

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

DISSERTATION

**Perioperative Genexpression von CD 94 (KLRD1), NKG2D und
Granulysin zytotoxischer Lymphozyten als prädiktive Marker einer
postoperativen Sepsis**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nicole Saak

aus Lemgo

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. D.Keh
2. Prof. Dr. rer. nat. M. Schneider
3. Prof. Dr. med. N. Riedermann

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	5
1.1 Definition der Sepsis.....	5
1.2 Sepsismodelle.....	7
1.3 Die Entzündungskaskade und Pathophysiologie der Sepsis.....	9
1.3.1 Die Konfrontation des Immunsystems mit Antigenen.....	10
1.3.2 Die Aktivierung mononukleärer Zellen.....	10
1.3.3 Die anti-inflammatorische Gegenantwort.....	11
1.4 Die perioperative Stressreaktion.....	12
1.4.1 Zytokinausschüttung im Rahmen der Akute-Phase-Response.....	13
1.4.2 Endotheliale Dysfunktion.....	14
1.4.3 Antiinflammatorische Gegenregulation und Immunsuppression.....	15
1.5 Die Rolle der zellvermittelten Immunantwort in der Sepsis.....	17
1.5.1 Die Regulation der NK-Zellaktivität.....	17
1.5.2 KLRD1 als Komponente der CD94/NKG2-Rezeptorfamilie.....	18
1.5.3 Die Aktivierung von NK-Zellen durch NKG2D.....	19
1.5.4 Die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen	20
1.6 Prädiktion einer Sepsis	21
1.6.1 Bestimmung von Zytokinplasmaspiegeln.....	22
1.6.2 Quantifizierung der HLA-DR-Expression auf Makrophagen.....	23
1.6.3 Genpolymorphismenanalyse.....	23
1.6.4 Funktionale Genomanalysen.....	23
1.6.5 Genexpressionsanalyse mit Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	25
1.7 Fragestellung der Arbeit.....	25
2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Ablauf der klinischen Studie.....	27
2.1.1 Einschluß von Patienten.....	27
2.1.2 Blutentnahmen.....	27
2.1.3 Datenerfassung.....	27
2.2 Genexpressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.2.1 RNA-Präparation und Synthese der cDNA, Primer und fluorogenen Proben.....	29
2.2.2 Identifizierung von Kandidatengenen.....	30

2.2.3 Real time Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.2.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.2.3.3 Quantifizierung mittels Real-time-PCR.....	32
2.2.4 Relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	34
2.3 Statistische Auswertung.....	34
3 ERGEBNISSE.....	35
3.1 Patientendaten.....	35
3.2 Genexpressionsanalyse der Transkripte NKG2D, KLRD1 und Granulysin	40
4 DISKUSSION.....	45
4.1 Prädiktion mittels rt-PCR.....	45
4.2 Genexpression von NKG2D.....	46
4.3 Genexpression von KLRD1.....	47
4.4 Genexpression von Granulysin.....	49
4.5 Risikostratifizierung bei präsymptomatischen Patienten.....	50
4.6 Klinische Relevanz der vorgestellten Studie und Ausblick.....	53
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	56
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	58
LITERATURVERZEICHNIS.....	62
LEBENS LAUF.....	70
DANKSAGUNG.....	71
ERKLÄRUNG	72

1 EINLEITUNG

Trotz größter intensivmedizinischer Bemühungen und erheblichem Forschungsaufwand stellen Sepsis beziehungsweise schwere Sepsis und septischer Schock eine große Herausforderung für die Intensivmedizin dar. Auch als Folge größerer chirurgischer Eingriffe, hervorgehend aus einer nosokomialen Pneumonie oder postoperativen bakteriellen Peritonitis, ist sie eine schwer beherrschbare Komplikation. Dabei werden Häufigkeit und Sterblichkeit erheblich unterschätzt, und ein weltweiter Trend zeichnet sich dahingehend ab, daß die Inzidenz steigt. In den letzten Jahrzehnten ist es auch nicht gelungen, die hohe Mortalität von bis zu 50% deutlich zu senken, was auch darauf zurückzuführen ist, daß die Pathophysiologie der Sepsis noch nicht ausreichend geklärt werden konnte.

Einer aktuellen Prävalenzstudie (1) zufolge erkranken pro Jahr in Deutschland schätzungsweise 79000 Einwohner an einer Sepsis und 75000 an einer schweren Sepsis oder septischem Schock, das entspricht einer Inzidenz von 100 bzw. 116/100 000. Auch entstehen erhebliche Kosten, die einen Großteil des Budgets für Intensivmedizin ausmachen. Dieser Hintergrund macht deutlich, daß die Erforschung prädisponierender Faktoren sowie der pathophysiologischen Prozesse eines septischen Geschehens einen hohen Stellenwert hat.

Im Folgenden werden zunächst die Definitionen und Diagnosekriterien vorgestellt und der aktuelle Kenntnisstand zu Pathophysiologie der Sepsis und perioperativer Stressreaktion zusammengefasst. Anschließend sollen die bisherigen Ansätze, das Entstehen einer Sepsis frühzeitig abzuschätzen und Risikopatienten herauszufiltern, erläutert werden. Diese Arbeit behandelt die Fragestellung, ob mittels Genexpressionsanalyse typischer Transkripte zytotoxischer Zellen perioperativ eine solche Risikostratifizierung erfolgen kann.

1.1 Definition der Sepsis

Die noch heute gültige Definition geht auf eine Konsensuskonferenz aus dem Jahr 1991 zurück, deren Ziel es war, einheitliche Bezeichnungen und objektive, vergleichbare Kriterien des Krankheitsbildes zu definieren (2). Mit steigender Schwere des klinischen Bildes spricht man von Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock (Tabelle 1), Begriffe wie den der Septikämie oder des septischen Syndroms wurden aufgegeben. Im einzelnen wurden diese Begriffe folgendermaßen definiert:

Tabelle 1: Diagnosekriterien der Sepsis (2),(3)

SIRS (systemische Entzündungsreaktion)	<p>mindestens 2 der folgenden Befunde:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C ● Herzfrequenz > 90/min ● Atemfrequenz > 20/min oder PaCO₂ < 32mmHg ● Leukozyten > 12000/μl oder < 4000/μl oder > 10% unreife Granulozyten
Sepsis	SIRS mit nachgewiesener Infektion
Schwere Sepsis	<p>Sepsis mit Zeichen der Organdysfunktion/-hypoperfusion oder Hypotension</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Hypotension mit SBP < 90 mmHg, MAP < 70mmHg oder Abfall > 40mmHg ● Oligurie und/oder Kreatinin > 2,0 mg/dl ● Thrombozytopenie < 100000/μl ● metabolische Azidose pH < 7,3 oder BE > 5 mmol/L oder Laktat > 2mmol/L ● arterielle Hypoxämie PaO₂/FiO₂ < 300 ● Hyperbilirubinämie > 2,0 mg/dl ● Gerinnungsstörung INR > 1,5 oder aPTT > 60 sec
Septischer Schock	persistierende Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution mit Organdysfunktionen

Als Sepsis bezeichnet man demnach eine durch eine Infektion hervorgerufene systemische inflammatorische Reaktion (systemic inflammatory response syndrome = SIRS).

SIRS bezeichnet eine mediatorvermittelte exzessive Entzündungsreaktion des Körpers, die nicht nur durch eine Infektion hervorgerufen werden kann, sondern beispielsweise auch durch schweres Trauma, Verbrennungen oder Hämorrhagie. Diese rein klinischen Kriterien zur Definition des SIRS sind allerdings sehr unspezifisch und erfassen die auf Zytokine gestützte Entzündungsantwort in ihrem Wesen nicht. Daher ist eine ausgedehntere Liste von Zeichen und Symptomen der Sepsis entwickelt worden. Auch geht das Bestreben dahin, SIRS zukünftig durch rein immunologische Marker wie beispielsweise Serumspiegel von Zytokinen oder Akute-Phase-Proteinen (CRP) definieren zu können (3), oder durch Betrachtung des Genoms.

Eine persistierende Immunimbalance ist ein wichtiger Pathomechanismus für Organdysfunktionen, Hypoperfusion und Hypotonie. Das Auftreten eines dieser Merkmale in Assoziation mit einer Sepsis wird als schwere Sepsis bezeichnet.

Ein septischer Schock schließlich bezeichnet ein Kreislaufversagen mit persistierender arterieller Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution. Dazu kommen häufig schwere Organdysfunktionen bis zum multiplen Organversagen (MOF).

1.2 Sepsismodelle

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“

Dies ist die klassische Definition nach Schottmüller (4) aus dem Jahr 1914. Hier wird davon ausgegangen, daß die Symptome bei generalisierter Entzündung durch die Bakterien in der Blutbahn hervorgerufen werden. Nachfolgende Konzepte haben sich vermehrt auf die körpereigene Immunantwort konzentriert, und in einer überschießenden, nicht mehr lokal begrenzten Mediatorausschüttung die eigentliche Gefährdung gesehen. Nach einer Definition von Schuster und Müller-Werdan ist

„Sepsis (...) die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ (5).

Ein neueres Modell der Sepsis ist das sogenannte PIRO-Konzept (6). Die Deskriptoren dieses Systems sind die Prädisposition, der primäre Insult, hier also die Infektion, das Ausmaß der Wirtsantwort (host response) und das der Organdysfunktion (Tabelle 2). Dieses Modell berücksichtigt nicht nur die Erkenntnis, daß auch das Ausmaß der körpereigenen Immunantwort einen eigenständigen Krankheitswert erlangen kann, sondern berücksichtigt auch die individuelle Disposition.

In letzter Zeit gilt das wissenschaftliche Interesse zunehmend der Immunsuppression, die bei Vorliegen einer Sepsis ebenfalls beobachtet werden kann. Diese wurde zunächst ausschließlich als Folge der vorangegangenen Hyperinflammation gesehen, daher die Bezeichnung CARS (compensatory antiinflammatory response syndrome) (7). Es kann aber auch, wie beispielsweise nach operativem Trauma, eine initiale Immunsuppression vorliegen, oder Hyperinflammation und Immunsuppression können auch in verschiedenen Kompartimenten zeitgleich vorliegen.

Tabelle 2: PIRO-System (3),(6)

Bereich	gegenwärtiger Stand	eventuell in Zukunft	Rationale
Prädisposition	Prämorbidität mit verringerter Überlebenswahrscheinlichkeit, ethnische Faktoren, Religion, Alter, Geschlecht	genetische Polymorphismen bei Komponenten der Entzündungsantwort (z.B. Toll-like receptor, TNF, IL 1, CD 14), verbessertes Verständnis der Interaktion zwischen Pathogen und Wirtsantwort	Einfluss dieser Faktoren auf Morbidität und Mortalität
Infektion	Kultur, Sensitivität der Keime, Detektion des Infektionsherdes	Assays von mikrobiellen Produkten (LPS, bakterielle DNA), Gen-Transkript- Profile	bessere Charakterisierung ermöglicht spezifische Therapie
Response	SIRS, andere Zeichen der Sepsis, Schock, CRP	Inflammation: PCT, IL-6, verschlechterte Wirstantwort: z.B. HLA-DR, Therapieziele: Protein C, TNF, PAF etc.	Mortalität und Responsivität auf eine Therapie hängen von der Schwere der Erkrankung ab, Präsenz und Aktivität von Mediatoren für eine spezifische gezielte Therapie
Organdysfunktion	Anzahl der Organversagen, Scores: MODS, LODS, SOFA, SAPS	Messung der zellulären Antwort auf Insult: Apoptose, zytopathische Hypoxie, zellulärer Stress	Abwägung präventiver/therapeutischer Maßnahmen, spezifische Therapien gestörter zellulärer Prozesse

Bone prägte den Begriff der immunologischen Dissonanz (8). Nach diesem Konzept dient eine kompensatorische antiinflammatorische Antwort zunächst der Regulation der Wirtsantwort, kann aber wie die Hyperinflammation auch überschießen und eigenen Krankheitswert erhalten. Diese beiden Extreme können gegenseitig verstärkend wirken und zunehmend destruktive Folgen haben (destructive immunologic dissonance). Einher mit diesem Konzept geht die Vorstellung der Kompartimentalisierung des septischen Geschehens.

1.3 Die Entzündungskaskade und Pathophysiologie der Sepsis

Eine Sepsis stellt ein komplexes klinisches Syndrom dar, bei dem mehr noch als die ursprüngliche Infektion eine überschiessende Aktivierung der körpereigenen Immunabwehr den eigentlichen Schaden hervorruft. Diese sogenannte Entzündungsreaktion ist ein sich selbst verstärkendes kaskadenförmig ablaufendes Geschehen, das durch Entzündungsmediatoren, die Zytokine, vermittelt wird. Es kommt zu einem komplexen Zusammenwirken von Komplement- und Kininsystem, Gerinnung und Fibrinolyse und der Aktivierung immunkompetenter Zellen (9).

In einem gesunden Organismus besteht ein komplexes Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen, die die Entzündungsreaktion regulieren und eine exzessive Aktivierung der Immunantwort verhindern (10).

Bleibt das entzündliche Geschehen lokalisiert, ist die Immunreaktion für den Gesamtorganismus vorteilhaft. Mediatorvermittelt führen Vasodilatation, gesteigerter Blutfluss und erhöhte Kapillarpermeabilität am Ort der Entzündung zu den bekannten Symptomen Rubor, Calor, Dolor und Tumor sowie zu einem Überangebot an Sauerstoff. Die sezernierten Zytokine und Chemokine bewirken eine verstärkte Einwanderung immunkompetenter Zellen, sodass Pathogene im Gewebe besser bekämpft werden können.

Ist die Wirtsantwort dysreguliert und kommt es zu einer systemischen Inflammation, erweisen sich diese protektiven Mechanismen für den Körper als schädlich. Systemisch freigesetzt bewirken proinflammatorische Zytokine generalisierte Vasodilatation und Erhöhung der Kapillarpermeabilität mit konsekutivem intravasalen Volumenmangel, Hypotonie und Schock (11). Dazu kann es durch eine disseminierte intravasale Gerinnung zu einer generalisierten Mikrozirkulationsstörung kommen und in Folge dessen zur Minderperfusion lebenswichtiger Organe bis hin zum Multiorganversagen. Als Schlüsselmolekül am Anfang dieser Kaskade wurde vor allem TNF α Ziel zahlreicher Interventionsstudien zur Senkung der Sepsismortalität (12),(13), wobei die Blockade einzelner Mediatoren bisher immer erfolglos geblieben ist. Allerdings hat sich die lange Zeit vorherrschende Vorstellung, daß Patienten im „Zytokinsturm“ eines entfesselten Immunsystems versterben, als zu vereinfacht herausgestellt. Hier sind Einsichten aus experimentellen Tierstudien irrtümlicherweise auf Menschen übertragen worden (14).

Im Folgenden soll nun lediglich ein kurzer Abriss zum gegenwärtigen Kenntnisstand der Pathophysiologie erfolgen.

1.3.1 Die Konfrontation des Immunsystems mit Antigenen

Die Aktivierung von Antigenpräsentierenden Zellen durch mikrobielle Komponenten stellt den initialen Schritt bei der Entwicklung eines septischen Geschehens dar. Ortsständige Makrophagen und Granulozyten verfügen über ein evolutionär gesehen sehr altes Repertoire an Rezeptoren, die konstante molekulare Muster mikrobieller Pathogene, sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), erkennen (15). Wie dabei zwischen pathogenen und kommensalen Mikroorganismen unterschieden wird, ist unklar.

Beispiele bakterieller PAMPs sind u.a. das Endotoxin (LPS) gram-negativer Bakterien oder Peptidoglykan und Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien (16). Die Erkennung solcher Strukturen erfolgt durch TLRs (toll-like receptor), Liganden-spezifische Rezeptoren, von denen bisher zehn identifiziert werden konnten. TLR4 beispielsweise fungiert als LPS-Rezeptor, andere binden gram-positive Zellwandstrukturen (TLR2), Elemente bakterieller DNA (TLR9) oder Proteine von Pilzen und Hefen. Auch eine Vielzahl anderer Signalmoleküle des Wirtsorganismus wie TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells), MDL-1 (myeloid DAP12-associating lectin) oder die NOD-Gruppe sind bei der Aktivierung der Makrophagen involviert (17). Diese Komplexität der Signaltransduktion, weiter noch kompliziert durch Polymorphismen der verschiedenen Komponenten, ist eine der vielen Erklärungsansätze für die enorme Variabilität der individuellen Wirtsantworten auf Infektionen.

1.3.2 Die Aktivierung mononukleärer Zellen

Zentrales Element der nun folgenden Immunantwort ist die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren durch Makrophagen, darunter die klassischen proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α , sowie deren Gegenspieler IL-10 (18). Diese werden bereits 30-90 Minuten nach einer Endotoxinexposition ausgeschüttet und stellen die prototypischen Zytokine des frühen septischen Schocks dar, zu einem Zeitpunkt, zu dem die Patienten zumeist noch nicht klinisch auffällig wurden. Durch diesen Umstand lässt sich eventuell auch das Scheitern der Versuche, IL-1 und TNF α selektiv zu blocken, und damit die Mortalität der Sepsis zu senken, erklären (19), da dies wahrscheinlich schlichtweg zu spät im septischen Geschehen erfolgte.

Es kommt durch die Vielzahl der Makrophagenprodukte (Tabelle 3) zur parallelen Aktivierung neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten, des Endothels und der intravasalen

Gerinnung. Diese Komponenten interagieren in komplexer Weise miteinander und führen schließlich durch Koagulopathie, Vasodilatation und Kapillarleck zur Gewebehypoperfusion und -hypoxie mit konsekutivem Multiorganversagen.

Wie entscheidend das Ausmaß der Gewebehypoxie für das Outcome ist, zeigt der Ansatz der “early goal-directed therapy” (20), bei der bereits in frühen Stadien der Sepsis eine aggressive Volumentherapie einschliesslich Bluttransfusionen und der frühe Einsatz inotroper Substanzen die Gewebepfusion optimieren .

Tabelle 3: Makrophagenprodukte (18),(9)

Zytokine	IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF α , MIF, IL-10	<ul style="list-style-type: none"> ● Aktivierung von Neutrophilen, Lymphozyten und Endothel ● Induktion NO-Synthasen, Prostaglandine, Akute-Phase-Proteine, zelluläre Adhäsionsmoleküle ● IL-10: Gegenregulation
Chemokine	IL-8, MIP, MCP	<ul style="list-style-type: none"> ● Aktivierung der Leukotaxis
Lipid-Mediatoren	PAF, Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane, tissue factor	<ul style="list-style-type: none"> ● Aktivierung des Gefäßendothels, der extrinsischen Gerinnungskaskade ● Regulation des Gefäßtonus
O₂-Radikale	NO, Superoxid- und Hydroxyl-Radikale	<ul style="list-style-type: none"> ● Antimikrobiell ● Regulation des Gefäßtonus ● NO: O₂-Verwertungsstörung in den Mitochondrien

1.3.3 Die anti-inflammatorische Gegenantwort

Die körpereigene Gegenregulation umschließt Moleküle wie lösliche TNF-Rezeptoren (sTNF-receptor) und IL-1 receptor antagonist, IL-1-Rezeptor Typ II, die Hemmung der Komplementkaskade und die verstärkte Produktion von Cortisol und Katecholaminen (18), (9), (21). Letztere stellt eine tiefgreifende Veränderung der metabolischen Aktivität des Organismus dar.

