09)	58,69 (26,17-958,74)	78,66 (23,83-985,7)
	Kontrollen	86,52 (28,54-141,53)	76,82 (32,9-216,77)	84,82 (40,79-213,78)

**Tabelle 9. Genexpression des Transforming Growth Factors Beta** Bestimmt wurden auf HPRT normalisierte Expressionswerte. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Minimal- und Maximalwert (in Klammern).



**Abbildung 23. Genexpression von TGFβ.** Weder zwischen den Messezeitpunkten noch zwischen den beiden Gruppen lag ein signifikanter Unterschied vor. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta C_T}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.

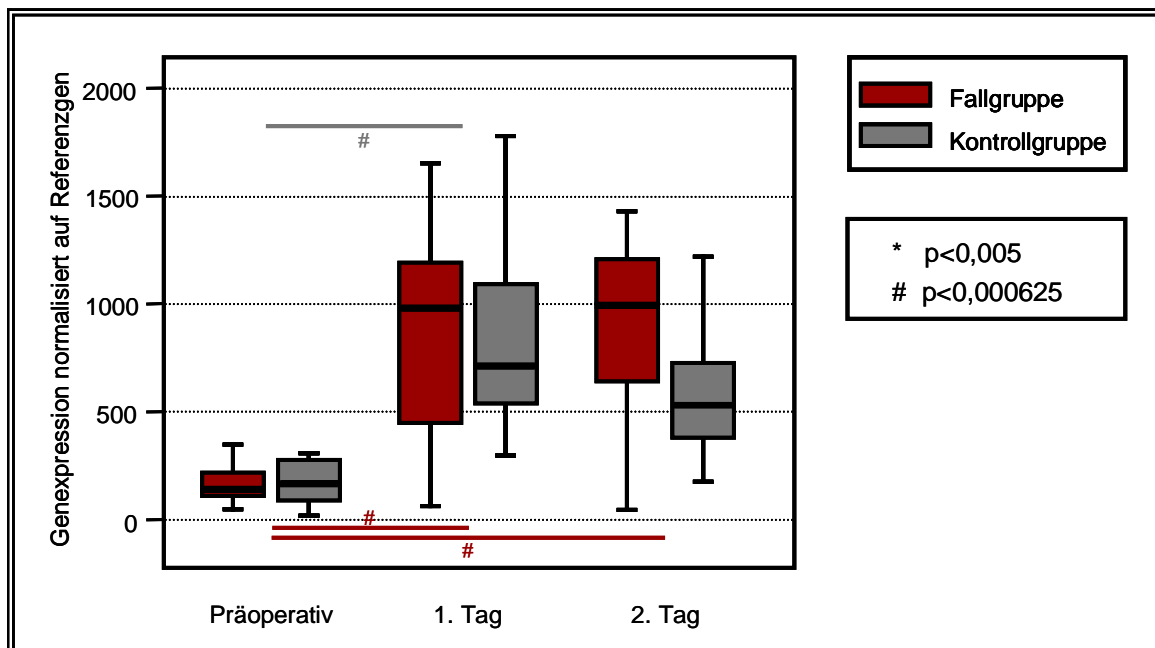


#### 4.6 Die Expression von Calgranulin A (S100A8)

Calgranulin A ist ein Protein, das von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird und das sowohl als Botenstoff fungiert, als auch eine direkte mikrobizide Wirkung hat. Es wurde bereits verschiedentlich im Zusammenhang mit chronischen und akuten inflammatorischen Prozessen beschrieben [90]. Interessanterweise steigt die Expression postoperativ signifikant an, jedoch nicht unterschiedlich zwischen den beiden Patientenpopulationen. Dieser Anstieg kann zumindest zu einem bedeutenden Anteil durch die postoperative Granulozytose erklärt werden, die durch das operative Weichteiltrauma ausgelöst wird.

Die Expression von Calgranulin A (S100A8)				
		Präoperativ	1. Postoperativer Tag	2. Postoperativer Tag
S100A8	Fälle	141,55 (47,18-550,65)	980,59 (64,89-2377,12)	994,35 (45,25-2248,89)
	Kontrollen	167,5 (18,51-989,12)	713,54 (298,17-2547,74)	531,95 (177,29-1217,75)

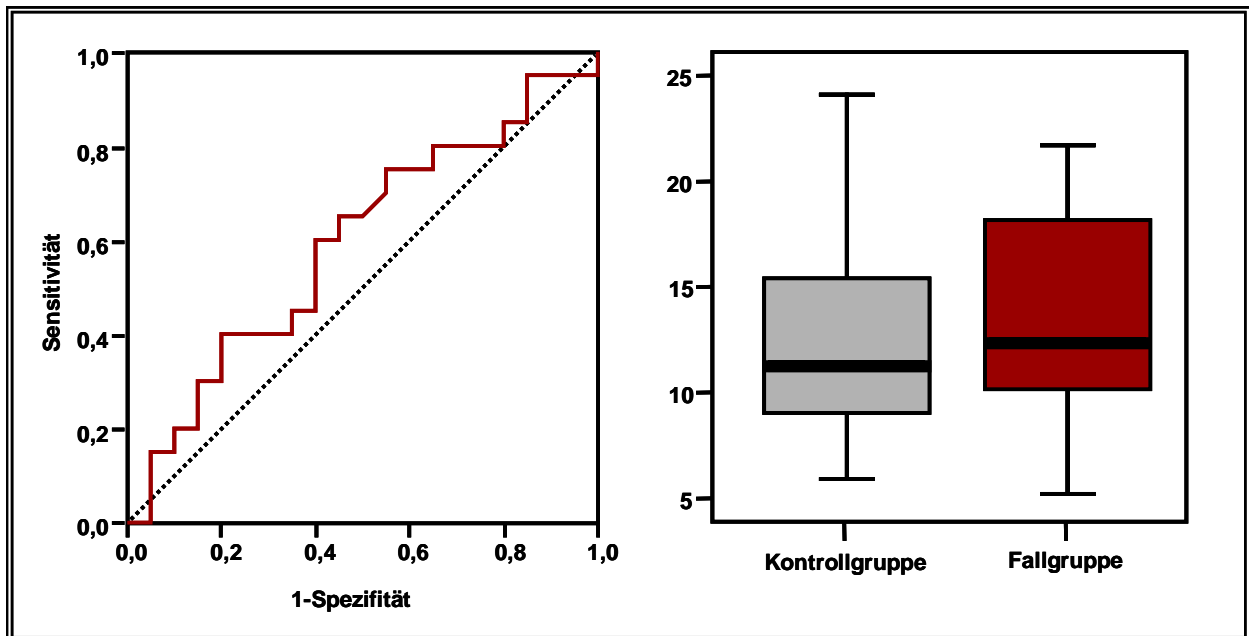
**Tabelle 10. Genexpression von S100A8.** Bestimmt wurden auf HPRT normalisierte Expressionswerte. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Minimal- und Maximalwert (in Klammern).



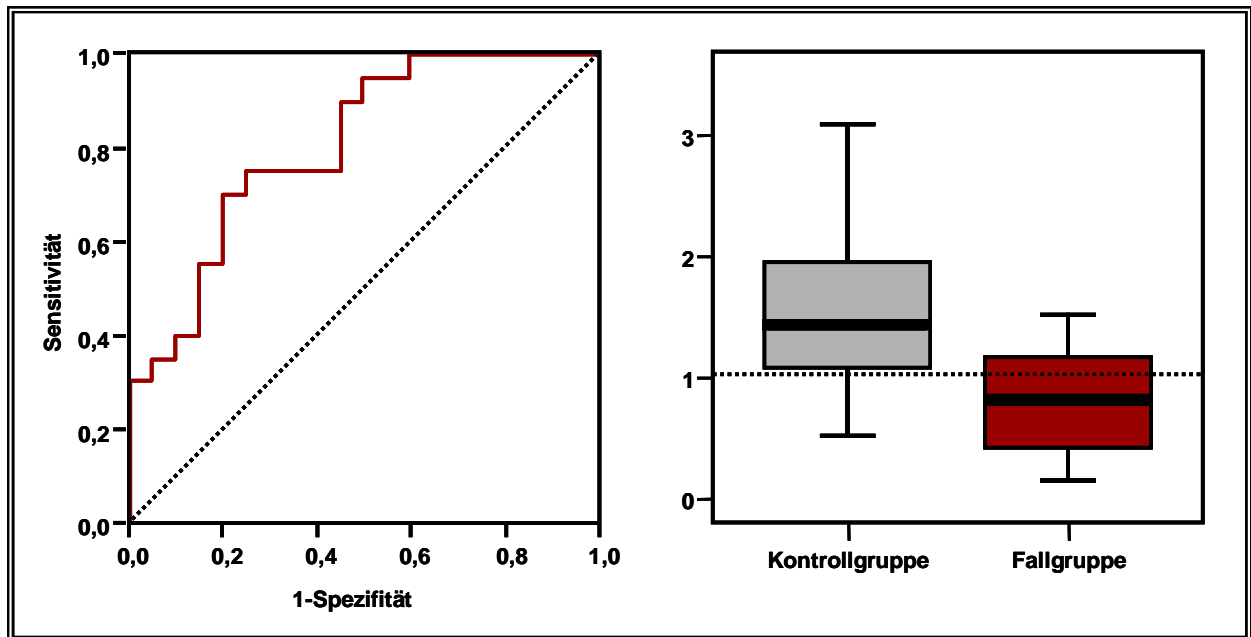
**Abbildung 24. Genexpression von S100A8.** Postoperativ starke Zunahme der gemessenen mRNA-Menge. Dieser Effekt ist in der Fallgruppe an beiden postoperativen Messzeitpunkten nachweisbar, in der Kontrollgruppe allerdings nur am ersten postoperativen Tag. Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie die Extremwerte ohne Ausreißer. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode mit HPRT als Housekeeping-Gen.

#### 4.7 Risikoprädiktion anhand der Genexpression einzelner Gene

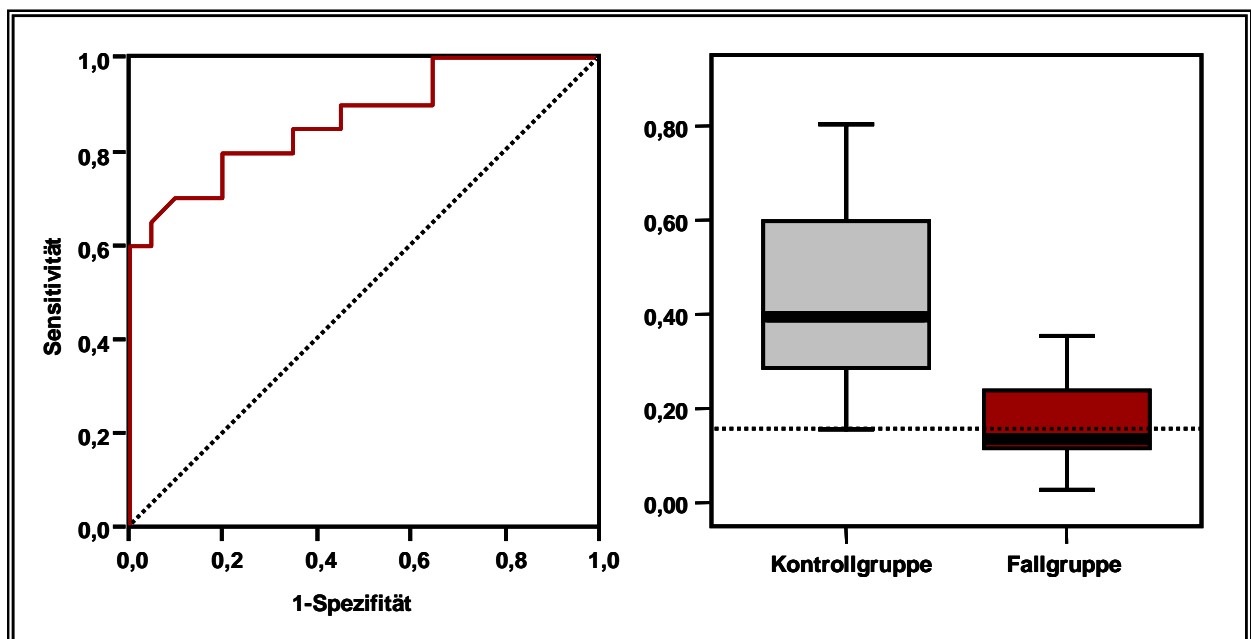
Anhand der Genexpression verschiedener Gene lässt sich das Sepsis-Risiko eines Patienten bestimmen. Basierend auf den Genexpressionsdaten am ersten postoperativen Tag wurden in der hier vorgestellten Studie ROC- (Receiver-Operating-Characteristics)-Kurven erstellt. In diese Analyse wurden nur Gene eingeschlossen, die zum entsprechenden Messzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen zeigten. Im Einzelnen betraf dies CD3, Perforin, TNFa und IL-1 $\beta$ . Die Ergebnisse der ROC-Kurvenanalyse werden in diesem Kapitel vorgestellt. Aus dieser Kurve und einer zugehörigen Tabelle lassen sich Trennwerte ablesen, die mit einer dem Diagramm zu entnehmenden Spezifität und Sensitivität zwischen den beiden Patientenkollektiven unterscheiden.



