Genexpressionsanalyse septischer Patienten nach Polytrauma im Zeitverlauf

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Behling, Maike
aus Höxter
Gießen 2019

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
unter der Leitung von Prof. Dr. Trinad Chakraborty,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Trinad Chakraborty
Gutachter: Prof. Dr. Konstantin Meyer

Tag der Disputation: 29.06.2018

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1. Geschichte der Sepsis 1

1.1.1. Vom Altertum bis zur Neuzeit 1
1.1.2. Die Entwicklungen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts 2
1.1.3. Die Gegenwart 5
1.1.3.1. Sepsis-3 5
1.1.3.2. Epidemiologie 6

1.2. Ätiologie der Sepsis 7

1.2.1. Überblick Ursachen der Sepsis 7
1.2.2. Erregerspektrum der Sepsis 8
1.2.3. Das Polytrauma 8

1.3. Diagnostik 10

1.3.1. Einzelwerte 10
1.3.1.1. C-reaktives Protein und Leukozytenzahl 10
1.3.1.2. Serumprocalcitonin 10
1.3.1.3. Zytokine 10
1.3.1.4. Lipopolysaccharid bindendes Protein 11
1.3.2. Immunparalyse 11
1.3.3. Scoresysteme 11

1.4. Therapie 12

1.4.1. Polytraumatherapie und Sepsisprophylaxe 12
1.4.1.1. Das Advances Trauma Live Support Konzept 13
1.4.1.2. Das Damage-Control Prinzip 13
1.4.2. Therapie der Sepsis 13
1.4.2.1. Kausale Therapie 14
1.4.2.2. Supportive Therapie 14
1.4.2.3. Adjunktive Therapie 16

1.5. Allgemeine Pathophysiologie der Sepsis 17

1.5.1. Modellvorstellungen zur Ätiopathogenese 17
1.5.1.1. Two-Hit Theorie 18
1.5.1.2. Alarmine Danger-Model nach Matzinger 18

1.5.2. Inflammation versus Immunparalyse 19
1.6. Spezielle Pathophysiologie der Sepsis 21
1.6.1. Immunantwort 21
1.6.1.1. Angeborene Immunantwort 21
1.6.1.2. Antigenpräsentierende Zellen 23
1.6.1.3. Adaptive Immunantwort 24
1.6.2. Dysregulation plasmatischer Kaskaden 24
1.6.3. Gefäßschädigung 25
1.6.4. Apoptose 26
1.6.5. NO-Produktion 26
1.6.6. Mitochondriale Dysfunktion 27
1.6.7. Stoffwechselveränderungen 27
1.7. Microarray-Analysen 28
1.7.1. Validierung per Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction 30
1.8. Stand der Forschung 31
1.9. Ziele und Fragestellung 33
2. METHODEN 35
2.1. Aufbau der Studie 35
2.1.1. Studiendesign 35
2.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien 35
2.1.3. Messzeitraum 36
2.2. Ablauf des klinischen Teils 37
2.2.1. Monitoring auf der Intensivstation 37
2.2.2. Intensivmedizinische Maßnahmen 37
2.2.3. Operationen 38
2.3. Technische Durchführung des Microarrayexperiments 38
2.3.1. Auswahl der Patienten für die Microarrayanalyse 39
2.3.2. Probenentnahme und RNA Isolation 39
2.3.3. Durchführung der Array Hybridisierung 40
2.4. Analyse der Microarraydaten 42
2.4.1. Low-level-Analyse 42
2.4.1.1. Quantifizierung der Microarrays 42
2.4.1.2. Intra-Slide-Normalisierung 42
2.4.1.3. Inter-Slide-Normalisierung 43

2.4.1.4. Identifizierung differentiell regulierter Gene mit Rank Products 46
2.4.2. RT-PCR Validierung 47
2.4.3. High-level Analyse 48
2.4.3.1. SOURCE 48
2.4.3.2. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 49
2.4.3.3. PathwayExplorer 50
2.4.3.4. Ingenuity Pathway Analysis 51
2.4.3.5. dChip 53
2.4.4. Disease load index 53
2.4.5. Identifizierung von Biomarker-Genen 54
3. ERGEBNISSE 56
3.1. Allgemeine und technische Ergebnisse 56
3.1.1. Patienten und klinische Ergebnisse 56
3.1.2. Ergebnisse der Microarray-Analyse 58
3.1.3. Kumulative Expression (Disease load index) 59
3.2. Ergebnisse der RT-PCR-Validierung 60
3.3. Ergebnisse der programmbasierten Genexpressionsanalyse 63
3.3.1. SOURCE 63
3.3.2. DAVID 64
3.3.3. Ingenuity Pathway Analysis 66
3.4. Identifizierung von Biomarker-Genen 71
3.5. Ergebnisse der funktionsorientierten Analyse 73
3.5.1. Immunantwort bei Sepsis 73
3.5.2. Angeborene Immunantwort 75
3.5.2.1. Gesteigerte Antigenerkennung 76
3.5.2.2. Aktivierung von Zytokinen und ihrer Rezeptoren der angeborenen Immunität 78
3.5.2.3. Verminderte Chemotaxis 80
3.5.2.4. Verstärkte Aktivierung Neutrophiler Granulozyten 82
3.5.2.5. Verminderte Antigenpräsentation 84
3.5.3. Adaptive Immunabwehr 84
3.5.3.1. dChip-Cluster-Analyse der adaptiven Immunantwort 84
3.5.3.2. Verminderte Aktivierung der Zytokine und ihrer Rezeptoren der adaptiven Immunität 85
3.5.3.3. Verminderte T-Zell-Rezeptor-Funktion 87
3.5.3.4. Eingeschränkte Kostimulation und verstärkte Koinhibition von T-Zellen 89
3.5.3.5. Weitere Signalwege zeigen eine Suppression der T-Zell Funktion 90

3.5.3.6. Hypoxie als Ursache einer T-Zelldysfunktion 92
3.5.3.7. Verminderte Expression von B-Zell-Genen 94
3.5.3.8. Apoptotische Lymphozytendepletion 97
3.5.4. Dysregulation plasmatischer Kaskaden 100
3.5.4.1. Verminderte Aktivierung des Komplement Systems 100
3.5.4.2. Aktivierte Blutgerinnung in septischen Patienten 103
3.5.4.3. Verminderte Fibrinolyse in septischen Patienten 105
3.5.4.4. Verstärkte Thrombozytenaggregation 105
3.5.5. Mitochondriale Dysfunktion 107
3.5.5.1. Herunterregulation mitochondrialer Gene am Anfang des Zeitverlaufs 107
3.5.5.2. Vermehrter oxidativer Stress in septischen Patienten 108
3.5.5.3. Dysregulierte oxidative Phosphorylierung 108
3.5.5.4. Eingeschränkte Abwehrfunktion gegenüber oxidativem Stress 109
3.5.5.5. Verminderte β-Oxidation als Zeichen der Mitochondrialen Dysfunktion 111
3.5.6. Eingeschränkte Signaltransduktion bei septischen Patienten 113
3.5.6.1. Alteration der Proteinkinase A in septischen Patienten 113
3.5.6.2. Verminderte Expression der Proteinkinase D 114
3.5.6.3. Verminderte Wirkung von DAG und InsP3 114
3.5.6.4. Unterschiedliche Aktivierung der MAP-Kinasekaskaden 117
3.5.6.5. Eingeschränkte WASL-Signaltransduktion 120
3.5.6.6. Insulin-Signaltransduktion 120
3.5.6.7. Extrazelluläre Signaltransduktion 125
3.6. Überblick über die Ergebnisse der Zeitverlaufsanalyse 126
4. DISKUSSION 129
4.1. Diskussion der Methoden 129
4.1.1. Studiendesign 129
4.1.2. Arbeiten mit kleiner Stichprobe 130
4.1.3. Untersuchung des Zeitraums vor der klinischen Sepsismanifestation 130
4.1.4. Die Analyse des Zeitverlaufs 131
4.1.5. Die Untersuchung polytraumatisierter Patienten 131
4.1.6. Die Verwendung von Vollblut 132
4.1.7. Die Verwendung von Microarrays 133
4.1.8. Überlegungen zum FDR-Wert 134
4.2. Diskussion der Ergebnisse 135
4.2.1. Diskussion der allgemeinen und technischen Ergebnisse 135

4.2.1.1. Anzahl differentiell regulierter Gene 135
4.2.1.2. Zeichen der Rekonvaleszenz an Tag 9 135
4.2.1.3. Vergleich der Kumulativen Expression 136
4.2.2. Diskussion der programmbasierten Analyse 136
4.2.2.1. Funktionelle Gruppen aus einem breiten Sprektrum der Zellfunktionen 136
4.2.2.2. Biomarker zur Diagnostik und als mögliche Schlüsselgene zur Therapie 137
4.2.3. Diskussion der funktionsorientierten Analyse 138
4.2.3.1. Derangierte Immunantwort 138
4.2.3.2. Suppression des Adaptiven Immunsystems 140
4.2.3.3. Dysregulation plasmatischer Kaskaden 144
4.2.3.4. Rolle der Mitochondrialen Dysfunktion bei einer Sepsis 147
4.2.3.5. Eingeschränkte Signaltransduktion in septischen Patienten 148
4.2.4. Die Zeitverlaufsanalyse 151
5. KONKLUSION UND AUSBLICK 152
6. ZUSAMMENFASSUNG 153
7. ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY) 155
8. LITERATURVERZEICHNIS 157
ANHANG A: RESPONSE TO STIMULUS 171
ANHANG B: DCHIP-CLUSTER GENE (T-ZELL-GENE) 174
ANHANG C: VERWENDETE GENE 175
ANHANG D: STUDIENPROTOKOLL 179
ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION 256
DANKSAGUNG 257
TABELLARISCHER LEBENSLAUF 258

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: VERLAUF DER MORTALITÄTSRATE SEPTISCHER PATIENTEN SEIT 1979 6
ABBILDUNG 2: URSACHEN EINER SEPSIS 7
ABBILDUNG 3: POTENTIELLES UNGLEICHGEWICHT 18
ABBILDUNG 4: PATHOPHYSIOLOGISCHE PHASEN EINER SEPSIS 20
ABBILDUNG 5: DIE PROTEINBIOSYNTHESE, AUF DEM WEG VON DER DNA ZUM FERTIGEN PROTEIN 29
ABBILDUNG 6: ABLAUF DES MICROARRAYEXPERIMENTS 38
ABBILDUNG 7: ZEITPUNKTE DER PROBENGEWINNUNG FÜR DIE MICROARRAYANALYSEN 40
ABBILDUNG 8: TECHNISCHE SCHRITTE DER MICROARRAY-HYBRIDISIERUNG 41
ABBILDUNG 9: QUANTILEN NORMALISIERUNG 45
ABBILDUNG 10: DREI VERSCHIEDENE MODELLE FÜR DIE KONTROLLGRUPPE ZUR BERECHNUNG EINES FC-WERTES 47
ABBILDUNG 11: BEISPIEL FÜR EIN BALKENDIAGRAMM AN DER GENEXPRESSION VON CDADC1 AM ZEITPUNKT 1 55
ABBILDUNG 12: ANZAHL SIGNIFIKANT REGULIERTER GENE IM ZEITVERLAUF 58
ABBILDUNG 13: GRAPHISCHE AUFTRAGUNG DER ANZAHL DER ÜBERSCHNEIDUNGEN BEI DEN GENEN. 59
ABBILDUNG 14: KUMULATIVE EXPRESSION ÜBER ALLE GENE.....60
ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER FC-WERTE AUS MICROARRAY UND AUS RT-PCR AM TAG 0 61
ABBILDUNG 16: VERGLEICH DER FC-WERTE AUS MICROARRAY UND AUS RT-PCR AM TAG 1 61
ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER FC-WERTE AUS MICROARRAY UND AUS RT-PCR AM TAG 3 62
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER FC-WERTE AUS MICROARRAY UND AUS RT-PCR AM TAG 5 62
ABBILDUNG 19: VERGLEICH DER FC-WERTE AUS MICROARRAY UND AUS RT-PCR AM TAG 9 63
ABBILDUNG 20: FUNKTIONELLE EINTEILUNG DURCH SOURCE..... 64
ABBILDUNG 21: PROTEINLOKALISATION NACH SOURCE. 64
ABBILDUNG 22: ANCESTORCHART AUS DAVID. 65
ABBILDUNG 23: INGENUITY TOP FUNCTIONS D_0, 1 UND 3 70
ABBILDUNG 24: INGENUITY TOP FUNCTIONS TAG 5 UND 9 71
ABBILDUNG 25: GRAPHISCHE AUFTRAGUNG DER GENEXPRESSION VON CLEC2B..... 72
ABBILDUNG 26: GRAPHISCHE AUFTRAGUNG DER GENEXPRESSION VON TXNRD2..... 72
ABBILDUNG 27: VERLAUF DER PRO-INFLAMMATION IN SEPTISCHEN UND NICHT-SEPTISCHEN PATIENTEN 74
ABBILDUNG 28: VERLAUF DER ANTI-INFLAMMATION IN SEPTISCHEN UND NICHT-SEPTISCHEN PATIENTEN 74
ABBILDUNG 29: ZEITVERLAUF D. PRO- UND ANTI-INFLAMMATION BEI SEPTISCHEN PATIENTEN. 75
ABBILDUNG 30: ZEITVERLAUF D. PRO- UND ANTI-INFLAMMATION BEI NICHT-SEPTISCHEN PATIENTEN. 75
ABBILDUNG 31: ANTIGENERKENNUNG MIT AKTIVIERUNG VON NF-KB. 76
ABBILDUNG 32: INTERLEUKIN 1 METABOLISMUS 78

ABBILDUNG 33: CCL-5 METABOLISMUS..... 81
ABBILDUNG 34: DCHIP-CLUSTER DER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT..... 85
ABBILDUNG 35: HYPOXIE UND T-ZELL-FUNKTION 93
ABBILDUNG 36: ÜBERBLICK ADAPTIVE IMMUNANTWORT. 96
ABBILDUNG 37: APOPTOSE. 99
ABBILDUNG 38: KOMPLEMENT SYSTEM, MODIFIZIERT NACH KEGG 102
ABBILDUNG 39: GERINNUNGSKASKADE UND FIBRINOLYSE, MODIFIZIERT NACH KEGG 104
ABBILDUNG 40: DISEASE LOAD INDEX DER MITOCHONDRIALEN GENE ALS AUSDRUCK DER MITOCHONDIRALEN DYSFUNKTION..... 107
ABBILDUNG 41 ATMUNGSKETTE IM ZEITVERLAUF, AUS INGENUITY 109
ABBILDUNG 42: B-OXIDATION, MODIFIZIERT NACH KEGG 112
ABBILDUNG 43: DAG UND INSP3 STOFFWECHSEL..... 115
ABBILDUNG 44: KLASSISCHE MAP KINASEKASKADE 118
ABBILDUNG 45: INSULIN-SIGNALWIRKUNG..... 122
ABBILDUNG 46: ROCK1 WIRKUNG AUF GEFÄßTONUS UND INSULINRESISTENZ..... 124

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EINSCHLUSSKRITERIEN. 36
TABELLE 2: AUSSCHLUSSKRITERIEN 36
TABELLE 3: ALLGEMEINE PATIENTENDATEN 57
TABELLE 4: MATCHED-PAIR-METHODE 57
TABELLE 5: ANZAHL DER ÜBERSCHNEIDUNGEN ZWISCHEN DEN ZEITPUNKTEN 59
TABELLE 6: KORRELATIONEN ZWISCHEN MICROARRAY- FCS UND RT-PCR-FCS 60
TABELLE 7: DAVID ERGEBNISSE 65
TABELLE 8: DAVID SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE. 66
TABELLE 9: INGENUITY-ANALYSE. 66
TABELLE 10: INGENUITY-ANALYSE: DISEASE (KRANKHEIT). 67
TABELLE 11: INGENUITY-ANALYSE: TOP CANONICAL PATHWAYS 67
TABELLE 12: INGENUITY-ANALYSE: TOP TOX LIST 67
TABELLE 13: FUNKTIONELLE NETZWERKE (ASSOCIATED NETWORK FUNCTION) 68
TABELLE 14: KRANKHEITEN UND FEHLFUNKTIONEN (DISEASES AND DISORDERS) 68
TABELLE 15: SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE (CANONICAL PATHWAYS) 68
TABELLE 16: TOXISCHE FUNKTIONEN (TOP TOX LISTS) 68
TABELLE 17: ANZAHL VON KANDIDATEN-GENEN AN DEN EINZELNEN ZEITPUNKTEN 72
TABELLE 18: GENE, BETEILIGT AN DER ANTIGENERKENNUNG. 78
TABELLE 19: ZYTOKINE DER ANGEBORENEN IMMUNITÄT. 80
TABELLE 20: GENE BETEILIGT AN CHEMOTAXIS 82
TABELLE 21: GENE VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN 83
TABELLE 22: GENE, BETEILIGT AN DER ANTIGENPRÄSENTATION 84
TABELLE 23: ZYTOKINE DER ADAPTIVEN IMMUNITÄT 87
TABELLE 24: GENE, BETEILIGT AN DER T-ZELL-REZEPTOR-FUNKTION 88
TABELLE 25: GENE, BETEILIGT AN T-ZELL-KOSTIMULATION UND -KOINHIBITION 90
TABELLE 26: GENE, BETEILIGT AN WEITERER T-ZELL-AKTIVIERUNG UND -INHIBITION 92
TABELLE 27: HYPOXIE UND T-ZELL DYSFUNKTION 94
TABELLE 28: GENE VON B-ZELLEN 95
TABELLE 29: GENE DER CASPASEN UND IN DIE INDUKTION DER APOPTOSE INVOLVIERTE GENE 98
TABELLE 30: GENE, INVOLVIERT IN DIE HEMMUNG DER APOPTOSE 100
TABELLE 31: GENE DES KOMPLEMENT SYSTEMS 103
TABELLE 32: GENE DER GERINNUNGSKASKADE UND FIBRINOLYSE 105
TABELLE 33: GENE DER THROMBOZYTENAGGREGATION 107
TABELLE 34: GENE DER ROS UND RNS-PRODUKTION 109
TABELLE 35: GENE, INVOLVIERT IN OXIDATIVEN STRESS 111
TABELLE 36: GENE DER ß-OXIDATION 113

TABELLE 37: GENE, INVOLVIERT IN INTRAZELLULÄRE SIGNALÜBERTRAGUNG_1. 114
TABELLE 38: GENE, INVOLVIERT IN INTRAZELLULÄRE SIGNALÜBERTRAGUNG_2 117
TABELLE 39: GENE DER KLASSISCHEN MAP KINASEKASKADE 118
TABELLE 40: GENE DER STRESS-AKTIVIERTEN MAP-KINASEKASKADE 119
TABELLE 41: GENE DER WASL-SIGNALTRANSDUKTION 120
TABELLE 42: GENE DER INSULIN SIGNALTRANSDUKTION 122
TABELLE 43: GENE, INVOLVIERT IN NEGATIVE RÜCKKOPPLUNGSMECHANISMEN UND HEMMUNG DER SIGNALTRANSDUKTION DURCH INFLAMMATIONSASSOZIIERTE MOLEKÜLE. 125
TABELLE 44: GENE DER EXTRAZELLULÄREN SIGNALTRANSDUKTION 126
TABELLE 45: ZEITVERLAUF DER IMMUNANTWORT 127
TABELLE 46: ZEITVERLAUF DER PLASMATISCHEN KASKADEN UND DER APOPTOSE 128
TABELLE 47: ZEITVERLAUF DER SIGNALTRANSDUKTION. 128

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIS	Abbreviated Injury Score
APS	Akuter Physiologischer Score
ATLS	Advaned Trauma Live Support
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell Rezeptor
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrom
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
LBP	Lipopolysaccharid binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
MODS	Multi-Organ Dysfunction Syndrom
NET	Neutrophil Exracellular Traps
NO	Nitric oxid
NOS	NO Synthetase
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Pro-Calcitonin
PIRO	Predisposition Infection Response Organdysfunction
PRR	Pattern recognition reeptors
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies, engl. *reactive nitrogen species*
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. *reactive oxygen species*
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SOFA	Sepsis related organ Failure Assessment
TCR	T-Zell Rezeptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor-necrosis Factor

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit sollen verschiedene pathophysiologische Abläufe und Zusammenhänge, die im Rahmen einer Sepsis stattfinden, analysiert werden. In der Einleitung wird daher zunächst ein thematischer Abriss über das aktuelle Wissen zur Sepsis geboten, um dann daraus die sich ergebenen Fragestellungen zu entwickeln.

1.1. Geschichte der Sepsis

Um sich dem großen Thema der Sepsis zu nähern, wird im Folgenden zunächst ein geschichtlicher Überblick über die Entwicklung des Sepsisbegriffes und das Verständnis der Sepsis dargestellt. Es zeigt sich, wie sehr sich das Bild von der Antike bis zur Gegenwart gewandelt hat.

1.1.1. Vom Altertum bis zur Neuzeit

Die Entwicklung einer Sepsis gehört schon seit jeher zu den gefürchtetsten Komplikationen nach Verletzungen oder Operationen. Schon 2735 v.Chr. beschrieb der chinesische Kaiser Cheng Nung die Verwendung bestimmter Kräuter zur Behandlung einer Blutvergiftung. Das Wort *Sepsis* wird hingegen aus dem griechischen abgeleitet und mit *faul machen* übersetzt. Schon Hippokrates (ca. 460 bis 370 v.Chr.) benutzte den Begriff Sepsis und auch Ibn Sina (979-1037) beschrieb die Sepsis als Fäulnis des Blutes, die mit Fieber einhergeht. Der so in der Antike geprägte Begriff hielt sich bis ins 19. Jahrhundert ([1],[2]).

Überlegungen zur Pathophysiologie gab es hingegen kaum. Herrmann Boerhave (1668 - 1738) postulierte, dass die Sepsis durch schädliche Substanzen in der Luft ausgelöst würde. Im 18. Jahrhundert stellte John Pringle, ein britischer Militärarzt, Beobachtungen zu septischen und anti-septischen Substanzen auf und begründete somit das Konzept der Behandlung und Prävention der Sepsis ([3],[4]).

Justus von Liebig machte wiederum Anfang des 19. Jahrhunderts den alleinigen Kontakt von Sauerstoff mit einer Wunde als Ursprung der Sepsis aus. Ignaz Semmelweis (1818 - 1865) nahm an, dass mangelnde Hygiene der Grund war für die Entwicklung des Kindbettfiebers, der Sepsis bei Wöchnerinnen. Er vermutete kleinste Leichenteile, die durch die Medizinstudenten aus der Pathologie auf die Frauen übertragen wurden als Ursache, während Louis Pasteur (1822 - 1895) bei seiner Arbeit über Fäulnis und Verwesung kleinste, einzellige Lebewesen entdeckte und sie als Bakterien oder Mikro-

[1] Vgl. Hernández B. und Florián P. 2012.
[2] Vgl. Deutsche Sepsis Gesellschaft 2012.
[3] Vgl. Hernández B. und Florián P. 2012.
[4] Vgl. Deutsche Sepsis Gesellschaft 2012.

ben bezeichnete. Er stellte die Vermutung auf, dass diese Einzeller Krankheitserreger wären und fand außerdem heraus, dass die Bakterien durch Erhitzen abgetötet werden können ([5],[6]).

In die Praxis umgesetzt wurden die Beobachtungen von Semmelweis und Pasteur das erste Mal von Joseph Lister, der in seiner chirurgischen Abteilung die Sterblichkeit nach Amputationen durch Haut- und Gerätedesinfektion dramatisch senken konnte. Im Gegensatz zu Ignaz Semmelweis vermochte er jedoch seine Kollegen von der Sinnhaftigkeit seiner Maßnahmen zu überzeugen und so wandelte sich das Bild der Sepsis von der Fäulnis zu einer bakteriellen Krankheit. Der Professor für Innere Medizin in Hamburg Hugo Schottmüller (1876 - 1936) stellte erstmals eine moderne Definition der Sepsis auf:

> *"Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden."* ([7])

Trotz dieser Wandlung des Sepsisverständnisses blieb die Sterblichkeit hoch und erst mit der Einführung der Antibiotika nach dem 2. Weltkrieg konnte sie weiter gesenkt werden. Jetzt begann auch die Evolution der modernen Intensivmedizin, deren Patientengut zu einem großen Teil aus Sepsis-Patienten besteht ([8]).

1.1.2. Die Entwicklungen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts

Der Anstoß zur Entwicklung der bis ins Jahr 2016 bestehenden Sepsisdefinition kam 1967. Ashbough und Mitarbeiter beschrieben bei septischen Patienten eine schwere Lungenerkrankung, die aus schwerer Atemnot, Verlust der Lungendehnbarkeit und Flüssigkeitseinlagerung bestand und bezeichneten sie als *Adult Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) ([9]). Die Entdeckung, dass diese eine Folge der Entzündungsreaktion ist, somit durch vom Körper produzierte Substanzen ausgelöst wird, führte 1989 zur folgenden Formulierung durch den US-amerikanischen Intensivmediziner Roger C. Bone (1941-1997):

[5] Vgl. Deutsche Sepsis Gesellschaft 2012.
[6] Vgl. Hernández B. und Florián P. 2012.
[7] Deutsche Sepsis Gesellschaft 2012.
[8] Vgl. Adam et al. 2004.
[9] Vgl. Ashbaugh et al. 1967.

> *"Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion." ([10])*

Damit wurde nun das erste Mal auch der Reaktion des Körpers eine Bedeutung beim Krankheitsbild der Sepsis zugemessen. Von Roger C. Bone stammt aus dem Jahre 1992 die Definition zum *Systemischen Inflammatorischen Response-Syndrom* (SIRS). Für die Diagnose der SIRS müssen mindestens zwei der folgenden Diagnose-Kriterien erfüllt sein:

- **Körpertemperatur** > 38 °C oder < 36 °C
- **Herzfrequenz** > 90/min (Tachykardie)
- **Tachypnoe**: Atemfrequenz > 20/min oder Hyperventilation mit pCO2< 4,3 kPa (33 mmHg)
- **Leukozytose** (>12000/µl) oder **Leukopenie** (<4000/µl) oder Linksverschiebung (d. h. > 10 % unreife Leukozytenformen im Differentialblutbild). ([11])

Eine **Sepsis** ist durch die Diagnose der SIRS und den Nachweis einer Infektion definiert. Dieser wird durch den mikrobiologischen Befund oder klinische Kriterien erbracht. Bone definierte darüber hinaus weitere häufig vermischte Begriffe:

- **Infektion**: Nachweis einer pathologischen Besiedelung des Körpers mit Mikroorganismen
- **Bakteriämie**: Nachweis lebender Bakterien im Blut
- **Multiorganversagen**: Kombination mehrerer Organdysfunktionen, die jede für sich unbehandelt eine vitale Bedrohung darstellt ([12]).

Für die Diagnose einer **schweren Sepsis** muss zusätzlich zu den Kriterien der Sepsis mindestens ein Kriterium einer Organdysfunktion erfüllt sein:

- Enzephalopathie
- Arterielle Hypotension
- Hypoxie
- Akutes Nierenversagen
- Metabolische Azidose ([13])

Ein **Septischer Schock** ist gegeben bei den Kriterien für eine Sepsis sowie für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck unter 90 mmHg bzw. ein mittlerer

[10] Bone et al. 1992.
[11] Vgl. Bone et al. 1992.
[12] Vgl. Bone et al. 1992.
[13] Vgl. Bone et al. 1992.

arterieller Blutdruck < 65 mmHg oder der notwendige Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck > 90 mmHg bzw. den arteriellen Mitteldruck > 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären. Der Septische Schock ist als Teilmenge der schweren Sepsis zu betrachten, hat jedoch eine deutlich schlechtere Prognose als die schwere Sepsis in ihrer Gesamtheit ([14]).

Fast genau 10 Jahre nach den Begriffsdefinitionen durch Roger C. Bone trafen sich 2003 Experten aus aller Welt, um über den Erfolg der Sepsisdefinitionen und deren Weiterentwicklung nachzudenken. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Konzepte prinzipiell für die Klinik nützlich sind, jedoch weder ein präzises Staging ermöglichen noch spezifische Kriterien bieten. Sie beschlossen die Entwicklung des hypothetischen PIRO-Modells. Es sollte eine differenziertere Prognoseabschätzung erlauben und zu individuellen Therapieentscheidungen verhelfen. Angelehnt an das aus dem Tumorstaging stammende TNM-System sollte auch für die Sepsis ein Stufenkonzept zur Schweregradeinteilung entwickelt werden ([15]).

Prädisposition: Unter Prädisposition werden Faktoren wie vorbestehende Krankheiten, Alter, Geschlecht oder auch die ethnische Herkunft gefasst. Zukünftig soll auch die Messung genetischer Polymorphismen (z.B. im TNF-alpha Gen) zur Prognoseabschätzung beitragen.

Infektion: Unter Infektion werden Faktoren wie die Keimbestimmung und deren Resistenzen sowie die Infektionsquelle gefasst. Zukünftig soll auch die Messung mikrobiologischer Produkte (DNA, RNA, Endotoxine,...) zu einer optimalen, individuellen Therapie beitragen.

Response: Unter Response werden die Reaktionen des Körpers (z.B. Fieber, CRP, Schock,...), die Symptome der Sepsis gefasst. Zukünftig sollen spezifische Marker sowohl für eine aktive Inflammation als auch eine Immunsuppression (z.B. durch Microarrayanalysen) zur Prognoseabschätzung beitragen und die Therapie optimieren.

Organdysfunktion: Die Organdysfunktion wird anhand der Anzahl funktionsgestörter Organe abgeschätzt. Zukünftig soll dies durch die Messung der zellulären Antwort (z.B. Apoptose, Reaktion auf Hypoxie, Anergie,...) erfolgen und eine frühzeitige Behandlung ermöglichen.

Die Vorteile dieses Konzepts liegen in der spezifischen Einteilung einzelner Komponenten der Sepsis ([16]). Durchgeführte Untersuchungen zeigen positive Ergebnisse und ergeben für das Modell mögliche Vorteile bei der frühen Auswahl des Therapieplans

[14] Vgl. Reinhart et al. 2006.
[15] Vgl. Angus et al. 2003.
[16] Vgl. Gerlach 2006.

entsprechend des Sterberisikos ([17]) und eine bessere Vorhersage der Mortalität septischer Patienten als der SOFA-Score ([18]). Trotzdem ist die Umsetzung bislang vorallem in Studien erfolgt und hat sich in der Praxis nicht flächendeckend durchgesetzt ([19]).

1.1.3. Die Gegenwart

1.1.3.1. Sepsis-3

Die Definition der Sepsis als Infektion mit mindestens zwei SIRS-Kriterien wurde mit neuen Erkenntnissen zur Sepsis zunehmend hinterfragt und als zu unspezifisch angesehen ([20]). Neuere Studien zeigten dagegen die Bedeutung des bestehenden Gewebeschadens und der Organdysfunktion auf, was den Anstoß zur Entwicklung einer neuen Sepsisdefinition brachte ([21]). Es wurde daher eine weitere Konsensuskonferenz zur Erstellung einer neuen, evidenzbasierten Sepsisdefinition zusammengerufen. Das Ergebnis lautete 2016:

> *„Sepsis ist definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer inadäquaten Wirtsantwort auf Infektionen.“ ([22])*

Der Begriff der schweren Sepsis ist damit redundant und soll nicht mehr verwendet werden. Der septische Schock umfasst nach neuer Definition sowohl zirkulatorische als auch metabolische Veränderungen und wird daher zusätzlich durch eine Laktatserumkonzentration von mehr als 2 mmol/l nach Volumensubstitution definiert.
Zur Einschätzung der Organdysfunktion wird das *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA) verwendet, genauer der mit diesem bestimmte SOFA-Score. Auf diesen wird in Kapitel 1.3.3. genauer eingegangen. Eine Abwandlung vom SOFA-Score zur schnelleren, klinischen Einschätzung ausserhalb der Intensivstation ist der quick-SOFA- oder qSOFA-Score entwickelt worden, der nur aus drei klinischen Kriterien besteht (vergleiche Kapitel 1.3.3) ([23]).
Erste Zweifel an der Überlegenheit der neuen Sepsisdefinition sind bereits geäußert worden. Die Zukunft wird zeigen inwieweit sich neue Therapieansätze ergeben werden und ein besseres Überleben septischer Patienten erreicht werden kann ([24],[25]).

[17] Vgl. Moreno et al. 2008.
[18] Vgl. Macdonald et al. 2014.
[19] Vgl. Marshall 2013.
[20] Vgl. Vincent et al. 2013.
[21] Vgl. Singer et al. 2016.
[22] Singer et al. 2016.
[23] Vgl. Singer et al. 2016.
[24] Vgl. Schmoch et al. 2017.
[25] Vgl. Peach 2017.

1.1.3.2. Epidemiologie

In der Gegenwart hat die Sepsis eine ungebrochen hohe Bedeutung. Zahlen aus den USA zeigen, dass dort etwa 215.000 Patienten jährlich an den Folgen einer Sepsis versterben. Damit liegt die Mortalitätsrate bei 28,6% und ist somit vergleichbar mit der des Herzinfarkts. Die Inzidenz in den Vereinigten Staaten liegt dabei bei 300 pro 100.000 (0,3%) mit steigender Tendenz ([26],[27]).

In Deutschland kommt es jährlich zu 52.000 bis 75.000 Fällen. Hier kann man im Mittel mit 5 Sepsisfällen auf 1000 Krankenhauspatienten rechnen. Auf deutschen Intensivstationen beträgt die Prävalenz der Sepsis 11 - 14% und die der schweren Sepsis zusammen mit dem Septischen Schock 10 - 12%. 36% der Patienten mit schwerer Sepsis hatten eine zu Grunde liegende ambulant erworbene Infektion. Von diesen waren wiederum 40% chirurgische Notfälle. Die Gesamtmortalität der schweren Sepsis liegt bei bis zu 55% und im Septischen Schock bei 62% ([28]).

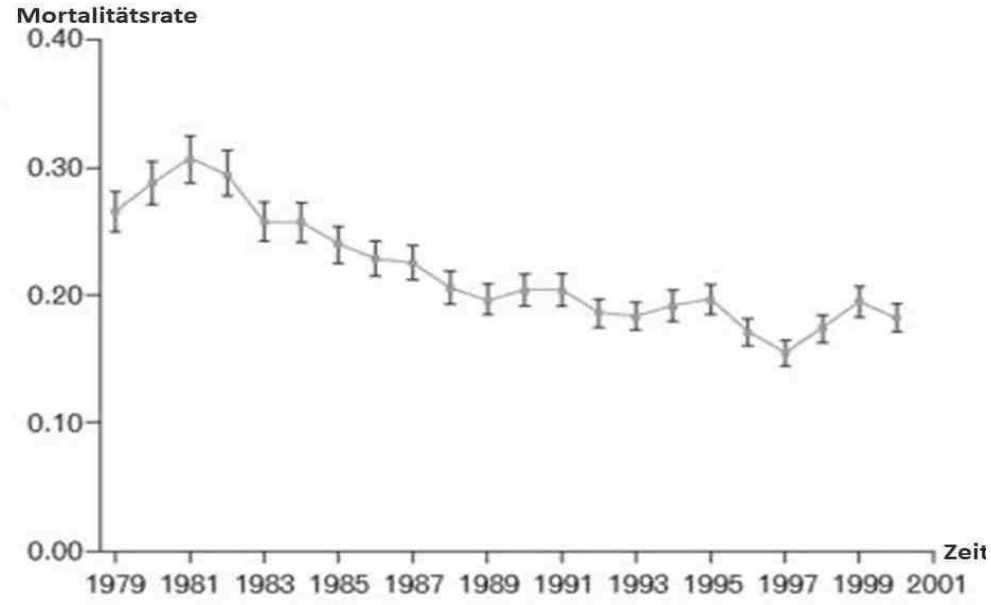

Abbildung 1: Verlauf der Mortalitätsrate septischer Patienten seit 1979 (adaptiert nach [29]): Im Verlauf von über 20 Jahren ist die Mortalitätsrate nur leicht gesunken. Die Schwankungsbreite ergibt sich durch unterschiedliche Daten in verschieden Studien.

Blickt man auf die Entwicklung seit 1979 zurück, wird der geringe Fortschritt bei den Behandlungserfolgen erkennbar. Die generelle Mortalität bei einer Sepsis ist in 30 Jahren nur leicht gesunken und stagniert mit ca. 20% auf hohem Niveau ([30]).

[26] Vgl. Angus und Wax 2001.
[27] Vgl. Mayr et al. 2014.
[28] Vgl. Engel et al. 2007.
[29] Vgl. Engel et al. 2007.
[30] Vgl. Christaki und Opal 2008.

Es wird deutlich, dass Sepsis ein großes Problem in der heutigen Medizin darstellt und weitere Bestrebungen für eine bessere Behandlung unternommen werden müssen.

1.2. Ätiologie der Sepsis

Die Ursachen für eine Sepsis sind vielfältig. Herde für eine Streuung von Krankheitserregern können im gesamten Körper entstehen. Im Folgenden wird daher zunächst ein Überblick über die verschiedenen Krankheiten und Zustände gegeben, die einer Sepsis zu Grunde liegen können. Anschließend wird das Erregerspektrum der Sepsis erläutert um dann, als Basis für die vorliegende Arbeit, auf das Polytrauma als Sepsisursache näher einzugehen.

1.2.1. Überblick Ursachen der Sepsis

In der Allgemeinbevölkerung ist die mit Abstand am häufigsten einer Sepsis zu Grunde liegende Krankheit eine Lungenentzündung. Im Vergleich über alle Altersstufen liegen Polytraumata insgesamt an fünfter Stelle. Beschränkt man sich auf die Patienten bis zu einem Alter von unter 50 Jahren, wandelt sich das Bild und schwere Traumata nehmen den ersten Platz der Sepsisursachen ein. Die Sepsis nach Polytrauma ist also eher eine Erkrankung des jungen Alters, während für Pneumonien alte Menschen sowie Neugeborene prädisponiert sind ([31]).

Eine allgemeine Übersicht über Ursachen einer Sepsis bietet Abbildung 2.

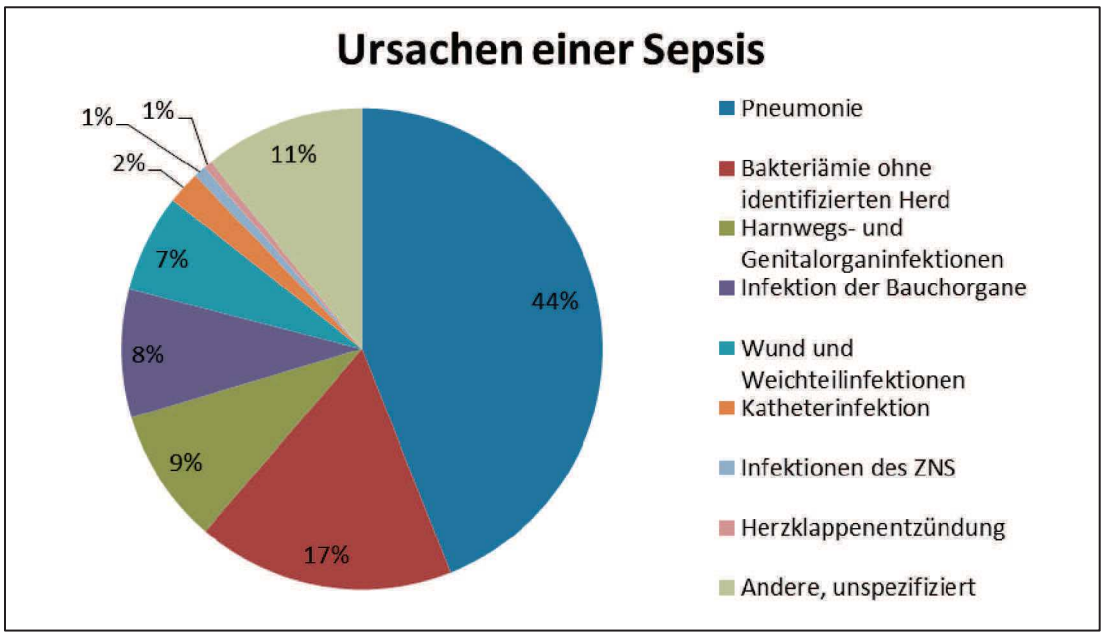

Abbildung 2: Ursachen einer Sepsis (Daten aus [32]): In der Ursachenstatistik unabhängig vom Alter liegt die Pneumonie an erster Stelle. Ihren Anteil machen jedoch vor

[31] Vgl. Angus und Wax 2001.
[32] Vgl. Mayr et al. 2014.

allem ältere Patienten aus. Wund- und Weichteilinfektionen liegen über alle Altersstufen hinweg nur an 5. Stelle.

1.2.2. Erregerspektrum der Sepsis

Waren in den 70er und 80er Jahren noch gram-negative Erreger, wie beispielsweise Escherichia coli, hauptsächlich für Sepsis verantwortlich, ist heutzutage die Prozentzahl gram-positiver Erreger, beispielsweise Staphylokokken und Streptokokken, deutlich angestiegen. Zum Erregerspektrum der Sepsis gehören neben den Bakterien in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend Pilze, hier vor allem Candida- und in geringerem Maße Aspergillus-Spezies. Auch eine virale Infektion ist als Sepsisursache möglich ([33]).

Eine international angelegte Studie konnte in 70% der Patienten einen oder mehrere Erreger nachweisen ([34]). Hierbei wurden bei 47% gram-positive und bei 62 % gram-negative Bakterien isoliert. Bei 19% der Patienten wurden Pilzinfektionen nachgewiesen. Die häufigsten gram-positiven Bakterien waren Staphylococcus aureus (20%), die häufigsten gram-negativen Bakterien waren Pseudomonas spezies (20%) und Escherichia coli (16%) ([35]).

Das Erregerspektrum ist zudem abhängig vom Alter der Patienten und dem Vorliegen von Grundkrankheiten. Auch der Ort der Infektion beeinflusst das Keimspektrum. Patienten, die eine Sepsis während ihres Krankenhausaufenthaltes entwickeln (nosokomiale Sepsis), haben potenziell andere Erreger als Patienten mit einer außerhalb des Krankenhauses erworbenen Infektion ([36]).

1.2.3. Das Polytrauma

Da in der vorliegenden Studie das Polytrauma als Ausgangspunkt einer Sepsis gewählt wurde, soll nun näher auf dieses eingegangen werden.

Das **Polytrauma** ist definiert als die Verletzung mehrerer Körperregionen oder Organsysteme, wobei mindestens eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen vital bedrohlich ist. Zu unterscheiden ist die Mehrfachverletzung ohne vitale Bedrohung oder die schwere, lebensbedrohlichen Einzelverletzung, das Barytrauma.

In Industrieländern stellen Unfälle die häufigste Todesursache bei Personen unter 45 Jahren. Da es in Deutschland bis jetzt keine amtliche statistische Erhebung zum Polytrauma gibt, fehlen hier genaue Daten zur Inzidenz des Polytraumas. Die angegebene Anzahl der Fälle in Deutschlang schwankt zwischen 20.000 bis 35.000 Fällen pro Jahr

[33] Vgl. Martin 2012.
[34] Vgl. Vincent et al. 2009.
[35] Vgl. Vincent et al. 2009.
[36] Vgl. Martin 2012.

([37],[38]). In Deutschland stellen dabei mit ca. 90% die stumpfen Verletzungen den größten Anteil, während in anderen Ländern wie zum Beispiel den Vereinigten Staaten, wo Schussverletzungen eine größere Rolle spielen, perforierende Verletzungen eine größere Bedeutung innehaben. Hier wie dort sind mehr Männer betroffen ([39]). Die Gesamtletalität eines Polytraumas liegt ungeachtet der Ursache bei ca. 20%. 1970 lag sie noch bei ca. 40%, konnte jedoch durch verbesserte Standards im Traumamanagement deutlich gesenkt werden ([40]).

Für die **Klassifikation des Schweregrades** werden verschiedene Einteilungen verwendet. Zwei der gebräuchlichsten sind die Glasgow Coma Scale und der hier verwendete Injury Severity Score (ISS) ([41]). Dieser basiert auf der Abbreviated Injury Scale (AIS). Der AIS bewertet jede Einzelverletzung mit einer Punktzahl von 1 bis 6 Punkten (leicht bis nicht überlebbar). Für den ISS wird von 6 Körperregionen (Schädel und Hals, Gesicht, Thorax, Abdomen, Extremitäten, Weichteil) der AIS-Wert bestimmt. Die Punkte der 3 am schwersten betroffenen Regionen werden quadriert und ergeben zusammenaddiert den ISS. Ein AIS von 6 Punkten in irgendeiner Region bedeutet automatisch einen ISS von 75 Punkten (= Maximalwert) ([42]).

Zu den häufigsten Komplikationen des Polytraumas zählen SIRS, Sepsis und der Septische Schock. Bei fast allen schwersttraumatisierten Patienten kommt es zu einer starken Immunantwort, es entwickelt jedoch nur ein Teil ein Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS), eine Sepsis oder einen Septischen Schock ([43]).

Die Entwicklung einer Sepsis nach Trauma schwankt stark mit der Schwere der Verletzung. Eine Untersuchung in den USA gibt die allgemeine Sepsisrate nach Trauma mit etwa 2% an. Sie steigt jedoch schon ab einem ISS von 15 um das sechsfache und ab einem ISS von 30 um das sechzehnfache an. In Deutschland fand eine Studie bei Schwerverletzten mit einem mittleren ISS von 22,2 eine Sepsisrate von 11,6% ([44]), eine andere Studie erhielt einen Wert von 10,2% ([45]).

Das Polytrauma als Sepsisursache bietet sich somit für die Verwendung in einer Studie an, um mögliche Fehlerquellen durch bei Probanden bestehende Begleiterkrankungen zu vermeiden. Diese treten vor allem bei älteren Menschen auf. Da Polytraumata wiederum zu einem großen Anteil bei jungen Menschen vorkommen, ist von ansonsten weitestgehend gesunden Probanden auszugehen.

[37] Vgl. Kühne et al. 2006.
[38] Vgl. Debus et al. 2015.
[39] Vgl. Kühne et al. 2006.
[40] Vgl. Stahel et al. 2005.
[41] Vgl. Baker et al. 1974.
[42] Vgl. Baker et al. 1974.
[43] Vgl. Keel und Trentz 2005.
[44] Vgl. Osborn et al. 2004.
[45] Vgl. Wafaisade et al. 2011.

1.3. Diagnostik

Neben den bereits oben aufgeführten Kriterien für die Diagnosestellung der septischen Krankheitsbilder werden im Folgenden weitere laborchemische Parameter und Scoresysteme für eine umfassende Diagnostik aufgeführt.

1.3.1. Einzelwerte

Allgemein lässt sich über die Messung von Laborparametern sagen, dass sie als einzeln stehende Messergebnisse nur einen geringen Aussagewert für die Diagnostik und Prognoseabschätzung einzelner Patienten haben. Erst in Kombination mit anderen Werten oder auch durch eine Beobachtung im Zeitverlauf lassen sich genauere Schlüsse ziehen.

1.3.1.1. C-reaktives Protein und Leukozytenzahl

Die klassischen Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) und die Messung der Leukozytenzahl sind auch in der Sepsisdiagnostik häufig verwendete Parameter. Problematisch ist, dass sowohl eine Leukozytose als auch eine Leukopenie auf eine Sepsis hinweisen können. Auch normale Werte schließen eine Sepsis nicht aus. Nachteil des CRPs ist seine verzögerte Reaktionszeit von 24 - 48 Stunden und seine lange Halbwertzeit und somit langsame Rückläufigkeit auch bei klinischer Besserung des Patienten ([46]).

1.3.1.2. Serumprocalcitonin

Studienergebnisse belegen für das Serumprocalcitonin die beste Korrelation aller Laborparameter mit dem Schweregrad der Infektion. Bei einem cut-off Punkt von 1,1 mg/ml wurden eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 78% zur Unterscheidung zwischen SIRS und Sepsis Patienten gefunden ([47]). Verglichen mit dem CRP-Wert ermöglicht eine Bestimmung des Serumprocalcitonin (PCT) eine bessere Unterscheidung von viralen zu bakteriellen Infekten ([48]). Zunehmend gibt es darüber hinaus Erfolge bei der Therapiesteuerung durch Messung von PCT ([49],[50]).

1.3.1.3. Zytokine

Verschiedene Zytokine wie IL-1, IL-6, Il-8, Il-10, TNFalpha und deren Rezeptoren können im Blut septischer Patienten vermehrt nachgewiesen werden. Dabei scheint vor allem die Messung von IL-6 zur Prognoseabschätzung geeignet zu sein. Es ist ein frü-

[46] Vgl. Dellinger et al. 2013.
[47] Vgl. Harbarth et al. 2001.
[48] Vgl. Nargis et al. 2014.
[49] Vgl. Bloos et al. 2016.
[50] Vgl. Schuetz et al. 2013.

her Indikator für die systemische Entzündung, Gewebeschädigung, Hypoxie und Infektion ([51]). Auch der lösliche TNF-Rezeptor kann aufgrund seiner längeren biologischen Halbwertzeit zur Beurteilung des Letalitätsrisikos verwendet werden, wie bei herzchirurgischen Patienten nachgewiesen wurde ([52]).

1.3.1.4. Lipopolysaccharid bindendes Protein

Als Akute-Phase-Protein bindet das Lipopolysaccharid bindendes Protein (LBP) bei Infektionen Lipopolysaccharide und dient somit als Marker bakterieller Infektionen und ist nach neuesten Studien ebenfalls bei Pilzinfektionen erhöht. LBP hat als initialer Marker für Sepsis bei Säuglingen (jünger als 48 h) Vorteile gegenüber IL-6 und PCT. Bei Säuglingen älter als 48h hat sich jedoch gezeigt, dass sie gleichwertig mit der PCT-Bestimmung sind ([53]).

1.3.2. Immunparalyse

Nach aktuellen Forschungsergebnissen erweist sich die Messung der Immunkompetenz als prognostisch aussagekräftig. Diese lässt sich durch die Bestimmung der Major Histocompatibility Complex (MHC) class 2 Rezeptor Expression auf Monozyten oder der Ex-vivo-TNFalpha Produktion nach LPS Stimulation abschätzen. Zukünftig wird auch die Messung der TH1/TH2 Balance oder von CD64 als Parameter für die Stimulation von Neutrophilen Granulozyten angestrebt ([54]).

1.3.3. Scoresysteme

Neben der eigentlichen Diagnose bereitet vor allem die Einteilung des Schweregrads der Sepsis Probleme. Hierbei hat sich im weitläufigen Bereich der relativ einfache APACHE II Score zur quantitativen Beurteilung des Zustands und der Prognose der Patienten durchgesetzt.

Der **APACHE II Score** setzt sich aus der Summe dreier Einzelscores zusammen: dem aus 12 physiologischen Parametern gewonnenen Akuter Physiologischer Score (APS), einem Wert für das Alter des Patienten (max. 6 Punkte) und einem Wert, der den chronischen Krankheitszustand des Patienten beurteilt (max. 5 Punkte) ([55]).

Je größer der Gesamtwert des APACHE II Scores ist, desto höher ist der Schweregrad der Erkrankung. Der APACHE II Score korreliert negativ mit der Prognose der Sepsis.

[51] Vgl. Giannoudis et al. 2004.
[52] Vgl. Cavaillon et al. 2003.
[53] Vgl. Giannoudis et al. 2004.
[54] Vgl. Lukaszewicz et al. 2009.
[55] Vgl. Knaus et al. 1985.

Der positive Vorhersagewert des APACHE II Scores wird mit 80 % angegeben, während die Spezifität bei etwa 98% liegt ([56]).

Zur Beurteilung des Schweregrades der Organdysfunktion kann das Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA), genauer der durch dieses bestimmte **SOFA Score** verwendet werden, der von der Europäischen Intensivmedizinischen Gesellschaft entwickelt wurde. Er teilt jedem Organsystem einen Parameter zu und dessen Abweichung von der Norm zeigt den Schweregrad der Dysfunktion an. Gemessen werden die respiratorische Insuffizienz anhand des PaO_2/FiO_2 Quotienten, die Gerinnungsstörung anhand der Thrombozytenzahl, die Leberdysfunktion anhand des Bilirubinwerts, die Kreislaufinsuffizienz anhand des Blutdrucks, Störungen des ZNS anhand der Glasgow Coma Scale und die Dysfunktion der Nieren anhand von Serumkreatinin und Urinproduktion ([57]). Für den SOFA-Score wurde eine gute Korrelation zur Vorhersage der Mortalität in septischen Patienten gezeigt ([58],[59]).

Um Risikopatienten durch Sepsis außerhalb von Intensivstationen leichter erkennen zu können, wurde in der Neudefinition der Sepsis 2016 der **qSOFA (quickSOFA)-Score** eingeführt (vergleiche Kapitel 1.1.3.1). Er besteht aus 3 klinischen Kriterien:

- eine Atemfrequenz von 22/min oder mehr
- Bewusstseinstrübung
- ein systolischer Blutdruck von 100 mmHg oder weniger

Wenn zwei oder mehr dieser Kriterien erfüllt sind, ist die Wahrscheinlichkeit für eine Sepsis mit erhöhter Sterblichkeit erhöht ([60]).

1.4. Therapie

Nachdem zuvor die Diagnosestellung und Diagnostik der Sepsis erläutert wurde, soll im Folgenden auf die Therapie des Polytraumas und vor allem der Sepsis eingegangen werden.

1.4.1. Polytraumatherapie und Sepsisprophylaxe

Im folgenden Abschnitt wird nun zunächst die Therapie des Polytraumas erläutert, wobei ein besonderes Augenmerk auf Maßnahmen gelegt wird, die einer Sepsisentwicklung vorbeugen sollen.

[56] Vgl. Sadaka et al. 2017.
[57] Vgl. Vincent et al. 1996.
[58] Vgl. Safari et al. 2016.
[59] Vgl. Jones et al. 2009.
[60] Vgl. Singer et al. 2016.

1.4.1.1. Das Advances Trauma Live Support Konzept

Die Senkung der Mortalität nach Polytrauma in den letzten Jahren ist vor allem der Einführung standardisierter Konzepte und Algorithmen durch das American College of Surgeon`s Committee on Trauma (ACS-COT) Anfang der 80er Jahre zu verdanken. Dieses sogenannte Advanced Trauma Live Support (ATLS) Konzept umfasst die frühe Phase der Evaluierung des Patientenzustands und dessen primäre Versorgung. Die ATLS Leitlinien basieren auf dem Konzept der *golden hour of shock*, das heißt, die Verletzungen, die innerhalb von Minuten oder Stunden zum Tode führen würden, werden nach standardisierten und validierten Algorithmen diagnostiziert und behandelt ([61]).

1.4.1.2. Das Damage-Control Prinzip

Wichtig für die Prophylaxe der Sepsis ist jedoch vor allem ein weiteres Konzept im Traumamanagement, das Damage Control Prinzip. Es wurde im letzten Jahrzehnt eingeführt und beruht auf der Beobachtung, dass Patienten mit persistierender metabolischer Azidose, Hypothermie und Koagulopathie als Zeichen der systemischen Inflammation eine signifikant höhere posttraumatische Sterblichkeit aufweisen und diese durch umfangreiche chirurgische Maßnahmen noch weiter steigt ([62]). Daraufhin wurde das Augenmerk auf die Verhinderung dieser sogenannten letalen Trias gelegt. Statt der frühen definitiven Versorgung der Verletzungen, wie sie bis dahin üblich war, wird nun bei schwerstverletzten Patienten, die sich trotz einer adäquaten Notfallversorgung nicht stabilisieren, auf belastende chirurgische Maßnahmen im Rahmen der Primärversorgung verzichtet. Stattdessen werden sie so schnell wie möglich auf die Intensivstation verlegt, um dort die Wiederherstellung der Homöostase (Einstellung von Blutdruck, Sauerstoffsättigung, Körpertemperatur, Koagulation, Blut-pH-Wert und Diurese) zu erlangen ([63]).

Die größten Schwierigkeiten im Management polytraumatisierter Patienten besteht also darin, die Balance zu finden zwischen lebensnotwendigen Behandlungen und Maßnahmen, die den Patienten zu sehr schwächen und damit den Zusammenbruch des Immunsystems begünstigen.

1.4.2. Therapie der Sepsis

In den letzten Jahren hat sich die Therapie der Sepsis ständig weiterentwickelt. Immer neue Konzepte wurden erforscht und angewendet. Jedoch wurden einige von diesen

[61] Vgl. Stahel et al. 2005.
[62] Vgl. Stahel et al. 2005.
[63] Vgl. Stahel et al. 2005.

bereits wieder verworfen, wie zum Beispiel die Gabe von aktiviertem Protein C ([64]) und die intensivierte Insulintherapie ([65]).

Allgemein lässt sich die Therapie in drei Teilbereiche aufteilen. Kausale, supportive und adjunktive Therapiekonzepte sind jedoch eine rein inhaltliche Unterteilung und sollten zeitlich nicht getrennt werden. Für alle Komponenten der Therapie gilt, dass sie möglichst früh begonnen und möglichst gezielt eingesetzt werden sollten ([66]).

Für das Prinzip der *Early goal-directed therapy* wurde nachgewiesen, dass eine frühzeitige hämodynamische Stabilisierung in den ersten 6 Stunden zu einer deutlichen Senkung der Mortalität führt. Gesteuert wird diese über Messung der zentralvenösen Sauerstoffsättigung, und bei Bedarf wird dann über Anhebung des Hämatokrit, Gabe von Katecholaminen und eventuell Beatmung, das Sauerstoffangebot erhöht ([67]). Weitere Studien konnten einen Überlebensvorteil wiederum nicht nachweisen ([68],[69]).

1.4.2.1. Kausale Therapie

Die kausale Therapie der Sepsis besteht in der Entfernung der Krankheitserreger aus dem Körper. Der wichtigste Punkt ist daher die Fokussanierung, soweit man diesen identifizieren kann, durch chirurgische Drainage, Debridement und die Beseitigung von Fremdkörpern ([70]). Bakterien in Gewebe und Blutbahn werden durch Antibiotikagabe bekämpft. Bei unbekanntem Erreger empfiehlt es sich, mit einer breiten antibiotischen Therapie zu beginnen und nach Vorliegen eines Antibiogramms die antibiotische Therapie entsprechend des Erregers anzupassen. Wichtig ist, vor der Antibiotikagabe mindestens zwei Blutkulturen abzunehmen. Darüber hinaus sollten je nach Krankheitsbild auch Kulturen aus Wunden, Liquor, Atemwegssekreten, Urin und anderen Körperflüssigkeiten abgenommen werden. Der Erregernachweis gelingt jedoch nur in 30-50% der Sepsisfälle ([71]).

1.4.2.2. Supportive Therapie

Zur supportiven Therapie werden die Maßnahmen zur Unterstützung der Organfunktion, Analgosedierung, Thromboseprophylaxe und die richtige Ernährung gezählt. Bei der supportiven Therapie der Organdysfunktion steht vor allem die Funktion des Herz-

[64] Vgl. Suter 2011.
[65] Vgl. Annane et al. 2010.
[66] Vgl. Rhodes et al. 2017.
[67] Vgl. Rivers et al. 2008.
[68] Vgl. Mouncey et al. 2015.
[69] Vgl. Peake et al. 2014.
[70] Vgl. Rhodes et al. 2017.
[71] Vgl. Engel et al. 2007.

Kreislaufsystems im Vordergrund. Dies wird einerseits durch eine aggressive Volumengabe, andererseits durch die Gabe von Katecholaminen erreicht ([72]).

Die erste Säule der supportiven Therapie ist die **Infusionstherapie**. Die meisten Patienten mit SIRS, Sepsis oder septischem Schock weisen eine absolute oder relative Reduktion des intravasalen Volumens auf. Durch fehlende Compliance des Myokards oder Fehlregulation der Gefäßweitstellung täuschen normale Ventrikelfüllungsdrücke oder periphere Ödeme oft über die bestehende Hypovolämie hinweg. Eine Flüssigkeitssubstitution sollte so lange fortgeführt werden, bis das Herzzeitvolumen oder O_2-Angebot nicht weiter steigt. Dies kann einen Volumenbedarf von bis zu 15 Litern pro Tag bedeuten. Ziele der Volumentherapie sind die Stabilisierung des Blutdrucks und der Herzfrequenz sowie die Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der Diurese ([73],[74]).

Ein weiteres Mittel, um das Sauerstoffangebot zu erhöhen, ist die Gabe von **Erythrozytenkonzentraten**. Als Zielwert bei einer schweren Sepsis wird ein Hämoglobinspiegel von mindestens 7 g/dl angegeben ([75]). Auch für den septischen Schock wurde die sichere Verwendung eines Grenzwertes von 7 g/dl nachgewiesen ([76]). Bei der Erythrozytengabe sollte darauf geachtet werden, dass die Konzentrate nicht älter als 2 Wochen sind, da ansonsten durch die mangelnde Verformbarkeit der Erythrozyten ein negativer Effekt und pH-Abfall zu beobachten ist ([77]).

Die Therapie mit **Katecholaminen** dient der Behandlung der Hypotension bei Sepsis und soll für eine adäquate Durchblutung und eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Organe sorgen. Ist dies durch alleinige Volumensubstitution nicht zu erreichen, werden zusätzlich Dobutamin und Noradrenalin eingesetzt.

Der Zwiespalt einer Behandlung mit Katecholaminen besteht darin, dass ein Teil der Wirkung über die Gefäßengstellung vermittelt und so der Blutdruck auf normale Werte angehoben wird, es jedoch auch, in vielleicht schon minderdurchbluteten Geweben, zu einem weiteren Abfall der Blutversorgung kommen kann. Darüber hinaus wird das ohnehin schon geschwächte Herz noch stärker belastet ([78]).

[72] Vgl. Reinhart et al. 2006.
[73] Vgl. Rhodes et al. 2017.
[74] Vgl. Dellinger et al. 2013.
[75] Vgl. Rhodes et al. 2017.
[76] Vgl. Holst et al. 2013.
[77] Vgl. Dellinger et al. 2013.
[78] Vgl. Dellinger et al. 2013.

1.4.2.3. Adjunktive Therapie

Die adjunktive Therapie ist, wie der Name bereits sagt (adiungere, Latein für hinzufügen, beifügen) eine Therapiesäule, die gemeinsam und zusätzlich zur kausalen und supportiven Behandlung angewendet werden sollte.

Kortisontherapie Da für die Hochdosiskortisontherapie schon in den 80er Jahren eine erhöhte Mortalität nachgewiesen werden konnte, ging man dann zur Gabe von niedrigen Dosen von Hydrokortison über. Pathophysiologische Untersuchungen hatten gezeigt, dass während einer Sepsis die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse gestört ist und klinische Studien hatten einen Überlebensvorteil für Patienten im septischen Schock bei niedriger Hydrokortisongabe nachgewiesen ([79]). Neuere Studien weisen jedoch ein gemischtes Bild auf ohne Nachweis einer Mortalitätsreduktion ([80],[81]). In den internationalen Leitlinien der *Surviving Sepsis Campaign* aus dem Jahr 2017 wird die niedrigdosierte Hydrokortisongabe nur dann empfohlen, wenn die hämodynamische Stabilisierung nicht durch andere Maßnahmen erreicht wird. Die Empfehlung wird mit einer geringen Evidenz ausgesprochen ([82]).

Mediatorenmodulation Die Erkenntnis, dass nicht allein Bakterien und ihre Toxine für die Entstehung einer Sepsis verantwortlich sind, legt die Überlegung nahe, die Signalkaskaden und pathophysiologischen Prozesse des Körpers zu unterbrechen, um damit die Entwicklung einer Sepsis zu verhindern. Immer größere Anstrengungen werden in die Erforschung des Toxin/Mediatornetzwerks gesteckt. Hier wird den Erkenntnissen der Ätiopathologie Tribut gezollt und versucht durch Antagonisierung oder Eliminierung bestimmter Botenstoffe den Verlauf der Sepsis zu beeinflussen. In der Praxis haben sich diese jedoch bislang als nicht durchführbar gezeigt und keine signifikanten Vorteile erbracht ([83]).

Beeinflussung der Gerinnung Als bislang einziges spezifisches Medikament erhielt Drotrecogin (Aktiviertes Protein C) eine Zulassung, nachdem eine signifikante Senkung der Mortalität bei schwerer Sepsis nachgewiesen worden war. Aufgrund der Beeinflussung von Gerinnung und Fibrinolyse und der damit verbundenen Blutungsgefahr war der Einsatz von APC bei polytraumatisierten Patienten kontraindiziert ([84]). 2011 jedoch wurde Drotrecogin vom Markt wieder zurückgezogen, als in einer großan-

[79] Vgl. Annane et al. 2004.
[80] Vgl. Gibbison et al. 2017.
[81] Vgl. Volbeda et al. 2015.
[82] Vgl. Rhodes et al. 2017.
[83] Vgl. Hotchkiss et al. 2016.
[84] Vgl. Dellinger et al. 2013.

gelegten Studie keine Wirksamkeit in der Behandlung der Sepsis nachgewiesen werden konnte ([85],[86]).

1.5. Allgemeine Pathophysiologie der Sepsis

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten über die Darstellung von Geschichte, Definitionen, Diagnostik und Therapie ein erstes Verständnis der Sepsis erzielt werden sollte, werden im Folgenden nun die pathophysiologischen Abläufe näher dargestellt.

1.5.1. Modellvorstellungen zur Ätiopathogenese

Die Fragen, wann und warum eine Sepsis entsteht und wann nicht, sind abschließend nur unzureichend erklärt. Im Folgenden werden daher verschiedene Modellvorstellungen aufgeführt.
Die Entstehung einer Sepsis lässt sich grob in fünf Komponenten einteilen, deren Abfolge und Zusammenspiel das Bild der Sepsis ergeben:

- Ausgangspunkt ist der **septische Fokus**, der als Infektionsquelle dient.
- Ausgehend vom septischen Fokus beginnen die **Invasion der Krankheitserreger** und die Endotoxinausschüttung.
- Durch starke Aktivierung der Zellen kommt es zur **Mediatorenexplosion**.
- Endotoxine und die "Waffen" der körpereigenen Abwehr führen zur **Zellschädigung**.
- Den Endpunkt der septischen Prozesse bildet das **Multiorganversagen**.

Dieses sind Eckpunkte, die bei einer Sepsis vorhanden sind, jedoch einzeln nicht ausreichen, diese zu definieren und zu verursachen. Zwischen ihnen gibt es unzählige Wechselwirkungen und Verbindungen, die wichtig sind oder in ihrer Gesamtheit eine bedeutende Rolle spielen. Daher stellt das Begreifen und Beschreiben der pathologischen und physiologischen Prozesse von SIRS und Sepsis bis heute eine große Herausforderung dar ([87]).
Die physiologische Entzündung bleibt unter normalen Umständen auf die lokale Umgebung des infizierten Gewebes beschränkt und wird durch definierte antiinflammatorische Mechanismen wieder beendet. Eine überschießende Abwehrreaktion, eine gleichzeitige starke Antiinflammation und ein dadurch bedingtes Ungleichgewicht in der Immunantwort können jedoch den Anstoß zur Entwicklung einer Sepsis geben (Abbildung 3) ([88]).

[85] Vgl. Suter 2011.
[86] Vgl. Thompson et al. 2010.
[87] Vgl. van der Poll et al. 2017.
[88] Vgl. Cinel und Opal 2009.

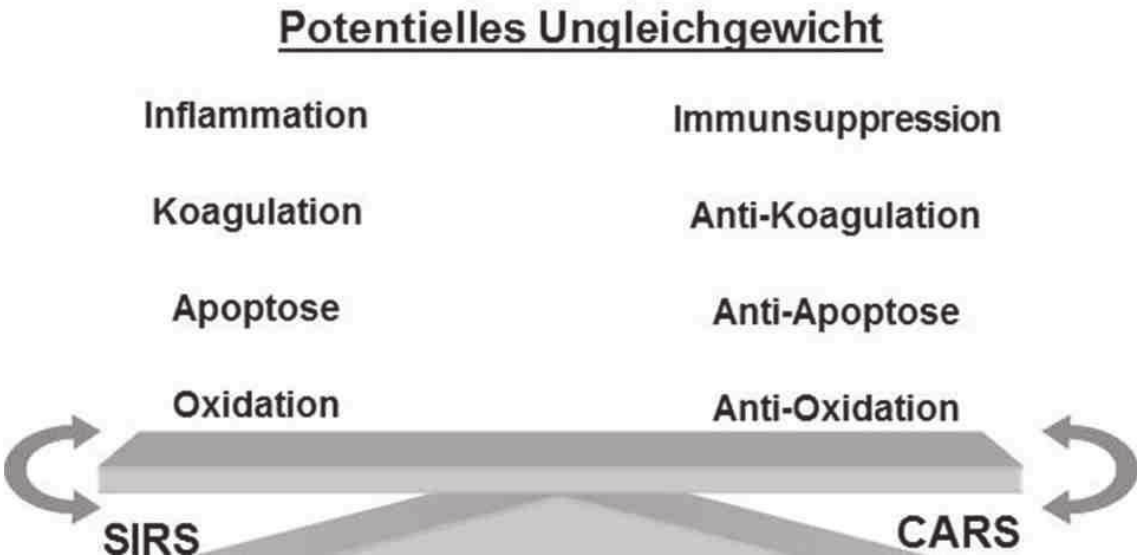

Abbildung 3: Potentielles Ungleichgewicht (adaptiert nach [89]): Zur Entstehung einer Sepsis trägt ein Ungleichgewicht zwischen Pro- und Anti- Inflammation, in Gerinnung, Apoptose und Oxidation bei. Je nach Phase der Sepsis schlägt die „Waage“ zur SIRS oder Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrom (CARS) Seite aus.

1.5.1.1. Two-Hit Theorie

Um die komplexen Abläufe, die zur Entstehung einer Sepsis nach Polytrauma führen, in ein Modell zu fassen, zieht man die sogenannte Two-Hit Theorie heran. Das Trauma stellt dabei den ersten Schlag dar. Organ- oder Weichteilschäden, offene Wunden und Frakturen führen zu einer systemischen Immunantwort und beeinträchtigen den Allgemeinzustand des Patienten ([90]).