Ein anderer wichtiger Aspekt ist die Lymphozytenapoptose. Diese konnte vor allem in Tiermodellen nachgewiesen werden, aber auch in gewissem Umfang bei septischen Patienten auf Intensivstationen. Sepsische Patienten sind häufig lymphopen, wohingegen bei Patienten mit SIRS ohne Sepsis häufig keine Lymphozytenapoptose nachgewiesen werden kann (22). Dies

betrifft insbesondere B- Lymphozyten und T-Helfer- Zellen (CD4+), dazu kommt es zu einer generellen Lymphozytenanergie (23). Diese Form der Immunparalyse wird von vielen Autoren nicht nur als Gegenregulation gewertet, sondern wird auch im Fall einer überschüssenden Lymphozytendysfunktion als Gefährdung gesehen. So gingen therapeutische Bestrebungen dahin, diesen immunsuppressiven Zustand umzukehren, konnten sich aber mangels Evidenz nicht durchsetzen (24). Mit herkömmlichem Monitoring lässt sich klinisch nicht unterscheiden, ob sich ein septischer Patient in einer generalisierten Inflammation oder Immunsuppression befindet, oder ob Hyperinflammation und Anergie parallel vorliegen.

1.4 Die perioperative Stressreaktion

Eine protektive Immunität beruht auf einem funktionierenden Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen und einer gut abgestimmten Interaktion zwischen Makrophagen und T-Zellen. Große chirurgische Eingriffe führen häufig zu einer Dysfunktion des Immunsystems, in der die Balance zwischen Hyperinflammation und Immunsuppression gestört ist.

Die Reaktion auf Trauma ist ein dynamischer Prozess, der nach spezifischen Mustern abläuft. Fast regelhaft kommt es zunächst zu einem postoperativen SIRS, eine initiale proinflammatorische Immunantwort, die hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems hervorgerufen wird. Gefolgt wird dies von einer kompensatorischen antiinflammatorischen Immunantwort – CARS (compensatory antiinflammatory response syndrome). Dies wird hauptsächlich von den Zellen der adaptativen Immunantwort vermittelt. Je nach Schwere dieser Gegenreaktion prädisponiert sie den Wirtsorganismus zu septischen Komplikationen (8). Wie bei einem primär septischen Geschehen auch gibt es hier eine große Variabilität der individuellen Reaktion; bei besonders empfänglichen Individuen kann sich ein septischer Schock mit Multiorganversagen herausbilden.

Komplizierend kommt hinzu, daß Hyperinflammation und Immunparalyse auch zeitgleich bestehen können, sodaß sich der konkrete Immunstatus klinisch oft nicht genau bestimmen lässt. So kann beispielsweise eine Immunsuppression auch dann vorliegen, wenn kritisch kranke Patienten hohe Plasmaspiegel proinflammatorischer Zytokine aufweisen. Ein neueres Konzept der “Kompartimentalisierung” der Immunantwort (8) geht davon aus, daß eine lokale Hyperinflammation am Ort des Traumas bzw. Entzündung, die notwendig ist, um

Fremdantigene zu eliminieren und die Wundheilung anzuregen, von einer systemischen Immunsuppression begleitet wird, um die Entzündungsreaktion einzugrenzen.

Therapeutische Ansätze der letzten Jahre gingen daher dahin, das Immunsystem beispielsweise durch Pentoxifyllin (25) oder eine immunmodulierende postoperative enterale und/oder parenterale Ernährung (26),(27) zu unterstützen, beziehungsweise eine Immunparalyse beim septischen Schock mittels rekombinantem GM-CSF (28),(29), IFN γ (30),(31),(32) gezielt zu behandeln.

1.4.1 Zytokinausschüttung im Rahmen der Akute-Phase-Response

Im Rahmen einer physiologischen Akute-Phase-Reaktion fungieren Zytokine als Immunmediatoren, die die Zellen des Immunsystems an die Stelle des Traumas lotsen. Diese Aktivierung ist essentiell für die Wundheilung und für den Schutz vor einer Keimeinschleppung und schädigt den Körper nur dann, wenn dies ein gewisses Maß übersteigt.

Die Produktion proinflammatorischer Zytokine beginnt bereits intraoperativ durch aktivierte Makrophagen und Monozyten im Bereich des Operationsgebietes. Schlüsselzytokine sind hierbei TNF α und IL-1 β , die im Hypothalamus die klassischen Entzündungszeichen Fieber und Tachykardie hervorrufen (33), auch die sogenannte nicht-hepatische Akute-Phase-Reaktion. TNF α und IL-1 β induzieren wiederum die Synthese weiterer Zytokine, darunter IL-4, IL-6, IL-10, PGE2 etc. Insbesondere IL-6 nimmt eine wichtige Rolle ein und initiiert die sogenannte hepatische Phase, die Synthese der Akute-Phase-Proteine in der Leber.

Diagnostisch wichtigste Akute-Phase-Proteine sind C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT). Erhöhte CRP-Plasmaspiegel finden sich regelhaft nach großen chirurgischen Eingriffen und erreichen ihr Maximum nach 24-72 Stunden postoperativ, um anschließend für weitere zwei Wochen erhöht zu bleiben (34). IL-6- und CRP-Spiegel scheinen postoperativ zu korrelieren. Postoperative IL-6-Spiegel scheinen auch mit der Schwere des operativen Traumas zu korrelieren, dies ist auch konsistent mit der Tatsache, daß die IL-6-Spiegel nach laparoskopischen Eingriffen signifikant niedriger sind (35). IL-6 bewirkt auch zahlreiche Effekte außerhalb der Leber; so stimuliert es auch die Proliferation von Vorläuferzellen polymorphkerniger Granulozyten im Knochenmark sowie weiterer Akute-Phase-Proteine wie Fibrinogen und Antiproteinasen.

1.4.2 Endotheliale Dysfunktion

Ein wichtiger Faktor für postoperative mikrozirkulatorische Störungen ist ein ausgeprägter intraoperativer Blutverlust, der mittels Stimulation des sympathischen Nervensystems zu einer Vasokonstriktion vor allem der Arteriolen und Venolen führt. Der so durch die Verlangsamung des kapillaren Blutflusses erhöhte hydrostatische Druck erhöht die Permeabilität der Kapillaren. Auch die Strategie der intraoperativen Volumensubstitution hat einen Einfluß auf die Mikrozirkulation (36).

Dies kann zusammen mit proinflammatorischen Zytokinen und einer gesteigerten NO-Synthese (37) bei lokalem NO-Mangel zu einer schwerwiegenden Störung der endothelialen Integrität führen, die in einem sogenannten Capillary-leak-Syndrom kulminiert. Es kommt zu einer Schädigung der tight junctions zwischen den Endothelzellen, gefolgt von einer Permeabilitätserhöhung.

Insbesondere nach abdominalchirurgischen Operationen kommt es auch regelhaft zu Veränderungen der Permeabilität der Darmmukosa (38). Dies kann dazu führen, daß es zu einem Leck von Bakterien und von Endotoxin durch die mukosale Barriere kommt. Nach einem initialen Andocken des Bakteriums an die Darmwand ruft dieses eine lokale Inflammation und Zytokinausschüttung hervor, und kann infolge der Permeabilitätssteigerung die Mukosa penetrieren. Nach größeren Operationen kann es zu einem SIRS und MODS kommen, obwohl sich kein infektiöser Fokus identifizieren lässt. Daher ist die Hypothese gebildet worden, dass Mikroorganismen aus dem intestinalen Trakt eine Quelle der Infektion darstellen (39).

Dazu kommt, daß in Abhängigkeit mit der Schwere des chirurgischen Traumas das "Rolling" und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel gesteigert sind (40), welche die kapillare Strombahn obstruieren können und so auch den Sauerstofftransport ins Gewebe unterbinden. Dies geschieht durch die gesteigerte Expression von Selektinen und Integrinen durch das aktivierte Endothel. Darüber hinaus verlieren Erythrozyten ihre Deformierbarkeit in den Kapillaren und erhöhen die Viskosität des Blutes.

Das physiologischerweise eher antikoagulatorisch wirkende Endothel, das Moleküle wie Thrombomodulin, tissue factor pathway inhibitor, Heparan und tissue type plasminogen activator exprimiert, hat nach Aktivierung ein prokoagulatorisches Profil mit einem relativen Mangel an aktiviertem Protein C. Geschieht diese Endothelaktivierung bei mangelnder Gegenregulation, zeigt sich eine tiefgreifende Störung der Mikrozirkulation mit verminderter Flußgeschwindigkeit und hoher Heterogenität des Flußes. Es resultiert eine Rarifizierung perfundierter Kapillaren mit

dem vermehrten Ausbilden von arteriell-venöser Shunts, die am Gas- und Stoffaustausch nicht teilnehmen.

Dies lässt sich bei kritisch kranken Patienten mittels sublingualer intravitale Videomikroskopie auch dann nachweisen, wenn es gelungen ist, die makrozirkulatorischen Kreislaufparameter wie Herzzeitvolumen, Herzindex oder den mittleren arteriellen Druck zu normalisieren (41). Die so entstehende Gewebhypoxie ist die Vorstufe eines Multiorganversagens.

1.4.3 Antiinflammatorische Gegenregulation und Immunsuppression

Während IL-6 in der frühen postoperativen Phase proinflammatorisch wirkt, ist es auch ein Schlüsselzytokin der antiinflammatorischen Kompensation. Durch die Induktion der Freisetzung von IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) und löslichen TNF-Rezeptoren wird die Wirkung dieser Protagonisten der Hyperinflammation moduliert (42).

IL-6 induziert auch die Freisetzung von durch Prostaglandin E₂ durch Makrophagen; ein Molekül mit vielfältigen immunsuppressiven Eigenschaften. Es hemmt über einen negativen Feedbackmechanismus mittels intrazellulärem cAMP die TNF α - und IL-1 β -Synthese. Daneben hemmt es die IL-2-Synthese und die IL-2-Rezeptorexpression. Ein weiterer wichtiger antiinflammatorischer Effekt ist die Stimulation der IL-10-Freisetzung.

Im Fall einer Zytokinimbalance kommt es zur Ausbildung eines CARS mit einem typischen Zytokinmuster und systemischer Immunsuppression (17). Es finden sich hohe Spiegel von IL-4, IL-10, TGF β und IL-1Ra. IL-10 und TGF β scheinen auch bedeutenden Anteil an einer in dieser Konstellation anzufindenden Monozytendysfunktion zu haben. Es kommt zum Verlust der Fähigkeit zur Antigenpräsentation, welches die Voraussetzung zur Aktivierung der adaptativen Immunabwehr ist (43).

Insgesamt betrifft das CARS vor allem die zellvermittelte Immunität, demnach zeigt sich eine postoperative Immunsuppression in einer Beeinträchtigung der Proliferation und Zytokinsekretion von T-Lymphozyten und Monozyten sowie deren MHC-Klasse II-Präsentation. Die verminderte HLA-DR-Expression auf Makrophagen gilt als verlässlicher Marker für das Ausmaß der postoperativen Immunsuppression und korreliert mit der Genexpression von IL-10 (44). HLA-DR ist ein MHC-Klasse II-Molekül, mittels dessen naiven T-Zellen Fremdantigene präsentiert werden. Auch korreliert die Verminderung der HLA-DR-Expression mit der Schwere

einer postoperativen Sepsis und dem Outcome (45),(46). Darüber hinaus entwickelt sich eine sogenannte LPS-Toleranz mit dem Verlust der Fähigkeit der Monozyten, auf Stimulation mit LPS ausreichend $\text{TNF}\alpha$ zu sezernieren (47). Ein weiterer Hinweis auf eine Monozytendysfunktion zeigt sich in einer verminderten IL-12-Produktion, die mit einem erhöhten Sepsisrisiko attribuiert wurde (48).

Neben der Monozytendysfunktion kommt es zu einer schwerwiegenden Einschränkung der T-Zell-Funktion. Chirurgisches Trauma resultiert in einer erniedrigten Anzahl zirkulierender CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, wobei das Ausmaß der postoperativen Lymphopenie mit der Schwere des chirurgischen Traumas zu korrelieren scheint (49). Die Lymphopenie wird vor allem auf eine gesteigerte T-Zell-Apoptose zurückgeführt. Apoptotische Zellen wiederum wirken ebenfalls immunsuppressiv, indem sie die Produktion antiinflammatorischer Zytokine stimulieren, die Proliferation von TH2-Zellen fördern und die Lymphozytenenergie verstärken (22).

Neben der reduzierten T-Zellfunktion kommt es zu einer relativen Abnahme der Aktivität von TH1-Zellen, dem so genannten TH2- Shift. Es kommt zu einer reduzierten Sekretion TH1-assoziierter Zytokine wie IL-2, IFN γ und zu einem TH-2-assozierten Zytokinmuster mit den TH-2-Indexzytokinen IL-4 und IL-10. IL-10 wirkt wiederum im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus verstärkend auf die TH-2-Proliferation. Allgemein haben TH-1-Zellen vor allem proinflammatorische Effekte und verstärken die Antigenpräsentation von Makrophagen, wohingegen TH-2-Zellen überwiegend antiinflammatorische Effekte verstärken (9).

Auf die Zellen der unspezifischen Immunantwort wie Makrophagen, Granulozyten und Natural-Killer-Zellen hat chirurgischer Stress sehr unterschiedliche Auswirkungen. Auch zeigt sich eine verminderte Funktion neutrophiler Zellen bezüglich Chemotaxis, Phagozytose und der Produktion von Sauerstoffradikalen (50). Die Anzahl als auch die Aktivität von NK-Zellen ist nach abdominalchirurgischen Eingriffen für 3-6 Tage vermindert. Diese Veränderungen scheinen mit der Invasivität des chirurgischen Eingriffs proportional zu sein. Kommt es postoperativ zu einer Endotoxinexposition, kommt es nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, zu einer weiteren Suppression der NK-Zellaktivität, sondern zu einer Erholung deren Funktion (51).

1.5 Die Rolle der zellvermittelten Immunantwort in der Sepsis

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind die primären Effektorzellen in der zellvermittelten Immunität. Sie haben besondere Relevanz in der Bekämpfung von Tumorzellen, intrazellulären Bakterien und Viren. Diese Zellen verursachen aber auch Gewebeschaden im Rahmen von Abstoßungsreaktionen von Transplantaten, Autoimmunerkrankungen oder Graft-versus-Host-Disease. Sie wirken über Zytolyse, indem sie Granulae mit verschiedenen zytolytischen Proteinen, unter anderem Perforin, Granzyme und Granulysin, freisetzen. NK-Zellen zählen zum angeborenen, unspezifischen Immunsystem und werden dadurch aktiviert, daß Zellen sich nicht mehr über MHC-I-Expression an der Zelloberfläche "ausweisen" können (missing-self-Hypothese) und stressinduzierte Moleküle exprimieren. Zytotoxische T-Lymphozyten gehören zum adaptiven Immunsystem, da sie über ihren antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor aktiviert werden. Dadurch, daß sie fremde MHC-I-Komplexe erkennen und durch sie aktiviert werden, haben sie eine komplementäre Funktion zu den NK-Zellen (52).

In den letzten Jahren hat man sich vermehrt um ein genaues Verständnis dieser zytolytischen Vorgänge bemüht, um eventuell therapeutische Ansätze bei durch zellvermittelte Zytolyse verursachten Krankheitsbildern entwickeln zu können.

1.5.1 Die Regulation der NK-Zellaktivität

Seitdem es gelungen ist, diverse Familien von natural killer (NK) – Zellrezeptoren zu klonieren und zu identifizieren, kam es zu einem raschen Wissenszuwachs über deren Rolle in der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr.

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und können neben Tumorzellen auch von Viren infizierte Zellen töten. Sie stellen einen Anteil von 10-15% aller zirkulierenden Lymphozyten. Ursprünglich erhielten sie ihren Namen aufgrund der Tatsache, daß sie bestimmte Zellen ohne vorausgehende Sensibilisierung abtöten konnten, dem sogenannten „natural killing“. Auch erkennen sie über den CD16-Rezeptor mit Antikörpern beladene Targetzellen (antibody dependent cell cytotoxicity). Daneben sind sie auch durch die Produktion von Zytokinen an der Regulation des adaptativen Immunsystems beteiligt und interagieren mit dendritischen Zellen und zytotoxischen T-Zellen (53).

NK-Zellen sind eine Lymphozyten-Subpopulation und entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit den T-Lymphozyten. Während T-Zellen im Thymus wichtige Reifungsprozesse durchlaufen, vollzieht sich die Entwicklung zu reifen NK-Zellen vor allem im Knochenmark. Reife NK-Zellen wandern in periphere Organe aus und bilden einen konstanten NK-Zellpool.

Generell werden aktivierende und inhibierende NK-Zellrezeptoren unterschieden, deren Gleichgewicht die zytolytische Aktivität von NK-Zellen kontrolliert (54). Dieses Gleichgewicht ist durch komplexe Interaktionen der verschiedenen Rezeptoren reguliert, sodaß sich im Muster der jeweils exprimierten und aktiven Rezeptoren das pathophysiologische Korrelat für gesteigerte Zytotoxizität beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen oder Transplantatabstoßung oder aber Immunsuppression und Anergie findet.

1.5.2 KLRD1 als Komponente der CD94/NKG2-Rezeptorfamilie

CD94 heißt gemäß der neuen Nomenklatur KLRD1, allerdings ist nach wie vor die alte Bezeichnung verbreitet (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/klr/html). Es stellt eine invariable Kette dar, mit der die Rezeptoren aus der NKG2-Familie mit Ausnahme von NKG2D und NKG2F Heterodimere bilden. Ligand der CD94/NKG2-Superfamilie (CD94/NKG2A/C/E/H) ist das atypische MHC-I-Molekül HLA-E (55).

CD94/NKG2-Rezeptoren werden von NK-Zellen und von einigen CD8+ T-Lymphozyten exprimiert. Während CD94/NKG2A inhibierend auf die NK-Zellfunktion wirkt, sind CD94/NKG2C und CD94/NKG2E aktivierende Rezeptoren. Es ist eine Besonderheit dieser Rezeptoren, daß inhibierende und aktivierende Rezeptoren an den gleichen Liganden binden. Eine Erklärung hierfür wurde noch nicht gefunden, es ist nur evident, daß im Ruhezustand die Inhibition überwiegt (56).

Inhibitorische NK-Zellrezeptoren binden vor allem MHC-I-Moleküle, und verhindern somit, daß NK-Zellen körpereigene Zellen mit einer normalen MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche angreifen. Weswegen Zellen, die natürlicherweise nur geringe Mengen an MHC-I-Molekülen aufweisen, wie Erythroblasten, Hepatozyten und Neurone, nicht von NK-Zellen angegriffen werden, ist unklar (57).

Unter anderem sind die Rezeptoren der KIR-Rezeptorfamilie und die CD94/NKG2A-Rezeptoren solche inhibitorischen Rezeptoren.