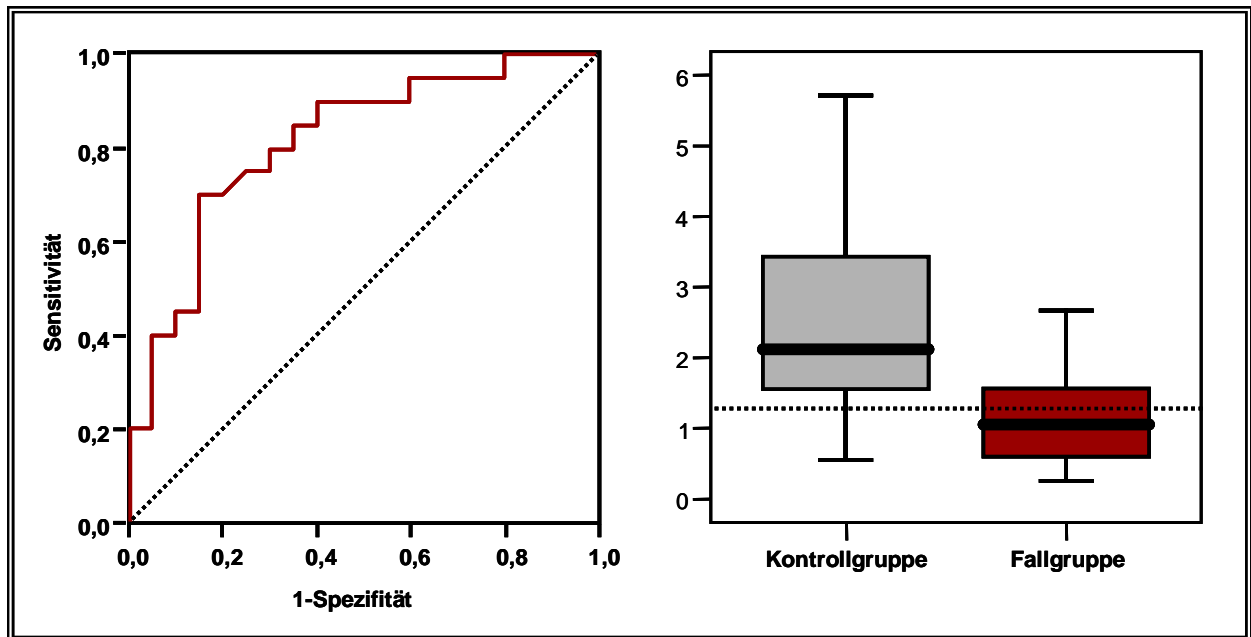
**Abbildung 25. Leukozytenzahlen an Tag 1 nach der Operation.** Links: ROC-Kurve am 1. postoperativen Tag. Fläche unter der Kurve 0,591 (95% KI 0,412-0,770), damit kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Zur Risikoprädiktion für die Entwicklung einer postoperativen Sepsis kann das Ausmaß der Leukozytose daher nicht herangezogen werden. Rechts: Boxplot.



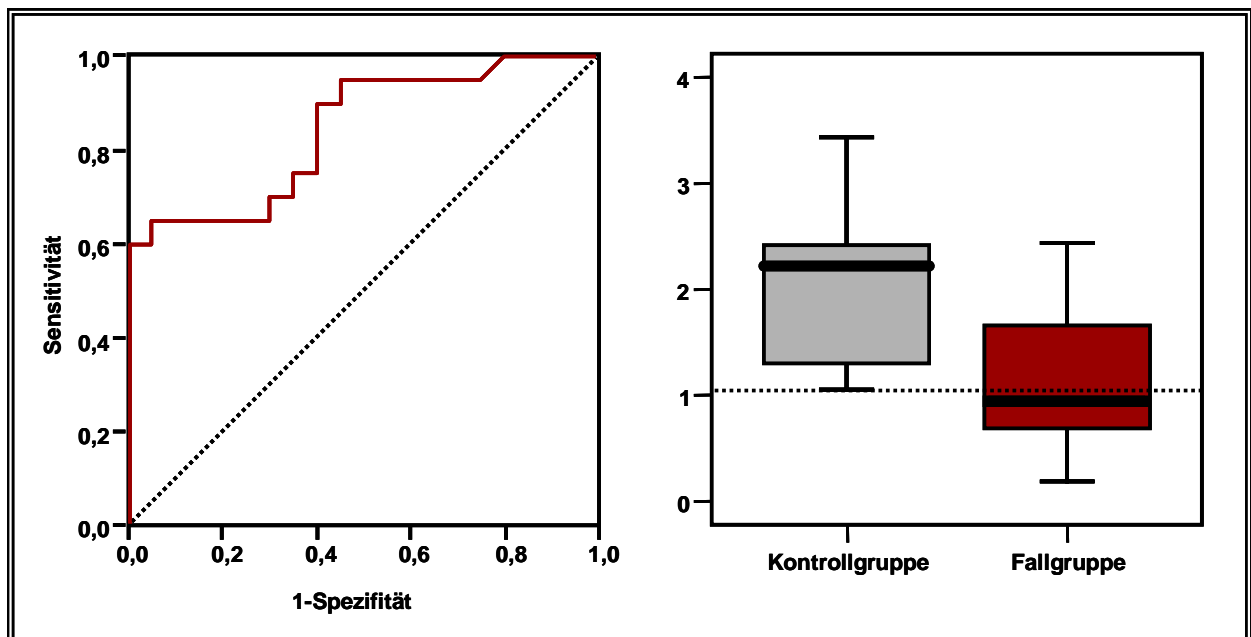
**Abbildung 26. ROC-Kurve und Boxplot für IL-1 $\beta$  am ersten postoperativen Tag.** Fläche unter der Kurve (AUC) 0,805 (95% KI: 0,671-0,939). Rechts: Box-Whisker-Plot mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie Extremwerten. gepunktete Linie Grenzwert, der für diese Analyse die höchste Korrektklassifikationsrate (accuracy) ergibt.



**Abbildung 27. ROC-Kurve und Boxplot für TNF $\alpha$  am ersten postoperativen Tag.** Fläche unter der Kurve 0,869 (95% KI 0,758-0,979). Rechts: Box-Whisker-Plot mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie Extremwerten. gepunktete Linie Grenzwert, der für diese Analyse die höchste Korrektklassifikationsrate (accuracy) ergibt.



**Abbildung 28. ROC-Kurve und Boxplot für Perforin am ersten postoperativen Tag.** Fläche unter der Kurve 0,814 (95% KI 0,680-0,948). Rechts: Box-Whisker-Plot mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie Extremwerten. gepunktete Linie Grenzwert, der für diese Analyse die höchste Korrektklassifikationsrate (accuracy) ergibt.



**Abbildung 29. ROC-Kurve und Boxplot für CD3 am ersten postoperativen Tag.** Fläche unter der Kurve 0,844 (95% KI 0,723-0,965). Rechts: Box-Whisker-Plot mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie Extremwerten. gepunktete Linie Grenzwert, der für diese Analyse die höchste Korrektklassifikationsrate (accuracy) ergibt.

#### 4.8 Der kombinierte Genexpressionstest zur Risikoprädiktion

Die Vorhersage einer postoperativen Sepsis ist anhand der Expression eines einzelnen Gens möglich. Die Anforderungen an einen klinischen Test mit möglichst hoher Spezifität und Sensitivität werden allerdings nur unzureichend erfüllt, wie in Kapitel 4.7 ausgeführt wurde. Hinzu kommt, dass die Expressionsdaten von Fall- und Kontrollgruppe für die einzelnen Gene in einem engen Bereich liegen, so dass eine präzise Zuordnung erschwert wird (siehe Abbildung 26-29).

<b>Risikoprädiktion durch einzelne Gene</b>					
	<b>Grenzwert</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1,029	0,8	0,7	27,67	96,06
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0,151	1	0,6	100	95,81
<b>Perforin</b>	1,261	0,85	0,7	33,78	96,29
<b>CD3</b>	1,043	1	0,6	100	95,81

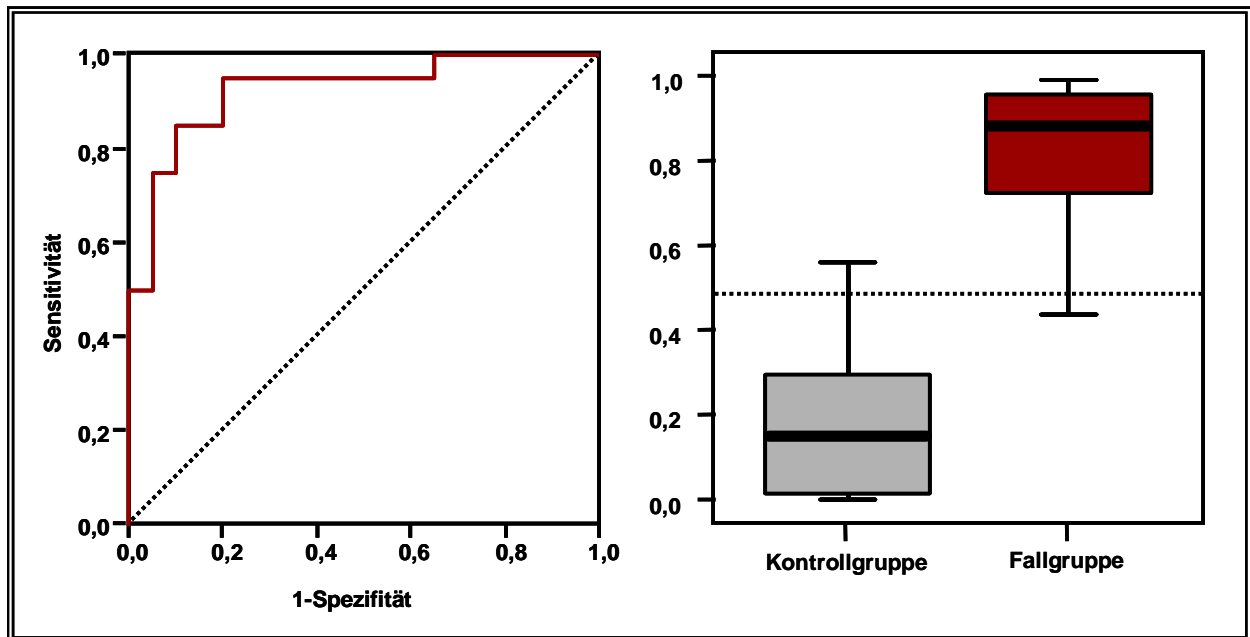
PPV: Positiv-Prädiktiver Wert; NPV: Negativ-Prädiktiver Wert

**Tabelle 11: Die Risikoprädiktion mittels Genexpression von einzelnen Markern liefert nur mäßige Sensitivitäten.** Ausgewählt wurde jeweils der Grenzwert (cutoff), an dem die Summe von Spezifität und Sensitivität maximal ist. PPV und NPV basieren auf der Prävalenz von 20 Sepsispatienten in einer Gesamtpatientenpopulation von 203 Studienpatienten.

Um die diagnostische Aussagefähigkeit zu verbessern, wurde eine binär-logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Diese statistische Methode erlaubt die Gewichtung der einzelnen Gene hinsichtlich ihres Einflusses auf die Entwicklung einer postoperativen Sepsis und ermöglicht die Berechnung einer Wahrscheinlichkeit, mit der einzelne Patienten anhand ihrer individuellen Genexpressionsmuster der Risikogruppe zuzuordnen sind. Da dieses Verfahren nicht auf der Quantifizierung der mRNA-Menge eines einzelnen Gens, sondern auf der Analyse von Genexpressionsmustern basiert, erlaubt es eine Verbesserung der Korrektklassifikationsrate, also der Zahl der Patienten, die richtig der jeweiligen Gruppe zugeordnet werden. Zur Risikovorhersage mittels binär-logistischer Regression wurde die Genexpression von CD3, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  herangezogen. Das Einbeziehen der Perforin-Expression führte nicht zu einer signifikant besseren Prädiktion, daher wurde dieser Marker aus der Analyse entfernt.