Kommt jetzt ein zweiter Schlag hinzu, kann daraus die Entwicklung einer Sepsis resultieren. Beispiele für endogene Störungen sind respiratorischer Stress mit Hypoxie, kardiovaskuläre Instabilität, metabolische Azidose, Ischämie/Reperfusions-Verletzungen, abgestorbenes Gewebe und Infektionen. Exogene, vom Menschen zugeführte „Hits“ können chirurgische Interventionen mit großer Gewebsverletzung, Hypothermie oder starkem Blutverlust, inadäquate oder zu späte Operationen und intensivmedizinische Maßnahmen sein. Treffen erster und zweiter Schlag in einer ungünstigen Konstellation aufeinander, kann daraus eine Sepsis resultieren ([91]).

1.5.1.2. Alarmine Danger-Model nach Matzinger

Ein übereinstimmendes bzw. ergänzendes Modell zur Two-Hit-Theorie ist das Alarmine Danger-Model nach Matzinger. Hier wird davon ausgegangen, dass eine Sepsis ent-

[89] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[90] Vgl. Keel und Trentz 2005.
[91] Vgl. Keel und Trentz 2005.

steht, wenn zu einem mikrobiellen Signal, wie zum Beispiel LPS, ein endogenes Gefahrensignal hinzukommt, das auf eine Gewebezerstörung hinweist. Diese sogenannten *Damage-associated-molecular-pattern* (DAMP) sind intrazelluläre Moleküle und werden von nekrotischen Zellen ausgeschüttet oder von geschädigten oder aktivierten Zellen sezerniert ([92]). Interessanterweise aktivieren DAMP die gleichen Rezeptoren wie die weiter unter beschriebenen *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMP). Zum Beispiel bindet HMGB-1 als eines der bekanntesten DAMPs an TLR-2 und TLR-4 ([93]). HMGB-1 ist ein sich im Zellkern befindliches Protein, das die DNA organisiert und die Transkription reguliert. Es wird während der späten Phase einer Sepsis aktiv ausgeschüttet, jedoch auch durch Nekrose und Gewebsschädigung freigesetzt. Forschungen in jüngster Zeit zeigten eine Rolle von HMGB-1 in der Angiogenese, Gewebereparatur und Regeneration. Es verhindert durch ATP-Mangel bedingte Nekrose und verringert den Energieverbrauch in ischämischem Gewebe, wie zum Beispiel im Myokard. Eine exzessive Freisetzung bei einer Sepsis kann jedoch zu einer starken Pro-Inflammation führen und eine myokardiale Depression verursachen ([94],[95]).

1.5.2. Inflammation versus Immunparalyse

Bis vor kurzem nahm man an, dass es während einer Sepsis einen zweiphasigen Verlauf gebe, wobei die erste Phase von einer überschießenden Immunantwort geprägt sei, die durch die klassischen pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 und TNFalpha getriggert werde. Auf die starke Immunantwort folge ein kompensatorisches Gegenlenken des Immunsystems, das zu einer Immunparalyse führe, dem sogenannten *Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrom* (CARS). Durch die Forschung der letzten Jahre verschwimmen die zeitlichen Grenzen der zwei Phasen jedoch immer weiter und stattdessen geht man heute von nahezu parallel beginnenden Prozessen aus (Abbildung 4) ([96]).

[92] Vgl. Chan et al. 2012.
[93] Vgl. Chan et al. 2012.
[94] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[95] Vgl. Pugin 2008.
[96] Vgl. Reddy und Standiford 2010.

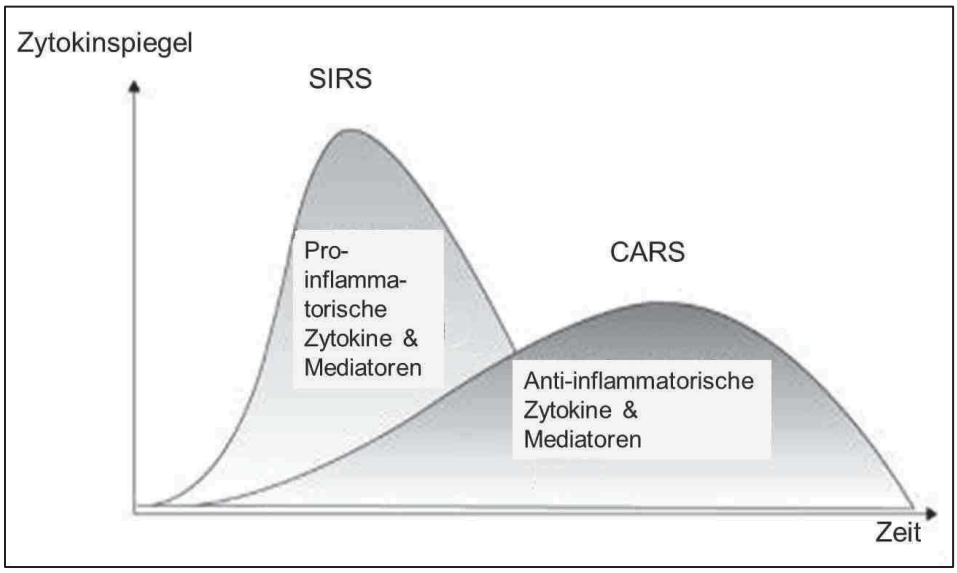

Abbildung 4: Pathophysiologische Phasen einer Sepsis ([97]): SIRS (Proinflammation) und CARS (Antiinflammation) beginnen fast gleichzeitig und werden durch unterschiedliche Mediatoren getriggert.

Darüber hinaus hat das Versagen anti-inflammatorischer Therapien in klinischen Studien Zweifel an dem Dogma hervorgerufen, dass die Mortalität einer Sepsis tatsächlich durch eine unkontrollierte Pro-Inflammation bedingt wird. Stattdessen geht man nun davon aus, dass die nachfolgende Immunsuppression für die Entwicklung von Komplikationen und einen Großteil der Sterblichkeit bei Sepsis verantwortlich ist ([98]).

Es wurde festgestellt, dass Neutrophile Granulozyten während einer Sepsis eine Immunparalyse mit einer kompletten Abschaltung wichtiger intrazellulärer Signaltransduktionswege durchlaufen ([99]). Gleichzeitig tragen Dysfunktion der Adaptiven Immunität und gesteigerte Apoptoseraten in lymphatischen Zellen zur Immunsuppression bei ([100],[101]).

Die Theorie der eingeschränkten antimikrobiellen Funktion wird zum Beispiel durch die Beobachtung gestärkt, dass die im menschlichen Körper latent persistierenden Cytomegalie- und Herpes-Simplex Viren im Verlauf einer Sepsis reaktiviert werden. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die reduzierte antimikrobielle Abwehrkapazität zu opportunistischen oder Superinfektionen führt und mit ausschlaggebend für die Entstehung einer Sepsis ist ([102]).

[97] Adaptiert nach Reddy und Standiford 2010.
[98] Vgl. Hotchkiss et al. 2009.
[99] Vgl. Hotchkiss et al. 2005.
[100] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[101] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[102] Vgl. Hotchkiss et al. 2009.

1.6. Spezielle Pathophysiologie der Sepsis

Nachdem zunächst übergeordnete, allgemeine Prozesse und Konzepte beschrieben wurden, soll im Folgenden auf die dahinterstehende Pathophysiologie eingegangen werden.

1.6.1. Immunantwort

Die Immunantwort gliedert sich grob in die angeborene und die erworbene Immunabwehr. Beide Säulen sind über mehrere Verbindungsglieder verknüpft und gleichermaßen wichtig für eine funktionierende Immunantwort. Im Folgenden wird daher zunächst auf die angeborene und dann auf die erworbene Immunantwort eingegangen.

1.6.1.1. Angeborene Immunantwort

In vorderster Front der Abwehrreihen zur Bekämpfung eingedrungener Pathogene steht die Angeborene Immunantwort. Gewebeschäden und Krankheitserreger aktivieren Endothel- und Immunzellen. Erkannt werden Antigene über sogenannte *Pattern-recognition receptors* (**PRR**) wie zum Beispiel *Toll-like receptors* (**TLR**s). Mit ihrer Hilfe sind sie in der Lage, bestimmte Muster von eingedrungenen Mikroorganismen zu erkennen ([103]).

Es wurde gezeigt, dass die TLR-Signaltransduktion und ihre Regulatoren eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der angeborenen Immunantwort spielen. Ihre Expression ist sowohl in experimentellen Studien als auch in septischen Patienten hochreguliert und mit der Sepsismortalität korreliert ([104]).

Ein Beispiel für eines dieser *Pathogen-associated molecular pattern* (**PAMP**s) ist das bekannte Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand grampositiver Bakterien. Von den Rezeptoren aus werden Signalketten aktiviert, die zu den verschiedensten Reaktionen in den Zellen führen. Die Zelle stellt sich auf die Abwehr der Krankheitserreger ein, indem sie ihre verschiedenen Mechanismen der Pathogenbekämpfung aktiviert, aber auch, indem sie ihren Metabolismus und ihren Zellzyklus umstellt ([105]).

NF-kB ist ein zentraler Transkriptionsfaktor in der proinflammatorischen Immunabwehr. Studien haben sowohl für NF-kB als auch für das assoziierte MyD88 gezeigt, dass ihre Deletion zu einer Reduktion der sepsisinduzierten Apoptose in T-und B-Zellen führt, jedoch die Überlebensrate verschlechtert ([106]).

Das sogenannte **Inflammosom** konvertiert diverse Signalmoleküle und trägt zur proinflammatorischen Immunantwort bei Sepsis bei. Ein wichtiger Teil ist die Caspase-1,

[103] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[104] Vgl. Williams et al. 2003.
[105] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[106] Vgl. Fraser 2006.

für die gezeigt wurde, dass ein knock-out in Mäusen diese vor der Entwicklung einer Sepsis bewahrt ([107]).

Die **Phosphoinositid 3-kinase** (PI3K) ist ein zentrales Enzym in einer Reihe von Signaltransduktionswegen. Die Kinase als auch die Serin-/Threonin-Kinase **AKT** sind involviert in die Zellaktivierung, Inflammation, Chemotaxis, Apoptose und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Ein knock-out führt somit zu einer eingeschränkten antimikrobiellen Kapazität. Darüber hinaus wird durch PI3K/AKT jedoch auch ein negativer Regulationsmechanismus induziert, der Inflammation und Apoptose reduziert ([108]).

Damit nicht einzelne Zellen gegen die eingedrungenen Keime ankämpfen müssen, werden zunächst Signale an andere Immunzellen ausgesendet. **Interleukine** aktivieren Zellen im ganzen Körper und regen deren Proliferation und Differenzierung an. **Chemokine** werden im Infektionsgebiet ausgeschüttet und locken so ruhende Zellen an den Ort der Infektion ([109]).

Auch wenn sich die Neutralisation einzelner Zytokine in der Sepsistherapie als nicht erfolgreich herausgestellt hat, besteht eine verstärkte Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren, die den Verlauf einer Sepsis beeinflussen. Charakteristisch sind hierfür ein gleichzeitiger Beginn der Ausschüttung mit einem stärkeren Abfall der pro-inflammatorischen Mediatoren und dadurch ein im Verlauf überwiegender Anteil immunsuppressiver Faktoren ([110]).

Neutrophile Granulozyten als Zellen der angeborenen Immunabwehr sind in der Lage, unspezifisch gegen jegliche Art von Eindringling vorzugehen. Innerhalb von Stunden sind Neutrophile die ersten Zellen, die zum Infektionsort rekrutiert werden. Bei einer Infektion steigt im Blut daher die Konzentration von Neutrophilen an, was durch eine Zunahme von jungen Neutrophilen, sogenannten Stabkernigen, im Blutbild nachgewiesen wird. Am Infektionsort angekommen, phagozytieren Neutrophile jegliche Art eingedrungener Fremdkörper, Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien oder abgestorbene Zellen ([111]).

Neutrophile Granulozyten haben zudem die Fähigkeit, Bakterien mittels einer freigesetzten fibrillären Matrix aus Granula-Proteinen und Chromatin zu binden. Dies verhindert einerseits die weitere Verbreitung von Bakterien und fördert andererseits das Zerstören der dort festgesetzten Bakterien. Diese Netze werden als *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) bezeichnet ([112]).

[107] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[108] Vgl. Wrann et al. 2007.
[109] Vgl. Hietbrink et al. 2006.
[110] Vgl. Majetschak et al. 2000.
[111] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[112] Vgl. Wartha et al. 2007.

Die Aktivität **Neutrophiler Granulozyten** während der Abwehr eingedrungener Pathogene bedingt Gewebeschäden durch die Ausschwemmung unreifer Zellen, zytotoxischer Moleküle und Toxine. Die Funktion Neutrophiler Granulozyten bei einer Sepsis ist charakterisiert durch eine ungenügende Beseitigung geschädigter Zellen und einer Unfähigkeit akute inflammatorische Abläufe zu beenden. Es wurde gezeigt, dass die Rekrutierung und Migration der Granulozyten eingeschränkt ist und sie so ihre antimikrobielle Kapazität nicht am Fokus gezielt einsetzen können. Stattdessen kommt es zu einer disseminierten Aktivität, die ungerichtet Gefäße und Gewebe angreift und schädigt ([113]).

Das Überleben der Neutrophilen wird durch eine verminderte Apoptoserate verlängert, was ihre Bedeutung für die Entstehung einer Sepsis zusätzlich graviert ([114]).

Sie produzieren toxische Sauerstoffverbindungen sogenannte *reactive oxygen species* (ROS) und hochreaktive Stickstoffverbindungen, sogenannte *reactive nitrogen species* (RNS), welche eingedrungene Krankheitserreger abtöten. Neben den angepeilten Zielen werden jedoch auch körpereigene Zellemembranen geschädigt. Für eine suffiziente Abwehr gegen eindringende Pathogene sind Sauerstoff- und Stickstoffradikale unabdingbar, eine überschießende Produktion oder eine ungenügende Abfang- und Abwehrfunktion, wie sie bei einer Sepsis beobachtet werden, führen jedoch zu **oxidativem Stress.** ROS und RNS bedingen Vasodilatation, Koagulation und Leukozytendysfunktion, führen zu einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit und stellen so ausschlaggebende Faktoren in der Entstehung einer Sepsis oder eines Septischen Schocks dar ([115]).

1.6.1.2. Antigenpräsentierende Zellen

Das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität stellen Antigenpräsentierende Zellen dar. Monozyten zirkulieren im Blut und werden durch verschiedene Stimuli zum Ort der Infektion gelockt. Dringen sie ins Gewebe ein, entwickeln sie sich weiter zu Makrophagen und zum Teil zu Dendritischen Zellen. Sie sind in der Lage, unspezifisch Fremdkörper und Mikroorganismen via PRRs zu erkennen und diese zu phagozytieren. Die weitere Immunantwort initiieren sie durch Ausschüttung von Interleukinen und Chemokinen sowie durch die Präsentierung von Antigenen aus den vorher phagozytierten Krankheitserregern. So aktivieren sie T-Zellen und damit die Adaptive Immunantwort. Über die Aktivität von Monozyten und Makrophagen bei septischen Patienten gibt es verschiedene Beobachtungen. Allgemein lässt sich jedoch eine ver-

[113] Vgl. Reddy und Standiford 2010.
[114] Vgl. Wesche et al. 2005.
[115] Vgl. Rittirsch et al. 2008.

minderte Stimulation des Adaptiven Immunsystems durch Makrophagen feststellen ([116]).

1.6.1.3. Adaptive Immunantwort

Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems phagozytieren die eingedrungenen Antigene und präsentieren sie nach einer Prozessierung den T-Zellen. T-Zellen sind wie B-Zellen Lymphozyten und gehören zur Adaptiven Immunantwort. Sie erkennen spezifisch eine Art von Pathogen und sind auf dessen Abwehr spezialisiert. Nachdem eine T-Zelle ihr spezielles Muster erkannt hat, vermehrt sie sich durch klonale Expansion. So entsteht ein ganzes Heer von auf diesen Krankheitserreger spezialisierten T-Zellen. Ihre Aktivität wird durch die Ausschüttung von diversen Mediatoren wie zum Beispiel Interleukin-2 gesteigert. Die T-Lymphozyten wiederum aktivieren B-Zellen und regen sie zur Antikörperproduktion gegen die spezifischen Pathogene an ([117]).
Es ist bekannt, dass sich im Verlauf einer Sepsis eine schwere Depression der Adaptiven Immunantwort entwickelt. Es kommt zum sogenannten **Th1 - Th2 Shift** (Verlagerung), der Induktion der Apoptose in Lymphozyten und einem Anstieg der regulatorischen T-Zellen (=T_{reg} Zellen) ([118],[119]). Die T_{reg} Zellen sind eine Untergruppe der T-Zellen, unterdrücken aktiv die adaptive Immunantwort und sind voraussichtlich in die Immundysfunktion bei Sepsis involviert. Die Depletion der T_{reg}-Zellen vor der Induktion einer Sepsis in experimentellen Studien hat das Ergebnis in der Mortalitätsrate bei Sepsis jedoch nicht geändert. Somit steht die genaue Verifizierung der Rolle regulatorischer T-Zellen bei einer Sepsis noch aus ([120]).
Zudem zeigen weitere Studien, dass eine T-Zell-induzierte Suppression der frühen Angeborenen Immunantwort notwendig ist, um diese zu regulieren, Gewebeschäden zu verringern und die Verteidigung gegenüber pathogenen Keimen zu optimieren ([121]).

1.6.2. Dysregulation plasmatischer Kaskaden

Sowohl für das Komplementsystem, die Gerinnungs- als auch die Fibrinolysekaskade wurde ihr Beitrag zur Entstehung einer Sepsis gezeigt ([122]). Die plasmatischen Kaskaden sind durch direkte und indirekte Verbindungen miteinander verknüpft. Gleichzeitig stehen sie im engen Verhältnis mit der Inflammation.

[116] Vgl. Hietbrink et al. 2006.
[117] Vgl. Adam et al. 2004.
[118] Vgl. Venet et al. 2008.
[119] Vgl. Hotchkiss et al. 2005.
[120] Vgl. Cao et al. 2015.
[121] Vgl. Kim et al. 2007.
[122] Vgl. Rittirsch et al. 2008.

Immer mehr Beobachtungen weisen auf starke Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und **Blutgerinnung** hin. Viele Proteine haben Funktionen in beiden Prozessen und so ist es nicht verwunderlich, dass die Manipulation des einen Systems auch das andere beeinflusst ([123]). Traumata und Operationen aktivieren die Blutgerinnung, doch auch pro-inflammatorische Mediatoren stoßen die Gerinnungskaskade an.

Die **disseminierte intravasale Koagulopathie** (von lat.: disseminiert = "verstreut") oder *Disseminated Intravascular Coagulation* (DIC) ist ein erworbener lebensbedrohlicher Zustand. Sie wurde früher als eigenständiges Krankheitsbild gesehen, wird jedoch heute vielmehr als Begleiterscheinung von Prozessen verstanden, die eine exzessive Koagulation beinhalten wie Sepsis, Polytrauma oder Schock ([124]).

Auch weisen neuere Erkenntnisse darauf hin, dass nicht nur die starke Aktivierung des Gerinnungssystems durch Bakterienendotoxine oder Thromboplastin (auf Englisch: tissue factor) verantwortlich für die Entstehung einer DIC ist, sondern außerdem die Aktivität von proinflammatorischen Zytokinen zu einer DIC führen kann. Hierbei handelt es sich um dieselben Mediatoren, die auch als ursächlich für eine Sepsis gesehen werden ([125]).

Durch die endotheliale Dysfunktion im Verlauf einer Sepsis steigt z.B. das Level des Plasminogen-activator inhibitors (PAI1) und führt zu einer **eingeschränkten Beseitigung des Fibrins**. Gesteigerte Blutgerinnung und verminderte Fibrinolyse wiederum führen zur Bildung von Mikrothromben und letztendlich zur mikrozirkulatorischen Dysfunktion ([126],[127]).

Die Aktivierung des **Komplementsystems** führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Plasmaproteine, sogenannten Anaphylaxinen. Insbesondere die Komplementfaktoren C3a und C5a scheinen bei einer Sepsis eine wichtige Rolle zu spielen. Diese sind im Serum septischer Patienten vermehrt vorhanden und mit einer erhöhten Mortalität verbunden ([128]). Denn auch wenn die Komplementaktivierung eine wichtige Komponente der schützenden Immunantwort ist, so kann eine unkontrollierte Aktivierung Schaden am Gewebe erzeugen und zum Organversagen beitragen ([129]).

1.6.3. Gefäßschädigung

Inflammation, Gerinnung und Ischämie während einer Sepsis bedingen eine Schädigung der Mikrovaskulation. Beeinträchtigungen in der Perfusion führen zu einer weite-

[123] Vgl. Keel und Trentz 2005.
[124] Vgl. Werdan et al. 2005.
[125] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[126] Vgl. Keel und Trentz 2005.
[127] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[128] Vgl. Rittirsch et al. 2012.
[129] Vgl. Rittirsch et al. 2012.

ren Störung der Wirtsantwort durch eine veränderte Leukozytenmigration, der Erzeugung apoptotischer Mikropartikel und einer verstärkten zellulären Hypoxie. Das Ergebnis ist die Entwicklung eines Teufelskreises, der schwer zu durchbrechen ist und eine Verschlimmerung der Gefäßschädigung bewirkt ([130],[131]).

1.6.4. Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und wird oft als ein „Selbstmordprogramm" einzelner Zellen bezeichnet. Dieses kann von außen zum Beispiel durch Natürliche Killerzellen angeregt oder aufgrund von zellinternen Prozessen ausgelöst werden (etwa nach starker Schädigung der Erbinformation). Vorteil der Apoptose gegenüber der Nekrose ist der geregelte Zelltod ohne Austritt intrazellulärer Proteine und somit ohne eine Aktivierung der Immunantwort. Apoptotische Zellreste werden von Phagozyten aufgenommen und verwertet ([132]).

Bei einer Sepsis wird eine erhöhte Apoptoserate in Lymphozyten und dendritischen Zellen beobachtet. Induziert durch Pathogene und eine starke Immunantwort dient sie als negativer Regulationsmechanismus, um die Inflammation zu bremsen. Apoptose trägt somit zur Immunparalyse bei Sepsis bei ([133]).

Die Apoptoserate in Neutrophilen Granulozyten und Monozyten dagegen bleibt gleich oder ist sogar vermindert. Verursacht wird dieses durch Zytokine, die das Überleben von Neutrophilen verlängern und gleichzeitig die Degranulation steigern. Die verzögerte Apoptose in Neutrophilen führt so zu einer starken Inflammation und steigert die Beschädigung von Endothel und Muskelzellen ([134]).

Die Phagozytose apoptotischer Zellen fördert die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine und induziert einen anti-inflammatorischen Phänotyp der phagozytierenden Zellen. Gleichzeitig wird in septischen Patienten jedoch eine eingeschränkte Beseitigung des Zelldetruitus beobachtet. Auf diese Art und Weise kann eine verstärkte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine begünstigt werden ([135]).

1.6.5. NO-Produktion

Stickstoffmonoxid (NO) ist eine von vielen vasoaktiven Substanzen, die von verschiedenen Zellen bei Endotoxinämie und Sepsis ausgeschüttet werden. Unter physiologischen Umständen wird es von zwei Kalzium-abhängigen Enzymen, den NO-Synthasen (NOS), produziert, die sich in Neuronen (nNOS) und im Endothel (eNOS) befinden. Die

[130] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[131] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[132] Vgl. Keel und Trentz 2005.
[133] Vgl. Hotchkiss et al. 2005.
[134] Vgl. Hotchkiss et al. 2009.
[135] Vgl. Luan et al. 2015.

Funktionen reichen von Neurotransmission und Vasodilatation bis zur Inhibition der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Nach bakteriellen Infektionen, besonders mit gramnegativen Keimen, wird seine Herstellung gesteigert durch die zytokinvermittelte Induktion der iNOS in Zellen, die unter normalen Umständen kein NO produzieren ([136]).

1.6.6. Mitochondriale Dysfunktion

Verminderter Sauerstoffverbrauch, erhöhte Gewebs-Sauerstoffwerte und gesteigerte anaerobe Glykolyse mit erhöhten Laktat-Serumleveln lassen darauf schließen, dass eher die Sauerstoff-Ausnutzung als das -Angebot im Rahmen einer Sepsis gestört ist. Neueste Entdeckungen zeigen, dass es im Verlauf von Sepsis und septischem Schock zu einer starken Beeinträchtigung der Mitochondrien kommt.

Reduzierte Level antioxidativen Glutathions kombiniert mit einer exzessiven Generation reaktiver Sauerstoffspezies bedingen eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung und ATP-Produktion. Diese zytopathische Hypoxie korreliert mit der Schwere und dem Ergebnis der Organdysfunktion und kann zu der Entwicklung einer Sepsis beitragen ([137],[138]).

1.6.7. Stoffwechselveränderungen

Nach einem schweren Trauma und bei Sepsis führen Stress, Verletzungen und die gesteigerte Immunabwehr zu einem erhöhten Energiebedarf und einer verstärkten Ausschüttung von Katecholaminen. Der sogenannte Postaggressionsstoffwechsel ist gekennzeichnet durch Hypermetabolismus, Hyperglykämie und verstärktem Abbau von Muskelproteinen. Glykogenolyse und Glukoneogenese in der Leber werden gesteigert und die Ausschüttung von freien Fettsäuren verstärkt. Es kommt zu Hyperglykämien, verursacht durch eine teilweise Hemmung der Insulinsekretion durch Katecholamine und vor allem durch eine periphere Insulinresistenz ([139]).

Die intrazelluläre Glukose wird via Glykolyse zu Pyruvat oxidiert und danach zu Laktat reduziert. Durch den vermehrten Anfall von Laktat kommt es zur metabolischen Azidose. Die Glykolyse läuft vermehrt anaerob ab und liefert somit pro Molekül Glukose sehr viel weniger ATP und damit Energie als bei der aeroben Glykolyse mit anschließendem Citratzyklus. Grund für die gesteigerte anaerobe Glykolyse ist nicht der verminderte Sauerstoffgehalt des Blutes - dieser kann sogar erhöht sein, sondern vielmehr eine Funktionsstörung der Mitochondrien ([140]).

[136] Vgl. Parratt 1998.
[137] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[138] Vgl. Galley 2011.
[139] Vgl. Englert und Rogers 2016.
[140] Vgl. Singer 2014.

Der erhöhte Bedarf an Proteinen nach einem Polytrauma durch die starke Immunantwort und zur Reparatur geschädigten Gewebes erfordert eine deutliche Steigerung des Proteinumsatzes. Außerdem werden für die Glukoneogenese vermehrt Aminosäuren benötigt. Dieser gesteigerte Bedarf wird jedoch nicht über die Nahrung, sondern über den Abbau von Muskelproteinen gedeckt. Auch eine maximale exogene Proteinzufuhr, wie sie heute parenteral möglich ist, verhindert die Muskelzellproteolyse nicht, da die Regulation über Zytokine weitgehend von der Nahrungsaufnahme unabhängig ist ([141]).

1.7. Microarray-Analysen

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten eine Einführung in die Thematik der Sepsis gegeben wurde, soll nun näher auf die wissenschaftliche Methode der Microarrays eingegangen werden.

Die Microarray Technologie ermöglicht die Untersuchung tausender Gene zur selben Zeit mit dem Ziel, Gene zu identifizieren, die in verschiedenen Proben unterschiedlich exprimiert werden ([142]).

Microarrays sind molekularbiologische Untersuchungssysteme zur Bestimmung der zellulären Genexpression. Soll in einer Zelle ein Protein produziert werden, so wird dessen Bauanleitung von der Desoxyribonukleinsäure (DNA) abgelesen und als sogenannte messenger Ribonukleinsäure (mRNA) umgeschrieben. Nach dieser sogenannten Transkription folgt nun die Translation, was das Zusammensetzen des Proteins aus den passenden Aminosäuren meint. Eine graphische Darstellung dieser Vorgänge bietet Abbildung 5.

[141] Vgl. Englert und Rogers 2016.
[142] Vgl. Wurmbach et al. 2003.

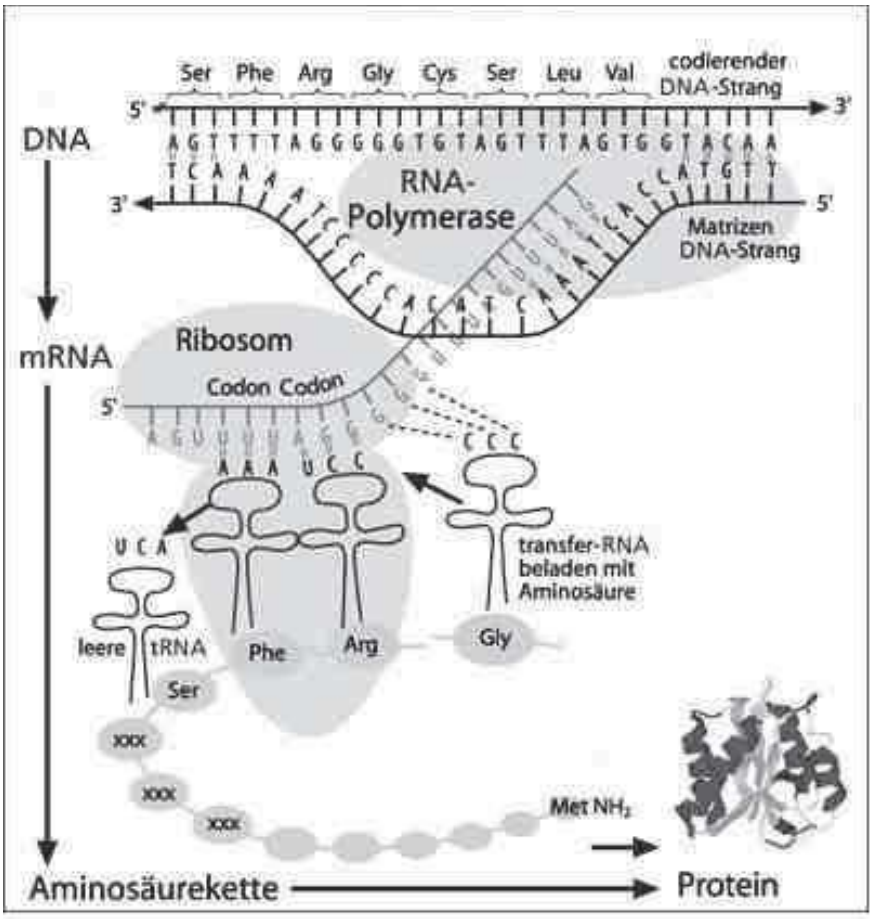

Abbildung 5: Die Proteinbiosynthese, auf dem Weg von der DNA zum fertigen Protein ([143]): Die Transkription (lat. transcribere = Umschreiben) ist in der Proteinbiosynthese der erste Schritt und beinhaltet die Umschreibung der DNA zu mRNA. Die mRNA ist eine komplementäre Kopie eines Teilstücks der DNA. Katalysiert wird dies durch Enzyme, den RNA-Polymerasen.
Bei der Translation wird dann der mRNA-Strang abgelesen und anhand dieser Vorlage das entsprechende Protein durch die Verknüpfung von Aminosäuren synthetisiert.
Abgebildete Aminosäuren: Arg = Arginin, Cys = Cystein, Gly = Glycin, Leu = Leucin, Phe = Phenylalanin, Ser = Sertralin, Val = Valin

Der Ansatz der Microarrayanalyse beruht auf der Annahme, dass die mRNA ein vorläufiges Bild der späteren Proteinbiosynthese ergibt. Dieses wiederum spiegelt den momentanen Aktivierungszustand und die Aufgabe der jeweiligen Zelle wider ([144]).
Ein Microarray besteht aus einer Platte, auf der winzige Mengen der DNA-Sequenz ausgesuchter Gene in punktförmigen Feldern, sogenannten Spots, aufgebracht sind. Für ein Experiment werden die Proben mit der isolierten RNA auf die Platten aufgetragen. Die enthaltene RNA bindet nun an die komplementären DNA-Sequenzen der Spots und bleibt daran haften. RNA ohne passenden Spot wird durch mehrmaliges Waschen beseitigt. Nach Anfärben der Microarrays werden diese abgelesen und die

[143] Adaptiert nach Junker et al. 2006.
[144] Vgl. Dallas et al. 2005.

Stärke der Signale gemessen. Spots, deren Gene oft exprimiert werden, haben ein starkes und Spots, deren Gene selten exprimiert werden, ein schwaches Signal. Microarrays messen somit über die Analyse der mRNA indirekt die Proteinsynthese und bewerten sie semiquantitativ ([145]).

Der große Vorteil von Microarrays ist die Möglichkeit, mit ihnen nicht nur einzelne Parameter erfassen zu können, sondern große Mengen verschiedener Gene. Somit bekommt man nicht nur punktförmige Informationen über einzelne Gene, wie zum Beispiel bei der Polymerase Chain Reaction (PCR), sondern einen Überblick über die ganzheitliche Reaktion der Zellen ([146]).

1.7.1. Validierung per Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction

Der große Vorteil eines Microarrayexperiments liegt in der Möglichkeit, große Datenmengen auf einmal zu untersuchen, der Nachteil ist jedoch die mangelnde Präzision bei quantitativen Analysen der Genexpression. Dieses Manko lässt sich durch die komplementäre Verwendung der Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technik ausgleichen, die in der Regel eine verlässliche mRNA Quantifizierung über eine große Spanne von Expressionsleveln bietet. Außerdem zeichnet sie sich durch hohe Reproduzierbarkeit aus und ist so ideal, um die Daten von Microarrayanalysen zu validieren ([147]).

Die RT-PCR ist die Kombination zweier Methoden der Molekularbiologie – die Nutzung der Reverse Transkriptase (RT) und der Polymerase Chain Reaction (PCR) – um RNA nachzuweisen und zu quantifizieren. Beide Prozesse laufen nacheinander ab. Zunächst wird die RNA in DNA umgeschrieben, dann werden Teile der DNA spezifisch vermehrt. Daher wird zuerst die Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden kann.

Bei der anschließenden Amplifikation von DNA durch die PCR werden spezifische thermostabile DNA-Polymerasen verwendet, die DNA-abhängig sind, das heißt: sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren.

Zur Durchführung der Amplifikation sind außerdem zwei Primer-RNAs essentiell. Als Primer bezeichnet man ein Oligonukleotid, welches für DNA-replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerase als Startpunkt dient. Die PCR wird heute üblicherweise apparativ in einem Thermocycler durchgeführt. Sie läuft in mehreren Schritten ab.

[145] Vgl. Wurmbach et al. 2003.
[146] Vgl. Wurmbach et al. 2003.
[147] Vgl. Dallas et al. 2005.

Durch Erwärmung wird der DNA-RNA-Strang zunächst denaturiert. Nach Abkühlung des Versuchsansatzes werden dann die gen-spezifischen Primer hinzugegeben, die an die jeweiligen Sequenzen auf der DNA binden. Anschließend synthetisiert die Polymerase, vom Primer ausgehend, den komplementären Strang.
Dies wird mehrfach wiederholt. Die Produkte der RT-PCR lassen sich anschließend gelelektrophoretisch untersuchen und quantifizieren ([148]).

1.8. Stand der Forschung

Die heutigen Erkenntnisse zur Sepsis stammen zum großen Teil aus Messungen einzelner Parameter und Proteine. Verschiedene Ansätze zur Behandlung der Sepsis anhand von Modulation dieser Einzelwerte sind jedoch fehlgeschlagen und haben so gezeigt, dass einzelne Faktoren nicht allein für die Entstehung oder den Verlauf einer Sepsis verantwortlich sind. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass bestimmte Genmutationen mit dem gehäuften Auftreten einer Sepsis einhergehen ([149]), blieb die Suche nach dem Sepsisgen bislang erfolglos.
Verschiedene Studien mit neuen Medikamenten zur Mediatorenmodulation sind fehlgeschlagen ([150],[151]). Dieses Versagen ist sowohl bedingt durch das mangelnde Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge der Entstehung einer Sepsis als auch unzureichende Möglichkeiten Sepsis in experimentellen Studien zu immitieren ([152]). Daher müssen Wege und Möglichkeiten gefunden werden, die Pathomechanismen der Sepsis umfassender zu betrachten und zu erforschen.
Sucht man in PubMed nach dem Begriff *Microarray*, findet man über 65.000 Einträge. Für *Sepsis* und *Gene expression* erhält man über 3.500 Einträge. Für *Sepsis* und *Microarray* gibt es immerhin noch über 280 Veröffentlichungen und fügt man Trauma hinzu, sind es 24. Diese immer weiter wachsenden Zahlen verdeutlichen, dass die **Microarray Technologie** eine wichtige Methode in der modernen Forschung darstellt und mit großem Erfolg eingesetzt wird. In verschiedenen Bereichen der Wissenschaft wurden mit Hilfe von Microarrays Pathomechanismen entdeckt und Schlüsselgene identifiziert. Vor allem im Bereich der Krebsforschung, jedoch auch bei inflammatorischen Krankheiten, neurologisch-degenerativen Syndromen, zur Erprobung neuer Medikamente und in vielen anderen Feldern konnten Fortschritte erzielt werden. So ist es nicht verwunderlich, dass auch in der Sepsisforschung Microarrays mit Erfolg verwen-

[148] Vgl. Bustin 2002.
[149] Vgl. Sutherland und Walley 2009.
[150] Vgl. The Pharmaletter.
[151] Vgl. Opal et al. 2013.
[152] Vgl. Angus 2011.

det werden ([153]). Studien haben gezeigt, dass sich SIRS und Sepsis anhand von Genexpressionsprofilen unterscheiden lassen, vor allem im Mausmodell ([154],[155]), aber auch in klinischen Studien ([156]).

Einzelne Gene, insbesondere inflammationsbezogene Gene, weisen hingegen sehr unterschiedliche Verläufe der Expression bei septischen Patienten auf ([157]). Maslove et al. konnten wiederum zwei Subtypen bei Sepsis anhand von Genexpressionsprofilen identifizieren, die sich in ihrer Reaktion unterschieden ([158]). Bogner et al. zeigten, dass Genexpressionsprofile spezielle Charakteristika bei Patienten mit Multiorganversagen aufweisen und sich diese mit der Höhe des ISS und dem klinischen Ergebnis verändern ([159]).

Johnson et al. haben gezeigt, dass die Unterschiede zwischen SIRS und Sepsis sogar vor den klinischen Zeichen der Sepsis bestehen ([160]). Für das klassische Zwei-Phasen-Modell mit Hyper- und dann Hypoinflammation finden sich auch auf Genexpressionslevel keine starken Hinweise ([161],[162]).

Außerdem wurde die Microarrayanalyse zur Identifizierung von Schlüsselgenen der Sepsis genutzt ([163]). Diese sollen einmal als Biomarker für die Diagnostik, jedoch selbstverständlich auch als mögliche Therapieziele dienen ([164]).

Eine einfache Methode, um von Patienten Proben zu gewinnen, ist die **Abnahme von Vollblut**. Während im Mausmodell oft Zellen verschiedener Organe wie der Milz genommen werden, muss für die Analyse von Patientendaten auf leichter zugängliches Material zurückgegriffen werden. Das Potential von Vollblut zur Microarrayanalyse wurde in verschiedenen Studien deutlich ([165],[166]). Talwar et al. zeigten, dass die Genexpressionsprofile nach der Applikation von Endotoxin bei Monozyten und Vollblut die gleichen Ergebnisse lieferten ([167]).

Mit der Verwendung von Vollblut bei septischen Patienten zur Mikroarrayanalyse steht ein leicht zugängliches Material zur Verfügung, das auch eine routinemäßige Mikroarrayanalyse zur Sepsisdiagnostik ermöglichen könnte.

---

[153] Vgl. Wong 2012.
[154] Vgl. Chung et al. 2006.
[155] Vgl. Brownstein et al. 2006.
[156] Vgl. Johnson et al. 2007.
[157] Vgl. Tang et al. 2010.
[158] Vgl. Maslove et al. 2012.
[159] Vgl. Bogner et al. 2007.
[160] Vgl. Johnson et al. 2007.
[161] Vgl. Tang et al. 2010.
[162] Vgl. Xiao et al. 2011.
[163] Vgl. Tang et al. 2007.
[164] Vgl. Wong 2012.
[165] Vgl. Feezor et al. 2004.
[166] Vgl. Johnson et al. 2007.
[167] Vgl. Talwar et al. 2006.

Die Fortschritte im Verständnis der Sepsis, die bereits durch die Analyse von Genexpressionsprofilen erzielt werden konnten, lassen auf weitere Möglichkeiten in der Sepsisforschung schließen und es drängen sich verschiedene Fragestellungen auf, die im nächsten Abschnitt erläutert werden ([168],[169]).

1.9. Ziele und Fragestellung

Trotz modernster Intensivmedizin liegt die Mortalitätsrate der Sepsis immer noch hoch und hat sich im Verlauf der letzten 40 Jahre kaum geändert. Dies liegt zum großen Teil am mangelnden Verständnis der Pathomechanismen, die zu einer Sepsis führen, und den Abläufen im Körper während einer Sepsis. Dank intensiver Forschung werden immer mehr einzelne Details gefunden, das Gesamtbild bleibt jedoch unvollständig.
Septische Patienten präsentieren jedoch oft kein einheitliches Bild, was das Verständnis der Sepsis weiter erschwert. Die Variabilität in den klinischen Symptomen macht es schwierig, frühzeitig eine differenzierte Diagnose zu stellen. Hinzu kommt, dass der Beginn der Sepsis von Patient zu Patient schwankt, in unserer Studie z.B. zwischen 3 und 8 Tagen nach Polytrauma.
Das Resultat von schlechtem Verständnis und später Diagnose ist eine unzureichende Therapie der Sepsis. Sie kommt oft zu spät und hilft nur bedingt. Zum großen Teil werden Symptome behandelt, anstatt die Ursachen der Sepsis angehen zu können. Eine frühzeitige kausale Therapie ist jedoch der entscheidende Faktor, um die Sterblichkeit der Sepsis wirkungsvoll zu senken. Daher müssen weitere Anstrengungen unternommen werden um das Verständnis über Sepsis zu verbessern und wirkungsvolle Therapien zu entwickeln.
Verschiedene Studien haben bereits vielversprechende Ergebnisse geliefert und Möglichkeiten zum Einsatz der Microarray-Technologie in der Sepsisforschung aufgezeigt. Spezifische Studien mit Patienten nach Polytrauma sind jedoch rar und beschränken sich auf den Zeitraum nach Beginn des septischen Phänotyps und auf einzelne Zellreihen.
Daher ist das Ziel der Doktorarbeit, einen gesamtheitlichen Eindruck der Reaktion septischer Patienten zu bekommen und damit zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen beizutragen. Nicht ein einzelnes Molekül der Signalkaskaden soll untersucht werden, sondern **Abläufe im Gesamten** und das Zusammenspiel der Mechanismen.

[168] Vgl. Tang et al. 2010.
[169] Vgl. Wong 2012.

- Welche Gemeinsamkeiten zeigen Patienten, die eine Sepsis entwickeln, in ihrem Reaktionsprofil und welche Unterschiede gibt es zu Patienten, die nicht septisch werden?
- Welche Mechanismen können zur Entstehung einer Sepsis beitragen?
- Welche Entwicklungen zeigen sich im Zeitverlauf?
- Wann werden welche Mechanismen initiiert und wann beendet? Wann bestehen die größten Unterschiede zwischen septischen und nicht-septischen Patienten?

Über die Ermittlung von sogenannten Biomarkern sollen diagnostische Möglichkeiten eröffnet werden für eine möglist frühzeitige Diagnosestellung. Darüber hinaus sollen durch die Analyse der Pathomechanismen **potentielle Angriffspunkte** für eine Therapie identifiziert werden, die die Behandlung der Sepsis optimieren oder sogar die Entwicklung einer Sepsis verhindern können.
Bezüglich einer **Therapieoptimierung** soll auch über den besten Zeitpunkt für spezifische Behandlungen nachgedacht werden.

- Kann anhand einer Microarrayanalyse gezeigt werden, wann und bei wem einzelne Maßnahmen sinnvoll wären und bei wem nicht?

Im Rahmen dieser Analyse können keine Beweise für pathophysiologische Prozesse erbracht werden, stattdessen soll die Basis für vertiefende Forschungen geschaffen und mögliche Fragestellungen aufgeworfen werden.

2. Methoden

Im nun folgenden Methodenteil werden das Studiendesign mit Beschreibung der Stichprobe und Materialien erläutert sowie die technischen Abläufe und insbesondere die statistischen Auswertungsmethoden und das Vorgehen bei der Datenanalyse.

2.1. Aufbau der Studie

Zunächst wird der allgemeine Aufbau der Studie beschrieben mit klinischem Setting, Patientenauswahl und Abläufen auf der Intensivstation.

2.1.1. Studiendesign

Es handelt sich hierbei um eine prospektive, klinische Studie. Das heißt, eine vor Beginn der Studie festgelegte Hypothese wird empirisch untersucht und überprüft.
Durchgeführt wurde die Studie auf der operativen Intensivstation der Abteilung für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin am Universitätsklinikum Gießen/ Marburg am Standort Gießen. Das vollständige Studienprotokoll kann dort eingesehen werden.
Von allen Patienten (oder bei zwischenzeitlichem Unvermögen von ihrem gesetzlichen Vormund) wurde die schriftliche Einwilligung für die Untersuchung eingeholt. Die Studie wurde durch das lokale Ethikkommittee der Universität Gießen Fachbereich Humanmedizin genehmigt (Aktenzeichen 79/01).
Die Einteilung der Patienten in septisch und nicht-septisch wurde vom diensthabenden Arzt auf der Intensivstation zu jedem Zeitpunkt neu vorgenommen. Dieser war sich dem Ziel der Studie nicht bewusst. Als Referenz wurden die Kriterien des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine von 1992 genommen ([170]). Die Behandlung der Patienten erfolgte nach standardisierten Vorlagen der Klinik und den aktuellen veröffentlichen Leitlinien ([171]).

2.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden Patienten nach Polytrauma eingeschlossen, die auf der Intensivstation behandelt und dort innerhalb von 12 Stunden aufgenommen wurden.
Weitere Einschlusskriterien waren ein Injury Severity Score von mindestens 15 und ein Alter zwischen 18 und 65 Jahren, wobei die Mikroarrayanalyse nur bei Patienten jünger als 40 Jahre erfolgte.
Ausgeschlossen wurden Patienten mit isoliertem Kopftrauma, Kardiopulmonaler Reanimation oder Tod innerhalb von 3 Tagen, da dieser dem Trauma und nicht der Sep-

[170] Vgl. Bone et al. 2009.
[171] Vgl. Reinhart et al. 2006.

sis zugeschrieben wurde. Weitere Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft und Diabetes mellitus sowie eine maligne Erkrankung, Hämofiltration oder Organversagen in der Anamnese. Eine Übersicht über Ein- und Ausschlusskriterien bieten Tabelle 1 und Tabelle 2.

Einschlusskriterien
• Eintreffen auf der Intensivstation <12h nach Trauma • Diagnose Polytrauma mit ISS > 15
• Alter zwischen 18 und 65 Jahren • Einverständniserklärung mit Unterschrift durch Patient oder Betreuer

Tabelle 1 Einschlusskriterien: Aufgeführt werden die für die Studie verwendeten Einschlusskriterien.

Ausschlusskriterien
• Isoliertes Schädelhirntrauma • Anzunehmender Hirntod bei noch funktionierendem Kreislauf • Sekundär nach Gießen verlegte Patienten • Patienten nach Reanimation • Schwangerschaft und Stillzeit • Verbrennungsopfer • Versterben innerhalb von 3 Tagen • Angeborene Immundefizienz, HIV • Chronische oder parallel bestehende Infektionskrankheiten • Hinweise auf einen akuten Myokardinfarkt • Maligne Erkrankung • Endokrine Störungen, z.B. Diabetes mellitus • Hämofiltration in der Anamnese • Rheumatische Erkrankungen

Tabelle 2 Ausschlusskriterien: Erst wenn bei Zutreffen der Einschlusskriterien keins der aufgeführten Ausschlusskriterien auf den Patienten passte, wurde dieser in die Studie aufgenommen.

2.1.3. Messzeitraum

Der Messzeitraum, an dem die klinischen Daten erhoben wurden, umfasst 15 Tage, beginnend mit dem Aufnahmetag auf der Intensivstation (d_0). Der erste Abnahmezeitpunkt auch der Proben für die Genexpressionsanalyse lag innerhalb der ersten zwei Stunden nach Eintreffen des jeweiligen Patienten auf der Intensivstation. Die Abnahmezeitpunkte waren dabei teilweise identisch mit der Entnahme der Blutproben für die Microarray-Analyse wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

In den folgenden Tagen erfolgte die Probengewinnung in der Zeit zwischen 6 und 8 Uhr morgens. So kann der Einfluss des endogenen, circadianen Rhythmus auf die Messwerte möglichst gering gehalten werden.

2.2. Ablauf des klinischen Teils

Eine detaillierte Darstellung des klinischen Teils der Studie bietet das Studienprotokoll, das in der operativen Intensivmedizin am Universitätsklinikum Gießen/ Marburg vorliegt sowie im Anhang D. Eine kurze Zusammenfassung der Abläufe auf der Intensivstation wird im Folgenden gegeben.

2.2.1. Monitoring auf der Intensivstation

Die auf der Intensivstation eingelieferten Patienten wurden nach den im Protokoll aufgeführten Standards überwacht. Das Monitoring umfasste hierbei die ständige Überwachung der Herzkreislaufsituation über eine arterielle Blutdruckmessung, der Körpertemperatur und eine Erfassung der pulmonalen Situation über eine Erhebung der Beatmungsparameter. Es erfolgte eine ständige Flüssigkeitsbilanzierung. Alle Patienten wurden mit einem mehrlumigen, zentralen Venenkatheter sowie einer Magen- bzw. Duodenalsonde versorgt. Zumindest während der ersten Behandlungswoche fand bei allen Patienten eine kontrollierte Beatmung statt.
Routinemäßige Blutentnahmen erfolgten täglich zur Überwachung und Kontrolle von Blutbild, Elektrolyten, Nierenretentionsparametern, Leberwerten, Entzündungsparametern, Gesamteiweiß und Gerinnung. Blutgase wurden arteriell, mindestens einmal täglich gewonnen.
Mikrobiologische Untersuchungen zur Keimbestimmung mit Antibiogramm erfolgten aus Bronchial- und Trachealsekret, Urinkulturen, Abstrichen aus Wunden oder intraoperativ sowie peripheren Kathetern. Blutkulturen wurden bei klinischem Verdacht auf einen septischen Schub mit Fieberanstieg über 38,5° C peripher und zentral entnommen.

2.2.2. Intensivmedizinische Maßnahmen

Die intensivmedizinischen Maßnahmen beinhalten die an den schwerstkranken Patienten angepassten pflegerischen und physiotherapeutischen Behandlungen sowie die ärztlich angeordneten Therapien.
Das Beatmungsverfahren wurde druckkontrolliert oder druckkontrolliert assistiert je nach Vigilanz des Patienten gewählt.
Zur Thromboseprophylaxe wurde Heparin kontinuierlich mit 125 – 150 IE/h infundiert.
Zur Kreislaufunterstützung wurde Adrenalin und/oder Noradrenalin bei einem systemischen vaskulären Widerstand unter 700 $dyn*sec^{-1}*cm^{-5}$ oder einem mittleren arteriellen Blutdruck unter 60 mmHg gegeben.
Die antimikrobielle Therapie mit Antibiose bzw. Antimykotika wurde primär kalkuliert begonnen und nach Eintreffen des Antibiogramms ggf. angepasst.

Transfusionen homologer Erythrozytenkonzentrate erfolgten bedarfsadaptiert, ab einem Hämoglobinwert von unter 7 g/l.

2.2.3. Operationen

Operationen an den polytraumatisierten Patienten zur Stabilisierung von Frakturen, Stoppen von Blutungen und Versorgung intraabdomineller Verletzungen erfolgten nach dem damage-control-Prinzip. Das heißt, die notwendigen Operationen wurden, dem Allgemeinzustand endsprechend, zum frühestmöglichen Zeitpunkt durchgeführt, um ein Überleben des Patienten zu ermöglichen. Gleichzeitig sollten die Eingriffe, die den Patienten schwächen, vermieden werden.

2.3. Technische Durchführung des Microarrayexperiments

Nach Darstellung der klinischen Studie soll nun auf die Durchführung des Mikroarrayexperiments eingegangen werden. Der allgemeine Ablauf umfasst diverse Schritte. Eine graphische Übersicht hierzu bietet Abbildung 6, die auch das Vorgehen in der vorliegenden Studie widerspiegelt.

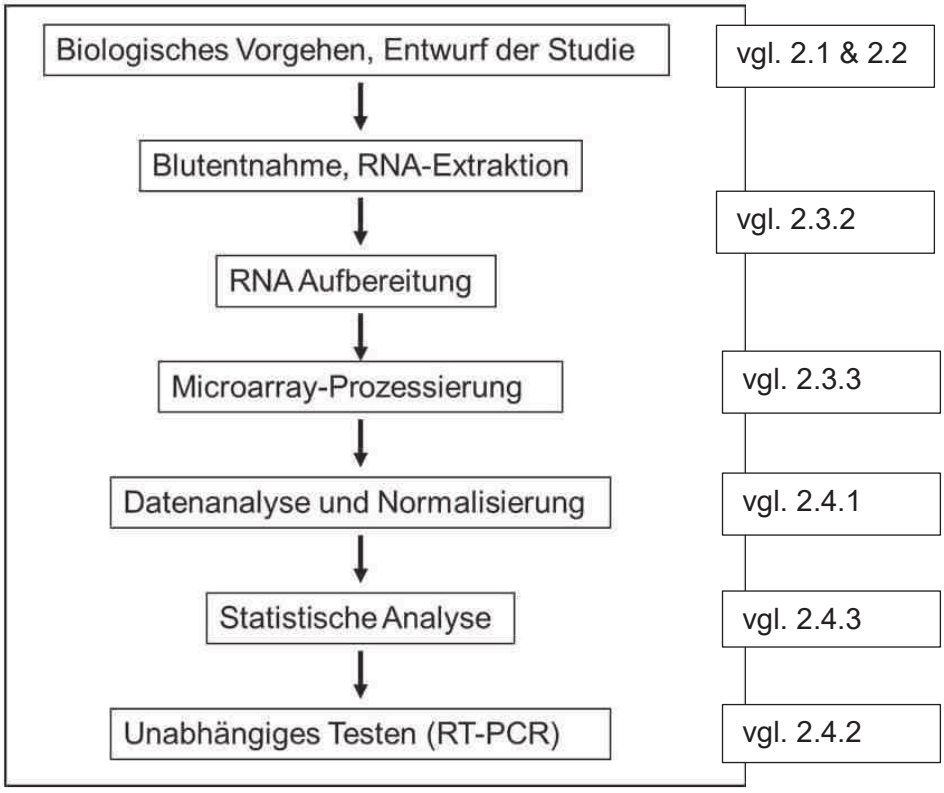

Abbildung 6: Ablauf des Microarrayexperiments: Nachdem das biologische Vorgehen in der Studie festgelegt wurde, erfolgt dann die Probengewinnung und anschließend die Analyse der erhobenen Daten. Abschließend wird die gewählte Methode mit

einem unabhängigen Verfahren evaluiert ([172]). Rechts am Bild sind die Kapitel angegeben, in denen die jeweiligen Schritte in dieser Arbeit behandelt werden.

Zunächst gilt es, das biologische Vorgehen festzulegen, das bereits in Abschnitt 2.1 und 2.2 beschrieben wurde. Was soll untersucht werden und wie kann man die Problemstellung am besten erfassen? Danach folgen die technische Abläufe wie Probenentnahme und RNA-Isolation, die Microarray-Auswahl und Hybridisierung sowie zum Schluss die Datenanalyse und PCR Validierung ([173]).

2.3.1. Auswahl der Patienten für die Microarrayanalyse

10 Patienten, die eine Sepsis im Verlauf entwickelten, und 10, die nicht septisch wurden, erfüllen die Kriterien für die Genexpressionsanalyse. Sie wurden manuell nach der *Matched Pair Methode* aus dem Gesamtkollektiv der Studie ausgewählt.
Im Gegensatz zu den verschiedenen Randomisierungsverfahren handelt es sich bei der Matched-pair-Methode um eine willkürliche, wenn auch systematische Methode. Jedem Probanden in der einen Gruppe wird ein vergleichbarer Partner einer anderen Gruppe zugeordnet. Vergleichbar muss er insbesondere im Hinblick auf alle für die jeweilige Fragestellung relevanten prognostischen Faktoren sein ([174]).
In dieser Studie wurden die Parameter Alter, ethnischer Hintergrund und Geschlecht für die Auswahl berücksichtigt.

2.3.2. Probenentnahme und RNA Isolation

Die erste Blutprobe wurde den Patienten innerhalb einer Stunde nach Eintreffen auf der Intensivstation abgenommen. Danach erfolgte eine Entnahme nach 12 und 24 Stunden und daraufhin alle 24 Stunden bis zum Zeitpunkt der Entlassung von der Intensivstation. Für die Microarrayanalyse wurden Proben von Zeitpunkt 0 d_0 (Aufnahme auf der Intensivstation), nach 24 Stunden (d_1), nach 72h (d_3), vom 5. Tag (d_5) und vom 9. Tag (d_9) verwendet.

[172] Wurmbach et al. 2003.
[173] Vgl. Wurmbach et al. 2003.
[174] Vgl. Stuart 2010.

	Aufnahme Intensivstation	SIRS	Sepsis		Erholungs phase
Blutent-nahme	innerhalb von 2h	nach 24h	nach 72h	am 5. Tag	am 9. Tag
	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 9
	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9

Abbildung 7: Zeitpunkte der Probengewinnung für die Microarrayanalysen: Insgesamt wurden 5 Zeitpunkte ausgewählt, entsprechend dem klinischen Bild der Patienten. Im vorliegenden Text wird aus sprachlichen Gründen für d_0 Tag 0, für d_1 Tag 1, usw. verwendet.

Für die Blutabnahme und die darauf folgende RNA Isolierung wurde das PAX gene Blood RNA System (PreAnalytiX, Heidelberg) nach Angaben der Firma PreAnalytiX angewendet. Dieses ist ein in allen Schritten von der Blutentnahme bis zur RNA-Konservierung standadisiertes System und liefert somit verlässliche und mit anderen Studien vergleichbare Daten. Die Probengewinnung erfolgte mit Vollblut, aus dem die mRNA isoliert und extrahiert wurde. Zu den Vorteilen der Verwendung von Vollblut vergleiche Abschnitt 4.1.6. Es wurden jeweils 2,5 ml Blut entnommen. Nach Entnahme wurden die von Paxgene vorgesehenen Behältnisse einige Male invertiert, bei Raumtemperatur gelagert und dann innerhalb von 24 h in das Institut für Mikrobiologie für die weitere Verarbeitung gebracht.

2.3.3. Durchführung der Array Hybridisierung

Die verwendeten Microarrays waren CodeLink Uni Set Human 10K Bioarrays der Firma GE Healthcare aus Freiburg. Diese beinhalten schätzungsweise 10458 Proben innerhalb einer Reaktionskammer auf jedem Objektträger. Der Kern jeder CodeLink Plattform ist eine Glasscheibe, beschichtet mit einer Matrix aus Polyacrylamidgel. So entsteht eine dreidimensionale, wasserhaltige Hybridisierungsumgebung.
Die Quantität der RNA wurde mit Nanodrop (NanoDrop Technologies, Rockland DE, USA) bestimmt, während die Qualität der RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Boeblingen, Deutschland) ermittelt wurde. Wenn der Gesamtertrag mehr als 2 µg RNA und das 260/280 Verhältnis größer als 1,9 betrug, wurden 2 µg RNA der darauf folgenden cRNA Synthese zugeführt. Das 260/280 Verhältnis gibt die Reinheit einer Lösung von Nukleinsäuren an. Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung wird spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, gibt das Verhältnis der Nucleinsäure-Absorption zur Protein-Absorption Auskunft über die Reinheit einer Nucleinsäure-Lösung.

Für die cRNA Synthese wurde das CodeLink Expression Assay Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ausgehend von der isolierten RNA wurde zunächst mittels Erststrangsynthese eine anti-sense cDNA (complementäre Desoxyribonukleinsäure) gebildet. Die beiden Stränge wurden aufgetrennt und die RNA entfernt. Auf der nun vorliegenden anti-sense DNA wurde dann sense DNA hergestellt. Basierend auf der sense DNA erfolgt dann die Herstellung von cRNA. Nach Lysierung der cDNA wurde die gereinigte cRNA fragmentiert und jeweils 10 µg zusammen mit Hybridisierungslösung auf jedes Bioarray aufgetragen. Einen Überblick hierzu bietet Abbildung 8. Erhöht man die Anzahl der Replikate, steigen Genauigkeit und Sensitivität, gleichzeitig wachsen jedoch auch die Kosten des Experiments und der Aufwand, um die Proben zu präparieren. Hier wurden deshalb von jeder RNA Probe zur besseren Reproduzierbarkeit drei Replikate angefertigt. Die Arrays wurden mit Hilfe von Cy5^{TM}-streptavadin (Amersham Biosciences) angefärbt und mit dem GenePix 4000B Scanner eingelesen. Die so erhaltenen Bilder wurden der Datenanalyse zugeführt.

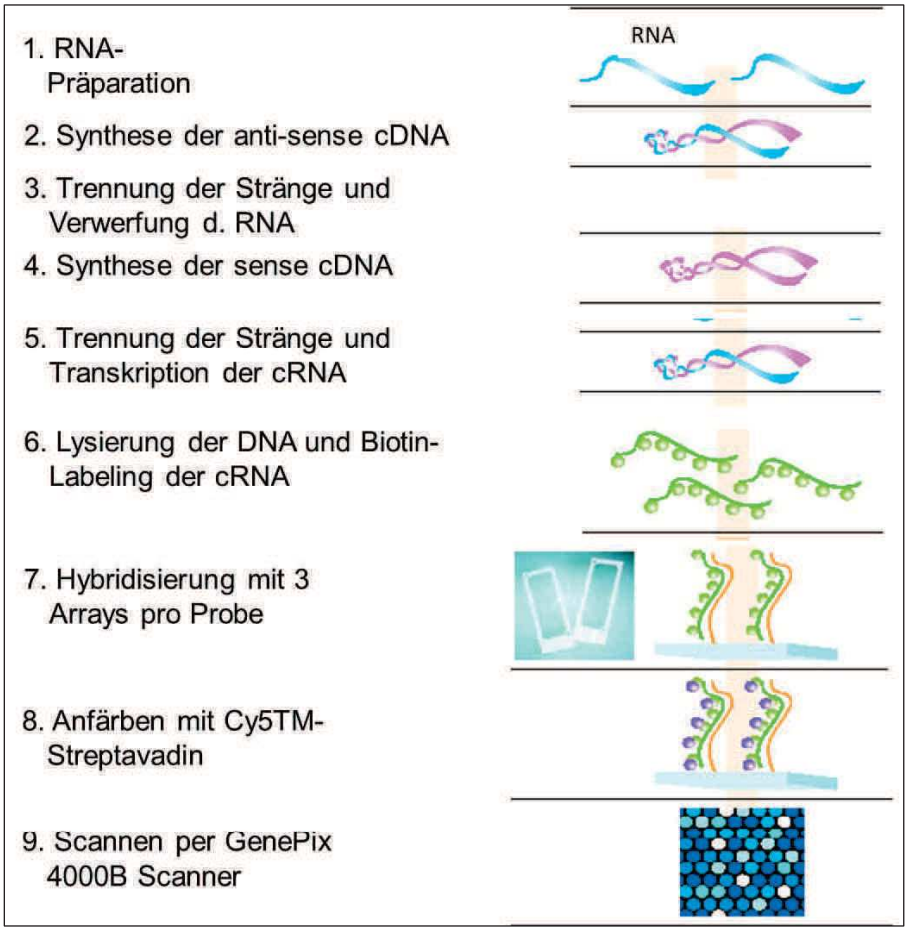

Abbildung 8: Technische Schritte der Microarray-Hybridisierung ([175]): Ablauf der cRNA-Synthese, ausgehend von der aus Vollblut gewonnen RNA, Hybridisierung und Färbung bis zum Scannen des Microarrays

[175] Adaptiert nach Taylor und McDougall A. 1999.

2.4. Analyse der Microarraydaten

Die Analyse eines Microarrayexperiments kann grob in zwei Teile eingeteilt werden. Die sogenannte low-level Analyse umfasst die Prozessierung der Rohdaten und deren Normalisierung. Unter high-level Analyse wird der Prozess der Visualisierung und Einordnung der in der low-level erlangten Daten in biologische Zusammenhänge verstanden ([176]).

2.4.1. Low-level-Analyse

Die Low-level-Analyse beinhaltet die Quantifizierung und anschließende Normalisierung der Microarray-Daten sowie die Identifizierung differentiell regulierter Gene.

2.4.1.1. Quantifizierung der Microarrays

Die Umwandlung der Bilder in numerische Daten wird Quantifizierung genannt ([177]). Für die Bewertung der Signalstärke der einzelnen Punkte wurde die CodeLink Expression Software 1.21 und die ImaGene 5.5 (BioDiscovery, CA, USA) Software im Hintergrund verwendet.

2.4.1.2. Intra-Slide-Normalisierung

Angegeben werden durch die CodeLink Expression Software die jeweilige Signalstärke und eine Qualitätsbeurteilung für jedes einzelne Gen sowie die Qualitätsmerkmale für das gesamte Array. Die Signalstärke wird zunächst jeweils als Rohwert angegeben. Darüber hinaus bietet die CodeLink Expression Software eine erste Intra-Slide-Normalisierung durch Bestimmung eines **medianen Expressionswertes** für jedes einzelne Microarray, zu dem die erhobenen Rohdaten ins Verhältnis gesetzt werden.
Zur Qualitätsbeurteilung der einzelnen Spots ordnet die CodeLink Software den Gensonden sogenannte **Attribute** zu, die der Morphologie und Symmetrie der Gensonden entsprechen. Die Dichte der auf einer Gensonde gebundenen Oligonukleotide nimmt auf einem Microarray ringförmig von innen nach außen zu. Dies führt dazu, dass eine qualitativ als hoch einzustufende Gensonde typischerweise eine „Donut"-Form aufweist. Die CodeLink Software ordnet jedem Spot eines der folgenden Qualitätsattribute zu:

- **GOOD** – Symmetrische Struktur
- **EMPTY** – Geringere Intensität als der Hintergrund
- **POOR** – Abweichungen in der Symmetrie erkennbar

[176] Vgl. Shay 2003.
[177] Vgl. Wurmbach et al. 2003.

- **MSR** – vom Hersteller entfernte Gensonden (Manufacturer Spot Removed), bei denen Qualitätsprobleme generell bekannt sind
- **NEG** – Unsymmetrische Struktur

In der vorliegenden Studie wurden nur Gensonden mit den Attributen GOOD und EMPTY verwendet. Werte mit den übrigen Attributen wurden gelöscht, wodurch Leerfelder entstanden.

Für jedes Array wurde darüber hinaus der sogenannte **Schwellenwert** bestimmt. Dies erfolgt mithilfe nicht-menschlicher Gensonden, wie z.B. bakteriellen Genen. Im Idealfall würde keine RNA an ihnen binden. Die im geringen Maße vorliegende unspezifische Bindung kann somit an diesen Gensonden erfasst werden.

Werte unterhalb des errechneten Schwellenwertes wurden als unspezifische Bindung angesehen und aussortiert.

Der Anteil der Werte in Prozent, die über dem Schwellenwert liegen, wird als **Present Call** (Pcall) bezeichnet. So lassen sich Microarrays von schlechter Qualität erkennen und ggf. entfernen.

2.4.1.3. Inter-Slide-Normalisierung

Im Gegensatz zur Intra-Slide-Normalisierung, die für jedes Microarray einzeln stattfindet, erfolgt die Inter-Slide-Normalisierung über mehrere Arrays hinweg. Die einzelnen Module werden nun im Folgenden beschrieben. Praktisch wurden die in Gießen entwickelten Module (Cleantable-, Schwellenwert, Ausreißerwerte Filtermodul) zur Vereinfachung der Anwendung in Visual Basic programmiert. Die GUI – (graphical user interface)- Oberfläche führt dann die Module automatisch aus.

Das bei uns entwickelte **Cleantable Modul** prüft, wie viele Leerfelder innerhalb einer Genzeile in zwei zu vergleichenden Gruppen vorliegen.

Def: Eine **Genzeile** meint hier und im Folgenden die Expressionswerte eines Gens in allen vorhandenen Arrays, d.h. sowohl in den technischen Replikaten als auch in den Arrays der anderen Patienten.

Alle Gene, bei denen mehr als 50% der Werte in einer Gruppe (Sepsis oder Nicht-Sepsis) fehlten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen und die Genzeile gelöscht.

Das ebenfalls bei uns entwickelte **Schwellenwert-Modul** vergleicht jeden vorhandenen Expressionswert eines Microarrays mit dem Schwellenwert. Liegen in einer Genzeile in einer der beiden Gruppen mehr als 50% der Werte unterhalb des Schwellenwerts wird diese gelöscht, da davon auszugehen ist, dass es sich um eine unspezifische Bindung handelt. Leerfelder werden hierbei ausgelassen.

Die **Imputation der Leerfelder** erfolgte bei Genen mit weniger als 50% fehlender Werte durch die **sequential K-nearest neighbor (sKNN)** Methode. Diese errechnet die fehlenden Werte sequenziell von der Genzeile mit den wenigsten fehlenden Werten und benutzt die angenommen Werte für die spätere Anrechnung. Trotz des Gebrauchs angenommener Werte weist diese neue Methode eine stark verbesserte Effizienz in Exaktheit und Berechnungskomplexität gegenüber den konventionellen, auf KNN basierenden Methoden auf ([178]).

Das **Filtermodul der Ausreißerwerte** wurde ebenfalls bei uns neu entwickelt zur Identifizierung einzelner Ausreißerwerte. Das Programm prüft hierbei innerhalb der Patientengruppe, ob die Expressionswerte eines Patienten im Vergleich mit den technischen Replikaten und den anderen Patienten derselben Gruppe plausibel sind. Liegt einer der Werte nicht auf Höhe der technischen Replikate, wird angenommen, dass der weiter von den anderen Werten der gleichen Gruppe entfernt liegende Wert falsch ist.

Hierzu berechnet das Filtermodul eine Standardabweichung und den Median für jede Genzeile innerhalb einer Gruppe. Je nach Verteilung der Einzelwerte für jeden Patienten werden so die Ausreißer identifiziert und entfernt.