Wichtige Vertreter dieser inhibitorischen Rezeptoren sind CD94/NKG2A und CD94-T4/NKG2B (56). Die Bedeutung von CD94/NKG2A wird dadurch unterstrichen, dass es auf allen NK-Zellen exprimiert wird, während die NK-Zellen eines Individuums ansonsten stark unterschiedliche Rezeptormuster aufweisen. Im allgemeinen überwiegen die inhibitorischen Signale dieser Rezeptoren, was durch eine höhere Bindungsaffinität erklärt wird.

Eine andere Besonderheit von CD94/NKG2A ist, wie dessen Expression auf der Zelloberfläche konstant gehalten wird, obwohl eine fortwährende Exposition gegenüber dem Liganden HLA-E besteht. Normalerweise würde die andauernde Bindung an den Liganden zu einer Herunterregulation der Expression führen (58). In diesem Fall sichert ein ligandenunabhängiges „Recycling“ zwischen Plasmamembran und endosomalem System (59) eine fortwährende Expression dieses Rezeptors.

Die Tatsache, daß die Ausbildung von MHC-I-Molekülen notwendig für die schützende Wirkung inhibierender NK-Zellrezeptoren vor Zytotoxizität ist, führte zu der „missing self“-Hypothese, die wichtig ist zum Verständnis der Grundlage der Selbsttoleranz dieser Zellen (52). Die Expression einer ausreichenden Menge dieser Moleküle kennzeichnet gesunde körpereigene Zellen, die nicht von Tumoren oder Viren transformiert wurden.

1.5.3 Die Aktivierung von NK-Zellen durch NKG2D

Neben dem MHC-I-Verlust ist die Ausbildung passender Liganden auf den Target-Zellen eine Voraussetzung zur Zytolyse. Diese Liganden entstehen bei Aktivierung, Proliferation oder Tumortransformation, also zellulärem Stress. Die am genauesten untersuchten Liganden im menschlichen Organismus sind stress-induzierte Moleküle MIC-A, MIC-B und ULBP, Liganden des NKG2D-Rezeptors, die vornehmlich auf Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert werden.

Daneben erfordert die Bindung an Target-Zellen das Vorhandensein aktivierender Rezeptoren, die an diese selbst-induzierten Liganden binden. Diese Rezeptoren bilden die “natural cytotoxicity receptors” (NCR), da sie nicht an HLA binden. Der am besten untersuchte ist NKG2D. NKG2D wird nicht ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert, er wurde auch auf zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen (53). Die Grundlage der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität ist die Ausbildung einer sogenannten „immunologischen Synapse“, von denen aktivierende (aNKIS) und inhibierende (iNKIS) unterschieden werden. Im Fall einer aNKIS bildet sich ein zwischen NK- und Zielzelle abgeschlossener Raum, in den die Sezernierung

zytotoxischer Granulae erfolgt. Diese Synapse ist nur dann stabil, wenn in der Summe aktivierende Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche überwiegen.

Dieses Muster der Erkennung selbst-induzierter Liganden durch multiple Rezeptoren ist ein typisches Merkmal des angeborenen Immunsystems und findet sich beispielsweise auch bei der Interaktion von dendritischen Zellen mit verschiedenen Toll-like-Rezeptoren.

1.5.4 Die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen (CD8+) werden zum adaptiven Immunsystem gezählt und werden durch ihre antigenspezifischen T-Zellrezeptoren und durch antigenunspezifische Ko-Rezeptoren, wie beispielsweise CD28, aktiviert. Die wichtigsten Liganden sind hierbei bakterielle Antigene und IL-2. Durch Differenzierung und Proliferation entstehen sogenannte Effektor-T-Zellen, die proinflammatorische Gene exprimieren und zytotoxische Granulae bilden.

In zeitlicher Abfolge werden unterschiedliche Gene exprimiert. In der Frühphase werden vor allem Zytokine wie IL-2 und IFN γ und Protoonkogene exprimiert, nach einigen Tagen, in der sogenannten Spätphase, werden die Gene, die mit der typischen T-Zell-Effektorfunktion in Verbindung gebracht werden, exprimiert; darunter RANTES, Tactile (CD99), WP34 und Granulysin (60).

Granulysin wird von aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen nach Stimulation durch IL-2 und bakterielle Antigene produziert. Es wirkt konzentrationsabhängig zytotoxisch oder chemoattraktiv, d.h. rekrutierend auf andere Zellen des Immunsystems. Darüber hinaus verfügt es auch über immunaktivierende Eigenschaften, indem es Monozyten zur Zytokinproduktion anregt. Somit hat es auch einen regulierenden Effekt auf das adaptive Immunsystem. Granulysin findet sich in zytolytischen Granulae neben Perforin und Granzymen. Es hat *in vitro* die Kapazität, Liposomen und Zellmembranen zu beschädigen, zerstört Mitochondrien und induziert Apoptose in kerntragenden Zellen (61).

1.6 Prädiktion einer Sepsis

Bisher wurden verschiedene Ansätze verfolgt, das Entstehen einer Sepsis in einem Individuum zu prädizieren. Die Notwendigkeit dazu ergibt sich aus der Erkenntnis, dass es eine enorme interindividuelle Variabilität darin gibt, wie der einzelne Organismus auf eine konkrete Infektion, oder ein Trauma wie beispielsweise eine abdominalchirurgische OP, reagiert.

Bisher wurden vor allem die Auswirkungen des operativen Stresses auf die Immunfunktion untersucht. Eine immunparalytische Wirkung konnte allgemein nachgewiesen werden, dies lässt allerdings keinen Rückschluss auf die individuelle Prädisposition zu. In epidemiologischen Studien wurden prädisponierende Faktoren wie Alter, Vorerkrankungen, Art des Traumas beziehungsweise des Eingriffes in Bezug zur Sepsisletalität gesetzt.

Bei Aufnahme auf die Intensivstation lassen sich anhand von scores die Wahrscheinlichkeit eines Multiorganversagens und dessen Mortalität benennen. Interessant in diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung von Murray et al. (62): Die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Vorhersage auf das Überleben oder Sterben von Intensivpatienten wurde zwischen APACHE II und erfahrenen Fachschwestern für Intensivpflege verglichen. Dazu wurde die Prognose am Tag der Aufnahme auf die Intensivpflegeeinheit gestellt, zum einen mittels APACHE II und zum anderen durch die bei der Aufnahme verantwortliche Intensivschwester. Von 799 Patienten überlebten 743 (93 %), die restlichen 56 (7 %) verstarben. Die Quoten einer korrekten Vorhersage des Überlebens lagen bei 97 % für APACHE II und bei 96 % aufgrund der subjektiven Einschätzung erfahrener Mitarbeiter.

Verbreitet sind dann auch die Bestimmung von Procalcitonin und IL-6. Hierbei ist allerdings das septische Geschehen schon weit fortgeschritten. Daher ist dieses Vorgehen nicht verwertbar, um die Sepsistentstehung in einem bestimmten Individuum zu einem frühen Zeitpunkt zu prädizieren, optimaler Weise bereits dann, wenn der Patient klinisch noch unauffällig ist.

Neben der Verwendung von scores gibt es einen neuen Ansatz, ein klinisches Alarmsystem auf Grundlage sogenannter „Selbstlernender Systeme“, insbesondere neuronaler Netze, zu entwickeln (63).

Nachfolgend werden die verschiedenen methodischen Ansätze vorgestellt, mit denen bisher versucht wurde, eine Sepsis zu prädizieren. Eine ausführliche Darstellung der relevanten Studien wird in der Diskussion vorgenommen.

1.6.1 Bestimmung von Zytokinplasmaspiegeln

Das Wissen um die Tatsache, daß ein mediatorvermitteltes Geschehen vorliegt, hat zu verschiedenen Ansätzen geführt, Zytokine als Indikatoren der Wahrscheinlichkeit einer Sepsistentstehung, des Fortschreitens der Erkrankung, der Prognose und des Behandlungserfolges zu nutzen.

Nach früheren Konzepten wurde insbesondere die postoperative Immunsuppression mit den bereits in einem vorangegangenen Kapitel beschriebenen Zytokinveränderungen als schädlich angesehen (64), deren Ausprägung mit dem Ausmaß postoperativer Komplikationen in Zusammenhang gebracht wurde. Heute sieht man in der Immunsuppression in gewissen Maßen eine physiologische Reaktion, die den Organismus vor systemischer Inflammation schützt (43). Die Gefährdung wird eher in der überschüssigen immunsuppressiven Reaktion gesehen.

Trotz dieser Einwände wird die Bestimmung von IL-12 als Syntheseprodukt aktivierter Makrophagen an spezialisierten Zentren bei Risikopatienten präoperativ durchgeführt, wobei die Bestimmung aus Vollblut aus Kosten- und Zeitgründen der Stimulation einzelner Makrophagen vorgezogen wird (Kap. 1.3.; Lit:(48)).

Die Bestimmung von Zytokinplasmaspiegeln bilden den Einfluß eines Gewebetraumas auf das Immunsystem ab, sind aber nicht geeignet, mit genügender Sensitivität und Spezifität das individuelle Risiko eines Patienten zu bestimmen. In vielen Studien unterschieden sich die Zytokinplasmaspiegel einzelner Faktoren in den verschiedenen Gruppen, d.h. Patienten mit Sepsis oder ohne, oder Patienten, die an einer Sepsis verstarben oder diese überlebten. Dies konnte u.a. für $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-10 und Procalcitonin gezeigt werden. Eine patientenindividuelle Prädiktion des outcome ist hiermit aber nicht möglich (65).

Alternativ könnte man auch verminderte Plasmaspiegel proinflammatorischer Zytokine als Marker anhaltender Immunsuppression sehen. In diesem Kontext wurde u.a. GM-CSF untersucht, wobei gezeigt wurde, daß in verstorbenen Patienten GM-CSF-Spiegel signifikant unter denen der „survivors“ lagen (66).

Auch aufgrund der komplexen Pathogenese der Sepsis ist es problematisch, das immunologische Monitoring auf einen Marker zu konzentrieren. So wird auch eine zukünftige sepsisspezifische Therapie vermutlich auch nicht nur auf einer einzelnen Intervention basieren können, sondern einen multimodalen Ansatz verfolgen müssen. Erschwerend kommt hinzu, daß Zytokine schnellen Konzentrationsänderungen unterliegen. Daher konnte trotz einer Vielzahl durchgeführter Studien letztlich kein Konsens darüber gefunden werden.

1.6.2 Quantifizierung der HLA-DR-Expression auf Makrophagen

In verschiedenen Studien (darunter auch eine Multicenter-Studie (45)) konnte gezeigt werden, dass die Messung der HLA-DR-Expression ein effektives Prädiktionsinstrument ist, wobei eine verringerte HLA-DR-Expression einen verlässlichen Marker für die postoperative Immunsuppression darstellt. Die Quantifizierung der Expression erfolgt mittels FACS-Analyse. Eine Limitierung stellt der relative technische Aufwand dar, auch müssen die Proben unmittelbar nach der Abnahme verarbeitet werden, was im klinischen Alltag nicht praktikabel ist. FACS als Methode ist weit verbreitet und in jedem größeren Labor vorhanden.

1.6.3 Genpolymorphismenanalyse

Ein anderer Ansatz besteht darin, anhand von Genpolymorphismen die Empfänglichkeit für eine Sepsis zu untersuchen. Mit Verbreitung der sogenannten gene chip arrays, anhand derer Polymorphismen lediglich einzelner Nukleinsäuren (single nucleotide polymorphisms) nachgewiesen werden können, wurden zahlreiche Studien dazu durchgeführt (67),(68). Auch diese Verfahren werden aufgrund des hohen technischen Aufwandes und der hohen Kosten nur an spezialisierten Zentren durchgeführt und haben ihre Berechtigung nur bei der Selektion von Risikopatienten.

Bisher durchgeführte Studien beziehen sich allerdings auf bereits an einer Sepsis erkrankte Patienten, wobei Polymorphismen hinsichtlich unterschiedlicher Verläufe untersucht werden. Anvisierte genomische Marker sind beispielsweise Polymorphismen der Zytokinpromoter (69).

1.6.4 Funktionale Genomanalysen

Funktionale Genomanalysen dienen einem besseren Verständnis von Merkmalsausprägungen, wohingegen sich strukturelle Genomanalysen mit dem Genom an sich beschäftigen.

Um komplexe physiologische Vorgänge wie die Sepsisentstehung nachvollziehen zu können, reicht es nicht aus, das strukturelle Genom zu kennen. Von Interesse ist nur der Teil des Genoms, der aktiv transkribiert und translatiert wird, um daraus zu folgen, welche Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt von einem bestimmten Gewebe synthetisiert werden.

Die Biosynthese von Proteinen ist gewebs- und zellspezifisch. Welche Proteine in welcher Menge gebildet werden, unterliegt nicht nur der Transkription und der Translation, sondern auch diversen posttranslationalen Modifikationen. Daher ergeben sich verschiedene Ebenen, die betrachtet werden können: das Genom einer Zelle, das Transkriptom, d.h. die Gesamtheit der mRNA, und das Proteom, d.h. die Proteinmenge, die von einem Genom unter bestimmten Bedingungen kodiert werden. Auf deren Analyse beziehen sich die Ausdrücke "Transcriptomics" und "Proteomics".

Funktionelle Genomanalysen beruhen auf DNA- und Protein- Array- Techniken. Array bezeichnet die spezifische Anordnung von Proben auf einem Träger. Die Terminologie ist kompliziert: DNA-Mikroarrays werden auch als Chips bezeichnet, synonym gebraucht werden DNA-Chip, Gen-Chip und Genom-Chip. Theoretisch ist es möglich, das Genom eines ganzen Organismus auf einem Chip abzubilden.

Nach Vollendung des Human Genome Project (70), der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Erbguts, ist es möglich geworden, komplementäre DNA-microarrays (cDNA) aller menschlichen Gene herzustellen. Die Array-Technologie beruht auf dem Konzept, bekannte (auf dem Chip gebundene) DNA und unbekannte DNA auf Grundlage der Basenpaarung der Nukleinsäuren zu hybridisieren und die unbekannte, zu untersuchende DNA zu identifizieren. Das Besondere an dieser Technik ist, daß Tausende von Genen, bzw deren Expression, zeitgleich untersucht werden können.

Gen-Chips werden bisher insbesondere in der klinischen Diagnostik von Infektions-, Krebs- und Erbkrankheiten eingesetzt. Von besonderem Interesse sind Gene, die in einem Gewebe unterschiedlich exprimiert sind, welches durch eine Krankheit, Infektion oder andere besondere Umstände beeinflusst ist. Mit Expressionsprofilen einer ausreichend großen Zahl von Geweben können statistisch signifikante Korrelationen zwischen gewebspezifischen Informationen (wie Krankheitsstatus, Behandlungs- oder Umwelteffekte oder Genotypen) und dem Expressionsniveau von ausgewählten Genen oder Gruppen von Genen abgeleitet werden (71). Korrelationen von Expressionsniveaus zwischen unterschiedlichen Genen werden es ermöglichen, Gene bestimmten allgemeinen Stoffwechselwegen und funktionellen Gruppen zuzuordnen. In diesem Zusammenhang wird die funktionelle Genomanalyse die Identifizierung funktioneller Kandidatengene erlauben. Die Methode, mit der dies geschieht, wird „class prediction“ genannt. Dies bezeichnet einen selbstlernenden Algorithmus, der anhand von Proben bekannter Klassenzugehörigkeit (beispielsweise die Klassen Sepsis-keine Sepsis) geschult wird (training set). Hierbei werden die aussagekräftigsten Gene ermittelt, anhand deren anschließend

neue Proben (test set) zugeordnet werden können. Dies ist sogar dann möglich, wenn die Funktion der untersuchten Gene überhaupt nicht bekannt ist (72).

1.6.5 Genexpressionsanalyse mit Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion gilt als Goldstandard der mRNA-Bestimmung. Es besteht eine gute Korrelation mit microarray-Techniken, Sensitivität und Spezifität ist bei rt-PCR aber höher (73). Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich im Methodenteil dieser Arbeit im Kapitel 2.3.3.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Aus den vorangegangenen Ausführungen wird deutlich, daß zunehmend ein genomischer Ansatz gewählt wird, Sepsis zu definieren, den klinischen Verlauf vorherzusagen und so letztlich auch bessere Einblicke in die Pathophysiologie zu gewinnen. Insbesondere die Analyse von SNP (single nucleotide polymorphisms) führt zu der Vorstellung, daß die individuelle genetische Ausstattung eines Menschen dessen Risiko, an einer Sepsis zu erkranken, beeinflusst.

Bisher gibt es nur sehr wenige Arbeiten, die eine solche Risikostratifizierung bereits vor dem Beginn einer Sepsis versuchen vorzunehmen. Jüngstes Beispiel ist eine Arbeit von Lukaszewski et al., die bei präsymptomatischen Patienten bei Aufnahme auf die Intensivstation das Entstehen einer Sepsis prädictieren (74). Hierbei wurde mittels Real-Time reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion die Genexpression von IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , FasL und CCL2 bestimmt. In 83% der Fälle konnte ein Panel dieser sieben Marker das Entstehen einer Sepsis korrekt voraussagen.

Vorläufer dieser Idee waren andere Arbeiten, die den Fokus auf eine möglichst frühe Detektion einer Sepsis gelegt haben, auch dies bei Patienten, die bereits auf einer Intensivstation lagen (d.h. bereits in irgendeiner Form symptomatisch waren) oder zumindest andere Symptome wie Fieber zeigten (75),(76).

Wir betrachten die Entwicklung einer Sepsis perioperativ, und benutzen daher das operative Trauma mit der darauf folgenden postoperativen Immunsuppression als definierten Insult. Daher ist es uns möglich, Genexpressionsanalysen bereits vor jeglicher Beeinflussung des Immunsystems vorzunehmen, und in Bezug zu den Veränderungen postoperativ zu setzen.

Konkret geschieht dies mittels einer retrospektiven Matched-Pair Analyse, bei der die Genexpression typischer Transkripte zytotoxischer Zellen von Patienten, die eine postoperative schwere Sepsis entwickeln mit derjenigen von Patienten, die bei vergleichbarem Trauma keine Sepsis entwickelten, verglichen wird. Die untersuchten Marker waren im einzelnen

- Granulysin
- NKG2D
- KLRD1

Dabei stellen sich folgende Fragen:

- Wie verhält sich die Expression der Gene von Granulysin, NKG2D und KLRD1 perioperativ?
- Lassen sich signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen Patienten mit unkompliziertem postoperativem Verlauf und solchen mit postoperativer Sepsis und/oder septischem Schock feststellen?
- Falls dies der Fall ist, eignen sich diese Daten für eine frühzeitige Prädiktion einer postoperativen Sepsis?
- Ist die hier vorgestellte Methode für die klinische Diagnostik praktikabel?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Ablauf der klinischen Studie

2.1.1 Einschluß von Patienten

Nach der Genehmigung durch die lokale Ethikkommission wurden zwischen September 2003 bis Mai 2005 an drei Berliner Kliniken (Charité Campus Virchow-Klinikum, Charité Campus Mitte und Vivantes Klinikum Neukölln) Blutproben von insgesamt 223 Patienten gesammelt, die sich größeren abdominalchirurgischen oder thoraxchirurgischen Eingriffen unterzogen. In Frage kommende Eingriffe waren insbesondere Gastrektomie, Hemikolektomie, tiefe anteriore Rektumresektion, Pankreasteilresektion, biliodigestive Anastomose, partielle pyloruserhaltende Pankreatikoduodenostomie (PPPD), Ösophagusresektion und Lungenteilresektion. Ausschlusskriterien waren fehlende Einwilligung, Minderjährigkeit und moribunde Patienten (ASA IV und V). Die Aufklärung erfolgte mündlich und schriftlich am Vortag des operativen Eingriffes und beinhaltete Ziel und Ablauf der Studie, die Verschlüsselung persönlicher Daten und mögliche Risiken.