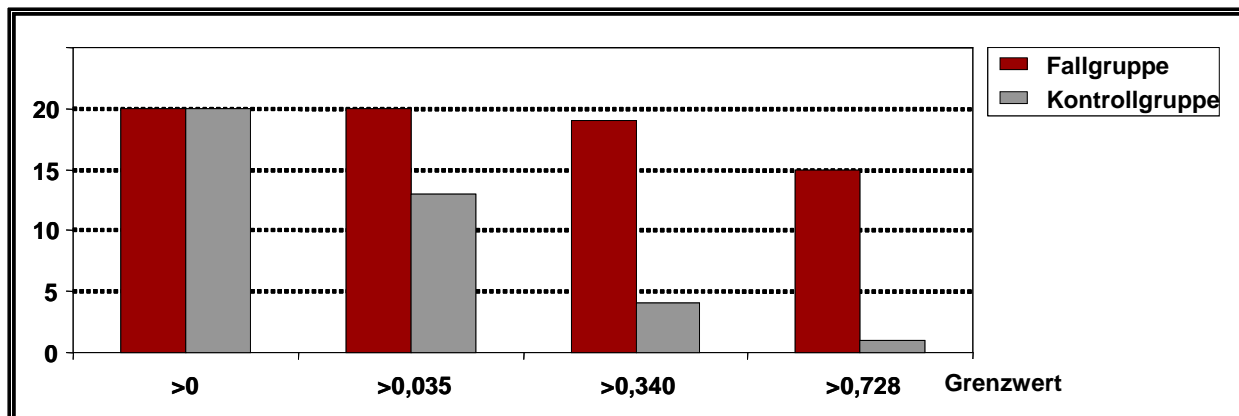
Mittels einer ROC-Kurven-Analyse, die auf diesen Wahrscheinlichkeitswerten basiert, können Trennwerte bestimmt werden, die zur Zuordnung von Patienten zu Gruppen mit unterschiedli-

chem Risiko dienen. Die ROC-Kurve und ein Box-Whisker-Plot sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30. ROC-Kurve basierend auf den Wahrscheinlichkeitswerten der Regressionsanalyse.** AUC 0,918 (95% KI: 0,826-1,009). Rechts: Box-Whisker-Plot mit Median, 25ster und 75ster Perzentile sowie Extremwerten. gepunktete Linie Grenzwert, der für diese Analyse die höchste Korrektklassifikationsrate (accuracy) ergibt. Für diesen Grenzwert betragen Spezifität und Sensitivität jeweils 85%.

Unterschiedlich gesetzte Grenzwerte erlauben dabei eine Optimierung des Testverfahrens hinsichtlich Spezifität oder Sensitivität. Abhängig von der medizinischen Fragestellung kann es sinnvoll sein, eine Gruppe, die ausschließlich aus Patienten mit hohem Sepsis-Risiko besteht, zu klassifizieren oder eine möglichst hohe Zahl der Risikopatienten um den Preis einer niedrigeren Sensitivität zu identifizieren. So wäre für eine Therapiestudie mit einer aufwändigen und kostenintensiven immunmodulatorischen Therapie eine Studienpopulation mit einer hohen Zahl von Sepsispatienten sinnvoll, für weniger aufwändige Maßnahmen wie intensivierte Antibiotikaprophylaxe und verbesserte postoperative Überwachung wären ein Einschluss möglichst aller Risikopatienten wünschenswert.



**Abbildung 31. Die Identifikation von Risikopatienten bei unterschiedlichen Grenzwerten.** Dargestellt ist die Anzahl der Patienten aus der Fall- oder Kontrollgruppe, deren Wahrscheinlichkeit oberhalb des angegebenen Grenzwertes liegt. Ein hoch gesetzter Grenzwert erlaubt die Identifikation einer Gruppe, deren Mitglieder mit hoher Wahrscheinlichkeit erkranken (hohe Spezifität), während ein niedrigerer Grenzwert die Risikopatienten mit hoher Sensitivität richtig klassifiziert.

Risikoprädiktion mittels Kombinationstest					
	Grenzwert	Spezifität	Sensitivität	PPV	NPV
<b>Hohes Risiko</b>	0,728	0,95	0,75	62,1	97,2
<b>Mittleres Risiko</b>	0,340	0,8	0,95	34,2	99,3
<b>Niedriges Risiko</b>	0,035	0,35	1	14,4	100

PPV: Positiv-Prädiktiver Wert; NPV: Negativ-Prädiktiver Wert

**Tabelle 12. Darstellung in Tabellenform.** Klinisch relevant sind einerseits die Gruppe mit hohem Risiko, die hochspezifisch Risikopatienten identifiziert, sowie die Gruppe mit mittlerem Risiko, die eine Diagnose bei 95% der im Verlauf erkrankten Patienten bei gleichzeitig zufrieden stellender Spezifität ermöglicht. PPV und NPV basieren auf der Prävalenz von 20 Sepsispatienten in einer Gesamtpatientenpopulation von 203 Studienpatienten.

## 5 DISKUSSION

Das Weichteiltrauma, das durch größere abdominalchirurgische Eingriffe entsteht, führt unter Vermittlung zahlreicher Mediatoren zu einer systemischen Aktivierung des Immunsystems. Dieser Zustand, der klinisch durch die Zeichen eines SIRS imponiert, geht mit einer unterschiedlich ausgeprägten kompensatorischen antiinflammatorischen Gegenreaktion (CARS) einher. Kommt es dabei zur Fehlregulation, resultiert eine anhaltende ausgeprägte Depression des Immunsystems, die die betroffenen Patienten für sekundäre Infektionen prädisponiert und damit das Entstehen einer postoperativen Sepsis begünstigt. Zur Reduktion der hohen Letalität der Sepsis ist es von großer Bedeutung, Risikopatienten frühzeitig zu identifizieren und gezielt zu überwachen, bzw. präventiv immunmodulatorisch zu behandeln. Dies kann unter anderem anhand der Genexpression von verschiedenen Markern geschehen, wobei ein profundes Verständnis der zugrunde liegenden Pathophysiologie und dem Zusammenhang von Entzündung und kompensierender Entzündungshemmung von großer Bedeutung ist. In der hier vorgestellten retrospektiven Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass

- perioperativ typische Zeichen einer Deaktivierung des Immunsystems auf mRNA-Niveau auftreten, sichtbar vor allem an einer verminderten Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie einer verminderten Expression von T-Zell- und Zytotoxizitätsmarkern (Perforin und CD3).
- Anhand der Expression einzelner Marker Risikopatienten für das Entstehen einer Sepsis identifiziert werden können. Die diagnostische Aussagekraft dieser Marker kann durch Kombination noch deutlich gesteigert werden.
- das verwendete Verfahren eine sinnvolle Ergänzung oder Erweiterung herkömmlicher Verfahren zur Überwachung der Immunfunktion darstellen könnte was allerdings in einer prospektiven Untersuchung bestätigt werden muss.

Zahlreiche Autoren haben Verfahren zur perioperativen Risikoprädiktion oder zur Diagnosestellung in septischen Patienten untersucht. Maßgebliche Arbeiten beschäftigten sich mit der Messung von Zytokinplasmaspiegeln, ein anderer Ansatz lag in der Identifikation von Risikopatienten anhand der monozytären HLA-DR-Expression.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Durchführung eines größeren operativen Eingriffes einen ausgeprägten Einfluss auf die Genexpression immunologisch relevanter Gene hat. Postoperativ trat eine verminderte Expression entzündungsassoziierter Gene wie IL-8 und MIP-1 $\alpha$  auf. Zudem konnte eine ausgeprägte postoperative Reduktion der mRNA-Menge an T-Zell- und NK-



Zellspezifischen Genen in beiden Studiengruppen gezeigt werden. In der Gruppe von Patienten, die im Verlauf eine postoperative Sepsis entwickelten, war die Expression von proinflammatorischen Markern wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  postoperativ deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Der T-Zell-Marker CD3 und das von Natürlichen Killer-Zellen exprimierte Perforin zeigte in der Risikogruppe eine signifikant niedrigere postoperative Expression als in der Gruppe mit unkompliziertem Verlauf.

Basierend auf der Genexpression von CD3, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  wurde eine binär-logistische Regressionsanalyse durchgeführt, die die individuelle Wahrscheinlichkeit berechnete, mit der ein Patient der Risikogruppe zuzuordnen ist. Auf Grundlage dieser Wahrscheinlichkeitswerte war es möglich, das Auftreten einer Sepsis im Verlauf bereits am ersten postoperativen Tag mit hoher Sensitivität und Spezifität vorherzusagen.

Die vorgestellte Studie demonstriert, dass die Analyse von Genexpressionsmustern eine Risiko-prädiktion erlaubt und damit eine Ergänzung von etablierten Verfahren zur genaueren Überwachung der Immunfunktion von Risikopatienten darstellt. Die Genexpressionsanalyse mit Hilfe der quantitativen rt-PCR ist ein einfach zu handhabendes, klinisch breit verfügbares Verfahren, das auf verschiedenen Gebieten bereits eingesetzt wird. Vorbehaltlich einer prospektiven Bestätigung der hier gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass die rt-PCR als neue Technik für die klinische Anwendung auch auf diesem Gebiet geeignet ist.

### **5.1 Expression von proinflammatorischen Zytokinen**

Aus der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine wurde in der vorliegenden Studie die Genexpression von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-18 untersucht. Während für IL-18 signifikante Unterschiede weder zwischen den beiden Patientengruppen noch im zeitlichen Verlauf gemessen wurden, zeigten IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in den beiden Gruppen differierende Genexpressionsmuster. Die Menge der TNF $\alpha$ -mRNA in den Proben der Risikogruppe lag zu allen drei Messzeitpunkten deutlich unterhalb der Menge in der Kontrollgruppe. Darüber hinaus kam es in dieser Gruppe am ersten postoperativen Tag zu einer überzufälligen Abnahme der mRNA-Expression dieses Zytokins. Nach dem Eingriff stieg die mRNA-Menge von IL-1 $\beta$  in beiden Gruppen signifikant an. Dieser Effekt war in der Kontrollgruppe deutlich ausgeprägter und schon am ersten postoperativen Tag nachweisbar, so dass sich nach der Intervention eine deutlich niedrigere IL-1 $\beta$ -Expression in der Risikogruppe fand.

Die gefundenen Ergebnisse sind kohärent zu verschiedenen Studien, die an postoperativen oder septischen Patienten vorgenommen worden sind. So zeigte Hensler et al. eine reduzierte Zytokinfreisetzung nach LPS-Stimulation von isolierten Blutleukozyten kürzlich operierter Patienten [49]. In dieser Studie an Patienten mit unkompliziertem Verlauf nach dem Eingriff zeigte sich eine postoperativ deutlich reduzierte Sekretion von TNF $\alpha$  aus T-Helferzellen, während sich die Sekretion aus Makrophagen nicht signifikant veränderte. Auch war in dieser Untersuchung die postoperative Freisetzung von IL-1 $\beta$  signifikant erhöht. Die in der von Hensler et al. publizierten Studie eingeschlossenen Patienten lassen sich am ehesten mit der hier untersuchten Kontrollgruppe vergleichen. So könnte sich das unterschiedliche Verhalten der TNF $\alpha$ -Expression verschiedener Leukozytenpopulationen in der von Hensler publizierten Untersuchung zu einer nicht nachweisbaren Änderung in einer Vollblutprobe summieren, wie sie in der hier vorgelegten Studie beobachtet wurde. In der Patientengruppe mit postoperativer Sepsis scheint die Reduktion ausgeprägter zu sein, hier überwiegt die Verminderung, so dass sich postoperativ ein signifikant geringerer Wert ergibt. Auch für IL-1 $\beta$  sind die Ergebnisse übereinstimmend. Hier fand sich in beiden Studien ein signifikanter postoperativer Anstieg der mRNA-Expression. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Untersuchung mit Studien, die an Sepsispatienten durchgeführt wurden, so findet man in vielen Fällen übereinstimmende Ergebnisse. Dies ist auf der einen Seite pathophysiologisch begründbar, da man von einem gemeinsamen Pathomechanismus für die immunologische Dysfunktion bei sterilen Traumata und septischen Erkrankungen ausgeht, auf der anderen Seite lag bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten kein klinisch manifestes SIRS vor. Trotzdem decken sich besonders in der Fallgruppe die hier erhobenen Befunde mit einer Vielzahl von Erkenntnissen, die aus der Messung der Zytokinsekretion bei septischen Patienten gewonnen wurden. Eine Untersuchung an PBMC's (Peripheral Blood Mononuclear Cells) von septischen Patienten zeigte eine reduzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung auf mRNA- und Proteinebene. Dieser Effekt war auch an LPS-stimulierten Vollblutproben nachweisbar. Bemerkenswert an dieser Studie ist außerdem, dass die Stimulation mit physiologisch auftretenden niedrigen Endotoxinkonzentrationen durchgeführt wurde, so dass abnormal hohe Zytokinpiegel vermieden werden konnten. Für IL-1 $\beta$  waren die Ergebnisse dieser Studie uneinheitlich, hier zeigte ein semiquantitatives Verfahren keine Änderung der mRNA-Menge [91].