Von insgesamt 9059 Genen wurde eine **Quantilen Normalisierung in R** durchgeführt ([179]) (software-download möglich unter: www.r-project.org). Hier wird angenommen, dass die meisten Gene in allen Experimenten gleich stark exprimiert werden, d.h. dass alle Arrays die gleiche Intensitätsverteilung haben.

Der Algorithmus wird am Beispiel in Abbildung 9 dargestellt. Es werden zunächst alle Gene der Größe nach für jedes Experiment sortiert. So steht dann z.B. in der ersten Zeile für jedes Experiment der Expressionswert des Gens mit dem kleinsten Wert (Vergleiche Tabelle 2 in Abbildung 9).

Dann wird über die Gene hinweg ein Mittelwert gebildet, der die Werte aller Gene in einer Zeile ersetzt (Vergleiche Tabelle 3 in Abbildung 9).

Im letzten Schritt wird dann wieder nach Genen sortiert (Vergleiche Tabelle 4 in Abbildung 9), so dass in jeder Zeile die Werte eines einzelnden Gens der verschiedenen Experimente stehen.

[178] Vgl. Kim et al. 2004.
[179] Vgl. Bolstad et al. 2003.

	Exp. A	Exp. B	Exp. C
Gen 1	100	200	140
Gen 2	10	40	270
Gen 3	100	120	70

1. Original-Expressionswerte

	Exp. A	Exp. B	Exp. C
	10 Gen 2	40 Gen 2	70 Gen 3
	100 Gen 1	120 Gen 3	140 Gen 1
	100 Gen 3	200 Gen 1	270 Gen 2

2. Ordnen der Werte pro Experiment

	Exp. A	Exp. B	Exp. C
	40 Gen 2	40 Gen 2	40 Gen 3
	120 Gen 1	120 Gen 3	120 Gen 1
	190 Gen 3	190 Gen 1	190 Gen 2

3. Ersetzen durch Mittelwerte pro Zeile

	Exp. A	Exp. B	Exp. C
Gen 1	120 (100)	190 (200)	120 (180)
Gen 2	40 (10)	40 (40)	190 (280)
Gen 3	190 (100)	120 (120)	40 (80)

4. Transformierte Expressionswerte

Abbildung 9: Quantilen Normalisierung: Der Algorithmus wird am Beispiel von drei Genen und drei Experimenten dargestellt. Die Genanzahl und Anzahl der Experimente können beliebig verändert werden.

Das **Microarray outlier Filter Modul** dient der Identifizierung technischer Probleme bei einem Array. Hierzu werden von diesem Modul drei Eigenschaften für jedes Array berücksichtigt. Zunächst wird der prozentuale Anteil an Ausreißerwerten für jedes einzelne Array gegenüber der Gruppe berechnet. Dann wird eine Korrelation für jedes einzelne Array gegenüber dem Gesamtkollektiv angegeben und zuletzt eine Korrelationsmatrize erstellt, in der jedes Array gegen jedes andere Array aufgeführt wird.
Technische Probleme fallen durch eine hohe Anzahl an Ausreißerwerten sowie einer geringen Korrelation gegenüber den anderen Arrays auf. Für die Korrelationsmatrize wird eine Heatmap erstellt, anhand derer sich Abweichungen im Farbverlauf erkennen lassen und somit fehlerhafte Arrays identifiziert werden können.
Der **Mean-Versus-Average-Plot** dient ebenfalls der Identifizierung fehlerhafter Arrays. Hier wird für jede Genzeile ein Mittelwert berechnet. Die Genzeilen werden anschließend nach aufsteigendem Wert sortiert. In einem Punktdiagramm werden dann die Einzelwerte jedes Arrays gegenüber dem Mittelwert der zugehörigen Genzeile geplottet. Die X-Achse ist hierbei der Rang des Mittelwertes einer Genzeile und die Y-Achse entspricht der Differenz zwischen einzelnem Expressionswert und Mittelwert. Bei einer natürlichen, zufälligen Verteilung liegen die Abweichungen um Y=0.

2.4.1.4. Identifizierung differentiell regulierter Gene mit Rank Products

Für die Ermittlung signifikant regulierter Gene wurde eine statistische Methode, basierend auf den Kalkulationen von Rank Products (RP), angewandt. Sie liefert verlässliche Signifikanz-Schwellenwerte durch die Annahme, dass relevante Expressionsänderungen immer nur einen kleinen Anteil aller Gene betreffen. Weiterhin wird angenommen, dass die einzelnen Messungen unabhängig zwischen den Replikaten der Arrays sind und dass die Varianz der Messungen in etwa gleich ist für alle Gene ([180]).
Die Daten der Sepsis-Gruppe und Nicht Sepsis-Gruppe von jedem Zeitpunkt durchliefen 2000 Permutationen in Rank Products, um die False Discovery Rate (FDR) zu bestimmen. Diese entspricht dem erwarteten Anteil der fälschlicherweise verworfenen Hypothesen an allen Verwerfungen ([181]).
Als signifikant reguliert angesehen wurden Gene mit einer FDR < 0,05.
Da die Aufgabenstellung dieser Studie einen Vergleich der Genexpression septischer und nicht-septischer Patienten beinhaltet (vergleiche Kapitel 1.9), wurde für jedes Gen ein sogenannter FoldChange (FC) errechnet. Dieser Wert zeigt auf einen Blick für jedes einzelne Gen an, inwiefern sich die Expression in der Sepsis- und Nicht-Sepsis-Gruppe unterscheidet. Allgemein errechnet sich dieser durch die Formel:

$$FoldChange = \frac{Signal_{Probe}}{Signal_{Kontrolle}}$$

In dieser Studie ist das Signal der Probe das mittlere Signal aller Sepsispatienten. Die Kontrolle bilden hier die nicht-septischen Patienten.
Erhält man für ein Gen zum Beispiel einen FoldChange von 2, heißt dies, dass die Expression dieses Gens zu diesem Zeitpunkt in septischen Patienten doppelt so hoch ist wie in nicht-septischen. Ein FC Wert von - 2 entspricht der Hälfte der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ([182]).
Wichtig ist, dass der FC-Wert für jeden Zeitpunkt einzeln berechnet wurde. Das heißt, der Vergleich findet nicht zwischen einem Ausgangswert und den jeweiligen Werten statt, wie es zum Beispiel in Abbildung 10 in **B** und **C** gezeigt wird, sondern jeweils für einen Wert der Sepsis-Gruppe und einen Wert der NS-Gruppe (vergleiche **A** in Abbildung 10).
Die Fragestellung der Studie ist hierbei der entscheidende Punkt für die Wahl des Modells. Wählt man für den Vergleich eine gesunde Kontrollgruppe zu einem Zeitpunkt, so können die Reaktionen und Abläufe über den gesamten Zeitverlauf zu einem fixen

[180] Vgl. Breitling et al. 2004.
[181] Vgl. Breitling et al. 2004.
[182] Vgl. Wurmbach et al. 2003.

Punkt in Bezug gesetzt werden. So wird auch eine Aussage über die Entwicklung zwischen den Zeitpunkten möglich und man kann die Reaktion der Gruppe zu jedem Zeitpunkt mit einem Ausgangswert vergleichen (siehe **B** in Abbildung 10).
Wählt man als Kontrolle einen Zeitpunkt aus der zu untersuchenden Gruppe, können die Entwicklungen im Zeitverlauf dargestellt und analysiert werden (siehe **C** in Abbildung 10).
Der große Vorteil eines Modells, das eine Gruppe A mit einer Gruppe B unter den selben äußerlichen Bedingungen (hier das Trauma und die weiter Behandlung) vergleicht, ist jedoch, dass wirklich nur die Reaktion auf den zu untersuchenden Zustand (hier die Sepsis) gezeigt wird. Weitere Einflüsse und Faktoren werden so herausgefiltert (siehe **A** in Abbildung 10).

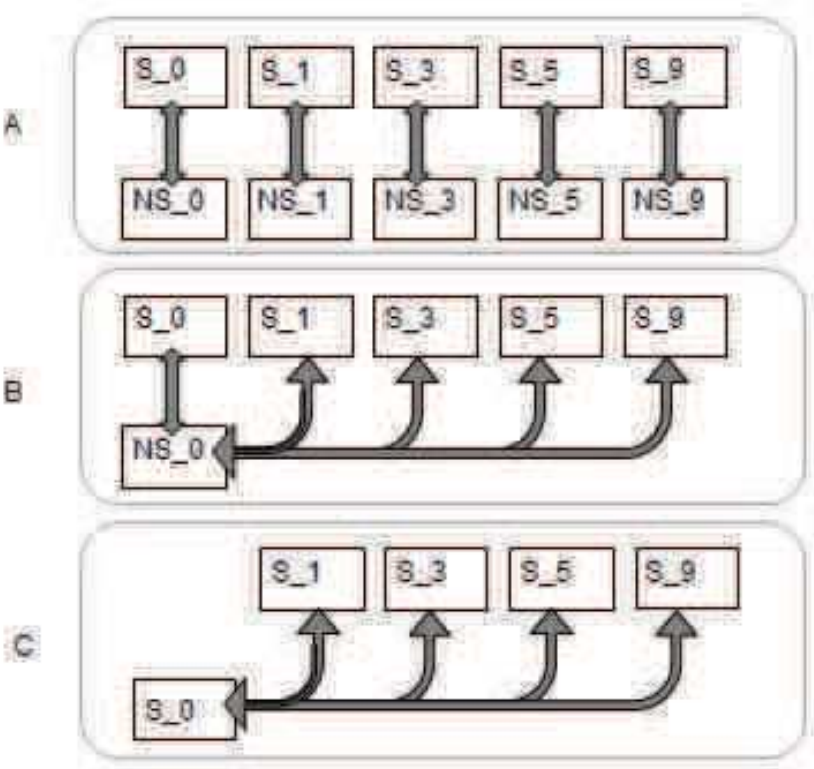

Abbildung 10: Drei verschiedene Modelle für die Kontrollgruppe zur Berechnung eines FC-Wertes: (A) zeigt die hier gewählte Variante, in der an jedem Zeitpunkt die Werte aus der Sepsis-Gruppe mit denen aus der Nicht-Sepsis Gruppe verglichen werden. In (B) ist der Kontrollwert jeweils der Wert der nicht-septischen Patienten am Zeitpunkt 0 und in (C) ist der Kontrollwert jeweils der Wert der septischen Patienten am Zeitpunkt 0.

2.4.2. RT-PCR Validierung

Die RT-PCR Validierung wurde mit insgesamt 13 Genen aus allen Teilbereichen der Genfunktionen durchgeführt. Die technische Durchführung erfolgte auf dem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

Über alle 5 Zeitpunkte wurde für jeden Patienten sowohl aus der Sepsis-Gruppe als auch aus der Nicht-Sepsis-Gruppe eine RT-PCR durchgeführt. Die so erhaltenen Daten wurden gegen die 4 Housekeeping Gene (PGK1, SDHA1, hB2M f1+r1, hHPRT1 f1+r1) normalisiert, danach logarithmiert und schließlich die Mittelwerte der Sepsis- und der Nicht-Sepsis-Patienten gebildet. Der Fold-Change ergab sich nun aus der Differenz der Mittelwerte der beiden Patientengruppen.
Um die Ergebnisse der beiden Verfahren Microarray und RT-PCR miteinander vergleichen zu können, wurde für eine graphische Darstellung ein Punktdiagramm gewählt und eine Trendlinie angelegt. Die Steigung der Geraden entspricht der Korrelation zwischen den beiden Verfahren (Idealwert: Steigung=1).

2.4.3. High-level Analyse

Die high-level Analyse zielt darauf ab, einen Sinn in die gewonnen Microarray-Daten zu bekommen. Begonnen wird hier mit der programmbasierten Analyse, die vor allem mit den im Folgenden beschriebenen Programmen SOURCE, DAVID, Pathwayexplorer, Ingenuity Pathway Analysis und dChip durchgeführt wurde. Anschließend erfolgt dann, basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen, die funktionsorientierte Analyse, die die Fragestellung nach Themen sortiert angeht.

2.4.3.1. SOURCE

Source ist eine webgestütze Datenbank, die Informationen von einer breiten Spanne an Ressourcen zusammen bringt und sie auf eine Art und Weise zur Verfügung stellt, die besonders für Analysen in Genom-Größe wertvoll ist ([183]).
Die Source Suchmaske bietet Einstellmöglichkeiten zu Organismen, Suchoptionen und den Informationstypen. Sucht man nach Informationen für ein einzelnes Gen, gelangt man von hier zum sogenannten Gen-Bericht. Dieser besteht aus einer Übersicht, auf der die gesammelten Informationen aus diversen anderen Datenbanken dargestellt werden. Er beinhaltet Pseudonyme, Lokalisation auf dem Chromosomen, biologische Rollen und funktionelle Beschreibungen des Proteins, GenOntologie Annotationen, Informationen über assoziierte Krankheiten und Gen-Expressions-Daten. Für vertiefende Forschungen werden Verknüpfungen zu externen Datenbanken wie OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), SwissProt, LocusLink, UniGene und Pubmed geboten. Die Verknüpfungen zu externen Datenbanken führen direkt zu den entsprechenden Seiten über die einzelnen Gene und Proteine. In PubMed wird eine Übersicht über die mit dem jeweiligen Gen in Zusammenhang stehenden Veröffentlichungen gegeben. Die PubMed Literatur Abfrage lässt sich mit Hilfe von benutzerdefinierten Suchworten

[183] Vgl. Diehn et al. 2003.

einschränken oder durch die Benutzung von Pseudonymen für das jeweilige Gen bzw. Protein ausweiten. Die GenOntologie Annotation beinhaltet zum "Beispiel Biologischer Prozess“, „Molekulare Funktion“ und „Zelluläres Kompartment“.
Neben der Abfrage für einzelne Gene bietet Source das sogenannte „batch-interface“ (Mengen-Verbindungsstück) für das schnelle Erlangen von Daten über tausende von Genen und erleichtert so die Analyse von Microarray-Experimenten. Je nachdem, welche Informationen gewünscht werden, können die einzelnen Optionen angeklickt werden. Diese beinhalten Gennamen oder -symbol, Pseudonyme, LocusLink Kennungen, die Lokalisation des Gens auf dem Chromosomen und die des Proteins in der Zelle, biologische Funktionen und GenOntologie Annotationen. Source wird fortlaufend auf den neusten Stand gebracht und enthält somit die aktuellsten und genauesten Informationen. Automatische wöchentliche Updates sorgen dafür, dass alle Daten aus den externen Datenbanken sofort in Source einfließen ([184]).

2.4.3.2. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

Die Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) ist eine webbasierte Plattform für verschiedene Analyseprogramme zur funktionellen Annotation und Klassifikation, Umwandlung von Genidentifikatoren und Zuordnung von Namen zu Genen in einer Liste. Das DAVID Genfunktions-Klassifikationsprogramm wird als biologischer, modulzentrierter Algorithmus zur Analyse großer Genlisten beschrieben ([185]).
Das webbasierte Programm fasst viele Gene aus einer Liste in definierte biologische Klassen zusammen, die biologische Module genannt werden. Diese Organisation wird durch Auswertung komplexer biologischer Zusammenhänge aus verschiedenen funktionellen Annotationsquellen erreicht. Einzelne Gene haben viele Funktionen und sind somit mit verschiedenen biologischen Begriffen assoziiert. Gleichzeitig sind einzelne biologische Begriffe mit einer Vielzahl von Genen verbunden. Diese Verknüpfungen bilden ein komplexes Netzwerk, das ein Abbild der Natur ergibt, aber den Forscher vor die Herausforderung stellt, aus diesem „many-genes-to-many-terms“ Problem das Wesentliche herauszuziehen. DAVID löst diese Aufgabe durch die Identifikation biologischer Module mit Hilfe explorativer statistischer Methoden ([186]).
Es werden also einmal Gene mit ähnlichen Funktionen in die gleiche Gruppe eingeordnet und dann Gruppen mit ähnlichen Funktionen in Module zusammengefasst. Es werden zum Beispiel die Klassen *Apoptose*, Zelltod oder *Regulation des Zelltods* in einem Modul zusammengefasst.

[184] Vgl. Diehn et al. 2003.
[185] Vgl. Huang et al. 2007.
[186] Vgl. Huang et al. 2007.

Durch Vergleich der DAVID Ergebnisse mit von Hand erzielten Resultaten wurde eine Leckrate (Gene, die nicht in eine Gruppe eingeordnet wurden, in die sie gehören) von 1-2% und eine Störungsrate (Gene, die in eine Gruppe eingeordnet wurden, in die sie nicht gehören) von 1-5% ermittelt ([187]).
Um die Frage beantworten zu können, welche Gengruppen für das jeweilige Experiment am wichtigsten sind, greift DAVID auf die traditionellen Überrepräsentationsanalysen zurück. Es wird gemessen, wie viele Gene in den einzelnen Gruppen vorkommen und dies mit der Anzahl der allgemein in diese Gruppe gehörenden Gene verglichen. Das heißt DAVID vergleicht die zu analysierende Liste der Gene mit einer anderen Liste, dem sogenannten Hintergrund. Dieser Hintergrund kann zum Beispiel aus dem von DAVID vorgegebenen gesamten Genom oder aus einer vom Benutzer gewählten Liste bestehen. Werden, wie in dieser Studie, Microarraydaten ausgewertet, ist es eine sinnvolle Anordnung, seine Liste signifikant regulierter Gene mit einer Liste aller Gene auf dem Chip zu vergleichen. So wird die Zusammenstellung des Chips beachtet und DAVID erkennt die überrepräsentierten Gruppen. Aus dem dabei errechneten "Enrichment Score" (modifizierter Fisher exact Wert) jeder Gruppe wird der Mittelwert für das zugehörige Modul errechnet. Je höher der Wert einer Gruppe ist, desto größer ist die Bedeutung der Gengruppe ([188]).
Als Ergebnis liefert DAVID eine Liste mit den Modulen und Gengruppen und den zugehörigen „Enrichment Scores“. Von hier kann man weitere Informationen über die Gruppen bekommen. Klickt man eine Gruppe an, so erhält man einmal eine Liste mit den zugehörigen Genen und eine Übersicht der über- und untergeordneten Begriffe. Die Genliste enthält die Gennamen, Genidentifikatoren und verwandte Gene. Wählt man ein Gen aus, bekommt man weitere Informationen zu Funktion, Synonymen und Genlokalisation und viele Links zu PubMed Veröffentlichungen, assoziierten Krankheiten und weiteren Internetseiten ([189]).

2.4.3.3. PathwayExplorer

Proteine sind oft Teile von *Pathways*. Ein Molekül aktiviert oder hemmt andere. So werden Informationen weitergegeben und vervielfältigt. Viele dieser Aktivierungsketten sind bereits erforscht und so können Proteine und die entsprechenden Gene in diese Netzwerke eingeordnet werden.
Das Programm PathwayExplorer wurde für die automatische Zuordnung von Proteinen in die momentan erhältlichen metabolischen und zellulären Pathways entwickelt. Der PathwayExplorer benutzt dafür die Daten von KEGG, BioCarta and GenMAPP. So

[187] Vgl. Huang et al. 2007.
[188] Vgl. Huang et al. 2007.
[189] Vgl. Huang et al. 2007.

können einzelne Gene in ihrem biologischen Zusammenhang überblickt und die Bedeutung der einzelnen Pathways anhand der Anzahl und Expression der Gene abgeschätzt werden ([190]).

Nach der Einlesung der Daten erstellt das Programm eine Liste mit den möglichen Pathways, geordnet nach der Anzahl der Gene, die in den eingegebenen Daten gefunden wurden. Diese Reihenfolge lässt sich nach der absoluten Menge oder der relativen Anzahl der Gene, gemessen an der insgesamt möglichen Zahl, regulieren. Von hier lassen sich die einzelnen *Pathways* aufrufen. Der PathwayExplorer gibt die Abbildung mit allen Proteinen und kennzeichnet die in der Liste vorhandenen Gene nach ihrer Expression farbig. Hat man zu einem Protein mehrere Daten, zum Beispiel durch mehrere Zeitpunkte, bietet der Pathwayexplorer eine Funktion zur Visualisierung dieser Werte. In durch den Benutzer einstellbaren Farbeinstellungen werden in den Pathway-Übersichten die verschiedenen Expressionen der Gene in kleinen Kästchen dargestellt. Die einzelnen Gene können angewählt werden und es öffnet sich ein Fenster mit weiteren Daten zu dem Gen und einem Expressionsprofil, wie zum Beispiel einem Verlauf über mehrere Zeitpunkte. Die einzelnen Pathways können als PDF, PNG, SVG Datei heruntergeladen werden. Die Übersicht mit allen Ergebnissen ist als Textdatei erhältlich ([191]).

2.4.3.4. Ingenuity Pathway Analysis

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ist eine „all-in-one“ Software Lösung, die es ermöglicht, komplexe biologische und chemische Systeme zu analysieren und zu verstehen. Mit dem ständig wachsenden Berg von Wissen stellt das Auffinden relevanter Informationen eine immer größer werdende Aufgabe dar. IPA bietet daher die Möglichkeit, auf durch Experten vorselektiertes Material zurückzugreifen. So werden bei der Suche nach Informationen über Gene, Medikamente, Zelluläre Prozesse oder Signaltransduktionswege statt einer Liste von zugehörigen Veröffentlichungen wichtige Informationen präsentiert. Die Datenbank wird dabei ständig aktualisiert, so dass auf den neusten Forschungsstand zurückgegriffen wird ([192]).

Zusätzlich zur expertenbasierten Literatursuche bietet IPA über graphische Abbildungen die Möglichkeit, Schlüsseleigenschaften und Verbindungen von Genen oder Proteinen noch einfacher zu erfassen und zu verstehen ([193]).

Neben der Literatursuche zeichnet sich IPA vor allem durch seine Werkzeuge zur Analyse experimenteller „high-throughput“ (hoher Durchlauf) Daten aus. IPA dient dazu,

[190] Vgl. Mlecnik et al. 2005.
[191] Vgl. Mlecnik et al. 2005.
[192] Vgl. Thomas und Bonchev 2010.
[193] Vgl. Thomas und Bonchev 2010.

relevante Beziehungen, Mechanismen, Funktionen und Signaltransduktionswege in großen Mengen von Daten zu identifizieren. IPA bietet die Möglichkeit, mehrere Experimente gleichzeitig einzulesen, analysiert diese dann jedoch einzeln. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, Vergleiche zwischen den einzelnen Experimenten anzustellen. In dieser Studie gab es somit fünf Experimente. Für die Analyse wurde als Referenz die Ingenuity Knowledge Base angenommen. Direkte sowie indirekte Beziehungen wurden beachtet. IPA gibt für jede Beobachtung die folgenden Analysepunkte geordnet jeweils nach der höchsten Relevanz an:

- Funktionelle Netzwerke (Associated Network Functions)
- Krankheiten und Fehlfunktionen (Diseases and Disorders)
- Molekulare und Zelluläre Funktionen
- Entwicklung eines physiologischen Systems
- Anerkannte Signaltransduktionswege (Canonical Pathways)
- Toxische Funktionen (Tox Functions) ([194])

Außerdem sucht es die am stärksten regulierten Gene für die jeweilige Beobachtung heraus. Zur einfacheren Übersicht fasst IPA die Ergebnisse jeder Analyse in einer Kurzfassung zusammen.

Zur Analyse der generellen Reaktion polytraumatisierter Patienten auf eine Sepsis unabhängig vom Zeitverlauf wurde eine Liste erstellt, in der sich die Gene befanden, die an zumindest einem Zeitpunkt die Signifikanzgrenze von 0,05 unterschritten haben. Ihnen wurde jeweils der FC-Wert mit der niedrigsten FDR zugeordnet. Die Ingenuity-Analyse dieser Zusammenstellung bietet somit einen Überblick über die Mechanismen, die septische von nicht-septischen Patienten unabhängig vom Zeitverlauf unterscheiden.

Um der Zeitverlaufs-Charakteristik dieser Studie gerecht zu werden, werden die Analyseergebnisse der einzelnen Zeitpunkte graphisch aufgetragen. Für jeden der oben aufgelisteten Analysepunkte wird eine Tabelle erstellt, in der die vier bis fünf wichtigsten Unterkategorien vorhanden sind. Für jeden Tag wird der jeweiligen Gruppe ein Farbwert zugeordnet, der je nach Bedeutsamkeit variiert. Im Vergleich der Gruppe „funktionelle Netzwerke“ wird zur Bestimmung der Wichtigkeit die von Ingenuity kalkulierte Punktzahl herangezogen. Diese wird anhand von p-Werten berechnet und bildet die Wahrscheinlichkeit ab, mit der die Fokus Gene in einem Netzwerk aus Zufall zusammen gefunden würden ([195]). Für die restlichen Gruppen wird dieser Score durch Ingenuity nicht berechnet, so dass auf den Platz in der Tabelle, abhängig von den p-

[194] Vgl. Thomas und Bonchev 2010.
[195] Vgl. Monarch App Note.

Werten, zurückgegriffen wird. Eine besser platzierte Gruppe mit einem entsprechend niedrigeren p-Wert wird dunkler hinterlegt als eine schlechter platzierte. So erhält man einen Überblick darüber, wie wichtig einzelne Funktionen über den Zeitverlauf sind.

2.4.3.5. dChip

dChip ist ein öffentlich erhältliches Softwarepaket, das verschiedene modellbasierte Expressionsanalyseverfahren von Microarrays und high-level Analyseprozessen ausführt. Das modellbasierte Vorgehen erlaubt Test-Level Analysen von vielen Arrays. Durch das Zusammenschließen von Informationen über mehrere Arrays ist es möglich, Standardfehler für verschiedene Expressionsindexe zu erhalten. Dieser Ansatz erlaubt außerdem die automatische Probenauswahl zur Fehlerreduktion durch querhybridisierende Proben und Bildverunreinigung. High-level Analysen in dChip beinhalten Vergleichsanalysen und hierarchisches Klustern. Hierarchische Kluster-Analysen packen Gene mit ähnlichen Expressionsmustern in Gruppen zusammen. Als Ergebnis liefert dChip einen Klusterbaum, in dem sich Gene in enger Nachbarschaft mit den Genen befinden, die eine hohe Ähnlichkeit in ihren standardisierten Expressionswerten über alle Arrays haben. Zur graphischen Darstellung verwendet dChip ein farbiges Kästchen pro Gen für jedes Array. Je nach Expression liegt die Farbe im grünen bis roten Bereich. Grün steht hierbei für eine schwache und rot für eine starke Expression. Je nach Aufgabenstellung lässt sich einstellen, ob zusätzlich zu den Genen auch die Arrays geklustert werden. So kann festgestellt werden, ob Arrays aus verschiedenen Patientengruppen allein durch die Genexpression der jeweiligen Gruppe zugeordnet werden können. Identifiziert man Kluster von Genen, die man gesondert untersuchen möchte, lassen sich Listen dieser Gene erstellen ([196]).

2.4.4. Disease load index

Die Berechnung eines FC-Wertes, wie im Abschnitt 2.4.1.4 beschrieben, bietet den Vorteil, auf einen Blick die Unterschiede in der Genexpression zwischen zwei Kohorten feststellen zu können. Für die Analyse eines Zeitverlaufs kommt dann jedoch die Einschränkung zum Tragen, dass eine Aussage über die Entwicklung der Expression nur bedingt möglich ist. So kann z.B. auch bei einem positiven FC-Wert die Expression insgesamt abfallen, so lange dies in beiden Gruppen abläuft.
Um dies auszugleichen, wurde ergänzend für einige Gengruppen der sogenannte Disease load index (DLI) berechnet. Dieser entspricht der kumulativen Expression, d.h.

[196] Vgl. Schadt et al. 2001.

der Summe der einzelnen Genexpressionswerte von Genen einer Gruppe an den verschiedenen Zeitpunkten, wie bei Porter et al. 2003 beschrieben ([197]).
Anschließend erfolgte die graphische Darstellung als Liniendiagramm mit der kumulativen Expression auf der X-Achse und den Zeitpunkten auf der Y-Achse.
In manchen Fällen wurde es notwendig anstatt der kumulativen Expression die mittlere Expression zu betrachten, wenn zwei Gruppen von Genen verglichen wurden deren Anzahl sehr unterschiedlich ist. Um dies auszugleichen wurde die kumulative Expression mit der Anzahl der Gene ins Verhältnis gesetzt.

2.4.5. Identifizierung von Biomarker-Genen

Zur Identifizierung von einzelnen Kandidaten-Genen zur Unterscheidung zwischen septischen und nicht-septischen Patienten wurde nach Genen gesucht, bei denen die Expressionswerte der Patienten einer Gruppe möglichst weit von der mittleren Expression der anderen Gruppe entfernt liegen.
Hierzu erfolgten folgende Berechnungen:
Gesucht wurde d > 0, wobei d der Differenz zwischen der mittleren Expression ($\bar{x}$) der Gruppe 1 zuzüglich der Standardabweichung (s) und der mittleren Expression der Gruppe 2 abzüglich der Standardabweichung entspricht.
Angenommen wurde hierbei eine größere mittlere Genexpression in Gruppe 2, was jeweils entweder der septischen oder der nicht-septischen Kohorte entsprach.
Für diese Unterscheidung erfolgte zunächst:

$$\bar{x}_{Ns} - \bar{x}_s = a$$

$$bei\ a > 0 \quad \rightarrow \quad (\bar{x}_{Ns} - s_{Ns}) - (\bar{x}_s + s_s) = d$$

$$bei\ a < 0 \quad \rightarrow \quad (\bar{x}_s - s_s) - (\bar{x}_{Ns} + s_{Ns}) = d$$

Der Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen (s) wurden jeweils nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Mittelwert} \qquad \bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

$$Standardabweichung \qquad s = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x - \bar{x})}$$

[197] Vgl. Porter et al. 2003.

Alle Gene, die zumindest an einem Zeitpunkt die Bedingung d > 0 erfüllten, wurden gesondert betrachtet und graphisch dargestellt. Ein Beispiel hierfür bietet Abbildung 11. Es ist anzunehmen, dass diese Gene eine möglichst gute Unterscheidung der beiden Gruppen bieten und sie wurden somit als potentielle Biomarker zur Sepsis-Erkennung identifiziert.

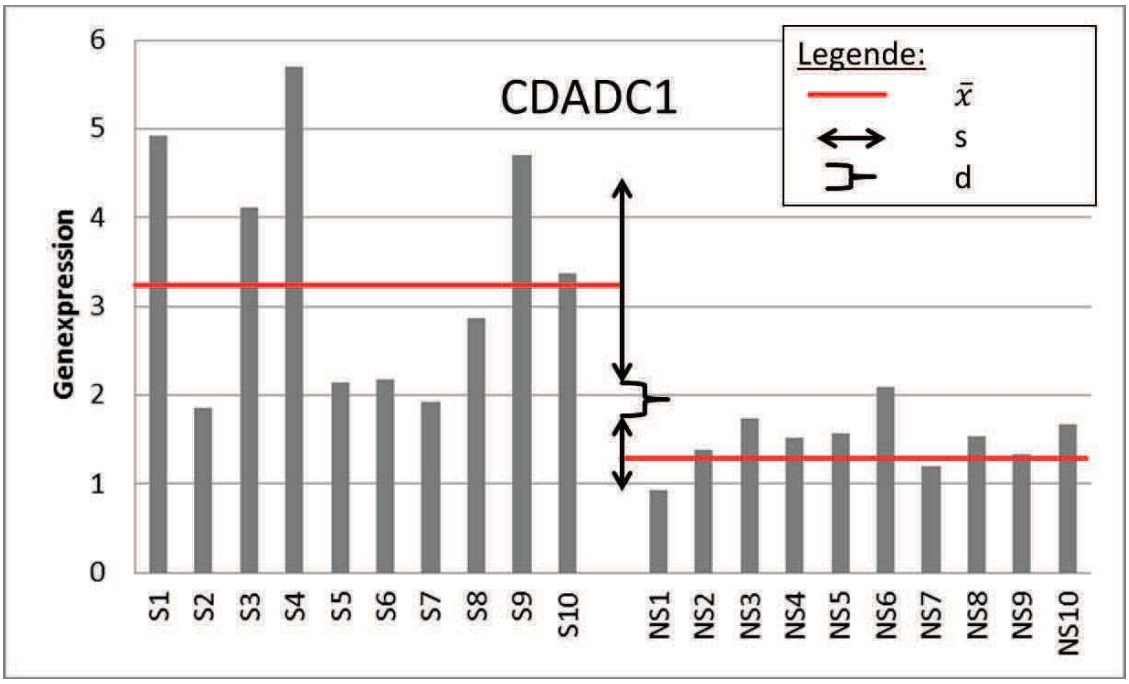

Abbildung 11: Beispiel für ein Balkendiagramm an der Genexpression von CDADC1 am Zeitpunkt 1: Die Genexpression ist auf der X-Achse aufgetragen. Die linken Balken entsprechen den septischen Patienten, die rechten den nicht-septischen Patienten.

3. Ergebnisse

Im nun folgenden Ergebnissteil werden zunächst die allgemeinen und technischen Ergebnisse aufgeführt, was eine Beschreibung und Auswahl der Patienten beinhaltet sowie allgemeine Ergebnisse der Microarrayanalyse, wie z.B. die Anzahl der differentiell regulierten Gene an den einzelnen Zeitpunkten. Dann werden die Ergebnisse der Validierung per RT-PCR aufgeführt.
Anschließend folgen die Ergebnisse der programmbasierten Analyse, einem der ersten Schritte der Analyse, um eine grobe Übersicht zu erhalten, in welchen Bereichen Auffälligkeiten vorliegen. Diese programmbasierte Analyse bildet somit die Basis für die dann folgende funktionsorientierte Analyse, in der man sich den einzelnen Funktionen, Abläufen und Reaktionen im Detail widmet.
Ergänzend werden im Anschluss die Ergebnisse der Biomarker-Analyse aufgeführt.
Abschließend folgt eine graphische Darstellung der Zeitverlaufsanalyse.

3.1. Allgemeine und technische Ergebnisse

Hier werden zunächst die Patientendaten und anschließend allgemeine Ergebnisse der Microarray-Analyse aufgeführt, ohne Beachtung der Genfunktion. Hierzu zählt z.B. die Anzahl der signifikant regulierten Gene an den einzelnen Zeitpunkten. Darüber hinaus wird analysiert, an welchen Tagen die gleichen Gene reguliert sind, um bereits die ersten Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen den Zeitpunkten darzustellen. Die Summierung der absoluten Expressionswerte, getrennt nach septischen und nicht-septischen Patienten, erlaubt dann einen ersten Blick auf die unterschiedliche Reaktion der beiden Patientengruppen.

3.1.1. Patienten und klinische Ergebnisse

Insgesamt erfüllten 85 Patienten die Einschlusskriterien der Studie, von denen wiederum 10 in die Gruppe 1 (Nicht-Septisch) und 10 in Gruppe 2 (Septisch) eingeordnet wurden. In Übereinstimmung mit anderen Studien zu Trauma und Sepsis war bei den septischen Patienten der durchschnittliche ISS höher und das männliche Geschlecht überrepräsentiert. Die gehäufte Anzahl an Männern wird durch ihre erhöhte Beteiligung an Unfällen erklärt. Die Sepsis wurde bei den Patienten klinisch zwischen dem dritten und achten Tag diagnostiziert, bei den meisten am 5. Tag.

Patienten	Gesamt	Gruppe 1 (Nicht-septisch)	Gruppe2 (septisch)
Anzahl	85	57	28
Alter (Jahre)	32	26 (18 - 32)	37 (18 - 66)
Männliches Geschlecht	62	30	32
Beginn der Sepsis (Tag)	5		3-8
Nicht-Überlebende	5	0	5
Durchschnittlicher ISS	24	21 (17 - 41)	29 (17 - 43)

Tabelle 3: Allgemeine Patientendaten: Vergleich der allgemeinen Daten. Die Gruppe der septischen Patienten ist durchschnittlich jünger und ihr ISS ist niedriger, trotzdem ist eine Unterscheidung allein anhand dieser Kriterien nicht möglich, da die Schwankungsbreite (in Klammern) beider Kriterien in den Bereich der anderen Gruppe hereinreicht.

10 Patienten aus der Sepsis-Gruppe und 10 aus der Nicht-Sepsis-Gruppe wurden manuell nach der *Matched Pair Methode* aus dem Gesamtkollektiv der Studie ausgewählt und zugeordnet. Für weitere Erläuterungen zur Matched Pair Methode vergleiche auch Absatz 2.3.1., Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die ausgewählten Patienten und die zugehörigen Parameter.

Paar	Patienten-ID	Alter	Geschlecht	Ethnischer Hinter-grund		Patienten-ID	Alter	Geschlecht	Ethnischer Hinter-grund
01	NS_01	26	M	Kaukasier		S_06	19	M	Kaukasier
02	NS_02	38	M	Kaukasier		S_07	19	M	Kaukasier
03	NS_03	48	F	Kaukasier		S_05	27	F	Kaukasier
04	NS_04	38	M	Kaukasier		S_10	20	M	Kaukasier
05	NS_05	51	M	Kaukasier		S_10	20	M	Kaukasier
06	NS_06	18	M	Kaukasier		S_08	19	M	Kaukasier
07	NS_07	47	M	Kaukasier		S_01	38	M	Kaukasier
08	NS_08	54	F	Kaukasier		S_09	63	F	Kaukasier
09	NS_09	50	M	Kaukasier		S_02	50	M	Kaukasier
10	NS_10	58	M	Kaukasier		S_12	73	M	Kaukasier

Tabelle 4: Matched-pair-Methode: Die 10 Patienten aus der septischen Gruppe (S) wurden per matched-pair-Methode 10 Patienten aus der nicht-septischen Gruppe (NS) zugeordnet.

3.1.2. Ergebnisse der Microarray-Analyse

Die Blutproben von 20 Patienten wurden für die Mikroarrayanalyse verwendet. Die Reproduzierbarkeit der technischen Replikate war hoch (r>0.97) und die Mikroarrays hatten ein durchschnittliches Präsenzsignal von 72%. Peripheres Blut zeigt eine stabile Wirtsantwort in Patienten nach Polytrauma. Die Anzahl der regulierten Gene mit einer FDR von unter 0.05 schwankte an den einzelnen Zeitpunkten (siehe Abbildung 12). Die höchste Anzahl signifikant regulierter Gene ergab sich nach 24 Stunden, während die niedrigste Anzahl an Tag 5 zu finden war.

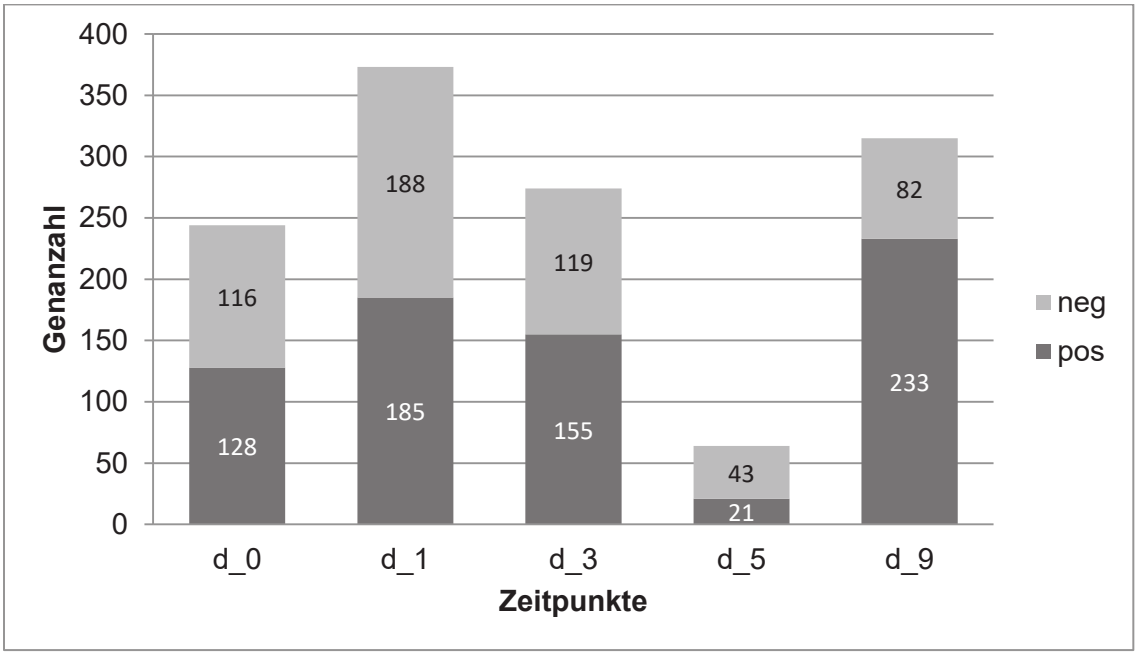

Abbildung 12: Anzahl signifikant regulierter Gene im Zeitverlauf: pos - Gene mit einem positiven Fc-Wert (hochreguliert), neg - Gene mit einem negativen Fc-Wert (herunterreguliert)

An den verschiedenen Zeitpunkten waren zum großen Teil unterschiedliche Gene reguliert. Die Anzahl der Gene, die an allen 5 Zeitpunkten signifikant reguliert waren, beträgt 23 bei einer FDR 0.05 und 84 bei einer FDR 0.3. Die Anzahl der Überschneidungen zwischen den Tagen für FDR 0.05 sieht man in Tabelle 5. Die Anzahl der Überschneidungen korreliert mit der Anzahl der Gene an den einzelnen Tagen. Auffällig ist jedoch, dass Tag 9, der insgesamt die zweithöchste Genanzahl hat, verhältnismäßig wenige Überschneidungen aufweist.

Die Anzahl der Gene, die zu mindestens einem Zeitpunkt signifikant mit einer FDR von unter 0,05 waren, beträgt 768. Diese Gene werden für die Analyse des Zeitverlaufs in einer Excelliste zusammengefügt, die als Basis für die weitere Analyse zu Grunde gelegt wird.

	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
d_0	x	233	166	48	100
d_1	233	x	240	52	124
d_3	166	240	X	57	150
d_5	48	52	57	x	66
d_9	100	124	150	66	X
Gesamtüberschn.	547	649	613	223	440
Genanzahl	244	373	274	64	315
# Überschn./Gene	2,24	1,73	2,23	3,48	1,39

Tabelle 5: Anzahl der Überschneidungen zwischen den Zeitpunkten: es ist jeweils die Anzahl der Gene angegeben, die an beiden Zeitpunkten gleichzeitig signifikant exprimiert werden. In der letzten Zeile wird das Verhältnis von Genanzahl und Genüberschneidungen gezeigt. Auffällig ist eine relativ geringe Anzahl an Überschneidungen an Zeitpunkt 9, trotz einer hohen Anzahl an Genen.

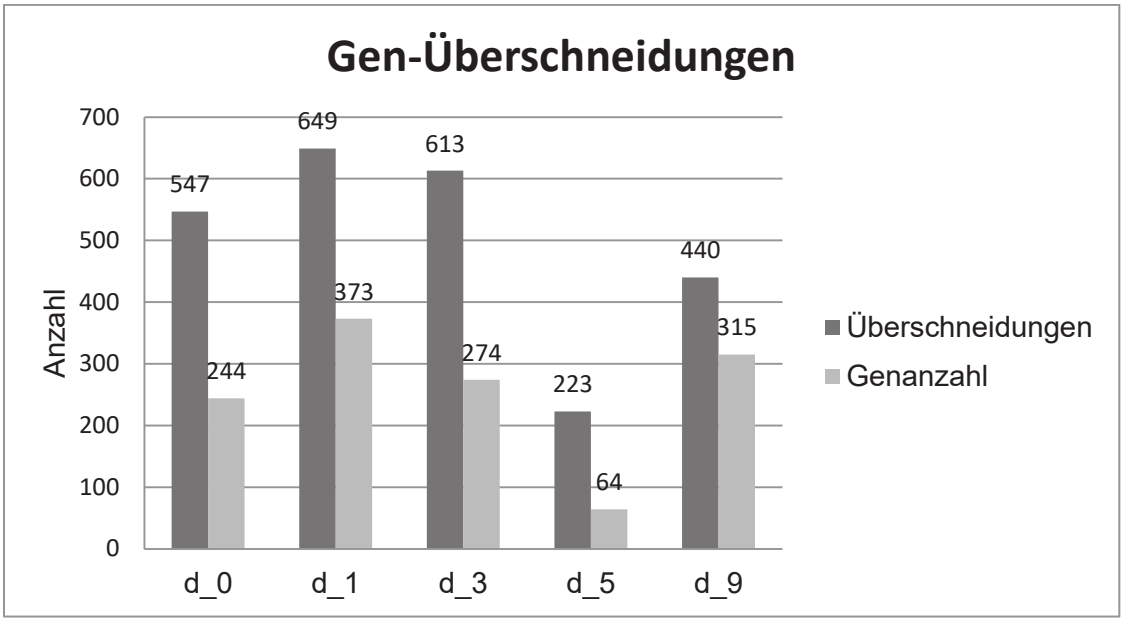

Abbildung 13: Graphische Auftragung der Anzahl der Überschneidungen bei den Genen: Auffällig ist, dass trotz hoher Genanzahl an d_9 nur relativ wenige Gen-Überschneidungen vorliegen.

3.1.3. Kumulative Expression (Disease load index)

Die quantitative Messung der Expression wurde durch die Addition der Intensitäten, getrennt nach septischen und nicht-septischen Patienten, erreicht ([198]). Sie ergibt eine verstärkte Reaktion der septischen Patienten über den gesamten Zeitverlauf. Das heißt, dass die 763 Gene im Durchschnitt eine stärkere Expression in den septischen Patienten als in den nicht-septischen Patienten aufweisen.

[198] Vgl. Porter et al. 2003.

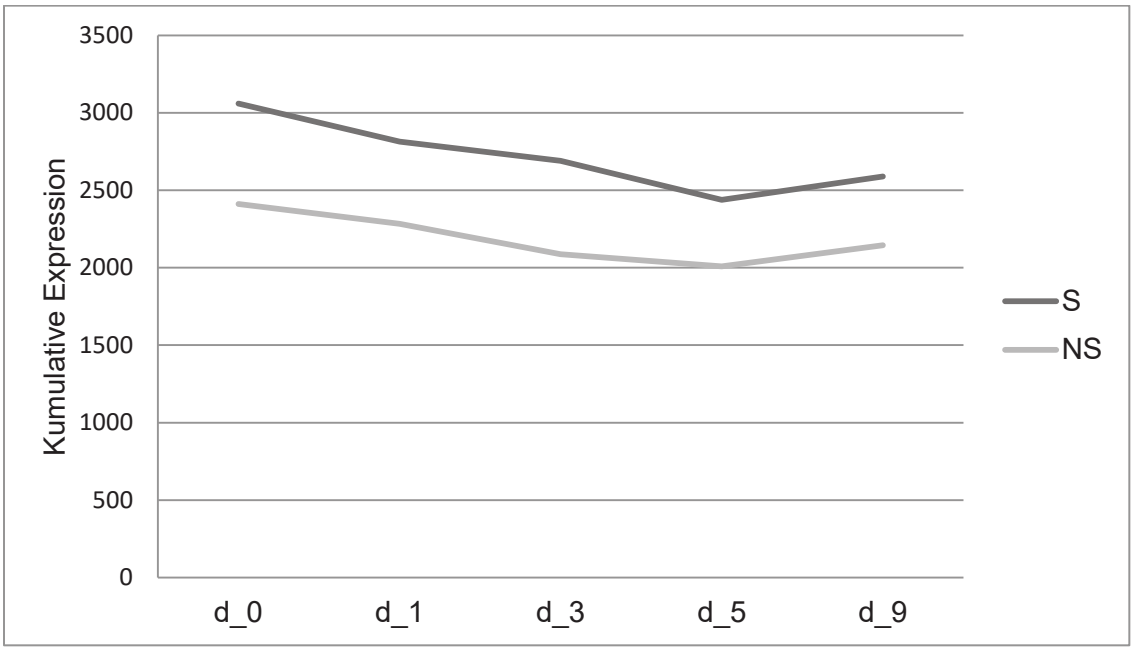

Abbildung 14: Kumulative Expression über alle Gene: Die kumulative Expression über alle Gene wurde für die 5 Zeitpunkte, getrennt nach Sepsis und Nicht-Sepsis, errechnet. Hier zeigen sich über den gesamten Zeitverlauf höhere Werte für die septische Gruppe, was auf eine insgesamt stärkere Reaktion in septischen Patienten hinweist.

3.2. Ergebnisse der RT-PCR-Validierung

Insgesamt wurden 13 Gene zur unabhängigen Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels RT-PCR ausgewählt. Die Auswahl erfolgte aus allen Genkategorien, um ein möglichst breites Spektrum abzudecken sowie aus der Liste der Biomarker-Gene (Vergleiche Abschnitt 2.4.5).

Die aus den RT-PCR-Ergebnissen errechneten FC-Werte wurden gegenüber den FC-Werten aus den Microarrayergebnissen in Abbildung 15 bis Abbildung 19 graphisch aufgetragen.

Die Korrelation zwischen den beiden Verfahren schwankt an den einzelnen Zeitpunkten.

	d_0	**d_1**	**d_3**	**d_5**	**d_9**
Korrelationen	0,914	0,920	0,839	0,740	0,839
Mittlere Korrelation	0,850				

Tabelle 6: Korrelationen zwischen Microarray- FCs und RT-PCR-FCs: Die Korrelationen zwischen Microarray- FCs und RT-PCR-FCs werden für die einzelnen 5 Zeitpunkte angegeben, ebenso eine Gesamtkorrelation als arithmetisches Mittel über die einzelnen Werte.

Die Korrelationen an den restlichen Zeitpunkten betragen: 0,91 (d_0), 0,92 (d_1), 0,83 (d_3), 0,74 (d_5), 0,83 (d_9), was im Durchschnitt eine Korrelation von 0,85 ergibt. Die

Ergebnisse aus den beiden Verfahren korrelieren daher gut und die Daten aus den Microarrays konnten somit validiert werden.

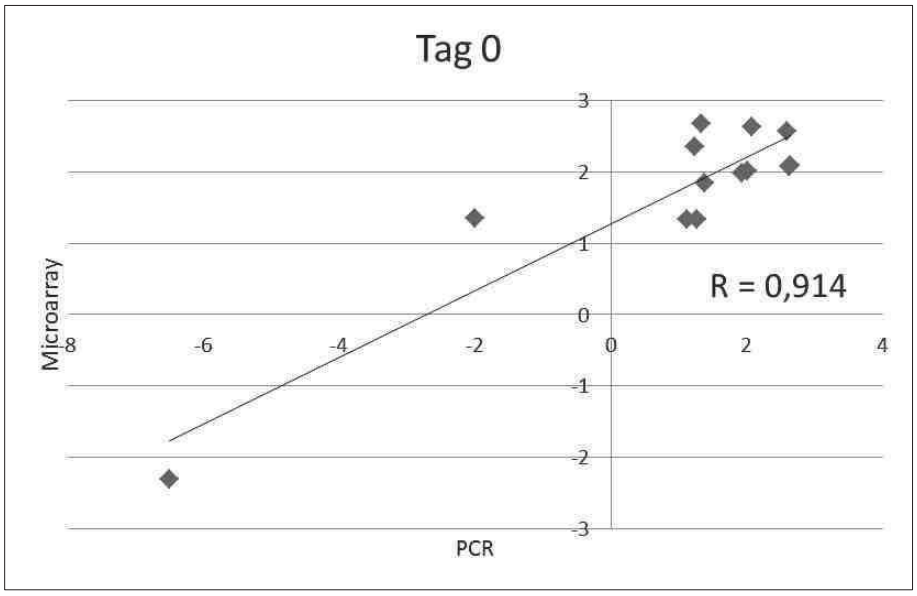

Abbildung 15: Vergleich der FC-Werte aus Microarray und aus RT-PCR am Tag 0: Für insgesamt 13 Gene wurden die FC-Werte aus Microarray und RT-PCR geplottet und eine Trendlinie angelegt.

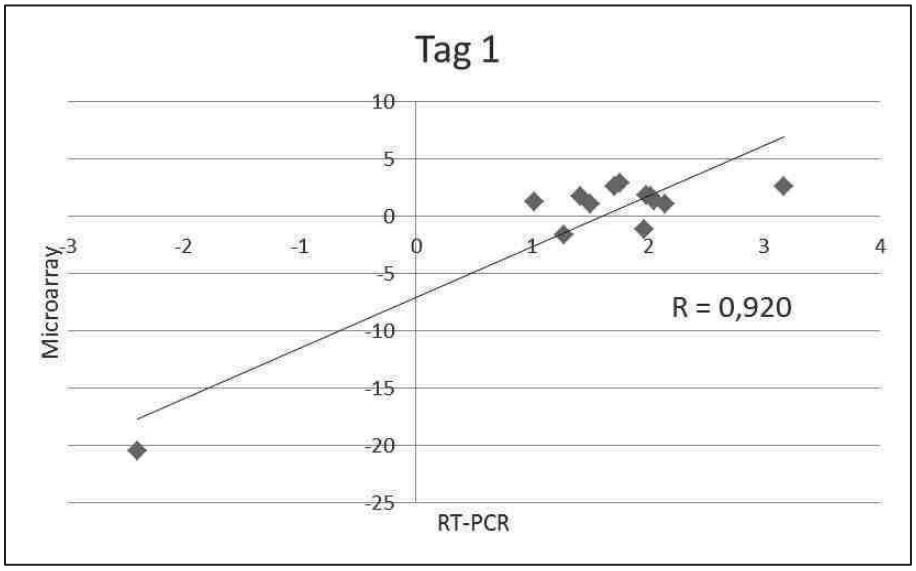

Abbildung 16: Vergleich der FC-Werte aus Microarray und aus RT-PCR am Tag 1: Für insgesamt 13 Gene wurden die FC-Werte aus Microarray und RT-PCR geplottet und eine Trendlinie angelegt

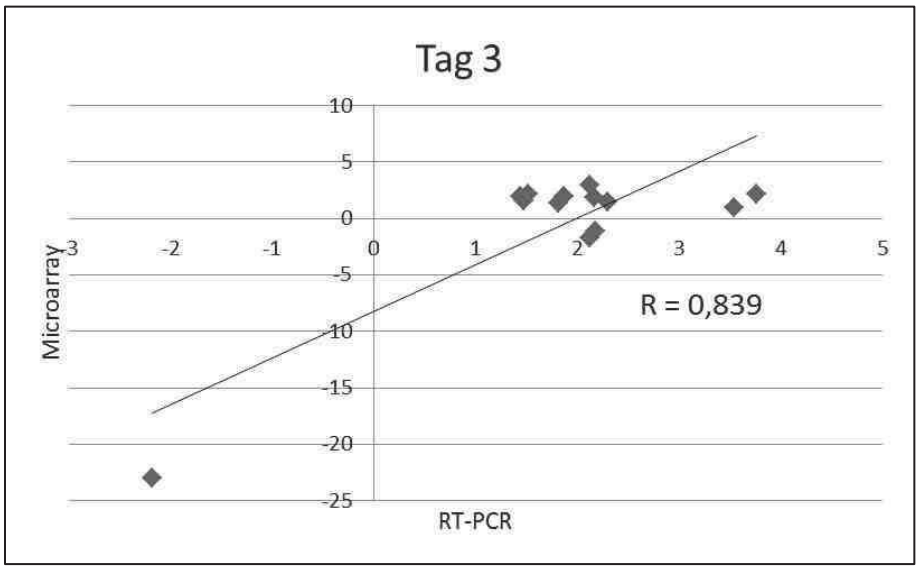

Abbildung 17: Vergleich der FC-Werte aus Microarray und aus RT-PCR am Tag 3: Für insgesamt 13 Gene wurden die FC-Werte aus Microarray und RT-PCR geplottet und eine Trendlinie angelegt

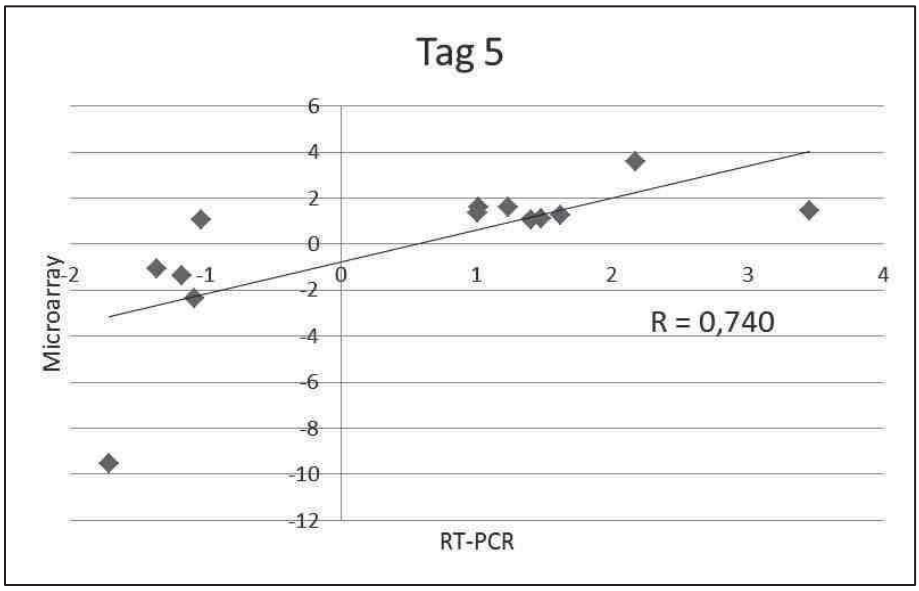

Abbildung 18: Vergleich der FC-Werte aus Microarray und aus RT-PCR am Tag 5: Für insgesamt 13 Gene wurden die FC-Werte aus Microarray und RT-PCR geplottet und eine Trendlinie angelegt

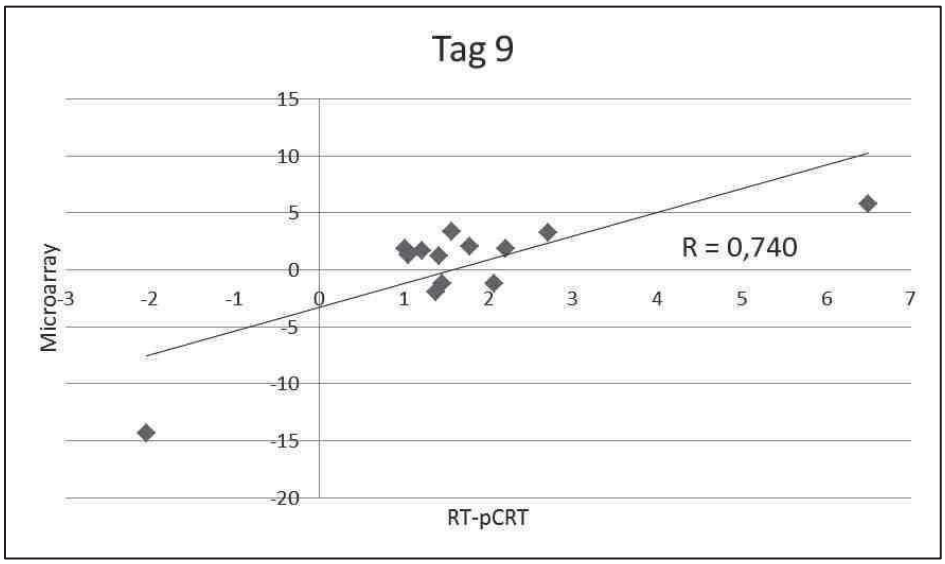

Abbildung 19: Vergleich der FC-Werte aus Microarray und aus RT-PCR am Tag 9: Für insgesamt 13 Gene wurden die FC-Werte aus Microarray und RT-PCR geplottet und eine Trendlinie angelegt

3.3. Ergebnisse der programmbasierten Genexpressionsanalyse

Die programmbasierte Genexpressionsanalyse ist der erste Schritt in der Analyse der erhobenen Daten, um eine Übersicht über Funktionen, Lokalisation in der Zelle oder assoziierte Krankheiten zu erhalten. Je nach Ergebnis kann dann anschließend die detailliertere Betrachtung einzelner Gengruppen bzw. Gene erfolgen. Die programmbasierte Genexpressionsanalyse bildet somit die Basis für die weitere Analyse.

3.3.1. SOURCE

Die Analyse der 768 Gene mit einer FDR kleiner als 0.05 in Source ergab 717 in UniGene, der Datenplattform des National Center for Biotechnology Information (NCBI), erkannte Gene. Somit wurden 51 Gene nicht erkannt. 97 Genen konnte SOURCE keine Funktion zuteilen. Die Gene wurden nach ihrer Funktion und der Lokalisation in der Zelle unterteilt (Abbildung 20, Abbildung 21).

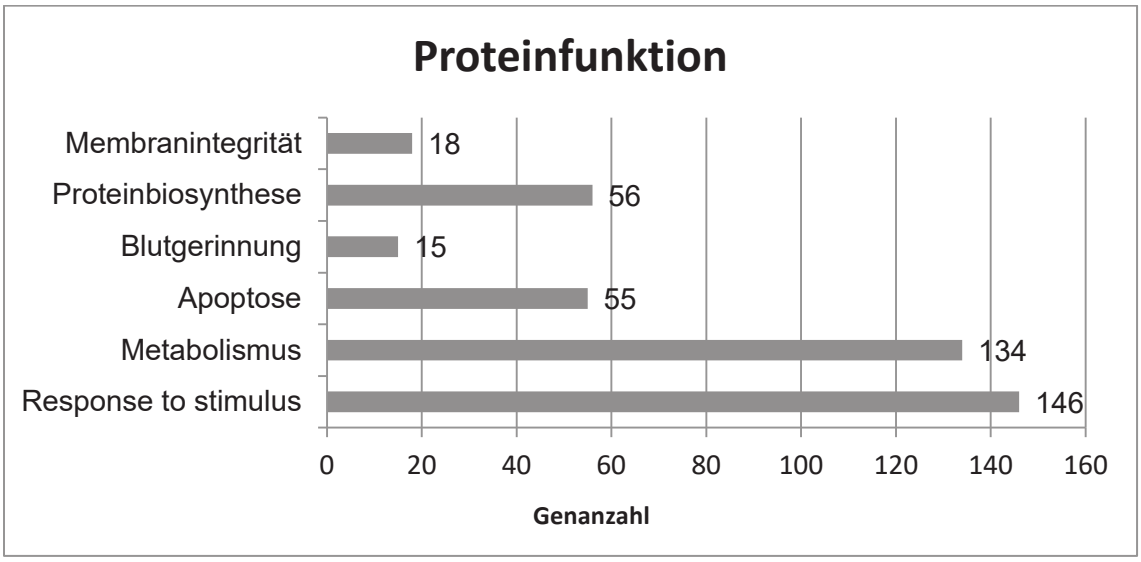

Abbildung 20: Funktionelle Einteilung durch SOURCE: SOURCE führt von jedem Gen eine Hauptfunktionen an. Die meisten Gene lassen sich in die Gruppe „Response to stimulus“ einordnen.

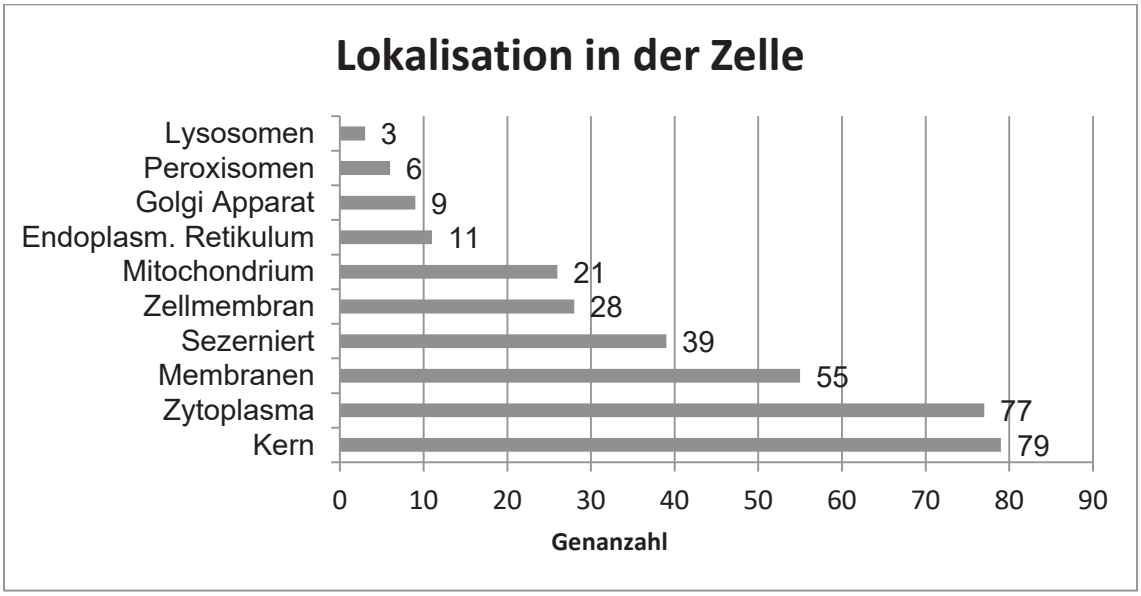

Abbildung 21: Proteinlokalisation nach SOURCE: SOURCE führt von jedem Gen ihre Lokalisation in der Zelle an. Die meisten Gene befinden sich im Zellkern.

3.3.2. DAVID

DAVID erkennt 751 von 768 Genen. Von diesen werden 645 in Funktionelle Gruppen eingeordnet, während 123 Gene nicht zugeordnet werden. Der höchste "Enrichment Score" lag bei 1.59 im Modul unter dem Überbegriff „Response to Stimulus“ (Antwort auf einen Reiz). Eine Übersicht über die Module mit dem höchsten "Enrichment Score" bietet Tabelle 7.

Überbegriff	Genanzahl	Enrichment Score
Response to stimulus	108	1,59
Biosynthetischer Prozess	83	1,01
Zytokin Produktion	9	0,82
Wundheilung	11	0,8
Regulation von multizellulären organismischen Prozessen	18	0,74
Metabolismus von Stickstoffverbindungen	35	0,73
Zellzyklus	53	0,71
Aktin-Zellskelet Organisation	11	0,7
Coenzym biosynthetischer Prozess	8	0,69

Tabelle 7: DAVID Ergebnisse: DAVID berechnet zu jedem Überbegriff einen Enrichment Score, der angibt, wie wichtig die Gengruppen im Expressionsprofil sind.

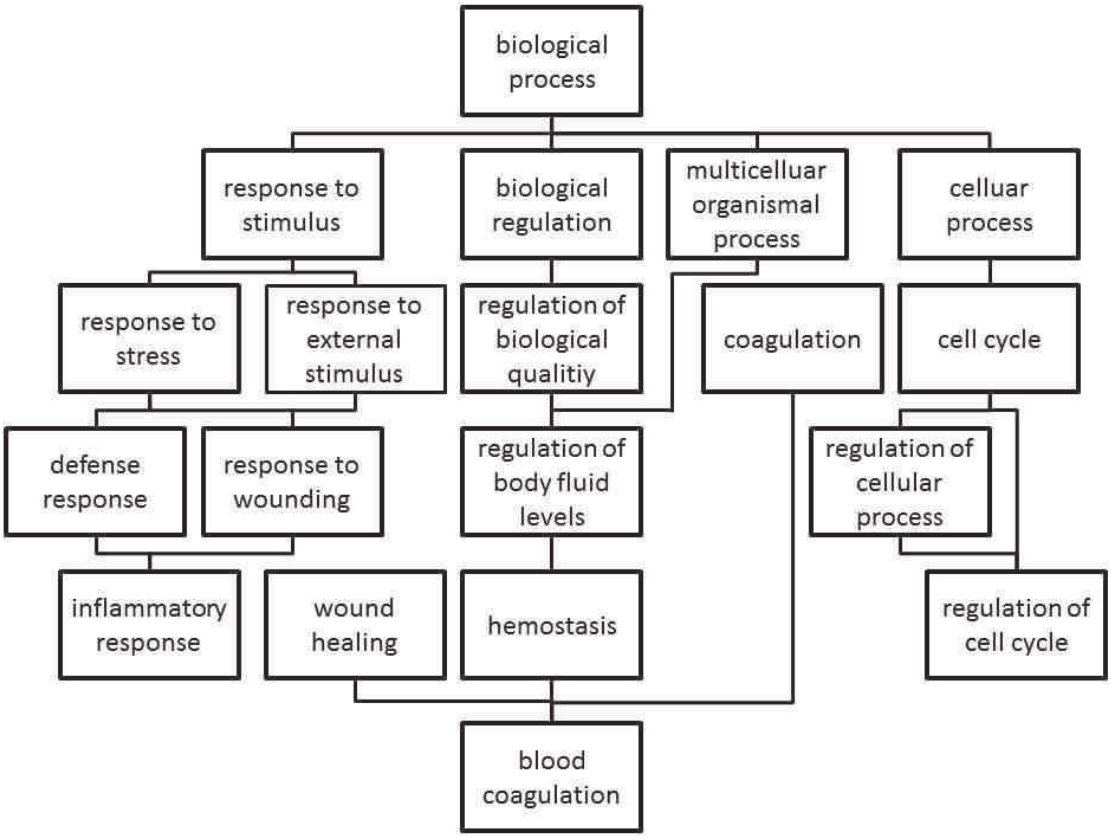

Abbildung 22: Ancestorchart aus DAVID: Beispiel für den Oberbegriff „biological process“ aus einer DAVID-Analyse, unter dem verschiedene Module untergeordnet sind. Die Gene der unteren sind jeweils auch in der oberen Gruppe vorhanden.

Die einzelnen Module enthalten Gruppen mit funktionell verbundenen Genen. Eine Übersicht über die Gruppen und deren Verbindungen bieten die Ancestorcharts (Abstammungsdiagramm). Ein Beispiel eines solchen Ancestorcharts der Gruppen *Inflammatory Response*, *Blood Coagulation* und Regulation of Cell-cycle ist in Abbildung 22 dargestellt. Gene, die zum Beispiel im Childterm *inflammatory response* vorhanden sind gehören ebenfalls in die Gruppe des Parentterms *response to stress*. Ebenso ist

es DAVID möglich, nach differentiell regulierten Signaltransduktionswegen zu suchen. Hierfür werden ebenfalls Enrichment Scores angegeben. Eine Übersicht über die Module mit dem höchsten Enrichment Score bietet Tabelle 8.