2.1.2 Blutentnahmen

Nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung wurden zu drei Zeitpunkten venöse Blutentnahmen vorgenommen; präoperativ und jeweils morgens am ersten und zweiten postoperativen Tag. Die Blutentnahmen erfolgten mit Paxgene™ Blood RNA Tubes (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), die unmittelbar nach Entnahme auf -20°C herabgekühlt und schließlich bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert wurden. Darüber hinaus wurde zu jedem Zeitpunkt jeweils ein EDTA-Blutröhrchen entnommen, mit welchem die Leukozytenzahl bestimmt wurde.

2.1.3 Datenerfassung

Alle Patienten wurden täglich bis zum 14. Tag postoperativ auf die Entwicklung einer Sepsis beziehungsweise einer schweren Sepsis in Anlehnung an die ACCP/ICCM-Kriterien (2)

untersucht. In einer Datenbank wurden pseudonymisiert von allen eingeschlossenen Patienten Alter, ASA-Score, Diagnose, Operation, relevante Begleiterkrankungen, Leukozytenzahlen und eventuell andere relevante Laborwerte wie CRP und Procalcitonin und alle für die Diagnose einer Sepsis relevanten Daten gesammelt. Von jedem postoperativen Tag wurden folgende Parameter erhoben: Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz bzw. Notwendigkeit der invasiven Beatmung und Leukozytenzahl. Das Auftreten eines SIRS wurde nach folgenden Kriterien ermittelt (bei mindestens zwei zutreffenden Befunden):

- Hyperthermie ($>38,3^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($<35,6^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie (Herzfrequenz $>90/\text{min}$)
- Tachypnoe (Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 <32\text{mmHg}$ bei Spontanatmung, oder die Notwendigkeit maschineller Beatmung)
- Leukozytämie ($>12000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($<4000/\mu\text{l}$) oder $> 10\%$ unreife Granulozyten

Darüber hinaus wurde an jedem postoperativen Tag ermittelt, ob es zu einer Infektion nach einem der folgenden Kriterien gekommen ist:

- Nachweis polymorphonukleärer Zellen (PMN) in sonst sterilen Körperflüssigkeiten
- positive Blutkultur oder Keimnachweis in Urin, Sputum oder anderen Körperflüssigkeiten
- optischer Nachweis einer Infektion wie beispielsweise purulentes Wundsekret, oder offensichtliche Infektionsherde wie Darmperforation mit freier Luft oder Darminhalt im Abdomen, Anastomoseninsuffizienz, etc.
- andere klinische Nachweise einer Infektion wie beispielsweise Pneumonie, nekrotisierende Fasziiitis, Purpura fulminans, etc.

Bei Nachweis eines SIRS mit dem Nachweis einer Infektion, also bei Erstmanifestation einer Sepsis wurden SOFA - und SAPS – Score erhoben, und für jeden folgenden bis zum 14. postoperativen Tag die Parameter zum Nachweis einer schweren Sepsis. Diese sind im einzelnen:

- Hypotension mit SBP < 90 mmHg, MAP < 70mmHg oder Abfall > 40mmHg trotz adäquater Volumensubstitution, sowie jegliche Katecholamintherapie
- Oligurie (<0,5ml/kgKG/h über mindestens eine Stunde)
- Thrombozytopenie < 100000/ μ l
- metabolische Azidose pH < 7,3 oder BE > 5 mmol/L oder Laktat > 2mmol/L
- arterielle Hypoxämie mit PaO₂/FiO₂ < 280 in Abwesenheit einer Pneumonie, oder <200 im Fall einer Pneumonie
- Bewußtseinstörung (GCS<14 oder akute Verschlechterung gegenüber Vorbefund)

Bei Vorliegen von 20 Fällen von nachgewiesener Sepsis oder schwerer Sepsis wurden keine weiteren Patienten mehr eingeschlossen. Im Sinne einer retrospektiven Matched-Pair Analyse wurden den 20 Fällen jeweils eine Kontrolle ohne postoperative Komplikation zugeordnet. Dabei wurde auf größtmögliche Übereinstimmung bei Geschlecht, Alter, Hauptdiagnose und Intervention sowie Nebendiagnosen geachtet. Die Blutproben dieser 20 Fall/Kontroll-Paare wurden im Anschluß an die vollständige Datenerhebung verarbeitet. Diese Analysen wurden im Institut für Medizinische Immunologie im Campus Charité Mitte durchgeführt.

2.2 Genexpressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

2.2.1 RNA-Präparation und Synthese der cDNA, Primer und fluorogenen Proben

Von den Blutproben wurde die RNA mittels des Paxgene Blood RNA Kit® (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben präpariert. Da Leukozyten die einzigen kernhaltigen Zellen im Vollblut sind, erhalten wir faktisch die RNA der Leukozyten. Zunächst wurde eine Degradation der genomischen DNA in den Proben durchgeführt, um sicherzustellen, daß ausschließlich cDNA von der mRNA in den Proben entsteht. Diese wurde mit einem Reverse Transkriptase-Ansatz unter Verwendung des Quantitect Reverse Transkription Kit® (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben synthetisiert.

Primer und fluorogene Proben (Sonden) wurden zu jedem Kandidatengen entworfen. Dafür muss zunächst die Nukleotidsequenz der entsprechenden cDNA ermittelt und mit derjenigen der entsprechenden genomischen DNA verglichen werden. So können die Exon-Intron-Grenzen des jeweiligen Gens bestimmt werden. Primer und Sonden sollten spezifisch für

jedes Gen sein (und daher eine Mindestlänge von 16 Nukleotiden umfassen) und nur mit cDNA reagieren. Dies wird dadurch erreicht, daß die Sonden die Exon-Grenzen genomischer DNA überspannen. Primer und Sonden wurden mit Primer Express Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) entworfen und mittels BLAST-Recherche (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), validiert.

2.2.2 Identifizierung von Kandidatengen

Für eine Genexpressionsanalyse wurden 25 Gene ausgewählt, die den Aktivitätszustand des Immunsystems repräsentieren. Eine Gruppe von Genen beinhaltet Gene von Zytokinen oder deren Signalverarbeitung (TNF α , IL-1b, IL-10, IL-18, SOCS3, TGF β , IL-6). Des weiteren wurden Gene der adaptativen Immunabwehr ausgewählt, die den Funktionszustand der T- Zellen und der NK-Zellen widerspiegeln, darunter CD3, CD69, Perforin, Granulysin, CCR3, NKG2D, IDO und CD 94. Die MHCII-assoziierten Gene HLA-DRA und CD74 als Marker der monozyären Antigenpräsentation und Chemokine wie IL8, IP10, PF4, MIP1a, GRO-1 wurden analysiert, ausserdem Moleküle wie HO-1 und S100A8.

Diese Arbeit wird sich mit der Expression der Gene von CD 94 (KLRD1), NKG2D und Granulysin beschäftigen, Produkte von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen.

2.2.3 Real time Polymerase-Kettenreaktion

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und ist die Standardmethode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit bekannter Sequenz (77). Die Methode hat breite Anwendung in Forschung, Diagnostik und forensischer Medizin gefunden, da die meisten Analyseverfahren eine vorhergehende Amplifizierung der oft nur geringen DNA-Mengen voraussetzen.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt in mehreren Zyklen, wobei die DNA-Menge exponentiell ansteigt, da die Reaktionsprodukte (d.h. DNA-Stränge) eines Zyklus als Vorlagen für die weitere DNA-Synthese dienen. Benötigt werden:

- die DNA mit dem zu amplifizierenden Abschnitt (Template)
- zwei Primer (Vorwärts- und Rückwärts- Primer)
- DNA-Polymerase (hitzebeständig)
- Desoxytrinukleotide der Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

Die Primer sind 16-20 Basen lange Oligonukleotidsequenzen, die komplementär zu der Sequenz an den 5'-Enden der zu replizierenden DNA-Einzelstränge sind. Dies ist wichtig, da die DNA-Polymerase, die die Primer als Ausgangspunkt für das Kopieren der DNA verwendet, eine 5'-3'-Syntheserichtung aufweist. Die Primer müssen ausreichend lang sein, um möglichst spezifisch für ein bestimmtes Gen zu sein, da mit steigender Basenzahl die statistische Wahrscheinlichkeit sinkt, daß die Kombination mehrfach im Genom vorkommt. Die Amplifizierung der DNA erfolgt in vollautomatisierten Thermocyclern in drei Schritten:

1. bei Erhitzen des Gemisches auf 90°C denaturiert die DNA in ihre Einzelstränge
2. nach der Abkühlung auf 50°C lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an (Primer-Annealing)
3. bei 70°C bildet die DNA-Polymerase ausgehend von den Primern neue Doppelstränge (Primer-Extension)

2.2.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Um spezifische mRNA, das Produkt der Genexpression, nachzuweisen, erfolgt vor der PCR die Reverse Transkription. Dies erfolgt mittels Reverser Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA als Vorlage zur Bildung komplementärer DNA nimmt. Über diese sogenannte cDNA kann im Rahmen einer quantitativen PCR die Expressionsrate der zugrundeliegenden mRNA dargestellt werden. Die DNA wird am Ende eines jeden Vervielfältigungszyklus in Echtzeit („real time“) quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgt über Fluoreszenzmessungen, wobei es zwei verschiedene Strategien gibt:

- die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die mit Doppelstrang-DNA (dsDNA) interkalieren. Diese Methode ist sehr unspezifisch, da die komplette DNA eines

Ansatzes gebunden wird, einschliesslich der Primer.

- DNA-Oligonukleotide (Sonden), die fluoreszieren, wenn sie mit komplementärer DNA hybridisiert werden. Ein Quencher unterdrückt die Fluoreszenz, bis bei der Neubildung der Doppelstränge der Quencher durch die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut wird und die Fluoreszenz freilässt.

Diese Fluoreszenzfarbstoffe oder Sonden müssen dem Reaktionsansatz beigegeben werden. Zur Detektion der Fluoreszenzsignale muss der Thermocycler über eine entsprechende Kamera verfügen.

Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, daher zeigt die Fluoreszenzkurve einen exponentiellen Verlauf. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Am Ende eines Laufs erreicht die Fluoreszenz ein Plateau, da die Menge an Primern und Nukleotiden begrenzt ist.

2.2.3.3 Quantifizierung mittels Real-time-PCR

Zur Quantifizierung der ursprünglichen mRNA stehen zwei Ansätze zur Verfügung (78), (Abbildung 1). Bei der absoluten Quantifizierung wird anhand einer externen Kalibrierkurve auf die Menge der vorhandenen cDNA im Reaktionsansatz geschlossen. Diese Kalibrierkurve basiert auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR-Produkten.

Im Fall der relativen Quantifizierung interessiert nicht die absolute Menge an Reaktionsprodukt, sondern die Relation zu der Fluoreszenzkurve eines Referenzgens oder eines Referenzindex aus mehreren Referenzgenen. Ein solches Referenzgen, auch Haushaltsgen (oder housekeeping gene) genannt, ist ein konstitutiv exprimiertes, nicht reguliertes Gen, das möglichst unabhängig von Zelltyp, Zellstadium oder von äußeren Einflüssen exprimiert wird. Haushaltsgene sind typischerweise Gene, die mit dem Grundstoffwechsel von Zellen zusammenhängen, beispielsweise mit dem Glukosestoffwechsel. Geläufige Referenzgene sind u.a. GAPDH, HPRT, Ubiquitin und β -Actin.

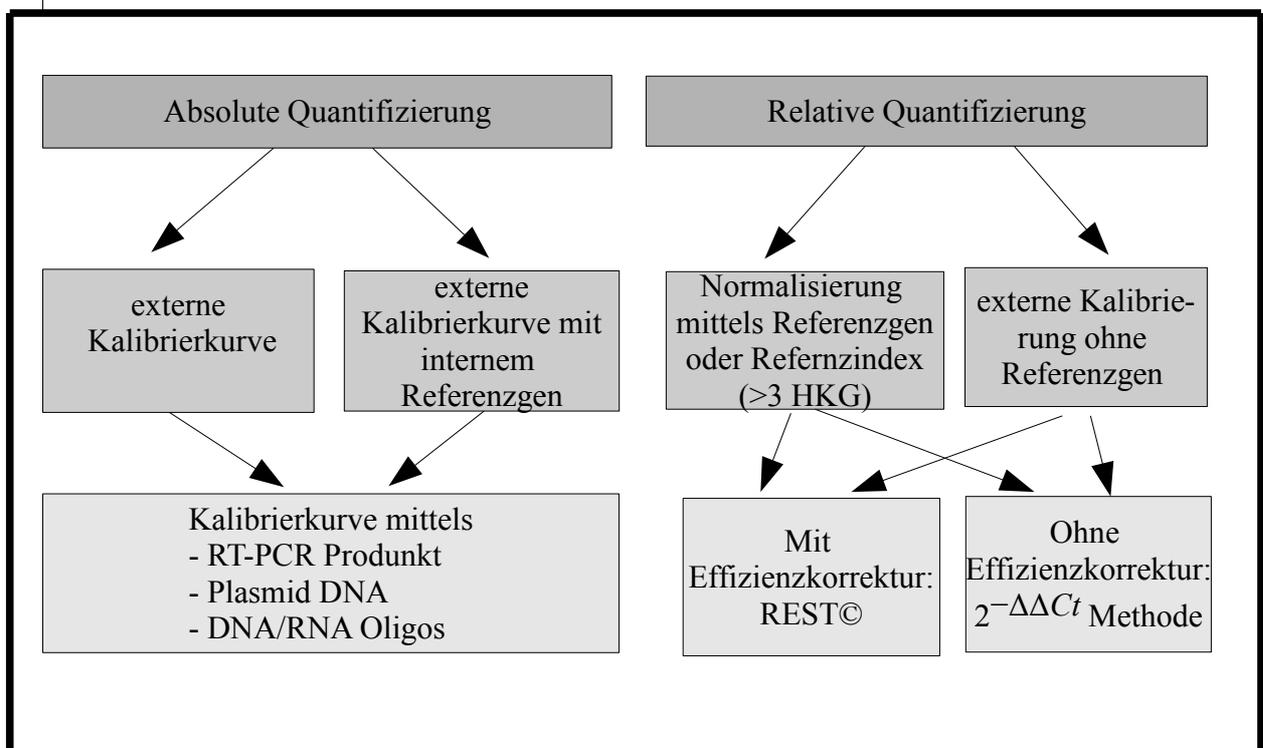
Die Beziehung zwischen zu messendem Gen und Referenzgen drückt sich im ΔC_t -Wert aus. Der C_t -Wert kann aus der Fluoreszenzkurve an einer frei wählbaren Schwelle (threshold cycle) abgelesen werden. Diese Schwelle (oder Messniveau) muss dazu bei logarithmischer

Auftragung im linearen Teil der Kurve liegen (siehe Kapitel 2.3.3).

Real-time PCR eignet sich gut dazu, Veränderungen von DNA-Mengen über die Zeit darzustellen. Der Reverse-Transkriptase-Ansatz ermöglicht die Bestimmung von Änderungen in der Genexpression im zeitlichen Verlauf, beispielsweise aufgrund pharmakologischer Intervention oder wie in der vorliegenden Studie aufgrund eines operativen Traumas.

Zur Quantifizierung der Gene wurde Real-time rt-PCR unter Verwendung des Quantitect Probe PCR Mastermix® durchgeführt.

Abbildung 1. Quantifizierungsansätze in der real-time RT-PCR (78)



In der hier vorgestellten Studie wurde eine relative Quantifizierung in Bezug auf das Referenzgen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) durchgeführt. Dies ist in der vorliegenden Konstellation sinnvoll, da die Proben aufgrund der verschiedenen Leukozytenzahlen in den entnommenen Vollblutproben unterschiedliche Konzentrationen von mRNA enthalten. Da durch Differenzbildung der Ct-Werte nur die relative Menge von mRNA in Bezug auf die mRNA des Referenzgens betrachtet wird, kann dieser Einflußfaktor eliminiert werden.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes kann über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode oder über genauere effizienzkorrigierte Modelle erfolgen (78). In unserem Fall erfolgt die Normalisierung auf HPRT mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

2.2.4 Relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Bei der Berechnung der Expressionsunterschiedes zwischen Kandidaten- und Referenzgen wird die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet (79). Zunächst wird für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert.

- $\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$

Anschließend wird vom ΔCt -Wert der Proben der Fallgruppe der ΔCt -Wert der Proben der Kontrollgruppe abgezogen.

- $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct-Fälle} - \Delta\text{Ct-Kontrolle}$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio) eines Gens zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe normalisiert auf ein Referenzgen berechnet sich folgendermassen:

- $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

2.3 Statistische Auswertung

Von den auf HPRT normalisierten Expressionswerte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurden jeweils der Median sowie die Minimal- und Maximalwerte mit dem Computerprogramm OpenOffice.org Calc bestimmt. Vom Expressionsverlauf der hier untersuchten Gene wurden Box-Whisker-Plots mittels der Software R statistics (www.r-project.org) erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 12.0 (SPSS Corporation, Chicago, USA), hierbei wurde der Wilcoxon-Test dafür verwandt, die Expressionsunterschiede zwischen präoperativem Zeitpunkt und den jeweiligen postoperativen Zeitpunkten zu untersuchen (1. und 2. postoperativer Tag). Der Mann-Whitney-Test wurde zur Auswertung der Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen benutzt. Da jeweils drei Meßzeitpunkte je Faktor untersucht wurden, wurde statistische Signifikanz unterhalb des Signifikanzniveaus $p=0,05/3$ ($p=0,016$) angenommen.