Das durch die Operation verursachte Trauma führt zu einer Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems. Postoperativ werden vermehrt proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  freigesetzt. Dabei konnte in vielen Studien nach größeren Eingriffen ein messbarer Anstieg der IL-6 Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Zudem scheint eine exzessiver Anstieg

des IL-6-Plasmaspiegels mit einer erhöhten Rate postoperativer Infektionen assoziiert zu sein [92]. Für IL-1 $\beta$  und TNFa sind die Ergebnisse weniger kohärent, hier wurde entweder ein Anstieg oder nicht messbare Spiegel beobachtet [92-94]. In tierexperimentellen Studien konnte allerdings das Übertreten von TNFa in die systemische Zirkulation nachgewiesen werden. Die fehlende Messbarkeit in verschiedenen klinischen Studien am Menschen ist also möglicherweise nur durch die kurze Halbwertszeit von TNFa und IL-1 $\beta$  bedingt [95]. Vor diesem Hintergrund scheint es widersprüchlich, dass die gewonnenen Ergebnisse eine Abnahme von TNFa postoperativ und generell eine verminderte Sekretion von TNFa und IL-1 $\beta$  in der Gruppe mit postoperativer Sepsis zeigten. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich leicht aufklären, wenn man pathophysiologisch eine differenzierte Aktivierung von Immunzellen betrachtet. Während Gewebemakrophagen große Mengen von proinflammatorischen Zytokinen freisetzen, werden im Blutkreislauf zirkulierende Monozyten in ihrer Aktivität eher gehemmt. Schindler et al. konnten in einer Studie zeigen, dass IL-6 hemmend auf die Sekretion von TNFa und IL-1 $\beta$  wirkt und damit die Immunreaktion in Richtung Entzündungshemmung verschiebt [96]. Dadurch wird zusätzlich die Resistenz gegen eindringende Erreger verschlechtert. Verschiedene Studien lieferten außerdem Hinweise dafür, dass der eigentliche Ort der Zytokinfreisetzung nicht das Blut selbst, sondern das entzündete Gewebe ist. Dabei kann die Zytokinkonzentration im Gewebe um den Faktor 100 über der des Blutes liegen [97-100]. Die bereits präoperativ reduzierte TNFa-Genexpression, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, lässt sich auf zwei verschiedenen Wegen erklären. Einerseits ist eine bereits präoperativ vorliegende relative Immundefizienz in der Gruppe der Patienten zu vermuten, die sich in einer verminderten TNFa-Genexpression zum Beispiel in Monozyten äußert und die eine ungenügende Wirtsantwort auf perioperativ eindringende Pathogene auslöst. Auf der anderen Seite wäre eine bereits präoperativ vorliegende vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine im peripheren Gewebe denkbar, die sekundär zu einer verminderten Aktivierung der zirkulierenden Leukozyten führt. Um hier eine weitere Differenzierung der zugrundeliegenden Mechanismen zu erreichen, wäre eine Parallelbestimmung von Zytokinspiegeln auf Proteinebene bzw. das Heranziehen von Oberflächenmarkern denkbar.

Interleukin 18 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das unter anderem von aktivierten Makrophagen freigesetzt wird und die Aktivität von Natürlichen Killerzellen sowie die IFN $\gamma$  Sekretion stimuliert [101,102]. In experimentellen Studien war die Stimulation mit IL-18 in der Lage, eine postoperativ eingeschränkte Immunfunktion von isolierten PBMCs aufzuheben [103]. In der hier

vorgestellten Studie zeigte IL-18 weder zwischen den beiden Patientengruppen noch im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Unterschied (Abbildung 12)

Klinische Studien, die die perioperative Genexpression von IL-18 untersuchen, fehlen zurzeit noch. Zur Unterstützung der hier vorgestellten Daten könnte man allerdings die Publikation von Grobmyer et al. heranziehen, der keine signifikante Veränderung der IL-18-Plasmaspiegel in gesunden Freiwilligen nach LPS-Applikation fand [102]. In dieselbe Richtung deuten einige von Tschoeke et al. publizierte Daten, die vergleichbare IL-18-Spiegel in Vollblutproben bei Traumatopatienten und gesunden Kontrollen zeigten [104].

Zusammenfassend fand sich bei der Untersuchung der proinflammatorischen Zytokine eine deutliche Reduktion wichtiger Entzündungsmediatoren in der Gruppe von Patienten, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten. Der Umstand, dass die TNFa-Expression in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert ist, unterstützt die Erkenntnis, dass dieses Zytokin für eine effiziente Abwehr eindringender Krankheitserreger essentiell ist [105,106]. Dafür spricht außerdem, dass in verschiedenen Studien ein erhöhtes Infektionsrisiko für Patienten mit verminderter postoperativer ex vivo TNFa-Sekretion gezeigt wurde [107,108]. Ebenso lässt sich der verminderte Anstieg der IL-1 $\beta$ -Expression postoperativ interpretieren, im Sinne eines verminderten Potentials des Wirts auf eindringende Krankheitserreger mit einer adäquaten Entzündungsantwort zu reagieren. Damit liefert die hier vorgestellte Studie nicht nur Hinweise für die grundsätzliche Bedeutung der proinflammatorischen Mediatoren bei der effektiven Erregerabwehr, vielmehr unterstreicht sie auch die pathophysiologische Bedeutung der, durch das operative Trauma ausgelösten Immundepression für die Entstehung der postoperativen Sepsis.

## **5.2 Expression von T-Zell- und NK-Zell-Genen**

Die Gene, die hauptsächlich oder spezifisch von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen exprimiert werden, zeigen in der hier vorgestellten Studie ein relativ einheitliches Verhalten. Untersucht wurden die Expression von Perforin, CD3, CCR3 und CD69 (Abbildung 13-16). Die mRNA-Menge von allen vier Markern nimmt im Verhältnis zum Ausgangswert postoperativ stark ab. In der Tendenz waren alle Gene in der Fallgruppe niedriger exprimiert, wobei der Unterschied für Perforin und CD3 signifikant war.

CD3 ist ein essentieller Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes, der neben CD3 noch aus dem TCR und der  $\zeta$ -Kette besteht. Die Funktion von CD3 besteht dabei im Wesentlichen in der Weiterleitung von Aktivierungssignalen am T-Zell-Rezeptor, sowie in der Expression des Re-

zeptorkomplexes auf der Zelloberfläche von Lymphozyten. Entsprechend wird CD3 von T-Zellen und Thymozyten exprimiert [17]. Bisher ging man davon aus, dass man mit gewissen Einschränkungen das CD3-Oberflächenantigen zur Einschätzung der relativen Menge an T-Zellen in einer Probe heranziehen kann, neuere Studien zeigen allerdings, dass die CD3-Expression auf der Zelloberfläche u.a. in septischen Patienten einer Regulation unterworfen ist [109].

CD69 ist ein Membranprotein, das auf T- und B-Lymphozyten exprimiert wird. Darüber hinaus kann es auf der Zelloberfläche von zahlreichen anderen Leukozyten wie NK-Zellen, Neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten sowie Makrophagen nachgewiesen werden. Von T-Lymphozyten wird es nach Stimulation des T-Zellrezeptors durch Antigene vermehrt in die Zellmembran integriert und dient als durchflusszytometrischer Marker für den Aktivierungszustand von T-Lymphozyten und ihren Subpopulationen [110].

CCR3 ist ein Chemokinrezeptor, der vor allem auf T-Helferzellen der Th2-Subpopulation exprimiert wird. In septischen Patienten wurde verschiedentlich eine Reduktion der Aktivität der Th1-Lymphozyten bei vermehrter Th2-Aktivität beobachtet. Dies könnte eine effektive Erregerabwehr durch phagozytierende Zellen beeinträchtigen [111]. In der vorliegenden Studie konnte allerdings keine Zunahme in der Expression dieses Chemokinrezeptors in der Fallgruppe nachgewiesen werden, damit gibt es keinen Anhalt für ein frühzeitiges postoperatives Überwiegen der Th2-Zell-Aktivität in dieser Patientenpopulation.

Ein weiteres untersuchtes Gen kodiert Perforin, ein Protein, das von NK- und NKT-Zellen produziert wird. Zusammen mit anderen Proteinen wie Granzyme und Granulysin wirkt es zytotoxisch und mikrobizid, indem Poren in der Zellmembran der attackierten Zelle gebildet werden und eine Apoptose ausgelöst wird [17,35].

Zumindest teilweise ist die Änderung der Genexpression im zeitlichen Verlauf auf Verschiebungen im Blutbild der eingeschlossenen Patienten zurückzuführen. Postoperativ ist das Blutbild spezifischen Veränderungen unterworfen; so kommt es zu einem Anstieg der Gesamtleukozytenzahlen, der maßgeblich von einer vermehrten Ausschwemmung Neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark getragen wird. Gleichzeitig kommt es bei größeren Operationen zur Abnahme der relativen und absoluten T-Zell und NK-Zell-Anzahl [112], wobei die relative Abnahme mitbedingt ist durch die Zunahme an Granulozyten. Diesem Mechanismus sind in der vorgestellten Studie beide Patientengruppen in ähnlichem Ausmaß unterworfen. So stieg die Leukozytenzahl von durchschnittlich 7800/ $\mu$ l auf 12900/ $\mu$ l am ersten und 13000/ $\mu$ l am zweiten

postoperativen Tag (Abbildung 9) ohne dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab. So lässt sich auch die starke Abnahme an spezifisch von T-Zellen und NK-Zellen exprimierten Genen am ersten und zweiten postoperativen Tag zumindest in Teilen durch eine Verschiebung der Anteile der verschiedenen Leukozytensubpopulationen erklären. Weitere Hinweise liefert ein Mausmodell der zerebralen Ischämie, bei dem ein Einfluss von ischämischer Gewebsschädigung auf die T-Zellfunktion nachgewiesen werden konnte. Es konnte ein dramatischer apoptotischer Verlust von Lymphozyten sowie eine Verlagerung von einer Th1- zu einer Th2-typischen Zytokinsekretion im ex vivo-Versuch gezeigt werden. Diese Immundefizienz führt zu einer hohen Inzidenz von Pneumonie und Bakteriämie in den Versuchstieren. Durch Gabe eines Beta-Rezeptorenblockers konnte die Pneumonie-Inzidenz deutlich gesenkt werden, was eine wichtige Rolle der Sympathikus-Aktivierung unterstreicht [113]. Die Aktivierung des Sympathikus spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Septischen Schocks, was verwandte Mechanismen auch in nicht-ischämischen Gewebstraumata nahelegt. Die Daten aus den Tiermodellen konnten an menschlichen Apoplex-Patienten bestätigt werden. Auch hier fand sich eine messbare Deaktivierung von T-Lymphozyten und Monozyten nach zerebraler Ischämie [114]. Da in der hier vorgestellten Studie aus logistischen Gründen kein Differentialblutbild der Patienten angefertigt wurde, lässt sich jedoch keine Aussage machen, ob der Effekt der Zellzahlverschiebung oder die Änderung der Transkriptionsrate in den einzelnen Zellen überwiegt. Eine Schätzung basierend auf publizierten Zahlen zum Verhalten von Zellsubpopulationen [112] lassen jedoch einen maßgeblichen Einfluss aufgrund Verschiebungen im Blutbild vermuten. Diese Annahme wird unterstützt durch eine signifikante positive Korrelation zwischen den einzelnen T- und NK-Zellspezifischen Genen (siehe Tabelle 13). Neben der Abnahme der Expression nach dem Eingriff ist die postoperative mRNA-Menge von CD3 und Perforin in der Fallgruppe deutlich im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Damit scheint das adaptive Immunsystem in Patienten, die im Verlauf eine Sepsis entwickeln, stärker gehemmt zu sein als in Patienten mit unkompliziertem postoperativen Verlauf. In Übereinstimmung mit der reduzierten mRNA-Expression in der hier vorgestellten Untersuchung konnte eine postoperativ eingeschränkte Funktion der Natürlichen Killerzellen in mehreren Studien an chirurgischen Patienten sowie in Tierexperimenten demonstriert werden [6,115,116]. Betroffen sind davon neben den T-Zellen auch die NK- sowie die NKT-Zellen; beide Zellpopulationen produzieren das antimikrobielle und zytotoxische Protein Perforin [35]. Über diesen direkten mikrobiziden Effekt, der erst in den letzten Jahren beschrieben wurde hinaus, könnte eine Verminderung der Aktivität der Natürlichen Killerzellen die Anergie von Monozyten begünstigen, da NK-Zellen bei der Interferon-vermittelten Monozytenstimulation eine wichtige Rolle spielen.

Korrelation zwischen T-Zell und NK-Zellgenen mit dem T-Zellmarker CD3				
		CD3		
		Präoperativ	Tag 1	Tag 2
CCR3	Präoperativ	-0,205 (n.s.)	0,069 (n.s.)	-0,015 (n.s.)
	Tag 1	-0,292 (n.s.)	0,471 (0,002**)	0,509 (0,001**)
	Tag 2	-0,106 (n.s.)	0,57 (<0,005**)	0,832 (<0,005**)
Perforin	Präoperativ	0,622 (0,005**)	0,149 (n.s.)	0,135 (n.s.)
	Tag 1	0,238 (n.s.)	0,796 (0,005**)	0,624 (0,005**)
	Tag 2	0,198 (n.s.)	0,604 (<0,005**)	0,884 (<0,005**)
CD69	Präoperativ	0,231 (n.s.)	0,013 (n.s.)	0,159 (n.s.)
	Tag 1	0,121 (n.s.)	0,565 (<0,005**)	0,487 (0,001**)
	Tag 2	0,036 (n.s.)	0,551 (<0,005**)	0,62 (<0,005**)

Angegeben sind der Korrelationskoeffizient und der p-Wert in Klammern (Spearman-Rho). \*\* p<0,01

**Tabelle 13. Korrelationstabelle von T-Zell-Genen.** Postoperativ zeigte sich eine enge Verbindung zwischen den einzelnen T-Zell assoziierten Genen und CD3.

Neben der Reduktion der monozytären Zytokinexpression ist damit auch die Genexpression von T-Zell und NK-Zelleigenen Genen vermindert. Daraus folgt, dass die postoperative Immundepression, die letztlich in der Entwicklung einer Sepsis mündet, nicht allein ein Resultat einer verminderten Aktivität phagozytierender Zellen ist, sondern dass der adaptive Teil des Immunsystems ebenfalls beeinträchtigt wird. Hinweise für ein Überwiegen von Th2- über Th1-Helferzellen postoperativ, wie sie verschiedentlich beschrieben wurden, lassen sich aus den hier vorgestellten Ergebnissen allerdings nicht ableiten.