Signaltransduktionswege	Genanzahl	Enrichment Score
Insulin Signal-Transduktionsweg	7	0,46
T-Zell Rezeptor Transduktionsweg	5	0,09
B-Zell Rezeptor Transduktionsweg	4	0,09
Phosphatidylinositol Transduktionsweg	5	0,09

Tabelle 8: DAVID Signaltransduktionswege: Je höher der Enrichment Score, desto größer ist die Bedeutung der Gengruppe in der Analyse. Vergleiche hierzu auch Abschnitt 2.4.3.2. Die meisten Gene mit dem höchsten Enrichment Score ordnet DAVID dem Insulinsignaltransduktionsweg zu.

3.3.3. Ingenuity Pathway Analysis

Ingenuity vereint bis zu einem gewissen Maße die Funktionen von Source, Pathwayexplorer und DAVID und bietet überdies weitere Möglichkeiten, wie zum Beispiel das Erstellen von Signaltransduktionswegen.

Zur integrierten Analyse der fünf Zeitpunkte wurde eine Liste erstellt, in der jedem Gen nur ein signifikanter FC-Wert aus den fünf Zeitpunkten zugeordnet wurde. Die Liste wurde dann einer Ingenuity-Analyse zugeführt. Das Ergebnis der Analyse zeigen Tabelle 9 bis Tabelle 12.

Assoziierte Netzwerk Funktionen	Score
Antigen Presentation, Zell-vermittelte Immunantwort	41
Zellwachstum and Proliferation, Krebserkrankungen	38
Krebserkr., Zellmorphology, Hämatologische Krankheiten	36
Medikamenten Metabolismus, Gene Expression, Nucleinsäure Metabolismus	36
Zell-zu-Zell Signalübertragung and Interaktion, Protein Degradierung	35

Tabelle 9: Ingenuity-Analyse: Associated Network function: Je höher der Score (engl. für Ergebnis oder Punktzahl), desto interessanter und auffälliger ist das Netzwerk.

Krankheiten	**p-Wert**
Krebserkrankungen	$8{,}74 \times 10^{-5}$
Infektiöse Krankeiten	$4{,}79 \times 10^{-4}$
Inflammatorische Antwort	$7{,}86 \times 10^{-4}$
Hämatologische Krankheiten	$8{,}7 \times 10^{-4}$
Immunologische Krankheiten	$8{,}7 \times 10^{-4}$

Tabelle 10: Ingenuity-Analyse: Disease (Krankheit): Je kleiner der p-Wert, d.h. desto größer der Exponent, desto interessanter und auffälliger ist die Gruppe.

Top Canonical Pathways	**p-Wert**
Lysin Degradierung	$8{,}88 \times 10^{-3}$
Tryptophan Metabolismus	$1{,}6 \times 10^{-2}$
IGF-Signalübertragung	$1{,}94 \times 10^{-2}$
Blutgerinnungssystem	$1{,}99 \times 10^{-2}$
Ephrin Rezeptor Signalübertragung	$2{,}28 \times 10^{-2}$

Tabelle 11: Ingenuity-Analyse: Top Canonical Pathways: Je kleiner der p-Wert, d.h. desto größer der Exponent, desto interessanter und auffälliger ist die Gruppe.

Top Tox List	**p-Wert**
NFkB Signalübertragung	$1{,}38 \times 10^{-2}$
Anti-Apoptose	$3{,}9 \times 10^{-2}$
Hypoxia-Inducible Factor Signalübertragung	$4{,}12 \times 10^{-2}$
Mitochondriale Dysfunktion	$5{,}53 \times 10^{-2}$
Hepatische Fibrose	$6{,}83 \times 10^{-2}$

Tabelle 12: Ingenuity-Analyse: Top Tox List: Je kleiner der p-Wert, d.h. desto größer der Exponent, desto interessanter und auffälliger ist die Gruppe.

Es zeigt sich, dass die Netzwerke *Antigen Presentation* und *Cell-mediated Immune Response* die höchsten Punktwerte zugeordnet bekommen und damit besonders auffällig sind. In der Liste *Krankheiten* bilden *Krebserkrankungen* die Gruppe mit dem niedrigsten p-Wert, gefolgt von *Infektiöse Krankheiten*. Die Top-Signaltransduktionswege sind laut Ingenuity *Lysin Degradierung* und der *Tryptophan Metabolismus*. In der Tox-Liste ist der *NFkB-Signaling Pathway* führend, gefolgt von *Anti-Apoptose* und *HIF-Signalübertragung*.

Darüber hinaus wurden die fünf Zeitpunkte einzeln analysiert und die Ergebnisse dann verglichen. Mit dem Ziel, die Wichtigkeit einzelner Bereiche an den jeweiligen Tagen darzustellen, werden, je nach Bedeutung in der ursprünglichen Ingenuity-Liste, unterschiedliche Farbwerte verteilt. Das Ergebnis des Vergleichs ist in Tabelle 13 - Tabelle 16 dargestellt.

Funktionelle Netzwerke	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
Zelltod					
Immunantwort					
Krebserkrankungen					
Zell-Zell-Signalübertragung					
Zellentwicklung					
Infektiöse Krankheiten					
Proliferation					

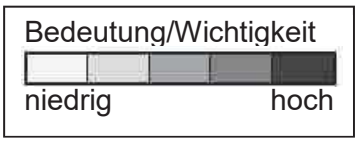

Tabelle 13: Funktionelle Netzwerke (Associated Network function): In der Zusammenfassung der Einzelanalysen durch Ingenuity wird mit Hilfe der zugeordneten Punktwerte (scores) die Wichtigkeit der funktionellen Netzwerke bestimmt.

Krankheiten /Fehlfunktionen	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
Krebserkrankungen					
Hämatologische Krankheiten					
Krankheiten d. hepatischen Systems					
Immunologische Krankheiten					

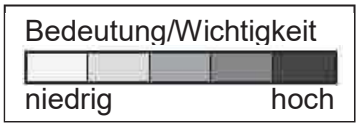

Tabelle 14: Krankheiten und Fehlfunktionen (Diseases and Disorders): In der Zusammenfassung der Einzelanalysen durch Ingenuity wird mit Hilfe der zugeordneten p-Werte die Wichtigkeit der funktionellen Netzwerke bestimmt.

Signaltransduktionswege	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
Glycin, Serin, Metabolismus					
Komplement System					
Interferon Signalübertragung					
Mitochondriale Dysfunktion					
Sphingolipid Metabolismus					

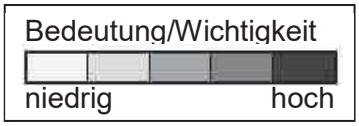

Tabelle 15: Signaltransduktionswege (Canonical Pathways): In der Zusammenfassung der Einzelanalysen durch Ingenuity wird mit Hilfe der zugeordneten p-Werte die Wichtigkeit der funktionellen Netzwerke bestimmt.

Toxische Funktionen	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
NFKB					
Anti-Apoptose					
HIF Signalübertragung					
Mitochondriale Dysfunction					
Akute-Phase Reaktion					
Oxidativer Stress					

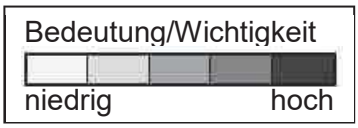

Tabelle 16: Toxische Funktionen (Top Tox Lists): In der Zusammenfassung der Einzelanalysen durch Ingenuity wird mit Hilfe der zugeordneten p-Werte die Wichtigkeit der funktionellen Netzwerke bestimmt.

Es zeigt sich, dass an fast allen Tagen das Netzwerk *Immunantwort* eine besonders wichtige Rolle einnimmt, genauso wie *Krebserkrankungen* und *Zelltod*. Bemerkenswerterweise taucht das Netzwerk *Infektiöse Krankheiten* dagegen nur an Tag 0 auf.

Bei den Erkrankungen spielt *Krebserkrankungen* über den gesamten Zeitverlauf eine große Rolle. Die Top-Signaltransduktionswege sind der *Glycerine-Serine-Threonine-Metabolismus* am Tag 0, das Komplementsystem an Tag 1 und 3 und *Interferon-Signalübertragung* gegen Mitte und Ende des Zeitverlaufs.

In der Top-Tox-Liste ist die *NFkB-Signalübertragung* an Tag 0 an erster Stelle, weiterhin scheint die *Positive Akute Phase Antwort* fast über den gesamten Zeitraum bis auf Tag 0 eine große Rolle zu spielen.

Ingenuity Pathways Alle Gene, denen Ingenuity an den jeweiligen Tagen eine der Top-Funktionen zuordnen konnte, sind in Pathways zusammengefügt, nach ihrer Expression eingefärbt und nach ihrer Lokalisation in der Zelle geordnet. Die bekannten Wechselwirkungen der Proteine untereinander sind durch Pfeile dargestellt (vgl. Abbildung 23, Abbildung 24).

Im Vergleich über alle Zeitpunkte hinweg zeigt sich an den Tagen 1 und 9 die größte Aktivität, da an diesen sowohl die meisten Gene signifikant reguliert sind, als auch die meisten funktionellen Verknüpfungen bestehen.

Einzelne Gruppen auffälliger Gene werden hervorgehoben und vergrößert. Besonders ins Auge fallen hier an Tag 0 die IL-1-Rezeptorfamilie (vgl. Abschnitt 3.5.2.2), an Tag 1 einige Proteine aus den plasmatischen Kaskaden (vgl. Kapitel 3.5.4) und die Expression um CD40 (vgl. Abschnitt 3.5.3.4). An Tag 9 ist die Expression der Caspase 3 und einiger umgebender Gene auffällig (vgl. Abschnitt 3.5.3.8). Den weiteren Zusammenhängen wird in den jeweiligen Kapiteln nachgegangen.

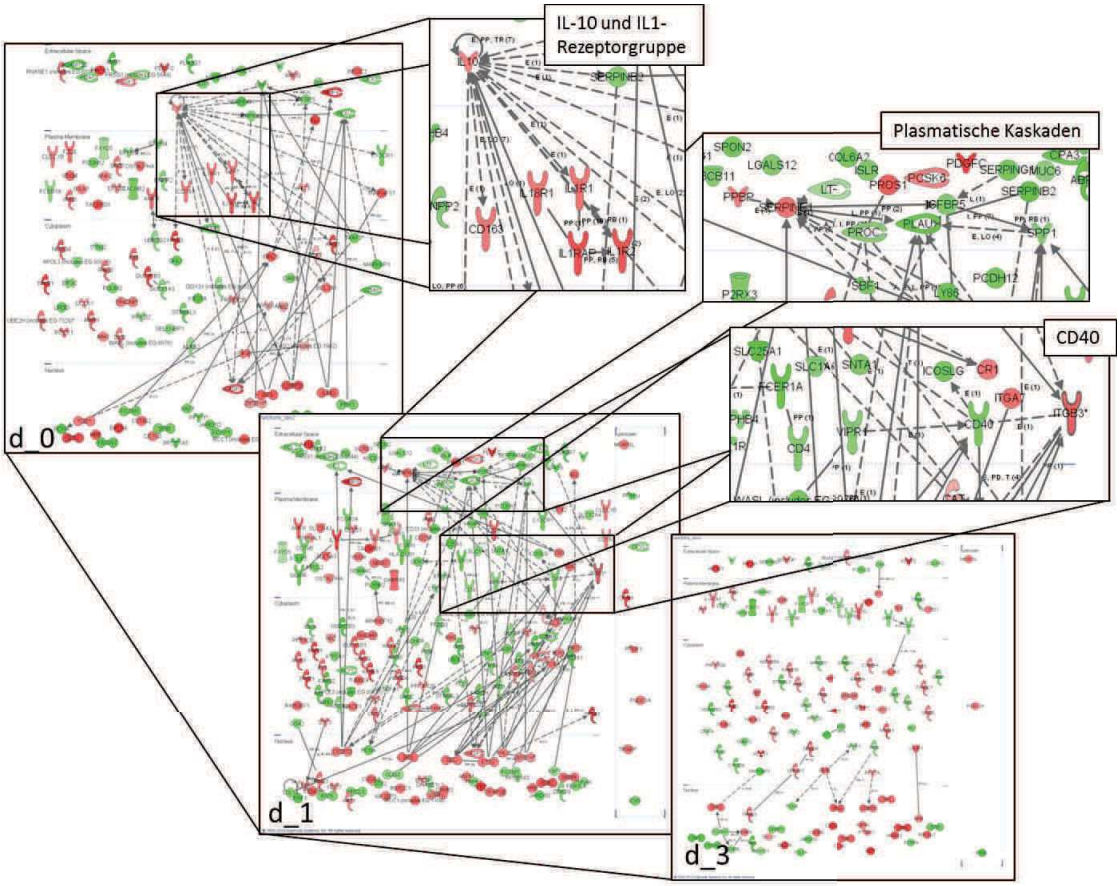

Abbildung 23: Ingenuity Top functions d_0, 1 und 3: Einzelne Ausschnitte aus den Übersichtsgrafiken wurden zur besseren Beurteilbarkeit vergrößert. Am Tag 0 (oben links) fällt die Expression von IL-10 und der IL-1-Rezeptormoleküle ins Auge. Am d_1 (Mitte) sind die Expression einiger Moleküle aus den plasmatischen Kaskaden und die Expression um CD40 auffällig.

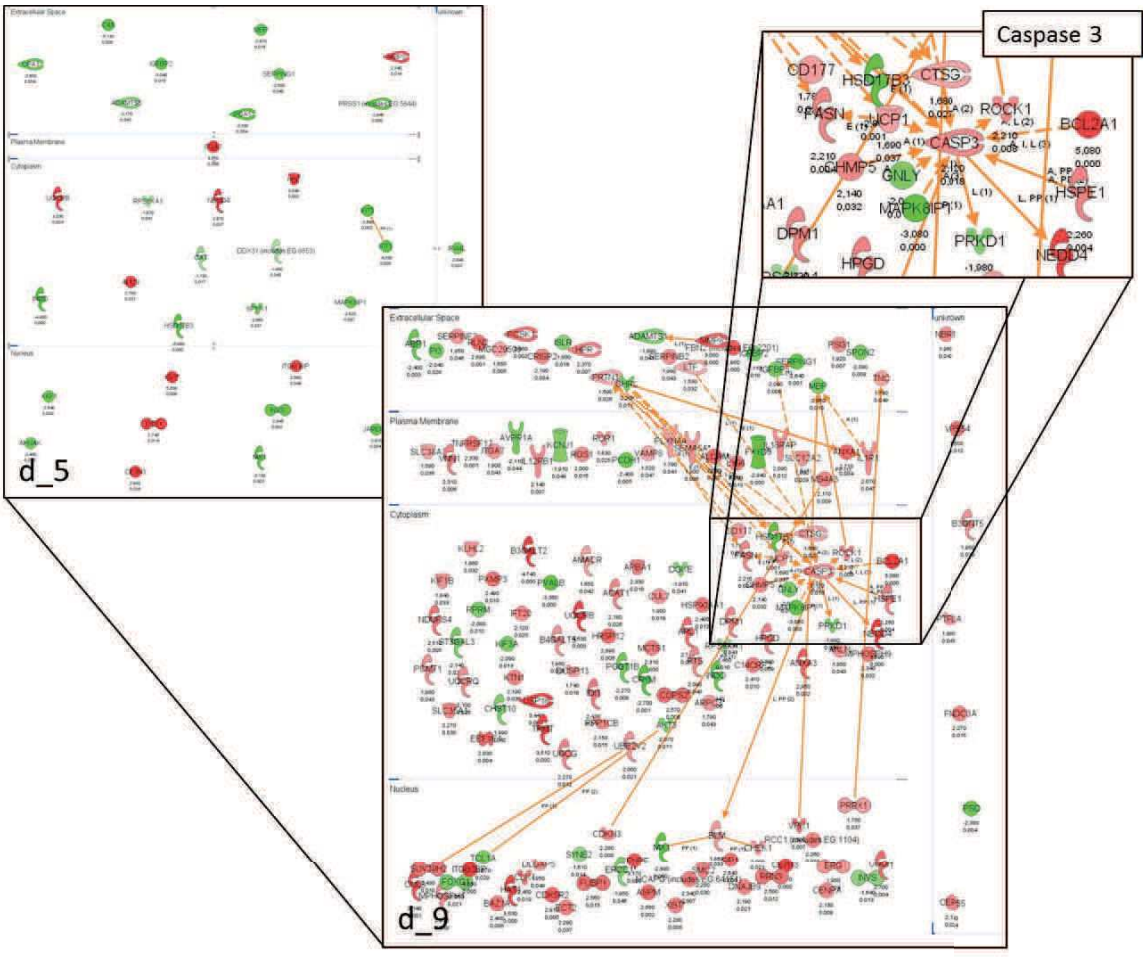

Abbildung 24: Ingenuity Top functions Tag 5 und 9: Nach dem starken Abfall der Aktivierung an d_5, zeigt sich an d_9 (Mitte) insgesamt eine Zunahme der Proteinanzahl und Interaktionen. Hier ist außerdem die Expression um die Caspase 3 auffällig. Im Vergleich mit den übrigen Zeitpunkten scheinen darüber hinaus mehr Gene hochreguliert zu sein.

3.4. Identifizierung von Biomarker-Genen

Auf der Suche nach Genen, die die beiden Kohorten besonders gut unterscheiden und möglicherweise als Biomarker dienen können, wurde die Genexpression der Patienten betrachtet. Idealerweise würde die Genexpression eines Gens bei allen Patienten deutlich höher oder deutlich niedriger als die Expression in der anderen Gruppe sein. Näherungsweise wurde die Differenz (d) zwischen der mittleren Expression ($\bar{x}$) zuzüglich bzw. abzüglich der Standardabweichung (s) betrachtet. Gesucht wurden die Gene mit einer Differenz größer 0. Details zur Berechnung bietet Abschnitt 2.4.5.

Tabelle 17 gibt die Anzahl der identifizierten Kandidatengene wieder.

Zeitpunkte	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
Anzahl	8	36	194	38	890

Tabelle 17: Anzahl von Kandidaten-Genen an den einzelnen Zeitpunkten: Aufgeführt wird die Anzahl der gefundenen Kandidaten-Gene mit d> 0 an den fünf Zeitpunkten.

29 Gene entsprachen dabei an zwei Zeitpunkten gleichzeitig der gestellten Anforderung, wobei von diesen insgesamt fünf Gene an drei Zeitpunkten identifiziert wurden. Diese sind CDADC1, IDH3G, CLEC2B, PARP3 und TXNRD2. Eine graphische Darstellung der Expressionen der in dieser Arbeit beschriebenen Gene CLEC2B und TXNRD2 bieten Abbildung 25 und Abbildung 26.

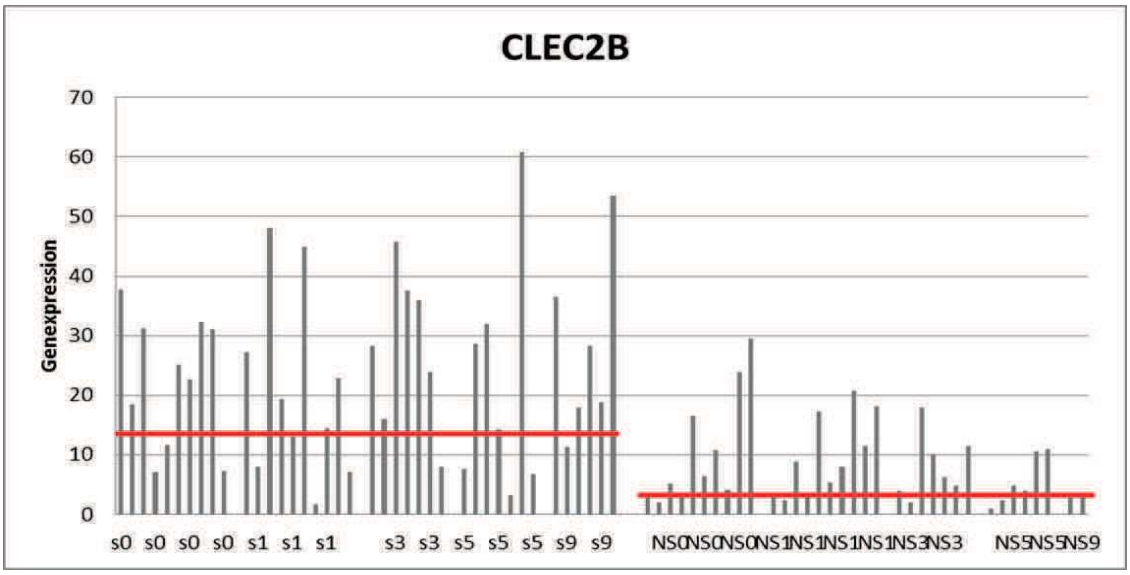

Abbildung 25: Graphische Auftragung der Genexpression von CLEC2B: Links stehen die septischen Patienten an den fünf Zeitpunkten und rechts die nicht-septischen Patienten. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Patientengruppe über die 5 Zeitpunkte an.

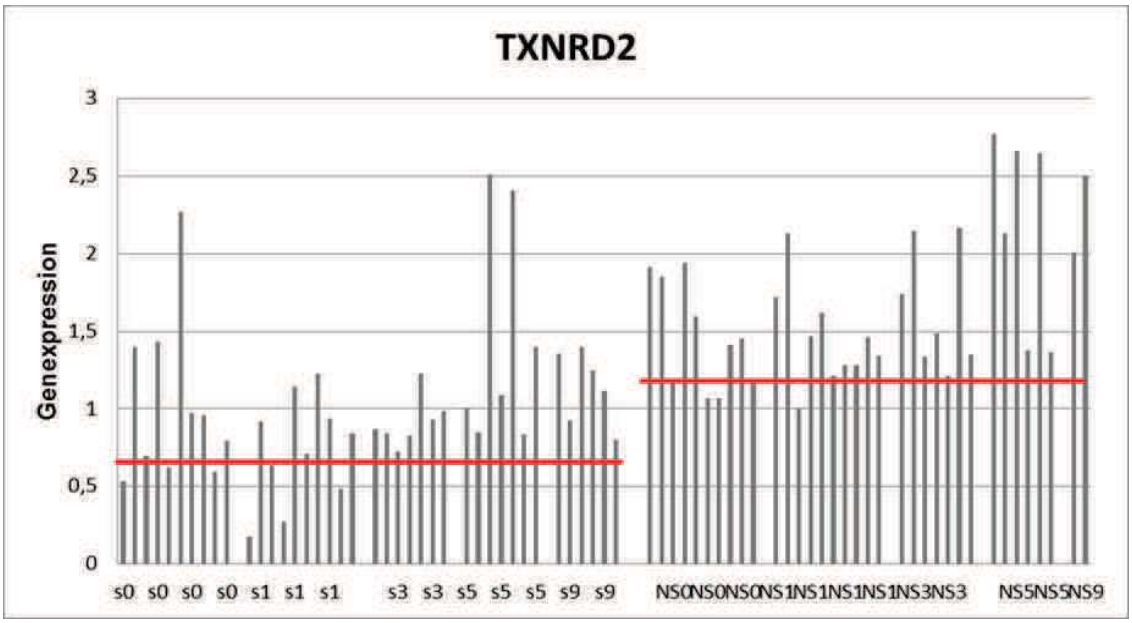

Abbildung 26: Graphische Auftragung der Genexpression von TXNRD2: Links stehen die septischen Patienten an den fünf Zeitpunkten und rechts die nicht-

septischen Patienten. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Patientengruppe über die 5 Zeitpunkte an.

3.5. Ergebnisse der funktionsorientierten Analyse

Nachdem in der vorangegangenen programmbasierten Analyse die Basis für die weitere Analyse gelegt wurde und die ersten Erkenntnisse über wichtige Gengruppen gefunden wurden, soll nun eine detaillierte Betrachtung einzelner funktioneller Gruppen erfolgen.

Betrachtet man die Ergebnisse in DAVID und Ingenuity, fällt ein breites Spektrum aus verschiedenen Bereichen der Reaktion auf eine Sepsis auf. Es sind unter anderem Gruppen aus den Bereichen Immunität, Metabolismus, Blutgerinnung und der Signaltransduktion betroffen.

3.5.1. Immunantwort bei Sepsis

Die beiden DAVID-Module mit den größten Enrichment scores (1,59 und 1,17) gehören beide zum Parentterm *Response to Stimulus*. Fasst man die Funktion der Gene der ersten beiden Module zusammen, so sind diese für die direkte Antwort des Körpers auf ein Trauma und eine Infektion zuständig.

Um einen ersten Eindruck der grundsätzlichen Richtung der Immunantwort zu bekommen, werden die Gene der Gruppe *Response to stimulus* bezüglich ihrer bekannten pro- oder antiinflammatorischen Funktion in zwei Hälften sortiert. Gene, deren Proteine sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen haben, werden nach ihrer Hauptfunktion eingeordnet. Wo keine Einteilung möglich ist, werden die Gene aussortiert. Insgesamt werden deutlich mehr pro- als antiinflammatorische Gene gefunden. Eine Auflistung der Gene mit Einteilung in die pro- oder antiinflammatorische Gruppe findet sich in Anhang A.

Bedingt durch die größere Anzahl proinflammatorischer Gene ist deren kumulative Expression (Disease Load Index, DLI) größer als die der antiinflammatorischen Gene. Insgesamt liegt die Pro-Inflammation in beiden Patientenkohorten auf einem gleichbleibend hohen Niveau. Die septischen Patienten haben dabei über den gesamten Verlauf eine höhere Expression (vgl. Abbildung 27).

Bei der Anti-Inflammation ergibt sich an den ersten drei Zeitpunkten eine deutlich höhere Genexpression in der septischen Gruppe, insbesondere an Tag 0. An Tag 5 und 9 liegt die Expression in beiden Kohorten gleich auf, wobei zuvor ein deutlicher Abfall der Expression bei den septischen Patienten zu beobachten ist, während die Genexpression nicht-septischer Patienten nur leicht abfällt (vgl. Abbildung 28).

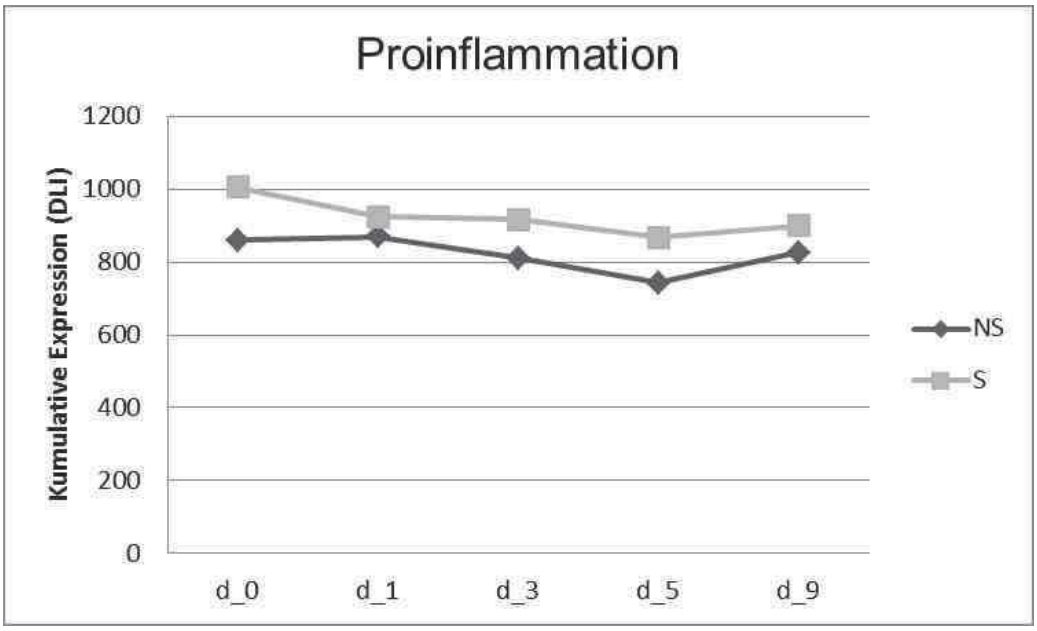

Abbildung 27: Verlauf der Pro-Inflammation in septischen und nicht-septischen Patienten: In beiden Patienten-Kohorten zeigt sich über den gesamten Zeitverlauf eine im Wesentlichen gleichbleibende Pro-Inflammation.

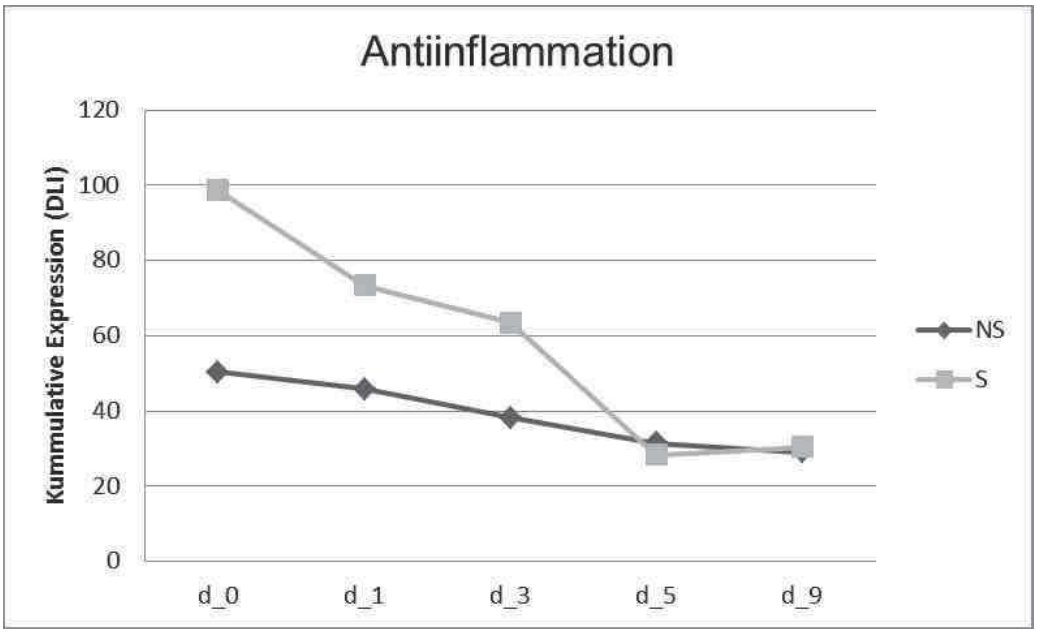

Abbildung 28: Verlauf der Anti-Inflammation in septischen und nicht-septischen Patienten: Auffällig ist eine stärkere Anti-Inflammation in septischen Patienten am Anfang des Zeitverlaufs.

Auch bei der Betrachtung der mittleren Intensitäten überwiegt die Aktivierung der Proinflammation sowohl in septischen als auch in nicht septischen Patienten. Das Verhältnis zwischen Pro- und Antiinflammation ist jedoch an den ersten beiden Tagen bei den septischen Patienten deutlich kleiner als in den nicht septischen Patienten (vgl. Abbildung 29 und Abbildung 30).

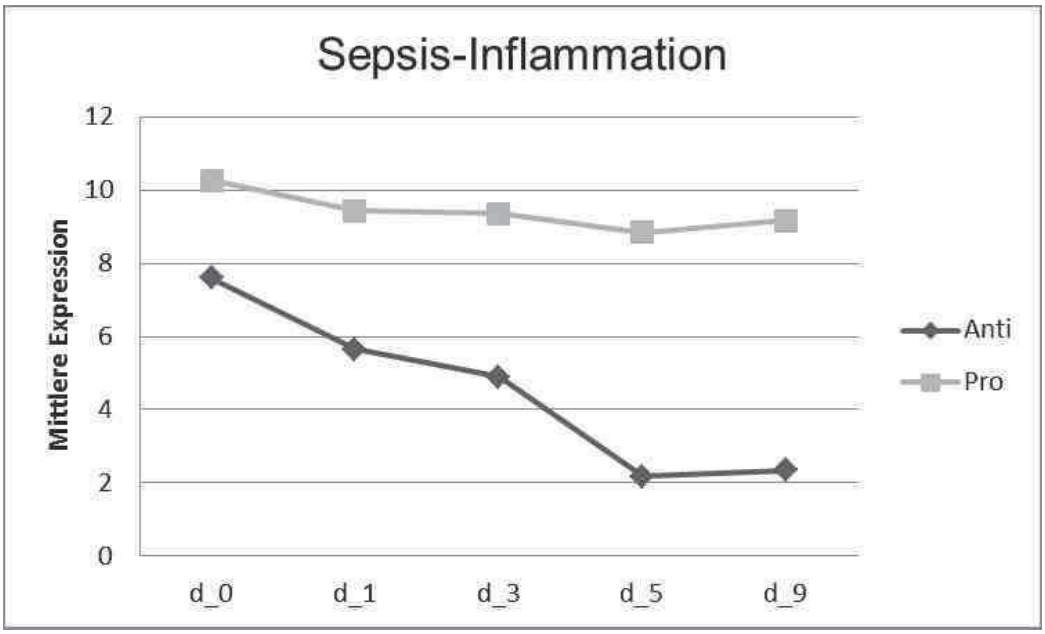

Abbildung 29: Zeitverlauf d. Pro- und Anti-Inflammation bei septischen Patienten: Über den gesamten Zeitverlauf zeigt sich eine stärkere Pro-Inflammation. Auffällig ist die am Anfang des Zeitverlaufs gemessene vermehrte Anti-Inflammation.

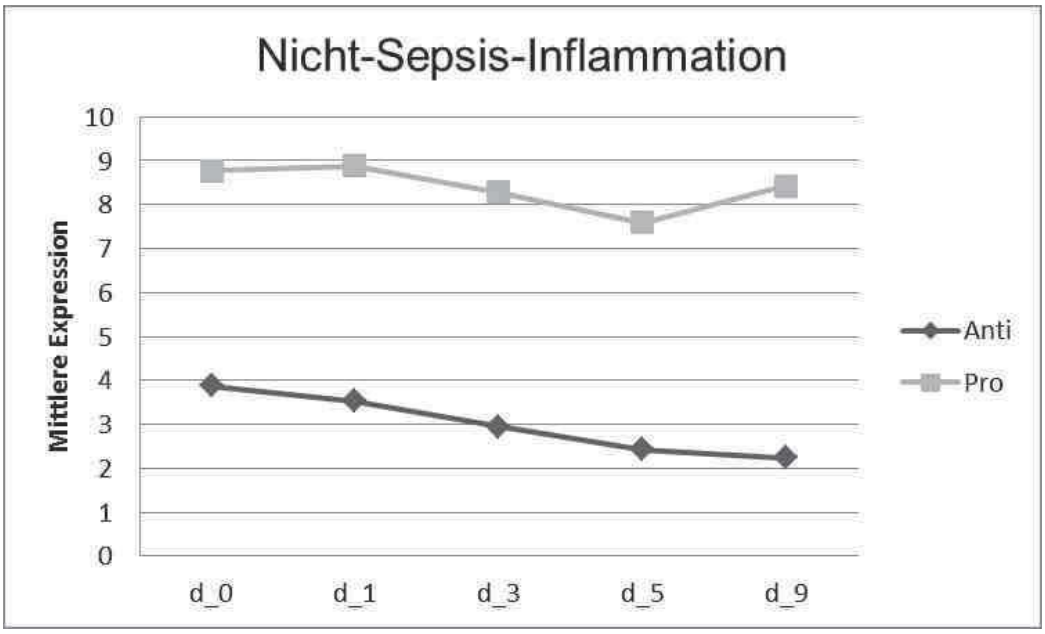

Abbildung 30: Zeitverlauf d. Pro- und Anti-Inflammation bei nicht-septischen Patienten: Bei den nicht-septischen Patienten zeigt sich über den gesamten Zeitverlauf eine deutlich stärkere Pro-Inflammation als Anti-Inflammation.

3.5.2. Angeborene Immunantwort

Das Programm Pathwayexplorer findet im Signaltransduktionsweg *Innate Immune Response'* 17 differentiell regulierte Gene. Diese sowie durch weitere Analyse gefundene Gene werden im folgenden Abschnitt besprochen.

3.5.2.1. Gesteigerte Antigenerkennung

Die Immunantwort beginnt mit der Erkennung der Pathogene über spezifische Rezeptoren. Der bekannteste ist dabei TLR-4, der jedoch nicht signifikant reguliert ist. Ein wichtiger Korezeptor von TLR-4 und auch TLR-2 ist **MD-2** (LY96). Dieser ist in septischen Patienten hochreguliert und lässt dadurch auf eine gesteigerte Antigenerkennung schließen. Die Aktivierung von MD2 ist mit der Entwicklung einer bakteriellen Sepsis verbunden ([199]).

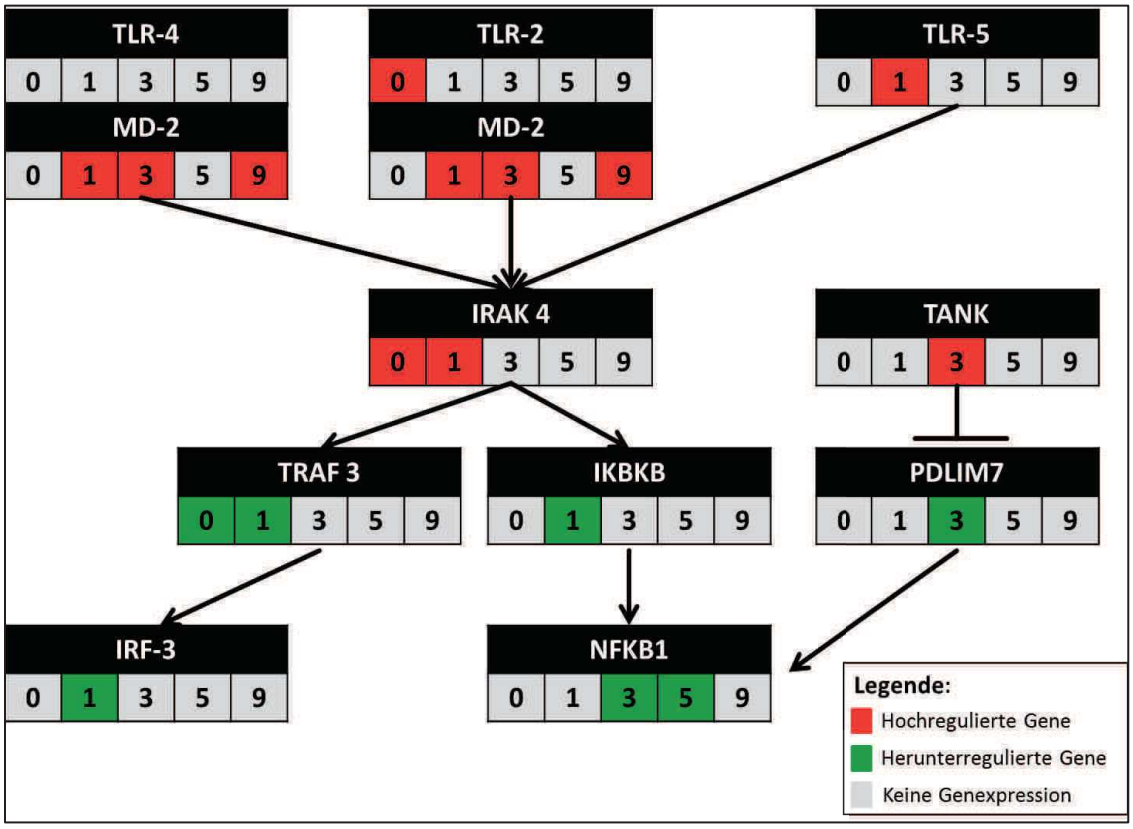

Abbildung 31: Antigenerkennung mit Aktivierung von NF-κB: Die direkte Antigenerkennung durch Toll-like-Rezeptoren scheint aktiviert zu sein, während die weitere Signaltransduktion für eine Bremsung der Immunreaktion spricht. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

TLR-2 und **TLR-5** sind am Anfang des Zeitverlaufs an Tag 0 bzw. 1 mit einer FDR von 0,27 bzw. 0,11 hochreguliert. TLR-2 und TLR-5 sind verantwortlich für die Erkennung von Zellwandbestandteilen gramnegativer und -positiver Bakterien und die Einleitung der inflammatorischen Immunantwort.

Ein weiteres wichtiges Molekül in der Signalkaskade, welches von TLR-2, TLR-4 und TLR-5 aktiviert wird, ist **IRAK4**. Dieses wird bei septischen Patienten an den Tagen 0

[199] Vgl. Miyake 2004.

und 1 mit einer FDR von 0,25 und 0,06 stärker exprimiert. Somit ist der anfängliche Teil der TLR-Signalkaskade zu Beginn bei septischen Patienten aktiviert.

Es zeigt sich eine verminderte Signaltransduktion nach Toll-like Rezeptoren. Betrachtet man die weiteren Abschnitte der Signaltransduktion nach Toll-like Rezeptoren, fehlen Hinweise auf eine Aktivierung. **TRAF3** wird direkt durch TLR-4 aktiviert und reguliert die Funktion von NF-κB und IRF3 (Abbildung 31). Es ist in septischen Patienten am Anfang des Zeitverlaufs herunterreguliert und weist so auf eine Verminderung der Signalweitergabe hin.

NF-κB als zentrales Molekül in der Vermittlung proinflammatorischer Prozesse wird durch Inhibitoren im nicht-aktivierten Zustand gehalten. **NFKB1** ist ein Bestandteil des NF-κB Komplexes und in septischen Patienten an Tag 3 und 5 vermindert exprimiert, wobei die FDR bei 0,19 bzw. 0,13 liegt. Die Inhibitoren werden durch Phosphorylierung abgespalten. Eine dieser Phosphorylasen ist **IKBKB**. Sie ist in septischen Patienten herunterreguliert und liegt mit einer FDR von 0,054 nur knapp über der Signifikanzgrenze. **PDLIM7** (LMP1) führt zur verstärkten Aktivierung von NF-κB und ist Tag 3 mit einer FDR von 0,14 herunterreguliert. Gleichzeitig wird es durch **TANK** geblockt, das an Tag 3 mit einer FDR von 0,27 heraufreguliert ist. Somit weist auch die Expression der biologisch zusammenhängenden Gene auf eine verminderte Aktivierung von NF-κB hin (Abbildung 31).

Neben der Aktivierung von NF-κB ist TRAF3 für die Aktivierung von IRF-3 und damit der antiviralen Immunabwehr zuständig. **IRF3** ist in septischen Patienten am zweiten Zeitpunkt mit einer FDR von 0,24 herunterreguliert. Folglich lässt sich außerdem auf eine geringere Stimulation der antiviralen Immunantwort schließen.

Symbol	Name	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	1,4	1,6	2,2	1,2	1,5
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	-1,2	-1,9	-1,4	-1,3	1,2
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4	1,7	1,9	1,4	1,1	1,4
IRF3	Interferon regulatory factor 3	-1,2	-1,8	-1,5	-1,4	-1,4
MD2	Lymphocyte antigen 96 (LY96)	1,3	1,7	2,2	1,5	2,3
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer (p105)	-1,5	1,1	-1,9	-2,3	-1,2
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	1,1	-1,1	-2,0	1,0	-1,3
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	1,7	1,6	1,9	1,2	1,4
TLR2	Toll-like receptor 2	1,7	1,5	1,3	1,1	1,3
TLR5	Toll-like receptor 5	1,3	1,6	1,4	1,0	1,2
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	-2,2	-1,5	-1,2	-1,4	-1,0

Signifikanz	FDR <0,05			FDR 0,05 – 0,3			FDR > 0,3	

Tabelle 18: Gene, beteiligt an der Antigenerkennung: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.2.2. Aktivierung von Zytokinen und ihrer Rezeptoren der angeborenen Immunität

DAVID ordnet dem Modul *Cytokine Production* den dritthöchsten Enrichment Score zu. Somit gehört die Genexpression der Zytokine zu den am auffälligsten regulierten Gengruppen.

Das einzig signifikant regulierte Interleukin ist **IL-10**. Es ist das bekannteste antiinflammatorische Interleukin. In septischen Patienten ist es an d_ 0 signifikant hochreguliert und zeigt bereits am Anfang des Zeitverlaufs die Induktion der Immunparalyse. Dahingegen sind verschiedene Interleukinrezeptoren signifikant reguliert.

Aktivierung der Interleukin-1 Signaltransduktion Interleukin 1 ist eines der wichtigsten und bekanntesten Zytokine bei der Entwicklung einer Sepsis. Es bindet an zwei Rezeptoren, die beide in septischen Patienten signifikant reguliert werden. IL1R1 ist an den Tagen 0, 1 und 9 hochreguliert, während IL1R2 am Tag 0 vermehrt exprimiert wird und auch am Tag 1 mit einer FDR von 0,08 nur knapp die Signifikanzgrenze überschreitet. Während IL1R1 zu einer gesteigerten Immunantwort führt, ist IL1R2 ein *Decoy-Rezeptor* und fischt Interleukin-1 aus dem Blut, ohne zu einer Signalweitergabe zu führen, und schwächt somit die IL1-Wirkung ab.

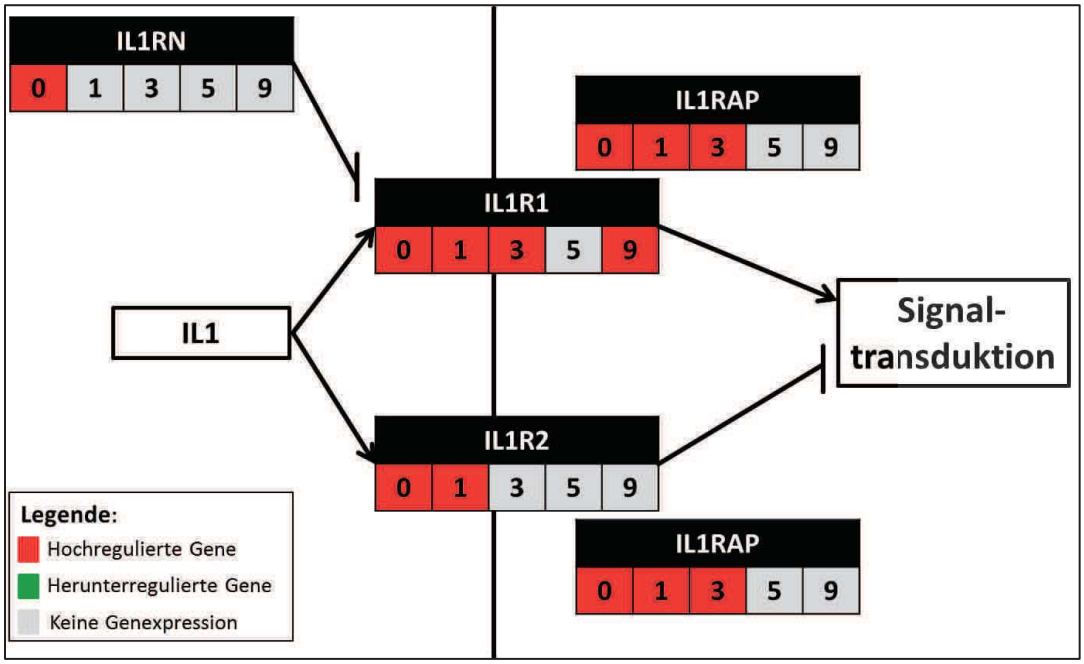

Abbildung 32: Interleukin 1 Metabolismus: Sowohl fördernde als auch hemmende Moleküle der IL-1-Signaltransduktion werden verstärkt exprimiert. Der Effekt ist vor

allem am Anfang und in der Mitte des Zeitverlaufs sichtbar. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Außerdem ist ein akzessorisches Protein reguliert. **IL1RAP** ist an den Tagen 0 und 1 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,08 hochreguliert.

Bei den nicht signifikanten Genen ist ein weiteres in die Interleukin-1-Signaltransduktion involviertes Gen reguliert. Der Interleukin 1 Rezeptorantagonist (**IL1RN**) ist an Tag 0 mit einer FDR von 0,24 hochreguliert. Er bindet wie Interleukin 1 an IL1R1 und blockiert ihn (Abbildung 32).

Die Genexpression der Interleukin 1 Gruppe lässt auf eine starke Aktivierung des Zytokins schließen. Die fehlende Regulation des Interleukins selbst sowie die gleichzeitige starke Inhibierung weisen jedoch auf eine schon abgelaufene Reaktion und die eingesetzte Gegenregulation hin.

Aktivierung der Interleukin-18 Signaltransduktion Interleukin 18 bindet an seinen Rezeptor **IL18R1**. Dieser ist, wie sein akzessorisches Protein (**IL18RAP**), in septischen Patienten hochreguliert. Der Rezeptor wird an Tag 0 und 1, das bindende Protein an Tag 3 vermehrt exprimiert. IL18RAP erhöht dabei die Bindungskapazität des Rezeptors und ist nötig für eine NF-κB Aktivierung. Die Aktivierung führt zu einer gesteigerten NF-κB Translokation und somit zu einer erhöhten Inflammation.

CEBPD ist ein Regulator der inflammatorischen Genexpression auf Transkriptionsebene mit Wirkung auf die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF und spielt darüber hinaus eine Rolle in der endotoxin-induzierten intravasalen Gerinnung ([200]). In septischen Patienten ist er an den Tagen 0 bis 3 signifikant hochreguliert und zeigt so eine gesteigerte pro-inflammatorische Genexpression.

Die Genexpression der Interleukine zeigt somit eine Aktivierung der Angeborenen Immunantwort über IL1 und IL18, jedoch gleichzeitig die Gegenregulation und Immunparalyse durch IL10 und die den IL-1-Signaltransduktionsweg antagonisierenden Mechanismen.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
IL18R1	Interleukin 18 receptor 1	2,1	1,7	1,4	1,2	1,5
IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	2,6	1,8	1,5	1,0	1,2
IL10	Interleukin 10	1,9	1,6	1,8	1,6	1,3
IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	2,1	3,2	1,9	1,0	2,1
IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein	2,7	2,0	2,2	-1,2	1,4
IL18RAP	Interleukin 18 receptor accessory protein	1,8	1,8	2,3	1,7	2,1
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	1,6	1,4	1,7	1,3	1,3
CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein	2,5	2,0	2,5	1,1	1,0

[200] Vgl. Slofstra et al. 2007.

	(C/EBP), delta								
Signifikanz	FDR <0,05			FDR 0,05 – 0,3			FDR > 0,3		

Tabelle 19: Zytokine der angeborenen Immunität: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.2.3. Verminderte Chemotaxis

Für eine gerichtete Abwehr ist es notwendig, Leukozyten zum Ort der Infektion zu rekrutieren. Dies wird über die Ausschüttung sogenannter Chemokine erreicht.
Der Rezeptor **CX3CR1** ist sowohl für Chemotaxis als auch für Migration von Leukozyten zuständig. Der Rezeptor ist an den Tagen 0 und 1 signifikant herunterreguliert. Eine verminderte Expression ist mit einer Immunsuppression bei Sepsis assoziiert ([201]).
CCL23 ist für die Rekrutierung von T-Lymphozyten und Monozyten verantwortlich und wird am Tag 3 vermindert exprimiert. Die Funktion von **CCL5** ändert sich je nach Prozessierung des Moleküls. Das ursprüngliche Protein wirkt stark chemotaktisch auf Monozyten und T-Gedächtnis-Zellen, es ist in septischen Patienten am Tag 3 herunterreguliert. Cathepsin G (**CTSG**) führt zur Entstehung des CCL5-4-68 Proteins, das die Chemotaxis hemmt. Cathepsin G ist am Tag 9 signifikant hochreguliert und überschreitet auch am Tag 3 mit einer FDR von 0,051 nur knapp die Signifikanzgrenze. Die CCL5-3-68 Variante wird durch **CD26** produziert und wirkt nur noch schwach chemotaktisch. CD26 (oder DPP4) ist an den Tagen 0 bis 3 mit einer FDR von 0,19 bzw. 0,20 bzw. 0,16 herunterreguliert. Somit scheint das in septischen Patienten grundsätzlich vermindert produzierte CCL5 darüber hinaus verstärkt in eine hemmende Variante umgebaut zu werden (Abbildung 33).

[201] Vgl. Pachot et al. 2008.

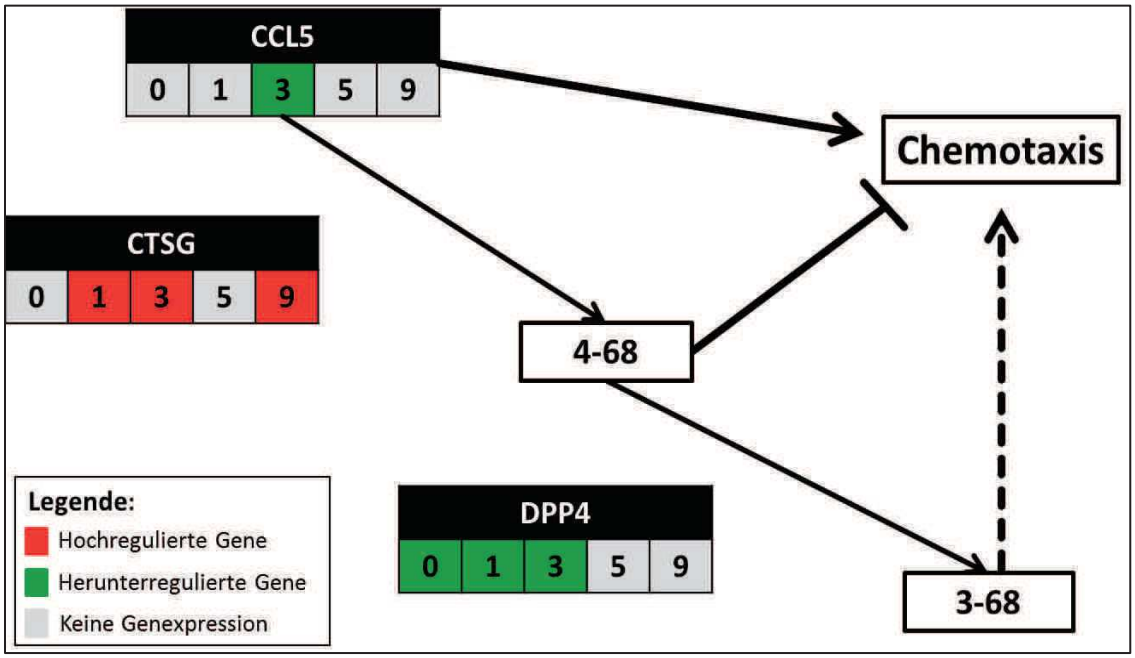

Abbildung 33: CCL-5 Metabolismus: Der gesamte Metabolismus von CCL-5, das in die 4-86 und 3-68 Version umgewandelt wird, spricht für eine verminderte Chemotaxis. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

CXCL1 ist am Tag 3 mit einer FDR von 0,24 herunterreguliert. Es rekrutiert Neutrophile Granulozyten und stimuliert autokrin das Endothel. Darüber hinaus ist **CXCL9** vermindert exprimiert. Funktionell spielt es eine Rolle in der Rekrutierung von T-Lymphozyten. Das einzige hochregulierte Chemokin mit einer FDR von 0,08 in septischen Patienten ist **CXCL2** (MIP-2). Es wird von Monozyten und Neutrophilen exprimiert und dient der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten.

Insgesamt zeigt sich die Chemotaxis in septischen Patienten jedoch über den gesamten Zeitverlauf herunterreguliert und erschwert so eine gezielte Rekrutierung von Leukozyten.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	-2,1	-2,3	-1,4	-1,3	-1,2
CCL5	chemokine (c-c motif) ligand 5	-1,1	-1,2	-2,1	-1,5	-1,5
CCL23	Chemokine (C-C motif) ligand 23	-1,3	-1,5	-1,6	-1,8	-1,5
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-1,2	-1,2	-1,6	-1,3	-1,6
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1,3	1,3	2,3	1,2	1,4
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1,5	-1,4	-1,7	-1,5	-1,3
CTSG	Cathepsin G	1,4	1,6	1,8	1,8	1,7
DPP4	Dipeptidyl-peptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	-1,6	-1,5	-1,7	1,1	-1,1

Signifikanz	FDR <0,05			FDR 0,05 – 0,3			FDR > 0,3	

Tabelle 20: Gene, beteiligt an Chemotaxis: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.2.4. Verstärkte Aktivierung Neutrophiler Granulozyten

Es zeigt sich eine verstärkte Degranulation in septischen Patienten. Bei Aktivierung schütten Neutrophile Granulozyten drei verschiedene Arten von Granula aus. Das in spezifischen (oder sekundären) Granula gespeicherte Protein **MMP8** (Matrix Metallopeptidase 8) weist an allen Tagen signifikante Werte auf. MMP8 ist auf einem hohen Niveau mit fast durchgehenden Fc-Werten von über drei hochreguliert. Eine Inhibierung von MMP8 im Mausmodell schützte vor der Entwicklung eines Endotoxinschocks ([202]).

Lactotransferrin (LTF) ist ebenfalls signifikant reguliert, die Expression schwankt jedoch und während sie am Tag 1 leicht vermindert ist, steigt sie danach an und ist am Tag 9 signifikant erhöht. LTF sorgt für die Bekämpfung von Bakterien, hat eine antiinflammatorische Wirkung und reguliert Zellwachstum und Differenzierung.

Zusammen mit der stark erhöhten MMP8 Produktion ergeben sich insgesamt mehr Hinweise auf eine verstärkte Ausschüttung spezifischer Granula.

Von den in azurophilen Granula gespeicherten Proteinen zeigen Cathepsin G (**CTSG**) und die Proteinase 3 (**PRTN3**) eine Aktivierung am Tag 9. Die Expression von CTSG liegt am Tag 3 mit einer FDR von 0,051 nur knapp über der Signifikanzgrenze. Im Zeitverlauf fällt auf, dass diese gegen Ende zunimmt und am Tag 9 ihren Höhepunkt hat. Auf eine gesteigerte Ausschüttung von azurophilen Granula am Ende des Zeitverlaufs weist darüber hinaus die Expression von **Defensin alpha 4**, **Azurocidin 1** und der Myeloperoxidase (**MPO**) hin. Die FDR dieser Gene liegt jedoch oberhalb der Signifikanzgrenze, auch wenn die Werte am Tag 9 mit 0,056 bis 0,096 nur knapp über 0,05 liegen.

Einen weiteren Hinweis auf eine aktivierte Exozytose der Granula bietet die gesteigerte Expression von **Rab27b**, das am Tag 3 in septischen Patienten signifikant hochreguliert ist. Rab27b ist wie Rab27a für die Exozytose von Granula sowohl in Neutrophilen Granulozyten als auch in Mastzellen verantwortlich.

Der Peptidase Inhibitor 3 (**PI3** oder Elafin) ist ein bekannter Inhibitor der neutrophilen Serinproteinase mit einer wichtigen Rolle bei der Verhinderung exzessiver Gewebsschädigung durch ein inflammatorisches Ereignis. Eine erhöhtes Risiko für ein akutes

[202] Vgl. Hu et al. 2005.

Lungenversagen bei Fehlfunktion des Proteins wurde nachgewiesen ([203]). In septischen Patienten ist die Genexpression an den Tagen 0, 1, und 9 signifikant vermindert sowie an Tag 3 mit einer FDR von 0,13.

Die Genexpression zeigt eine gesteigerte Aktivierung Neutrophiler Granulozyten in septischen Patienten, die erstaunlicherweise vor allem am Ende des Zeitverlaufs deutlich wird.

Es zeigt sich ein aktivierter „Oxidative burst" in Neutrophilen Granulozyten. In Neutrophilen Granulozyten ist die NADPH-Oxidase 2 (NOX2) für die Produktion von ROS zuständig. Eine der beiden Komponenten ist **CYBB**, das in septischen Patienten am Tag 3 signifikant und am Tag 0 mit einer FDR von 0,26 hochreguliert ist.

Kontrolliert wird die NOX2 durch die Phosphoinositid-3-Kinase, jedoch nicht über den bekannten Weg mit Rekrutierung von AKT (in septischen Patienten vermindert exprimiert), sondern die Aktivierung erfolgt sowohl direkt oder über die Proteinkinase C ([204]). Eine der katalytischen Untereinheiten (**PIK3CA**) ist in septischen Patienten an den Tagen 1 und 3 signifikant sowie am Tag 0 und 9 mit einer FDR von 0,21 bzw. 0,14 hochreguliert.

Somit zeigt die Genexpression vor allem gegen Mitte des Zeitverlaufs einen gesteigerten „Oxidative burst" der Neutrophilen Granulozyten und dadurch bedingten oxidativen Stress (siehe auch Abschnitt „Mitochondriale Dysfunktion", 3.5.5).

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
PRTN3	Proteinase 3 (serine proteinase, neutrophil,)	1,2	1,3	1,1	2,1	1,6
MMP8	Matrix metallopeptidase 8 (neutrophil collagenase)	3,3	3,0	3,4	2,5	3,1
CTSG	Cathepsin G	1,4	1,6	1,8	1,8	1,7
LTF	Lactotransferrin	1,1	-1,4	1,2	1,8	1,5
DEFA4	Defensin, alpha 4, corticostatin	1,1	1,2	1,3	1,3	1,4
AZU1	Azurocidin 1 (cationic antimicrobial protein 37)	-1,1	1,0	-1,2	1,7	1,2
MPO	Myeloperoxidase	1,3	1,0	1,5	1,4	1,6
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1,3	1,3	2,3	1,2	1,4
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	1,4	1,6	2,4	-1,0	1,3
PI3	Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	-1,6	-1,9	-2,0	-1,3	-2,0
CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide	1,5	1,2	2,4	1,4	1,5
PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	1,9	2,2	2,5	1,5	1,9

Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 21: Gene von Neutrophilen Granulozyten: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

[203] Vgl. Tejera et al. 2014, 2014, 2014.
[204] Vgl. Yamamori et al. 2004.

3.5.2.5. Verminderte Antigenpräsentation

Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort ist die Antigenpräsentation. Die Beta-Kette des HLA-II (**HLA-DPB1**) wird an den Tagen 1 und 3 vermindert exprimiert. Studien haben gezeigt, dass eine Herunterregulation des HLA-II Komplexes bei Sepsis mit der Organschädigung korreliert ([205]).

Weitere Gene, die auf Seiten der Antigenpräsentierenden Zellen involviert sind, werden nicht signifikant reguliert. **HLA-DMA** ist ein Hilfsmolekül für die „Beladung" des HLA-II-Komplexes mit Antigenen und in septischen Patienten mit einer FDR von 0,18 am Tag 1 herunterreguliert. Ebenso zeigt die Herunterregulation von Cathepsin S (**CTSS**) eine verminderte Antigenprozessierung. Die Protease ist spezifisch für die Degradation von Antigenen und am Tag 1 mit einer FDR von 0,17 herunterreguliert.

Insgesamt zeigen signifikante und nicht signifikante Gene eine verminderte Aktivierung der Antigenpräsentation in septischen Patienten am Anfang des Zeitverlaufs.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	-1,2	-2,6	-2,1	-1,7	-1,6
CTSS	Cathepsin S	-1,1	-1,6	-1,1	-1,6	1,2
HLA-DMA	Major histocompatibility complex, class II, DM beta	-1,3	-1,9	-1,6	-1,4	-1,3

Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 22: Gene, beteiligt an der Antigenpräsentation: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.3. Adaptive Immunabwehr

Während für die Angeborene Immunantwort im Allgemeinen eine verstärkte Aktivierung im Rahmen einer Sepsis beschrieben wird, gibt es mehrere Hinweise auf eine gestörte und verminderte Aktivität der adaptiven Immunität bei septischen Patienten. Im Folgenden werden die aus der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse diesbezüglich aufgeführt.

3.5.3.1. dChip-Cluster-Analyse der adaptiven Immunantwort

Für einen ersten Eindruck der Reaktion der adaptiven Immunantwort erfolgte die Erstellung eines dChip-Clusters (siehe Abbildung 34).

[205] Vgl. Lukaszewicz et al. 2009.

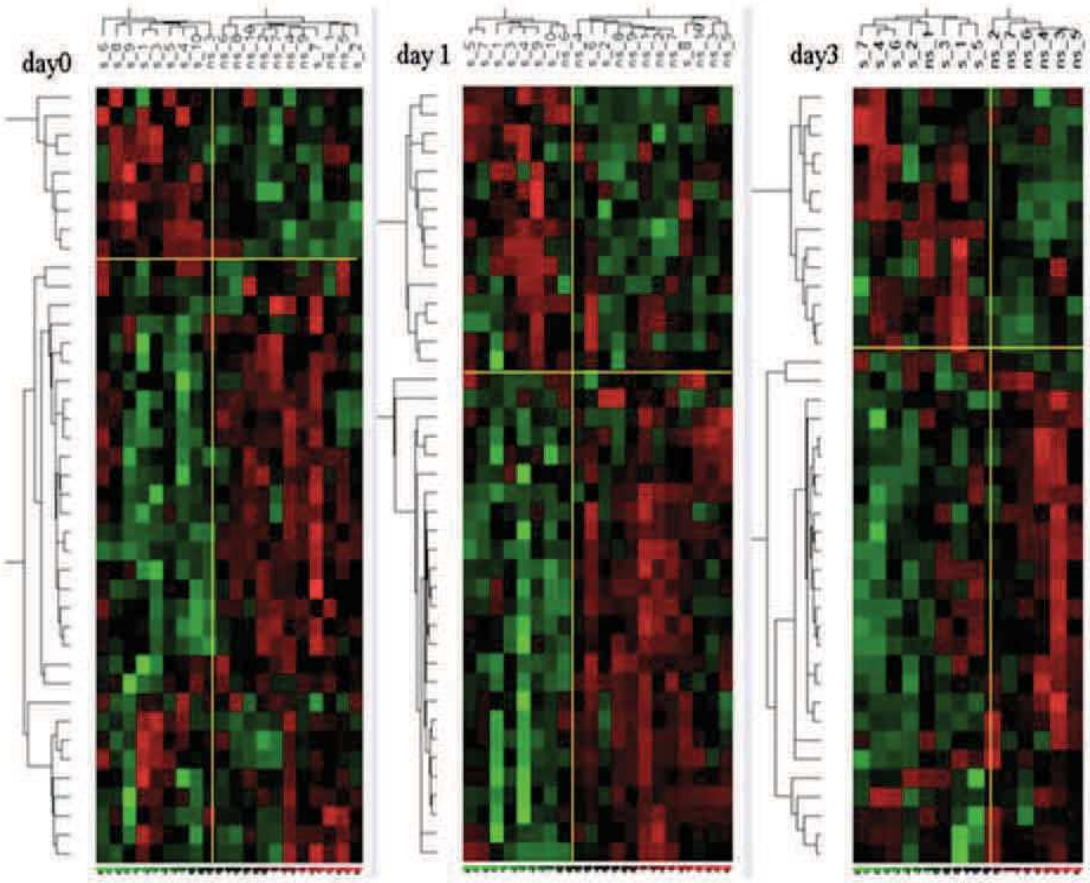

Abbildung 34: dChip-Cluster der Adaptiven Immunantwort: Für dieses Cluster wurden ausschließlich die in die adaptive Immunität involvierten Gene verwendet. An den ersten drei Tagen ergibt es eine gute Einordnung septischer und nicht-septischer Patienten in die jeweilige Gruppe.

Die Einordnung der Patienten per dChip-Cluster erfolgte anhand der in die adaptive Immunantwort involvierten Gene. Die Gruppierung wurde erfolgreich durchgeführt und bis auf einzelne Ausreißer entsprach sie dem klinischen Phänotyp. Somit wird schon bei der geringen Genanzahl (41) ein großer Unterschied in den beiden Gruppen deutlich und es zeigt sich, dass dieser relativ homogen über die Patienten verteilt besteht. Eine Auflistung der verwendeten Gene findet sich in Anhang B.

3.5.3.2. Verminderte Aktivierung der Zytokine und ihrer Rezeptoren der adaptiven Immunität

Wie bereits im Abschnitt „Zytokine der angeborenen Immunität“ erwähnt, bildet das Modul *Cytokine Production* bei DAVID eine der wichtigsten Gruppen.
Die Prozessierung von **CCL5** wurde bereits im Abschnitt Chemotaxis beschrieben. Die Genexpression zeigt eine verminderte Funktion des Chemokins. Neben der chemotaktischen Wirkung führt CCL5 außerdem zu einer Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen. Es hat sich gezeigt, dass in septischen Patienten die Serumlevel von CCL5

negativ mit dem Apache II Score reguliert sind, niedrige Level somit mit einem schlechten Ergebnis korrelieren ([206]).

Osteopontin (**SPP1**) ist ein essentielles Zytokin in der Initiierung einer Th1 Antwort. Sezerniert von aktivierten T-Zellen, führt es zur Ausschüttung von Interferon-gamma und Interleukin 12, unterdrückt die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Produktion von Immunglobulinen durch B-Zellen. In septischen Patienten ist es am Tag 0 und 1 signifikant herunterreguliert.

Der Rezeptor für Interleukin 21 (**IL21R**) ist in septischen Patienten am Tag 3 signifikant und am Tag 0 mit einer FDR von 0,053 herunterreguliert. Interleukin 21 ist ein wichtiges Signal für die Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen sowie Natürlicher Killerzellen. Der Rezeptor für den Colony stimulating factor 1 (**CSF1R**) ist am Tag 1 signifikant herunterreguliert. Er ist für die Funktionen von CSF-1 in Makrophagen zuständig und vermittelt eine proinflammatorische Zytokinproduktion und erhöhte HLA-DR Expression.

Am Ende des Zeitverlaufs am Tag 9 ist der Rezeptor für Interleukin 12 (**IL12R**) hochreguliert. Interleukin 12 wirkt ebenfalls an T-Zellen und Natürlichen Killerzellen und führt zur Differenzierung sowohl von Th1 als auch Th2 Zellen über eine Induktion von IFN-γ.

Interleukin 10 (**IL10**) spielt nicht nur in der Suppression der angeborenen Immunität eine Rolle, sondern reguliert auch die Produktion von TH1-Zytokinen, vermindert die MHC-II Expression und die reduziert die Aktivierung von T-Zellen. Somit führt die gesteigerte Expression in septischen Patienten am Tag 0 gleich zu Beginn zu einer starken Gegenregulation der adaptiven Immunreaktion.

Die Betrachtung nicht signifikant regulierter Interleukinrezeptoren unterstützt die Beobachtungen. Die Herunterregulierung des Rezeptors für IL15 (**IL15RA**) (FDR 0,24 und 0,14) spricht für eine verminderte Aktivierung des adaptiven Immunsystems bereits in den ersten 24 Stunden nach Trauma.