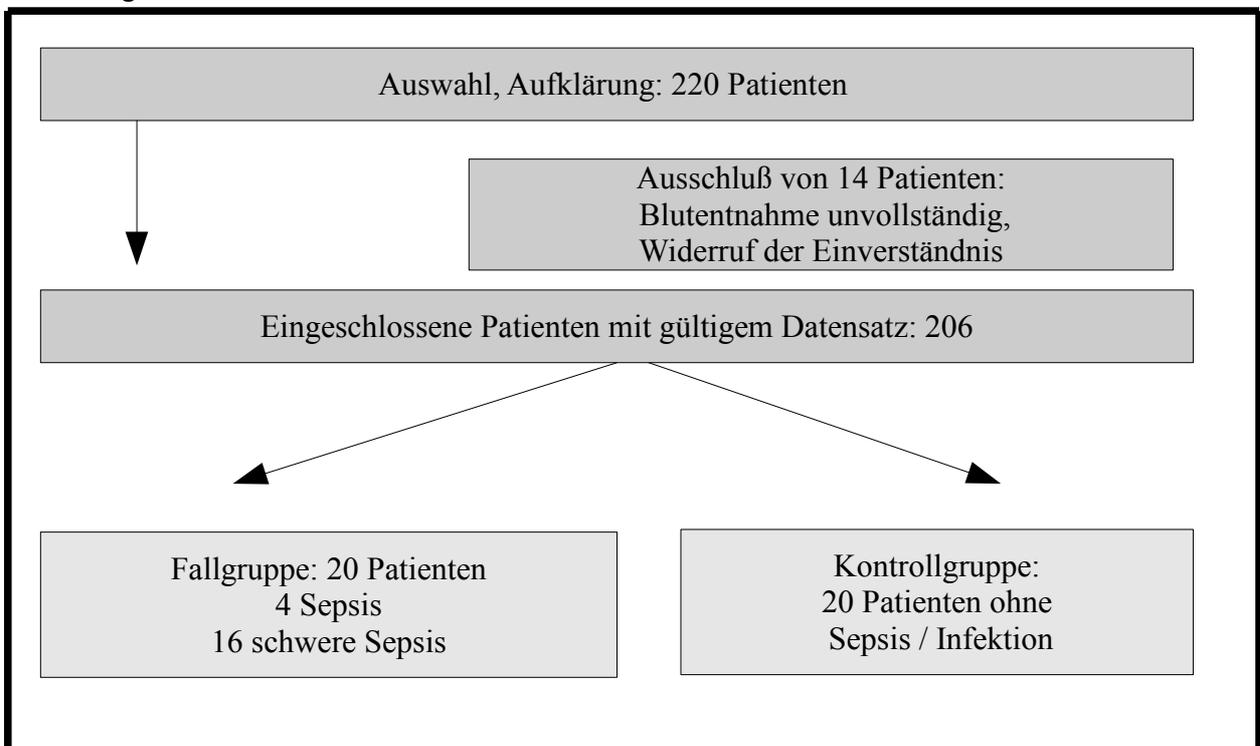
3 ERGEBNISSE

3.1 Patientendaten

Von den 220 Patienten, die zwischen September 2003 bis Mai 2005 an den drei Berliner Kliniken (Charité Campus Virchow-Klinikum, Charité Campus Mitte und Vivantes Klinikum Neukölln) zur Teilnahme an der vorgestellten Studie vorgesehen waren und ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten, konnten von 209 Patienten vollständige Datensätze erhoben werden. Bei 14 Patienten waren die Blutproben nicht vollständig, oder die Patienten widerriefen mündlich ihr Einverständnis zur Blutentnahme.

Bei Vorliegen von 20 Fällen von nachgewiesener Sepsis oder schwerer Sepsis (**Tabelle 5**) wurden keine weiteren Patienten mehr eingeschlossen. Im Sinne einer retrospektiven Matched-Pair Analyse wurden den 20 Fällen jeweils eine Kontrolle ohne postoperative Komplikation zugeordnet. Dabei wurde auf größtmögliche Übereinstimmung bei Geschlecht, Alter, Hauptdiagnose und Intervention sowie Nebendiagnosen geachtet (**Tabelle 6**). Die Blutproben dieser 20 Fall/Kontroll-Paare wurden im Anschluß an die vollständige Datenerhebung verarbeitet.

Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Studie.



Von 206 eingeschlossenen Patienten mit gültigem Datensatz und vollständigen Blutproben entwickelten 20 Patienten eine Sepsis (4 Patienten) oder eine schwere Sepsis (16 Patienten). Dies deckt sich mit den publizierten Zahlen zur Inzidenz (1). Bei weiteren 5 Patienten kam es zu einer Infektion, ohne daß die Kriterien zum Vorliegen einer Sepsis erfüllt waren.

In der Fallgruppe war eine Pneumonie die häufigste Infektion (11 Patienten), gefolgt von einer Peritonitis (6 Patienten). Weitere Infektionsquellen waren das Mediastinum und der Urogenitaltrakt in jeweils einem Fall. In einem weiteren Fall ließ sich bei positiver Blutkultur kein Infektionsfokus finden.

Die überwiegende Zahl der Infektionen wurde durch gramnegative Keime hervorgerufen, deren Quelle der Gastrointestinaltrakt darstellt, gefolgt von Pilzinfektionen mit *Candida species*. In zwei Fällen blieb der Erregernachweis trotz klinischer Zeichen einer Infektion negativ. Tabelle 6 zeigte auch, daß die Diagnose einer Sepsis nach herkömmlichen Kriterien in 14 von 20 Fällen nach dem 2. postoperativen Tag erfolgte.

Von den eingeschlossenen Patienten der Fallgruppe wurden jeweils am Tag der Diagnosestellung die SAPS- und SOFA- Scores erhoben. Der mittlere SAPS betrug (Minimal- und Maximalwert in Klammern) 36,5 (4, 69) und der mittlere SOFA 6,3 (0, 15).

Neben der Erhebung dieser Daten wurden im Rahmen der klinischen Routineversorgung die herkömmlichen Entzündungsparameter im Blut bestimmt. Diese Parameter wurden von uns auch zum Screening hinsichtlich der Entwicklung eines septischen Geschehens verwendet. Hierzu wurden bei allen Patienten die Leukozytenzahlen und das CRP (C-reaktives Protein) bestimmt, in Einzelfällen andere Parameter wie Procalcitonin.

Tabelle 4 zeigt die Mediane der CRP-Werte und der Leukozytenzahlen in beiden Gruppen im zeitlichen Verlauf. Hierbei lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollgruppe feststellen.

Tabelle 4. Übersicht über den Verlauf der konventionellen Entzündungsparameter (Medianwerte, in Klammern Minimal- und Maximalwerte)

CRP (mg/l)	Präoperativ	1. postoperativer Tag	2. postoperativer Tag
Fallgruppe	0,9 (0,3 – 19,4)	9,6 (4,0 – 24,7)	18,6 (3,4 – 34,1)
Kontrollgruppe	0,9 (0,2 – 14,6)	6,9 (4,6 – 14,6)	15,2 (9,6 – 28,5)
Leukozyten(1000/μl)			
Patienten gesamt	7,8 (3,2 – 25,3)	12,9 (4,6 – 22,8)	13,0 (2,2 – 34,9)

Tabelle 5. Infektionen in der Fallgruppe

Nr	Komplikation	Infektion	Erreger	Nachweis	Tag	SAPS	SOFA
1f	Schwere Sepsis	Peritonitis	E.coli, E. faecium	Wundabstrich	6	46	10
2f	Schwere Sepsis	Bronchitis	E. faecium	Bronchialsekret	8	38	5
3f	Schwere Sepsis	Peritonitis	Enterobacter cloacae	Bauchabstrich	2	43	6
4f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Candida	Bronchialsekret	2	58	8
5f	Schwere Sepsis	Peritonitis	Candida, E. faecium	Wundabstrich	12	56	11
6f	Schwere Sepsis	Pneumonie	P. aeruginosa	Bronchialsekret	6	33	5
7f	Schwere Sepsis	Peritonitis	Negativ	Negativ	14	53	11
8f	Schwere Sepsis	Pneumonie	E.coli, P. Vulgaris	Bronchialsekret	3	47	9
9f	Schwere Sepsis	Peritonitis	Candida	Blutkultur	2	47	4
10f	Schwere Sepsis	Pneumonie	P. aeruginosa	Bronchialsekret	9	49	11
11f	Schwere Sepsis	Peritonitis	Candida, E. faecium	Wundabstrich	6	33	3
12f	Schwere Sepsis	Mediastinitis	E. coli	Bronchialsekret	2	30	5
13f	Schwere Sepsis	Pneumonie	P. aeruginosa	Bronchialsekret	14	52	12
14f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Klebsiella, Proteus	Bronchialsekret	10	41	7
15f	Schwere Sepsis	HWI	E. coli, E. Faecium	Urin	7	69	15
16f	Schwere Sepsis	Pneumonie	Staph. Aureus	Bronchialsekret	1	36	7
17f	Sepsis	Pneumonie	Candida	Bronchialsekret	9	32	1
18f	Sepsis	Septikämie	Candida	Blutkultur	12	28	0
19f	Sepsis	Bronchitis	Enterobacter	Bronchialsekret	3	7	1
20f	Sepsis	Pneumonie	Negativ	Negativ	2	26	1

Abkürzungen:
HWI: Harnwegsinfekt, Tag: Tag des Sepsisbeginns postoperativ, SAPS: Severe Acute Physiology Score, SOFA: Sepsis Organ Failure Assessment

Tabelle 6. wichtige Daten der Studienpatienten

Nr	Alter	sex	ASA	Operation	Hauptdiagnose	Nebendiagnosen
1f	73	m	3	PPPD	Pankreaskarzinom	HTN, COPD
1k	77	m	3	PPPD	Pankreaskarzinom	HTN, DM
2f	68	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	HTN, COPD
2k	68	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	HTN, COPD, DM
3f	75	w	3	Pankreasresektion	Pankreaskarzinom	HTN, DM, KHK
3k	68	w	3	PPPD	Pankreaskarzinom	HTN, DM
4f	86	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	HTN, Lungenemphysem
4k	75	m	2	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	HTN, KHK
5f	71	m	3	PPPD	Pankreaskarzinom	COPD, DM, Apoplex
5k	75	m	3	PPPD	Pankreaskarzinom	HTN, KHK
6f	46	m	3	PPPD	Pankreatitis	Alkoholabusus, Leberzirrhose
6k	45	m	3	PPPD	Pankreatitis	Alkoholabusus
7f	46	w	3	Biliodig. Anastomose	Biliodig. Insuff.	HTN, Adip. per magna
7k	59	w	3	Biliodig. Anastomose	Chron. Cholangitis	Rektumkarzinom
8f	67	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	HTN, COPD, Leberzirrhose
8k	54	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	HTN, pAVK
9f	55	w	3	Gastrektomie	Magenkarzinom	COPD
9k	58	w	3	Gastrektomie	Magenkarzinom	HTN, Aortenaneurysma
10f	71	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	COPD, HTN, pAVK
10k	79	m	3	Gastrektomie, dist. Ösophagusresektion	Kardiakarzinom	COPD, Hyperthyreose
11f	68	m	3	Rektumresektion	Rektumkarzinom	HTN, pAVK
11k	62	m	3	Rektumresektion	Rektumkarzinom	COPD, KHK
12f	63	m	4	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	HTN, HRST, Hypothyreose
12k	57	m	3	Gastrektomie, dist. Ösophagusresektion	Kardiakarzinom	Pleurakarzinose
13f	66	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	KHK, DM
13k	57	m	2	Gastrektomie, dist.	Kardiakarzinom	Alkoholabusus

Nr	Alter	sex	ASA	Operation	Hauptdiagnose	Nebendiagnosen
14f	52	m	3	Pneumektomie	Bronchialkarzinom	COPD, Alkoholabusus
14k	69	m	3	Lungenlappenresektion	Bronchialkarzinom	KHK, HTN
15f	88	w	3	Gastrektomie	Kardiakarzinom	Aortenklappeninsuffizienz
15k	80	w	3	Gastrektomie	Magenkarzinom	DM, KHK, HTN
16f	61	m	3	Thorakotomie	Bronchialkarzinom	COPD, HTN, DM
16k	60	m	2	Laparotomie	Pankreaskarzinom	
17f	58	m	2	Rektumresektion	Rektumkarzinom	Divertikulitis
17k	57	m	2	Rektumresektion	Rektumkarzinom	
18f	68	m	2	PPPD	Magenkarzinom	HRST
18k	76	m	3	Biliodig. Anastomose	Pankreaskarzinom	HTN, DM
19f	49	m	3	Lungenlappenresektion	Lungenemphysem	COPD, HRST
19k	30	m	2	Lungenlappenresektion	Hämophysen	
20f	64	m	3	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	COPD, HTN, pAVK
20k	56	m	2	Ösophagusresektion	Ösophaguskarzinom	Alkoholabusus

Abkürzungen:

Nr.: Patientenummer, f: Fallgruppe, k: Kontrollgruppe, ASA: American Society of Anaesthesiologists Index, PPPD: partielle pyloruserhaltende Pankreatikoduodenstomie, COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung, HTN: arterielle Hypertonie, DM: Diabetes mellitus, KHK: koronare Herzerkrankung, pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit, HRST: Herzrhythmusstörungen

Tabelle 6 zeigt, daß die Indikation zu einem operativen Eingriff zu einem großen Teil Malignome waren. Es handelt sich hier mehrheitlich um Karzinome des Gastrointestinaltraktes. Lediglich bei drei Fall-/Kontrollpaaren lag eine nicht-maligne Grunderkrankung vor, es handelt sich hierbei im Einzelnen um Pankreatitis, Cholangitis bzw. biliodigestive Insuffizienz sowie Lungenemphysem. Daraus lässt sich schließen, daß es sich bei den operativen Eingriffen um radikale kurative Tumorchirurgie handelt.

3.2 Genexpressionsanalyse der Transkripte NKG2D, KLRD1 und Granulysin

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde die Genexpression von NKG2D, KLRD1 und Granulysin untersucht. Dabei wird exemplarisch die Auswirkung des operativen Traumas auf die zellvermittelte Immunabwehr, d.h. auf zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen, dargestellt. Wie bereits gezeigt wurde, sind postoperativ T-Zellfunktion und Aktivität von NK-Zellen vermindert (49),(51),(50).

Die Genexpression von NKG2D, einem aktivierenden NK-Zellrezeptor, zeigt einen hochsignifikanten Abfall an beiden postoperativen Tagen in Bezug auf präoperativ in beiden Gruppen, wobei dieser Abfall in der Sepsisgruppe (Faktor 5) deutlich stärker ausgeprägt ist als in der Kontrollgruppe (Faktor 2). Dieser unterschiedliche Stärke des Abfalls ist konsistent mit der Einsicht, daß das Ausmaß der postoperativen Immunsuppression mit der Wahrscheinlichkeit einer postoperativen Sepsis korreliert. Dieser Unterschied zwischen beiden Gruppen ist allerdings nicht signifiant.

Die Expression der mRNA von KLRD1, welches Teil eines inhibierenden NK-Rezeptorheterodimers ist, zeigt eine gegenläufige Tendenz. Die Expression von KLRD1 zeigt in der Fallgruppe einen Anstieg um den Faktor 2 von präoperativ zum 2. Tag postoperativ. Die Expression in der Kontrollgruppe ändert sich nicht.

Die Genexpression von Granulysin zeigte eine ähnliche Tendenz und steigt postoperativ in der Fallgruppe tendenziell leicht an, wohingegen sie in der Kontrollgruppe unverändert bleibt.

Tabelle 7. Genexpression von Granulysin, NKG2D und KLRD1 (CD94)

Mediator	Gruppe	Präoperativ	1. Tag postoperativ	2. Tag postoperativ
Granulysin	Fall	1,05 (0,48-2,46)	1,17 (0,3-3,11)	1,39 (0,39-6,57)
	Kontrolle	1,01 (0,31-1,81)	0,9 (0,31-1,57)	0,96 (0,39-1,93)
NKG2D	Fall	1,05 (0,41-2,71)	0,27 (0,03-1,68)	0,26 (0,06-1,78)
	Kontrolle	0,97 (0,33-3,73)	0,57 (0,17-1,53)	0,49 (0,12-1,4)
KLRD1	Fall	0,97 (0,38-2,69)	1,21 (0,35-3,68)	1,93 (0,33-3,27)
	Kontrolle	1,05 (0,33-2,19)	1,15 (0,35-3,52)	1,16 (0,38-3,71)

Die Werte stellen auf HPRT normalisierte Expressionswerte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode dar. Gezeigt werden jeweils der Median sowie in Klammern die Minimal- und Maximalwerte.

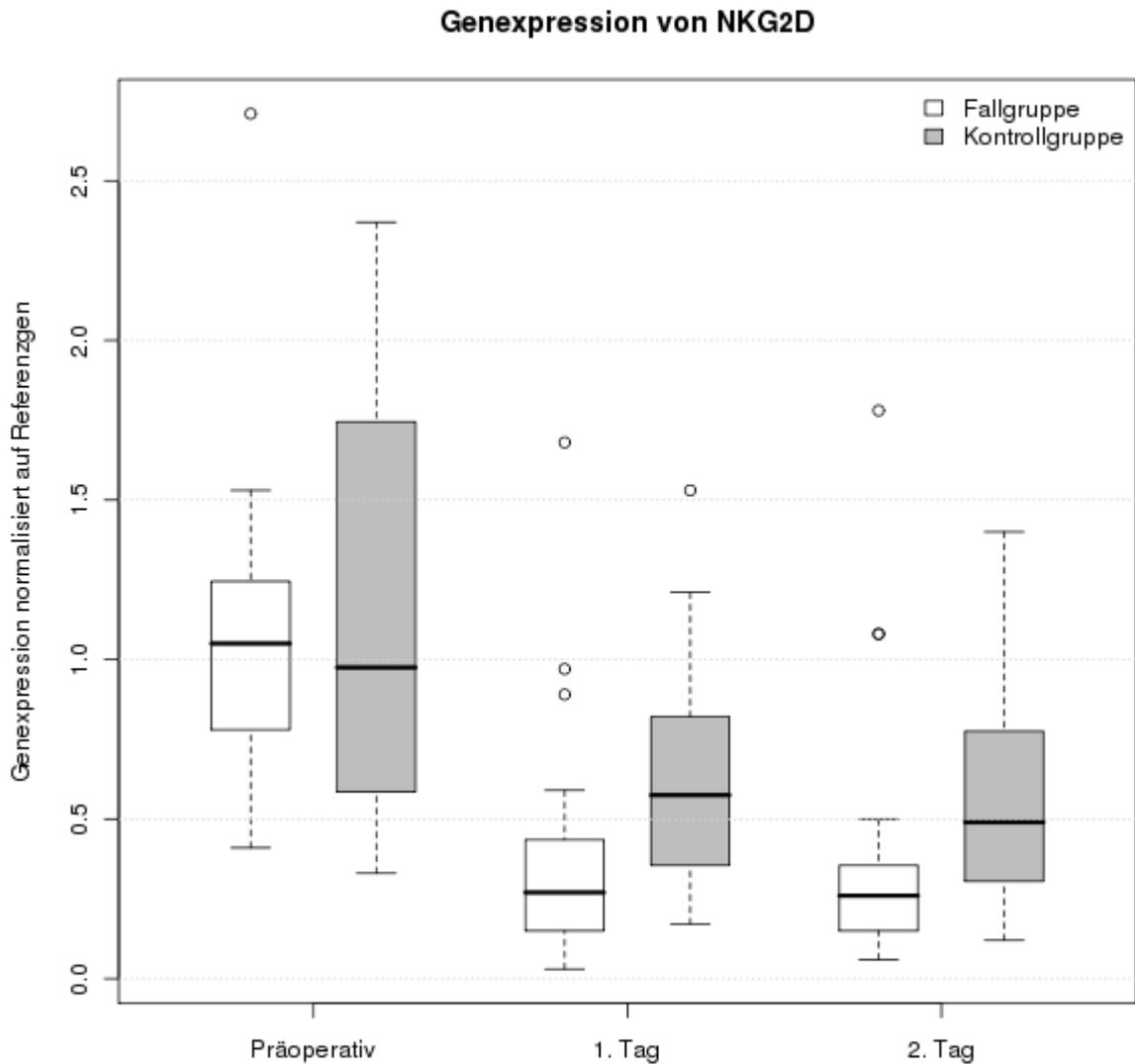


Abbildung 3. Genexpression von NKG2D.

Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile und Extremwerten. Die Kreise bezeichnen die Ausreißer.

Postoperativ kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Expression in beiden Gruppen, die in der Fallgruppe stärker ausgeprägt ist. Der Expressionsunterschied zwischen den Gruppen ist nicht signifikant.

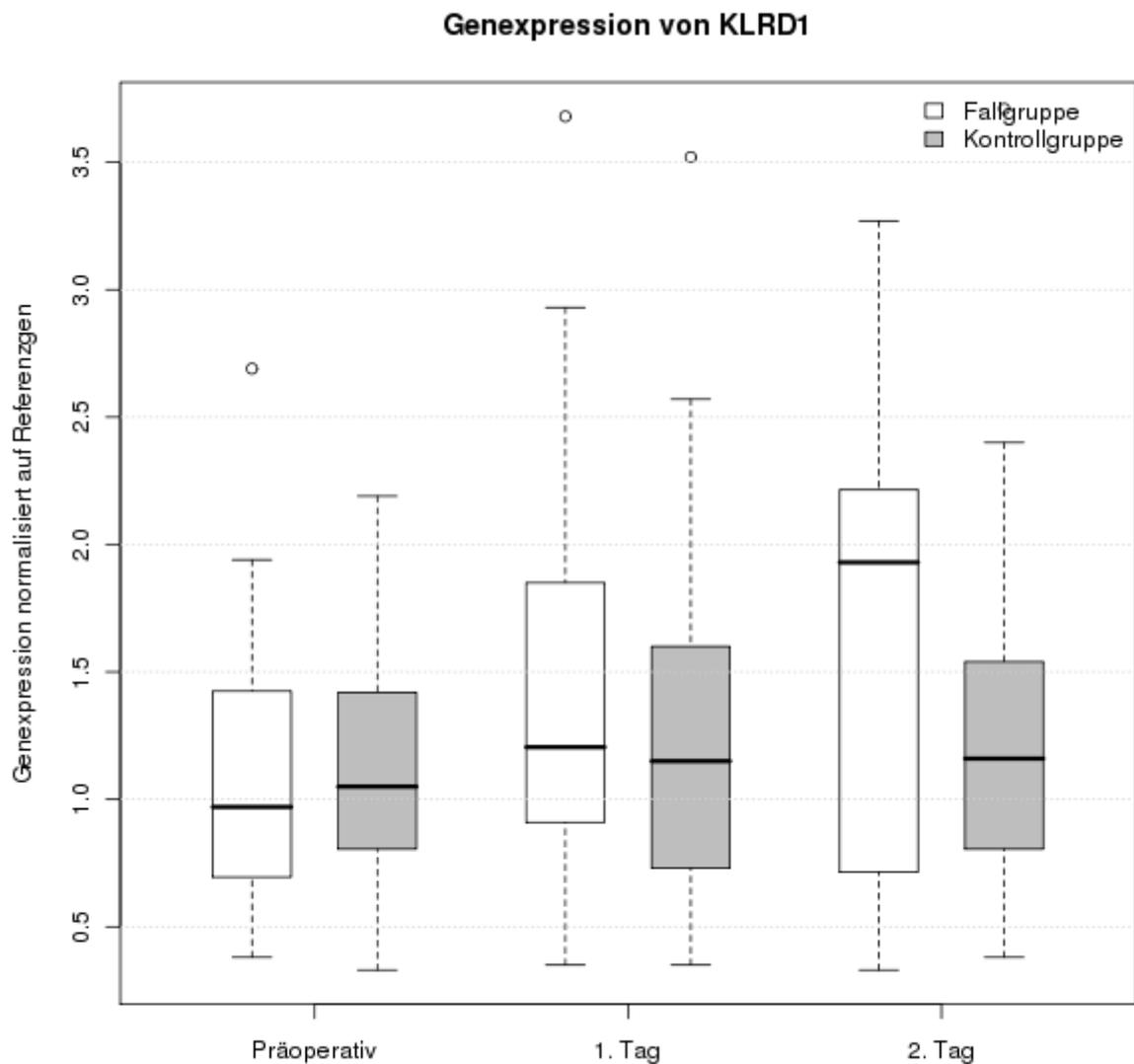


Abbildung 4. Genexpression von KLRD1 (CD94).

Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile und Extremwerten. Die Kreise bezeichnen die Ausreißer.

Die Expression von KLRD1 zeigt einen Anstieg des Medians in der Fallgruppe am 2. postoperativen Tag bei insgesamt breiter Streuung der Werte. Die Expression in der Kontrollgruppe bleibt unverändert. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

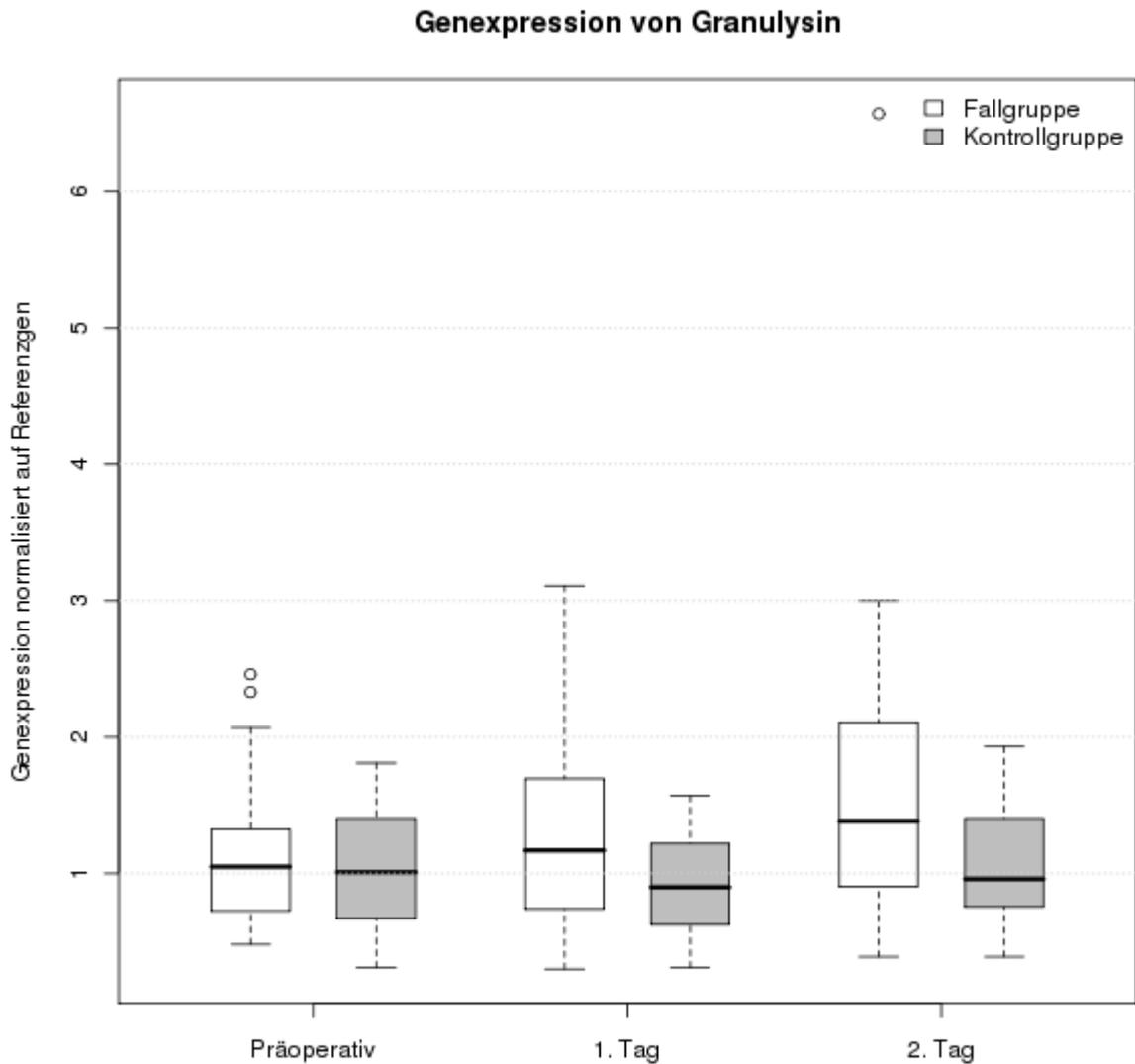


Abbildung 5. Genexpression von Granulysin.

Box-Whisker-Plots mit Median, 25ster und 75ster Perzentile und Extremwerten. Die Kreise bezeichnen die Ausreißer.

In der Fallgruppe kommt es zu einem geringfügigen Anstieg im Median postoperativ, die Kontrollgruppe zeigt keine Veränderungen. Auch hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen.

Tabelle 8. Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.

Messzeitpunkte	NKG2D	KLRD1	Granulysin
Präoperativ vs. Tag 1 postoperativ	0,00	0,00	0,57
Präoperativ vs. Tag 2 postoperativ	0,00	0,01	0,05
Tag 1 vs. Tag 2 postoperativ	0,33	0,92	0,02
P-Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet. Untersucht wurden die Unterschiede in der Genexpression zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten. Hierbei wurden die Messergebnisse nicht nach Studiengruppen unterteilt. Statistische Signifikanz wurde bis $0,05/3=0,016$ angenommen.			

Tabelle 9. Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

Messzeitpunkte	NKG2D	KLRD1	Granulysin
Präoperativ	0,70	0,94	0,31
Tag 1 postoperativ	0,06	0,46	0,04
Tag 2 postoperativ	0,09	0,15	0,13
P-Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet. Untersucht wurden die Unterschiede in der Genexpression zwischen den Studiengruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Statistische Signifikanz wurde bis $0,05/3=0,016$ angenommen.			

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wird mit der Genexpressionsmessung mittels real-time Reverse Transkriptase-PCR ein neuer Ansatz zur Sepsisprädiktion vorgestellt. Anhand der Genexpressionsanalyse von Transkripten zytotoxischer Zellen wird untersucht, ob die perioperative Veränderung in der Genexpression immunologisch relevanter Gene Rückschlüsse auf die individuelle Prädisposition eines Patienten, postoperativ eine Sepsis zu entwickeln, zulässt. Es ist bereits hinlänglich bekannt, daß ein operatives Trauma typische Veränderungen des Immunsystems im Sinne einer systemischen Entzündungsreaktion und kompensatorischer Immundepression hervorruft. Dabei wird die Frage aufgeworfen, weshalb bei vergleichbarem Trauma gewisse Individuen eine postoperative Sepsis entwickeln, andere hingegen einen unkomplizierten postoperativen Verlauf zeigen. Dies lässt darauf schließen, daß es relevante interindividuelle Unterschiede in der Reaktion auf Trauma gibt. Neu an unserem Ansatz ist daher auch der zeitliche Aspekt, da eine Prädiktion bereits zu einem frühen Zeitpunkt erfolgen soll.

4.1 Prädiktion mittels rt-PCR

Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion hat als Goldstandard der mRNA-Bestimmung Einzug in die klinische Routinediagnostik genommen. Auch in der Forschung scheint diese Methode aufgrund ihrer höheren Sensitivität und Spezifität die verbreiteten microarray-Techniken zu verdrängen (73). Sie ist in der klinischen Anwendung weit verbreitet, da sie in der moderneren automatisierten Form zeit- und kosteneffektiv ist und nur eine einfache Blutentnahme erforderlich ist. In einer Übersichtsarbeit zum Genexpressions-“profiling“ in der Sepsisdiagnostik kommen Tang et al. zu der Schlußfolgerung, daß Genomanalysen zur Sepsisdiagnostik mittels rt-PCR schon bald klinische Routine werden könnten (80). Auch im Vergleich zu der Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten mittels FACS-Analyse ist das Verfahren vorteilhaft, da bei letzterer die Proben unmittelbar nach der Abnahme verarbeitet werden müssen, was im klinischen Alltag nicht praktikabel ist (45).

Eine andere genomische Betrachtungsweise sind funktionale Genomanalysen mittels DNA-Array-Techniken. Im Unterschied zur rt-PCR können hierbei sehr große Genmengen betrachtet werden. Pachot et al. haben das komplette Genom von Vollblutproben hinsichtlich der Vorhersagewahrscheinlichkeit des Outcome nach Auftreten einer Sepsis analysiert (72). Für die

Genexpressionsanalyse mittels rt-PCR ist ein solches „blood transcriptional profiling“ wertvoll, da dadurch sinnvolle Kandidatengene ausgewählt werden können.

Die Betrachtung der Genexpression lässt Rückschlüsse über den funktionellen Status von Immunzellen zu und gestattet daher besseren Einblick in die Regulation des Immunsystems als die isolierte Betrachtung des Genoms wie beispielsweise bei der Untersuchung von Genpolymorphismen oder die Messung von Zytokinplasmaspiegeln, die letztlich nur eine Momentaufnahme, die zahlreichen Einflüssen unterworfen ist, darstellen. Daher hat diese Methode außerdem das Potential, bessere funktionelle Einblicke in die Pathophysiologie der Sepsistentstehung zu gewähren.

4.2 Genexpression von NKG2D

Die Untersuchung der drei Marker NKG2D, KLRD1 und Granulysin geben Auskunft über den funktionellen Status von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxischen T-Lymphozyten, den primären Effektorzellen der zellvermittelten Immunität.

NKG2D ist der am besten untersuchte aktivierende Rezeptor auf zytotoxischen Zellen, der bei Bindung an durch zellulären Stress induzierte Liganden die Zytolyse auslöst. Er wird vor allem auf NK-Zellen, aber auch auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert. In der vorliegenden Studie zeigt sich ein signifikanter Abfall der Genexpression an beiden postoperativen Tagen in Bezug auf den präoperativen Ausgangswert.

Der signifikante Abfall der Genexpression von NKG2D perioperativ ist konsistent mit den bereits beschriebenen Auswirkungen des operativen Traumas auf die zellvermittelte Immunabwehr (50),(49). Das gegenläufige Verhalten der Expression von KLRD1 als inhibitorischen NK-Rezeptor bestätigt ebenfalls die Plausibilität der hier gewonnenen Daten. Im Rahmen dieser Studie sind weitere NK- und T-Zell-assoziierte Gene untersucht worden, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind: CD3, CCR3, CD69 als T-Zell-assoziierte Gene und Perforin als NK-Zell-assoziiert. Die Expression dieser Gene zeigt die gleiche Tendenz mit signifikanter Verminderung vom präoperativen zum postoperativen Zeitpunkt, wobei der deutlichste Abfall in der Expression CD3 und Perforin betrafen (81).

Es ist bereits nachgewiesen worden, daß postoperativ die T-Zellfunktion und die Aktivität von NK-Zellen vermindert sind (51). Auch kommt es bei größeren operativen Eingriffen zu einer absoluten und relativen Abnahme der T- und NK-Zellzahl (82). Zwar kommt es postoperativ im

Regelfall zu einem Anstieg der Gesamtleukozytenzahl, die aber hauptsächlich auf der vermehrten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und deren unreifer Vorstufen aus dem Knochenmark beruht. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, kam es auch bei den hier untersuchten Patienten zu einem typischen Anstieg der Gesamtleukozytenzahlen (von durchschnittlich 7800/ μ l präoperativ auf 12900/ μ l am ersten und 13000/ μ l am zweiten postoperativen Tag). Der Verlauf der Leukozytenzahlen zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Durchführung eines Differentialblutbildes ist in unserem Fall nicht erfolgt, daher kann hier kein Rückschluß darauf erfolgen, zu welchem Anteil der starke Abfall der Genexpression auf einer realen Verminderung der Transkriptionsrate beruht.

Festzuhalten bleibt jedoch, daß die Verminderung der Genexpression in der Fallgruppe deutlich ausgeprägter ist als in der Kontrollgruppe. Auch wenn der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant ist, so zeigt es doch, daß es in der Sepsisgruppe zu einer stärkeren funktionellen Beeinträchtigung der zellvermittelten Immunität gekommen ist. Dies spiegelt sich auch in der Arbeit von Ditschkowski et al. wieder, in der eine verminderte NK-Zellzahl nach schwerem Trauma mit der Wahrscheinlichkeit, eine Sepsis zu entwickeln, korreliert (83). Dies entspricht der Erkenntnis, daß eine fehlregulierte Immunantwort auf operatives Trauma, die in einer Immunsuppression resultiert, ein wichtiger Bestandteil der Entstehung postoperativer Sepsis ist. Auch bei bereits bestehender Sepsis steigt die Überlebenschance bei höheren NK-Zellzahlen (84).

Weitere Studien beziehen sich nicht auf die absoluten Zellzahlen, sondern betrachten die Zytotoxizität von NK-Zellen. Eine vergleichende Untersuchung von gesunden und an einer Sepsis erkrankten Neugeborenen zeigte eine dramatische Verringerung der NK-Zell-Zytotoxizität in der Sepsisgruppe (85). In einer Studie zur frühen Diagnose neonataler Sepsis und deren Outcome zeigte sich neben den NK-Zellzahlen eine reduzierte NK-Zytotoxizität als prädiktiver Marker, der in Sensibilität und Sensitivität der üblichen Bestimmung von CRP und IL-8 überlegen war (86). Kritisch anzumerken ist hierbei, ob die Messung der Zytotoxizität von NK-Zellen mittels Chrom-Release-Assay nicht zu aufwändig für die klinische Routine ist.

4.3 Genexpression von KLRD1

KLRD1, synonym mit CD94, ist als invariable Kette integraler Bestandteil der CD94/NKG2-Rezeptorfamilie. CD94/NKG2-Rezeptoren werden auf NK-Zellen und auf einigen zytotoxischen

T-Zellen exprimiert (56). Fünf verschiedene NKG2-Molekültypen (NKG2A, B, C, E und H) bilden Heterodimere mit CD94. CD94/NKG2A besitzt unter diesen die höchste Bindungsaffinität an den gemeinsamen Liganden HLA-E und ist der am besten untersuchte. Es ist der prominenteste inhibierende NK-Zellrezeptor und daher als Gegenspieler zu NKG2D anzusehen.

Die Genexpression von KLRD1 steigt perioperativ tendenziell an, ohne daß diese Veränderung signifikant ist. Da es auch keine eindeutigen Unterschiede im Expressionsverlauf zwischen beiden Studiengruppen gibt, sind die Veränderungen auf die Auswirkungen des operativen Traumas auf die zellvermittelte Immunabwehr (50) zurückzuführen. Da nach größeren chirurgischen Eingriffen die absoluten und relativen T- und NK-Zellanzahlen abfallen (82), wird der Anstieg der Genexpression vermutlich unterschätzt. Hier kommt erneut das oben erwähnte Problem der fehlenden Bestimmung eines Differentialblutbildes zum Tragen.

Es gibt bislang keine weiteren Untersuchungen zu KLRD1 als Marker für Diagnose, Prädiktion oder Verlauf einer Sepsis, aber aufgrund der Relevanz der CD94/NKG2-Rezeptoren hinsichtlich der Modulation der NK-Zell- und T-Zellantworten spielen sie eine wichtige klinische Rolle bei Infektionen, Malignomerkrankungen und Knochenmarktransplantationen.