### 5.3 Expression von Chemokinen

Neben den oben beschriebenen Zytokinen stellen die Chemokine eine weitere Gruppe von Botenstoffen des Abwehrsystems dar, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Immundefunktionsstörungen nach operativem Trauma und bei septischen Erkrankungen spielen. Zudem nimmt man an, dass insbesondere IL-8 eine Vermittlerfunktion bei entzündungsbedingten Gewebsschä-

den innehat [117]. Zu den untersuchten Chemokinen gehören MIP-1a (CCL3), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), PF4 (CXCL4) und GRO-1 (CXCL1). Während MIP-1a zu den CC-Motiv-Chemokinen gehört, sind die restlichen vier Mitglieder der CXCL-Chemokin-Familie. In den hier vorgestellten Ergebnissen zeigen die untersuchten Chemokine allerdings kein gruppenspezifisches Verhalten.

Bei zwischen den beiden Gruppen vergleichbarer Expression von Interleukin 8, konnte eine ausgeprägte Reduktion zwischen dem Ausgangswert und den postoperativen Messzeitpunkten festgestellt werden (Abbildung 22). Ein ähnliches Verhalten zeigten auch IP-10 (Abbildung 18) sowie MIP-1a. Beim letzteren fiel auf, dass die Genexpression postoperativ zwischen den Gruppen signifikant voneinander abwich. Die Fallgruppe zeigte eine geringere Expression dieses Chemokins (Abbildung 21).

Dahingegen konnten keine Unterschiede in der Expression des Plättchenfaktors 4 (Abbildung 20) festgestellt werden. GRO-1 zeigte in der Kontrollgruppe einen geringfügigen, aber signifikanten Abfall der Expression am zweiten postoperativen Tag im Verhältnis zum Vortag (Abbildung 19).

Die Rolle von Interleukin 8 im Zusammenhang mit Sepsis und Entzündung wird schon seit vielen Jahren diskutiert. Insbesondere die leukozytotaktische und neutrophilen-aktivierende Wirkung sowie die Vermittlung von Gewebsschäden ist dabei bedeutsam. IL-8 wird insbesondere von Monozyten, aber auch von Zellen wie Fibroblasten, Endothelien und anderen Zellspezies sezerniert [118]. Eine naheliegende Ursache für die zunächst paradox erscheinende postoperative Verminderung der Genexpression – schließlich wird dieses Chemokin unter anderem von TNF $\alpha$  induziert – kann in der bereits ausführlich beschriebenen perioperativen Deaktivierung von Monozyten liegen, die in einer verminderten Expression dieses im Wesentlichen proinflammatorischen Zytokins resultiert. Eine andere denkbare Erklärung wäre eine vermehrte Auswanderung aktivierter Monozyten aus dem zirkulierenden Blut in das chirurgisch geschädigte Gewebe. Dies würde in einer Erhöhung der relativen Anzahl unreifer bzw. inaktiver Zellen in den postoperativen Blutproben resultieren, die entsprechend weniger mRNA produzieren. Vergleichbare Ergebnisse zur IL-8 Expression konnten auch in einer Untersuchung an Patienten nach kardiochirurgischem Eingriff mit Einsatz einer Herzlungenmaschine gewonnen werden [119]. Ähnlich lässt sich auch das Verhalten der gemessenen mRNA-Mengen von IP-10 und MIP-1a erklären. IP-10 wird von verschiedenen Immunzellen nach Stimulation durch Interferon gebildet, während MIP-1a spezifischer für monozytäre Zellen ist. Eine erhöhte Expression der PF4-mRNA in septischen Patienten im Vergleich zu nichtseptischen Kontrollen, die in einer von Prucha et al. durchgeführ-



ten Studie gezeigt wurde [71], konnte hier allerdings nicht bestätigt werden. Da der größte Teil der mRNA für den Plättchenfaktor 4 aus Thrombozyten stammt [120] und diese als kernlose Zellen nicht zur mRNA-Neusynthese befähigt sind [17], wäre eine Änderung der Expression hauptsächlich auf Basis einer Verschiebung von relativen Zellzahlen zu erwarten.

Die Analyse der Chemokinexpression liefert einen weiteren Hinweis auf eine eingeschränkte Aktivität der zirkulierenden Monozyten als Risikofaktor für eine postoperative Sepsis. Während im überwiegenden Teil der Chemokine die Unterschiede im zeitlichen Verlauf überwogen, zeigte das von Monozyten exprimierte, proinflammatorische MIP-1a eine deutliche Reduktion in der Gruppe der Patienten, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten und ergänzte damit das Bild, das sich aus der Messung der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNFa ergab.

#### **5.4 Expression des antiinflammatorischen Zytokins TGF $\beta$**

Auf der Seite der antiinflammatorischen Seite wurde die Genexpression des Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ) untersucht. Dieses Zytokin wird unter anderem von T-Helferzellen vom Typ 2 und regulatorischen T-Zellen sezerniert. Trotz einiger entzündungsfördernder Wirkungen wird es im Allgemeinen zu den antiinflammatorischen Zytokinen gerechnet, da es einen starken hemmenden Einfluss auf die Makrophagenaktivität besitzt [32]. In der vorgestellten Untersuchung fand sich weder zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe noch zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten ein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 23). Damit erscheint die TGF $\beta$ -Expression unbeeinflusst durch das operative Trauma. In Unkenntnis der Plasmaspiegel von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen lassen sich über Wechselwirkungen mit anderen Zytokinen allerdings nur spekulieren. Eine mögliche Ursache für die unveränderten mRNA-Mengen in den Vollblutproben könnte allerdings in der mRNA-Menge von TGF $\beta$  in Blutthrombozyten bedingt sein [121]. Da diese Zellen kernlos sind, sind sie nicht befähigt, auf Stimuli mit vermehrter Transkription zu reagieren. Damit könnten Veränderungen in der Transkription in anderen Zelltypen von der konstanten Expression in Blutplättchen verwischt werden. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass aus Thrombozyten stammende Plättchenfaktor 4 ebenfalls eine unveränderte mRNA-Expression zeigte (siehe Kapitel 5.3 und Abbildung 20).

## 5.5 Expression von Calgranulin A (S100A8)

Neben den beschriebenen Zytokinen und T-Zellproteinen wurde noch das Gen S100A8 untersucht. Dieses Gen codiert für Calgranulin A, ein Protein das von verschiedenen Autoren im Zusammenhang mit chronischen und akuten entzündlichen Prozessen beschrieben wurde. Calgranulin A wird vor allem von Neutrophilen Granulozyten, aktivierten Makrophagen sowie verschiedenen Bindegewebszellen produziert [122]. Seine Funktion ist noch nicht vollständig verstanden; es bildet zusammen mit Calgranulin B (S100A9) Homo- oder Heterodimere und bewirkt nach Freisetzung eine Rekrutierung weiterer Leukozyten im entzündeten Gewebe [90]. Darüber hinaus besitzt es auch eine ausgeprägte antimikrobielle Wirkung [123].

In einer DNA-Mikroarray-Studie mit Proben von septischen Patienten fand sich eine Überexpression im Vergleich zu Kontrollpatienten, die sich einem neurochirurgischen Eingriff unterzogen ohne dass sie Zeichen einer Entzündungsreaktion zeigten [71]. Trotz der unterschiedlichen Patientenkollektive weißt die von Prucha et al. publizierte Studie in die selbe Richtung der hier vorgestellten Ergebnisse (Abbildung 24), bei denen eine starke Zunahme der gemessenen mRNA-Menge nach operativen Eingriffen mit begleitender Entzündungsreaktion auftrat.

Dieser Anstieg lässt sich nur teilweise über eine Zunahme der Neutrophilen Granulozyten erklären. Zum einen, da die Zunahme an Calgranulin A-mRNA mit dem 5-7fachen des Ausgangswert größer als die Zunahme der Leukozytenzahlen ist, zum anderen sind Leukozytenzahlen und mRNA-Menge nur schwach korreliert.

<b>Korrelation von Leukozytenzahlen und S100A8 mRNA-Menge</b>				
		<b>S100A8</b>		
		Präoperativ	Tag 1	Tag 2
<b>Leukozyten</b>	Präoperativ	0,37 (0,0203)	0,29 (n.s.)	0,04 (n.s.)
	Tag 1	0,33 (0,039)	0,32 (0,048)	-0,11 (n.s.)
	Tag 2	0,14 (n.s.)	0,16 (n.s.)	-0,13 (n.s.)

Angegeben ist jeweils der Korrelationsfaktor zwischen -1 und 1, in Klammern p-Wert (Spearman-Rho)

**Tabelle 14. Korrelation zwischen S100A8 und den Gesamtleukozytenzahlen.** Die Expression von Calgranulin A ist nur schwach mit der Gesamtanzahl der Leukozyten korreliert. Damit erscheint eine geänderte Expression durch Zellzahlverschiebung unwahrscheinlich.

Eine mögliche Ursache des Anstieg der S100A8-Expression liegt in erhöhten postoperativen IL-1 $\beta$  und TNFa-Konzentrationen, die nach größeren chirurgischen Eingriffen beobachtet werden können [124], da beide Zytokine die Expression von Calgranulin A induzieren [125]. Aufgrund der bisher noch nicht vollständig verstandenen Rolle von S100A8 in Entzündungsprozessen und bisher fehlende weitergehende Untersuchungen an septischen Patienten ist die pathophysiologische Bedeutung der hier vorgestellten Ergebnisse unklar. Eine Rolle könnte die Aktivierung von alternativen Entzündungssignalwegen über RAGE-Rezeptoren spielen [90].

## **5.6 Vergleich des Kombinierten Genexpressionstests mit anderen Verfahren zum Immunomonitoring**

Verschiedene Verfahren zum Überwachen der Immunfunktion und zur Risikoprädiktion und Diagnose septischer Patienten wurden bisher beschrieben. Das am besten Validierte ist dabei die Messung der HLA-DR-Expression auf Blutmonozyten mittels der FACS-Analyse [62].

Die in der hier vorgelegten Studie beschriebene Methode, die auf der quantitativen rt-PCR basiert, erlaubt eine Identifikation von Risikopatienten mit hoher Sensitivität und Spezifität (siehe Abbildung 30 und Tabelle 12). Dabei ist die vorgestellte Technik unabhängig von der Erhebung weiterer Daten wie z.B. klinischen SIRS-Symptomen.

Eine von Mokart et al. publizierte Studie zur Risikoprädiktion an insgesamt 50 Patienten basiert auf der Bestimmung von PCT, CRP oder IL-6 am ersten postoperativen Tag [68]. Während damit Werte für die Sensitivität von bis zu 100% erreicht werden konnten, lag die Spezifität bei maximal 86%. Dieser Test erfordert allerdings das Vorliegen der SIRS-Kriterien, andernfalls liegen Sensitivitäten und Spezifitäten deutlich unter diesen Werten. Damit fällt die diagnostische Bedeutung des beschriebenen Testverfahrens deutlich ab. Hier zeigt ein Verfahren, das unabhängig von der Erhebung klinischer Symptome ist, erhebliche Vorzüge. Dies ist insbesondere bei Eingriffen von Bedeutung, bei denen die SIRS-Symptome auch in Risikopatienten nicht zwangsläufig beobachtet werden können.

Im Vergleich zum hier vorgestellten Verfahren ist die Quantifizierung der monozytären HLA-DR-Expression wesentlich besser validiert [62]. Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns und des im Kapitel 5.7 beschriebenen Überanpassungseffekt bedürfen die hier publizierten Werte für Sensitivität und Spezifität einer prospektiven Überprüfung. Vorbehaltlich einer Bestätigung der Ergebnisse könnte die PCR-basierte Risikoprädiktion allerdings eine sinnvolle Ergänzung dieses etablierten Verfahrens darstellen. Schließlich bietet sie neben praktischen Vorteilen in der An-

wendbarkeit auch eine Möglichkeit, verschiedene Faktoren zur Beurteilung der aktuellen Immunfunktion von Patienten heranzuziehen. So werden in dem vorgestellten Expressionstests die Expression von inflammatorischen Zytokinen, die hauptsächlich von Makrophagen sezerniert werden mit der Expression von typischen T- und NK-Zell-Genen kombiniert. Damit wird die Immunfunktion nicht nur des angeborenen Teils des Immunsystems sondern auch des adaptiven evaluiert. Ein weiterer ungelöster Punkt in der Anwendung der FACS-Analyse ist die rasche Veränderung der HLA-DR-Expression nach Blutabnahme. Bisher existiert kein kommerziell verfügbares System, die Expression direkt nach Blutabnahme zu stabilisieren, so dass eine Analyse umgehend durchgeführt werden muss. Hier hat die rt-PCR eindeutige Vorteile. Zwar sollte der Transport in das verarbeitende Labor nach Möglichkeit zügig erfolgen und besondere Lagerungsbedingungen eingehalten werden, dies stellt jedoch keine ungelöste Aufgabe selbst an kleinere Krankenhäuser. Diese besonderen Vorkehrungen müssen z.B. auch bei der klinisch etablierten Blutgasanalyse ebenfalls eingehalten werden, so dass die entsprechende Logistik in jedem Krankenhaus verfügbar sein sollte.