Interleukin 2 ist das bekannteste Zytokin in der Aktivierung von Lymphozyten. In septischen Patienten ist die α-Kette des Interleukin 2 Rezeptors (**IL2RA**) am Tag 3 mit einer FDR von 0,27 herunterreguliert. Auch die verminderte Expression von **NK4** am Tag 1 mit einer FDR von 0,09 weist in die gleiche Richtung, da es vor allem von aktivierten T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen produziert wird und diese sowie auch Makrophagen stimuliert.

TGF-beta ist ein multifunktionelles Molekül, das u. a. zur Proliferation regulatorischer T-Zellen (Tregs) führt und die T-Zell-Funktion hemmt ([207]). Der TGF-beta Rezeptor

[206] Vgl. Cavaillon et al. 2003.
[207] Vgl. Rubtsov und Rudensky 2007.

(**TGFBR2**) ist am Tag 1 mit einer FDR von 0,09 heraufreguliert und weist so auf eine verstärkte Hemmung hin.

Insgesamt zeigt die Genexpression der in das adaptive Immunsystem involvierten Interleukine eine verminderte Aktivierung und eine verstärkte Suppression der adaptiven Immunfunktion. Diese wird besonders am Anfang des Zeitverlaufs deutlich, während sich eine Umkehr gegen Ende durch die Hochregulation des IL12 Rezeptors andeutet.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CCL5	chemokine (c-c motif) ligand 5	-1,1	-1,2	-2,1	-1,5	-1,5
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor	-1,0	-2,0	-1,1	-1,4	-1,4
IL10	Interleukin 10	1,9	1,6	1,8	1,6	1,3
IL12RB1	Interleukin 12 receptor, beta 1	1,1	-1,1	1,1	2,2	2,1
IL15RA	Interleukin 15 receptor, alpha	-1,6	-1,9	-1,6	1,1	-1,4
IL21R	Interleukin 21 receptor	-1,8	-1,6	-2,3	1,1	-1,3
IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha	-1,4	-1,5	-1,8	-1,1	1,1
NK4	Interleukin 32	-1,6	-1,9	-1,9	1,3	-1,0
SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	-2,4	-1,9	-1,6	-1,2	-1,2
TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80 KDA)	1,5	1,5	1,8	1,0	1,0

Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 23: Zytokine der adaptiven Immunität: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.3.3. Verminderte T-Zell-Rezeptor-Funktion

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein Komplex, bestehend aus verschiedenen Proteinen. **CD4** ist ein Korezeptor und ist notwendig für die effiziente Signalweitergabe und für die korrekte Bindung an die MHC-II Moleküle. CD4 ist in septischen Patienten am Tag 1 signifikant herunterreguliert. Drei Moleküle aus dem eigentlichen TCR-Rezeptorkomplex werden in septischen Patienten vermindert exprimiert. **CD3E**, **CD3G** und **CD3D** sind alle an den Tagen 1 und 3 mehr oder weniger stark herunterreguliert. Ebenso ist **CD247** (oder CD3Z) am Tag 3 mit einer FDR von 0,27 vermindert reguliert, das den Rezeptorkomplex mit mehreren intrazellulären Signalwegen verknüpft.

Für eine suffiziente Signaltransduktion nach dem TCR sorgen weitere Proteine. **LIME** (Lck interacting transmembrane adaptor 1) ist über LCK mit CD4 verbunden ([208]). Es ist in septischen Patienten am Tag 3 signifikant und an den Tagen 0 und 1 mit einer FDR von 0,08 bzw. 0,13 herunterreguliert. Das im Abschnitt „Signaltransduktion“ näher beschriebene Gen **WASL** spielt auch eine Rolle in der TCR-Funktion. Es wurde gezeigt,

[208] Vgl. Brdicková et al. 2003.

dass sowohl WASP als auch WASL kritisch für die T-Zell-Entwicklung ist ([209]). **SHP2** (oder PTPN11) ist eine Tyrosin Phosphatase und spielt eine Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen. Eine Deletion von SHP2 in T-Zellen verhindert die Weitergabe von Signalen des TCRs ([210]). In septischen Patienten ist SHP2 über den gesamten Zeitverlauf signifikant herunterreguliert.

FYN ist eine weitverbreitete Tyrosinrezeptorkinase und spielt auch in der TCR-Signaltransduktion eine entscheidende Rolle. FYN ist an den Tagen 0 und 3 mit einer FDR von 0,08 bzw. 0,09 herunterreguliert und spricht so für eine verminderte Aktivierung des Rezeptorkomplexes.

PTPRCAP erleichtert die Bindung von CD45 an den TCR, die für dessen suffiziente Aktivierung notwendig ist. Im Mausmodell wurde ein Zusammenbruch der Lymphozytenfunktion bei Knock-out von **PTPRCAP** festgestellt ([211]). In septischen Patienten sind gleich zwei Gene für PTPRCAP reguliert. Das erste ist am Tag 5 mit einer FDR von 0,13 und das zweite an Tag 1 und 9 mit einer FDR von 0,15 und 0,17 herunterreguliert. Insgesamt zeigen signifikante und nicht signifikante Gene eine eingeschränkte TCR-Funktion in septischen Patienten vor allem am Tag 1.

Gen-symbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	-1,4	-1,5	-1,4	1,2	1,4
CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)	-1,3	-1,5	-1,7	1,3	-1,2
CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)	-1,4	-1,4	-1,5	-1,2	-1,4
CD3Z	CD247 molecule	-1,5	-1,6	-1,8	-1,1	-1,2
CD4	CD4 molecule	-1,1	-2,0	-1,4	1,0	1,0
FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	-1,9	-1,6	-2,2	-1,4	-1,3
LIME	Lck interacting transmembrane adaptor 1	-1,8	-1,8	-3,4	-1,2	-1,2
ptpn11	shp-2	-1,8	-2,5	-2,7	-4,3	-2,3
PTPRCAP	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein	-1,0	-1,7	-1,6	-1,5	-1,8
PTPRCAP	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein	-1,4	-1,5	-2,0	1,1	-1,0
WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	-1,9	-2,3	-2,3	-1,1	-1,7
PTPN12	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	1,7	1,5	2,1	-1,0	1,1

Signifikanz	FDR <0,05	FDR 0,05 – 0,3	FDR > 0,3

Tabelle 24: Gene, beteiligt an der T-Zell-Rezeptor-Funktion: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

[209] Vgl. Humblet-Baron et al. 2007.
[210] Vgl. Nguyen et al. 2006.
[211] Vgl. Leitenberg et al. 2007.

3.5.3.4. Eingeschränkte Kostimulation und verstärkte Koinhibition von T-Zellen

Für eine suffiziente Aktivierung von T-Zellen muss neben einer Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein MHC-II Molekül auch eine ausreichende Kostimulation über Korezeptoren stattfinden. Zwei dieser Korezeptoren sind in septischen Patienten signifikant reguliert. **CD40** ist an den Tagen 1 und 3 signifikant herunterreguliert. **ICOSLG** wird ebenfalls von APCs exprimiert und führt zu einer Kostimulation von T-Zellen über die Bindung an ICOS. Es ist am Tag 1 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,12 herunterreguliert.

Neben diesen beiden signifikanten Genen zeigt auch die Expression von **CD86** eine verminderte Kostimulation. Der Rezeptor bindet an CD28 auf T-Zellen und ist in septischen Patienten am Tag 1 mit einer FDR von 0,19 herunterreguliert. Ebenfalls nicht signifikant reguliert wird **SIRPG**. Im Gegensatz zu CD40, ICOSLG und CD86 befindet es sich jedoch auf den T-Zellen und wird an den ersten drei Zeitpunkten mit einer FDR von 0,17, 0,11 und 0,07 vermindert exprimiert. Es führt durch die Bindung an **CD47** zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. CD47 ist am Tag 3 mit einer FDR von 0,28 hochreguliert. Es wurde festgestellt, dass es in Patienten mit Trauma zur Entwicklung einer Anergie in T-Zellen beiträgt ([212]). Ebenfalls inhibierend wirkt das an den Tagen 0 und 1 signifikant und an Tag 3 mit einer FDR von 0,06 hochregulierte **VSIG4**. Exprimiert auf Makrophagen bindet es an einen noch nicht identifizierten Rezeptor oder an den Komplementrezeptor **CR1** auf T-Zellen und vermittelt so ein inhibitorisches Signal. CR1 wird ebenfalls signifikant hochreguliert und führt, wie ebenfalls im Abschnitt „Komplementsystem“ angedeutet, zu einer Suppression der T-Zell-Antwort.

CD274 ist in septischen Patienten am Tag 1 signifikant hochreguliert und wird von T- und B-Zellen sowie Makrophagen exprimiert. Stimuliert wird die Expression durch übermäßige Aktivierung und Erschöpfung der T-Zellen. Es bindet an **PD-1** (Programmed Cell death 1) und sorgt für eine Inhibition der T-Zell-Funktion. Das nicht signifikant exprimierte Gen **CEACAM1** wird wie CD274 nach Stimulation der T-Zellen hochreguliert. Wie dieses induziert es eine Inhibierung der T-Zell Zytokinproduktion, der Proliferation und der zytotoxischen Aktivität. Es wird verstärkt exprimiert und überschreitet am Tag 1 mit einer FDR von 0,054 nur knapp die Signifikanzgrenze.

Die Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die starke Herunterregulation der T-Zell-Immunität die Folge einer vorangegangenen exzessiven oder auch unausgeglichenen Aktivierung ist.

[212] Vgl. Bandyopadhyay et al. 2007.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	-1,6	-2,3	-2,4	-1,4	-1,7
CR1	Complement component (3b/4b) receptor 1	1,6	2,0	2,1	-1,0	1,3
VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	2,1	2,0	2,2	-1,1	-1,1
SIRPG	Signal-regulatory protein gamma	-1,7	-1,8	-2,1	-1,0	-1,3
ICOSLG	INDUCIBLE T-CELL CO-STIMULATOR LIGAND	-1,3	-2,3	-1,9	1,2	1,1
CD86	CD86 molecule	-1,1	-1,6	1,0	-1,1	1,3
PDCD1LG1	CD274 molecule	1,4	2,0	1,2	-1,7	-1,4
CD47	CD47 molecule	1,4	1,5	1,9	-1,4	-1,2
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	1,6	1,9	1,7	1,4	1,6

Signifikanz	FDR <0,05	FDR 0,05 – 0,3	FDR > 0,3

Tabelle 25: Gene, beteiligt an T-Zell-Kostimulation und -Koinhibition: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.3.5. Weitere Signalwege zeigen eine Suppression der T-Zell Funktion

Neben den bereits beschriebenen Mechanismen zur Aktivierung und Regulation der T-Zell-Funktion tragen noch weitere Proteine und Signaltransduktionswege zur Kontrolle der T-Zell-Funktion, Proliferation und Differenzierung bei. **EGR3** ist ein Transkriptionsregulator, der, aktiviert durch den TCR, ein negatives regulatorisches Programm induziert. Er ist in septischen Patienten am Tag 1 signifikant heraufreguliert, was zu einer Hemmung der Lymphozytenfunktion führt.

NEDD4 ist eine E3 Ubiquitinligase und in septischen Patienten über den gesamten Zeitverlauf hochreguliert. Die Ligasen ubiquinieren Moleküle des TCR-Signaltransduktionsweges und führen so zu ihrer lysosomalen Destruktion und einem Abbruch der TCR-Signalweitergabe. Sie sind bekannt für ihre Rolle in der Induktion einer T-Zell-Anergie ([213]). Neben NEDD4 zählt auch **ITCH** zu den E3 Ubiquitinligasen. Es ist in septischen Patienten am Tag 1 mit einer FDR von 0,17 hochreguliert. Somit spricht die Genexpression von NEDD4 und ITCH für eine Inhibierung der Signalweitergabe und eine Induktion der T-Zell-Anergie über den gesamten Zeitverlauf.

NFAT Proteine sind Schlüsselenzyme in der Funktion und in der Entwicklung von T-Zellen. In septischen Patienten ist **NFAT4** an Tag 5 signifikant herunterreguliert, doch auch an den Tagen 1, 5 und 9 wird die Signifikanzgrenze mit einer FDR von 0,07, 0,09 und 0,09 nur knapp überschritten. Für den Mangel von NFAT4 in T-Zellen wurde ein Anstieg der Th2-Anwort und eine gestörte Entwicklung von T-Zellen beschrieben ([214]).

[213] Vgl. Mueller 2004.
[214] Vgl. Macian 2005.

Ebenfalls ist die Expression von **NFAT5** vermindert. Auch für dieses Gen ist bekannt, dass sein Mangel zu einer eingeschränkten T-Zell-Funktion führt ([215]). **TOB1** ist ein antiproliferatives Protein, das die Proliferation der T-Zellen und deren Transkription von Zytokinen, wie z. B. Interleukin 2, und Zyklinen inhibiert. In septischen Patienten ist TOB1 am Tag 0 und 3 signifikant und am Tag 1 mit einer FDR von 0,056 hochreguliert. Die Expression spricht für eine Unterdrückung der T-Zell Funktion und Proliferation am Anfang bis zur Mitte des Zeitverlaufes.

GADD45alpha ist ein negativer Regulator der durch Aktivierung induzierten T-Zell Proliferation. Er hemmt die durch den TCR induzierte Signaltransduktion über LCK und p38, die zu einer Proliferation führt ([216]). Er ist an den ersten drei Zeitpunkten mit einer FDR von 0,11, 0,054 und 0,14 heraufreguliert.

KLF2 (oder LKLF) ist ein multifunktionelles Protein. In T-Zellen hemmt es die Aktivierung und die Progression des Zellzyklus durch die Inhibierung des Protooncogens MYC. Es ist am Tag 0 und 3 mit einer FDR von 0,18 bzw. 0,16 hochreguliert. **GILZ** (oder TSC22D3) ist ein Transkriptionsregulator und wird durch Glukokortikoide und Interleukin 10 stimuliert. Es scheint eine Schlüsselrolle in deren antiinflammatorischen und immunsuppressiven Funktionen inne zu haben und hemmt NF-κB und AP-1. Es wurde gezeigt, dass eine Hochregulation mit einer vermehrten Produktion von Th2 Zytokinen einhergeht ([217]). In septischen Patienten ist es am Tag 0 und 3 mit jeweils einer FDR von 0,24 hochreguliert.

Ebenfalls zur Familie der TSC22-Proteine gehört **TSC22D1**. Es wird an Tag 3 mit einer FDR von 0,27 hochreguliert. Der Transkriptionsfaktor wird von TGF-beta induziert und führt zum Einhalt des Zellzyklus. **TCL1A** ist spezifisch für T-Lymphozyten. Über eine Aktivierung von AKT wirkt es anti-apoptotisch. Es ist signifikant an den Tagen 1, 3 und 9 herunterreguliert. Zusammen mit der ebenfalls verminderten Expression von **AKT3** deutet es auf einen gehäuften Zelltod durch Apoptose in T-Zellen hin. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine gesteigerte Apoptoserate in Lymphozyten zur Immundysfunktion bei Sepsis beiträgt ([218]).

Insgesamt zeigt sich, dass die T-Zell-Funktion eingeschränkt ist und verstärkt gehemmt wird. Diese Hemmung scheint reaktiv auf eine vorangegangene übermäßige oder insuffiziente Aktivierung zu erfolgen. Im Zeitverlauf wird dies vor allem an den Tagen 1 und 3 deutlich.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
EGR3	Early growth response 3	1,8	2,0	1,4	1,8	1,4

[215] Vgl. Macian 2005.
[216] Vgl. Schmitz 2013.
[217] Vgl. Cannarile et al. 2006.
[218] Vgl. Hotchkiss et al. 2005.

GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1,9	1,9	2,0	1,2	1,3
KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung)	1,7	1,5	2,0	1,3	1,1
GILZ	TSC22 domain family, member 3	1,5	1,4	1,7	-1,6	-1,3
ITCH	Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)	1,2	1,7	1,5	1,2	1,3
NEDD4	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	2,4	2,4	3,0	2,9	3,7
TOB1	Transducer of ERBB2, 1	1,9	1,9	2,8	1,4	1,4
NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	-1,5	1,1	-1,5	-1,8	-1,3
NFATC3	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	-1,1	-1,6	-1,9	-2,6	-1,8
TGFB1I4	TSC22 domain family, member 1	1,2	1,5	1,7	-1,3	-1,3
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A	-1,7	-2,1	-2,8	-1,7	-2,1
AKT3	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	-1,6	-1,7	-1,8	-2,1	-2,1
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 26: Gene, beteiligt an weiterer T-Zell-Aktivierung und -Inhibition: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.3.6. Hypoxie als Ursache einer T-Zelldysfunktion

In septischen Patienten ist HIF1α (**HIF1A**) am Tag 3 signifikant hochreguliert und überschreitet an den Tagen 0 und 1 die Signifikanzgrenze mit einer FDR von 0,06 bzw. 0,051 nur knapp. Die beta-Untereinheit von HIF (**ARNT**) ist am Tag 1 mit einer FDR von 0,26 hochreguliert. Zusammen sprechen beide Gene für eine Hypoxie in septischen Patienten gegen Anfang und Mitte des Zeitverlaufs. Es ist bekannt, dass HIF über verschiedene Mechanismen die T-Zell-Funktion hemmt und gleichzeitig die antibakterielle Aktivität reduziert und so zur Suppression der Adaptiven Immunität beitragen kann ([219]).

[219] Vgl. Thiel et al. 2007.

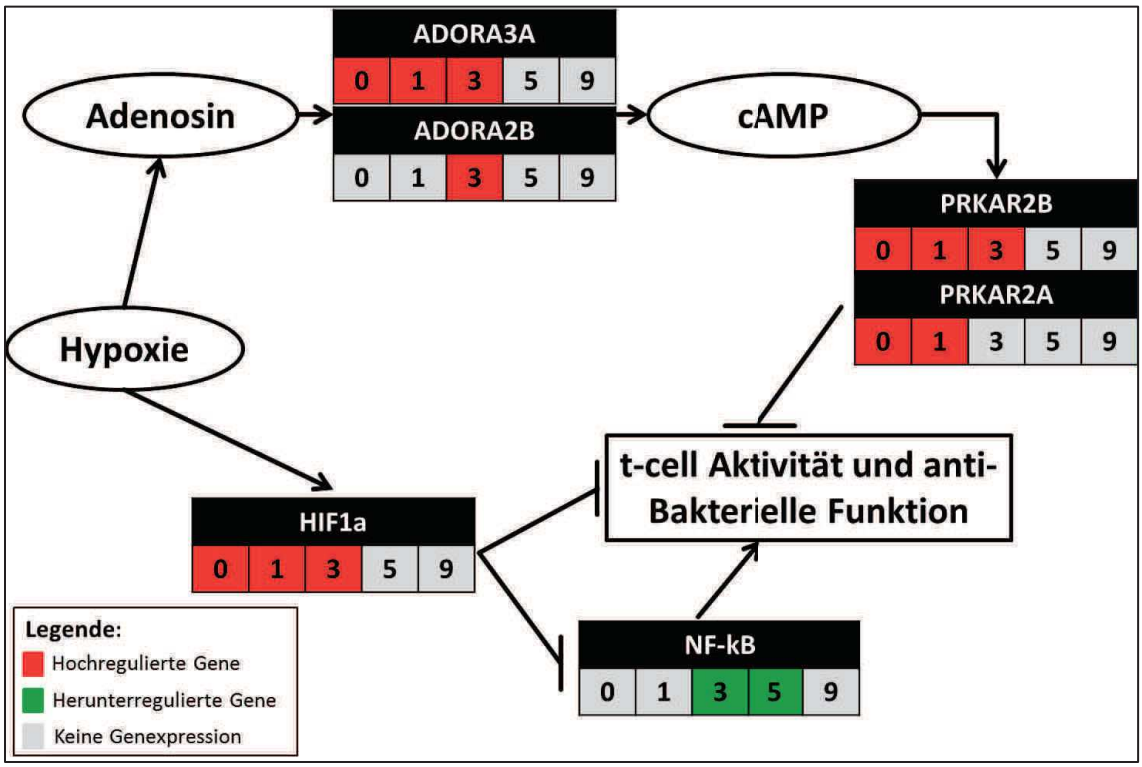

Abbildung 35: Hypoxie und T-Zell-Funktion: Hypoxie beeinflusst die T-Zell-Aktivität sowohl über HIF-1α als auch über die Ausschüttung von Adenosin. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Adenosin wird während einer Gewebshypoxie freigesetzt und vermittelt über die Bindung an Rezeptoren verschiedene Wirkungen. In septischen Patienten ist der Adenosinrezeptor A3 (**ADORA3**) signifikant an den Tagen 0, 1 und 3 hochreguliert. Ebenso ist **ADORA2B** an Tag 3 mit einer FDR von 0,22 hochreguliert, während **ADORA2A** an Tag 1 und 3 mit einer FDR von 0,27 bzw. 0,18 herunterreguliert ist.

Trotz der unterschiedlichen Expression lässt sich auf eine Hemmung der T-Zell-Funktion sowie die Induktion einer Th2-Antwort schließen. Yang et. al zeigten eine HIF-abhängige Induktion von ADORA2B, die zu einem Th2 Phänotyp führt ([220]) und Himer et. al wiesen in T-Zellen eine Protektion vor Apoptose durch ADORA2A nach ([221]).

Darüber hinaus wird die hemmende Wirkung auf die adaptive Immunantwort der ADORAs über die Proteinkinase A (PKA) vermittelt (Abbildung 35). Von dieser sind in septischen Patienten zwei regulatorische Einheiten (**PRKAR2A** und **PRKAR2B**) signifikant exprimiert. Sie wird ausführlich im Abschnitt Signaltransduktion besprochen. Für die **PRKAR2B** Einheit ist speziell bekannt, dass sie den Transkriptionsfaktor CREB hemmt

[220] Vgl. Yang et al. 2010.
[221] Vgl. Himer et al. 2010.

und damit in aktivierten T-Zellen ihre Transkription unterdrückt ([222]) sowie die IL-2-Produktion vermindert ([223]).

Gen-symbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
ADORA2A	Adenosine A2a receptor	-1,6	-1,6	-1,9	-1,1	-1,2
ADORA2B	Adenosine A2b receptor	-1,0	-1,2	1,7	1,2	1,5
ADORA3	Adenosine A3 receptor	3,6	2,9	1,6	-1,2	1,0
ARNT	Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator	1,2	1,7	1,2	1,2	-1,0
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	1,9	1,9	2,8	1,3	1,4
PRKAR2A	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	1,6	1,8	1,1	1,2	1,3
PRKAR2B	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	2,0	2,1	2,3	1,1	1,6

Signifikanz	FDR <0,05	FDR 0,05 – 0,3	FDR > 0,3

Tabelle 27: Hypoxie und T-Zell Dysfunktion: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.3.7. Verminderte Expression von B-Zell-Genen

Viele der Gene, die auf oder in T-Zellen wirken, haben auch Einfluss in B-Zellen. Die supprimierte T-Zell-Aktivierung lässt somit auch auf eine verminderte B-Zell-Funktion schließen. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) besteht aus verschiedenen Molekülen, von denen **CD79B** in septischen Patienten an den Tagen 1 und 3 signifikant herunterreguliert ist. Ebenfalls zum BCR-Komplex gehört **CD81**. Dieses ist nicht signifikant an den Tagen 1 und 3 mit einer FDR von 0,21 bzw. 0,22 herunterreguliert. Somit wird die suffiziente Signalweitergabe durch den BCR bereits am Anfang des Zeitverlaufs unterbunden.

Der Transkriptionsfaktor **FOXP1** kontrolliert die Rekombination der Immunglobulinketten in B-Zellen. Sein „knock-out“ führt zu einer mangelhaften Entwicklung der B-Zell Reihe ([224]). In septischen Patienten sind gleich zwei Gene für FOXP1 reguliert. Das erste ist signifikant am Tag 0 und mit einer FDR von 0,19 am Tag 3 herunterreguliert, während das zweite eine verminderte Expression mit einer FDR von 0,15 am Tag 3 zeigt.

Die Rolle des Transkriptionsfaktors **SPIB** in B-Zellen ist noch unklar. Es scheint jedoch, dass er neben seiner bekannten Funktion in der Entwicklung von Dendritischen Zellen auch für die Signaltransduktion des BCRs notwendig ist ([225]). Es ist in septischen Pati-

[222] Vgl. Elliott et al. 2003.
[223] Vgl. Elliott et al. 2004.
[224] Vgl. Hu et al. 2006.
[225] Vgl. Zhu et al. 2008.

enten an Tag 0 und 3 signifikant und am Tag 1 mit einer FDR von 0,053 herunterreguliert. **VPREB3** wird spezifisch in B-Zellen in allen Stadien der Differenzierung exprimiert und scheint für die Biosynthese des B-Zell-Rezeptors notwendig zu sein. Daher bietet die verminderte Expression an den Tagen 0 und 3 Hinweis auf eine abgeschwächte B-Zell-Funktion.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta	-1,5	-2,2	-2,8	-1,2	-1,5
SPIB	SPIB	-2,0	-1,9	-2,7	1,0	-1,6
VPREB3	Pre-B lymphocyte gene 3	-1,9	-1,6	-2,2	1,0	-1,7
FOXP1	Forkhead box P1	-1,3	-1,1	-1,8	-1,2	-1,4
FOXP1	Forkhead box P1	-2,0	1,1	-1,8	-1,2	-1,7
CD81	CD81 molecule	-1,4	-1,8	-2,0	-1,2	-1,4
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 28: Gene von B-Zellen: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

Insgesamt bestätigt die Genexpression der B-Zell-spezifischen Gene die erwartete verminderte Aktivität der B-Zellen. Insbesondere bis zum Tag 3 zeigt sich eine signifikant schwächere B-Zell-Aktivierung. Abbildung 36 zeigt einen Überblick über die Mechanismen der Adaptiven Immunität und deren Regulation.

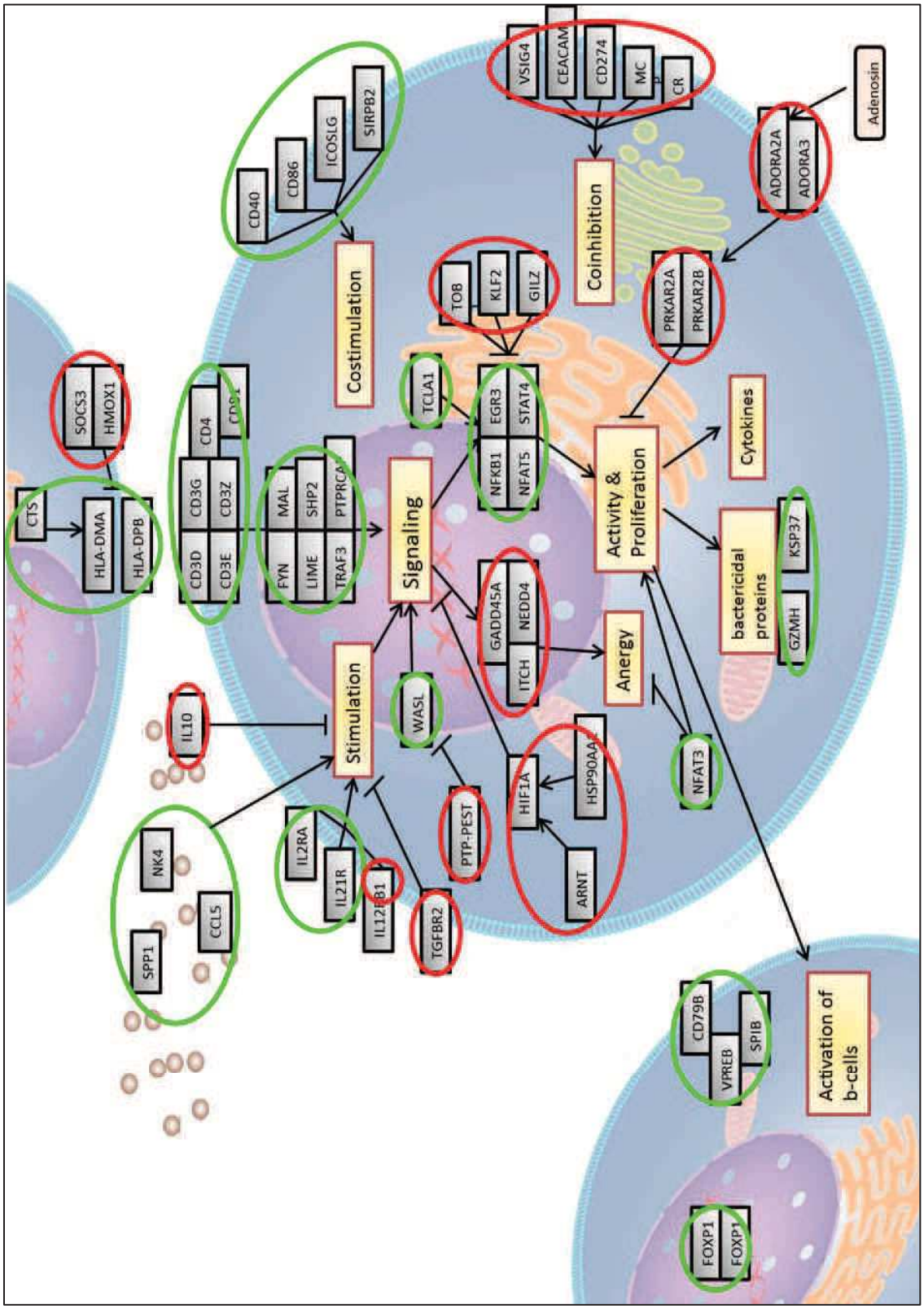

Abbildung 36: Überblick Adaptive Immunantwort, ([226]): Dargestellt ist eine antigenpräsentierende Zelle (oben), eine T-Zelle (Mitte) sowie eine B-Zelle (unten links) mit zugehörigen Genen in biologischen Zusammenhängen. Die Regulation der Gene wird anhand farbiger Markierungen gezeigt, wobei die einzelnen Zeitpunkte nicht abgegrenz

[226] Bildhintergrund aus Macian 2005.

werden. Eine grüne Markierung zeigt eine verminderte und eine rote Markierung eine verstärkte Expression der Gene auf.

3.5.3.8. Apoptotische Lymphozytendepletion

Neben den zellulären Mechanismen einer Immunsuppression kommt es im Lauf einer Sepsis zur apoptotischen Depletion von Lymphozyten in Blut und Milz. Der Wegfall großer Mengen Immuneffektorzellen trägt maßgeblich zur verringerten Abwehrkapazität im Verlauf einer Sepsis bei ([227]).

DAVID ordnet dem Modul *Zellzyklus* den sechsthöchsten Enrichment Score zu. Somit gehört die Gruppe der Zellzyklusgene zu den am stärksten differentiell regulierten Genen. Das Modul enthält sowohl Gene, die zur Zellteilung und Proliferation führen, als auch Gene, die den Zellzyklus unterbrechen und zum programmierten Zelltod führen.

Es zeigt sich eine gesteigerte Aktivierung der Caspasekaskade. Bei Untersuchungen der Apoptoserate in Zellen wird oft die Aktivität der Caspase 3 gemessen, da diese gut mit der Apoptoseaktivität korreliert. In septischen Patienten ist **CASP3** am Tag 9 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,051 hochreguliert. Die Genexpression von CASP3 lässt auf eine gesteigerte Apoptoserate in Leukozyten vor allem gegen Ende des Zeitverlaufs schließen. Eine weitere signifikant regulierte Caspase ist **CASP8**. Sie wird extrinsisch über verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktiviert. In septischen Patienten ist sie an den Tagen 0 und 1 signifikant sowie am Tag 3 mit einer FDR von 0,052 heraufreguliert.

Ebenso hochreguliert, jedoch nicht signifikant, ist die Caspase 5 (**CASP5**). Sie hat ähnliche Funktionen wie Caspase 8 und wird von LPS induziert. Sie ist mit einer FDR von 0,16 am Tag 1 hochreguliert.

Somit lässt die Genexpression der Caspasen auf eine über den gesamten Zeitverlauf gesteigerte Apoptoserate schließen.

Es zeigen sich gesteigerte Mechanismen der Apoptoseinduktion. Ein Protein der BCL-2-Familie ist **BNIP2**. Im Gegensatz zu BCL-2 wirkt BNIP2 jedoch proapoptotisch. BNIP2 bindet an BCL-2-Moleküle und scheint so deren anti-apoptotische Wirkung zu unterdrücken ([228]). BNIP2 ist in septischen Patienten am Tag 3 signifikant und am Tag 1 mit einer FDR von 0,06 hochreguliert. Durch eine vermehrte Unterdrückung der Hemmung resultiert so indirekt eine gesteigerte Apoptose gegen Mitte des Zeitverlaufs.

ANXA1 ist bekannt für seine abschwächende Wirkung auf die Immunfunktion. Es wurde gezeigt, dass diese unter anderem durch eine Induktion der Apoptose in Leukozy-

[227] Vgl. Hotchkiss et al. 2001.
[228] Vgl. Zhang et al. 2003.

ten hervorgerufen wird ([229]). In septischen Patienten ist es am Tag 9 signifikant und am Tag 0 mit einer FDR von 0,09 hochreguliert.

AXUD1 ist ein intranukleäres Protein und wirkt als Tumor-Suppressor durch die Induktion der Apoptose ([230]). Es ist in septischen Patienten am Tag 1 signifikant hochreguliert. Insgesamt zeigt sich eine Hochregulation verschiedener Apoptose-induzierender Mechanismen über den gesamten Zeitverlauf.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	2,6	2,1	2,5	1,4	1,6
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	1,5	1,3	2,3	1,2	2,1
CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	1,3	1,6	1,3	-1,0	1,0
ANXA1	Annexin A1	2,0	1,5	2,2	1,6	2,7
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	2,0	2,0	2,9	1,7	1,8
AXUD1	AXIN1 up-regulated 1	1,5	2,0	1,4	1,4	1,2

Signifikanz	FDR <0,05	FDR 0,05 – 0,3	FDR > 0,3

Tabelle 29: Gene der Caspasen und in die Induktion der Apoptose involvierte Gene: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

Es zeigen sich aktivierte Hemmmechanismen der Apoptose Die Familie der BCL-2 Proteine stellt dabei einen der bekanntesten Hemmmechanismen dar. BCL2A1 wird in septischen Patienten an den Tagen 0, 1, 3 und 9 verstärkt exprimiert. Es wird von NF-κB induziert und ist in der Lage, sowohl die Aktivierung der Caspasen als auch die Ausschüttung von Cytochrom C zu hemmen. **BIRC5** (oder survivin) ist ein Mitglied der IAP (inhibitor of apoptosis). Es ist in septischen Patienten an den Tagen 0 und 1 signifikant sowie an Tag 3 und 9 mit einer FDR von 0,051 bzw. 0,06 hochreguliert. Somit zeigen BCL2A1 und BIRC5 eine verstärkte Hemmung der Apoptose über den gesamten Zeitverlauf.

Ebenfalls antiapoptotisch wirkt **HIPK3**, das in septischen Patienten an Tag 1 und 2 signifikant sowie an Tag 9 mit einer FDR von 0,06 hochreguliert ist. Es wird durch JNK induziert und hemmt die Apoptose über den Fas-Rezeptor.

Auch verschiedene, in die Blutgerinnung involvierte Gene spielen eine Rolle in der Regulation der Apoptose. Protein C (**PROC**) wirkt als survival factor hemmend auf die Apoptose.

[229] Vgl. Perretti und Solito 2004.
[230] Vgl. Glavic et al.

SERPINB2 (oder PAI-2) ist ein Hemmfaktor der Fibrinolyse, verhindert jedoch auch eine proapoptotische Signaltransduktion. Es ist in septischen Patienten an den Tagen 0 und 1 signifikant herunter- und am Tag 9 hochreguliert. Somit scheint die Apoptose über SERPINB2 am Anfang verstärkt und am Ende gehemmt zu werden.

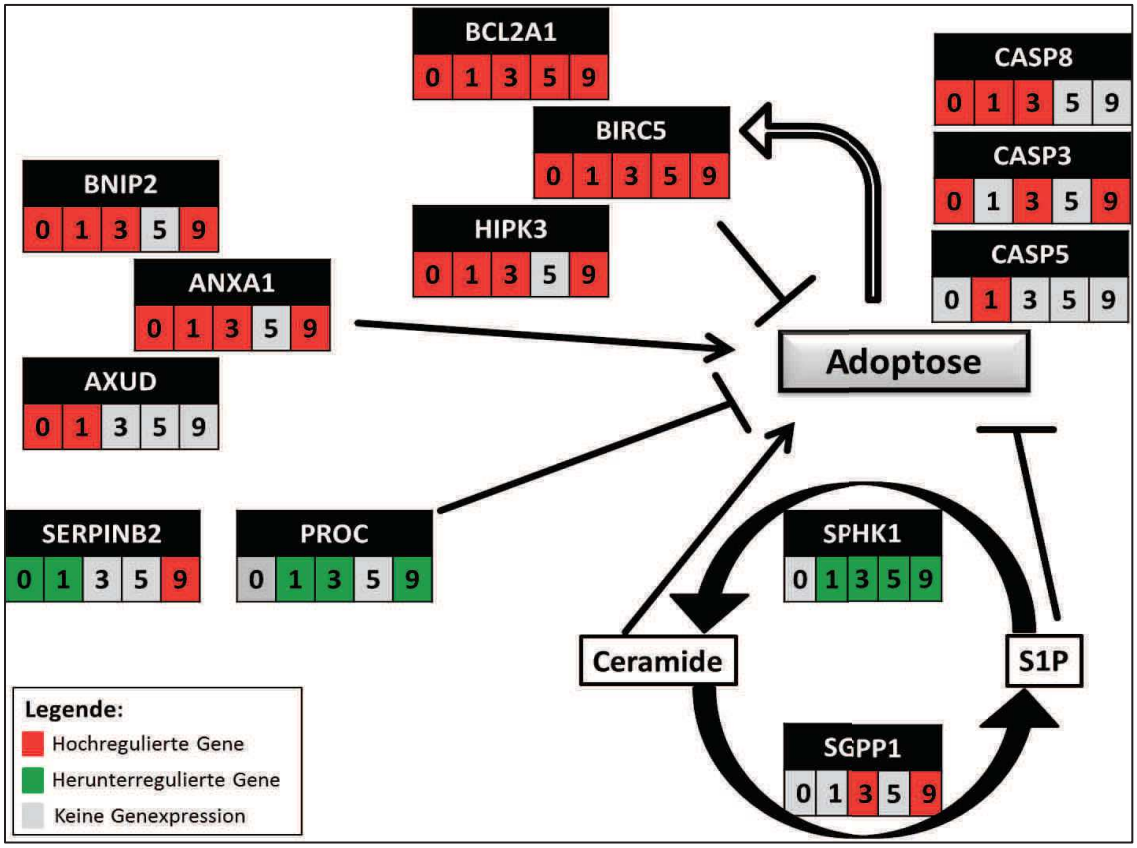

Abbildung 37: Apoptose: Die „Entscheidung", ob es zur Apoptose einer Zelle kommt, wird durch ein hochsensibles Netzwerk reguliert. In septischen Patienten zeigt sich sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein Lipid-Botenstoff, der intrazellulär für Zellüberleben und Proliferation zuständig ist und extrazellulär über seinen Rezeptor EDG1 auf Endothelzellen für Zell-Zell-Adhäsion sorgt. S1P ist in weitere Botenstoffe durch enzymatische Reaktionen umwandelbar. Ceramid und Sphingosin führen jedoch im Gegenteil zu S1P zum Stopp des Zellzyklus und zur Apoptose. **SPHK1** ist eine Kinase und stellt S1P aus Sphingosin und Ceramid durch Phosphorylierung her ([231]). Sie ist an den Tagen 3 und 5 signifikant und am Tag 1 mit einer FDR von 0,08 herunterreguliert.
Die Phosphatase **SGPP1** führt dagegen zum Abbau von S1P, wobei Ceramid entsteht. Sie ist am Tag 3 signifikant heraufreguliert. Somit scheint das Level von S1P in septi-

[231] Vgl. Hait et al. 2006.

schen Patienten niedriger und von Ceramid und Sphingosin höher zu sein als in der Vergleichsgruppe. Folge ist eine gesteigerte Apoptoserate und gleichzeitig eine verminderte Proliferation in der Mitte des Zeitverlaufs (Abbildung 37).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass Moleküle, die reaktiv die Apoptosekaskade hemmen, hochreguliert sind, während Proteine, welche die Induktion der Apoptose unterdrücken, vermindert exprimiert werden. Zusammen mit den aktivierten Caspasen lässt sich so schließen, dass es zu einer starken Aktivierung der Apoptose kommt, die reaktiv eine Ankurbelung von Hemmmechanismen mit sich bringt.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
BCL2A1	BCL2-related protein A1	2,1	1,9	2,6	2,4	5,1
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	2,4	1,9	2,0	2,3	1,6
HIPK3	CDNA clone IMAGE:4799578	1,8	2,0	2,6	1,6	2,1
PROC	Protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa)	-1,4	-1,9	-2,2	-1,4	-1,6
SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	-1,8	-2,8	1,1	1,4	2,0
SGPP1	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	1,3	1,5	2,9	1,3	1,7
SPHK1	Sphingosine kinase 1	-1,2	-1,7	-2,5	-2,9	-1,6
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 30: Gene, involviert in die Hemmung der Apoptose: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.4. Dysregulation plasmatischer Kaskaden

Die drei plasmatischen Kaskaden Komplementsystem, Blutgerinnung und Fibrinolyse sind eng miteinander verknüpft. Im Verlauf einer Sepsis ist die gegenseitige Beeinflussung der Serin-Protease-Kaskaden von besonderer Bedeutung, da ihre unkontrollierte Aktivierung essentiell zur Pathogenese der Sepsis beiträgt ([232]).

3.5.4.1. Verminderte Aktivierung des Komplement Systems

In septischen Patienten sind die Komplementfaktoren **C3** und **C4A** signifikant herunterreguliert. Die verminderte Expression von C3 am Tag 3 spricht dabei für eine verminderte Aktivierung des Alternativen Weges, während C4 sowohl Teil der Endstrecke des klassischen als auch des Lektin-Komplementweges ist. C4A ist an den Tagen 3, 5 und 9 signifikant herunterreguliert.

Der Komplementrezeptor **CR1** wird in septischen Patienten an den Tagen 1 und 3 verstärkt exprimiert. Er hat sowohl eine aktivierende als auch eine hemmende Funktion auf die Immunantwort.

[232] Vgl. Rittirsch et al. 2008.

Ein weiteres in das Komplementsystem involviertes Molekül wird in septischen Patienten vermindert exprimiert. **SERPING1** ist an allen Zeitpunkten signifikant herunterreguliert. Es hemmt den C1-Komplex des alternativen Weges, ist aber auch in andere Prozesse wie Blutgerinnung, Phagozytose und der Bakterientötung durch Neutrophile und Monozyten involviert. Die Gabe von SERPING1 bei Sepsis im Mausmodell verbesserte die Überlebensrate ([233]).

Um einen genaueren Eindruck der Aktivierung des Komplementsystems zu bekommen, werden die biologisch verwandten Gene mit einer höheren FDR betrachtet.

Im alternativen Weg ist zusätzlich zu C3 der Komplementfaktor B (**BF**) reguliert, er wird ebenfalls vermindert exprimiert.

Dreh- und Angelpunkt im Komplementsystem ist die C3-Konvertase, die von allen drei Wegen aktiviert wird. In septischen Patienten sind drei, die Konvertase hemmende Gene nicht signifikant hochreguliert. **MCP** liegt mit einer FDR am Tag 3 von 0,07 nur leicht über der Signifikanzgrenze. Die stärksten Expressionswerte von MCP (CD46), **DAF** (CD55) und dem **Komplementfaktor I** liegen dabei an den Tagen 0 bis 3.

Der Membranangriffskomplex besteht aus vier Komplementfaktoren, von denen **C6** und **C8** reguliert sind. C6 wird am Tag 1 und C8 am Tag 3 mit einer FDR von 0,14 bzw. 0,09 vermindert exprimiert. Somit weist die Genexpression auf eine abgeschwächte direkte Lyse der Pathogene über das Komplementsystem hin.

C3AR1 ist vor allem ein Rezeptor für das chemotaktische und proinflammatorische Anaphylatoxin C3A und stimuliert die Ausschüttung von Granulozytenenzymen und Superoxidanion-Radikalen. Es ist in septischen Patienten am Tag 0 mit einer FDR von 0,12 hochreguliert.

[233] Vgl. Liu et al. 2007.

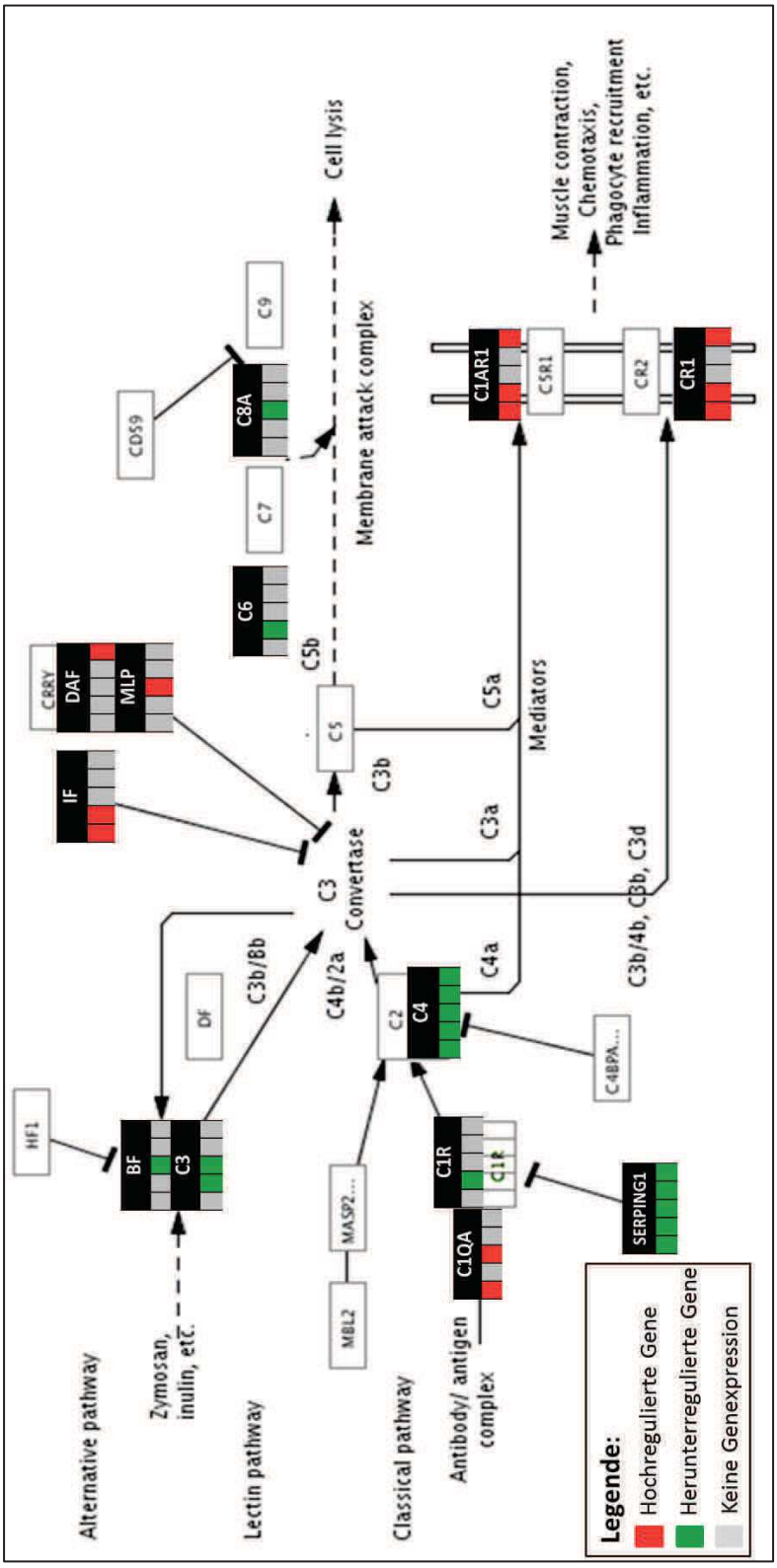

Abbildung 38: Komplement System, modifiziert nach KEGG: Die Signalkaskade des Komplementsystems zeigt neben herunterregulierten Faktoren vor allem aktivierte Hemmmechanismen und Rezeptoren. Dies weist auf eine bereits abgelaufene Aktivierung des Komplementsystems auf Genexpressionsebene hin. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Insgesamt ist die Genexpression der Komplementfaktoren vermindert und der Ablauf wird verstärkt gehemmt. Die erhöhte Expression der Rezeptoren kann auf eine bereits abgelaufene Komplementaktivierung hinweisen.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
C1R	Complement component 1, r subcomponent	-1,3	-2,0	-1,6	-1,6	-1,2
C3	Complement component 3	-1,2	-1,9	-2,0	-1,1	-1,3
C6	Complement component 6	1,0	-1,6	-1,4	1,1	1,4
C4A	Complement component 4A	-1,6	-1,4	-2,3	-5,1	-3,0
BF	Complement factor B	-1,1	-1,4	-1,8	-1,5	-1,3
C8G	Complement component 8, gamma polypeptide	-1,2	-1,3	-1,8	1,3	1,0
C1QB	Complement component 1, q subcomponent, B chain	1,2	1,0	2,1	1,5	-1,1
MCP	CD46 molecule, complement regulatory protein	1,3	1,3	2,1	-1,1	1,4
DAF	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement	1,5	1,6	1,7	1,4	1,6
IF	Complement factor I	1,6	1,8	1,5	1,5	1,0
CR1	Complement component (3b/4b) receptor 1	1,6	2,0	2,1	-1,0	1,3
C3AR1	Complement component 3a receptor 1	1,8	1,1	1,3	1,0	1,4
SERPING1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor)	-2,7	-2,3	-2,5	-2,5	-2,6

Signifikanz	FDR <0,05	FDR 0,05 – 0,3	FDR > 0,3

Tabelle 31: Gene des Komplement Systems: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.4.2. Aktivierte Blutgerinnung in septischen Patienten

Protein C (**PROC**) ist in septischen Patienten am Tag 1 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,054 nur knapp oberhalb der Signifikanzgrenze herunterreguliert. Im Gegensatz dazu wird dessen Kofaktor Protein S (**PROS1**) in septischen Patienten an den ersten drei Zeitpunkten verstärkt exprimiert. Es ist sowohl in die Gerinnung als auch in inflammatorische Prozesse und Zellüberleben involviert. Es zählt zu den Akut-Phase-Proteinen und wird durch Interleukin 6 aktiviert ([234]).

Von den Gerinnungsfaktoren sind keine Gene signifikant reguliert. So verfehlen die Faktoren VIII (**F8**) und XIII (**F13A1**) die Signifikanzgrenze mit einer FDR von 0,051 und 0,08 nur knapp. Faktor VIII wird über die intrinsische Kaskade aktiviert und ist am Tag 1 hochreguliert. Faktor XIII ist für die Stabilisierung der Fibrinklots zuständig und wird am Tag 0 verstärkt exprimiert. Thrombin (Faktor II) wird durch **SERPIND** gehemmt, das in septischen Patienten mit einer FDR von 0,09 am Tag 1 herunterreguliert ist.

[234] Vgl. Rezende et al. 2004.

Insgesamt ergeben sich somit auf Genexpressionsebene Anzeichen für eine Aktivierung der Gerinnungskaskade am Anfang des Zeitverlaufs.

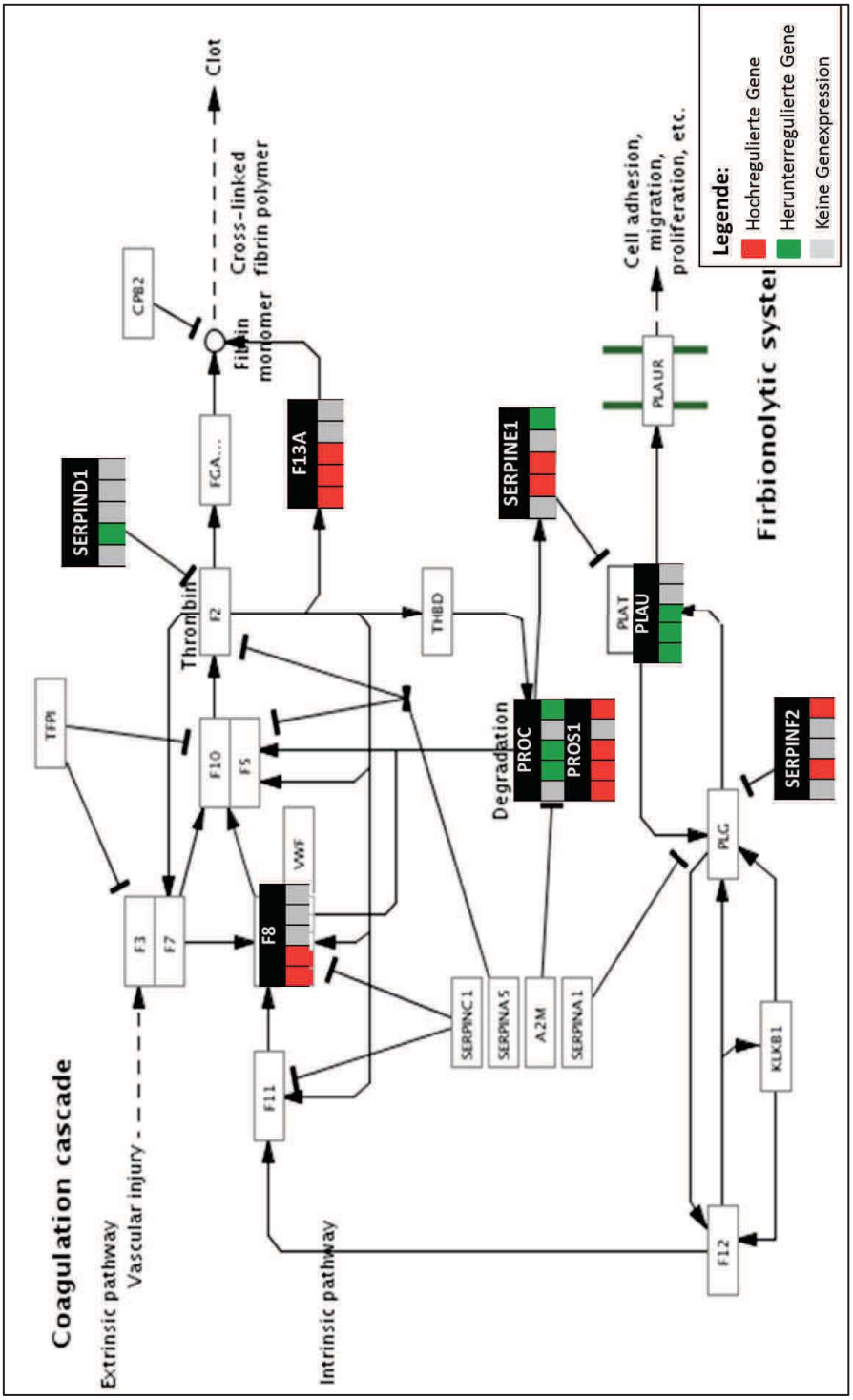

Abbildung 39: Gerinnungskaskade und Fibrinolyse, modifiziert nach KEGG: Die Gerinnungskaskade zeigt einige Hinweise für eine Aktivierung. Im Gegensatz dazu weist die Expression der Fibrinolysegene auf eine verminderte Aktivität der Fibrinspaltung hin. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

3.5.4.3. Verminderte Fibrinolyse in septischen Patienten

Ausgehend vom Protein C - S Komplex wird der Serpin Peptidase Inhibitor E (**SERPINE1**) aktiviert. Es hemmt die Plasminaktivatoren und somit den Startpunkt der Fibrinolyse. Es ist am Tag 1 heraufreguliert. Der Urokinase-Plasminaktivator (**PLAU**) selbst ist in septischen Patienten an den Tagen 0 und 1 stark herunterreguliert. Zu der so verminderten Plasmin-aktivierung kommt des Weiteren eine Hemmung durch **SERPINF1** hinzu (Abbildung 39). Dieses ist am Tag 9 signifikant und am Tag 1 mit einer FDR von 0,13 hochreguliert.

Die Genexpression zeigt eine verminderte Aktivierung und eine verstärkte Hemmung der Fibrinolyse in septischen Patienten, was ein verlängertes Bestehen der Blutgerinnsel zur Folge hat und so zu einer Störung der Mikrozirkulation führen kann.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
F13A1	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	1,8	1,3	1,8	-1,2	-1,0
F8	Coagulation factor VIII, procoagulant component	1,6	1,9	1,8	1,3	1,2
PROC	Protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa)	-1,4	-1,9	-2,2	-1,4	-1,6
PROS1	Protein S (alpha)	3,1	2,5	3,7	1,4	2,1
SERPIND1	Serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), 1	-1,2	-1,8	-1,2	-1,2	-1,2
CYBB	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	1,5	2,1	1,8	-1,4	-1,8
SERPINF2	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin), member 2	1,4	1,8	1,7	1,8	1,8
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	-2,4	-2,7	-1,8	1,2	1,3
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 32: Gene der Gerinnungskaskade und Fibrinolyse: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.4.4. Verstärkte Thrombozytenaggregation

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt durch Ausschüttung aggregationsfördernder Substanzen wie ATP und ADP und von Thromboxan-A2 (TXA2). Der Metabolit der Arachidonsäure wird durch die Thromboxan A Synthetase (**TBXAS1**) gebildet, die in septischen Patienten am Tag 1 signifikant hochreguliert ist.

Der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) führt zu einer weiteren Aktivierung der Thrombozyten. Inaktiviert wird PAF durch die PAF-Azetylhydrolase (**PLA2G7**). Diese wird in septischen Patienten an den Tagen 0 und 1 vermindert exprimiert.

Der membranständige Rezeptor Integrin αIIbβ3 bindet an Fibrinogen mit hoher Affinität und führt zu einer starken Quervernetzung der Thrombozyten. In septischen Patienten ist **ITGB3** durch zwei verschiedene Gene repräsentiert. Beide werden am Tag 1 signifikant vermehrt exprimiert und eines der beiden Gene überschreitet mit einer FDR von 0,06 am Tag 0 nur knapp die Signifikanzgrenze.

CLEC2 gehört zu den Thrombozyten-spezifischen Rezeptoren und eine Stimulation durch exogene Stimuli hat eine Thrombozytenaktivierung und die Formierung von Thromben zur Folge ([235]). In septischen Patienten wird CLEC2 an den Tagen 0 und 1 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,19 verstärkt exprimiert.

Das Pro-Platelet Basic Protein (**PPBP**) wird von Thrombozyten gebildet und bei Aktivierung ausgeschüttet. Es ist ein potentes Chemokin für Neutrophile Granulozyten, führt jedoch auch zur Bildung und Ausschüttung von Plasminogenaktivatoren. In septischen Patienten ist es am Tag 1 signifikant hochreguliert und überschreitet an den Tagen 0 und 3 mit einer FDR von 0,06 bzw. 0,08 nur knapp die Signifikanzgrenze.

PDGFC ist ein Mitglied der Wachstumsfaktorfamilie aus Thrombozyten (Platelet derived growth factors) und ist in septischen Patienten an den Tagen 0, 1 und 3 signifikant hochreguliert. Es hat eine mitogene Wirkung auf mesenchymale Zellen und bindet an die PDGF-Rezeptoren A und B. Seine verstärkte Expression weist auf eine Thrombozytenaktivierung am Anfang des Zeitverlaufs hin.

Insgesamt zeigt die Genexpression eine starke Aktivierung der Blutplättchen am Anfang des Zeitverlaufs bis zum Tag 3. Somit trägt neben der Gerinnungskaskade auch die Aktivierung der Thrombozyten mit zur gesteigerten Blutgerinnung bei.

Darüber hinaus ist bekannt, dass Thrombozyten aktivierend auf Neutrophile Granulozyten wirken. Eine verstärkte Thrombozytenaktivität kann gleichzeitig zu einer gesteigerten Funktion der Neutrophilen führen und hat somit Auswirkungen auf die Immunantwort bei einer Sepsis.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	1,7	2,0	1,5	-1,1	-1,3
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	1,8	2,5	1,9	-1,2	-1,4
PDGFC	Platelet derived growth factor C	2,5	3,3	4,9	1,1	1,2
PLA2G7	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	-2,4	-2,7	-1,5	-1,2	-1,1
PPBP	Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	1,9	1,9	2,1	1,1	1,4
TBXAS1	Thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)	-1,2	2,1	1,5	-1,8	-1,3
CLEC2	C-type lectin domain family 1, member B	1,8	2,1	1,8	-1,4	1,1

[235] Vgl. Suzuki-Inoue et al. 2006.

Signifikanz	FDR <0,05			FDR 0,05 – 0,3			FDR > 0,3	

Tabelle 33: Gene der Thrombozytenaggregation: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.5. Mitochondriale Dysfunktion

Ingenuity führt unter den Top-Canonical pathways die Kategorie *Mitochondriale Dysfunktion* besonders an den Tagen 0, 5 und 9 auf. DAVID ordnet dem Modul *Metabolismus von Stickstoffverbindungen* den fünfthöchsten Enrichment Score zu. Somit gehören die Gene im Zusammenhang mit oxidativem Stress und zytopathischer Hypoxie zu den am auffälligsten regulierten Gengruppen.

3.5.5.1. Herunterregulation mitochondrialer Gene am Anfang des Zeitverlaufs

Um einen ersten Eindruck der Genexpression mitochondrialer Gene zu bekommen, wurden zunächst die signifikanten Gene, denen Source die zelluläre Lokalisation „Mitochondria“ zuordnet, allgemein analysiert. Dazu wurden die Expressionsintensitätsdaten der 21 Gene, getrennt nach septischen und nicht septischen Patienten, addiert und der Verlauf der kumulativen Expression grafisch dargestellt (Abbildung 40).
Es zeigt sich, dass an den Tagen 0 bis 3 die Expression der septischen sichtbar schwächer als die der nicht-septischen Patienten ausfällt. Erst ab Tag 5 kommt es zu einer Erholung mit deutlicher Umkehr an Tag 9. Hier liegt die Expression der septischen Patienten sogar höher als die der nicht-septischen Patienten an Tag 0.

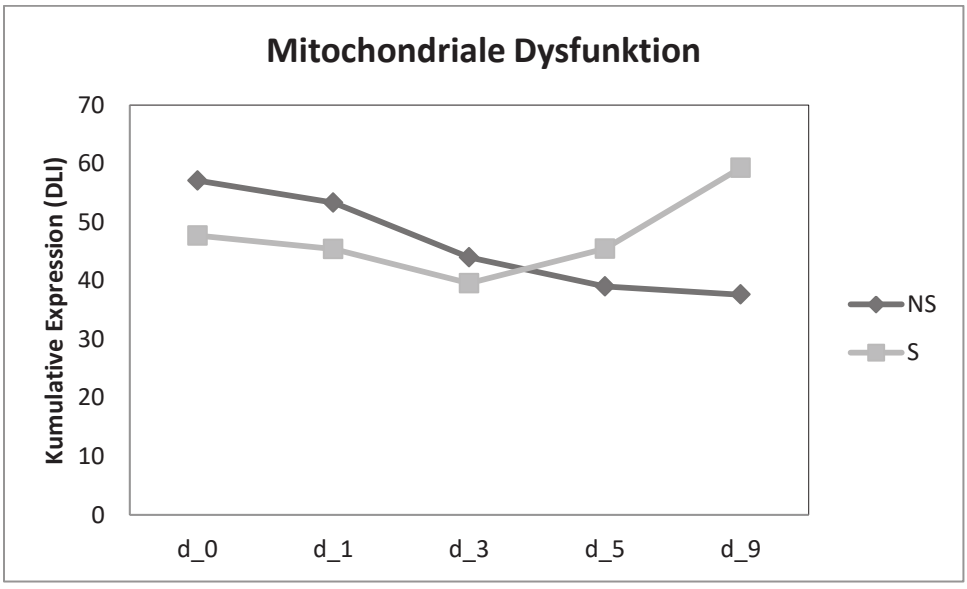

Abbildung 40: Disease load index der Mitochondrialen Gene als Ausdruck der mitochondiralen Dysfunktion: Der Verlauf der kumulativen Expression mitochondrialer Gene zeigt eine zunächst schwächere Aktivierung in septischen Patienten mit einer Umkehr ab Tag 5. (Gene: COX7A2L, GCAT, SARDH, DLD, THY28, PDK2, FARS2, IVD, TIMM13,

ACAA2, TXNRD2, SPAG1, NDUFA5, FASN, NDUFB1, MRPL42, C14orf112, SAH, ACAT1, MRPL13, AMACR)

3.5.5.2. Vermehrter oxidativer Stress in septischen Patienten

Neben der bereits beschriebenen gesteigerten Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen des „oxidative burst“ Neutrophiler Granulozyten bringen auch verschiedene Stoffwechselvorgänge vermehrten oxidativen Stress mit sich.

Die Aldehyd Oxidase (**AOX**) produziert Hydrogenperoxid und katalysiert die Bildung von Hyperoxid oder Superoxid. In septischen Patienten ist die AOX1 am Tag 1 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,21 hochreguliert.

In septischen Patienten scheint der Enzymkomplex der α-Ketoglutarat Dehydrogenase (α-KGDH) aus dem Citratzyklus aktiviert zu sein. Die Dihydrolipoamid Dehydrogenase (**DLD**) und die Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase (**DLST**) sind Bestandteile des Enzyms und in septischen Patienten am Tag 0 bzw. 3 signifikant heraufreguliert. Unter den nicht signifikant regulierten Genen der Ketoglutarat Dehydrogenase befindet sich die Oxoglutaratdehydrogenase (**OGDH**). Diese wird am Tag 0, 1 und 3 mit einer FDR von 0,13 bzw. 0,11 bzw. 0,09 verstärkt exprimiert. Somit zeigt die Expression der drei Gene eine Aktivierung der α-KGDH von Tag 0 bis 3.

Ansonsten finden sich keine Hinweise für eine vermehrte Aktivität des Citratzyklus. Da die α-KGDH für ihre Rolle in der Produktion von ROS bekannt ist ([236]), scheint eine Aktivierung am ehesten auf diese Funktion zurückzuführen zu sein. So führt eine aktivierte alpha-KGDH zur Entstehung von vermehrtem oxidativem Stress.

3.5.5.3. Dysregulierte oxidative Phosphorylierung

Die Komplexe der Atmungskette sind gegensätzlich reguliert. Während verschiedene Gene des zweiten Enzymkomplexes und am Tag 9 auch des ersten hochreguliert sind, ist die Expression der Gene der Cytochrom C Oxidase über den gesamten Zeitverlauf vermindert. Interessanterweise ist gerade für dieses Enzym eine Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis beschrieben ([237]).

Gleichzeitig ist bekannt, dass es im Rahmen einer Sepsis durch die oxidative Phosphorylierung zur exzessiven Entstehung von ROS und RNS kommt und diese die Atmungskette und damit die ATP-Produktion inhibieren ([238]).

[236] Vgl. Tretter und Adam-Vizi 2005.
[237] Vgl. Levy und Deutschman 2007.
[238] Vgl. Brealey et al. 2002.

Insgesamt spiegelt die Genexpression die Erkenntnisse des vermehrten oxidativen Stresses und der gleichzeitigen Beeinträchtigung der Energiegenerierung in septischen Patienten wider.

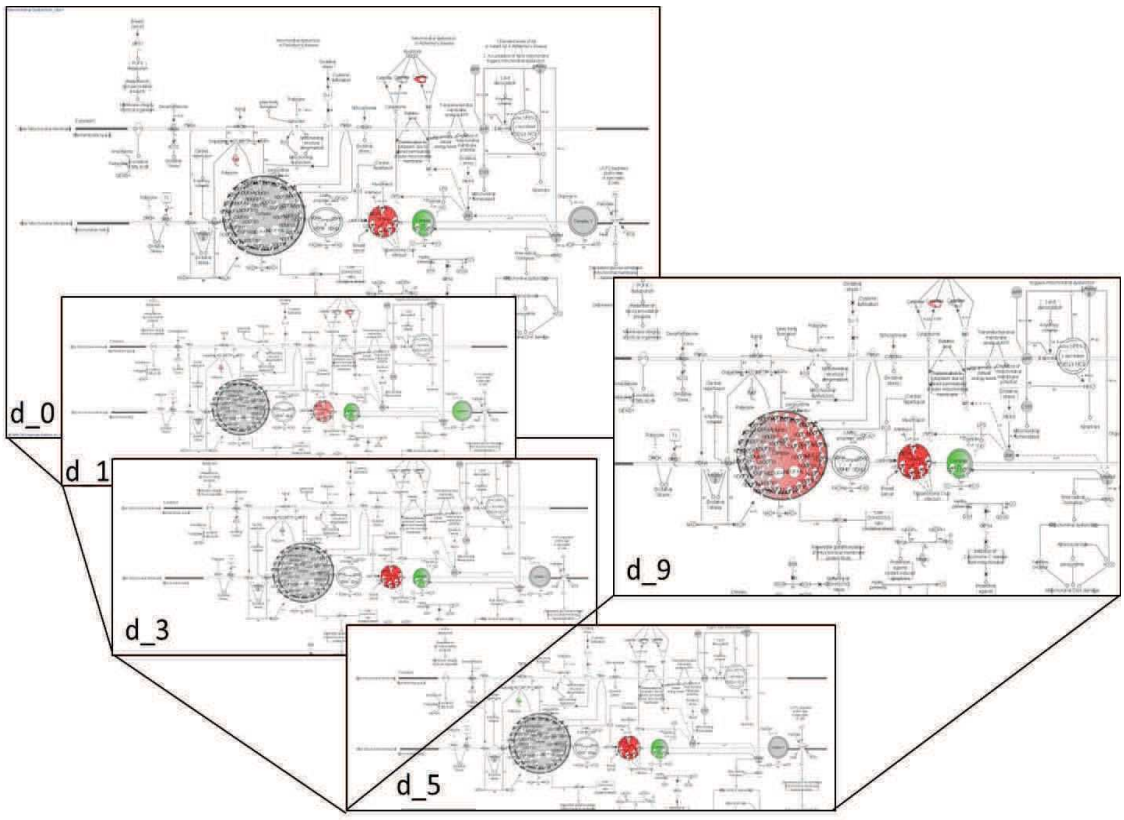

Abbildung 41 Atmungskette im Zeitverlauf, aus Ingenuity: Im Verlauf über 5 Zeitpunkte zeigt sich eine divergente Regulation der Atmungskette. Ausgehend vom größten Bild (d_0) sind die einzelnen Tage in zeitlicher Reihenfolge von hinten nach vorne dargestellt.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
AOX1	Aldehyde oxidase 1	1,3	2,4	1,9	1,4	1,4
OGDH	Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase	1,6	1,7	1,7	1,2	1,0
DLD	Dihydrolipoamide dehydrogenase	1,8	1,1	1,8	1,1	1,6
DLST	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase	1,1	1,5	2,0	1,3	-1,1

Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 34: Gene der ROS und RNS-Produktion: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.5.4. Eingeschränkte Abwehrfunktion gegenüber oxidativem Stress

Einer der bekanntesten Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress ist das Enzym Catalase (**CAT**). Es ist am Tag 0 und 1 mit FC-Werten von unter 1,3 leicht hochreguliert, wird jedoch am Tag 5 vermindert exprimiert, was aufgrund der ansonsten niedrigen FC-Werte besonders ins Gewicht fällt.