Ein typischer Mechanismus bei viraler Infektion ist die Reduktion der MHC-I-Expression der infizierten Zelle, um einen Angriff zytotoxischer T-Lymphozyten zu vermeiden. Diese evolutionäre Adaptation zeigen auch Tumorzellen. NK-Zellen werden als evolutionäre Antwort des Immunsystems hierauf verstanden, da sie durch MHC-I-Verlust aktiviert werden (56). Bei Infektion mit humanem Cytomegalievirus (HCMV) führen Virusprodukte zu einer Verringerung der MHC-I-Expression, während die HLA-E-Expression nicht beeinträchtigt wird, sodaß diese Zellen resistent gegenüber CD94/NKG2A-tragenden NK-Zellen sind (87).

Ähnlich verhält es sich bei einer Infektion mit HIV-1. Hierbei zeigt sich eine selektive Verminderung der HLA-A- und HLA-B-Expression (88), wohingegen die HLA-E-Expression sogar erhöht wird, um einem Angriff von sowohl zytotoxischen T-Zellen als auch NK-Zellen auszuweichen (89). So wird die NK-Zelle durch den CD94/NKG2A-Rezeptor inhibiert. Auch zeigen Patienten mit einer höheren Zahl CD94/NKG2A exprimierender CD8⁺ Lymphozyten einen schwereren Verlauf der HIV-Infektion. Entsprechende Muster des selektiven HLA-Verlusts zeigen sich bei chronischer Hepatitis C (90).

Bei malignen Erkrankungen zeigt sich oftmals eine erhöhte CD94/NKG2A-Expression auf zytotoxischen T-Zellen, wodurch die Tumorzellen der Lyse entgehen. Dies zeigte sich unter anderem beim Malignen Melanom (91), Zervixkarzinom (92) und ovariellen Karzinom (93).

4.4 Genexpression von Granulysin

Granulysin ist das Produkt zytotoxischer T-Lymphozyten und NK-Zellen nach deren Stimulation durch IL-2 und wirkt sowohl zytotoxisch als auch regulierend auf andere Zellen des Immunsystems, auch auf die adaptive Immunabwehr.

Es wird als eine 15-kDa-Vorstufe synthetisiert und wird in den Granulae zu einem 9-kDa-Protein verarbeitet. Darüber hinaus wird die 15-kDa-Form auch direkt durch Exozytose sezerniert, die biologische Aktivität dieser Form ist unklar. Mittels monoklonaler Antikörper konnte nachgewiesen werden, daß diese Form von Granulysin im Serum gesunder Menschen vorzufinden ist, und daß die Konzentration im Serum mit dem allgemeinen Aktivitätsniveau von NK-Zellen und CTL korreliert.

Die Zytotoxizität richtet sich vor allem gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und Parasiten. Dabei können insbesondere auch intrazelluläre Keime abgetötet werden, wichtiges Beispiel ist *Mycobacterium tuberculosis*. Andere humanpathogene Keime, bei denen eine direkte zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte, sind unter anderem *Mycobacterium leprae*, *Cryptococcus neoformans* und *Plasmodium falciparum*. Gegen mit Varizella-Zoster-Virus infizierte Zellen wirkt es, indem es dort Apoptose induziert. Diese *in vitro* nachgewiesenen Wirkungen lassen allerdings keinen Rückschluss über tatsächlichen Stellenwert von Granulysin in der Infektabwehr *in vivo* zu.

Darüber hinaus können auch von Tumoren befallene Zellen abgetötet werden; so zeigen Patienten mit Tumorerkrankungen ein besseres Outcome, wenn ihre peripheren NK-Zellen Granulysin produzieren (61). Allerdings ist Perforin das weitaus wichtigere Molekül hinsichtlich der Elimination von Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, daß Tumorzellen sehr viel empfänglicher für eine Lyse durch Granulysin sind, rote Blutzellen werden beispielsweise auch bei sehr hohen Konzentrationen nicht lysiert. Dies ist konsistent mit der Erkenntnis, daß granulysin-vermittelte Zytotoxizität das Vorhandensein von Mitochondrien voraussetzt. Daher sind beispielsweise Retikulozyten wiederum empfänglich (94).

Zytotoxische T-Zellen spielen auch eine wichtige Rolle in der Abstoßungsreaktion von Transplantaten. Hierbei interagieren zytotoxische Zellen untereinander; so gibt es Hinweise darauf, daß NK-Zellen ein Trigger für die Autoreaktivität von T-Zellen sein können (95). Granulysin scheint ein geeigneter Biomarker zur Detektion einer Transplantatabstoßung zu sein. Die mRNA-Expression im Urin geht im Fall einer akuten Abstoßung dem Anstieg des Serum-Kreatinins voraus und eignet sich zur Prädiktion (96).

4.5 Risikostratifizierung bei präsymptomatischen Patienten

In der hier vorgestellten Studie wurde ein neuer zeitlicher Ansatz gewählt, da hier eine Möglichkeit vorgestellt werden soll, eine Risikostratifizierung von Patienten bereits vor dem Beginn eines septischen Geschehens vorzunehmen. Auch geht es um die Frage, ob eventuell eine genetische Prädisposition vorliegt, und wie man diese bestimmen kann. Da die Blutentnahmen auch präoperativ erfolgt sind, können Veränderungen der Genexpression durch den operativen Eingriff in Bezug zum Ausgangswert gesetzt werden.

Bisher gibt es nur sehr wenige Arbeiten, die eine solche Risikostratifizierung bereits vor dem Beginn einer Sepsis vorzunehmen versuchen. Ein ähnlicher Ansatz war bereits in der Arbeit von Lukaszewski et al. erfolgt (74): Hierbei wurde zum Zeitpunkt der Aufnahme mittels Real-Time reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion die Genexpression von IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , FasL und CCL2 bestimmt. Die insgesamt 92 Patienten hatten sich Prozeduren, die das Auftreten einer Sepsis wahrscheinlich machen, unterzogen (welche Eingriffe dies konkret beinhaltet, wird nicht beschrieben). In 83% der Fälle konnte ein Panel dieser sieben Marker das Entstehen einer Sepsis korrekt voraussagen.

Vorläufer dieser Idee waren andere Arbeiten, die den Fokus auf eine möglichst frühe Detektion einer Sepsis gelegt haben, auch dies bei Patienten, die bereits auf einer Intensivstation lagen (d.h. bereits in irgendeiner Form symptomatisch waren) oder zumindest andere Symptome wie Fieber zeigten (75),(76). Sprung et al. konnten mit der SOAP-Study (97) zeigen, daß die Anzahl der positiven SIRS-Kriterien bei Aufnahme auf die Intensivstation prognostischen Wert hinsichtlich des weiteren Verlaufes hat. Insbesondere bei primär nicht infizierten Patienten war das Vorhandensein von mehr als zwei SIRS-Kriterien mit einem signifikant höherem Risiko verbunden, eine schwere Sepsis und/oder einen septischen Schock zu entwickeln.

Ein etabliertes Verfahren zur Risikoprädiktion einer Sepsis ist die Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten. Dies ist insbesondere für den Fall herzchirurgischer Eingriffe (98) und von Lebertransplantationen (99) beschrieben. Hier wird das Ausmaß der durch das chirurgische Trauma hervorgerufene Immunsuppression in Relation zum Outcome gesetzt. Die präoperative Ausgangslage wird nicht betrachtet, sodaß hier kein Rückschluß auf die individuelle Prädisposition zur Entwicklung septischer Verläufe erfolgen kann.

Unter der Vorstellung, daß es eventuell eine genetische Prädisposition zur Entstehung einer Sepsis gibt, wurden vielfach Genpolymorphismenanalysen durchgeführt. Untersuchte Polymorphismen betrafen beispielsweise die Gene von IL-1, IL-1-Rezeptor-Antagonist, TNF- β

und TNF-Promoter (Tabelle 10).

So konnte für Patienten mit einer homozygoten Form des TNF- β -Allels TNFB2 ein signifikant höheres Mortalitätsrisiko und höhere Spiegel an zirkulierendem TNF α nachgewiesen werden als die homozygote Form B1 oder die heterozygote Form B1/B2 (68). Höhere Spiegel an TNF α werden mit einer höheren Rate von Multiorganversagen bei septischen Patienten in Zusammenhang gebracht. Ähnliches gilt für die Präsenz des IL-1-Rezeptor-Antagonist-Allels IL-1raA2 (67). In den Genen von TNF α und IL-1 konnten sogenannte Hochrisikoallele gefunden werden, deren Existenz mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (100), (101).

Es konnte auch ein TLR4-Polymorphismus nachgewiesen werden (102), der mit einem erhöhten Risiko für schwere Sepsis einhergeht. TLR4 ist die Bindungsstelle für LPS, das Endotoxin gramnegativer Bakterien, und steht damit als Schlüsselmolekül der Erkennung bakterieller Antigene ganz am Anfang jeglichen septischen Geschehens.

Wurfel et al. konnten anhand eines TLR1-Polymorphismus eine erhöhte Empfänglichkeit betroffener Patienten bezüglich der Endpunkte Organdysfunktion, Tod und grampositiver Infektion mit Sepsis zeigen (103).

Tabelle 10: Genpolymorphismen

Genlokus	Quelle
IL-1-Gen-Polymorphismus	(67)
TNF- β -Gen-Polymorphismus	(104)(105)(68)
IL-1-Rezeptorantagonist-, TNF-Promoter-Polymorphismus	(100)(101)
Toll-like-Rezeptor 4	(102)
Toll-like-Rezeptor 1	(103)

Neben der Genomanalyse lassen sich auch funktionelle Genomanalysen durchführen, indem die Gesamtheit der mRNA, das Transkriptom, oder die Proteinmenge, das Proteom, betrachtet wird. Hauptanwendungsgebiet bislang ist die Krebsforschung, insbesondere die Tumorklassifikation. Eine der ersten Anwendungen war die Zuordnung von Proben an akuter Leukämie erkrankter Patienten (71). Hierbei findet eine Zuordnung zu myeloischen und lymphatischen Leukämien zuverlässiger statt als mittels Histopathologie. Auch im Bereich solider Tumoren gibt es zahlreiche Ansätze, heute besonders klinisch relevant ist u.a. die Brustkrebsklassifikation hinsichtlich der Mutationen des BRCA-Gens (106).

Diese Methode wird aber auch zunehmend dazu verwendet, um die genetischen

Veränderungen bei Inflammation und Sepsis zu verstehen und dadurch ein besseres Verständnis der Pathophysiologie zu erwirken. Auch erscheint aufgrund der Komplexität der Pathophysiologie eine Betrachtung einzelner Gene, Zytokine, etc. als nicht mehr ausreichend, um aussagekräftige Zusammenhänge herstellen zu können. Diese bisher vielfach verfolgte Strategie wird zunehmend von sogenannten „genomweiten“ Betrachtungen abgelöst. Eine Vielzahl von Studien wurden durchgeführt, um ein umfangreiches „Sepsis-Transkriptom“ zu erstellen (107).

Hinsichtlich der Prädiktion einer Sepsis stellt sich die Frage, ob diese Methode geeignet ist, den klinischen Verlauf (outcome) nach operativem Trauma abzuschätzen. Feezor et al. untersuchten Genexpressionsmuster in Leukozyten nach viszeraler Ischämie, hervorgerufen durch operative Versorgung thorakaler Aortenaneurysmen. Auch hier wurden bereits präoperativ Genexpressionsanalysen durchgeführt. Es war möglich, Gene zu identifizieren, deren Expression die Entwicklung eines Multiorganversagens nach chirurgischem Eingriff voraussagte (108). Dies waren vor allem Gene, die eine frühe Aktivierung der angeborenen Immunantwort bewirken. Einige Gene zeigten bereits präoperativ eine stark veränderte Expression, sodaß sie geeignet sein könnten, Patienten mit einer genetischen Disposition für die Entwicklung eines SIRS bzw. Multiorganversagens zu identifizieren. Auffällig ist hierbei, daß sich mit Ausnahme eines Genes die Gruppe der Gene, deren Expression sich perioperativ verändert, und die Gruppe der Gene, die das Outcome vorhersagen konnten, nicht überschneiden. Bemerkenswert ist, daß dies einer der ersten Ansätze ist, bereits präoperativ Genexpressionsanalysen durchzuführen, um tatsächlich das Entstehen einer Sepsis präzisieren zu können, wohingegen bei der Mehrzahl der Studien das outcome bei bereits eingetretener Sepsis vorhergesagt werden soll.

Tang et al. haben die Genexpression neutrophiler Granulozyten auf „Signaturgene“ einer Sepsis untersucht, wobei eine Auswahl von 50 Genen das Vorliegen einer Sepsis mit einer Vorhersagegenauigkeit von 88-91% identifizieren konnte (80). Auch scheint es mit dieser Methode möglich zu sein, Sepsis und SIRS zu unterscheiden; eine Unterscheidung, die klinisch oft nicht zu treffen ist.

In einer anderen Studie haben Pachot et al. ein sogenanntes „blood transcriptional profiling“ durchgeführt, indem die Genexpression des kompletten Genoms aus Vollblutproben analysiert wurde (72). Da in Vollblutproben Leukozyten die einzigen kerntragenden Zellen sind, handelt es sich faktisch um das Genom der Gesamtheit der Leukozyten einer Probe.

Dabei konnte eine Auswahl von 28 Genen das Überleben bzw. Versterben innerhalb von 24 Stunden nach Auftreten einer Sepsis mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 88% vorhersagen. Dies waren vorrangig proinflammatorische Gene, die in Überlebenden

signifikant stärker exprimiert wurden, welche die Pathogenerkennung, Zellmigrationsprozesse und Zytokine der proinflammatorischen Antwort kodierten. Die stärkste Diskrepanz in der Genexpression zeigte der Chemokinrezeptor CX3CR1. Dies zeigt, wie notwendig eine Erholung der proinflammatorischen Antwort für das Überleben in der Sepsis ist. Das wird unterstützt durch die Erkenntnis, daß die meisten Patienten eher im späteren Verlauf einer Sepsis, also in der Phase persistierender Immunsuppression versterben, während die initiale Stabilisierung meistens gelingt.

Interessant sind diese Methoden auch deshalb, da sie eine Auswahl weniger Kandidatengene einfacheren, verbreiteteren Methoden wie der quantitativen reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion zugänglich macht. Unverzichtbar ist diese Methode dank ihrer „genomweiten“ Betrachtungsweise für das Genexpressions- „profiling“. Hierbei muss kritisch angemerkt werden, daß eine derart genomweite Betrachtung nur zu einer Identifizierung von Kandidatengenen führen kann, welche dann in nachfolgenden Studien bestätigt werden müssen. Aufgrund der Vielzahl der hier untersuchten Gene ist aufgrund des Problems des multiplen Testens von falsch positiven Zusammenhängen auszugehen.

4.6 Klinische Relevanz der vorgestellten Studie und Ausblick

Schließlich stellt sich die Frage, ob die Messung der Expression der hier untersuchten Gene zur Prädiktion einer postoperativen Sepsis geeignet ist. Die Antwort muss im Kontext dieser Arbeit negativ ausfallen, da es zwar Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollgruppe gibt, diese aber nicht die nötige Signifikanz aufweisen, um Schwellenwerte bestimmen zu können, die über eine ausreichende prädiktive Aussagekraft verfügen. Andererseits hat die Beurteilung der Signifikanz aufgrund der fehlenden Fallzahlkalkulation ihre Limitation, sodaß ein Fehler 2. Art vorliegen könnte, der zu einer irrtümlichen Annahme der Nullhypothese führte. Auch lässt das Studiendesign keine eindeutigen Antworten zu, da im Sinne einer Pilotstudie eine retrospektive Matched-pair-Analyse mit relativ geringer Fallzahl vorgenommen wurde. Da es hier um die Generierung einer Arbeitshypothese ging, muss eine prospektive Studie mit ausreichender Fallzahl angeschlossen werden. Hierbei müsste dann auch eine strengere p-Wert-Korrektur erfolgen.

Diese Studie beschränkt sich auf die Analyse von Genexpressionsdaten. Um bessere pathophysiologische Einsichten zu gewinnen, wäre die Erhebung weiterer Messparameter wie

die Bestimmung von Zytokinplasmaspiegeln oder das Erstellen von Differentialblutbildern notwendig gewesen. Zwar wurden die absoluten Leukozytenzahlen zu drei Zeitpunkten gemessen, es wäre allerdings eine Differenzierung nach Leukozytensubpopulationen notwendig gewesen, um die Veränderungen der Genexpression zu interpretieren. Die Verschiebungen zwischen den Leukozytensubpopulationen haben großen Einfluß auf die Messergebnisse, ohne daß sich notwendigerweise die Genexpression pro Zelle verändert hat.

Die Auswahl anderer Kandidatengene im Rahmen der gleichen Studie zeigte deutlich bessere Ergebnisse, woraus sich schließen läßt, daß der hier vorgestellte methodische Ansatz vielversprechend ist (81). Hier zeigte die Expression der Gene CD3, TNF α , IL-1 β und Perforin zum entsprechenden Meßzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen.

Aufgrund der Komplexität der Wirtsantwort auf operativen Stress und der Pathogenese der Sepsis ist es auch unwahrscheinlich, daß die Betrachtung einzelner Faktoren zur Prädiktion genügen kann. Die vielfältigen Interaktionen zwischen Antigenerkennung, Immunantwort, Gerinnung und fibrinolytischem System lassen sich nicht auf einzelne Schlüsselmediatoren reduzieren. Tang et al. (80) haben diese Erkenntnis in Hinsicht auf prognostische und interventionelle Sepsisstudien beschrieben. Eine zukünftige spezifische Sepsistherapie wird nicht auf einer speziellen Intervention oder einem bestimmten Medikament beruhen können, hier liegt auch das Defizit der bisherigen Versuche, die Mortalität der Sepsis mittels einzelner Maßnahmen wie beispielsweise der Verabreichung von TNF α -Antikörpern zu verringern (die herkömmliche „ein Molekül-eine Diagnose- bzw eine Intervention-Methode“ (80)). Dies gilt auch für das immunologische Monitoring von Patienten, wo die zahlreichen prognostischen Studien der vergangenen Jahre gezeigt haben, daß die einseitige Betrachtung vereinzelter Marker (u.a. TNF α , IL-1 β , Procalcitonin, IL-6, IL-10) der Komplexität des Geschehens nicht gerecht wird (65). Obwohl die Plasmakonzentrationen dieser einzelnen Mediatoren in der Gruppe der Patienten mit oder ohne Sepsis, beziehungsweise in der Gruppe der Patienten, die eine Sepsis überleben oder daran versterben, erheblich differiert, gelingen damit keine individuellen Vorhersagen.

Bessere Ergebnisse können erzielt werden, wenn ein Panel besonders aussagekräftiger Marker zur Prädiktion verwendet wird. In der bereits erwähnten Arbeit von Lukaszewski et al. (74) konnte ein Panel, zusammengesetzt aus den Markern IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , FasL und CCL2 das Entstehen einer Sepsis bei asymptomatischen Patienten in 83% der Fälle richtig vorhersagen. Diese Studie ist mit einer Fallzahl von 92 ITS-Patienten allerdings eher im Sinne einer Pilotstudie zu verstehen und bedarf der Bestätigung durch weitere Studien.