Verschiedentlich wurde die Messung von Zytokinmengen, die von LPS-stimulierten Monozyten freigesetzt werden, zur Bestimmung des Sepsisrisikos bzw. der Prognose der Sepsis herangezogen. So haben Weighardt und Koautoren in einer Studie an chirurgischen Patienten eine Assoziation zwischen einer erniedrigten IFN $\gamma$  und LPS-abhängigen IL-12-Sekretion und Tod infolge postoperativer Sepsis festgestellt [69]. Interessanterweise bestand dieser Zusammenhang präoperativ, damit wäre eine optimierte präoperative Vorbereitung auf den Eingriff bzw. die kritische Indikationsstellung in Abhängigkeit von immunologischen Parametern möglich. Aufgrund der niedrigen Spezifität ist dieses Verfahren allerdings eher zur Identifikation von Niedrig-Risiko-Patienten geeignet, in der genannten Studie fallen fast 500 von etwa 1100 Patienten in die Risikogruppe. Damit ist dieses Verfahren nicht geeignet, eine Therapieentscheidung zugunsten einer kostspieligen immunmodulatorischen Therapie zu treffen, bzw. geeignete Studienpatienten für eine entsprechende Therapiestudie zu identifizieren, da bei einer Sepsismortalität von maximal 3,6% in der Risikogruppe eine exorbitante Anzahl behandelter Patienten zur Verhinderung eines Todesfalls (number-needed-to-treat, NNT) notwendig wären. Gewichtiger wiegt außerdem das Argument, dass man eine große Zahl von Patienten den Risiken von Unerwünschten Arzneimittelwirkungen aussetzen würde, ohne dass sie von der entsprechenden Therapie profitieren würden. Gleiches gilt sinngemäß für eine ähnliche Studie an Patienten nach neoadjuvanter Therapie [70]. Zudem sind Testverfahren, die die Stimulation vitaler Zellen beinhaltet mit einem hohen Zeit und Materialaufwand behaftet.

Patel et al. konnten schon 1994 zeigen, dass ein erhöhter IL-6-Plasmaspiegel mit einer höheren Mortalität bei Sepsispatienten einhergeht [67]. Auch wenn Sensitivität und Spezifität in dieser Studie nicht optimal sind, könnte dieses Verfahren bei der bekannt hohen Letalität der Sepsis als Auswahlgrundlage für eine Therapiestudie dienen, ohne dass zu hohe NNT zu erwarten wären. Erfahrungen der Vergangenheit legen allerdings für Therapiestrategien, die auf die Immundefunktion zielen, den Schluss nahe, dass nach Ausbruch der Sepsis die Immundysregulation schon so weit fortgeschritten ist, dass eine sinnvolle, zielgerichtete Intervention häufig nicht mehr möglich ist. Deshalb ist die Identifikation von Risikopatienten schon vor Entwicklung klinischer Sepsiszeichen Voraussetzung, um erfolgreich therapieren zu können.

Verschiedene Verfahren zum Immunomonitoring oder zur Risikoprädiktion sind in der Vergangenheit untersucht worden. Keines dieser Verfahren erreicht dabei bisher ein diagnostisches Optimum, was die Entwicklung neuer Strategien rechtfertigt. Der hier vorgestellte Ansatz zur Identifikation von Risikopatienten ist viel versprechend, muss allerdings noch genauer evaluiert werden.

### **5.7 Klinische Relevanz und Aussagekraft der gewonnenen Daten**

Erkrankungen wie Sepsis, Septischer Schock und Schwere Sepsis gehören zu den häufigsten Erkrankungen auf nicht-kardiologischen Intensivstationen. Jährlich sterben Tausende von Menschen und zusätzlich entstehen Kosten in Milliardenhöhe [77,78]. Ersteres allein rechtfertigt den hohen Forschungsaufwand, der auf diesem Gebiet betrieben wird. Zusätzlich kann die Vermeidung von septischen Komplikationen zur Kostenersparnis bei weiter knapper werdenden finanziellen Ressourcen des Gesundheitssystems führen.

In der vorgestellten Studie wurde die Genexpression von insgesamt 40 Patienten, die sich einem chirurgischen Eingriff unterzogen, untersucht. Die durchgeführten Eingriffe waren im Wesentlichen aus dem Bereich der Abdominalchirurgie und die Indikationsstellung erfolgte in den weitestgehendsten Fällen aufgrund einer malignen Erkrankung. Tumorerkrankungen führen häufig zu einer Einschränkung der Immundefunktion [126], daher könnte die Übertragbarkeit der in dieser Studie gewonnenen Daten auf Patienten mit gutartigen Erkrankungen eingeschränkt sein. Andererseits haben andere Autoren im Vergleich von Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen keine Unterschiede in der Sekretion von zahlreichen Zytokinen wie z.B. TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gefunden [49], was für eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auch auf andere Patienten spricht. Davon abgesehen sind maligne Erkrankungen eine der häufigsten Indikationen für größere viszeralkirurgische Operationen, womit die praktische Relevanz der eingeschlossenen Studienpopu-

lation unterstrichen wird. Nicht übertragbar sind die gewonnenen Erkenntnisse hingegen auf Patienten, die sich einem kleineren Routine-Eingriff (z.B. Hernienchirurgie) unterziehen. Da der Einfluss auf das Immunsystem zumindest teilweise vom Ausmaß des operativen Traumas und der Länge der Operation abhängt [112], ist für diese Patienten eine geringere Beeinträchtigung der Immunfunktion und der Genexpression wahrscheinlich. Ohne Zweifel sind größere Eingriffe allerdings auch mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer Sepsis behaftet. Somit stellt eine Einschränkung des angewandten Tests auf Hochrisikopatienten keine Einschränkung für den sinnvollen Einsatz des Verfahrens dar. Eine Routineanwendung an allen Patienten, unabhängig von der Größe des Eingriffes und dem Operationsrisiko würde sich schon aus ökonomischen Gründen nicht empfehlen.

Ein Problem, dem jedes neu zu etablierende Testverfahren zur Identifikation von Gruppen mit bestimmten Merkmalen, unterworfen ist, ist die so genannte Überanpassung des beschriebenen Testverfahrens an den zugrunde liegenden Datensatz (engl. Overfitting). Mit steigender Zahl an Testparametern ist mit einer höheren Anpassung an die Studienpopulation zu rechnen, gleichzeitig verringert sich die Übertragbarkeit auf zukünftig mit dem beschriebenen Testverfahren untersuchte Patientenkollektive [127]. Auf die vorliegende Studie angewandt bedeutet das, dass die hier publizierten Grenzwerte auf die 40 eingeschlossenen Patienten optimiert sind. Um die Aussagekraft der verwendeten Grenzwerte zu bestätigen und verlässliche Werte für Sensitivität und Spezifität zu erhalten, ist eine prospektive Validierung an einer neuen Patientengruppe notwendig. Auch wären ein Vergleich zwischen verschiedenen verarbeitenden Laboren und der Einsatz von verschiedenen Geräten sinnvoll, um die Gültigkeit des Verfahrens zu bestätigen.

Die klinische Anwendbarkeit des angewandten Verfahrens konnte in der Studie gezeigt werden. Für die rt-PCR aus Vollblutproben existieren standardisierte Testkits und Arbeitsanweisungen, so dass auch der Einsatz in verschiedenen Labors zu vergleichbaren Ergebnissen führen sollte. Auch die praktische Handhabbarkeit der Blutröhrchen ist mit der von bereits in der klinischen Routinediagnostik verwendeten Behältnissen vergleichbar. Gleichwohl stellt die in Röhrchen enthaltene Stabilisierungslösung bei Raumtemperatur keinen absoluten Schutz vor RNA-Degradation dar. Im Blut enthaltene RNAsen benötigen keine Koenzyme und sind außerordentlich resistent gegen eine Hemmung. Spezielle Kühlungsmaßnahmen sind deshalb notwendig. Es bietet sich ein eiliger Transport in das verarbeitende Labor und eine Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung an. Unter diesen Bedingungen sollte die RNA-Stabilität gewährleistet sein [128].

Um ein hohes Maß an klinischer Anwendbarkeit zu gewährleisten, beschränkt sich die Studie auf die Analyse von Genexpressionsdaten. Für eine erschöpfende pathophysiologische Bewertung der gewonnenen Daten wäre allerdings die Erhebung weiterer Messparameter notwendig gewesen. So wurden z.B. keine Zytokinplasmaspiegel bestimmt. Die Aktivierung und Inaktivierung zirkulierender Leukozyten ist von der Einwirkung von verschiedenen Botenstoffen abhängig. Über die Höhe von Zytokinpiegeln und ihre Wechselwirkung mit der Genexpression kann aufgrund des Studiendesigns keine Aussage getroffen werden. Darüber hinaus hätte eine Bestimmung der Differentialblutbilder die Interpretation der Ergebnisse sinnvoll ergänzt. Zwar liegen die absoluten Leukozytenzahlen für alle drei Zeitpunkte vollständig vor, nicht jedoch eine Differenzierung nach verschiedenen Zellpopulationen. Da das verwendete Messverfahren auf der relativen Quantifizierung von mRNA beruht, haben relative Änderungen von Leukozytensubpopulationen einen erheblichen Einfluss auf die Messergebnisse. Praktisch ist es deshalb nicht möglich, eine gemessene Reduktion der Transkriptmenge auf eine Verminderung der Transkription pro Zelle zurückzuführen. Vielmehr werden die einzelnen Gene in unterschiedlichen Zellpopulationen unterschiedlich stark oder sogar spezifisch exprimiert. Verringert sich der Anteil dieser Zellpopulation, verringert sich automatisch die relative Menge an mRNA in der Vollblutprobe.

Der hier vorgestellte Test basiert auf dem pathophysiologischen Konzept einer zweizeitigen Sepsisentwicklung. Dabei wird durch die Operation eine Einschränkung der Immunfunktion hervorgerufen, die wiederum in einer sekundär auftretenden Infektion Vorschub leistet. Dabei sind, wie von Roger C. Bone publiziert, auch andere, wenn auch ähnliche Mechanismen vorstellbar [124] (siehe auch Abbildung 32). So entwickelten ein Teil der untersuchten Patienten ein SIRS beziehungsweise eine Sepsis sehr frühzeitig am ersten oder zweiten postoperativen Tag, während andere Patienten erst am 14. postoperativen Tag das klinische Vollbild entwickelten. Die Frage, ob diese Patienten dabei prinzipiell unterschiedliche Expressionsmuster zeigen, muss aufgrund des retrospektiven Studiendesigns allerdings unbeantwortet bleiben.

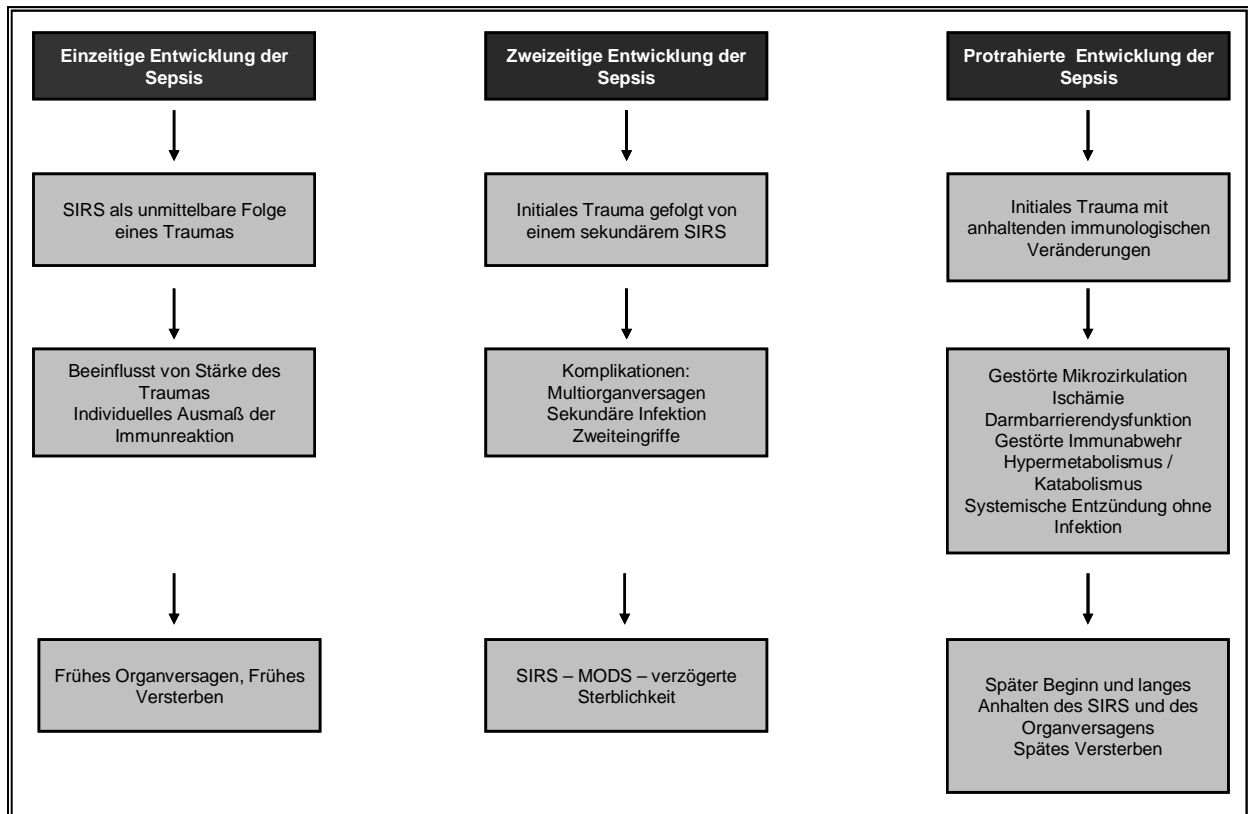


Abbildung 32. Verschiedene Möglichkeiten der SIRS-Entwicklung [124] .