Die Superoxid-Dismutase bindet reaktive Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien und verwandelt sie in Hydrogenperoxid und O_2. In septischen Patienten ist die **SOD2** nicht signifikant, jedoch von Tag 1 bis 9 mit FDR-Werten von 0,11 bzw. 0,10 bzw. 0,17 bzw. 0,12 herunterreguliert.

Es zeigt sich ein eingeschränkter Glutathion-Metabolismus. Glutathion ist in fast allen Zellen in hoher Konzentration enthalten und gehört zu den wichtigsten Antioxidantien in Mitochondrien. In septischen Patienten sind einige im Glutathion-Stoffwechsel beteiligte Enzyme reguliert. Die Glutathion-Synthetase (**GSS**) katalysiert den zweiten Schritt der Glutathion-Synthese. Sie ist in septischen Patienten signifikant am Tag 1 und 3 herunterreguliert.

Die Konjugation von Glutathion an verschiedene Partikel wie Karzinogene, Medikamente, und an Produkte oxidativen Stresses wird über Glutathion-Transferasen katalysiert. In septischen Patienten sind einige dieser Transferasen reguliert. **GSTM3**, **GSTM4**, **GSTA4** und **GSTP1** sind nicht signifikant herunterreguliert. GSTM3 ist am Tag 3 mit einer FDR von 0,14, GSTM4 an den Tagen 0 und 1 mit einer FDR von 0,15 bzw. 0,16, GSTA4 am Tag 0 mit einer FDR von 0,28 und GSTP1 mit einer FDR von 0,26 herunterreguliert. Im Gegensatz dazu ist die Glutathion-Transferase T1 (**GSTT1**) an den Tagen 0, 1, 5 und 9 mit einer FDR von 0,08 bzw. 0,12 bzw. 0,76 bzw. 0,07 hochreguliert.

Die Gamma-Glutamyltransferase 1 (**GGT1**) ist sowohl für den Abbau als auch für das Recycling von Glutathion zuständig. Sie ist an den Tagen 1 und 3 signifikant und am Tag 0 mit einer FDR von 0,18 herunterreguliert.

Insgesamt weist die Expression der im Glutathion-Stoffwechsel involvierten Gene auf einen eingeschränkten Glutathion-Metabolismus und damit eine beeinträchtigte Abwehr gegenüber oxidativem Stress hin.

Auch das Thioredoxinsystem spielt eine wichtige Rolle im Schutz der Zelle durch die Abwehr von oxidativem Stress. Die Thioredoxin Reduktase 2 (**TXNRD2**) ist in septischen Patienten am Tag 1 signifikant und am Tag 9 mit einer FDR von 0,13 herunterreguliert. Sie ist ein zellulärer Redoxsensor und spielt eine wichtige Rolle in der Redoxregulation der Zellen.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
GGT1	Gamma-glutamyltransferase 1	-1,7	-2,1	-3,0	-1,5	-1,3
GSS	Glutathione synthetase	-1,4	-2,7	-2,3	-2,0	-1,4
GSTM3	Glutathione S-transferase M3 (brain)	-1,4	-1,3	-1,8	-1,3	-1,4
GSTM4	Glutathione S-transferase M4	-1,8	-1,7	-1,5	-1,4	-1,3
GSTA4	Glutathione S-transferase A4	-1,6	-1,4	-1,1	-1,0	-1,0
GSTT1	Glutathione S-transferase theta 1	1,8	1,6	1,3	1,7	1,5
GSTP1	Glutathione S-transferase pi	-1,4	-1,7	-1,4	-1,1	-1,1
TXNRD2	Thioredoxin reductase 2	-1,5	-2,2	-1,8	-1,6	-1,9

TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	1,2	1,4	1,3	1,1	1,6
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 35: Gene, involviert in oxidativen Stress: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

Zusammenfassend lässt die Genexpression in septischen Patienten auf ein vermehrtes Aufkommen von oxidativem Stress schließen. Gleichzeitig zeigt sich die Abwehrkapazität gegenüber Reaktiver Sauerstoffspezies eingeschränkt, so dass es in septischen Patienten zu einer verstärkten Beschädigung von Gewebe und Gefäßen durch ROS kommt.

3.5.5.5. Verminderte β-Oxidation als Zeichen der Mitochondrialen Dysfunktion

Unter den signifikanten Genen befindet sich die Acetyl-Coenzym-A Acyltransferase 2 (**ACAA2**), die für den letzten Schritt der mitochondrialen β-Oxidation zuständig ist. ACAA2 ist am Tag 1 signifikant und am Tag 0 mit einer FDR von 0,23 herunterreguliert. Die Genexpression spricht daher für die in der Literatur beschriebene Dysfunktion der Mitochondrien allgemein und im Speziellen der ß-Oxidation ([239]).
Weitere Gene, die für eine eingeschränkte ß-Oxidation sprechen, sind nicht signifikant herunterreguliert. Die Cholinkinase β (**CHKB**) reguliert die β-Oxidation und ist am Tag 3 mit einer FDR von 0,22 herunterreguliert. Die Acyl-CoA Dehydrogenasen **ACADS** und **ACADVL** werden am Tag 1 mit einer FDR von 0,22 bzw. 0,12 und **ACADM** am Tag 9 mit einer FDR von 0,08 vermindert exprimiert (siehe Abbildung 42).

[239] Vgl. Cinel und Opal 2009.

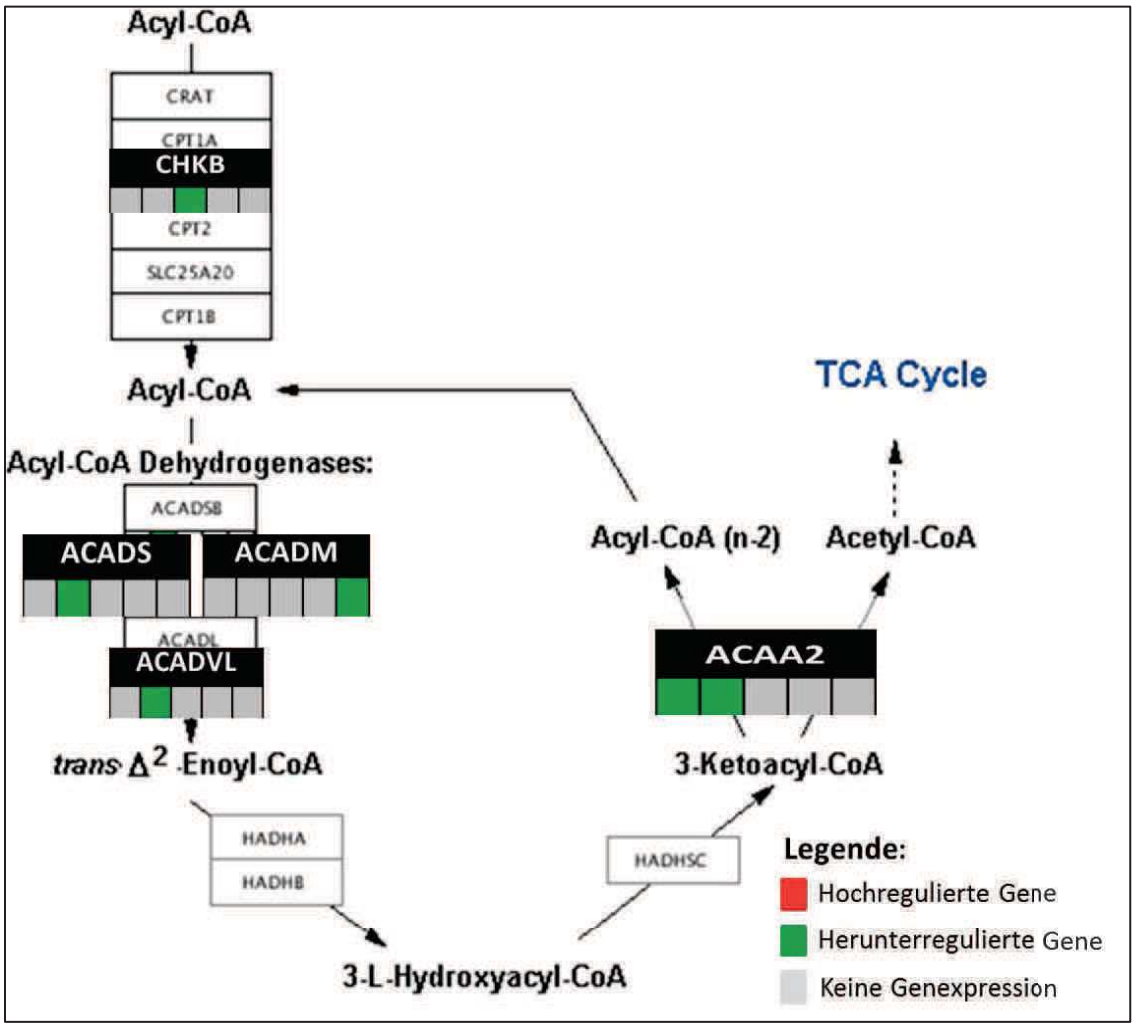

Abbildung 42: β-Oxidation, modifiziert nach KEGG: Verschiedene Gene des β-Oxidationszyklus lassen auf eine verminderte Aktivität schließen. Das entstehende Acetyl-CoA dient im Citratzyklus der Energiegewinnung. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Die β-Oxidation langkettiger und ungesättigter Fettsäuren erfordert weitere Enzyme, wie zum Beispiel die Enoyl CoenzymA Hydratase (**ECH1**). Sie ist in septischen Patienten am Tag 1 signifikant sowie am Tag 0 und 3 mit einer FDR von 0,07 bzw. 0,12 herunterreguliert.

Ein weiteres Schlüsselenzym ist die Dodecenoyl-CoenzymA Isomerase (**DCI**), die in septischen Patienten am Tag 1 mit einer FDR von 0,09 herunterreguliert ist. Ebenso ist die Peroxisomale-Enoyl-CoA Isomerase (**PECI**) für die Oxidation ungesättigter Fettsäuren zuständig. Sie ist in septischen Patienten vom Tag 0 bis 3 mit einer FDR von 0,19 bzw. 0,18 bzw. 0,20 nicht signifikant herunterreguliert.

Insgesamt zeigen die regulierten Gene eine verminderte β-Oxidation, vor allem an Tag 1 des Zeitverlaufs, die im Rahmen der in der Literatur beschriebenen mitochondrialen Dysfunktion bei Sepsis gewertet wird.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
ACAA2	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	-1,5	-2,3	-1,6	-1,6	-1,2
CHKB	Choline kinase beta	-1,5	-1,6	-1,9	-1,2	-1,1
ACADS	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	-1,4	-1,7	-1,8	-1,3	-1,5
ACADM	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	-1,2	1,0	-1,1	-1,4	-1,9
ACADVL	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	-1,5	-1,9	-1,7	-1,4	-1,2
DCI	Dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2 trans-enoyl-Coenzyme A isomerase)	-1,5	-2,0	-1,6	-1,1	-1,1
PECI	Peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	-1,8	-1,9	-2,0	-1,4	-1,1
ECH1	Enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	-1,8	-2,1	-2,0	-1,0	1,1
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 36: Gene der β-Oxidation: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.6. Eingeschränkte Signaltransduktion bei septischen Patienten

Eine suffiziente Signalweitergabe ist Voraussetzung für geregelte und adäquate Prozesse zur Verteidigung und dem Überleben einzelner Zellen, aber auch des gesamten Organismus.

3.5.6.1. Alteration der Proteinkinase A in septischen Patienten

Ein wichtiger *Second Messenger* ist cAMP, das von der Adenylatcyclase nach der Stimulation durch eine Reihe verschiedener Rezeptoren gebildet wird. cAMP aktiviert daraufhin die Proteinkinase A (PKA), welche die weitere zelluläre Antwort in Gang setzt. Es gibt zwei Isoenzyme der PKA, die jeweils aus zwei katalytischen und zwei hemmend wirkenden regulatorischen Untereinheiten bestehen. In septischen Patienten sind zwei regulatorische Untereinheiten der Typ II PKA reguliert. **PRKAR2B** ist an den Tagen 0 bis 3 signifikant heraufreguliert. Ebenso ist die **PRKAR2A** Untereinheit mit einer FDR von 0,28 am Tag 0 bzw. mit einer FDR von 0,08 am Tag 1 heraufreguliert. Die regulatorische Untereinheit **PRKAR1B** der Typ I Proteinkinase A ist dagegen am Tag 9 mit einer FDR von 0,09 herunterreguliert. Es ist bekannt, dass die beiden Typen

gegenläufig reguliert werden und ein Anstieg der Typ I Expression einen Abfall der Typ II Expression mit sich bringt ([240]).

3.5.6.2. Verminderte Expression der Proteinkinase D

Eine weitere wichtige Proteinkinase ist die PKD, die ebenso wie die PKA eine Rolle in verschiedenen zellulären Signaltransduktionswegen spielt. In septischen Patienten sind zwei der drei Isoenzyme reguliert. Die **PRKD1** ist am Tag 9 signifikant und an den Tagen 3 und 5 mit einer FDR von 0,052 bzw. 0,14 herunterreguliert. Die PRKD1 ist in Prozesse wie Proliferation, Regulation der Signaltransduktion und Invasion involviert, gleichzeitig wirkt sie anti-apoptotisch ([241]). Ebenso ist die der Typ I PKD sehr ähnliche **PRKD2** an den Tagen 0 und 3 signifikant sowie am Tag 1 mit einer FDR von 0,23 bzw. an den Tagen 5 und 9 mit einer FDR von 0,09 bzw. 0,12 herunterreguliert. Neben ihren ähnlichen Funktionen wie die PKD1 wurde für die PKD2 nachgewiesen, dass sie die Aktivierung von NF-κB und die Produktion von IL-2 fördert ([242]). Somit kann die Herunterregulation beider Isoenzyme zu Störungen wichtiger Zellfunktionen führen und die Induktion einer Immunparalyse, speziell der Adaptiven Immunantwort, bedingen.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
PRKAR1B	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	1,2	1,5	1,2	-1,5	-1,8
PRKAR2A	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	1,6	1,8	1,1	1,2	1,3
PRKAR2B	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	2,0	2,1	2,3	1,1	1,6
PRKD1	Protein kinase D1	-1,3	-1,4	-2,1	-2,0	-2,0
PRKD2	Protein kinase D2	-1,8	-1,5	-2,5	-2,5	-1,7
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 37: Gene, involviert in intrazelluläre Signalübertragung_1: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.6.3. Verminderte Wirkung von DAG und InsP3

Die PKD Isoenzyme wie andere Signaltransduktionswege werden über Diacylglycerol (DAG) aktiviert. DAG entsteht zusammen mit $InsP_3$ (Inositoltriphosphat) und dient wie dieses als Second messenger in der Signalübertragung von über 100 extrazellulären Rezeptoren. Katalysiert wird ihre Produktion durch Isoenzyme der Phospholipase C (**PLCb** in septischen Patienten vermindert exprimiert).

[240] Vgl. Taskén et al. 1997.
[241] Vgl. Rozengurt et al. 2005.
[242] Vgl. Mihailovic et al. 2004.

In septischen Patienten ist die **PLCL1** am Tag 1 signifikant und an den Tagen 0 und 3 mit einer FDR von 0,19 bzw. 0,08 hochreguliert. Im Gegensatz zu den anderen Isoenzymen ist sie jedoch katalytisch inaktiv, stattdessen bindet sie $InsP_3$, verhindert so dessen Bindung an Rezeptoren und vermindert die Signalstärke ([243]). Gleichzeitig ist die **PLCB1** nicht signifikant an den Tagen 3 bis 9 mit einer FDR von 0,11 bzw. 0,24 bzw. 0,09 bzw. 0,14 herunterreguliert. Diese ist katalytisch aktiv und eine verminderte Aktivität verursacht einschneidende Störungen in der Übertragung vieler extrazellulärer Signale in das Zellinnere.

Somit scheint die Produktion der „Second Messenger" vermindert und die Wirkung von $InsP_3$ wird durch die kompetitive Hemmung durch die PLCL1 weiter abgeschwächt (Abbildung 43). Diese Effekte sind vor allem gegen Mitte des Zeitverlaufs sichtbar.

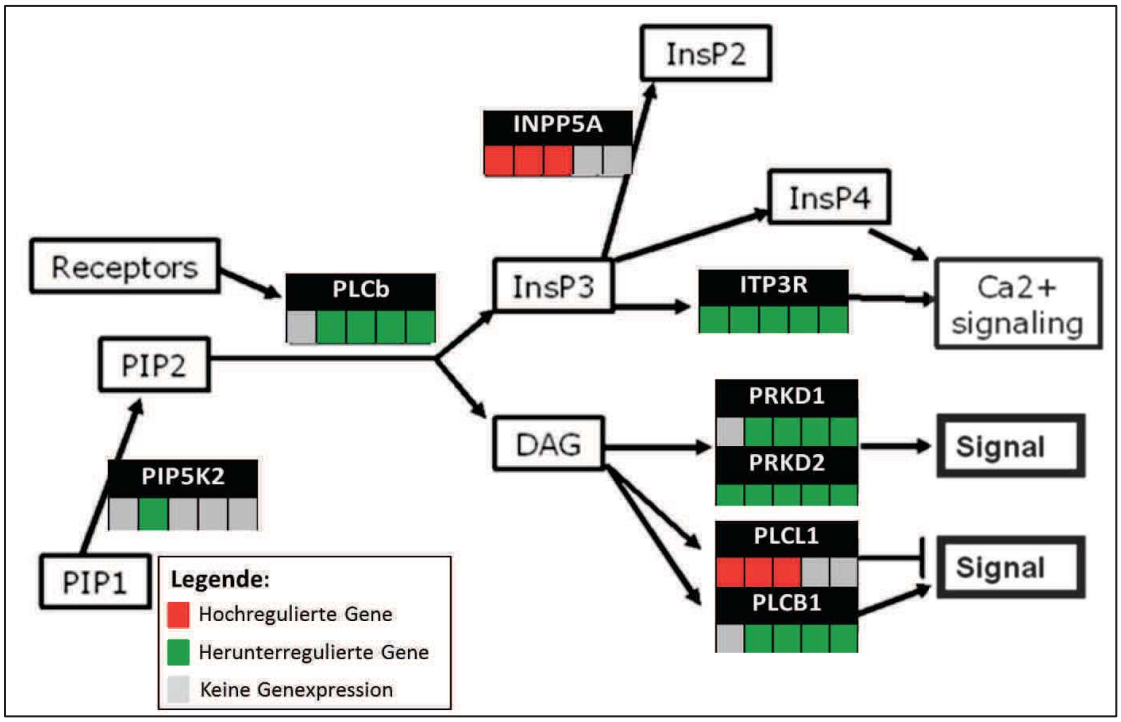

Abbildung 43: DAG und InsP3 Stoffwechsel: Die Phosphoinositol-Signalmoleküle werden durch verschiedene Enzyme verstoffwechselt. Teilweise entstehen wirksame „second Messenger", teilweise werden sie jedoch auch inaktiviert. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Im DAG-Metabolismus septischer Patienten ist weiterhin auffällig, dass drei Diacylglycerolkinasen (DGK) reguliert sind. Diese sind für den Abbau von DAG zuständig. Die **DGKA** ist in septischen Patienten am Tag 3, die **DGKE** am Tag 9 und die **DGKG** am Tag 0 signifikant herunterreguliert. Die DGKG wird darüber hinaus an den Tagen 1 und 3 mit einer FDR von 0,06 bzw. 0,21 vermindert exprimiert. Durch die Regulation der

[243] Vgl. Rhee 2001.

drei Gene an verschiedenen Zeitpunkten kommt der Effekt über den gesamten Zeitverlauf zum Tragen.

Ausgangspunkt für die DAG- und $InsP_3$-Produktion ist Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP2). Dieses wiederum wird aus PIP1 hergestellt. Diese Reaktion katalysiert die Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase (**PIP5K2A**), die in septischen Patienten über den gesamten Zeitverlauf nicht signifikant herunterreguliert ist. Somit scheint die Lipid-Second-Messenger Produktion gleich zu Beginn des Stoffwechselwegs gedrosselt abzulaufen.

Die Weiterverstoffwechselung und der Abbau von $InsP_3$ laufen über verschiedene Wege. Neben der bereits beschriebenen Bindung durch die inaktive **PLCL1**, wird $InsP_3$ außerdem zu $InsP_2$, das ebenfalls inaktiv ist, umgewandelt. Diese Reaktion wird von der in septischen Patienten nicht signifikant regulierten **INPP5A** katalysiert. Sie ist an den Tagen 0 bis 3 mit einer FDR von 0,16 bzw. 0,25 bzw. 0,27 hochreguliert. Die Inaktivierung des Signalmoleküls scheint somit gesteigert zu sein. Im Gegensatz dazu ist die Bildung von $InsP_4$, das wie $InsP_3$ die Signaltransduktion über Calcium vermittelt vermindert. Die Reaktion wird von der Inositol-1,4,5-Triphosphatkinase C (**ITPKC**) katalysiert, deren Genexpression in septischen Patienten am Tag 3 herunterreguliert ist.

Die Wirkung von $InsP_3$ auf die Calcium-Signaltransduktion verläuft über verschiedene Rezeptoren. Der Typ 3 Rezeptor (**ITPR3**) wird in septischen Patienten an den Tagen 0 bis 3 mit einer FDR von 0,12 bzw. 0,21 bzw. 0,08 vermindert exprimiert. Somit scheint die Aktivierung der Calcium-Signalübertragung durch $InsP_3$ und $InsP_4$ vor allem gegen Mitte des Zeitverlaufs in septischen Patienten eingeschränkt abzulaufen.

Einen Überblick über den Stoffwechsel der Lipid-Second-Messenger DAG und $InsP_3$ gibt Abbildung 43.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
PLCB1	Phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-1,4	-1,7	-1,7	-2,4	-1,8
PLCL1	Phospholipase C-like 1	1,7	2,3	2,3	1,7	1,3
DGKG	Diacylglycerol kinase, gamma 90kDa	-2,4	-1,9	-1,9	-1,8	-1,5
DGKA	Diacylglycerol kinase, alpha 80kDa	1,2	-1,1	-1,8	1,1	1,2
DGKE	Diacylglycerol kinase, epsilon 64kDa	-1,1	-1,1	-1,2	-1,7	-1,9
PIP5K2A	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, alpha	-1,3	-1,4	-1,6	-2,1	-1,6
INPP5A	Inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa	1,8	1,5	1,8	1,1	1,1
ITPR3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	-1,7	-1,7	-2,2	-1,1	-1,1
ITPKC	Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C	1,3	1,1	-1,8	1,1	1,1

Signifikanz	FDR <0,05			FDR 0,05 – 0,3			FDR > 0,3	

Tabelle 38: Gene, involviert in intrazelluläre Signalübertragung_2: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.6.4. Unterschiedliche Aktivierung der MAP-Kinasekaskaden

Lässt man DAVID nach überrepräsentativen Signaltransduktionswegen suchen, wird unter anderem der Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) Weg angegeben.

Der klassische MAPK-Weg wird über Wachstumsfaktoren aktiviert und verläuft über RAS-Proteine. Von diesen kleinen GTPasen sind in septischen Patienten drei Gene reguliert. **RRAS** ist am Tag 1 signifikant sowie am Tag 0 mit einer FDR von 0,27 herunterreguliert und es wurde gezeigt, dass es Zellüberleben und die Aktivität von Integrinen reguliert ([244]). Darüber hinaus wird **HRAS** an den Tagen 1 und 3 vermindert exprimiert und überschreitet die Signifikanzgrenze mit einer FDR von 0,06 am Tag 1 nur knapp. HRAS ist das bekannteste onkogene RAS-Protein und aktiviert RAF-Proteine, die zur Proliferation und Differenzierung führen. Ebenso ist **MRAS** ein weiteres Mitglied der RAS-Proteinfamilie in septischen Patienten reguliert. Es ist an den Tagen 1 und 3 mit einer FDR von 0,22 bzw. 0,29 herunterreguliert. Auch für MRAS ist bekannt, dass es die MAP-Kinasen aktiviert und darüber die Zellproliferation reguliert.

Gehemmt werden die RAS-Proteine durch **RASA2**. Dieses ist in septischen Patienten an den Tagen 0, 1, 3 und 9 signifikant hochreguliert. Ebenso verringert **ERBB2IP** die Signalweitergabe von RAS an die RAF Proteine ([245]). Es ist in septischen Patienten am Tag 3 signifikant und an den Tagen 0 und 1 mit einer FDR von 0,13 bzw. 0,06 hochreguliert und trägt so zur Hemmung der klassischen MAP-Kinasekaskade bei.

In septischen Patienten ist die **MAP2K2** nicht signifikant herunterreguliert. Nach der dann folgenden Aktivierung der MAPKinase ERK teilt sich der Weg. Ein „Zweig“ führt über die MAP-Kinase-Interacting-Serin/Threoninkinase 2 (**MKNK2**), die in septischen Patienten an den Tagen 0 und 1 mit einer FDR von 0,08 bzw. 0,07 herunterreguliert ist. Somit ist in septischen Patienten die klassische MAP-Kinase Signaltransduktion reduziert. Dieser Effekt wird vor allem am Tag 1 deutlich. Eine Übersicht über den Verlauf der Signalweitergabe bietet Abbildung 44.

[244] Vgl. Komatsu und Ruoslahti 2005.
[245] Vgl. Huang et al. 2003.

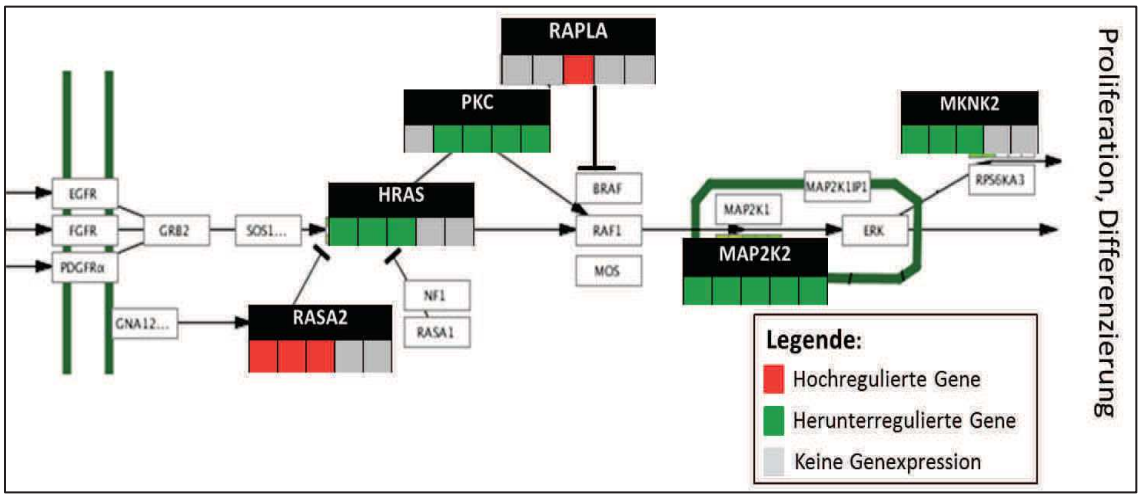

Abbildung 44: Klassische MAP Kinasekaskade: Die klassischen MAPKinasen werden durch Wachstumshormone aktiviert. Sie führen durch Geninduktion zu Proliferation und Differenzierung. In septischen Patienten finden sich eine Herunterregulation einiger Signalmoleküle und eine verstärkte Hemmung. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
RRAS	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	-1,6	-3,0	-1,7	-1,6	-1,6
HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	-1,5	-2,0	-1,9	-1,1	-1,2
MRAS	Muscle RAS oncogene homolog	-1,1	-1,6	-1,6	-1,1	-1,5
ERBB2IP	Erbb2 interacting protein	1,8	1,8	2,5	1,1	1,1
RAP1B	RAP1B, member of RAS oncogene family	1,6	1,2	2,0	1,1	1,5
RASA2	RAS p21 protein activator 2	2,4	2,4	2,8	1,6	2,2
PRKD1	Protein kinase D1	-1,3	-1,4	-2,1	-2,0	-2,0
MKNK2	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2	-1,8	-1,6	-1,6	1,0	1,1

Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 39: Gene der klassischen MAP Kinasekaskade: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

MAP-Kinasen werden darüber hinaus durch jegliche Art von Stress, DNA-Schäden, Lipopolysaccharide oder ROS aktiviert. Eines der wichtigen Endstreckengene ist dabei **JUND** als Teil des AP1-Transkriptionsfaktor-Komplexes und führt zur Induktion von Genen, die in Proliferation, Differenzierung, Inflammation und Apoptose involviert sind. In septischen Patienten ist es am Tag 0 signifikant hochreguliert. Des Weiteren wird es an den Tagen 1, 3 und 9 mit einer FDR von 0,15 bzw. 0,28 bzw. 0,11 verstärkt exprimiert.

Gehemmt wird der AP1-Komplex unter anderem durch das MAPK8-Interacting-Protein. **MAPK8IP1** ist in septischen Patienten signifikant über den gesamten Zeitverlauf herunterreguliert.

Somit zeigt sich in septischen Patienten eine gesteigerte Aktivierung des AP1-Transkriptionsfaktor-Komplexes über den gesamten Zeitverlauf mit einem Schwerpunkt am Tag 0.

Zuvor in der Aktivierungskette ist bereits **MAP3K8** in septischen Patienten reguliert. Mit einer FDR von 0,09 wird sie am Tag 3 verstärkt exprimiert. Die Serin/Threonin-Kinase kann sowohl die MAP-Kinasekaskade als auch den JNK-Kinaseweg aktivieren. Es wurde gezeigt, dass es die Produktion von NF-κB steigert und dieses aktiviert.

Die Serin/Threonin-Kinase **STK3** wird von verschiedenen proapoptotischen Stoffen stimuliert und aktiviert Stress-aktivierte MAP-Kinasen. Sie ist in septischen Patienten an Tag 1 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,08 hochreguliert.

Die Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinasen 1 und 2 (**MSK1** und **MSK2**) waren ursprünglich dafür bekannt, dass sie zur Expression von *Immediate Early Genes* führen. Neuere Forschungen haben jedoch gezeigt, dass sie in einen negativen Rückkopplungsmechanismus involviert sind und darüber die Aktivierung proinflammatorischer Gene hemmen ([246]). MSK1 ist an den Tagen 0 und 1 signifikant sowie am Tag 3 und 9 mit einer FDR von 0,19 bzw. 0,25 herunterreguliert. MSK2 ist am Tag 1 mit einer FDR von 0,09 herunterreguliert.

Insgesamt zeigt sich in septischen Patienten eine vermehrte Stress-aktivierte MAPKinase-Aktivierung gegen Anfang und Mitte des Zeitverlaufs, die eine gesteigerte Apoptoserate, Inflammation und Proliferation zur Folge hat.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
JUND	Jun D proto-oncogene	2,1	1,7	1,5	2,0	1,7
MAPK8IP1	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	-2,9	-2,0	-3,6	-2,6	-3,1
STK3	Serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	1,1	2,2	2,2	1,1	1,3
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	1,7	1,5	2,2	1,2	1,5
RPS6KA5	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	-3,3	-2,0	-2,0	-1,6	-1,6
RPS6KA4	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	-1,5	-1,9	-1,7	-1,2	-1,4
Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 40: Gene der Stress-aktivierten MAP-Kinasekaskade: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

[246] Vgl. Ananieva et al. 2008.

3.5.6.5. Eingeschränkte WASL-Signaltransduktion

WASL hat die gleichen Funktionen wie das bekannte WASP und wurde bereits im Abschnitt T-Zell-Rezeptor-Funktion besprochen. Zudem hat es verschiedene andere Funktionen inne. Die Symptome einer unzureichenden Expression beinhalten Thrombozytopenie, wiederholte bakterielle und virale Infekte, Lymphopenie und eine erhöhte Sepsisinzidenz.

WASL ist in septischen Patienten an den Tagen 0 und 1 signifikant und am Tag 3 mit einer FDR von 0,052 herunterreguliert. Gehemmt wird es durch das Prolin-serin-threonin Phosphatase interacting Protein 2 (**PSTPIP2**), das in septischen Patienten an den Tagen 0 und 1 signifikant und am Tag 9 mit einer FDR von 0,09 heraufreguliert ist. PSTPIP2 wiederum wird von der Protein-Tyrosin-Phosphatase PEST (**PTP-PEST** oder PTPN12) aktiviert. Diese ist in septischen Patienten nicht signifikant am Tag 3 mit einer FDR von 0,18 hochreguliert. Somit wird die schon gesteigerte Hemmung des bereits vermindert exprimierten WASLs weiter verstärkt.

Insgesamt zeigt sich in septischen Patienten eine stark eingeschränkte Funktion der WASL-Signaltransduktion mit einem Schwerpunkt an den Tagen 0 und 1.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	-1,9	-2,3	-2,3	-1,1	-1,7
PSTPIP2	Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein	2,1	2,1	1,6	1,3	1,9
PTPN12	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	1,7	1,4	2,1	-1,0	1,1

Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3			FDR > 0,3	

Tabelle 41: Gene der WASL-Signaltransduktion: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.6.6. Insulin-Signaltransduktion

Bei einer Sepsis ist bekannt, dass nicht ein Insulinmangel, sondern eine periphere Insulinresistenz durch eine gestörte Signaltransduktion zu erhöhten Blutglukosespiegeln führt.

Nach der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor werden Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) phosphoryliert. Ein Überblick über die Insulin-Signaltransduktion bietet Abbildung 45. Für die Weitergabe des Signals bindet IRS-1 unter anderem an die Phosphotyrosin-Phosphatase SHP2. Ein Mangel der Phosphatase geht dabei mit Insulinresistenz

und verminderter Glukoseaufnahme einher ([247]). In septischen Patienten wird **SHP2** an allen Tagen signifikant vermindert exprimiert mit dem tiefsten Punkt am fünften Tag.
Auch das Adapterprotein **APS** (SH2B2) wird vom Insulinrezeptor rekrutiert und stimuliert daraufhin GRB2. Es ist in septischen Patienten am Tag 9 mit einer FDR von 0,13 herunterreguliert. Da es außerdem in der Signalübertragung des B-Zell-Rezeptors eine Rolle spielt, kann seine Herunterregulation sowohl zu einer verminderten Insulinwirkung als auch zu einer Einschränkung der adaptiven Immunantwort am Ende des Zeitverlaufs führen ([248]). Die weit verbreitete Tyrosinkinase **FYN** wird von IRS aktiviert und ist so ebenfalls in die Insulinsignaltransduktion involviert. Ihre Herunterregulation am Tag 0 und 3 (FDR: 0,08 bzw. 0,09) kann daher die Insulinwirkung einschränken.
Neben der Wirkung auf den Glukosestoffwechsel hat Insulin auch Einfluss auf den Lipidmetabolismus. Dieser wird unter anderem über die Regulation der Genexpression vermittelt. Zwei wichtige Transkriptionsfaktoren sind dabei das Sterol regulatory element-binding protein 1 (**SREBF1** oder SREBP1) und **SREBF2** (oder SREBP2). Beide sind in septischen Patienten nicht signifikant herunterreguliert. SREBF2 überschreitet die Signifikanzgrenze am Tag 9 mit einer FDR von 0,07 nur noch knapp. Die verminderte Genexpression der beiden Transkriptionsfaktoren kann somit zu einer Störung der Lipidhomöostase in den späteren Phasen einer Sepsis führen.

[247] Vgl. Princen et al. 2009.
[248] Vgl. Kanzaki 2006.

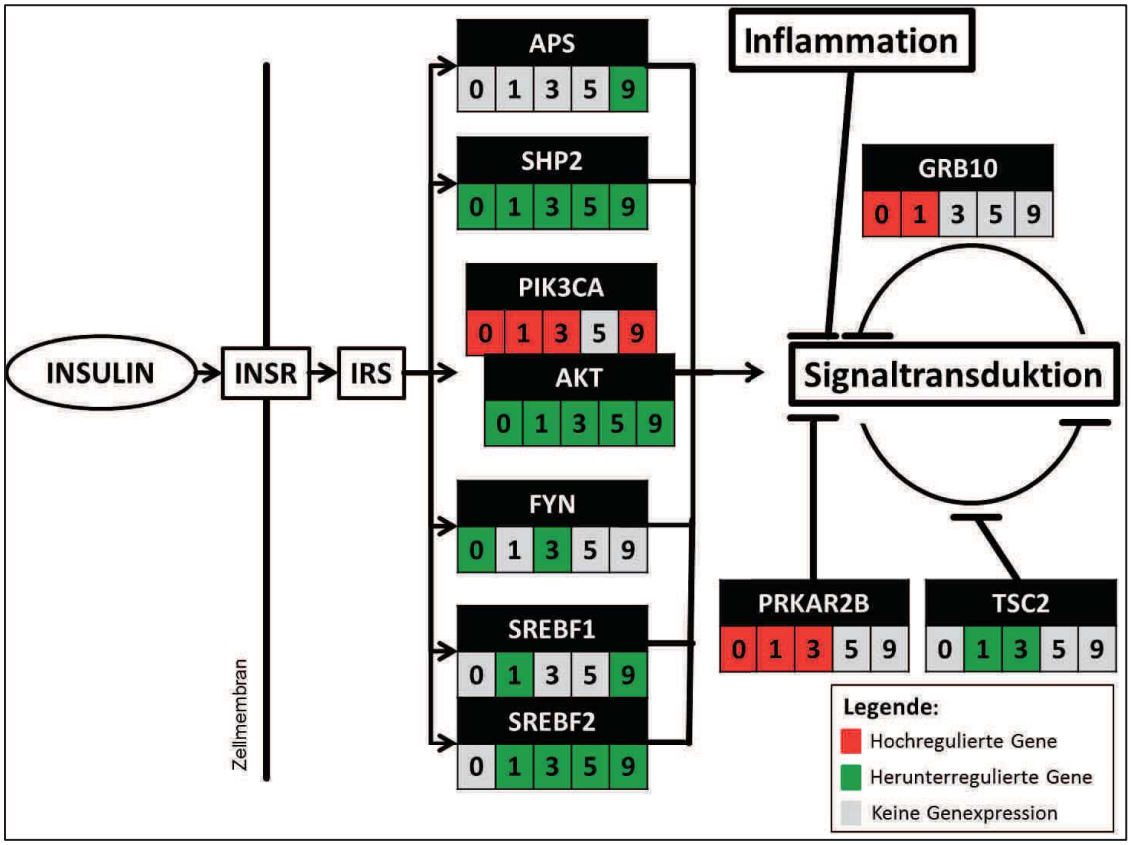

Abbildung 45: Insulin-Signalwirkung: Insulin hat über die Aktivierung mehrerer Signaltransduktionswege verschiedene Effekte auf eine Zelle. Diese werden unter dem Begriff „Signaltransduktion“ zusammengefasst. Es wird eine verminderte Aktivierung und gleichzeitig eine verstärkte Hemmung in septischen Patienten deutlich. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
SHP2	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	-1,8	-2,5	-2,7	-4,3	-2,3
APS	Adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2 domains	-1,1	-1,3	-1,6	-1,8	-1,8
FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	-1,9	-1,6	-2,2	-1,4	-1,3
SREBF2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	-1,2	-1,5	-1,7	-2,1	-1,8
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	-1,1	-1,7	-1,6	-1,4	-1,4

Signifikanz	FDR <0,05	FDR 0,05 – 0,3	FDR > 0,3

Tabelle 42: Gene der Insulin Signaltransduktion: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

Die hemmenden Regulationsmechanismen der Insulin-Signaltransduktion sind ebenfalls in Abbildung 45 aufgeführt. Das Protein Tuberous sclerosis (TSC) wird durch

die Signaltransduktion des Insulinrezeptors geblockt. Da TSC selbst hemmend auf die Proteinsynthese wirkt, kommt es so zur Induktion der Proteinsynthese durch Insulin. Es wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von TSC jedoch zur Aktivierung eines negativen Rückkopplungsmechanismus führt und es über die Degradation von IRS zu einer Insulinresistenz kommt ([249]). In septischen Patienten ist **TSC2** an Tag 3 signifikant und an Tag 1 mit einer FDR von 0,16 herunterreguliert.

GRB10 induziert ebenfalls einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch den Insulinrezeptor und führt zu dessen verstärkter Degradation. So kommt es zur verminderten Insulinwirkung und Insulinresistenz ([250]). GRB10 ist in septischen Patienten nicht signifikant am Tag 1 mit einer FDR von 0,09 hochreguliert. Somit finden sich Hinweise für eine Aktivierung von negativen Rückkopplungsmechanismen am Anfang und gegen Mitte des Zeitverlaufs.

Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) ist ein wichtiges Signalmolekül in verschiedenen zellulären Funktionen. Für die regulatorische PKA-Untereinheit **PRKAR2B** ist bekannt, dass sie in aktivierten T-Zellen den Transkriptionsfaktor CREB hemmt (siehe Abschnitt 3.5.3) und ein knock-out des Gens zu einer gesteigerten Insulinsensitivität führt ([251]). In septischen Patienten ist PRKAR2B vom Tag 0 bis 3 signifikant hochreguliert und kann so am Anfang des Zeitverlaufs zu einer Insulinresistenz beitragen.

Es zeigt sich ein negativer Einfluss inflammations-assoziierter Proteine auf das Insulin-Signal. Es wurde gezeigt, dass erhöhte Serumlevel verschiedener proinflammatorischer Mediatoren zu einer Insulinresistenz führen. Mögliche Mechanismen sind dabei die Signaltransduktionswege von IL-1, Il-18, Prostaglandinen und TNFα ([252]). Bei septischen Patienten findet sich eine signifikant erhöhte Genexpression von Proteinen, die für die Signaltransduktion von IL-1 und IL-18 verantwortlich sind (Abschnitt 3.5.2.2).

Die Expression von **SOCS3** wird von TNFα und IL-6 induziert und führt über die Hemmung des Insulinrezeptors zur inflammations-induzierten Insulinresistenz ([253]). Es ist in septischen Patienten am Tag 1 hochreguliert und überschreitet die Signifikanzgrenze mit einer FDR von 0,057 nur knapp.

Eine Rolle in der Modulation der Insulinsignaltransduktion spielt auch das für seine hemmende Wirkung auf das angeborene und adaptive Immunsystem bekannte **CEACAM1** ([254]). Es ist in septischen Patienten an Tag 0 und 1 mit einer FDR von 0,23

[249] Vgl. Shah und Hunter 2005.
[250] Vgl. Ramos et al. 2006.
[251] Vgl. Schreyer et al. 2001.
[252] Vgl. Osborn et al. 2008.
[253] Vgl. Lebrun und van Obberghen 2008.
[254] Vgl. Najjar 2002.

und 0,053 hochreguliert. Somit scheinen sowohl SOCS3 als auch CEACAM1 die Wirkung von Insulin am Anfang des Zeitverlaufs zu reduzieren.

TNFα führt, neben der schon beschriebenen Induktion von SOCS3, auch über die Aktivierung von Sphingomyelinasen zu einer abgeschwächten Insulinsignaltransduktion. Die Sphingomyelinasen führen über die Bildung von Ceramid zur Serinphosphorylierung von IRS-1, das daraufhin die Signaltransduktion des Insulinrezeptors blockiert ([255]). Die Genexpression von **SPHK1** und **SGPP1** weist auf eine verminderte Bildung von S1P aus Ceramid und gleichzeitig eine gesteigerte Bildung von Ceramid aus S1P hin (Sphingosin-Ceramid-Metabolismus: siehe Abschnitt 3.5.3.8). Zum höheren Ceramid-Level in septischen Patienten trägt außerdem das nicht signifikant exprimierte Gen **NSMAF** bei, das p55-TNF-Rezeptoren an die neutrale Sphingomyelinase koppelt. NSMAF ist in septischen Patienten an Tag 0 und 3 mit einer FDR von 0,28 bzw. 0,22 hochreguliert und scheint so am Anfang des Zeitverlaufs zur gesteigerten Ceramidproduktion zu führen.

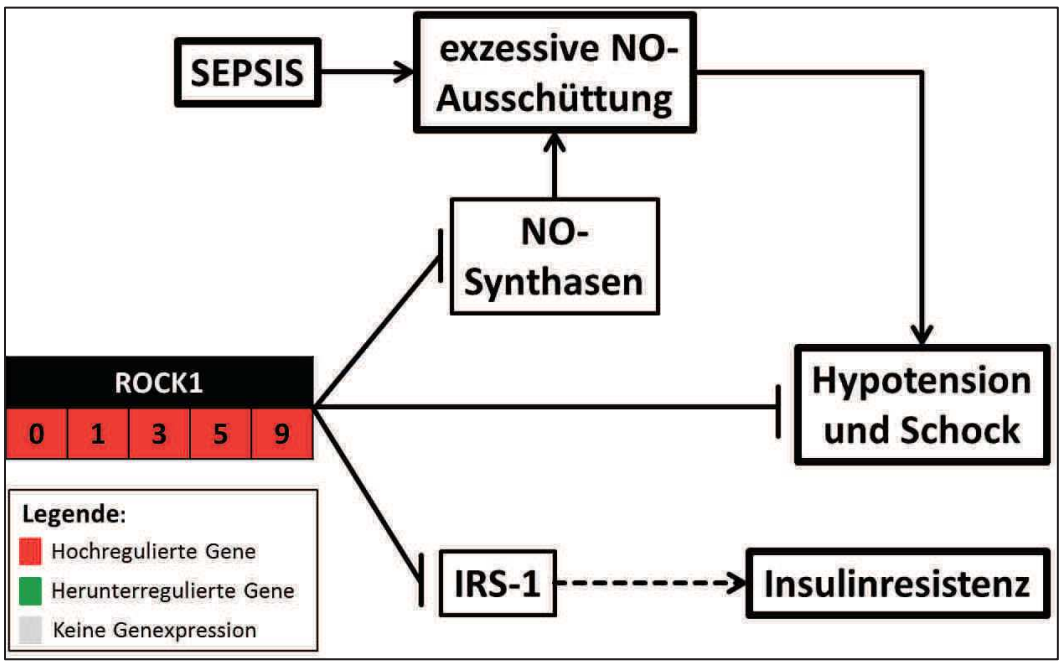

Abbildung 46: ROCK1 Wirkung auf Gefäßtonus und Insulinresistenz: ROCK1 hemmt die exzessive NO-Ausschüttung im Zuge einer Sepsis über NO-Synthasen. Gleichzeitig ist bekannt, dass ROCK1 zu einer Insulinresistenz mit beitragen kann. Um den Zeitverlauf der Genexpression abzubilden, sind die Kästchen zu den einzelnen Genen in fünf Felder aufgeteilt. Jedes Feld steht dabei für einen Zeitpunkt und ist je nach Richtung der Expression am jeweiligen Tag farbig markiert.

Die Rho-assoziierte-Kinase **ROCK1** ist eine Serin-Threonin-Kinase und in diverse zelluläre Prozesse, wie die Organisation des Zytoskeletts oder die Hemmung der Genexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS), involviert. Zudem führt ROCK1 zur

[255] Vgl. Moller 2000.

Serinphosphorylierung von IRS-1, das so inhibierend auf die weitere Signaltransduktion wirkt ([256]). In septischen Patienten ist ROCK1 an den Tagen 0, 1, 3 und 9 signifikant hochreguliert.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
TSC2	Tuberous sclerosis 2	-1,5	-1,8	-2,7	-1,4	-1,4
GRB10	Growth factor receptor-bound protein 10	1,9	1,6	1,1	-1,0	-1,0
PRKAR2B	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, β	2,0	2,1	2,3	1,1	1,6
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	1,7	1,3	1,1	1,3	-1,0
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	1,6	1,9	1,7	1,4	1,6
NSMAF	Neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	1,7	1,4	1,8	-1,4	1,4
SGPP1	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	1,3	1,5	2,9	1,3	1,7
SPHK1	Sphingosine kinase 1	-1,2	-1,7	-2,5	-2,9	-1,6
ROCK1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	2,3	2,2	3,5	1,5	2,2

Signifikanz	FDR <0,05	FDR 0,05 – 0,3	FDR > 0,3

Tabelle 43: Gene, involviert in negative Rückkopplungsmechanismen und Hemmung der Signaltransduktion durch inflammationsassoziierte Moleküle: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.5.6.7. Extrazelluläre Signaltransduktion

Im Prostaglandinkatabolismus fällt die Expression der Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (**HPGD**) ins Auge. Sie ist an den Tagen 0 bis 3 und 9 signifikant hochreguliert mit FC-Werten von bis zu 6,5 am Tag 0. Sie inaktiviert eine Reihe von Prostaglandinen, wie zum Beispiel PGE1/2 und PGF1/2. Es ist bekannt, dass eine Hochregulation der HPGD eine Herunterregulation der COX-2 zur Folge hat, so dass es zu einer allgemeinen Hemmung der Prostaglandinwirkung kommt und so antiinflammatorisch wirkt ([257]).

CLEC2B (oder AICL) ist ein C-Typ-Lectin-Rezeptor, der von Makrophagen und Granulozyten exprimiert wird und eine starke Zytokinsekretion induziert. In septischen Patienten ist CLEC2B an allen Tagen signifikant hochreguliert mit FC-Werten bis zu 6,5 am Tag 9. Somit zeigt sich eine starke Aktivierung myeloischer Zellen mit einer Stimulation der Zytokinsekretion über den gesamten Zeitverlauf.

HMGB1 ist ein nukleäres Protein, das bei Nekrose freigesetzt oder aktiv von Makrophagen in der späten Aktivierungsphase ausgeschüttet wird und bei einer Sepsis zum

[256] Vgl. Kanda et al. 2006.
[257] Vgl. Tai et al. 2006.

Organversagen beitragen kann ([258]). In septischen Patienten ist HMGB1 erwartungsgemäß in einer späteren Phase hochreguliert. Die FDR beträgt am dritten Tag 0,12 und am neunten Tag 0,15. Somit kann die gesteigerte Expression von HMGB1 in septischen Patienten mit zur Entwicklung eines Organversagens beitragen.

Zusammen mit den bereits in den Abschnitten 3.5.2.2 und 3.5.3.2 besprochenen Zytokinen zeigt die Genexpression der extrazellulären Signaltransduktion gleichzeitig eine eingeschränkte Funktion der adaptiven Immunität und eine Aktivierung angeborener Immunmechanismen.

Es zeigt sich eine verminderte Expression von Apolipoproteinen. Neben der klassischen Lipidtransportfunktion wurde für die Apolipoproteine auch eine modulierende Wirkung auf die inflammatorische Antwort nach LPS-Gabe und auf die Apoptose gezeigt ([259]). Das Apolipoprotein L (**APOL3**) ist signifikant an den Tagen 0 bis 3 herunterreguliert. Ebenso wird **APOL2** vermindert exprimiert. Dessen FDR liegt an Tag 0 bei 0,17 und am Tag 1 bei 0,22.

APOH ist in septischen Patienten am Tag 1 herunterreguliert. Es ist ebenfalls in verschiedene physiologische Prozesse involviert. Es transportiert Lipide und wirkt hemmend auf die intrinsische Gerinnung.

So spiegelt eine verminderte Menge von Apolipoproteinen eine verminderte Lipidtransportfunktion wider, kann im Zuge einer Infektion jedoch zu einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion führen und zur Entstehung einer Sepsis beitragen.

Gensymbol	Genname	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
CLEC2B	C-type lectin domain family 2, member B	2,6	2,0	3,8	3,5	6,5
HMGB1	High-mobility group box 1	1,5	1,5	2,2	1,4	1,9
HPGD	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	6,5	5,7	6,4	1,7	2,3
APOL3	Apolipoprotein L, 3	-1,7	-3,0	-2,2	-2,1	-1,2
APOL2	Apolipoprotein L, 2	-1,5	-1,6	-1,4	-1,6	-1,2
APOH	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	-1,5	-1,7	-1,7	-1,2	-1,1

Signifikanz	FDR <0,05		FDR 0,05 – 0,3		FDR > 0,3	

Tabelle 44: Gene der extrazellulären Signaltransduktion: Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus der sogenannten Zeitverlaufsliste. Angegeben sind Gensymbol, Genname und die entsprechenden FoldChanges zu den fünf Zeitpunkten.

3.6. Überblick über die Ergebnisse der Zeitverlaufsanalyse

Für eine übersichtliche Darstellung der Genexpression einzelner funktioneller Gruppen im Zeitverlauf wurde eine grafische Darstellung in Tabellenform gewählt.

[258] Vgl. Klune et al.
[259] Vgl. Berbée et al. 2005.

In den funktionellen Gruppen der Immunabwehr (Tabelle 45) fällt auf, dass die meisten Mechanismen an Tag 1 und zu einem geringeren Grad an Tag 3 reguliert sind. Ausnahmen bilden die „Aktivierung Neutrophiler Granulozyten“ mit der stärksten Regulation an Tag 3 und 9 sowie die Interleukine der angeborenen Immunität mit der stärksten Aktivierung an Tag 0.

Mechanismus	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
Antigenerkennung					
Signaltransduktion nach Toll-like Rezeptoren					
Chemotaxis					
Aktivierung Neutrophiler Granulozyten					
Komplementsystem					
Interleukine des angeborenen Immunsystems					
Antigen Präsentation					
Interleukine des adaptiven Immunsystems					
TCR-Funktion					
Kostimulation von T-Zellen					
Koinhibition von T-Zellen					
Aktivität der B-Zellen					

Aktivierung in septischen Patienten				
	verstärkt		weniger verstärkt	
	vermindert		weniger vermindert	

Tabelle 45: Zeitverlauf der Immunantwort: Farbliche Markierung der septischen Reaktion, wobei „rot“ für eine verstärkte Genexpression und „grün“ für eine verminderte Reaktion gegenüber den nicht-septischen Patienten steht. Die Darstellung erfolgt über den Zeitverlauf an den fünf Zeitpunkten.

Die funktionellen Gruppen der plasmatischen Kaskaden und der Apoptose sind in Tabelle 46 abgebildet. Auch hier fällt auf, dass die meisten Mechanismen an Tag 1 stark reguliert sind, jedoch auch an den Tagen 0, 3 und 9 sieht man eine deutliche Regulation.

Mechanismus	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
Aktivierung der Gerinnungskaskade					
Fibrinolyse					
Thrombozytenfunktion					
Caspasekaskade					
Apoptose-induzierende Mechanismen					
Hemmung der Apoptose durch Proteine, welche die Induktion der Apoptose unterdrücken					
Reaktive Hemmmechanismen					

Aktivierung in septischen Patienten	verstärkt		weniger verstärkt	
	vermindert		weniger vermindert	

Tabelle 46: Zeitverlauf der plasmatischen Kaskaden und der Apoptose: Farbliche Markierung der septischen Reaktion, wobei „rot“ für eine verstärkte Genexpression und „grün“ für eine verminderte Reaktion gegenüber den nicht-septischen Patienten steht. Die Darstellung erfolgt über den Zeitverlauf an den fünf Zeitpunkten.

Die funktionellen Gruppen der in die Signaltransduktion involvierten Gene sind in Tabelle 47 dargestellt. In beiden Gruppen fällt die starke Regulation am Anfang und in der Mitte des Zeitverlaufs auf, jedoch sind die Gruppen im Zusammenhang mit oxidativem Stress an Tag 9 reguliert.

Mechanismus	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
Proteinkinase A Funktion					
Expression der Proteinkinase D					
Wirkung von DAG und InsP3					
Aktivierung der klassischen MAPK-Kinase					
Aktivierung der stressaktivierten MAP-Kinase					
Insulin-Signaltransduktion					
Negative Regulationsmechanismen der Insulin-Signaltransduktion					
Bildung von Apolipoproteinen					

Aktivierung in septischen Patienten	verstärkt		weniger verstärkt	
	vermindert		weniger vermindert	

Tabelle 47: Zeitverlauf der Signaltransduktion: Farbliche Markierung der septischen Reaktion, wobei „rot“ für eine verstärkte Genexpression und „grün“ für eine verminderte Reaktion gegenüber den nicht-septischen Patienten steht. Die Darstellung erfolgt über den Zeitverlauf an den fünf Zeitpunkten.

Insgesamt sind die meisten funktionellen Gruppen an Tag 1 reguliert. Doch auch an den anderen Tagen zeigt sich eine mehr oder minder starke Regulation bestimmter Gruppen. Einzig Tag 5 fällt aus der Reihe, da an diesem nur wenige Mechanismen reguliert sind.

4. Diskussion

Die vorliegende Studie analysiert die Charakteristika der Genexpression septischer und nicht-septischer Patienten nach Polytrauma im Zeitverlauf. Der Zeitraum beginnt dabei bereits vor der klinischen Manifestation, beschreibt jedoch auch die Phase während und nach der klinischen Sepsis. Im Folgenden sollen zunächst die Methoden und im Anschluss die Ergebnisse der Analyse diskutiert werden.

4.1. Diskussion der Methoden

Der erste Teil der Diskussion widmet sich den verwendeten Materialien und Methoden und zeigt die Vor- und Nachteile des verwendeten Studiendesigns.

4.1.1. Studiendesign

Bei der Studie wurde ein prospektives, klinisches Design verwendet. Vorteil einer prospektiven Herangehensweise ist, dass die Rekrutierung von Patienten nach vorher genau festgelegten Kriterien und die Beeinflussung der Umstände des Experiments ermöglicht werden. Die retrospektive Datenerhebung schloss sich von vorneherein aus, da die zeitnahe Gewinnung der mRNA nach definierten Voraussetzungen obligat ist. Somit mussten die Nachteile des prospektiven Designs, wie ein höherer Kosten- und Zeitaufwand, in Kauf genommen werden, um die Analyse von Zeitpunkten bereits vor der klinischen Manifestation zu ermöglichen.
Der Vorteil einer klinischen Studie ist die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf reale Patienten, da im Modell oft unvorhersehbare dritte Größen vorliegen, die die Analyse beeinträchtigen oder die Durchführung aufgrund ethischer Aspekte nicht möglich ist. Oftmals haben darüber hinaus Therapien im Tiermodell erfolgversprechende Wirkungen gezeigt, sind dann jedoch in den folgenden klinischen Studien gescheitert. Seok et al. haben zum Beispiel gezeigt, wie eingeschränkt die menschliche Reaktion, insbesondere der Inflammation durch Maus-Modelle widergespiegelt wird ([260]).
Nachteil klinischer Studien ist der Einfluss anderer Faktoren auf den Verlauf, wie zum Beispiel unterschiedliche Verletzungsmuster, Therapien und die große Heterogenität der eingeschlossenen Patienten. Minimiert wird dieser Einfluss durch streng definierte Ein- und Ausschlusskriterien sowie festgelegte Therapieverfahren. Trotzdem sieht man allein an den unterschiedlichen Manifestationszeitpunkten der Sepsis zwischen dem 3. und 7. Tag die bestehende Schwankungsbreite.

[260] Vgl. Seok et al. 2013.

4.1.2. Arbeiten mit kleiner Stichprobe

Die Größe einer Stichprobe hat Auswirkungen auf die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Je größer die Stichprobe, desto kleiner ist das Risiko, dass die Ergebnisse durch den Zufall beeinträchtigt werden.
Um Schlüsse von kleinen Zufallsstichproben auf die Gesamtheit ziehen zu können, muss das Problem der unbeobachteten Heterogenität berücksichtigt werden. In kleinen Stichproben ist die Wahrscheinlichkeit, aus einer Population zufällig eine bestimmte Merkmalskombination zu ziehen, geringer als bei einer großen. Aus diesem Grunde ist es notwendig, in Fällen, in denen nur kleine Stichproben gezogen werden können, andere Verfahren zur Sicherung der Stichprobenaussagekraft anzuwenden, wie zum Beispiel die hier verwendete matched-pair-Methode ([261]).
Trotzdem sind die geringen Patientenzahlen, insbesondere zu den späteren Zeitpunkten im Verlauf einer der Schwachpunkte der Studie und die Einzelergebnisse sollten mit größeren Stichproben bestätigt werden.
Ein Teil der Ergebnisse kann dabei sicherlich durch den Blick auf andere Studien untermauert werden. Denn viele der hier gezeigten Resultate finden sich auch in anderen Untersuchungen zur Sepsis wieder. Somit erscheinen auch neue Erkenntnisse verlässlich.

4.1.3. Untersuchung des Zeitraums vor der klinischen Sepsismanifestation

In den meisten anderen Sepsisstudien mit Genexpressionsanalysen wurde der Zeitraum während der Sepsis untersucht. Geht man jedoch von der Annahme aus, dass die mRNA Expression den späteren Phänotyp bereits im Vorfeld widerspiegelt, so drängt sich die Überlegung auf, sich darüber hinaus auch der Phase vor der klinischen Manifestation zu widmen. Auch die dringende Notwendigkeit einer möglichst frühzeitigen Diagnose und Therapie machen den Zeitraum vor der der eigentlichen Sepsis für Studien attraktiv.
Aus pathophysiologischer Sicht wird außerdem ermöglicht, nicht nur die Prozesse zu untersuchen, die während der Sepsis ablaufen, sondern auch diejenigen, die zu einer Sepsis führen. Auf diese Art und Weise können potentielle Ursachen und pathologischen Abläufe der Entstehung einer Sepsis identifiziert werden.

[261] Vgl. Stuart 2010.

4.1.4. Die Analyse des Zeitverlaufs

Um statt eines statischen Bildes einen dynamischen Ablauf der Prozesse und Mechanismen zu erhalten, wurde die Genexpressionsanalyse mehrerer Zeitpunkte durchgeführt. Der Vergleich der Abläufe in septischen und nicht-septischen Patienten soll zeigen, in wie weit unterschiedliche Prozesse am selben Zeitpunkt oder gleiche Prozesse zu unterschiedlichen Zeiten ablaufen, wann bestimmte Vorgänge initiiert und wann beendet werden.

Johnson et al. verwendeten 2007 ein Modell, in dem der Tag der klinischen Manifestation einer Sepsis als Zeitpunkt festgelegt war ([262]). Rückwirkend wurden dann die Abnahmezeitpunkte bezeichnet, wie zum Beispiel 12 oder 36 Stunden vor Sepsiskonvertierung. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass Abläufe unmittelbar vorher relativ einheitlich erfasst werden. Aufgrund der individuellen Reaktionszeit der Patienten bleibt jedoch unklar, wann der Stimulus für die Entstehung der Sepsis zu datieren ist. In der vorliegenden Studie wurde daher das Gewicht auf einen definierten Anfangszeitpunkt gelegt.

Andere Studien untersuchen die Abläufe vor allem nach Beginn der klinischen Sepsis, wie z.B. Talwar et al. 2005, wo die Genexpression in Leukozyten zu definierten Zeitpunkten nach Endotoxin-Applikation untersucht wurde ([263]) oder auch Yang et al. 2011, wo die Genexpression von Ratten nach Sepsisbeginn analysiert wurde ([264]).

Die meisten Studien beschränken sich jedoch auf einen Zeitpunkt, so dass die Zeitverlaufsanalyse unsere Studie in dieser Hinsicht besonders hervorhebt.

Methodisch ist hier noch anzumerken, dass neben der Berechnung von FC-Werten, die insbesondere in der Analyse einzelner Zeitpunkte Vorteile aufweisen, auch kumulative Expressionen verwendet wurden, um einen besseren Einblick in die Dynamik der septischen Reaktion zu erhalten. Die kumulativen Expressionswerte, oder auch „disease load indices“ ([265]), erlauben eine einfachere Abschätzung der Genexpression über den Zeitverlauf, da sie im Gegensatz zu FC-Werten nicht nur relative Werte bieten.

4.1.5. Die Untersuchung polytraumatisierter Patienten

Der Vergleich zwischen septischen und nicht-septischen Patienten nach Polytrauma bietet zudem die Möglichkeit, diejenigen Pathomechanismen zu sehen, die im Rahmen einer Sepsis ablaufen. Es ist bekannt, dass auch Patienten mit einem unkomplizierten

[262] Vgl. Johnson et al. 2007.
[263] Vgl. Talwar et al. 2006.
[264] Vgl. Yang et al. 2012.
[265] Vgl. Porter et al. 2003.

Verlauf nach Polytrauma eine starke inflammatorische Reaktion zeigen ([266]). Daher kann angenommen werden, dass wirklich nur die Mechanismen differentiell reguliert sind, die den Unterschied zwischen SIRS und Sepsis ausmachen.
Patienten nach einem Polytrauma zu wählen anstatt Patienten mit anderen Ursachen für eine Sepsis, wie zum Beispiel einer Pneumonie oder Harnwegsinfekten, bietet den Vorteil, dass ein bestimmter Anfangspunkt vorliegt. In anderen Gruppen muss man dagegen mit einer sehr unterschiedlichen Krankheitsdauer und einer Reihe von Komorbiditäten rechnen, da die Patienten oft älter und dementsprechend körperlich beeinträchtigt sind. Im Gegensatz dazu sind Patienten nach Polytrauma meist junge, vorher gesunde Menschen, die über eine ähnliche Konstitution verfügen.

4.1.6. Die Verwendung von Vollblut

Die Genexpressionsanalyse bei einer Sepsis von spezifischen Zelltypen wurde bereits in verschiedenen Studien angewendet ([267],[268],[269]). Der Gedanke, in der vorliegenden Studie eine Analyse von Vollblut durchzuführen, ergab sich aus folgenden Überlegungen:
Die Abnahme und Aufbereitung wird vereinfacht und wäre damit auch für den klinischen Alltag praktikabel. Ausserdem wird vermieden, dass es durch die Zelltypextraktion zu Manipulationen an den Zellen und damit einer möglichen Beeinflussung der Genexpression kommt.
Nachteile der Verwendung von Vollblut sind, dass Reaktionen in einzelnen Zellpopulationen nicht erkennbar sind und die Genexpression durch den Anteil eines Zelltyps an der Gesamtzahl beeinflusst wird. Beispielhaft ist hier zu erwähnen, dass in Neutrophilen Granulozyten eine verzögerte ([270]), in Lymphozyten jedoch eine deutlich gesteigerte Apoptoserate bei Sepsis festgestellt werden konnte ([271]).
Im direkten Vergleich von Vollblut mit Leukozytenextrakten zur Genexpressionsanalyse wurde gezeigt, dass beide Verfahren hochqualitative RNA generieren und eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen. Beachten sollte man, dass die Verwendung von Vollblut ein erhöhtes Rauschen und eine reduzierte Empfindlichkeit in ihren Genexpressionsprofilen zur Folge hat, so dass sich ein direkter Vergleich zwischen Studien mit unterschiedlichen Methoden als problematisch herausstellen kann ([272]).

[266] Vgl. Laudanski et al. 2006.
[267] Vgl. Tang et al. 2007.
[268] Vgl. Chung et al. 2006.
[269] Vgl. Tang et al. 2009.
[270] Vgl. Wesche et al. 2005.
[271] Vgl. Hotchkiss et al. 2001.
[272] Vgl. Feezor et al. 2004.

Verschiedene Studien haben jedoch bereits gezeigt, dass die Verwendung von Vollblut gute Ergebnisse liefert und eine gute Basis für eine entsprechende Analyse bietet mit Erkenntnissen sowohl bei der Einordnung von Patienten in Klassen (class prediction) als auch in der Identifizierung funktioneller Gruppen. So wurde in einer Studie von Feezor et al. 2004 gezeigt, dass peripheres Blut für die Vorhersage von Multiorganversagen und generellem Ausgang verwendet werden kann ([273]). Johnson et al. konnten anhand von Genexpressionsprofilen aus Vollblut zwischen sterilem SIRS und Sepsis unterscheiden und identifizierten zusätzlich verschiedene funktionelle Gruppen, deren mögliche Pathomechanismen zu Grunde liegen könnten ([274]).

4.1.7. Die Verwendung von Microarrays.

Microarrays sind molekularbiologische Untersuchungssysteme zur Bestimmung der zellulären Genexpression. Sie sind kostengünstig, flexibel bei der Wahl des Ausgangsmaterials und erlauben die Analyse großer Datenmengen innerhalb kürzester Zeit ([275]). Statt einzelner Gene oder Proteine werden gleichzeitig tausende Gene untersucht. So entsteht ein ganzheitliches Bild der Zellreaktion ([276]).

Insgesamt lässt sich ein hohes Potential der Microarray-Analysen feststellen. Es wurden Fortschritte beim Verständnis von Sepsis und septischem Schock, Identifizierung von neuen „pathways“ und Einzelgenen für eine potentielle Intervention oder diagnostische Möglichkeiten gemacht ([277]).

Die Komplexität der Microarrayanalysen bringt jedoch auch Probleme mit sich. Es ist nötig, aus den riesigen Datenmengen die Ergebnisse zu extrahieren, die wichtig sind und zu neuen Erkenntnissen führen, und nicht auf Artefakten beruhen. Daher muss eine sorgfältige Qualitätskontrolle und Validierung der Ergebnisse stattfinden ([278]).

Wichtig für die Qualitätskontrolle ist unter anderem die Normalisierung der Microarrayergebnisse. Hier werden zwei Arten der Normalisierung unterschieden. Die Intra-Slide-Normalisierung gleicht systematische Fehler innerhalb eines Arrays aus, während die Inter-Slide-Normalisierung Effekte nivelliert, die das ganze Array betreffen, um die Arrays untereinander vergleichbar zu machen ([279]).

Die Quantifizierung und Intra-Slide-Normalisierung erfolgte mit Hilfe der weit verbreiteten und gut belegten CodeLink System Software ([280]).

[273] Vgl. Feezor et al. 2004.
[274] Vgl. Johnson et al. 2007.
[275] Vgl. McLachlan et al. 2004.
[276] Vgl. Kim et al. 2004.
[277] Vgl. Wong 2012.
[278] Vgl. Chuaqui et al. 2002.
[279] Vgl. Wurmbach et al. 2003.
[280] Vgl. Diez et al. 2007.