Auch in der oben erwähnte Arbeit, in der im Rahmen derselben Studie andere Gene

untersucht wurden (81), konnte ein kombinierter Expressionstest der Gene CD3, TNF α und IL-1 β höhere Sensitivität und Spezifität erreichen als die Risikoprädiktion durch einzelne Gene. Vorbehaltlich der prospektiven Bestätigung konnte basierend auf einer Prävalenz von 20 Sepsisfällen in einer Studienpopulation von 220 Patienten durch geeignete Auswahl der Grenzwerte eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 90% erreicht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Sepsis beziehungsweise schwere Sepsis und septischer Schock gehören trotz größter intensivmedizinischer Bemühungen und extensiver Forschung auf diesem Gebiet zu den häufigsten Todesursachen der Industrienationen. Es ist davon auszugehen, daß Prävalenz und Inzidenz weiterhin noch steigen werden bei einer unvermindert hohen Mortalität von bis zu 50%. Die betroffenen Patienten bedürfen umfassender intensivmedizinischer Betreuung. Dadurch entstehen enorme Kosten, die eine erhebliche ökonomische Belastung der Gesundheitssysteme darstellen.

Ein wichtiger Schritt zur effektiven Bekämpfung dieser Probleme ist das Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie. Mit andauernder Grundlagenforschung haben sich im Laufe der Zeit auch die Konzepte, die unserem Verständnis der Sepsis zugrundeliegen, gewandelt. Aktuell ist die Vorstellung einer immunologischen Dissonanz mit einem gestörten Gleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Komponenten, wobei Hyperinflammation und Immunsuppression zeitgleich in verschiedenen Kompartimenten auftreten können. Mediatorvermittelt kommt es durch eine endotheliale Dysfunktion zu Organversagen und Schock.

Aufgrund der Komplexität der Vorgänge ist es bisher nicht gelungen, eine sepsisspezifische, kausale Therapie zu entwickeln. Diese Arbeit befasst sich mit der Prädiktion einer Sepsis als Folge eines operativen Traumas. Dabei wurde versucht, bereits zu einem besonders frühen Zeitpunkt eine septische Entgleisung zu detektieren, indem an den ersten beiden postoperativen Tagen Genexpressionsanalysen immunologisch relevanter Gene durchgeführt wurden. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf Transkripten zytotoxischer Zellen. Hierzu wird mit der realtime Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion eine in diesem Zusammenhang neue Technik vorgestellt.

Mittels einer retrospektiven Matched-pair Analyse wurde die Genexpression von Granulysin, NKG2D und KLRD1 von Patienten, die eine postoperative schwere Sepsis entwickeln mit derjenigen von Patienten, die bei vergleichbarem Trauma keine Sepsis entwickelten, verglichen. Hierzu wurde insgesamt 220 Patienten, die sich größeren abdominal- oder thoraxchirurgischen Eingriffen unterzogen, rekrutiert. Von 209 Patienten mit vollständigem Datensatz entwickelten 20 Patienten eine postoperative Sepsis, darunter 16 eine schwere Sepsis. Diesen 20 Fällen wurden aus der Gruppe der asymptomatischen Patienten 20 Kontrollen zugeordnet.

Die Genexpression von NKG2D, einem aktivierenden NK-Zellrezeptor, zeigt einen signifikanten Abfall an beiden postoperativen Tagen in Bezug auf präoperativ in beiden Gruppen. Die Expression der mRNA von KLRD1, welches Teil eines inhibierenden NK-Rezeptorheterodimers ist, zeigt eine gegenläufige Tendenz. Perioperativ zeigt die Expression von Granulysin als Produkt zytotoxischer T-Lymphozyten und NK-Zellen keine relevanten Veränderungen. Zwischen den beiden Studiengruppen zeigen sich keine relevanten Unterschiede, sodaß die in dieser Arbeit vorgestellten Kandidatengene zur Prädiktion einer postoperativen Sepsis nicht geeignet erscheinen.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht in

Hinrichs C, Kotsch K, Volk HD, Buchwald S, Habicher M, Saak N, Gerlach H, Keh D. Gene Expression Profiling For Risk Assessment of postoperative Sepsis. Abstract 19th ESICM Annual Congress - Barcelona, Spain - 24-27 September 2006, Intensive Care Medicine 2006, Suppl. 1, S128.

Hinrichs C, Kotsch K, Buchwald S, Habicher M, Saak N, Gerlach H, Volk HD, Keh D. Perioperative gene expression analysis for prediction of postoperative sepsis. Clin Chem 2010; 56(4), 613-622

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APACHE	Acute Physiology and Chronic Health
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
ASA	American Society of Anaesthesiologists
BE	Base excess
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CCR3	CC-Motive-Chemokine-Rezeptor 3
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CXCL	CXC –Motive-Chemokine-Ligand
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FasL	Fas Ligand
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCS	Glasgow coma scale
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
ICU	Intensive Care Unit
IFNg	Interferon gamma
IL	Interleukin
IP-10 I	nterferon-inducible Peptide 10
ITS	Intensivstation
KLRD	killer cell lectin-like receptor subfamily D
LODS	Logistic Organ Dysfunction System
LPS	Lipopolysaccharid

MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrome
MCP	Monocyte Chemotactic Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Macrophage migration Inhibitory Factor
MIP-1a	Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multiple Organ Failure
NKIS	Natural killer immunologic synapse
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCT	Procalcitonin
PAF	Platelet Activating Factor
PGE	Prostaglandin E

PPPD	Pyloruserhaltende Pancreaticoduodenotomie
RNA	Ribonucleic Acid
rt-PCR	Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SBP	Systolischer Blutdruck
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SOCS	suppressor of cytokine signaling proteins
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
TCR	T-Cell-Receptor
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-like Receptor
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
ULBP	UL16-Binding Protein

LITERATURVERZEICHNIS

1. Brunkhorst FM. Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41, 43-44
2. Bone RC, Balk RA et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992; 101, 1644-1655
3. Levy MM, Fink MP et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29, 530-538
4. Schottmüller H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandlung der 31. Deutschen Kongresses für Innere Medizin* 1914; 31, 257-80
5. Schuster HP, Müller-Werdan U. Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. In: *Sepsis und MODS*. Springer Berlin Heidelberg 2005
6. Gerlach H. Von Roger Bone zu PIRO. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41, 32-34
7. Bone RC. Sir Isaac Newton, Sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 163(2), 316-321
8. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125(8), 680-687
9. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *NEJM* 2003; 348(2), 138-150
10. Nelson S. A question of balance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159, 1365-7
11. Elenkov IJ et al. Cytokine Dysregulation, Inflammation and Well-Being. *Neuroimmunomodulation* 2005; 12, 255-269
12. Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. *NEJM* 1996; 334, 1697-702
13. Abraham E, Wunderink R, Silverman H et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome: a randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *JAMA* 1995; 273, 934-41
14. Deitch EA. Animal models of Sepsis and Shock: A review and lessons learned. *Shock* 1998; 9, 1-11
15. Janeway CA, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 1998; 10, 349-350

16. Wang JE et al. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce α , IL-6 and IL-10 production in both T-cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun* 2000; 68, 3965-2970
17. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420(6917), 885-91
18. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112, 321S-329S
19. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406, 782-787
20. Rivers E et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *NEJM* 2001; 345(19), 1368-1377
21. Okajima K. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol. Rev.* 2002; 184, 258-274
22. Hotchkiss RS et al. Apoptotic cell death in patients in with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27, 1230-1251
23. Hotchkiss RS et al. Sepsis induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001; 166, 6952-6963
24. Hotchkiss RS et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96, 14541- 14546
25. Hartung T, Docke WD, Gantner F et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood* 1995; 85, 2482-2489
26. Marik PE, Zaloga GP. Immunonutrition in High-Risk Surgical Patients: A Systematic Review and Analysis of the Literature. *JPEN* 2010; 34(4), 378-386
27. Mizock BA. Immunonutrition and critical illness: An update. *Nutrition* 2010; 26, 701-707
28. Meisel C et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Ctir Care Med* 2009; 180(7), 640-8
29. Gennari R, Alexander JW, Eaves-Pyles T. IFN- γ decreases translocation and improves survival following transfusion and thermal injury. *J Surg Res* 1994; 56, 530-536
30. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997; 3(6), 678-81
31. Kox WJ et al. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med* 1997; 157(4),

32. Hoffmann H, Markewitz A, Kreuzer E et al. Pentoxifylline decreases the incidence of MOF in patients after major cardio-thoracic surgery . Shock 1998; 9, 235-240
33. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today 1994; 15, 74-80
34. Ohzato H, Yoshizaki K, Nishimoto N, et al. IL-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of IL-6 and CRP after surgery. Surgery 1992; 111, 201-209
35. Hildebrandt U, Kessler K, Pluscyk T, et al. Comparison of surgical stress between laparoscopic and open colonic resections. Surg Endosc 2003; 17, 242-246
36. Boldt J, Ducke M, Kumle B, Papsdorf M, Zurmeyer EL. Influence of different volume replacement strategies on inflammation and endothelial activation. Intensive Care Med 2004; 30, 416-422
37. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis: hemodynamics, oxygen transport and nitric oxide. Crit Care 2003; 7, 359-373
38. Roumen RM, van der Vliet JA, Wevers RA, Goris RJ. Intestinal permeability is increased after major vascular surgery. J Vasc Surg 1993; 17, 734-37
39. Marshall JC et al. The gastrointestinal tract: the "undrained abscess" of multiple organ failure. Ann Surg 1993; 218, 111-119
40. Shijo H et al. Evaluation of neutrophil functions after experimental abdominal surgical trauma. Inflamm Res 1998; 47, 67-74
41. Trzeciak S, Dellinger RP, Parillo JE et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. Ann Emerg Med 2007; 49, 88-98
42. Tilg H, Tremu E, Atkins MB. IL-6 as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. Blood 1994; 83, 113-118
43. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163(2), 316-21
44. Klava A, Windsor AC, Farmery SM et al. Interleukin 10: a role in the development of postoperative immunosuppression. Arch.Surg. 1997; 132, 425-429
45. Docke WD, Hoflich KA, Davis K, Rottgers C, Meisel P, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. Clin Chem 2005; 51(12), 2341-7
46. Monneret G et al. Persisting low monocyte antigen-DR expression predicts mortality in

- septic shock. *Intensive Care Med* 2006; 32(8), 1175-83
47. Heagy W, Hansen K, Nieman K, Cohen M, Richardson C, Rodriguez JL, West MA. Impaired ex vivo LPS-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify „septic“ intensive care unit patients. *Shock* 2000; 14(3), 271-6
 48. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J Immunol* 1998; 161(5), 2655-9
 49. Yamauchi H et al. Changes in immuno-endocrine response after surgery. *Cytokine* 1998; 10(7), 549-554
 50. Faist E. The mechanisms of host defense dysfunction following shock and trauma. In: Rietschel (Hrsg) *Pathology*. Springer New York 1996, 259-274
 51. 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(4), 405-410
 52. Backström E, Kristensson K, Ljunggren HG. Activation of Natural Killer Cells: Underlying molecular Mechanisms revealed. *Scand J Immunol* 2004; 60, 14-22
 53. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO* 2004; 23, 255-259
 54. Radaev S, Sun PD. Structure and Function of Natural Killer Cell Surface Receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003; 32, 93-114
 55. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391(6669), 795-99
 56. Borrego F et al. The CD94/NKG2 Family of Receptors: From Molecules and Cells to Clinical Relevance. *Immunologic Research* 2006; 35(3), 263-277
 57. Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transplant Immunology* 2002; 10, 147-164
 58. Alcover A, Alarcon B. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* 2000; 20(4), 325-346
 59. Borrego F, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes. *J Immunol* 2002; 169(11), 6102-6111
 60. Krensky AM, Clayberger, C. Granulysin: A Novel Host Defense Molecule. *Am J Transpl*

2005; 5, 1789-92

61. Deng A, Chen S, Qing L, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *The Journal of Immunology* 2005; 174, 5243-5248
62. Murray B, Fakhry SM, Cooney R, Rutledge R, Meyer AA. Comparison of ICU nurses clinical judgement and APACHE II score in predicting ICU outcome in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 1992; 20, 57
63. Büssow, S. Wade, R. Brause, E. Hanisch. Prognostische Beurteilung chirurgischer Intensivpatienten mit einem Neuronalen Netz. *Deutscher Chirurgenkongress, München, 1997*
64. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 1997; 65(6), 2283-91
65. Abraham E, Marshall JC. Sepsis and mediator-directed therapy: rethinking the target populations. *Mol Med Today* 1999; 5, 56-58
66. Punyadeera C et al. A biomarker panel to discriminate between systemic inflammatory response syndrome and sepsis and sepsis severity. *J Emerg Trauma Shock* 2010; 3(1), 26-35
67. Fang XM, Schroder S, Hoefft A, Stuber F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27, 1330–1334
68. Riese J, Woerner K, Zimmermann P, Denzel C, Hohenberger W, Haupt W. Association of a TNFbeta gene polymorphism with complications after major abdominal operations. *Shock* 2003; 19, 1–4
69. Stuber F, Klaschik S, Lehmann LE, Schewe JC, Weber S, Book M. Cytokine promoter polymorphisms in severe sepsis. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 7, 416-20
70. The International Human Genome Mapping Consortium. A physical map of the human genome. *Nature* 2001; 409, 934-41
71. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286, 531-7
72. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mouglin B, Monneret G. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunology Letters* 2006; 106, 63-71

73. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29, 23-39
74. Lukaszewski RA et al. Presymptomatic prediction of Sepsis in Intensive Care Unit Patients. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(7), 1089-94
75. Kabir K et al. Cytokines and chemokines in serum and urine as early predictors to identify septic patients on intensive care units. *Int J Mol Med* 2003; 12, 565-570
76. van Dissel JT, van Langenvelde P, Westendorp RGJ, Kwappenburg K, Frolich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 1998; 351, 950-953
77. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155, 335-350
78. Pfaffl M. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004; 1, 92-95
79. Livak K, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; 25(4), 402-8
80. Tang MP et al. The Use of Gene-Expression Profiling to Identify Candidate Genes in Human Sepsis. *Am J Respir Crit Care* 2007; 176, 676-684
81. Hinrichs C, Kotsch K, Buchwald S, Habicher M, Saak N, Gerlach H, Volk HD, Keh D. Perioperative gene expression analysis for prediction of postoperative sepsis. *Clin Chem* 2010; 56(4), 613-622
82. Cullen BF, van Belle G. Lymphocyte transformation and changes in leukocyte count: effects of anesthesia and operation. *Anesthesiology* 1975; 43, 563-569
83. Dischkowski ME, Kreuzfelder E, Majetschak M, Obertacke U, Schade UF, Grosse-Wilde H. Reduced B-cell HLA-DR expression and natural killer cell counts in patients prone to sepsis after injury. *Eur J Surg* 1999; 165(12), 1129-33
84. Giamarellos-Bourboulis EJ et al. Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Crit Care* 2006; 10(6), R166
85. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovács A, Kovács L, László A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr* 2001; 160(8), 478-82
86. el-Sameea ER, Metwally SS, Mashhour E, el-Bendary A, Hassan AM, el-Sharkawy H, el-Shennawy FA. Evaluation of natural killer cells as diagnostic markers of early onset neonatal sepsis: comparison with C-reactive protein and interleukin-8. *Egypt J Immunol* 2004; 11(1), 91-102

87. Llano M, Guma M, Ortega M, Angulo A, Lopez-Botet M. Differential effects of US2, US6 and US11 human cytomegalovirus proteins on HLA class Ia and HLA-E expression: impact on target susceptibility to NK cell subsets. *Eur J Immunol* 2003; 33(10), 2744-54
88. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, et al. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 1999; 10(6), 661-671
89. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, et al. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther* 2005; 10(1), 95-107
90. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35–44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 2005; 166(2), 443-453
91. Speiser DE, Pittet MJ, Valmori D, et al. In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1999; 190(6), 775-782
92. Sheu BC, Chiou SH, Lin HH, et al. Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumorinfiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(7), 2921-2929
93. Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, et al. IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2002; 110(10), 1515-23
94. Li Q, Dong C, Deng A. Hemolysis of erythrocytes by granulysin-derived peptides but not by granulysin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49, 388-397
95. Poggi A, Zocchi MR. Antigen presenting cells and stromal cells trigger human natural killer lymphocytes to autoreactivity. *Clin Develop Immunol* 2006; 13, 325-336
96. Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77, 1866-1975
97. Sprung CL, Sakr Y, Vincent J, Le Gall J, Reinhart K, Ranieri VM, Gerlach H, Fielden J, Groba CB, Payen D. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med* 2006; 32, 421-427
98. Oczenski W, Krenn H, Jilch R, Watzka H, Waldenberger F, Koller U, Schwarz S,

- Fitzgerald RD. HLA-DR as a marker for increased risk for systemic inflammation and septic complications after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2003; 29(8), 1253-7
99. Haveman JW, van den Berg AP, van den Berk JM, Mesander G, Slooff MJ, de Leij LH, The TH. Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis* 1999; 1(3), 146-52
 100. Mira JP, Cariou A, Grall F et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282, 561-568
 101. Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T. Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med* 2005; 33, 89-97
 102. Lorenz, E, Mira, JP, Frees, K L, Schwartz, DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162, 1028-1032
 103. Wurfel MM et al. Toll-like Receptor 1 Polymorphisms Affect Innate Immune Responses and Outcomes in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178, 710-20
 104. Kahlke V, Schafmayer C, Schniewind B, Seegert D, Schreiber S, Schroder J. Are postoperative complications genetically determined by TNF-beta gene polymorphism? *Surgery* 2004; 135, 365-373
 105. Majetschak M, Flohe S, Obertacke U et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999; 230, 207-214
 106. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene expression profiling in hereditary breast cancer. *NEJM* 2001; 344, 539-48
 107. Chinnaiyan et al. Molecular signature of Sepsis. *Am J Pathol* 2001; 159, 1199-209
 108. Feezor RJ, Baker HV, Xiao W, et al. Genomic and Proteomic Determinants of Outcome in Patients Undergoing Thoracoabdominal Aortic Aneurysm Repair. *J Immunol* 2004; 172, 7103-9

LEBENS LAUF

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

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin CCM/CVK danke ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Didier Keh für die fachliche Unterstützung und die Betreuung beim Erstellen dieser Arbeit. Dank gebührt auch Anne Gössinger für wertvolle praktische Tipps beim klinischen Teil der Arbeit und dafür, dass sie es versteht, in der Arbeitsgruppe Immunologie eine warmherzige Atmosphäre zu schaffen. Herrn Prof. Hans-Dieter Volk und Frau PD Dr. Katja Kotsch vom Institut für medizinische Immunologie Charité Campus Mitte danke ich für die Unterstützung und die Analyse der Laborproben, sowie Dr. Carl Hinrichs für die konstruktive Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe und Unterstützung bei der Auswertung der immunologischen Daten. Meinen Mit-Doktorandinnen Marit Habicher und Sandra Buchwald möchte ich schließlich für ihre Mitarbeit danken.

Meinem Mann Dr. Iván Kopilovic gebührt allergrößter Dank für andauernde Motivation und wertvolle Hilfestellung. Meinen Eltern danke ich schließlich für ihre fortwährende Unterstützung.

ERKLÄRUNG

„Ich, Nicole Saak, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Perioperative Genexpression von CD 94 (KLRD1), NKG2D und Granulysin zytotoxischer Lymphozyten als prädiktive Marker einer postoperativen Sepsis* 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

Nicole Saak