Schließlich erlaubt die Messung der Genexpression keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächlich freigesetzte Proteinmenge. Diese ist auf vielfältige Weise posttranskriptionell reguliert. So können Proteine intrazellulär gespeichert werden und infolge eines externen Stimulus sezerniert werden, ohne dass dieser Stimulus, der z.B. der Kontakt eines Mediators an einem Membranrezeptor sein kann, einen Einfluss auf die Transkriptionsrate des entsprechenden Gens hat.

### 5.8 Zusammenfassung und Ausblick

Die hier vorgestellte Studie untersuchte die perioperative Genexpression von zwei Patientengruppen, die sich eines größeren chirurgischen Eingriffs unterziehen mussten. Dabei entwickelte die eine Gruppe postoperativ eine Sepsis, während die andere Gruppe im Verlauf unkompliziert war. Eingeschlossen waren in jeder Gruppe zwanzig Patienten, die in der überwiegenden Mehrzahl aufgrund einer malignen Erkrankung operiert wurden.

Die Ergebnisse lassen sich unter zwei Gesichtspunkten zusammenfassen. Zum einen kommt es in beiden Patientengruppen postoperativ zu einer signifikanten Veränderung der Expression von entzündungsrelevanten Genen. Dies betraf neben den Chemokinen IL-8, MIP-1a und IP-10



sowie dem antimikrobiellen Protein Calgranulin A insbesondere die T-Zell-Gene und das NK- und NKT-Zellspezifische Perforin. Hier tragen aller Wahrscheinlichkeit nach Verschiebungen in der relativen Zellzahl der Blutproben maßgeblich zur Erklärung der Ergebnisse bei.

Der zweite wichtige Gesichtspunkt beschreibt spezifische Veränderungen, die die beiden Patientengruppen voneinander unterschieden. Hier wurden signifikante Unterschiede im Expressionsverhalten von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MIP-1a, CD3 und Perforin beobachtet. Diese Marker waren postoperativ in der Fallgruppe signifikant geringer exprimiert. Insbesondere für IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  konnte in verschiedenen Studien eine essentielle Rolle in der Abwehr eindringender Mikroorganismen demonstriert werden. Als T-Zellassoziertes Gen kann CD3 einen Hinweis auf die Zahl zirkulierender T-Zellen geben. Für eine effektive Immunantwort auf Krankheitserreger unterstützen und aktivieren sich phagozytierende Zellen wie Makrophagen und Zellen des adaptiven Immunsystems gegenseitig. Somit ist eine Reduktion von Mediatoren sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems ein Hinweis auf eine gestörte Immunfunktion in beiden Armen der Wirtsantwort.

Basierend auf einer retrospektiven Analyse der veränderten Genexpression konnte ein Testverfahren entwickelt werden, welches Risikopatienten mit hoher Sensitivität und Spezifität identifiziert. Die dabei zur Anwendung gekommene rt-PCR ist ein standardisiertes Verfahren, was in der klinischen Praxis in verschiedenen Bereichen bereits eingesetzt wird. Zurzeit gibt es Bestrebungen, die noch hohen Kosten der rt-PCR zu optimieren. So existiert für die Quantifizierung von Virus-RNA in Blutproben standardisierte Techniken, die nur \$12 pro Versuchsansatz kosten [129]. Vorbehaltlich einer prospektiven Validierung der hier vorgestellten Daten könnte das beschriebene Verfahren dazu dienen, früh postoperativ Risikopatienten zu identifizieren und diese gezielter zu überwachen und gegebenenfalls immunmodulatorisch zu behandeln, um damit dem Ausbruch einer Sepsis entgegenzuwirken. Verschiedene immunmodulatorische Verfahren, wie die Stimulation von Monozyten mit GM-CSF oder IFN $\gamma$  stehen dabei zur Verfügung.

Das Studiendesign steht dabei an der Schnittstelle zwischen Hypothesenfindung und Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit. Sowohl um die pathophysiologischen Zusammenhänge genauer aufzuklären als auch um die Anwendbarkeit und Validität zu bestätigen, bedürfte es weiterer Untersuchungen. Auf pathophysiologischer Seite wären Untersuchungen wünschenswert, die das Verhältnis von Leukozyten-Subpopulationen und der mRNA-Menge der jeweiligen Gene zu bestimmen. Hier wäre eine Kombination der rt-PCR mit durchflusszytometrischen Verfahren (FACS) sinnvoll. In diesem Zusammenhang wäre auch der Einfluss und die Kinetik von Zytokin-Plasmaspiegeln auf die Expression bestimmter Gene interessant. Hier wäre zu versuchen, die

Erkenntnisse, die man aus Stimulationsexperimenten an isolierten Blutleukozyten gewonnen hat, auf eine Vollblutprobe zu übertragen. Um die Weiterentwicklung der realtime-PCR in Richtung einer funktionellen Analyse von Blutproben voranzutreiben, wären Referenzgene, die für einzelne Subpopulationen spezifisch sind, hilfreich. Diese Referenzgene müssten dabei konstitutiv in dem jeweiligen Zelltyp exprimiert werden. So könnte das Ausmaß von Effekte, die durch die Verschiebungen im Differentialblutbild entstehen, in der Analyse mit berücksichtigt werden, ohne ein weiteres Verfahren in den Versuchsaufbau einbinden zu müssen.

Zur Validierung in der klinischen Praxis würde sich eine prospektive Überprüfung des angewandten Testverfahrens anbieten. So könnte nicht nur die Basis, das heißt die eingeschlossenen Genexpressionen an einer zweiten Patientenpopulation überprüft werden, sondern man würde auch den Effekt der Überanpassung vermindern und realistischere Werte für Sensitivität und Spezifität bestimmen können. Dabei wäre ein multizentrischer Ansatz zu wählen, um etwaige Unterschiede zwischen verschiedenen Labors festzustellen. Auch könnte eine prospektive Validierung mit einer Einschränkung der Anzahl gemessener Gene einhergehen, um das Problem des multiplen Testens, das dem vorgestellten Studienaufbau zweifellos innewohnt, zu minimieren. Die sichere Identifikation von Risikopatienten mit dem hier vorgestellten Verfahren könnte den Weg freimachen für eine präemptive Therapie von Patienten, die postoperativ von einer Sepsis bedroht sind. Die derzeitige Sepsisforschung steht vor der ungelösten Herausforderung, neue Therapien erfolgreich bei Sepsispatienten einzusetzen. Eine frühzeitige Identifikation von Risikopatienten würde den Beginn einer solchen Therapie ermöglichen, noch ehe die Immundysregulation irreversibel fortgeschritten ist.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Sepsis und assoziierte Erkrankungen wie die Schwere Sepsis und der Septische Schock gehören zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. Besonders Polytraumatisierte und Patienten nach größeren chirurgischen Eingriffen sind von einer Sepsis bedroht. Die Inzidenz von über 200/100 000 Einwohner und Jahr ist dabei deutlich höher als die von Volkskrankheiten wie dem Dickdarm- und dem Bronchialkarzinom [77]. Ein bedeutender Anteil der betroffenen Patienten bedarf einer Intensivtherapie, wodurch erhebliche Kosten für die öffentliche Gesundheitsversorgung entstehen.

Heute wird die Pathophysiologie der Sepsis verstanden als eine Fehlreaktion des Immunsystems, die, ausgelöst durch eindringende Mikroorganismen, zu einem gestörten Gleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Mechanismen führt. Dabei treten Zeichen einer überschießenden Entzündung gleichzeitig mit einer Immundepression auf, wobei letztere ausgeprägt und langanhaltend sein kann. Daraus resultiert eine ineffiziente Erregerabwehr. Dieser Vorgang kann nicht nur durch eindringende Mikroorganismen ausgelöst werden, sondern auch durch sterile Traumata, Verbrennungen oder eine akute Pankreatitis. Neben den beteiligten zellulären Bestandteilen der Wirtsabwehr kommt Botenstoffen wie Zytokinen und Lipidmediatoren eine erhebliche Bedeutung zu. Diese Botenstoffe sind nicht nur für die Wechselwirkung zwischen den Immunzellen verantwortlich, sie sind auch maßgeblich an Organschädigungen, die im Verlauf der Sepsis auftreten, beteiligt.

Trotz des erweiterten Verständnisses pathophysiologischer Vorgänge im Rahmen der Sepsis sind bisherige Ansätze einer immunmodulatorischen Therapie weitgehend erfolglos geblieben. Dies erklärt sich unter anderem durch das Fehlen von standardisierten und validierten Instrumenten, um den aktuellen Immunstatus eines Patienten zu erfassen und den Einsatz immunstimulatorischer oder -suppressiver Therapien zu steuern. In der Vergangenheit wurden verschiedene Verfahren zur Überwachung der Immunfunktion und Risikoeinschätzung von Patienten entwickelt, die sich, bis auf die Quantifizierung der monozytären HLA-DR-Expression (HLA, Human Leukocyte Antigen), in der Klinik allerdings nicht durchsetzen konnten. Die realtime rt-PCR (reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction) stellt eine neue Technik dar, die in verschiedenen klinischen Bereichen wie der Quantifizierung der Viruslast bereits diagnostisch verwendet wird [130]. In der hier vorgestellten retrospektiven Untersuchung an Patienten mit größeren allgemeinchirurgischen Eingriffen wurde die perioperative Expression von 24 immunologisch relevanten Genen untersucht. 20 Patienten entwickelten postoperativ eine Sepsis, während aus der

Gruppe von 209 Patienten mit unkompliziertem Verlauf 20 Kontrollpatienten mit vergleichbarer Anamnese (sog. matched-pairs) ausgewählt wurden.

Postoperativ zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression der Botenstoffe IL-8, MIP1-a und IP-10 in beiden Patientengruppen. Zudem waren auch T-Zell- und NK-Zellspezifische Gene (NK-Zellen, Natürliche Killerzellen) postoperativ geringer exprimiert. Die Gruppe von Patienten mit Sepsis im Verlauf zeigte am ersten postoperativen Tag eine signifikant geringere mRNA-Menge von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und CD3 im Vergleich zu den Kontrollpatienten. Basierend auf der Genexpression und einer logistischen Regression wurde ein klinisches Testverfahren entwickelt, welches Risikopatienten mit einer Spezifität und Sensitivität von 85% identifizierte.

Die gewonnenen Ergebnisse demonstrieren die Bedeutung der postoperativen Immundepression als Risikofaktor für eine Sepsis. Unter Anwendung einer klinisch einfach zu etablierenden Technik konnten Risikopatienten mit hoher Zuverlässigkeit noch vor Auftreten klinischer Symptome identifiziert werden. Damit eröffnet das vorgestellte Verfahren die Möglichkeit, Sepsispatienten präemptiv immunmodulatorisch zu therapieren und damit die hohe Letalität dieser Erkrankung zu senken.