Die Qualitätskontrolle, wie hier verwendet, wurde dagegen im Rahmen der hiesigen Studie als modularer Arbeitsablauf etabliert und basiert auf bereits vorhandenen Programmen, die um einige selbstentwickelte Module erweitert wurden. Der modulare Arbeitsablauf mit hintereinandergeschalteten Programmen ermöglicht ein einfaches und schnelles Arbeiten. Er wurde bereits komplett ([281]) sowie in reduzierter Form ([282]) verwendet und publiziert.
Die übernommenen Module SKNN ([283]), das MOF-Modul (Microarray outlier filter) ([284]) und die Quantilen Normalisierung ([285]) sind ebenfalls mehrfach veröffentlichte und weltweit etablierte Methoden.
Die Validierung erfolgte unabhängig von den zuvor beschriebenen Methoden per RT-PCR nach standardisiertem Ablauf ([286]), was mittlerweile zum Standard eines Microarray-Experiments gehört ([287]). Es wurde gezeigt, dass es eine starke Korrelation der Expression zwischen Microarray und RT-PCR-Daten gibt ([288]).

4.1.8. Überlegungen zum FDR-Wert

Der FDR-Wert wurde durch das gut etablierte Programm RancProducts ermittelt ([289]).
Nach allgemeiner Konvention wurde die Grenze für die Signifikanz der Gene auch in der vorliegenden Studie auf 0,05 festgelegt. Gleichzeitig wurden zur Unterstützung für die Analyse Gene mit eine FDR bis zu 0,3 herangezogen. Diese dienen nicht zur Aufstellung der Thesen, füllen jedoch das teilweise inkomplette Bild aus, das die Gene mit einer FDR bis 0,05 ergeben.
Die Tatsache, dass in dieser Studie ein Zeitverlauf analysiert wird, bringt bei vielen Genen mit sich, dass sie an einem Tag eine FDR unter 0,05, an anderen Tagen jedoch eine FDR über 0,05 aufweisen. Trotzdem spricht der Zeitverlaufscharakter für eine hohe Plausibilität auch des eigentlich nicht signifikanten Wertes, wenn der dasselbe Vorzeichen aufweist. Darüber hinaus gibt es viele Gene, die an mehreren Tagen gleich reguliert sind, jedoch an keinem der Zeitpunkte signifikant. Auch hier kann man auf Grund der Häufung der Werte diesen eine höhere Glaubwürdigkeit zusprechen.

[281] Vgl. Menges et al. 2008.
[282] Vgl. Fenic et al. 2008.
[283] Vgl. Kim et al. 2004.
[284] Vgl. Yang et al. 2008.
[285] Vgl. Bolstad et al. 2003.
[286] Vgl. Bustin 2002.
[287] Vgl. Wurmbach et al. 2003.
[288] Vgl. Dallas et al. 2005.
[289] Vgl. Breitling et al. 2004.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Diskussion der Ergebnisse beginnt mit einem Blick auf die allgemeinen und technischen Resultate, um dann die Ergebnisse der funktionellen Analyse zu bewerten.

4.2.1. Diskussion der allgemeinen und technischen Ergebnisse

Die kurze Diskussion der allgemeinen und technischen Ergebnisse beinhaltet einige Auffälligkeiten und Überlegungen zur Anzahl der differentiell regulierten Gene, zu Genüberschneidungen und der kumulativen Genexpression über alle Gene.

4.2.1.1. Anzahl differentiell regulierter Gene

Betrachtet man die Anzahl der differentiell regulierten Gene, fällt auf, dass sie an Tag fünf stark abfällt und nur gut 20% der durchschnittlichen Anzahl der anderen Tage beträgt. Diese Tatsache ist besonders deshalb auffällig, da am fünften Tag der durchschnittliche Manifestationszeitpunkt der klinischen Sepsis liegt.
Nimmt man an, dass die Genexpression jeweils einen Zeitraum widerspiegelt, der in der Zukunft liegt, würde die Genexpression an Tag 5 einer Phase entsprechen, in der die Sepsis noch vorliegt, jedoch bereits wieder abklingt. Die Genexpression würde somit für die Angleichung der septischen Reaktion an die der nicht-septischen Patienten sprechen.
Andererseits könnte die Ursache für die ähnlicher werdende Genexpression septischer und nicht-septischer Patienten auch in einer ähnlichen Intensivbehandlung der beiden Patientenkohorten liegen. In diesem Fall würde die Genexpression die medizinische Therapie widerspiegeln, die mit Sepsisbeginn angesetzt wird und auf die die Patienten reagieren.
Die meisten Gene sind dagegen nach 24h reguliert. Hier scheint somit der grösste Unterschied in der Genexpression der beiden Patientenkohorten zu liegen. In der Vorstellung entspricht der Tag 1, ebenso wie zum Aufnahmezeitpunkt, der Zeit, in der die Pathogenese der Sepsis liegt, ohne dass bereits eine klinische Manifestation vorliegt.

4.2.1.2. Zeichen der Rekonvaleszenz an Tag 9

Betrachtet man die absolute Anzahl signifikanter Gene an den einzelnen Tagen, so zeigt sich an Tag 9 die zweithöchste Anzahl. Im klinischen Zeitverlauf entspricht dieser der Phase der Genesung der Patienten. Auffällig ist an Tag 9 jedoch die Statistik der Überschneidungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten. Hier zeigt sich eine relativ geringe Menge von Genüberschneidungen, gemessen an der Genanzahl. Das bedeutet, trotz einer starken Reaktion an diesem Zeitpunkt sind viele Gene nur an diesem einen Tag differentiell reguliert.

In den funktionellen Gruppen fällt insbesondere die Expression der Gene im Rahmen der Mitochondrialen Dysfunktion an Tag 9 auf. Es zeigt sich eine regelrechte Umkehr der Situation und auch bei einigen Genen aus anderen funktionellen Gruppen dreht sich die Genexpression ins Gegenteil. Somit scheinen einige Funktionen zunächst in septischen Patienten zu schwach bzw. zu stark abzulaufen, um dann als notwendige Kompensationsmechanismen gesteigert bzw. gedrosselt zu werden.

4.2.1.3. Vergleich der Kumulativen Expression

Im Vergleich der absoluten Expressionswerte, und nicht der Fc-Werte über den Zeitverlauf, stellt man fest, dass die septischen Patienten eine insgesamt größere Genexpression haben. Die Differenz bleibt dabei über den gesamten Zeitraum konstant. Sie zeigen also auf das Polytrauma eine stärkere Reaktion. Dies wirft die Frage auf, ob sich die absolute Genexpression der Patienten auch unter normalen Umständen unterscheidet. Die Frage ist also, ob Menschen mit der Prädisposition für die Entwicklung einer Sepsis auch unter normalen Umständen dazu tendieren, mit einer höheren Genexpression zu antworten und somit stärker zu reagieren.

4.2.2. Diskussion der programmbasierten Analyse

In der programmbasierten Analyse wird der Grundstein für die weitere Detailanalyse gelegt. Hier soll sich zeigen, welche funktionellen Gruppen in der weiteren Analyse besonders wichtig sind.

4.2.2.1. Funktionelle Gruppen aus einem breiten Sprektrum der Zellfunktionen

Das heutige Verständnis der Sepsis entfernt sich immer weiter von der simplen Annahme, dass allein eine starke Pro-Inflammation oder gar die Ausschüttung einzelner Botenstoffe für die Entwicklung einer Sepsis verantwortlich sind. Stattdessen geht man von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Funktionseinheiten und Prozesse innerhalb einzelner Zellen oder zwischen mehreren Zelltypen aus ([290],[291]). Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch in der vorliegenden Analyse diverse Mechanismen aus den unterschiedlichsten Teilbereichen gefunden wurden. Sowohl die Analyse mit Source und DAVID als auch mit Ingenuity und dem Pathwayexplorer zeigen betroffene Funktionen aus allen Richtungen. Die Ergebnisse überschneiden sich dabei zum großen Teil und alle drei Programme ordnen den Kategorien „Response to stimulus“ (engl. für Antwort auf einen Reiz) und „Cell Cycle“ (engl. für Zellzyklus) eine große Bedeutung zu.

[290] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[291] Vgl. Cinel und Opal 2009.

Wichtige Ergebnisse kommen vor allem aus den Bereichen der Adaptiven Immunantwort und Apoptose, den plasmatischen Kaskaden, den Mitochondrien und der Signaltransduktion. Damit stimmen viele Ergebnisse der vorliegenden Genexpressionsanalyse grundsätzlich mit Erkenntnissen anderer Studien überein. Entscheidend ist jedoch, dass in vielen Fällen neue Aspekte und Mechanismen gefunden werden konnten, die zum jeweiligen Zeitpunkt oder in diesem Zusammenhang noch nicht analysiert wurden.

4.2.2.2. Biomarker zur Diagnostik und als mögliche Schlüsselgene zur Therapie

Ein zunehmend wichtigerer Aspekt in der Analyse von Microarraydaten ist die Identifizierung von Biomarkern zur frühzeitigen Diagnosestellung und möglichen Schweregradeinschätzung der Sepsis ([292]).

Studien haben gezeigt, dass mit Hilfe von Genexpressionsprofilen nur einer kleinen Anzahl von Genen eine Vorhersage bezüglich des Eintretens einer Sepsis möglich ist ([293],[294],[295]). Auch wurden einzelne Gene identifiziert, um eine Aussage über Schweregrad und Heilungschancen zu erhalten. So identifizierten Pachot et al. den Chemokin-Rezeptor CX3CR1 als einen potentiellen Biomarker ([296]) und Nowak et al. fanden, dass die Expression des Chemokinliganden CCL4 zum Verlauf bei Kindern mit einem septischen Schock korreliert ([297]).

Darüber hinaus gelang auch die Einteilung in Untergruppen bei septischen Patienten durch Genexpressionsprofile, z.B. bei Kindern mit septischen Schock ([298]). Diese Untergruppen sollen in der Zukunft für eine zielgerichtete Therapie genutzt werden.

Neben den diagnostischen Möglichkeiten der Biomarker-Analysen sollen so auch neue Zielgene und Signaltransduktionswege für therapeutische Ansätze gefunden werden. So wurde zum Beispiel in mehreren Studien gezeigt, dass die Expression der Matrix-Metalloproteinase 8 (MMP8) in septischen deutlich höher ist als in nicht-septischen Patienten ([299]). Interessanterweise konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine genetische Ablation und auch eine pharmakologische Inaktivierung der MMP8-Aktivität einen signifikanten Überlebensvorteil bietet ([300]). Auch in der vorliegenden Studie zeigt sich eine signifikante Hochregulation von MMP8 an allen 5 Zeitpunkten kongruent mit den vergleichbaren Studien.

---

[292] Vgl. Pierrakos und Vincent 2010.
[293] Vgl. Sutherland et al. 2011.
[294] Vgl. Johnson et al. 2007.
[295] Vgl. Tang et al. 2008.
[296] Vgl. Pachot et al. 2008.
[297] Vgl. Nowak et al. 2010.
[298] Vgl. Wong 2012.
[299] Vgl. Wong 2012.
[300] Vgl. Solan et al. 2012.

Die weiteren hier gefundenen Biomarker CDADC1, IDH3G, CLEC2B, PARP3 und TXNRD2 entsprechen den Genen, bei denen die Mittelwerte von septischen und nicht-septischen Patienten über mind. drei Zeitpunkte die größtmögliche Differenz aufweisen und somit eine bestmögliche Unterscheidung der beiden Gruppen ermöglicht. CLEC2B (C-type lectin domain family 2, member B) und TXNRD2 (thioredoxin reductase 2) wurden beide auch in der funktionsorientierten Analyse als Schlüsselgene identifiziert und scheinen somit mögliche Ansatzpunkte in der Diagnostik und Therapie zu bieten.
Ein Zusammenhang von CLEC2B mit Sepsis wurde bislang nicht beschrieben. Die verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch den, insbesondere auf Natürlichen Killerzellen exprimierten Rezeptor, wurde gezeigt ([301]).
Auch die Thioredoxin-Reduktase 2 (TXNRD2) wurde bislang nicht im Zusammenhang mit Sepsis beschrieben. Es konnte jedoch ein Zusammenhang mit der Funktion von Mitochondrien, Abwehr von oxidativem Stress und Insulinresistenz gezeigt werden ([302],[303]).

4.2.3. Diskussion der funktionsorientierten Analyse

Nachdem mit den verschiedenen Programmen festgelegt wurde, in welche Richtung die weitere Analyse vorangetrieben werden sollte, legt die funktionsorientierte Analyse ein besonderes Augenmerk auf die Bereiche der angeborenen und der adaptiven Immunantwort, der plasmatischen Kaskaden, der Mitochondrialen Funktion und der Signaltransduktion. Im Folgenden werden nun diese Ergebnisse diskutiert.

4.2.3.1. Derangierte Immunantwort

Im Gegensatz zur weitläufigen Meinung zeigt die Genexpressionsanalyse der vorliegenden Studie keine hervorstechende Hyperinflammation. Typische Inflammationsmarker fehlen. Weder IL-1, TNF, IL-6 noch Procalzitonin sind differentiell reguliert. Trotzdem gibt es verschiedene Hinweise auf eine Hochregulation im Angeborenen Immunsystem.

Die Rolle der TLR-Familie bei Sepsis Die Initiierung der Immunantwort über TLRs scheint aufgrund der Hochregulation von MD-2, TLR-2 und IRAK4 verstärkt stattzufinden. Verschiedene Studien haben für TLR-2 und vor allem TLR-4 eine verstärkte Expression und sogar eine Korrelation zur Mortalität bei Sepsis festgestellt ([304],[305]). Somit entsprechen die Ergebnisse der vorliegenden Studie den bereits vorhandenen Forschungserkenntnissen.

[301] Vgl. Welte et al. 2006.
[302] Vgl. Edvardsen et al. 2013.
[303] Vgl. Chen et al. 2006.
[304] Vgl. Armstrong et al. 2004.
[305] Vgl. Williams et al. 2003.

Überraschend ist jedoch die fehlende Aktivierung der folgenden Signaltransduktionsmoleküle. Im Gegenteil sind sogar TRAF3 als wichtiges Verbindungsglied und NF-κB als Haupttranskriptionsfaktor der Inflammation herunterreguliert.

Kongruent dazu wurde bereits festgestellt, dass es im Verlauf einer Sepsis bzw. einem septischen Schock zur Herunterregulation der inflammatorischen Antwort in Blutzellen kommt ([306]) und dies mit der Entwicklung von Multiorganversagen korreliert ([307]). In einer Studie durch Salomao et al. wurde zudem die Reaktion von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten getrennt untersucht. Die Genexpression der beiden Zellreihen unterschied sich dabei deutlich und zeigte bei den Monozyten eine Herunterregulation der TLR-Signaltransduktion, während in den Granulozyten eine Aktivierung sichtbar wurde. Interessanterweise ist die verminderte Aktivität in Monozyten vor allem in den nachgeordneten Genen der Signaltransduktion und Effektormolekülen stärker als in der TLR-Familie selbst sichtbar ([308]). Somit spiegeln die Ergebnisse der vorliegenden Studie die vereinten Resultate von Salomao et. al. wider.

Die Expression der IL-1-Gen-Gruppe und ihre Folgen Prototyp eines proinflammatorischen Mediators ist Interleukin-1 und es steht beispielhaft für die gesamte Genexpression in der Inflammation. Das Zytokin selbst ist nicht differentiell reguliert. Die Expression der Rezeptoren und zugehöriger Proteine zeigt jedoch sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung der Interleukin-1-Signaltransduktion in septischen Patienten. Somit zeigt sich hier stellvertretend für die übrige Immunantwort das gleichzeitige Bestehen einer Hyperinflammation und einer Immunsuppression. Für das eigentliche Zytokin wurde in septischen Patienten keine gute Korrelation mit Mortalität und Organversagen gefunden ([309]). Dagegen konnte für den auch in der vorliegenden Studie hochregulierten Rezeptor IL1R1 ein Anstieg nach Endotoxingabe festgestellt werden. Bemerkenswerterweise wurden höhere Konzentrationen in überlebenden als in nicht-überlebenden Patienten einer Sepsis gefunden ([310]). Somit scheint der Rezeptor zwar ein Hinweis für das Bestehen einer Sepsis zu sein, gleichzeitig aber seine erhöhte Expression einen Überlebensvorteil darzustellen, der in der effektiveren Immunabwehr besteht.

Die Reaktion Neutrophiler Granulozyten In der Literatur wird eine starke Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten-Funktion bei Sepsis beschrieben ([311]). Damit übereinstimmend zeigen sich auch in der vorliegenden Genexpressionsanalyse Anzeichen für

[306] Vgl. Ertel et al. 1995.
[307] Vgl. Kirchhoff et al. 2009.
[308] Vgl. Salomao et al. 2009.
[309] Vgl. Giannoudis et al. 2004.
[310] Vgl. Giannoudis et al. 2004.
[311] Vgl. Nathan 2006.

eine Granulozytenaktivierung. Auffällig ist, dass diese vor allem gegen Mitte und Ende des Zeitverlaufs sichtbar wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen Mechanismen liegt die Regulation der Granulozyten auf Transkriptionsebene somit am Zeitpunkt der tatsächlichen klinischen Sepsis sowie darüber hinaus.

Die differentiell exprimierten Gene in der vorliegenden Studie ergeben mehrere Hinweise für eine aktivierte Pathogenabwehr mit verstärktem „oxidative burst". Das heraufregulierte CYBB ist Bestandteil der NADPH Oxidase 2 (NOX2), die vornehmlich für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Neutrophile Granulozyten zuständig ist und signifikant zur mikrozirkulatorischen Dysfunktion bei einer Sepsis beiträgt ([312]).

Unter den Genen, die in die Degranulation der Neutrophilen involviert sind, wurde für eine Inhibition von MMP8 ein Schutz vor einem Endotoxinschock im Mausmodell nachgewiesen ([313]). Auch für Lactotransferrin gibt es Ansätze, dessen Eigenschaften therapeutisch auszunutzen ([314]).

Die Genexpressionsanalyse im Zeitverlauf zeigt, dass während MMP8 und die Gene des „oxidative burst" direkt nach einem Polytrauma bereits erhöhte Werte aufweisen und somit schon früh therapeutisch beeinflusst werden können, LTF erst etwas später eine Rolle spielt. Dieser Aspekt im Zusammenhang mit der Überlegung, dass an Tag 9 bei einigen Funktionen eine Umkehr der Genexpression stattfindet, unterstützt darüber hinaus die These, dass für die Resolution der Sepsis eine effektive Immunität notwendig ist.

Zusammen mit der vorliegenden eingeschränkten Chemotaxis in septischen Patienten ergibt sich ein hohes Gefahrenpotential. Werden Neutrophile Granulozyten durch die disseminierten Mediatoren aktiviert und es kommt zur verstärkten Degranulation, ohne dass sie zum Infektionsort vordringen, kommt es zur generalisierten Gewebs- und Gefäßschädigung ([315]).

4.2.3.2. Suppression des Adaptiven Immunsystems

Statt der erwarteten starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems fällt zunächst ins Auge, dass in der Genexpression eine starke Herunterregulation der Adaptiven Immunität gleich zu Beginn des Zeitverlaufs vorliegt. Die Funktionen sind auf verschiedenen Ebenen der Aktivierung vermindert. Angefangen bei der Antigenpräsentierung, über die rezeptorvermittelte Kostimulation bis zur humoralen Aktivierung zeigen sich in septischen Patienten geringere Expressionswerte bei in diesem Zusammenhang wichtigen Genen.

[312] Vgl. Nathan 2006.
[313] Vgl. Hu et al. 2005.
[314] Vgl. Kruzel et al. 2007.
[315] Vgl. Reddy und Standiford 2010.

Stattdessen sind Gene hochreguliert, welche die T-Zell-Funktion abschwächen und von einer Th_1- zu einer Th_2 Antwort führen. Es zeigen sich sogar Anzeichen für die Entwicklung einer T-Zell-Anergie, dem Ruhezustand von T-Zellen, bedingt durch eine mangelnde oder fehlerhafte Stimulation. Die apoptotische Depletion von Lymphozyten trägt durch die Verringerung der absoluten Anzahl von Immuneffektorzellen sowie der Induktion eines anti-inflammatorischen Status in Phagozyten zur Immunparalyse bei. Diese Suppression des Adaptiven Immunsystems ist ein bekannter Mechanismus sowohl während einer Sepsis als auch bei Patienten mit Polytrauma ([316],[317]).

Die Dysregulation der Adaptiven Immunantwort wurde lange als eine späte Komplikation bei Sepsis gesehen, neuere Erkenntnisse sowie auch in der vorliegenden Studie zeigen jedoch, dass die Suppression bereits viel früher auftritt und mehr oder weniger gleichzeitig mit einer verstärkten Proinflammation vorliegt ([318]). Wir konnten bereits kurz nach Einlieferung auf die Intensivstation, vor allem jedoch nach einem und drei Tagen eine allumfassende Suppression der Adaptiven Immunantwort feststellen.

Auch in anderen Genexpressionsanalysen bei Sepsis konnten verschiedene Merkmale einer Suppression der Adaptiven Immunantwort festgestellt werden. Johnson et al. fanden 2007 mehrere differentiell regulierte Gene der T-Zell-Differenzierung im Vergleich von SIRS und Sepsis. Überraschenderweise ergaben sich hier auch Hinweise für eine Th1-Differenzierung ([319]). Dagegen fanden sich in einer Genexpressionsstudie mit polytraumatisierten Patienten und MODS Alterationen in der adaptiven Immunität, die für die Induktion einer Anergie und einer erhöhten Apoptoserate in T-Zellen sprechen ([320]).

Insgesamt stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit bereits bekannten Forschungserkenntnissen überein. Im Einzelnen konnten jedoch neue Details zum Gesamtbild der Sepsis hinzugefügt und über den Zeitverlauf verfolgt werden.

Auswirkung der verminderten Antigenpräsentation Es ist bekannt, dass die Expression von HLA-DR umgekehrt mit der Schwere des septischen Verlaufs korreliert, wobei eine niedrige Expression für einen schlechten Ausgang spricht ([321]). Diagnostisch wird es bereits zum Immunmonitoring Sepsis-gefährdeter Patienten angewendet. Auch in der vorliegenden Genexpressionsanalyse findet sich eine verminderte Expression eines HLA-D Gens. Über den Zeitverlauf betrachtet, liegen die niedrigsten Werte von HLA-DPB1 an den Tagen 1 und 3, während direkt nach 12 Stunden noch

[316] Vgl. Hotchkiss et al. 2005.
[317] Vgl. Tschoeke und Ertel 2007.
[318] Vgl. Hotchkiss et al. 2009.
[319] Vgl. Johnson et al. 2007.
[320] Vgl. Laudanski et al. 2006.
[321] Vgl. Tschoeke und Ertel 2007.

kein signifikanter Unterschied feststellbar ist. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Genexpression von HLA-DMA und Cathepsin S dazu beitragen könnten, die Kapazität der Antigenpräsentation zu bewerten und somit für ein Monitoring einsetzbar wären.
Erkenntnisse über die Regulation während einer Sepsis liegen ferner für das Chemokin CCL5 vor. Dessen Expression korreliert negativ mit dem Apache II Score ([322]) und auch die Vorhersage einer DIC bei Frühgeborenen ist möglich ([323]). In der vorliegenden Studie ist CCL5, übereinstimmend zu diesen Forschungsergebnissen, herunterreguliert. Neben den prädiktiven Eigenschaften machen es die pleotrophen Effekte mit Wirkungen sowohl in adaptiver als auch angeborener Immunantwort darüber hinaus zu einem möglichen Ziel für eine therapeutische Intervention.

Zusammenhang zwischen Hypoxie und T-Zell-Funktion Verschiedene Begleitumstände von Polytrauma und Sepsis machen das Bestehen einer Hypoxie sehr wahrscheinlich. Die hochregulierte Genexpression von HIF-1 deutet dabei auf das Bestehen eines Sauerstoffmangels bei septischen Patienten hin. Es ist bekannt, dass HIF zu einer erhöhten Anzahl regulatorischer T-Zellen führt, welche die TCR-Signaltransduktion hemmen ([324]) und außerdem zu einem septischen Verlauf über die Induktion proinflammatorischer Zytokine beitragen kann ([325]). Es wurde gezeigt, dass eine Deletion von HIF die T-Zell-Suppression in entzündetem, hypoxischem Gewebe unterbindet und so zu einem Überlebensvorteil führt ([326]). Da die Studie in Mäusen durchgeführt wurde, muss die Relevanz des Mechanismus in Menschen noch erwiesen werden.
Die Rolle HIFs im Rahmen einer Sepsis erstreckt sich auch auf andere Bereiche, da sowohl eine gesteigerte Proinflammation der angeborenen Immunität ([327]) als auch eine Rolle für HIF in der Mitochondrialen Dysfunktion ([328]) gezeigt werden konnten.
Darüber hinaus ist auch über Adenosin bekannt, dass es bei Hypoxie verstärkt freigesetzt wird und es über verschiedene Mechanismen die T-Zell-Funktion negativ reguliert ([329],[330]). Auch wenn die Adenosinrezeptoren unterschiedlich reguliert sind, kann man doch darauf schließen, dass Adenosin bei der Entwicklung einer Sepsis eine Rolle spielt. Somit scheint Hypoxie insgesamt im Verlauf einer Sepsis beteiligt zu sein und stellt einen weiteren Mechanismus für die Suppression der T-Zell-Funktion dar.

[322] Vgl. Cavaillon et al. 2003.
[323] Vgl. Ng et al. 2006.
[324] Vgl. Sitkovsky und Lukashev 2005.
[325] Vgl. Peyssonnaux et al. 2007.
[326] Vgl. Thiel et al. 2007.
[327] Vgl. Nizet und Johnson 2009.
[328] Vgl. Regueira et al. 2009.
[329] Vgl. Yang et al. 2010.
[330] Vgl. Himer et al. 2010.

Die Bedeutung der Apoptose Seit langem ist die gesteigerte Apoptoserate bei Sepsis beschrieben. Sie gilt dabei als Gegenregulation der initialen Proinflammation und als Teil der Suppression des Adaptiven Immunsystems. Die Hauptmechanismen sind dabei die Beseitigung lymphatischer Effektorzellen und die antiinflammatorische Wirkung der apoptotischen Zellen auf die Phagozyten durch die Induktion von T-Zell-Anergie und einer Th2-Antwort ([331]). Die Erkenntnis, dass der Grad der Apoptose in Lymphozyten mit der Schwere der Sepsis korreliert, unterstreicht dabei die Bedeutung des programmierten Zelltods im Zuge einer Sepsis ([332]).

Diese Korrelation weist ferner auf die Möglichkeit hin, den Grad der Apoptose zum Monitoring des Sepsisverlaufs anzuwenden. In der vorliegenden Studie zeigen sich verschiedene Mechanismen, die für eine starke Aktivierung der Apoptose in septischen Patienten sprechen. Es liegt eine Hochregulation der Caspasekaskade vor, die auf gesteigerte Induktionsmechanismen sowie eine verminderte Hemmung des programmierten Zelltods zurückzuführen ist.

Gleichzeitig werden einige Hemmmechanismen verstärkt exprimiert, die jedoch durch die Apoptosesignaltransduktion selbst reaktiv aktiviert werden und somit die Annahme einer primär gesteigerten Apoptoserate unterstützen. Erste Studienergebnisse zur therapeutischen Beeinflussung der Apoptose als Sepsistherapie bieten vielversprechende Ansätze, gleichzeitig zeigen sich auch die Schwierigkeiten und potentiellen Gefahren, die in der Manipulation des komplexen Regulationsnetzwerkes liegen. So hat zum Beispiel die Inhibition von Caspase 8 einen Überlebensvorteil im Mausmodel gezeigt ([333]). Dies sowie die starke Hochregulation gleich zu Beginn, 12 Stunden nach Polytrauma, machen die Caspase zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere therapeutische Studien sowie zum Monitoring der Apoptoserate über den Zeitverlauf.

Auch in anderen Studien zeigte sich in der Genexpressionsanalyse eine gesteigerte Apoptoserate ([334],[335]). Interessanterweise sind die beiden zitierten Studien einmal mit mononuklearen Zellen und einmal mit Vollblut durchgeführt wurden. In einer Studie von Tang et al. mit Neutrophilen Granulozyten zeigte sich dagegen keine deutliche Aktivierung der Apoptose ([336]). Somit wird bestätigt, dass die Apoptose vor allem in lymphatischen Zellen gesteigert wird, während sie in Neutrophilen Granulozyten nicht verstärkt oder unter Umständen sogar vermindert abläuft.

[331] Vgl. Adib-Conquy und Cavaillon 2009.
[332] Vgl. Hotchkiss et al. 2005.
[333] Vgl. Wesche et al. 2005.
[334] Vgl. Tang et al. 2009.
[335] Vgl. Johnson et al. 2007.
[336] Vgl. Tang et al. 2007.

Die Analyse des Zeitverlaufs zeigt einen sequentiell ablaufenden Prozess. Gleich zu Beginn sind Caspasekaskade und apoptoseinduzierende Mechanismen hochreguliert. Gleichzeitig werden reaktiv Hemmmechanismen aktiviert. Der Wegfall anderer Hemmmechanismen beginnt dabei langsam und ist besonders deutlich erst am Tag 9 zu sehen. Somit bietet die Genexpression der in die Apoptose involvierten Gene eine gute Möglichkeit zur Verfolgung des Krankheitsverlaufs und verschiedene Ansätze für eine therapeutische Intervention.

Zusammenspiel der adaptiven und angeborenen Immunität Differentiell regulierte Gene auf allen Ebenen der Adaptiven Immunität lassen auf eine generelle Dysregulation schließen. Die Tatsache, dass bereits die Aktivierung durch das Angeborene Immunsystem via Antigenpräsentation, Kostimulation und Zytokinausschüttung vermindert stattfindet, gibt Hinweise für die pathophysiologischen Zusammenhänge einer Sepsis. Somit ist anzunehmen, dass nicht das Adaptive Immunsystem einer isolierten Fehlregulation unterliegt, sondern es insgesamt zu einem Ungleichgewicht in der Immunantwort kommt. Interessant für das Gesamtverständnis der Abläufe bei einer Sepsis ist darüber hinaus, dass unlängst gezeigt werden konnte, dass eine T-Zell-vermittelte Regulation der frühen Angeborenen Immunität nötig ist, um Kollateralschäden zu minimieren und die Wirtsverteidigungsantwort (host defense response) zu optimieren ([337]). Eine dysregulierte Adaptive Immunantwort kann daher auch das Angeborene Immunsystem beeinflussen und hier zu einem Ungleichgewicht führen.

Somit kann in der Entwicklung einer Sepsis von einem Teufelskreis gesprochen werden. Es findet eine unzureichende oder fehlgeleitete Aktivierung der Adaptiven durch die Angeborene Immunität statt. Dieses führt zur Störung der T-Zell-Funktion, die dann wiederum in der fehlenden Regulation des Angeborenen Immunsystems resultiert. Auf diese Art und Weise verstärken sich Hyperinflammation der Angeborenen Immunität und Immunsuppression der Adaptiven Immunität gegenseitig.

4.2.3.3. Dysregulation plasmatischer Kaskaden

Die plasmatischen Kaskaden des Komplementsystems, der Gerinnung und der Fibrinolyse weisen, neben ihren Gemeinsamkeiten im Aufbau mit Serinproteasen, unzählige direkte und indirekte Verbindungen auf. Seit Jahren beschäftigen sich Studien mit der Erforschung der gegenseitigen Wechselwirkungen und ihrem Einfluss auf Sepsis und Multiorganversagen ([338]).

[337] Vgl. Kim et al. 2007; Kim et al. 2004.
[338] Vgl. Rittirsch et al. 2008.

Für das Komplementsystem ist im Verlauf einer Sepsis eine frühe, starke Aktivierung mit erhöhten Serumleveln der Komplementfaktoren bekannt ([339]). Trotzdem finden sich in der vorliegenden Genexpressionsanalyse eine Herunterregulation mehrerer Faktoren sowie eine verstärkte Hemmung. Einzig zwei Rezeptoren sind hochreguliert und deuten eine Proinflammation an, die eventuell auf Genexpressionsebene bereits abgelaufen ist. Darüber hinaus könnte die Hochregulation der zwei Rezeptoren auch eine kompensatorische Maßnahme auf die verminderte Expression der Komplementfaktoren darstellen.

Interessanterweise ist für den Rezeptor CR1 beschrieben, dass er auch antiinflammatorische Wirkungen hat und insbesondere in T-Zellen ein hemmendes Signal auslöst ([340]).

Rolle der Koagulation Es ist gut belegt, dass es im Verlauf einer Sepsis zur Aktivierung des Blutgerinnnungssystems und gleichzeitig zu einer Inhibierung hemmender Mechanismen und einer verminderten Fibrinolyse kommt. Durch die enge ``Verzahnung'' von Gerinnung und Immunsystem findet eine gegenseitige Beeinflussung und Verstärkung statt ([341]). Dies kann sich so weit entwickeln, dass es zur sogenannten Disseminierten Intravasalen Gerinnung (DIC) kommt und durch die Entstehung von Mikrothromben und Organdysfunktion zur Schwere des Krankheitsbildes beiträgt ([342]).

Konkordant zu den bekannten Forschungsergebnissen zeigen sich auch in der vorliegenden Studie eine Aktivierung der Gerinnungskaskade und eine eingeschränkte Fibrinolyse.

Die Behandlung septischer Patienten mit aktiviertem **Protein C** (APC) war in den letzten Jahren ein Hoffnungsschimmer in der Intensivmedizin. Die Administration scheint die Mikrozirkulation zu verbessern, die Reduzierung der Gesamtmortalität bei Sepsis ließ sich letztendlich jedoch nicht nachweisen, so dass Drotrecogin wieder vom Markt genommen wurde.

Auch in der vorliegenden Studie ist die Expression von PROC vermindert und zeigt einen Mangel des Gerinnungshemmers auf. Im Zeitverlauf wird dieser vor allem an den Tagen 1 und 3 deutlich und bietet so die Möglichkeit, bereits vor der Entstehung der klinischen Sepsis den Status der Blutgerinnung zu überwachen. Der Einsatz von APC in polytraumatisierten Patienten wurde ebenfalls getestet und auch hier 2006 insgesamt ein Vorteil gezeigt, trotz erhöhtem Blutungsrisiko ([343]). Dies wirft die Frage auf, ob eine vorherige Testung des PROC-Status mit Hilfe von Microarrays zur Risikostratifi-

[339] Vgl. Hecke et al. 1997.
[340] Vgl. Wagner et al. 2006.
[341] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[342] Vgl. Esmon 2004.
[343] Vgl. Dahabreh et al. 2006.

zierung eingesetzt werden kann und ob so ein therapeutischer Einsatz doch einen Vorteil bieten könnte.

Einfluss der Fibrinolyse Diverse Verknüpfungen zwischen Fibrinolyse und Inflammation lassen auf einen Einfluss dieser plasmatischen Kaskade auf den Verlauf einer Sepsis schließen. Neben den negativen Effekten der verminderten Funktion auf die Mikrozirkulation wurde für mehrere Bestandteile eine Wechselwirkung mit der inflammatorischen Immunantwort nachgewiesen ([344]).

Die Plasmakonzentration des Fibrinolyseaktivators **PAI-1** (SERPINE1) ist in septischen Patienten stark erhöht und ihr Level hoch prädiktiv für einen ungünstigen Krankheitsverlauf ([345]). Es bleibt dabei zu evaluieren, in wie weit diese Erhöhung funktionelle Konsequenzen hat oder vornehmlich einen guten Verlaufsparameter darstellt ([346]). Die frühe Hochregulation bereits vor Beginn der klinischen Sepsis bietet jedoch einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere Forschungen in beide Richtungen.

Der Fibrinolyseaktivator **PLAU** (plasminogen activator, urokinase) ist bekannt für seine Wirkung im Gerinnungssystem. Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass PLAU als Modulator sowohl der Angeborenen als auch der Adaptiven Immunantwort dient und sogar als endogenes Antibiotikum wirken kann ([347]). Die verminderte Expression gleich zu Beginn des Zeitverlaufs in septischen Patienten stellt somit einen weiteren Ansatzpunkt für eine frühe Therapie der Sepsis dar.

Aktivität der Thrombozyten Neben der Gerinnungskaskade zeigen auch die Blutplättchen im Lauf einer Sepsis eine gesteigerte Aktivität. Angeregt werden sie sowohl durch LPS als auch durch proinflammatorische Zytokine ([348]). Zusätzlich tragen sie im aktivierten Zustand zur Proinflammation durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei und regen vor allem Neutrophile Granulozyten zur gesteigerten Aktivität an. Die vorliegende Genexpressionsanalyse zeigt bereits zu Beginn des Zeitverlaufs eine hochregulierte Thrombozytenfunktion. Besonders die beiden Rezeptoren ITGB3 und CLEC2 (entspricht CLEC1B) könnten Ziele einer therapeutischen Intervention darstellen und bieten gute Voraussetzungen für eine weitere Erforschung ihrer Regulation und pathophysiologischen Effekte im Verlauf einer Sepsis. Über ITGB3 sind im Zusammenhang mit Sepsis keine Studien veröffentlicht, es hat sich jedoch gezeigt, dass es eine wichtige Rolle in der Entstehung von Asthma und Allergien hat ([349]).

[344] Vgl. Schouten et al. 2008.
[345] Vgl. Raaphorst et al. 2001.
[346] Vgl. Schouten et al. 2008.
[347] Vgl. Jin et al. 2005.
[348] Vgl. Zimmerman et al. 2002.
[349] Vgl. Thompson et al. 2007.

CLEC2 wurde vormals als thrombozytenspezifisch angesehen, interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass auch Neutrophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen den Rezeptor exprimieren, dieser die Phagozytose anregt und zur vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine führt ([350]).

4.2.3.4. Rolle der Mitochondrialen Dysfunktion bei einer Sepsis

Die Erkenntnis, dass in septischen Patienten oftmals vielmehr eine Sauerstoffutilisationsstörung als eine Beeinträchtigung der Zufuhr vorliegt, führte zur Theorie der Mitochondrialen Dysfunktion bei Sepsis. Diese sogenannte zytopathische Hypoxie im Zusammenspiel mit der generellen Abschaltung energieverbrauchender Prozesse in den Zellen trägt signifikant zur Entwicklung einer Sepsis bei ([351]). Ihr Ausmaß korreliert mit der Schwere und dem Behandlungserfolg eines Septischen Schocks ([352]).

Tang et. al. fanden mit Hilfe von Genexpressionsanalysen eine Mitochondriale Dysfunktion in Neutrophilen aus Vollblut septischer Patienten ([353]).

Auch in der vorliegenden Studie finden sich Hinweise für eine verminderte Funktion von Enzymen der Atmungskette. Die Untereinheit COX7A2L des Komplexes IV, der Zytochrom C Oxidase, ist signifikant über den gesamten Zeitverlauf herunterreguliert und bestätigt die speziell für diesen Enzymkomplex bekannte Dysfunktion bei Sepsis ([354]).

In der vorliegenden Studie wurde eine Einschränkung in der mitochondrialen β-Oxidation gefunden. Allgemein ist wenig bekannt über die Funktion während einer Sepsis, es konnte jedoch eine Herunterregulation durch LPS in Mäusen ([355]) und endotoxemischen Ratten ([356]) gezeigt werden.

Auswirkungen von oxidativem Stress Ein weiterer Aspekt ist die Generierung oxidativen Stresses durch Mitochondrien und die bekannte, beeinträchtigte Elimination von ROS bei Sepsis. Neben der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies im Zuge des „oxydative burst“, entstehen auch bei diversen Stoffwechselvorgängen ROS und RNS. In der vorliegenden Studie fällt die Hochregulation dreier Gene des α-KGDH-Enzymkomplexes auf, der signifikant zur vermehrten Entstehung von oxidativem Stress beiträgt ([357]).

In der vorliegenden Studie zeigt sich darüber hinaus eine eingeschränkte Abwehrfunktion gegenüber oxidativem Stress, vornehmlich durch den beeinträchtigten Glutathion-

[350] Vgl. Kerrigan et al. 2009.
[351] Vgl. Cinel und Opal 2009.
[352] Vgl. Brealey et al. 2002.
[353] Vgl. Tang et al. 2007.
[354] Vgl. Levy und Deutschman 2007.
[355] Vgl. Feingold et al. 2008.
[356] Vgl. Takeyama et al. 1990.
[357] Vgl. Tretter und Adam-Vizi 2005.

metabolismus. Insbesondere die verminderte Expression der Glutathion-Synthetase (GSS) und der Gamma-Glutamyltransferase, die für das Recycling von Glutathion zuständig ist, sprechen für die verminderte Produktion des Antioxidans in septischen Patienten. Es liegen relativ wenige Informationen über den Glutathionhaushalt im Verlauf einer Sepsis vor. So konnte in Kindern mit Sepsis eine um 60% reduzierte Glutathionsynthese entdeckt werden ([358]), und auch in operativen Patienten mit septischer Komplikation zeigte sich eine verminderte Glutathionkonzentration ([359]).

Die vorliegende Studie findet Hinweise für ein vermehrtes Aufkommen von oxidativem Stress in septischen Patienten. Auf den Verlauf einer Sepsis kann dies schwerwiegende Folgen haben. So wurden neben der verstärkten Gewebe- und Gefäßschädigung auch Einflüsse auf diverse Zellmechanismen wie die Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette und ATP-Produktion nachgewiesen.

Ein bemerkenswerter Gedanke betrifft die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Induktion einer Insulinresistenz. Der Theorie nach soll eine gesteigerte Glukoseaufnahme zur Entstehung von vermehrtem oxidativem Stress im Rahmen der Energieproduktion führen. Konsequenterweise führt somit die bei septischen Patienten beobachtete Insulinresistenz zu verminderter Entstehung von ROS und RNS ([360]). Therapeutisch könnte man somit durch die Bekämpfung des oxidativem Stresses die Insulinresistenz beeinflussen.

In diesem Zusammenhang ist die Rolle von ROCK1 zu erwähnen, einer Serin-Threonin-Kinase, die gleichzeitig die Produktion von NO hemmt, aber auch zur verminderten Insulin-Signaltransduktion durch die Phosphorylierung von IRS-1 beiträgt ([361]).

Die Genexpression in der vorliegenden Studie zeigt eine starke Hochregulation über den gesamten Zeitraum. Dies weist auf einen weiteren physiologischen Mechanismus hin, der durch die Verbesserung des einen Zustands eine Verschlechterung in einem anderen hervorruft.

4.2.3.5. Eingeschränkte Signaltransduktion in septischen Patienten

Kommunikation zwischen Zellen, aber auch von der Zelloberfläche ins Innere der Zelle in Form von diversen Signaltransduktionswegen, bildet die Basis für den geordneten Ablauf von Zellfunktionen.

Zytokine und Chemokine sind Moleküle der extrazellulären Signaltransduktion. In der vorliegenden Studie wurden mehrere Hinweise für eine Alteration in septischen Patienten gefunden. Darüber hinaus ist die Expression weiterer Gene auffällig.

[358] Vgl. Biolo et al. 2007.
[359] Vgl. Biolo et al. 2007.
[360] Vgl. Erol 2007.
[361] Vgl. Kanda et al. 2006.

Für die Reaktion der Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (**HPGD**) bei Sepsis liegen noch keine Informationen vor. In der vorliegenden Studie zeigt sie sich jedoch durch eine starke Hochregulation auffällig. Durch ihre antiinflammatorische Funktion in der Deaktivierung verschiedener Prostaglandine kann sie zur allgemeinen Immunparalyse beitragen und macht sie zu einem möglichen Ziel einer therapeutischen Intervention.
Im Gegensatz dazu wurde die Funktion von **HMBG1** bei Sepsis vielfach beschrieben. Seine unterschiedlichen Wirkungen tragen zur Proinflammation bei und beeinflussen signifikant den Verlauf der Krankheit ([362]). Die hochregulierte Genexpression weist dazu auf seine Eigenschaft als aktiv sezerniertes Protein hin, da die akzidentelle Freisetzung durch nekrotische Zellen keine Auswirkung auf diese haben dürfte.
Relativ wenig ist wiederum über die Funktion von **CLEC2B** (entspricht CLECSF2) bei Sepsis bekannt. Die hohe Genexpression über den gesamten Zeitraum macht es jedoch für weitere Investigationen lohnenswert. Schließlich ist eine verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch den insbesondere auf Natürlichen Killerzellen exprimierten Rezeptor beschrieben ([363]).
Die Proteinkinase D zählt zu den wichtigsten intrazellulären Signaltransduktionsgliedern. Ihre Herunterregulation, wie sie in der vorliegenden Studie gefunden wurde, hat somit Auswirkungen auf eine Reihe von Zellfunktionen wie Proliferation, Invasion, Apoptose und der Aktivierung von NF-κB ([364],[365]).
Der Phospholipidstoffwechsel bringt eine Vielzahl von Signalmolekülen mit unterschiedlichen Wirkungen hervor. Somit beeinflusst die Alteration der Genexpression ihrer Enzyme gleich mehrerer Prozesse in den Zellen und kann zur verminderten Signaltransduktion in septischen Patienten beitragen ([366]). In der vorliegenden Studie sind mehrere Gene des Phospholipidstoffwechsels differentiell reguliert und insbesondere die gesteigerte Expression der hemmend wirkenden PLCL1 und die verminderte Expression der PLCB1 bieten die Basis für weitere Nachforschungen.
Der Ruf der **MAP-Kinasen** ist seit jeher mit der Proinflammation im Zuge einer Infektion und Sepsis verlinkt. In der vorliegenden Studie wurde erwartungsgemäß eine Heraufregulation einiger in die Stress-aktivierte p38 MAPKinasen involvierten Gene gefunden. Eins der wichtigsten Signaltransduktionsmoleküle ist dabei JUND, das gleich zu Beginn in septischen Patienten verstärkt exprimiert wird.
Im Gegensatz dazu finden sich in der klassischen MAPK-Kaskade, die vor allem durch Wachstumshormone stimuliert wird, Hinweise auf eine Aktivierung in septischen Pati-

[362] Vgl. Rittirsch et al. 2008.
[363] Vgl. Welte et al. 2006.
[364] Vgl. Mihailovic et al. 2004.
[365] Vgl. Rozengurt et al. 2005.
[366] Vgl. Blazer-Yost und Nofziger 2005.

enten. Dies kann als Indiz für einen vermehrten Bedarf für Proliferation und Differenzierung bei Sepsis nach Polytrauma gedeutet werden.

WASL ist, wie das besser bekannte WASP, Mitglied einer Familie verschiedener Signaltransduktionsmoleküle, die neben ihrer Funktion in der Aktinpolymerisation diverse Zellprozesse beeinträchtigen. Das mit WASP assoziierte Wiskott-Aldrich-Syndrom ist durch wiederkehrende bakterielle und virale Infektionen, eine Thrombozytopenie, B- und T-Zell-Dysfunktion und eine Lymphopenie durch verstärkte Apoptose charakterisiert. Ähnliche Symptome lassen sich auch bei einem Mangel des Proteins finden und insbesondere wurde eine T-Zell-Rezeptordysfunktion beschrieben ([367],[368]). In der vorliegenden Studie liegen eine verminderte Expression über den gesamten Zeitverlauf sowie Hinweise auf eine verstärkte Hemmung durch PSTPIP2 und PTPN12 vor.

In der Insulinsignaltransduktion finden sich verschiedene Gengruppen, die differentiell reguliert sind und mögliche Mechanismen für die Entwicklung der bekannten Insulinresistenz bei Sepsis aufzeigen. Es zeigt sich eine Hochregulation hemmender Gene sowohl im Zuge einer negativen Rückkopplung als auch durch inflammationsassoziierte Proteine. Die Phosphotyrosin Phosphatase **SHP2** bietet dabei einen möglichen Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention. Es wurde gezeigt, dass ein Mangel der Phosphatase mit einer Insulinresistenz und einer verminderten Glukoseaufnahme einhergeht ([369]). Die starke Herunterregulation des Gens über den gesamten Zeitverlauf lässt somit auf eine gute Beeinflussbarkeit hoffen.

Es gibt eine Reihe von Proteinen, die sowohl im Immunsystem als auch in der Insulinsignaltransduktion eine Rolle spielen. So ist sowohl für **CEACAM1** als auch für **SOCS3** bekannt, dass sie hemmende Wirkungen in beiden Systemen haben ([370],[371]). In der vorliegenden Studie zeigten sich beide Gene hochreguliert und somit vielversprechend für eine potentielle Manipulation.

Der Sphingosin-Ceramid-Metabolismus schlägt zudem eine Brücke zwischen Apoptose und Insulinmetabolismus ([372],[373]). Die Genexpression beteiligter Gene lässt auf die Blockierung des Insulinrezeptors durch Ceramid schließen, das gleichzeitig die Apoptoserate erhöht. Hier bietet sich also die Möglichkeit der Beeinflussung gleich zweier kritischer Faktoren bei der Entstehung einer Sepsis.

[367] Vgl. Thrasher 2002.
[368] Vgl. Silvin et al. 2001.
[369] Vgl. Princen et al. 2009.
[370] Vgl. Najjar 2002.
[371] Vgl. Lebrun und van Obberghen 2008.
[372] Vgl. Hait et al. 2006.
[373] Vgl. Wang et al. 2014.

4.2.4. Die Zeitverlaufsanalyse

Die allgemeine Analyse des Zeitverlaufs bietet einen ersten Eindruck über die Genexpression in septischen und nicht-septischen Patienten. Über den Zeitverlauf gesehen lässt sich feststellen, dass die meisten Gene am Tag 1 signifikant exprimiert sind. Entsprechend sind hier auch die meisten funktionellen Gruppen differentiell reguliert. Für das Verständnis der Sepsis bedeutet dies, dass die größten Unterschiede in der Genexpression am Anfang des Zeitverlaufs zu liegen scheinen, noch vor der klinischen Manifestation einer Sepsis. Eine Unterscheidung zwischen septischen und nicht-septischen Patienten ist noch vor der klinischen Diagnose, allein anhand der Genexpression, möglich.
Offen bleibt jedoch, ob diese Unterschiede zur Entwicklung einer Sepsis führen, ob also eine Prädisposition zur Entwicklung einer Sepsis besteht oder ob sie bereits Ausdruck der Sepsis sind und den späteren Phänotyp widerspiegeln.

Insgesamt lässt sich eine derangierte Signaltransduktion in septischen Patienten feststellen, die in ihrer Gesamtheit zum kritischen Verlauf einer Sepsis beitragen kann.
Unklar bleibt, ob alle Mechanismen, die bei einer Sepsis gefunden werden, wirklich nachteilig für die Patienten sind. Einige Studien haben gezeigt, dass die Beeinflussung eines oder mehrerer Gene zwar den Mechanismus auf ein Normalniveau reguliert, die Überlebensrate der Patienten aber nicht beeinflusst oder sogar verschlechtert ([374]). Man muss daher annehmen, dass viele Prozesse, die bei septischen Patienten anders reguliert werden, Kompensationsmechanismen sind, deren Manipulation die Situation sogar noch verschlechtern kann. Es ist daher sorgfältig zu prüfen, ob den entdeckten Mechanismen nicht andere Ursachen zu Grunde liegen, die weiterverfolgt werden sollten. Man kann nicht automatisch davon ausgehen, dass alle Regulationsmechanismen, die bei septischen Patienten beobachtet werden, zur Sepsis beitragen und zum Nachteil der Patienten sind.

[374] Vgl. Fraser 2006.

5. Konklusion und Ausblick

Kongruent zu den neuesten Forschungsergebnissen wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass die pathophysiologischen Prozesse einer Sepsis aus vielen Bereichen der Zellfunktion stammen. Die Ergebnisse zeigen Schlüsselrollen in den Bereichen der angeborenen und adaptiven Immunsysteme, in den plasmatischen Kaskaden, der Signaltransduktion und der mitochondrialen Funktion. Das Dogma der alles überwältigenden Proinflammation wurde überwunden, trotzdem finden sich mehrere Hinweise für eine aktivierte Angeborene Immunität. Im Gegensatz dazu weist die Adaptive Immunantwort eine profunde Herunterregulation diverser Prozesse mit Induktion einer T-Zell-Anergie und der gesteigerten Lymphozytendepletion per Apoptose auf.

Die plasmatischen Kaskaden zeigen eine starke Aktivierung der Blutgerinnung, während die Fibrinolyse vermehrt gehemmt wird. Auch die Expression des Komplementsystems weist eher auf eine Herunterregulation beziehungsweise bereits abgelaufene Aktivierung hin. Die vorliegende Studie zeigt eine in vielen Bereichen beeinträchtigte Signaltransduktion, deren Folgen sich letztendlich auf die gesamte Reihe der Zellfunktionen auswirken.

Es ist davon auszugehen, dass diese Bereiche keine abgekoppelte Reaktion zeigen, sondern dass es vielmehr ein feines Netzwerk unzähliger Verbindungen gibt, die durch eine gegenseitige Beeinflussung zur Pathophysiologie der Sepsis beitragen.

Die Analyse des Zeitverlaufs hat dabei weitere Möglichkeiten eröffnet. In einigen Bereichen konnten pathophysiologische Prozesse zeitlich eingeordnet werden und somit zu einem besseren Verständnis der chronologischen Abfolge beitragen.

Die Identifikation von Biomarkern ergab bekannte und neue Schlüsselgene für Diagnostik und Therapie. Auch in dieser Studie blieb die Suche nach dem einen „Sepsis-Gen“ erfolglos, das alle septischen von allen nicht-septischen Patienten unterscheidet und dessen Manipulation eine Heilung aller Sepsis-Patienten verspricht. Es ist jedoch ein Szenario denkbar, in dem eine Reihe ausgesuchter Biomarker die Diagnose einer Sepsis frühzeitig ermöglichen und anhand der Ergebnisse dann eine individualisierte Therapie begonnen werden kann. Statt eines einzelnen Gens wird in der Realität ein Satz von Genen dieser syndromhaften Krankheit viel eher gerecht. Statt die Genexpression eines Gens zu messen um eine Sepsis zu diagnostizieren erscheint die Berechnung von „Disease load indices“ (DLIs) ein weitaus vielversprechender Ansatz.

Es ist uns gelungen, durch die Genexpressionsanalyse zentrale „Schalthebel“ in Form einzelner Gene, aber vor allem zusammenhängender Gruppen auszumachen. In wie weit diese als diagnostische Marker oder sogar einer therapeutischen Manipulation dienen könnten, muss das Ziel nachfolgender Studien werden.

6. Zusammenfassung

Dank intensiver Forschung und immer neuen Erkenntnissen hat sich das Bild der Sepsis in den letzten Jahren und Jahrzehnten gewandelt. Trotzdem bleibt das Bild unvollständig und die Entwicklung einer Sepsis ist weiter mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden. Mangelndes Verständnis führt zu einer späten Diagnosestellung und somit zu einer späten Therapie. Das therapeutische Eingreifen in pathophysiologische Prozesse, wie die Beeinflussung einzelner inflammatorischer Parameter, hat bislang keine zufriedenstellenden Behandlungserfolge erzielt.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Ziel verfolgt, sowohl das Verständnis der Sepsis und der komplexen Abläufe, die zu ihrer Entwicklung führen, zu erhöhen, als auch Schlüsselprozesse für diagnostische Zwecke zu identifizieren.

Es wurde eine Untersuchungsmethode gesucht, die nicht nur einzelne Details analysiert, sondern einen möglichst umfassenden Blick auf die pathophysiologischen Mechanismen und Reaktionen des Körpers ermöglicht. Hier bot sich die Verwendung der gut etablierten Microarrayanalyse an. Microarrays messen gleichzeitig die Genexpression tausender Gene anhand der Menge von RNA, die so, als Korrelat für die später entstehenden Proteine, ein vorläufiges Abbild der Zellfunktion bzw. -reaktion bietet.

In dieser prospektiv angelegten Studie wurde peripheres Blut von Patienten nach einem Polytrauma gesammelt, von denen eine Teilmenge im Verlauf eine Sepsis entwickelte. Die transkriptionellen Muster von Patienten mit und ohne Sepsis wurden mithilfe der Codelink Mikroarray Plattform verglichen. Fünf Zeitpunkte, beginnend an Tag 0 (Einlieferung auf der Intensivstation, d. h. innerhalb von 12h nach dem Trauma) bis zum Tag 9 wurden analysiert und die Ergebnisse dann per RT-PCR validiert.

Die Analyse der Microarraydaten ergab differentiell regulierte Gene aus einem breiten Spektrum funktioneller Gruppen. Es zeigten sich Unterschiede in der Reaktion septischer Patienten bei der Immunantwort, in den plasmatischen Kaskaden, der Mitochondrienfunktion und verschiedenen Signaltransduktionswegen. Die Untersuchung des Zeitverlaufs zeigte, dass diese Unterschiede hauptsächlich an den Tagen vor der klinischen Manifestation bestanden, insbesondere nach 24h.

Konkret wurden in den verschiedenen Bereichen die nachfolgend beschriebenen Unterschiede gefunden:

1. Die Untersuchung der Immunantwort offenbart, übereinstimmend mit dem aktuellen Stand der Forschung, eine Suppression der adaptiven Immunität in verschiedenen Teilbereichen, während die angeborene Immunität Zeichen einer Aktivierung aufweist.

2. Die „Disseminierte Intravasale Gerinnung“ ist eine der gefürchtetsten Komplikationen einer Sepsis. Kongruent hierzu fand sich eine höhere Expression von Genen, die in diese plasmatische Kaskade involviert sind, ebenso wie eine reduzierte Fibrinolyse und eine stärkere Aktivierung der Thrombozyten.
3. Die mitochondriale Dysfunktion ist ein weiterer entscheidender Faktor in der Entwicklung eines Organversagens im Rahmen einer Sepsis. Die Genexpression in dieser Studie deckt verschiedene Details auf, wie eine gestörte oxidative Phosphorylierung, vermehrten oxidativen Stress und eine verminderte ß-Oxidation.
4. Kommunikationsprobleme führen nicht nur in großen Firmen oder zwischenmenschlichen Beziehungen zu Fehlern und Krisen, sie halten auch unseren Organismus davon ab, richtig zu arbeiten. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Signaltransduktionswege mit dysregulierter, meist verminderter Genexpression gefunden, die mögliche „Fehlerquellen“ darstellen können.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es möglich war, die Beteiligung verschiedener funktioneller Gruppen in der Entstehung einer Sepsis darzustellen und ihre Entwicklung über den Zeitverlauf nachzuverfolgen. So wurden Möglichkeiten für weitere Studien und detailliertere Nachforschungen aufgezeigt.

7. Englische Zusammenfassung (summary)

Despite all efforts that have been made all to unravel the enigma of sepsis, the development of sepsis remains vague and is still associated with a high mortality rate. Insufficient understanding of the complex processes leading to sepsis is accountable for late diagnosis and treatment and therefore poor outcome.

Aim of this study was therefore improving the comprehension of sepsis and the complex processes leading to its development as well as to find diagnostical key connections and genes.

Microarray analysis has evolved as an important tool for identification of genes and pathways with regulative functions. It thereby has the potential to contribute to the understanding of pathomechanisms as well as it may offer diagnostical possibilities.

The approach of this study was to prospectively collect peripheral blood of patients with multiple trauma of which a proportion developed sepsis. We compared the transcriptional pattern of patients with and without sepsis using the Codelink microarray platform. Five timepoints were analyzed from day 0 (= admission to ICU = within 12h after trauma) until day 9 and the data was validatet per RT-PCR. In order to gain a better understanding of the pathomechanisms leading to sepsis we did not focus on single genes but instead wanted to look at the response of patients after multiple trauma in a general way.

Results show differentially expressed genes involved in the immune response, plasmatic cascades, mitochondrial function and signal transduction. The analasis of the time-course reveales differences mostly before the onset of clinical sepsis, especially after 24h.

Precisely the following differences were found in the different fields:

1. The data uncovers a suppression of the adaptive immune system and reveal its underlying molecular mechanisms. Specifically, genes participating in antigen presentation, activation and co-stimulation of t-cells, TCR signaling and b-cell activation were expressed at a lower level in septic patients while the innate immune response shows clear signs of activation.

2. The disseminated intravascular coagulopathie is one of the feared complications of sepsis. Congruent to this we found a higher expression of genes involved into this plasmatic cascade as well as a reduced fibrinolysis and a stronger activation of thrombocytes.

3. Mitochondrial dysfunction has been shown to be another crucial point in the processes leading to organ dysfunction in the course of sepsis. Gene expression reveals

several details as an impaired oxidative phosphorylation, increased oxidative stress and a reduced ß-oxidation as signs of the mitochondrial dysfunction.

4. Communication problems do not only lead to mistakes and crisis in major companies or interpersonal relationships, but also detain processes in our organism to work properly. In this study we found a number of different signaltransduction pathways with dysregulated, mainly decreased gene expression in septic patients.

In summary it can be said, that we were able to show the involvement of several functional groups into the evolution of sepsis and track their development over the time-course. We therefore lay the basis for further studies and more detailed research.

8. Literaturverzeichnis

Adam, D.; Doerr, H. W.; Link, H.; Lode, H. (2004): Die Infektiologie. Berlin: Springer. Online verfügbar unter http://www.gbv.de/dms/hebis-mainz/toc/113771878.pdf.

Adib-Conquy, M.; Cavaillon, J. M. (2009): Compensatory anti-inflammatory response syndrome. In: *Thrombosis and Haemostasis* 101 (1), 36–47.

Ananieva, O.; Darragh, J.; Johansen, C.; Carr, J. M.; McIlrath, J.; Park, J. M. et al. (2008): The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. In: *Nature Immunology* 9 (9), 1028–1036.

Angus, D. C. (2011): The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? In: *JAMA* 306 (23), 2614–2615.

Angus, D. C.; Burgner, D.; Wunderink, R.; Mira, J. P.; Gerlach, H.; Wiedermann, C. J.; Vincent, J. L. (2003): The PIRO concept: P is for predisposition. In: *Critical Care* 7 (3), 248–251.

Angus, D. C.; Wax, R. S. (2001): Epidemiology of sepsis: an update. In: *Critical Care Medicine* 29 (7 Suppl), 109-16.

Annane, D.; Bellissant, E.; Bollaert, P. E.; Briegel, J.; Keh, D.; Kupfer, Y. (2004): Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. In: *BMJ* 329 (7464), 480.

Annane, D.; Cariou, A.; Maxime, V.; Azoulay, E.; D'honneur, G.; Timsit, J. F. et al. (2010): Corticosteroid treatment and intensive insulin therapy for septic shock in adults: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 303 (4), 341–348.

Armstrong, L.; Medford, A. R. L.; Hunter, K. J.; Uppington, K. M.; Millar, A. B. (2004): Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. In: *Clinical and Experimental Immunology* 136 (2), 312–319.

Ashbaugh, D. G.; Bigelow, D. B.; Petty, T. L.; Levine, B. E. (1967): Acute respiratory distress in adults. In: *Lancet* 2 (7511), 319–323.

Baker, S. P.; O'Neill, B.; Haddon, W.; Long, W. B. (1974): The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. In: *The Journal of Trauma* 14 (3), 187–196.

Bandyopadhyay, G.; De, A.; Laudanski, K.; Li, F.; Lentz, C.; Bankey, P.; Miller-Graziano, C. (2007): Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. In: *Critical Care Medicine* 35 (3), 794–801.

Berbée, J. F. P.; Havekes, L. M.; Rensen, P. C. N. (2005): Apolipoproteins modulate the inflammatory response to lipopolysaccharide. In: *Journal of Endotoxin Research* 11 (2), 97–103.

Biolo, G.; Antonione, R.; Cicco, M. (2007): Glutathione metabolism in sepsis. In: *Critical Care Medicine* 35 (9 Suppl), 591-595.

Blazer-Yost, B. L.; Nofziger, C. (2005): Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for transepithelial signal transduction. In: *European Journal of Physiology* 450 (2), 75–82.

Bloos, F.; Trips, E.; Nierhaus, A.; Briegel, J.; Heyland, D. K.; Jaschinski, U. et al. (2016): Effect of Sodium Selenite Administration and Procalcitonin-Guided Therapy on Mortality in Patients With Severe Sepsis or Septic Shock: A Randomized Clinical Trial. In: *JAMA Internal Medicine* 176 (9), 1266–1276.

Bogner, V.; Kirchhoff, C.; Baker, H. V.; Stegmaier, J. C.; Moldawer, L. L.; Mutschler, W.; Biberthaler, P. (2007): Gene expression profiles are influenced by ISS, MOF, and clinical outcome in multiple injured patients: a genome-wide comparative analysis. In: *Langenbeck's Archives of Surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* 392 (3), 255–265.

Bolstad, B. M.; Irizarry, R. A.; Astrand, M.; Speed, T. P. (2003): A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. In: *Bioinformatics* 19 (2), 185–193.

Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B.; Dellinger, R. P.; Fein, A. M.; Knaus, W. A. et al. (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. In: *Chest* 101 (6), 1644–1655.

Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B.; Dellinger, R. P.; Fein, A. M.; Knaus, W. A. et al. (2009): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. In: *Chest* 136 (5 Suppl), e28.

Brdicková, N.; Brdicka, T.; Angelisová, P.; Horváth, O.; Spicka, J.; Hilgert, I. et al. (2003): LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (10), 1453–1462.

Brealey, D.; Brand, M.; Hargreaves, I.; Heales, S.; Land, J.; Smolenski, R. et al. (2002): Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. In: *Lancet* 360 (9328), 219–223.

Breitling, R.; Armengaud, P.; Amtmann, A.; Herzyk, P. (2004): Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. In: *FEBS Letters* 573 (1-3), 83–92.

Brownstein, B. H.; Logvinenko, T.; Lederer, J. A.; Cobb, J. P.; Hubbard, W. J.; Chaudry, I. H. et al. (2006): Commonality and differences in leukocyte gene expression patterns among three models of inflammation and injury. In: *Physiological Genomics* 24 (3), 298–309.

Bustin, S. A. (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. In: *Journal of Molecular Endocrinology* 29 (1), 23–39.

Cannarile, L.; Fallarino, F.; Agostini, M.; Cuzzocrea, S.; Mazzon, E.; Vacca, C. et al. (2006): Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines. In: *Blood* 107 (3), 1039–1047.

Cao, C.; Ma, T.; Chai, Y. F.; Shou, S. T. (2015): The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis. In: *World Journal of Emergency Medicine* 6 (1), 5–9.

Cavaillon, J. M.; Adib-Conquy, M.; Fitting, C.; Adrie, C.; Payen, D. (2003): Cytokine cascade in sepsis. In: *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 35 (9), 535–544.

Chan, J. K.; Roth, J.; Oppenheim, J. J.; Tracey, K. J.; Vogl, T.; Feldmann, M. et al. (2012): Alarmins: awaiting a clinical response. In: *The Journal of Clinical Investigation* 122 (8), 2711–2719.

Chen, Y.; Cai, J.; Jones, D. P. (2006): Mitochondrial thioredoxin in regulation of oxidant-induced cell death. In: *FEBS Letters* 580 (28-29), 6596–6602.

Christaki, E.; Opal, S. M. (2008): Is the mortality rate for septic shock really decreasing? In: *Current Opinion in Critical Care* 14 (5), 580–586.

Chuaqui, R. F.; Bonner, R. F.; Best, C. J. M.; John W.; Flaig, M. J.; Hewitt, S. M. et al. (2002): Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. In: *Nature Genetics* 32 Suppl, 509–514.

Chung, T. P.; Laramie, J. M.; Meyer, D. J.; Downey, T.; Tam, L. H. Y.; Ding, H. et al. (2006): Molecular diagnostics in sepsis: from bedside to bench. In: *Journal of the American College of Surgeons* 203 (5), 585–598.

Cinel, I.; Opal, S. M. (2009): Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. In: *Critical Care Medicine* 37 (1), 291–304.

Dahabreh, Z.; Dimitriou, R.; Chalidis, B.; Giannoudis, P. V. (2006): Coagulopathy and the role of recombinant human activated protein C in sepsis and following polytrauma. In: *Expert Opinion on Drug Safety* 5 (1), 67–82.

Dallas, P. B.; Gottardo, N. G.; Firth, M. J.; Beesley, A. H.; Hoffmann, K.; Terry, P. A. et al. (2005): Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? In: *BMC Genomics* 6 (1), 59.

Debus, F.; Lefering, R.; Frink, M.; Kühne, C. A.; Mand, C.; Bücking, B.; Ruchholtz, S. (2015): Numbers of Severely Injured Patients in Germany. A Retrospective Analysis From the DGU (German Society for Trauma Surgery) Trauma Registry. In: *Deutsches Arzteblatt international* 112 (49), 823–829.

Dellinger, R. P.; Levy, M. M.; Rhodes, A.; Annane, D.; Gerlach, H.; Opal, S. M. et al. (2013): Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. In: *Critical Care Medicine* 41 (2), 580–637.

Deutsche Sepsis Gesellschaft (2012): Geschichte der Sepsis. Online verfügbar unter http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Geschichte+der+Sepsis?sid=nQ5SzqUEKqL8xWtGyMbeyM&iid=1, zuletzt aktualisiert am 22.03.2012, zuletzt geprüft am 11.08.2018.

Diehn, M.; Sherlock, G.; Binkley, G.; Jin, H.; Matese, J. C.; Hernandez-Boussard, T. et al. (2003): SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. In: *Nucleic Acids Research* 31 (1), 219–223.

Diez, D.; Alvarez, R.; Dopazo, A. (2007): Codelink: an R package for analysis of GE healthcare gene expression bioarrays. In: *Bioinformatics* 23 (9), 1168–1169.

Edvardsen, H.; Landmark-Høyvik, H.; Reinertsen, K. V.; Zhao, X.; Grenaker-Alnæs, G. I.; Nebdal, D. et al. (2013): SNP in TXNRD2 associated with radiation-induced fibrosis: a study of genetic variation in reactive oxygen species metabolism and signaling. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 86 (4), 791–799.

Elliott, M. R.; Shanks, R. A.; Khan, I. U.; Brooks, J. W.; Burkett, P. J.; Nelson, B. J. et al. (2004): Down-regulation of IL-2 production in T lymphocytes by phosphorylated protein kinase A-RIIbeta. In: *Journal of Immunology* 172 (12), 7804–7812.

Elliott, M. R.; Tolnay, M.; Tsokos, G. C.; Kammer, G. M. (2003): Protein kinase A regulatory subunit type II beta directly interacts with and suppresses CREB transcriptional activity in activated T cells. In: *Journal of Immunology* 171 (7), 3636–3644.