Unter der Bedingung einer prospektiven Validierung der gewonnenen Daten stellt das vorgestellte Verfahren eine aussichtsreiche Erweiterung des bisher bestehenden diagnostischen Spektrums dar.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>APACHE</b>	Acute Physiology and Chronic Health
<b>ARDS</b>	Adult Respiratory Distress Syndrome
<b>ASA</b>	American Society of Anaesthesiologists
<b>CARS</b>	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
<b>CCR3</b>	CC-Motive-Chemokine-Rezeptor 3
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CXCL</b>	CXC –Motive-Chemokine-Ligand
<b>DEPC</b>	Diethyl-Pyrocarbonat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
<b>IFNg</b>	Interferon gamma
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IP-10</b>	Interferon-inducible Peptide 10
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MARS</b>	Mixed Antagonistic Response Syndrome
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MIP-1a, CCL3</b>	Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha
<b>NNT</b>	Number-Needed-to-Treat
<b>NPV</b>	Negativ Prädiktiver Wert
<b>PCT</b>	Procalcitonin
<b>PF4</b>	Platelet Factor 4
<b>PPV</b>	Positiv Prädiktiver Wert
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid

<b>ROC</b>	Receiver-Operating-Characteristic
<b>rt-PCR</b>	Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
<b>S100A8</b>	Calgranulin A (S100 calciumbinding Protein A8)
<b>SAPS</b>	Simplified Acute Physiology
<b>SIRS</b>	Systemic Inflammatory Response
<b>SOFA</b>	Sepsis-related Organ Failure Assessment
<b>TCR</b>	T-Cell-Receptor
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor beta
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor alpha
<b>TNM</b>	Tumor-Node-Metastasis

## REFERENZEN

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-1655
2. Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med* 1997;25:372-374
3. Bone RC. Why sepsis trials fail. *Jama* 1996;276:565-566
4. Dellinger RP, Bone RC. To SIRS with love. *Crit Care Med* 1998;26:178-179
5. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-1256
6. Toft P, Dagnaes-Hansen F, Tonnesen E, Petersen MS. Influence of surgery and endotoxin-induced sepsis combined on natural killer cell activity, oxidative burst of granulocytes and antigen presentation capability of monocytes. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46:405-410
7. Angele MK, Chaudry IH. Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. *Langenbecks Arch Surg* 2005;390:333-341
8. Koller M, Clasbrummel B, Kollig E, Hahn MP, Muhr G. Major injury induces increased production of interleukin-10 in human granulocyte fractions. *Langenbecks Arch Surg* 1998;383:460-465
9. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest* 1991;100:1619-1636
10. Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, et al. A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med* 1984;12:975-977
11. Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998;26:1793-1800

12. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3:678-681
13. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853-859
14. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-469
15. Scott MJ, Godshall CJ, Cheadle WG. Jaks, STATs, Cytokines, and Sepsis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1153-1159
16. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003;31:1560-1567
17. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology*. 6th ed: Garland Science Publishing; 2005
18. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997;112:235-243
19. van der Poll T, van Deventer SJ, Hack CE, et al. Effects on leukocytes after injection of tumor necrosis factor into healthy humans. *Blood* 1992;79:693-698
20. van Deventer SJ, Hart M, van der Poll T, Hack CE, Aarden LA. Endotoxin and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 release in humans. *J Infect Dis* 1993;167:461-454
21. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885-891
22. Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med* 2005;33:S460-462
23. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77:1627-1652
24. Coelho AL, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:553-560
25. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220



26. Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 1992;12:239-247
27. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991;174:1549-1555
28. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765
29. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924
30. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993;151:1224-1234
31. Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, et al. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol* 1988;140:3026-3032
32. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988;334:260-262
33. Tiemessen MM, Kunzmann S, Schmidt-Weber CB, et al. Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *Int Immunol* 2003;15:1495-1504
34. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005;6:353-360
35. Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, et al. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol* 2000;165:7102-7108
36. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988;81:1162-1172

37. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985;229:869-871
38. Müller-Werdan U, Werdan K. Septischer Kreislaufschock und Septische Kardiomyopathie. In: Werdan K, Schuster H-P, Müller-Werdan U eds, *Sepsis und MODS*. 4. Auflage ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005:277-358
39. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005;365:63-78
40. Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, et al. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol* 1997;273:H286-294
41. Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16:289-317
42. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150
43. Levy RM, Prince JM, Billiar TR. Nitric oxide: a clinical primer. *Crit Care Med* 2005;33:S492-495
44. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-1251
45. Emmanuilidis K, Weighardt H, Matevossian E, et al. Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome. *Shock* 2002;18:301-305
46. Payen D, Faivre V, Lukaszewicz AC, Losser MR. Assessment of immunological status in the critically ill. *Minerva Anesthesiol* 2000;66:351-357
47. Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR. 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;177:55-60
48. Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001;32:76-102

49. Hensler T, Hecker H, Heeg K, et al. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 1997;65:2283-2291
50. Ayala A, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH. Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release. *Arch Surg* 1994;129:1172-1178
51. Levy EM, Alharbi SA, Grindlinger G, Black PH. Changes in mitogen responsiveness lymphocyte subsets after traumatic injury: relation to development of sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 1984;32:224-233
52. Heidecke CD, Weighardt H, Hensler T, Bartels H, Holzmann B. [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. *Chirurg* 2000;71:159-165
53. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 1993;80:205-209
54. Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, et al. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock* 2005;24 Suppl 1:1-6
55. Schultz MJ, van der Poll T. Animal and human models for sepsis. *Ann Med* 2002;34:573-581
56. Clark MA, Plank LD, Connolly AB, et al. Effect of a chimeric antibody to tumor necrosis factor-alpha on cytokine and physiologic responses in patients with severe sepsis--a randomized, clinical trial. *Crit Care Med* 1998;26:1650-1659
57. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, et al. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 2001;29:765-769
58. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 2001;29:S121-125

59. Christou NV, Tellado-Rodriguez J, Chartrand L, et al. Estimating mortality risk in preoperative patients using immunologic, nutritional, and acute-phase response variables. *Ann Surg* 1989;210:69-77
60. Martin C, Saux P, Mege JL, et al. Prognostic values of serum cytokines in septic shock. *Intensive Care Med* 1994;20:272-277
61. Vermont CL, Hazelzet JA, de Kleijn ED, van den Dobbelen GP, Groot RD. CC and CXC chemokine levels in children with meningococcal sepsis accurately predict mortality and disease severity. *Crit Care* 2006;10:R33
62. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005;51:2341-2347
63. Abe R, Hirasawa H, Oda S, et al. Up-Regulation of Interleukin-10 mRNA Expression in Peripheral Leukocytes Predicts Poor Outcome and Diminished Human Leukocyte Antigen-DR Expression on Monocytes in Septic Patients. *J Surg Res* 2007
64. Haveman JW, van den Berg AP, van den Berk JM, et al. Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis* 1999;1:146-152
65. Oczenski W, Krenn H, Jilch R, et al. HLA-DR as a marker for increased risk for systemic inflammation and septic complications after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2003;29:1253-1257
66. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC, Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg* 1990;77:204-207
67. Patel RT, Deen KI, Youngs D, Warwick J, Keighley MR. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *Br J Surg* 1994;81:1306-1308
68. Mokart D, Merlin M, Sannini A, et al. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Anaesth* 2005;94:767-773

69. Weighardt H, Heidecke CD, Westerholt A, et al. Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann Surg* 2002;235:560-567
70. Novotny AR, Emmanuel K, Ulm K, et al. Blood interleukin 12 as preoperative predictor of fatal postoperative sepsis after neoadjuvant radiochemotherapy. *Br J Surg* 2006;93:1283-1289
71. Prucha M, Ruryk A, Boriss H, et al. Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics. *Shock* 2004;22:29-33
72. Pachot A, Monneret G, Voirin N, et al. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin Immunol* 2005;114:61-69
73. Jardi R, Rodriguez F, Buti M, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *J Viral Hepat* 2001;8:465-471
74. Perrin L, Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, et al. Multicenter performance evaluation of a new TaqMan PCR assay for monitoring human immunodeficiency virus RNA load. *J Clin Microbiol* 2006;44:4371-4375
75. Wada K, Kubota N, Ito Y, et al. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2007;45:1426-1432
76. Borgermann J, Friedrich I, Scheubel R, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) restores decreased monocyte HLA-DR expression after cardiopulmonary bypass. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 2007;55:24-31
77. Brunkhorst FM. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006;41:43-44
78. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310

79. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama* 1995;274:968-974
80. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30:580-588
81. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998;26:2078-2086
82. Cheadle WG, Mercer-Jones M, Heinzelmann M, Polk HC, Jr. Sepsis and septic complications in the surgical patient: who is at risk? *Shock* 1996;6 Suppl 1:S6-9
83. Preanalytix G. Paxgene Blood RNA Kit Handbook; 2005
84. QIAGEN. Quantitect Reverse Transcription Handbook; 2005
85. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350
86. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006
87. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 2001;25:402-408
88. NCBI Entrez Nucleotide. In: National Center for Biotechnology Information
89. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 1993;218:769-776
90. Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1622-1631
91. Kremer JP, Jarrar D, Steckholzer U, Ertel W. Interleukin-1, -6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  release is down-regulated in whole blood from septic patients. *Acta Haematol* 1996;95:268-273

92. Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 1992;79:757-760
93. Mettler L, Salmassi A, Heyer M, et al. Perioperative levels of interleukin-1beta and interleukin-6 in women with breast cancer. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004;31:20-22
94. Baker EA, El-Gaddal S, Williams L, Leaper DJ. Profiles of inflammatory cytokines following colorectal surgery: relationship with wound healing and outcome. *Wound Repair Regen* 2006;14:566-572
95. Hildebrand F, Pape HC, Krettek C. [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Unfallchirurg* 2005;108:793-794, 796-803
96. Schindler R, Mancilla J, Endres S, et al. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990;75:40-47
97. Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, et al. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994;150:710-716
98. Frohlich D, Eiber RM, Jochum M, Billing A. Perioperative pattern of peritoneal interleukin 8, tumour necrosis factor-alpha, and granulocyte elastase release in human secondary peritonitis. *Cytokine* 1997;9:288-292
99. Sakamoto K, Arakawa H, Mita S, et al. Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level. *Cytokine* 1994;6:181-186
100. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117:1162-1172
101. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88-91
102. Grobmyer SR, Lin E, Lowry SF, et al. Elevation of IL-18 in human sepsis. *J Clin Immunol* 2000;20:212-215
103. Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, et al. Interleukin-18 restores immune suppression in patients with nonseptic surgery, but not with sepsis. *Am J Surg* 2007;193:676-680

104. Tschoeke SK, Oberholzer A, Moldawer LL. Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis. *Crit Care Med* 2006;34:1225-1233
105. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001;345:1098-1104
106. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993;364:798-802
107. Strohmeyer JC, Blume C, Meisel C, et al. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2003;53:54-62
108. Asadullah K, Woiciechowsky C, Docke WD, et al. Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med* 1995;23:1976-1983
109. Venet F, Bohe J, Debard AL, et al. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med* 2005;33:2836-2840
110. Lindsey WB, Lowdell MW, Marti GE, et al. CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery. *Cytotherapy* 2007;9:123-132
111. Ferguson NR, Galley HF, Webster NR. T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 1999;25:106-109
112. Cullen BF, van Belle G. Lymphocyte transformation and changes in leukocyte count: effects of anesthesia and operation. *Anesthesiology* 1975;43:563-569
113. Prass K, Meisel C, Hoflich C, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 2003;198:725-736
114. Haeusler KG, Schmidt WU, Fohring F, et al. Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovasc Dis* 2008;25:50-58



115. Page GG. Surgery-induced immunosuppression and postoperative pain management. *AACN Clin Issues* 2005;16:302-309; quiz 416-308
116. Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, et al. NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy. *Br J Cancer* 2007;97:105-111
117. Albadawi H, Patton GM, Bratton CF, Peterson BG, Watkins MT. Human microvascular endothelial synthesis of interleukin-8 during in vitro ischemia and reperfusion. *J Cell Biochem* 2007;100:412-420
118. Leonard EJ, Yoshimura T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:479-486
119. Strohmeier JC. Gestörte Homöostase von Inflammation und Antiinflammation bei Risikopatienten nach Herzchirurgie – standardisiertes Immunmonitoring zur Prädiktion infektiöser Komplikationen. In, Institut für Medizinische Immunologie, Campus Charité Mitte. Berlin: Charité Universitätsmedizin; 2006
120. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, et al. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:133-144
121. Soslau G, Morgan DA, Jaffe JS, Brodsky I, Wang Y. Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function. *Cytokine* 1997;9:405-411
122. Kelly SE, Jones DB, Fleming S. Calgranulin expression in inflammatory dermatoses. *J Pathol* 1989;159:17-21
123. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990;336:763-765
124. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996;24:163-172

125. Xu K, Geczy CL. IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. *J Immunol* 2000;164:4916-4923
126. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:1137-1146
127. Berthold MR, Hand DJ. *Intelligent Data Analysis*. Berlin: Springer; 2003
128. Chai V, Vassilakos A, Lee Y, Wright JA, Young AH. Optimization of the PAXgene blood RNA extraction system for gene expression analysis of clinical samples. *Journal of clinical laboratory analysis* 2005;19:182-188
129. Rouet F, Ekouevi DK, Chaix ML, et al. Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. *J Clin Microbiol* 2005;43:2709-2717
130. Katzenstein TL. Molecular biological assessment methods and understanding the course of the HIV infection. *APMIS Suppl* 2003:1-37

## **LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der Online-Version nicht veröffentlicht.

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre unschätzbare Hilfe an dem Gelingen dieser Arbeit Anteil haben.

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Hans-Dieter Volk für die großartige Unterstützung und Betreuung bei der Verwirklichung der Arbeit. Meiner Arbeitsgruppenleiterin, Frau Dr. Katja Kotsch danke ich in gleichem Maße für ihre Hilfe. Der Arbeitsgruppe von Frau Kotsch sowie allen Kollegen im Institut für Medizinische Immunologie möchte ich für die ausgesprochen kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Hier möchte ich insbesondere Herrn Dr. Farzin Mashreghi erwähnen, der mir jederzeit mit fachlichem Rat zur Seite gestanden hat. Herrn PD Dr. Didier Keh aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Campus Virchow-Klinikum sowie den von ihm betreuten Doktoranden danke ich für die zur Verfügung Stellung der Blutproben, der klinischen Daten der Patienten sowie für wertvolle konstruktive Unterstützung bei den aus dieser Arbeit hervorgegangenen Publikationen.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken, da sie mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern mir jederzeit mit Unterstützung und Rat zur Seite standen.

## **ERKLÄRUNG**

„Ich, Carl Hinrichs, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Postoperative Immunsuppression und Sepsis: Risikoprädiktion anhand der Expression immunologisch relevanter Gene“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Carl Hinrichs