Engel, C.; Brunkhorst, F. M.; Bone, H. G.; Brunkhorst, R.; Gerlach, H.; Grond, S. et al. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. In: *Intensive Care Medicine* 33 (4), 606–618.

Englert, J. A.; Rogers, A. J. (2016): Metabolism, Metabolomics, and Nutritional Support of Patients with Sepsis. In: *Clinics in Chest Medicine* 37 (2), 321–331.

Erol, A. (2007): Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. In: *Bioessays* 29 (8), 811–818.

Ertel, W.; Kremer, J. P.; Kenney, J.; Steckholzer, U.; Jarrar, D.; Trentz, O.; Schildberg, F. W. (1995): Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. In: *Blood* 85 (5), 1341–1347.

Esmon, C. T. (2004): The impact of the inflammatory response on coagulation. In: *Thrombosis Research* 114 (5-6), 321–327.

Feezor, R. J.; Baker, H. V.; Mindrinos, M.; Hayden, D.; Tannahill, C. L.; Brownstein, B. H. et al. (2004): Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. In: *Physiological Genomics* 19 (3), 247–254.

Feingold, K. R.; Wang, Y.; Moser, A.; Shigenaga, J. K.; Grunfeld, C. (2008): LPS decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the kidney. In: *Journal of Lipid Research* 49 (10), 2179–2187.

Fenic, I.; Hossain, H. M.; Sonnack, V.; Tchatalbachev, S.; Thierer, F.; Trapp, J. et al. (2008): In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis. In: *Journal of Andrology* 29 (2), 172–185.

Fraser, C. C. (2006): Exploring the positive and negative consequences of NF-kappaB inhibition for the treatment of human disease. In: *Cell Cycle* 5 (11), 1160–1163.

Galley, H. F. (2011): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. In: *British Journal of Anaesthesia* 107 (1), 57–64.

Gerlach, H. (2006): [From Roger Bone to PIRO.]. In: *AINS* 41 (1), 32–34.

Giannoudis, P. V.; Hildebrand, F.; Pape, H. C. (2004): Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. Can they predict outcome? In: *The Journal of Bone and Joint Surgery* 86 (3), 313–323.

Gibbison, B.; López-López, J. A.; Higgins, J. P. T.; Miller, T.; Angelini, G. D.; Lightman, S. L.; Annane, D. (2017): Corticosteroids in septic shock: a systematic review and network meta-analysis. In: *Critical Care* 21 (1), 78.

Glavic, A.; Molnar, C.; Cotoras, D.; Celis, J. F.: Drosophila Axud1 is involved in the control of proliferation and displays pro-apoptotic activity. In: *Mechanisms of Development* 126 (3-4), 184–197.

Hait, N. C.; Oskeritzian, C. A.; Paugh, S. W.; Milstien, S.; Spiegel, S. (2006): Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (12), 2016–2026.

Harbarth, S.; Holeckova, K.; Froidevaux, C.; Pittet, D.; Ricou, B.; Grau, G. E. et al. (2001): Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (3), 396–402.

Hecke, F.; Schmidt, U.; Kola, A.; Bautsch, W.; Klos, A.; Köhl, J. (1997): Circulating complement proteins in multiple trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome. In: *Critical Care Medicine* 25 (12), 2015–2024.

Hernández B., Johan S.; Florián P., María C. (2012): The History of Sepsis from Ancient Egypt to the XIX Century: INTECH Open Access Publisher.

Hietbrink, F.; Koenderman, L.; Rijkers, Gt; Leenen, Lph (2006): Trauma: the role of the innate immune system. In: *WJES* 1, 15.

Himer, L.; Csóka, B.; Selmeczy, Z.; Koscs, B.; Pócza, T.; Pacher, P. et al. (2010): Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. In: *The FASEB Journal 24 (8), 2631-2640*.

Holst, L. B.; Haase, N.; Wetterslev, J.; Wernerman, J.; Aneman, A.; Guttormsen, A. B. et al. (2013): Transfusion requirements in septic shock (TRISS) trial - comparing the effects and safety of liberal versus restrictive red blood cell transfusion in septic shock patients in the ICU: protocol for a randomised controlled trial. In: *Trials* 14, 150.

Hotchkiss, R. S.; Coopersmith, C. M.; McDunn, J. E.; Ferguson, T. A. (2009): The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. In: *Nature Medicine* 15 (5), 496–497.

Hotchkiss, R. S.; Moldawer, L. L.; Opal, S. M.; Reinhart, K.; Turnbull, I. R.; Vincent, J. L. (2016): Sepsis and septic shock. In: *Nature Reviews Disease Primers* 2, 16045.

Hotchkiss, R. S.; Osmon, S. B.; Chang, K. C.; Wagner, T. H.; Coopersmith, C. M.; Karl, I. E. (2005): Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. In: *Journal of Immunology* 174 (8), 5110–5118.

Hotchkiss, R. S.; Tinsley, K. W.; Swanson, P. E.; Schmieg, R. E.; Hui, J. J.; Chang, K. C. et al. (2001): Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. In: *Journal of Immunology* 166 (11), 6952–6963.

Hu, H.; Wang, B.; Borde, M.; Nardone, J.; Maika, S.; Allred, L. et al. (2006): Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. In: *Nature Immunology* 7 (8), 819–826.

Hu, J.; van den Steen, P. E.; Dillen, C.; Opdenakker, G. (2005): Targeting neutrophil collagenase/matrix metalloproteinase-8 and gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with a peptidomimetic inhibitor protects against endotoxin shock. In: *Biochemical Pharmacology* 70 (4), 535–544.

Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Tan, Q.; Collins, J. R.; Alvord, W. Gregory; R. et al. (2007): The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. In: *Genome Biology* 8 (9), R183.

Huang, Y. Z.; Zang, M.; Xiong, W. C.; Luo, Z.; Mei, L. (2003): Erbin suppresses the MAP kinase pathway. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2), 1108–1114.

Humblet-Baron, S.; Sather, B.; Anover, S.; Becker-Herman, S.; Kasprowicz, D. J.; Khim, S. et al. (2007): Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. In: *The Journal of Clinical Investigation* 117 (2), 407–418.

Jin, T.; Bokarewa, M.; Tarkowski, A. (2005): The role of urokinase in innate immunity against Staphylococcus aureus. In: *Microbes and Infection* 7 (9-10), 1170–1175.

Johnson, S. B.; Lissauer, M.; Bochicchio, G. V.; Moore, R.; Cross, A. S.; Scalea, T. M. (2007): Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. In: *Annals of Surgery* 245 (4), 611–621.

Jones, A. E.; Trzeciak, S.; Kline, J. A. (2009): The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of

hypoperfusion at the time of emergency department presentation. In: *Critical Care Medicine* 37 (5), 1649–1654.

Junker, R.; Scherer, S.; Binder, H. (2006): Evolution. Ein kritisches Lehrbuch. 6., aktual. und erw. Aufl. Gießen: Weyel (Weyel-Biologie).

Kanda, T.; Wakino, S.; Homma, K.; Yoshioka, K.; Tatematsu, S.; Hasegawa, K. et al. (2006): Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. In: *The FASEB Journal* 20 (1), 169–171.

Kanzaki, M. (2006): Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. In: *Endocrine Journal* 53 (3), 267–293.

Keel, M.; Trentz, O. (2005): Pathophysiology of polytrauma. In: *Injury* 36 (6), 691–709.

Kerrigan, A. M.; Dennehy, K. M.; Mourão-Sá, D.; Faro-Trindade, I.; Willment, J. A.; Taylor, P. R. et al. (2009): CLEC-2 is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils. In: *Journal of Immunology* 182 (7), 4150–4157.

Kim, K. D.; Zhao, J.; Auh, S.; Yang, X.; Du, P.; Tang, H.; Fu, Y. X. (2007): Adaptive immune cells temper initial innate responses. In: *Nature Medicine* 13 (10), 1248–1252.

Kim, K. Y.; Kim, B. J.; Yi, G. S. (2004): Reuse of imputed data in microarray analysis increases imputation efficiency. In: *BMC Bioinformatics* 5, 160.

Kirchhoff, C.; Biberthaler, P.; Mutschler, W. E.; Faist, E.; Jochum, M.; Zedler, S. (2009): Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study. In: *Critical Care* 13 (3), R88.

Klune, J. R.; Dhupar, R.; Cardinal, J.; Billiar, T. R.; Tsung, A.: HMGB1: endogenous danger signaling. In: *Molecular Medicine* 14 (7-8), 476–484.

Knaus, W. A.; Draper, E. A.; Wagner, D. P.; Zimmerman, J. E. (1985): APACHE II: a severity of disease classification system. In: *Critical Care Medicine* 13 (10), 818–829.

Komatsu, M.; Ruoslahti, E. (2005): R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. In: *Nature Medicine* 11 (12), 1346–1350.

Kruzel, M. L.; Actor, J. K.; Boldogh, I.; Zimecki, M. (2007): Lactoferrin in health and disease. In: *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61, 261–267.

Kühne, C. A.; Ruchholtz, S.; Buschmann, C.; Sturm, J.; Lackner, C. K.; Wentzensen, A. et al. (2006): Polytraumaversorgung in Deutschland. Eine Standortbestimmung. In: *Der Unfallchirurg* 109 (5), 357–366.

Laudanski, K.; Miller-Graziano, C.; Xiao, W.; Mindrinos, M. N.; Richards, D. R.; De, A. et al. (2006): Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (42), 15564–15569.

Lebrun, P.; van Obberghen, E. (2008): SOCS proteins causing trouble in insulin action. In: *Acta Physiologica* 192 (1), Sp. 29–36.

Leitenberg, D.; Falahati, R.; Lu, D. D.; Takeda, A. (2007): CD45-associated protein promotes the response of primary CD4 T cells to low-potency T-cell receptor (TCR) stimulation and facilitates CD45 association with CD3/TCR and lck. In: *Immunology* 121 (4), 545–554.

Levy, R. J.; Deutschman, C. S. (2007): Cytochrome c oxidase dysfunction in sepsis. In: *Critical Care Medicine* 35 (9 Suppl), S468-75.

Liu, D.; Lu, F.; Qin, G.; Fernandes, S. M.; Li, J.; Davis, A. E. (2007): C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. In: *Journal of Immunology* 179 (6), 3966–3972.

Luan, Y.; Yao, Y.; Xiao, X.; Sheng, Z. (2015): Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. In: *Journal of Interferon & Cytokine Research* 35 (1), 17–22.

Lukaszewicz, A. C.; Grienay, M.; Resche-Rigon, M.; Pirracchio, R.; Faivre, V.; Boval, B.; Payen, D. (2009): Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. In: *Critical Care Medicine* 37 (10), 2746–2752.

Macdonald, S. P. J.; Arendts, G.; Fatovich, D. M.; Brown, S. G. A. (2014): Comparison of PIRO, SOFA, and MEDS scores for predicting mortality in emergency department patients with severe sepsis and septic shock. In: *Academic Emergency Medicine* 21 (11), 1257–1263.

Macian, F. (2005): NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. In: *Nature Reviews Immunology* 5 (6), 472–484.

Majetschak, M.; Obertacke, U.; Waydhas, C.; Nast-Kolb, D.; Schade, F. U. (2000): Mediator modulation in infection and multiple organ failure. In: *Der Unfallchirurg* 103 (10), 903–907.

Marshall, J. C. (2013): The PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) model: Toward a staging system for acute illness. In: *Virulence* 5 (1), 27–35.

Martin, G. S. (2012): Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. In: *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10 (6), 701–706.

Maslove, D. M.; Tang, B. M.; McLean, A. S. (2012): Identification of sepsis subtypes in critically ill adults using gene expression profiling. In: *Critical Care* 16 (5), R183.

Mayr, F. B.; Yende, S.; Angus, D. C. (2014): Epidemiology of severe sepsis. In: *Virulence* 5 (1), 4–11.

McLachlan, G. J.; Do, K.; Ambroise, C. (2004): Analyzing microarray gene expression data. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience (Wiley series in probability and statistics).

Menges, T.; König, I. R.; Hossain, H.; Little, S.; Tchatalbachev, S.; Thierer, F. et al. (2008): Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor. In: *Critical Care Medicine* 36 (5), 1456-62, e1-6.

Mihailovic, T.; Marx, M.; Auer, A.; van Lint, J.; Schmid, M.; Weber, C.; Seufferlein, T. (2004): Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappaB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukemia cells. In: *Cancer Research* 64 (24), 8939–8944.

Miyake, K. (2004): Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotoxin shock. In: *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy* 3 (3), 291–297.

Mlecnik, B.; Scheideler, M.; Hackl, H.; Hartler, J.; Sanchez-Cabo, F.; Trajanoski, Z. (2005): PathwayExplorer: web service for visualizing high-throughput expression data on biological pathways. In: *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server issue), W633-7.

Moller, D. E. (2000): Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11 (6), 212–217.

Monarch App Note. Online verfügbar unter http://www.ingenuity.com/products/ProstateCancer.pdf, zuletzt geprüft am 28.12.2018.

Moreno, R. P.; Metnitz, B.; Adler, L.; Hoechtl, A.; Bauer, P.; Metnitz, P. G. H. (2008): Sepsis mortality prediction based on predisposition, infection and response. In: *Intensive Care Medicine* 34 (3), 496–504.

Mouncey, P. R.; Osborn, T. M.; Power, G. S.; Harrison, D. A.; Sadique, M. Z.; Grieve, R. D. et al. (2015): Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock. In: *The New England Journal of Medicine* 372 (14), 1301–1311.

Mueller, D. L. (2004): E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. In: *Nature Immunology* 5 (9), 883–890.

Najjar, S. M. (2002): Regulation of insulin action by CEACAM1. In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13 (6), 240–245.

Nargis, W.; Ibrahim, M.; Ahamed, B. (2014): Procalcitonin versus C-reactive protein: Usefulness as biomarker of sepsis in ICU patient. In: *International Journal of Critical Illness and Injury Science* 4 (3), 195–199.

Nathan, C. (2006): Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. In: *Nature Reviews. Immunology* 6 (3), 173–182.

Ng, P. C.; Li, K.; Leung, T. F.; Wong, R. P. O.; Li, G.; Chui, K. M. et al. (2006): Early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation with interleukin-10, interleukin-6, and RANTES in preterm infants. In: *Clinical Chemistry* 52 (6), 1181–1189.

Nguyen, T. V.; Ke, Y.; Zhang, E. E.; Feng, G. (2006): Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. In: *Journal of Immunology* 177 (9), 5990–5996.

Nizet, V.; Johnson, R. S. (2009): Interdependence of hypoxic and innate immune responses. In: *Nature Reviews Immunology* 9 (9), 609–617.

Nowak, J. E.; Wheeler, D. S.; Harmon, K. K.; Wong, H. R. (2010): Admission chemokine (C-C motif) ligand 4 levels predict survival in pediatric septic shock. In: *Pediatric Critical Care Medicine* 11 (2), 213–216.

Opal, S. M.; Laterre, P.; Francois, B.; LaRosa, S. P.; Angus, D. C.; Mira, J. et al. (2013): Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. In: *JAMA* 309 (11), 1154–1162.

Osborn, O.; Gram, H.; Zorrilla, E. P.; Conti, B.; Bartfai, T. (2008): Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGE2 in obesity and insulin resistance. In: *Swiss Medical Weekly* 138 (45-46), 665–673.

Osborn, T. M.; Tracy, J. K.; Dunne, J. R.; Pasquale, M.; Napolitano, L. M. (2004): Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury. In: *Critical Care Medicine* 32 (11), 2234–2240.

Pachot, A.; Cazalis, M.; Venet, Fabienne; T.; Faudot, C.; Voirin, N. et al. (2008): Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. In: *Journal of Immunology* 180 (9), 6421–6429.

Parratt, J. R. (1998): Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. In: *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Suppl A, 31–39.

Peach, B. C. (2017): Implications of the new sepsis definition on research and practice. In: *Journal of Critical Care* 38, 259–262.

Peake, S. L.; Delaney, A.; Bailey, M.; Bellomo, R.; Cameron, P. A.; Cooper, D. J. et al. (2014): Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. In: *The New England Journal of Medicine* 371 (16), 1496–1506.

Perretti, M.; Solito, E. (2004): Annexin 1 and neutrophil apoptosis. In: *Biochemical Society Transactions* 32 (Pt3), 507–510.

Peyssonnaux, C.; Cejudo-Martin, P.; Doedens, A.; Zinkernagel, A. S.; Johnson, R. S.; Nizet, V. (2007): Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. In: *Journal of Immunology* 178 (12), 7516–7519.

Pierrakos, C.; Vincent, J. L. (2010): Sepsis biomarkers: a review. In: *Critical Care* 14 (1), R15.

Porter, J. D.; Merriam, A. P.; Leahy, P.; Gong, B.; Khanna, S. (2003): Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. In: *Human Molecular Genetics* 12 (15), 1813–1821.

Princen, F.; Bard, E.; Sheikh, F.; Zhang, S. S.; Wang, J.; Zago, W. M. et al. (2009): Deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in muscle leads to dilated cardiomyopathy, insulin resistance, and premature death. In: *Molecular and Cellular Biology* 29 (2), 378–388.

Pugin, J. (2008): Dear SIRS, the concept of "alarmins" makes a lot of sense! In: *Intensive Care Medicine* 34 (2), 218–221.

Raaphorst, J.; Johan Groeneveld, A. B.; Bossink, A. W.; Erik Hack, C. (2001): Early inhibition of activated fibrinolysis predicts microbial infection, shock and mortality in febrile medical patients. In: *Thrombosis and Haemostasis* 86 (2), 543–549.

Ramos, F. J.; Langlais, P. R.; Hu, D.; Dong, L. Q.; Liu, F. (2006): Grb10 mediates insulin-stimulated degradation of the insulin receptor: a mechanism of negative regulation. In: *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 290 (6), E1262-6.

Reddy, R. C.; Standiford, T. J. (2010): Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. In: *Current Opinion in Hematology* 17 (1), 18–24.

Regueira, T.; Andresen, M.; Djafarzadeh, S. (2009): [Mitochondrial dysfunction during sepsis, impact and possible regulating role of hypoxia-inducible factor-1alpha]. In: *Medicina Intensiva* 33 (8), 385–392.

Reinhart, K.; Brunkhorst, F.; Bone, H.; Gerlach, H.; Gründling, M.; Kreymann, G. et al. (2006): Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine. In: *Der Anaesthesist* 55 Suppl 1, 43–56.

Rezende, S. M.; Simmonds, R. E.; Lane, D. A. (2004): Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. In: *Blood* 103 (4), 1192–1201.

Rhee, S. G. (2001): Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. In: *Annual Review of Biochemistry* 70, 281–312.

Rhodes, A.; Evans, L. E.; Alhazzani, W.; Levy, M. M.; Antonelli, M.; Ferrer, R. et al. (2017): Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. In: *Critical Care Medicine* 45 (3), 486–552.

Rittirsch, D.; Flierl, M. A.; Ward, P. A. (2008): Harmful molecular mechanisms in sepsis. In: *Nature Reviews Immunology* 8 (10), 776–787.

Rittirsch, D.; Redl, H.; Huber-Lang, M. (2012): Role of complement in multiorgan failure. In: *Clinical & Developmental Immunology* 2012, 962927.

Rivers, E. P.; Coba, V.; Whitmill, M. (2008): Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: a contemporary review of the literature. In: *Current Opinion in Anaesthesiology* 21 (2), 128–140.

Rozengurt, E.; Rey, O.; Waldron, R. T. (2005): Protein kinase D signaling. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (14), 13205–13208.

Rubtsov, Y. P.; Rudensky, A. Y. (2007): TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. In: *Nature Reviews Immunology* 7 (6), 443–453.

Sadaka, F.; EthmaneAbouElMaali, C.; Cytron, M. A.; Fowler, K.; Javaux, V. M.; O'Brien, J. (2017): Predicting Mortality of Patients With Sepsis: A Comparison of APACHE II and APACHE III Scoring Systems. In: *Journal of Clinical Medicine Research* 9 (11), 907–910.

Safari, S.; Shojaee, M.; Rahmati, F.; Barartloo, A.; Hahshemi, B.; Forouzanfar, M. M.; Mohammadi, E. (2016): Accuracy of SOFA score in prediction of 30-day outcome of critically ill patients. In: *Turkish Journal of Emergency Medicine* 16 (4), 146–150.

Salomao, R.; Brunialti, M. K. C.; Gomes, N. E.; Mendes, M. E.; Diaz, R. S.; Komninakis, S. et al. (2009): Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. In: *Critical Care Medicine* 37 (1), 132–139.

Schadt, E. E.; Li, C.; Ellis, B.; Wong, W. H. (2001): Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data. In: *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 37, 120–125.

Schmitz, I. (2013): Gadd45 proteins in immunity. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 793, 51–68.

Schmoch, T.; Bernhard, M.; Uhle, F.; Gründling, M.; Brenner, T.; Weigand, M. A. (2017): Neue SEPSIS-3-Definition : Müssen wir Sepsis in Zukunft behandeln, bevor wir sie diagnostizieren dürfen? In: *Der Anaesthesist* 66 (8), 614–621.

Schouten, M.; Wiersinga, W. J.; Levi, M.; van der Poll, T. (2008): Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. In: *Journal of Leukocyte Biology* 83 (3), 536–545.

Schreyer, S. A.; Cummings, D. E.; McKnight, G. S.; LeBoeuf, R. C. (2001): Mutation of the RIIbeta subunit of protein kinase A prevents diet-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice. In: *Diabetes* 50 (11), 2555–2562.

Schuetz, P.; Müller, B.; Christ-Crain, M.; Stolz, D.; Tamm, M.; Bouadma, L. et al. (2013): Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. In: *Evidence-Based Child Health* 8 (4), 1297–1371.

Seok, J.; Warren, H. S.; Cuenca, A. G.; Mindrinos, M. N.; Baker, H. V.; Xu, W. et al. (2013): Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (9), 3507–3512.

Shah, O. J.; Hunter, T. (2005): Tuberous sclerosis and insulin resistance. Unlikely bedfellows reveal a TORrid affair. In: *Cell Cycle* 4 (1), 46–51.

Shay, E. (2003): Microarray cluster analysis and application. Online verfügbar unter https://pdfs.semanticscholar.org/4dd3/73bda052723f12e38d7a3df1c2c4ffe361a4.pdf, zuletzt aktualisiert am 22.01.2003, zuletzt geprüft am 11.08.2018.

Silvin, C.; Belisle, B.; Abo, A. (2001): A role for Wiskott-Aldrich syndrome protein in T-cell receptor-mediated transcriptional activation independent of actin polymerization. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (24), 21450–21457.

Singer, M. (2014): The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. In: *Virulence* 5 (1), 66–72.

Singer, M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M. et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In: *JAMA* 315 (8), 801–810.

Sitkovsky, M.; Lukashev, Dmitriy. (2005): Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. In: *Nature Reviews. Immunology* 5 (9), 712–721.

Slofstra, S. H.; Groot, A. P.; Obdeijn, M. H. P.; Reitsma, P. H.; Cate, H.; Spek, C. A. (2007): Gene expression profiling identifies C/EBPdelta as a candidate regulator of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 (6), 602–609.

Solan, P. D.; Dunsmore, K. E.; Denenberg, A. G.; Odoms, K.; Zingarelli, B.; Wong, H. R. (2012): A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis. In: *Critical Care Medicine* 40 (2), 379–387.

Stahel, P. F.; Heyde, C. E.; Wyrwich, W.; Ertel, W. (2005): Current concepts of polytrauma management: from ATLS to "damage control". In: *Der Orthopäde* 34 (9), 823–836.

Stuart, E. A. (2010): Matching Methods for Causal Inference: A Review and a Look Forward. In: *Statistical Science* 25 (1), 1–21.

Suter, P. M. (2011): Xigris is withdrawn from the market. A 10 year odyssey. In: *Minerva Anestesiologica* 77 (12), 1128–1129.

Sutherland, A.; Thomas, M.; Brandon, R. A.; Brandon, R. B.; Lipman, J.; Tang, B. et al. (2011): Development and validation of a novel molecular biomarker diagnostic test for the early detection of sepsis. In: *Critical Care* 15 (3), R149.

Sutherland, A. M.; Walley, K. R. (2009): Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. In: *Critical Care* 13 (2), 210.

Suzuki-Inoue, K.; Fuller, G. L. J.; García, A.; Eble, J. A.; Pöhlmann, S.; Inoue, O. et al. (2006): A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. In: *Blood* 107 (2), 542–549.

Tai, H-H; Cho, H.; Tong, M.; Ding, Y. (2006): NAD+-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions. In: *Current Pharmaceutical Design* 12 (8), 955–962.

Takeyama, N.; Itoh, Y.; Kitazawa, Y.; Tanaka, T. (1990): Altered hepatic mitochondrial fatty acid oxidation and ketogenesis in endotoxic rats. In: *The American Journal of Physiology* 259 (4 Pt 1), E498-505.

Talwar, S.; Munson, P. J.; Barb, J.; Fiuza, C.; Cintron, A. P.; Logun, C. et al. (2006): Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. In: *Physiological Genomics* 25 (2), 203–215.

Tang, B. M.; Huang, S. J.; McLean, A. S. (2010): Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. In: *Critical Care* 14 (6), R237.

Tang, B. M. P.; McLean, A. S.; Dawes, I. W.; Huang, S. J.; Cowley, M. J.; Lin, R. C. Y. (2008): Gene-expression profiling of gram-positive and gram-negative sepsis in critically ill patients. In: *Critical Care Medicine* 36 (4), 1125–1128.

Tang, B. M. P.; McLean, A. S.; Dawes, I. W.; Huang, S. J.; Lin, R. C. Y. (2007): The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 (7), 676–684.

Tang, B. M. P.; McLean, A. S.; Dawes, I. W.; Huang, S. J.; Lin, R. C. Y. (2009): Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. In: *Critical Care Medicine* 37 (3), 882–888.

Taskén, K.; Skålhegg, B. S.; Taskén, K. A.; Solberg, R.; Knutsen, H. K.; Levy, F. O. et al. (1997): Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. In: *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 31, 191–204.

Taylor, K.; McDougall A. (1999): Quantification of Gene Expression in a Microarray System using Fluorescent CyDyes. 3rd fluorescence microscopy and fluorescent probes conference. Prague, zuletzt geprüft am 11.08.2018.

Tejera, P.; O'Mahony, D. S.; Owen, C. A.; Wei, Y.; Wang, Z.; Gupta, K. et al. (2014): Functional characterization of polymorphisms in the peptidase inhibitor 3 (elafin) gene and validation of their contribution to risk of acute respiratory distress syndrome. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 51 (2), 262–272.

The Pharmaletter: AstraZeneca/BTG abandon CytoFab for sepsis as it fails in Ph IIb. Online verfügbar unter https://www.thepharmaletter.com/article/astrazeneca-btg-abandon-cytofab-for-sepsis-as-it-fails-in-ph-iib, zuletzt geprüft am 23.08.2018.

Thiel, M.; Caldwell, C. C.; Kreth, S.; Kuboki, S.; Chen, P.; Smith, P. et al. (2007): Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. In: *PLoS ONE* 2 (9), e853.

Thomas, S.; Bonchev, D. (2010): A survey of current software for network analysis in molecular biology. In: *Human Genomics* 4 (5), 353–360.

Thompson, B. T.; Ranieri, V. M.; Finfer, S.; Barie, P. S.; Dhainaut, J.; Douglas, I. S. et al. (2010): Statistical analysis plan of PROWESS SHOCK study. In: *Intensive Care Medicine* 36 (11), 1972–1973.

Thompson, E. E.; Pan, L.; Ostrovnaya, I.; Weiss, L. A.; Gern, J. E.; Lemanske, R. F. et al. (2007): Integrin beta 3 genotype influences asthma and allergy phenotypes in the first 6 years of life. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (6), 1423–1429.

Thrasher, A. J. (2002): WASp in immune-system organization and function. In: *Nature Reviews Immunology* 2 (9), 635–646.

Tretter, L.; Adam-Vizi, V. (2005): Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360 (1464), 2335–2345.

Tschoeke, S. K.; Ertel, W. (2007): Immunoparalysis after multiple trauma. In: *Injury* 38 (12), 1346–1357.

van der Poll, T.; van de Veerdonk, F. L.; Scicluna, B. P.; Netea, M. G. (2017): The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. In: *Nature Review. Immunology* 17 (7), 407–420.

Venet, F.; Chung, C.; Monneret, G.; Huang, X.; Horner, B.; Garber, M.; Ayala, A. (2008): Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. In: *Journal of Leukocyte Biology* 83 (3), 523–535.

Vincent, J. L.; Moreno, R.; Takala, J.; Willatts, S.; Mendonça, A. de; Bruining, H. et al. (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. In: *Intensive Care Medicine* 22 (7), 707–710.

Vincent, J. L.; Opal, S. M.; Marshall, J. C.; Tracey, K. J. (2013): Sepsis definitions: time for change. In: *The Lancet* 381 (9868), 774–775.

Vincent, J. L.; Rello, J.; Marshall, J.; Silva, E.; Anzueto, A.; Martin, C. D. et al. (2009): International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. In: *JAMA* 302 (21), 2323–2329.

Volbeda, M.; Wetterslev, J.; Gluud, C.; Zijlstra, J. G.; van der Horst, I. C. C.; Keus, F. (2015): Glucocorticosteroids for sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. In: *Intensive Care Medicine* 41 (7), 1220–1234.

Wafaisade, A.; Lefering, R.; Bouillon, B.; Sakka, S. G.; Thamm, O. C.; Paffrath, T. et al. (2011): Epidemiology and risk factors of sepsis after multiple trauma: an analysis of 29,829 patients from the Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery. In: *Critical Care Medicine* 39 (4), 621–628.

Wagner, C.; Ochmann, C.; Schoels, M.; Giese, T.; Stegmaier, S.; Richter, R. et al. (2006): The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. In: *Molecular Mmmunology* 43 (6), 643–651.

Wang, J.; Badeanlou, L.; Bielawski, J.; Ciaraldi, T. P.; Samad, Fahumiya. (2014): Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance. In: *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 306 (7), E756-68.

Wartha, F.; Beiter, K.; Normark, S.; Henriques-Normark, B. (2007): Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. In: *Current Opinion in Microbiology* 10 (1), 52–56.

Welte, S.; Kuttruff, S.; Waldhauer, I.; Steinle, A. (2006): Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. In: *Nature Immunology* 7 (12), 1334–1342.

Werdan, K.; Müller-Werdan, U.; Schuster, H. P. (2005): Sepsis und MODS. Berlin, Heidelberg. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/b137850.

Wesche, D. E.; Lomas-Neira, J. L.; Perl, M.; Chung, C.; Ayala, A. (2005): Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. In: *Journal of Leukocyte Biology* 78 (2), 325–337.

Williams, D. L.; Ha, T.; Li, C.; Kalbfleisch, J. H.; Schweitzer, J.; Vogt, W.; Browder, I. W. (2003): Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. In: *Critical Care Medicine* 31 (6), 1808–1818.

Wong, H. R. (2012): Clinical review: sepsis and septic shock--the potential of gene arrays. In: *Critical Care* 16 (1), 204.

Wrann, C. D.; Tabriz, N. A.; Barkhausen, T.; Klos, A.; van Griensven, M.; Pape, H. C. et al. (2007): The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. In: *Journal of Immunology* 178 (9), 5940–5948.

Wurmbach, E.; Yuen, T.; Sealfon, S. C. (2003): Focused microarray analysis. In: *Methods* 31 (4), 306–316.

Xiao, W.; Mindrinos, M. N.; Seok, J.; Cuschieri, J.; Cuenca, A. G.; Gao, H. et al. (2011): A genomic storm in critically injured humans. In: *The Journal of Experimental Medicine* 208 (13), 2581–2590.

Yamamori, T.; Inanami, O.; Nagahata, H.; Kuwabara, M. (2004): Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47(phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 (3), 720–730.

Yang, M.; Ma, C.; Liu, S.; Shao, Q.; Gao, W.; Song, B. et al. (2010): HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia. In: *Immunology and Cell Biology* 88 (2), 165–171.

Yang, Q.; Mattick, J. S. A.; Orman, M. A.; Nguyen, T. T.; Ierapetritou, M. G.; Berthiaume, F.; Androulakis, I. P. (2012): Dynamics of hepatic gene expression profile in a rat cecal ligation and puncture model. In: *The Journal of Surgical Research* 176 (2), 583–600.

Yang, S.; Guo, X.; Hu, H. (2008): MOF: an R function to detect outlier microarray. In: *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 6 (3-4), 186–189.

Zhang, H. M.; Cheung, P.; Yanagawa, B.; McManus, B. M.; Yang, D. C. (2003): BNips: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family. In: *Apoptosis* 8 (3), 229–236.

Zhu, X.; Schweitzer, B. L.; Romer, E. J.; Sulentic, C. E. W.; DeKoter, R. P. (2008): Transgenic expression of Spi-C impairs B-cell development and function by affecting genes associated with BCR signaling. In: *European Journal of Immunology* 38 (9), 2587–2599.

Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M.; Prescott, S. M.; Stafforini, D. M. (2002): The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. In: *Critical Care Medicine* 30 (5 Suppl), S294-301.

Anhang A: Response to stimulus

Pro-Inflammation:

ACC	Symbol	Name
NM_004221	NK4	Interleukin 32
NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1
NM_012445	SPON2	Spondin 2, extracellular matrix protein
NM_012483	GNLY	Granulysin
U20350	CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
NM_000569	FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)
NM_012276	ILT7	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 4
NM_021798	IL21R	Interleukin 21 receptor
NM_017806	LIME1	Lck interacting transmembrane adaptor 1
NM_002800	PSMB9	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
AF135187	MX1	MYXOVIRUS (INFLUENZA VIRUS) RESISTANCE 1, INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN P78 (MOUSE)
NM_001935	DPP4	Dipeptidyl-peptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)
NM_002001	FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide
NM_001250	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
NM_000675	ADORA2A	Adenosine A2a receptor
NM_004271	LY86	Lymphocyte antigen 86
NM_007293	C4A	Complement component 4A (Rodgers blood group)
BG677541	IL7R	MRNA; cDNA DKFZp667P0610 (from clone DKFZp667P0610)
AF213884	NFKB1	NUCLEAR FACTOR OF KAPPA LIGHT POLYPEPTIDE GENE ENHANCER IN B-CELLS 1 (P105)
NM_001511	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
NM_012072	C1QR1	CD93 molecule
NM_021602	CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta
NM_000073	CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)
NM_007334	KLRD1	Killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1
NM_002260	KLRC3	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2
NM_002801	PSMB10	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10
NM_000417	IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha
NM_000732	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
AB014553	ICOSLG	INDUCIBLE T-CELL CO-STIMULATOR LIGAND
NM_002250	KCNN4	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
NM_006120	HLA-DMA	Major histocompatibility complex, class II, DM beta
NM_006144	GZMA	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
NM_001242	TNFRSF7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7
AA868493	LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase
NM_001733	C1R	Complement component 1, r subcomponent
NM_017852	NALP2	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 2
NM_000733	CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)

NM_002002	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
NM_002416	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
NM_000064	C3	Complement component 3
NM_000606	C8G	Complement component 8, gamma polypeptide
AA348191	HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
AF143887	CD48	Clone IMAGE:121687 mRNA sequence
NM_000952	PTAFR	platelet-activating factor receptor
NM_000625	NOS2A	Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)
NM_014002	IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
NM_001710	BF	Complement factor B
BG399868	NFATC3	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3
AF088219	CCL5	chemokine (c-c motif) ligand 5
NM_000616	CD4	CD4 molecule
AF064090	TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
NM_006889	CD86	CD86 molecule
NM_004079	CTSS	Cathepsin S
NM_001700	AZU1	Azurocidin 1 (cationic antimicrobial protein 37)
NM_005211	CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog
NM_001814	CTSC	Cathepsin C
NM_000065	C6	Complement component 6
NM_002343	LTF	Lactotransferrin
NM_000584	IL8	Interleukin 8
AW372968	TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)
NM_005535	IL12RB1	Interleukin 12 receptor, beta 1
NM_001925	DEFA4	Defensin, alpha 4, corticostatin
NM_000491	C1QB	Complement component 1, q subcomponent, B chain
NM_003811	TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
NM_000566	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)
NM_003268	TLR5	Toll-like receptor 5
NM_005923	MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
NM_005419	STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa
AF217965	PTGES	Prostaglandin E synthase
NM_015364	LY96	Lymphocyte antigen 96
NM_002089	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
NM_000250	MPO	Myeloperoxidase
J03474	SAA1	SERUM AMYLOID A1
NM_014143	PDCD1LG1	CD274 molecule
Y10183	ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
AF080157	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
NM_001911	CTSG	Cathepsin G
NM_013254	TBK1	TANK-binding kinase 1
NM_002935	RNASE3	Ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein)
NM_001779	CD58	CD58 molecule
AA653936	HMGB1	High-mobility group box 1
NM_000397	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)
NM_000204	IF	Complement factor I

NM_000651	CR1	Complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)
NM_031200	CCR9	Chemokine (C-C motif) receptor 9
NM_018965	TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
NM_003264	TLR2	Toll-like receptor 2
NM_004833	AIM2	Absent in melanoma 2
NM_004054	C3AR1	Complement component 3a receptor 1
NM_003853	IL18RAP	Interleukin 18 receptor accessory protein
NM_014358	CLECSF9	C-type lectin domain family 4, member E
NM_016509	CLEC2	C-type lectin domain family 1, member B
NM_002704	PPBP	Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)
NM_003855	IL18R1	Interleukin 18 receptor 1
NM_000877	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I
NM_001192	TNFRSF17	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
NM_005127	CLECSF2	C-type lectin domain family 2, member B
NM_002182	IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein

Anti-Inflammation:

ACC	Symbol	Name
NM_000572	IL10	Interleukin 10
NM_000577	IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist
NM_002164	INDO	Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase
NM_002460	IRF4	Interferon regulatory factor 4
NM_017773	LAX	Lymphocyte transmembrane adaptor 1
NM_021805	SIGIRR	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
X59405	MCP	CD46 molecule, complement regulatory protein
NM_006866	LILRA2	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 2
NM_000062	SERPING1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
NM_005084	PLA2G7	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)
NM_004244	CD163	CD163 molecule
NM_031483	ITCH	Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)
NM_004633	IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II
NM_000700	ANXA1	Annexin A1
NM_000574	DAF	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
NM_004755	RPS6KA5	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5
NM_002638	PI3	Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)

Anhang B: dChip-Cluster Gene (T-Zell-Gene)

ACC	Symbol	Name
AA348191	HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
NM_006120	HLA-DMA	Major histocompatibility complex, class II, DM beta
NM_001571	IRF3	Interferon regulatory factor 3
AF110908	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
NM_032904	ptpn11	shp-2
NM_017806	LIME	Lck interacting transmembrane adaptor 1
BM724842	FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
NM_004430	EGR3	Early growth response 3
NM_003151	STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
NM_000734	CD3Z	CD247 molecule
NM_002835	PTPN12	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12
NM_022440	MAL	Mal, T-cell differentiation protein
NM_000733	CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
NM_000732	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
NM_000073	CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)
NM_000616	CD4	CD4 molecule
NM_004356	CD81	CD81 molecule
NM_005608	PTPRCAP	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein
D42055	NEDD4	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
NM_005749	TOB1	Transducer of ERBB2, 1
NM_001250	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
NM_000651	CR1	Complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)
NM_007268	VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4
X59405	MCP	CD46 molecule, complement regulatory protein
NM_018556	SIRPB2	Signal-regulatory protein gamma
NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
AB014553	ICOSLG	INDUCIBLE T-CELL CO-STIMULATOR LIGAND
NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
NM_016270	KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung)
NM_004089	DSIPI = GILZ	TSC22 domain family, member 3
X16354	CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
NM_031483	ITCH	Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)
NM_014143	PDCD1LG1	CD274 molecule
NM_006889	CD86	CD86 molecule
Z25521	CD47	CD47 molecule
NM_021602	CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta
NM_003121	SPIB	SPIB
NM_013378	VPREB3	Pre-B lymphocyte gene 3
AW444717	FOXP1	Forkhead box P1
AF250920	FOXP1	Forkhead box P1
NM_021966	TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A

Anhang C: Verwendete Gene

Gensym-bol	ACC	FC-Wert					FDR				
		d_0	d_1	d_3	d_5	d_9	d_0	d_1	d_3	d_5	d_9
ACAA2	NM_006111	-1,48	-2,27	-1,65	-1,57	-1,16	0,23	0,03	0,49	0,81	0,99
ACADM	NM_000016	-1,19	1,02	-1,06	-1,43	-1,94	1,04	1,18	1,07	0,84	0,08
ACADS	NM_000017	-1,41	-1,75	-1,78	-1,31	-1,51	0,75	0,22	0,33	1,01	0,49
ACADVL	NM_000018	-1,49	-1,93	-1,69	-1,44	-1,24	0,55	0,12	0,50	0,97	1,02
ADORA2A	NM_000675	-1,57	-1,59	-1,95	-1,08	-1,18	0,30	0,27	0,18	1,07	1,04
ADORA2B	NM_000676	-1,01	-1,16	1,71	1,20	1,51	0,86	0,56	0,22	0,94	0,34
AKT3	NM_005465	-1,60	-1,70	-1,75	-2,11	-2,07	0,11	0,05	0,21	0,15	0,01
ANXA1	NM_000700	1,98	1,51	2,16	1,62	2,71	0,09	0,21	0,12	0,68	0,00
AOX1	NM_001159	1,33	2,39	1,90	1,38	1,42	0,72	0,01	0,21	0,78	0,24
APOH	NM_000042	-1,45	-1,70	-1,65	-1,15	-1,05	0,78	0,28	0,51	1,08	1,11
APOL2	NM_030882	-1,50	-1,58	-1,37	-1,58	-1,19	0,17	0,22	0,51	0,68	0,58
APOL3	NM_014349	-1,65	-2,97	-2,18	-2,08	-1,23	0,03	0,00	0,05	0,15	0,36
APS	NM_020979	-1,07	-1,25	-1,59	-1,83	-1,81	1,10	0,96	0,48	0,50	0,14
AXUD1	NM_033027	1,52	2,04	1,41	1,44	1,18	0,24	0,02	0,48	0,77	0,75
AZU1	NM_001700	-1,05	1,01	-1,21	1,73	1,22	0,74	0,33	0,23	0,36	0,07
BCL2A1	NM_004049	2,08	1,95	2,64	2,36	5,08	0,02	0,01	0,03	0,12	0,00
BF	NM_001710	-1,15	-1,41	-1,83	-1,48	-1,30	0,97	0,67	0,22	0,49	0,56
BIRC5	NM_001168	2,40	1,89	1,97	2,30	1,62	0,01	0,02	0,05	0,14	0,06
BNIP2	NM_004330	1,99	2,05	2,87	1,71	1,83	0,13	0,06	0,02	0,50	0,17
C1QB	NM_000491	1,19	1,02	2,11	1,46	-1,12	0,20	0,44	0,05	0,68	0,65
C1R	NM_001733	-1,27	-1,95	-1,58	-1,60	-1,18	0,86	0,11	0,58	0,80	1,02
C3	NM_000064	-1,23	-1,86	-2,03	-1,07	-1,34	0,54	0,05	0,15	1,07	0,51
C3AR1	NM_004054	1,75	1,13	1,30	1,03	1,36	0,13	0,19	0,38	0,79	0,24
C4A	NM_007293	-1,55	-1,44	-2,31	-5,13	-3,04	0,18	0,25	0,02	0,00	0,00
C6	NM_000065	1,03	-1,59	-1,38	1,14	1,37	1,13	0,15	0,33	1,00	0,49
C8G	NM_000606	-1,23	-1,31	-1,80	1,32	1,02	0,82	0,50	0,09	0,62	0,52
CASP3	NM_032991	1,50	1,26	2,29	1,24	2,12	0,13	0,38	0,05	0,79	0,02
CASP5	NM_004347	1,26	1,65	1,29	-1,03	1,04	0,57	0,16	0,68	1,08	1,02
CASP8	NM_001228	2,61	2,09	2,51	1,45	1,60	0,01	0,05	0,05	0,91	0,40
CCL23	NM_005064	-1,28	-1,49	-1,57	-1,79	-1,49	0,38	0,12	0,05	0,18	0,11
CD3D	NM_000732	-1,37	-1,47	-1,41	1,24	1,36	0,53	0,28	0,41	1,01	0,50
CD3E	NM_000733	-1,26	-1,54	-1,72	1,27	-1,20	0,51	0,21	0,15	0,87	0,86
CD3G	NM_000073	-1,45	-1,36	-1,54	-1,25	-1,37	0,55	0,26	0,42	0,87	0,49
CD3Z	NM_000734	-1,55	-1,55	-1,76	-1,11	-1,16	0,32	0,36	0,27	1,08	0,95
CD4	NM_000616	-1,14	-1,96	-1,44	1,00	1,01	0,60	0,04	0,41	1,08	1,10
CD40	NM_001250	-1,61	-2,27	-2,43	-1,42	-1,72	0,20	0,01	0,03	0,92	0,14
CD47	Z25521	1,37	1,47	1,88	-1,43	-1,18	0,35	0,30	0,28	0,81	0,44
CD79B	NM_021602	-1,46	-2,24	-2,79	-1,21	-1,54	0,46	0,02	0,01	0,94	0,35
CD81	NM_004356	-1,41	-1,85	-1,97	-1,23	-1,42	0,65	0,21	0,22	1,07	0,58
CD86	NM_006889	-1,07	-1,62	1,02	-1,10	1,34	1,07	0,20	1,16	0,99	0,78
CEACAM1	X16354	1,58	1,87	1,67	1,36	1,63	0,23	0,05	0,38	0,92	0,23
CEBPD	NM_005195	2,46	1,96	2,47	1,08	1,03	0,00	0,03	0,02	1,01	0,94
CHUK	AF080157	1,42	1,61	2,19	1,18	1,52	0,77	0,29	0,11	0,99	0,55
CLEC2	NM_016509	1,84	2,05	1,81	-1,36	1,05	0,04	0,01	0,19	0,81	0,98
CLECSF2	NM_005127	2,63	1,97	3,76	3,46	6,50	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
CPT1B	NM_005198	-1,53	-1,56	-1,94	-1,25	-1,10	0,42	0,51	0,22	1,07	1,07

CR1	NM_000651	1,60	2,02	2,07	-1,03	1,35	0,11	0,02	0,03	0,98	0,17
CR1	NM_000651	1,60	2,02	2,07	-1,03	1,35	0,11	0,02	0,03	0,98	0,17
CSF1R	NM_005211	-1,04	-2,00	-1,09	-1,36	-1,35	0,96	0,04	0,87	0,76	0,32
CTSG	NM_001911	1,42	1,55	1,83	1,75	1,68	0,50	0,17	0,05	0,32	0,03
CTSS	NM_004079	-1,05	-1,58	-1,09	-1,62	1,21	0,74	0,17	0,65	0,50	0,89
CX3CR1	U20350	-2,13	-2,29	-1,41	-1,29	-1,20	0,01	0,01	0,58	0,95	0,69
CXCL1	NM_001511	-1,50	-1,38	-1,71	-1,53	-1,30	0,49	0,40	0,24	0,74	0,79
CXCL2	NM_002089	1,32	1,30	2,25	1,20	1,42	0,41	0,29	0,08	0,93	0,57
CXCL9	NM_002416	-1,24	-1,21	-1,62	-1,35	-1,57	0,53	0,68	0,36	0,73	0,26
CYBB	NM_000397	1,55	1,21	2,44	1,44	1,51	0,26	0,59	0,04	0,73	0,46
DAF	NM_000574	1,47	1,61	1,75	1,45	1,61	0,66	0,34	0,32	0,87	0,26
DCI	NM_001919	-1,53	-1,97	-1,59	-1,11	-1,13	0,55	0,09	0,59	1,08	1,10
DEFA4	NM_001925	1,14	1,23	1,31	1,32	1,42	0,63	0,61	0,25	0,64	0,10
DGKA	NM_001345	1,25	-1,14	-1,77	1,15	1,23	0,05	0,07	0,02	0,37	0,06
DGKE	NM_003647	-1,08	-1,06	-1,16	-1,72	-1,91	1,04	1,04	0,84	0,47	0,04
DGKG	NM_001346	-2,40	-1,92	-1,94	-1,75	-1,48	0,00	0,06	0,21	0,35	0,38
DLD	NM_000108	1,84	1,13	1,79	1,07	1,57	0,02	0,43	0,11	0,69	0,14
DLST	NM_001933	1,10	1,47	1,97	1,34	-1,12	0,75	0,11	0,04	0,62	0,74
DPP4	NM_001935	-1,65	-1,55	-1,72	1,07	-1,05	0,20	0,19	0,16	1,09	1,06
ECH1	AA788643	-1,82	-2,09	-2,03	-1,04	1,09	0,07	0,02	0,12	1,06	0,82
EGR3	NM_004430	1,77	2,05	1,38	1,76	1,45	0,11	0,03	0,71	0,49	0,33
ERBB2IP	NM_018695	1,79	1,78	2,53	1,10	1,10	0,13	0,06	0,03	0,77	0,58
F13A1	NM_000129	1,83	1,26	1,83	-1,24	-1,03	0,08	0,24	0,21	0,92	0,79
F8	NM_019863	1,63	1,95	1,76	1,27	1,20	0,26	0,05	0,35	1,01	0,88
FYN	BM724842	-1,88	-1,57	-2,23	-1,39	-1,28	0,09	0,34	0,09	0,92	0,78
GADD45A	NM_001924	1,85	1,93	2,03	1,18	1,27	0,11	0,05	0,14	1,02	0,77
GGT1	NM_013430	-1,74	-2,09	-3,00	-1,50	-1,30	0,18	0,05	0,01	0,70	0,75
GRB10	D86962	1,88	1,60	1,07	-1,04	-1,03	0,12	0,09	0,89	1,07	1,02
GSS	NM_000178	-1,36	-2,66	-2,34	-1,96	-1,42	0,21	0,00	0,05	0,29	0,33
GSTA4	NM_001512	-1,62	-1,41	-1,11	-1,03	-1,03	0,28	0,43	0,97	1,08	1,06
GSTM3	J05459	-1,36	-1,32	-1,75	-1,32	-1,43	0,69	0,50	0,14	0,83	0,47
GSTM4	M99422	-1,80	-1,74	-1,49	-1,45	-1,29	0,15	0,16	0,51	0,84	0,47
GSTP1	NM_000852	-1,39	-1,72	-1,36	-1,07	-1,13	0,75	0,26	0,90	1,06	1,07
GSTT1	NM_000853	1,75	1,63	1,26	1,66	1,47	0,08	0,12	0,76	0,24	0,07
HIF1A	NM_001530	1,93	1,92	2,82	1,32	1,44	0,06	0,05	0,02	0,63	0,36
HIPK3	BM472587	1,84	2,01	2,65	1,55	2,08	0,23	0,04	0,03	0,57	0,07
HLA-DMA	NM_006120	-1,31	-1,91	-1,59	-1,35	-1,31	0,88	0,18	0,47	1,00	0,65
HLA-DPB1	AA348191	-1,22	-2,63	-2,14	-1,67	-1,58	0,60	0,00	0,05	0,59	0,12
HMGB1	AA653936	1,53	1,53	2,17	1,43	1,90	0,49	0,40	0,12	0,75	0,15
HMOX1	NM_002133	1,74	1,29	1,97	-1,04	-1,43	0,08	0,71	0,11	1,08	0,45
HPGD	NM_000860	6,53	5,75	6,37	1,69	2,30	0,00	0,00	0,00	0,40	0,01
HRAS	NM_005343	-1,53	-2,04	-1,91	-1,06	-1,16	0,45	0,06	0,23	1,08	1,02
HSPA12A	AI970972	-2,07	-1,97	-1,90	-2,07	-1,70	0,04	0,04	0,23	0,26	0,23
HSPCB	NM_007355	-1,64	-1,08	1,08	1,02	1,05	0,05	0,56	1,03	0,99	0,78
IF	NM_000204	1,58	1,76	1,49	1,50	1,04	0,21	0,12	0,50	0,56	0,98
IKBKB	AF080158	-1,21	-1,87	-1,40	-1,30	1,18	0,68	0,05	0,62	0,90	0,48
IL10	NM_000572	1,86	1,59	1,82	1,62	1,28	0,02	0,18	0,26	0,72	0,67
IL12RB1	NM_005535	1,13	-1,12	1,13	2,23	2,14	0,97	0,97	0,99	0,13	0,01
IL15RA	NM_002189	-1,56	-1,87	-1,65	1,06	-1,35	0,24	0,14	0,51	1,08	0,65
IL18R1	NM_003855	2,07	1,71	1,44	1,23	1,45	0,01	0,01	0,19	0,99	0,39
IL18RAP	NM_003853	1,79	1,80	2,29	1,69	2,09	0,21	0,11	0,02	0,42	0,01
IL1R1	NM_000877	2,09	3,17	1,87	1,02	2,07	0,01	0,00	0,16	0,92	0,05

IL1R2	NM_004633	2,57	1,76	1,48	1,00	1,22	0,00	0,08	0,57	1,07	1,02
IL1RAP	NM_002182	2,68	1,99	2,18	-1,17	1,37	0,00	0,05	0,08	1,06	0,57
IL1RN	NM_000577	1,61	1,38	1,74	1,25	1,29	0,25	0,41	0,32	0,90	0,67
IL21R	NM_021798	-1,83	-1,63	-2,33	1,09	-1,35	0,05	0,22	0,05	1,02	0,73
IL2RA	NM_000417	-1,38	-1,50	-1,76	-1,15	1,08	0,57	0,37	0,27	1,06	1,11
INPP5A	Z31695	1,77	1,54	1,81	1,09	1,10	0,16	0,25	0,27	0,99	0,96
IRAK4	NM_016123	1,69	1,87	1,44	1,09	1,43	0,26	0,07	0,58	1,08	0,50
IRF3	NM_001571	-1,19	-1,77	-1,49	-1,43	-1,36	0,96	0,25	0,53	0,83	0,55
ITCH	NM_031483	1,19	1,74	1,45	1,15	1,27	0,94	0,17	0,65	1,08	0,84
ITGB3	NM_000212	1,72	1,95	1,47	-1,06	-1,29	0,12	0,02	0,35	1,07	0,79
ITGB3	S70348	1,78	2,51	1,93	-1,21	-1,43	0,06	0,00	0,10	1,07	0,51
ITPKC	D38169	1,30	1,11	-1,76	1,10	1,08	0,13	0,14	0,04	0,91	0,94
ITPR3	NM_002224	-1,72	-1,66	-2,24	-1,06	-1,08	0,12	0,21	0,08	1,09	1,02
JUND	NM_005354	2,12	1,73	1,51	2,04	1,75	0,04	0,15	0,66	0,28	0,11
KLF2	NM_016270	1,70	1,50	2,01	1,29	1,05	0,18	0,33	0,16	0,82	1,09
LIME	NM_017806	-1,83	-1,75	-3,42	-1,22	-1,21	0,08	0,13	0,00	0,86	0,85
LTF	NM_002343	1,06	-1,38	1,16	1,85	1,53	0,08	0,04	0,10	0,23	0,03
LY96	NM_015364	1,31	1,69	2,17	1,53	2,38	0,76	0,17	0,11	0,77	0,01
MAP3K8	NM_005204	1,75	1,49	2,19	1,18	1,46	0,33	0,48	0,09	0,92	0,51
MAPK8IP1	AF074091	-2,89	-2,02	-3,61	-2,62	-3,08	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
MCP	X59405	1,34	1,28	2,12	-1,09	1,42	0,30	0,37	0,07	0,66	0,33
MKNK2	NM_017572	-1,79	-1,64	-1,59	1,05	1,10	0,08	0,07	0,46	0,94	0,86
MMP8	NM_002424	3,32	3,01	3,36	2,54	3,05	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
MPO	NM_000250	1,33	1,02	1,52	1,40	1,57	0,53	0,82	0,17	0,48	0,06
MRAS	NM_012219	-1,13	-1,64	-1,63	-1,12	-1,49	0,90	0,22	0,29	0,98	0,48
NEDD4	D42055	2,35	2,37	2,97	2,87	3,69	0,01	0,01	0,01	0,04	0,00
NFAT5	NM_006599	-1,51	1,06	-1,52	-1,78	-1,31	0,44	0,65	0,28	0,35	0,38
NFKB1	AF213884	-1,52	1,10	-1,94	-2,35	-1,22	0,52	0,96	0,19	0,14	0,83
NK4	NM_004221	-1,55	-1,89	-1,91	1,28	-1,03	0,26	0,09	0,14	0,85	1,05
NSMAF	NM_003580	1,66	1,41	1,84	-1,35	1,40	0,28	0,31	0,22	0,79	0,67
OGDH	NM_002541	1,59	1,69	1,70	1,24	1,04	0,13	0,11	0,09	0,95	0,78
PDCD1LG1	NM_014143	1,37	2,03	1,22	-1,65	-1,43	0,37	0,01	0,79	0,58	0,22
PDGFC	NM_016205	2,46	3,28	4,85	1,07	1,15	0,00	0,00	0,00	1,01	0,73
PDLIM7	NM_005451	1,07	-1,13	-1,97	1,04	-1,30	0,93	0,80	0,14	0,93	0,52
PECI	NM_006117	-1,78	-1,87	-1,99	-1,44	-1,09	0,20	0,18	0,21	0,97	1,09
PIK3CA	NM_006218	1,89	2,20	2,47	1,50	1,94	0,21	0,01	0,04	0,50	0,14
PIP5K2A	NM_005028	-1,29	-1,44	-1,64	-2,09	-1,57	0,30	0,23	0,20	0,24	0,25
PLA2G7	NM_005084	-2,45	-2,68	-1,54	-1,18	-1,09	0,00	0,00	0,26	1,00	0,49
PLAU	NM_002658	-2,39	-2,69	-1,82	1,16	1,31	0,00	0,00	0,09	0,98	0,29
PLCB1	AB011153	-1,40	-1,69	-1,65	-2,44	-1,78	0,41	0,11	0,24	0,10	0,14
PLCL1	NM_006226	1,66	2,35	2,26	1,71	1,28	0,19	0,00	0,08	0,54	0,54
PPBP	NM_002704	1,94	1,94	2,10	1,07	1,42	0,06	0,05	0,08	1,08	0,56
PRKAR1B	M65066	1,20	1,45	1,19	-1,52	-1,77	0,60	0,32	0,93	0,74	0,10
PRKAR2A	NM_004157	1,56	1,83	1,13	1,20	1,27	0,28	0,08	0,93	1,02	0,74
PRKAR2B	NM_002736	2,04	2,09	2,25	1,12	1,63	0,04	0,02	0,04	1,02	0,33
PRKD1	NM_002742	-1,27	-1,41	-2,11	-2,04	-1,98	0,77	0,28	0,05	0,14	0,03
PRKD2	AF309082	-1,76	-1,48	-2,52	-2,48	-1,74	0,03	0,23	0,03	0,09	0,12
PROC	NM_000312	-1,42	-1,91	-2,20	-1,38	-1,60	0,65	0,05	0,05	0,73	0,11
PROS1	NM_000313	3,10	2,50	3,65	1,36	2,05	0,00	0,01	0,00	0,77	0,07
PRTN3	NM_002777	1,15	1,26	1,12	2,09	1,59	0,42	0,11	0,21	0,22	0,03
PSTPIP2	NM_024430	2,11	2,14	1,60	1,26	1,87	0,03	0,03	0,41	0,90	0,09
ptpn11	NM_032904	-1,75	-2,49	-2,73	-4,26	-2,27	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01

PTPN12	NM_002835	1,67	1,45	2,06	-1,04	1,10	0,33	0,31	0,18	1,06	1,01
PTPRCAP	BM712865	-1,05	-1,70	-1,60	-1,46	-1,76	1,05	0,15	0,47	0,77	0,17
PTPRCAP	NM_005608	-1,45	-1,51	-1,95	1,14	-1,03	0,38	0,39	0,13	0,89	1,09
RAB27B	AF131784	1,36	1,56	2,45	-1,02	1,27	0,61	0,19	0,04	1,07	0,75
RAP1B	NM_015646	1,58	1,16	1,96	1,13	1,47	0,43	0,87	0,18	0,95	0,47
RASA2	AK025305	2,43	2,40	2,85	1,56	2,16	0,00	0,00	0,00	0,37	0,02
ROCK1	NM_005406	2,35	2,15	3,54	1,48	2,21	0,01	0,01	0,00	0,29	0,01
RPS6KA4	NM_003942	-1,55	-1,94	-1,66	-1,19	-1,37	0,38	0,09	0,47	1,07	0,73
RPS6KA5	NM_004755	-3,25	-1,97	-1,98	-1,64	-1,61	0,00	0,05	0,19	0,58	0,25
RRAS	NM_006270	-1,63	-2,99	-1,70	-1,63	-1,64	0,27	0,00	0,40	0,74	0,29
SERPINB2	NM_002575	-1,78	-2,80	1,11	1,40	1,98	0,02	0,00	0,57	0,74	0,04
SERPIND1	NM_000185	-1,18	-1,79	-1,20	-1,19	-1,19	0,88	0,09	0,76	1,03	0,78
SERPINE1	NM_000602	1,48	2,14	1,77	-1,38	-1,83	0,29	0,02	0,13	0,74	0,12
SERPINF2	NM_000934	1,35	1,81	1,67	1,79	1,85	0,66	0,13	0,38	0,45	0,05
SERPING1	NM_000062	-2,70	-2,28	-2,49	-2,50	-2,64	0,00	0,02	0,02	0,04	0,00
SGPP1	NM_030791	1,28	1,45	2,88	1,31	1,66	0,52	0,32	0,01	0,59	0,10
SIRPB2	NM_018556	-1,67	-1,79	-2,10	-1,04	-1,33	0,17	0,11	0,07	1,08	0,61
SOCS3	NM_003955	1,71	1,28	1,10	1,30	-1,03	0,06	0,34	0,86	0,77	0,74
SPHK1	NM_021972	-1,16	-1,65	-2,54	-2,86	-1,62	0,96	0,08	0,02	0,03	0,26
SPIB	NM_003121	-2,00	-1,93	-2,71	1,05	-1,63	0,01	0,05	0,01	0,79	0,23
SPP1	NM_000582	-2,39	-1,92	-1,61	-1,22	-1,19	0,00	0,02	0,22	0,81	0,58
SREBF1	U00968	-1,11	-1,73	-1,58	-1,37	-1,43	0,62	0,14	0,39	0,94	0,26
SREBF2	NM_004599	-1,22	-1,50	-1,68	-2,12	-1,80	0,47	0,13	0,23	0,14	0,07
STK3	NM_006281	1,15	2,23	2,16	1,07	1,30	0,71	0,01	0,08	0,72	0,24
TANK	NM_004180	1,71	1,60	1,89	1,15	1,36	0,42	0,31	0,27	0,97	0,76
TBXAS1	AK000794	-1,19	2,13	1,50	-1,79	-1,35	1,04	0,02	0,28	0,44	0,52
TCL1A	NM_021966	-1,72	-2,05	-2,82	-1,70	-2,07	0,13	0,02	0,01	0,55	0,03
TGFB1I4	NM_006022	1,23	1,55	1,71	-1,27	-1,27	0,88	0,35	0,27	0,91	0,65
TGFBR2	D50683	1,45	1,55	1,83	1,04	1,00	0,27	0,10	0,21	0,98	1,04
TLR2	NM_003264	1,75	1,49	1,32	1,08	1,29	0,27	0,36	0,78	1,06	0,74
TLR5	NM_003268	1,26	1,62	1,42	1,04	1,25	0,88	0,12	0,58	1,04	0,76
TOB1	NM_005749	1,90	1,89	2,76	1,39	1,41	0,05	0,06	0,01	0,50	0,30
TRAF3	AF110908	-2,26	-1,51	-1,23	-1,45	-1,03	0,01	0,07	0,77	0,69	1,06
TRAF3	NM_003300	-1,47	-1,54	-1,69	-1,33	-1,12	0,23	0,32	0,38	0,97	1,02
TSC2	NM_021056	-1,54	-1,80	-2,65	-1,37	-1,39	0,33	0,16	0,02	0,94	0,43
TSC22D3	NM_004089	1,50	1,37	1,74	-1,58	-1,28	0,24	0,22	0,24	0,58	0,26
TXNRD1	NM_003330	1,23	1,36	1,30	1,14	1,65	1,02	0,76	0,95	1,09	0,29
TXNRD2	NM_006440	-1,55	-2,24	-1,77	-1,58	-1,90	0,46	0,05	0,40	0,76	0,13
VPREB3	NM_013378	-1,93	-1,56	-2,21	1,00	-1,69	0,01	0,14	0,04	0,92	0,16
VSIG4	NM_007268	2,14	2,02	2,18	-1,09	-1,12	0,00	0,00	0,06	1,07	1,02
WASL	NM_003941	-1,92	-2,29	-2,26	-1,08	-1,74	0,02	0,01	0,05	0,81	0,14

Anhang D: Studienprotokoll

Funktionelle Genetik der Wirts – Erreger – Interaktion bei Patienten mit schwerer Mehrfachverletzung, nekrotisierender Pankreatitis und Pneumonie (ARDS)

Inzidenz von septisch-toxischen Komplikationen, Sepsis und Multiorganversagen

1. Inhaltsverzeichnis

I. Informationsblatt: Ein- und Ausschlusskriterien

II. Patienten- Information/ Aufklärung

III. Patientenliste

IV.Kontaktadressen/ Ansprechpartner

V.Ethikantrag / Votum der Ethikkommission

VI. Studienprotokoll

A. Einführung
- Zusammenfassung und Zeitplan:

B. Studienziel:

C. Studiendesign:
- Patientengruppen
  * Fallzahlen
  * Einschlußkriterien
  * Ausschlußkriterien
- Ablauf der Studie (Zeitplan)
  * Baseline- Messungen (01.05. 2002 bis 04. 2004)
  * Beobachtungszeitraum
  * Erhobene Parameter
  * Klinische Daten (Untersuchungen/ Laborparameter)
  * Mikrobiologische Daten
  * Statistik

D. Nebenwirkungen/ Komplikationen
- Definition und Dokumentation

E. Statistik (WP5)

F. Ethische und gesetzliche Voraussetzungen
- Ethikkommision
- Patienteninformation

G. Literatur

H. Studienprotokoll, Dokumentation und Archivierung der Daten

I. Informationsblatt Ein- und Ausschlusskriterien

1. Einschlußkriterien

Die folgenden Kriterien müssen zum Einschluß eines Patienten in die Studie erfüllt sein, d.h. die folgenden Fragen müssen Sie mit **Ja** beantworten können.

♦ Ja () Nein () Vorliegen einer Einverständniserklärung

♦ Ja () Nein () Diagnose Polytrauma, Pankreatitis, ARDS (Pneumonie, Sepsis)

1. Schweres Polytrauma

Kriterien:

- Hannover polytrauma score > 20 points
- Injury severity Scale Score ISS > 25 (J Trauma (1):10-6, Jul 2001)
- Ausschluss von Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma

2. Akute nekrotisierende Pankreatitis

Kriterien:

- CT- Severity- Index (Balthazar,EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH, Radiology 1990; 174 – 331)
- Ranson Criteria (Crit. Care Med; 27:901, 1999)

3. Schwere Pneumonie

gemäß den **ATS-** Kriterien (Am. Rev Respir Dis 148: 1418 - 1426, 1993)

♦ Ja () Nein () PTS-Wert ≥ 20 und/oder ISS-Wert ≥ 25

♦ Ja () Nein () Alter ≥ 18 Jahre und ≤ 65 Jahre

♦ Ja () Nein () Aufnahme des Patienten auf die Intensivstation ≤12 Stunden nach dem Trauma bzw. der Diagnosestellung (Pankreatitis, ARDS/Pneumonie)

♦ Ja () Nein () Patient ist >18 Jahre alt.

♦ Ja () Nein () Klinischer Anhalt für eine Pneumonie ?

♦ Ja () Nein () Vollständige körperliche Untersuchung durchgeführt ?

♦ Ja () Nein () Mindestens 2 der folgenden Kriterien sind erfüllt:

-> Der Röntgenthorax des Patieten zeigt eine multilobuläre Beteiligung bei Aufnahme oder eine Größenzunahme des Infiltrates um 50% in den letzten 48 h (seit Aufnahme ?)

-> der systolische Blutdruck beträgt weniger als 90 mmHg, der diastolische weniger als 60 mmHg, oder es bestand die Notwendigkeit der Katecholamingabe über mehr als 4 h oder die Urinmenge in den letzten 4 Stunden betrug weniger als 80 ml.

-> Atemfrequenz > 30Atemzüge pro Minute oder aktive Kontraktion der Atemhilfmuskulatur oder paradxe abdominelle Bewegungen

-> Sauerstoffpartialdruck beträgt weniger als 68 mmHg CO_2 Partialdruck größer als 50 mmHg

2. Ausschlußkriterien

♦ Ja ( )Nein () Schwere Einzelverletzungen wie Wirbelsäulen- und Beckenverletzungen (Barytraumen)

♦ Ja () Nein () Patienten mit anzunehmendem Hirntod, aber dennoch funktionierendem Kreislauf

♦ Ja () Nein () Massive ZNS-Schädigung (Patienten mit im Vordergrund stehendem operativ zu versorgendem Schädel-Hirn-Trauma, SHT II°-III°)

♦ Ja () Nein () Patienten, die nach dem Unfall sekundär nach Gießen verlegt werden

- ♦ Ja () Nein () Reanimation nach Herzstillstand oder schwerer kardiogener Schock
- ♦ Ja () Nein () Verabreichung steroidaler und nicht-steroidaler Antiphlogistika
- ♦ Ja () Nein () Schwangere Frauen und Frauen in der Stillzeit
- ♦ Ja () Nein () Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie
- ♦ Ja () Nein () Patienten mit Verbrennungen aller Stadien
- ♦ Ja () Nein () Versterben des Patienten innerhalb der ersten 3 Tage auf der Operativen Intensivstation
- ♦ Ja () Nein () Immundefizienz - angeborene Syndrome, HIV
- ♦ Ja () Nein () Chronische Infektionskrankheiten
- ♦ Ja () Nein () Parallel stattfindende andere akute Infektionen (Endokarditis, EBV, etc.)
- ♦ Ja () Nein () Zeichen eines akuten Myokardinfarkt
- ♦ Ja () Nein ( ) Zerebrovaskuläre Insuffizienz, Z.n. Apoplex
- ♦ Ja () Nein () Endokrine Störungen, die mit erhöhten Cortisol- Spiegeln einhergehen
- ♦ Ja () Nein () Immunsupprimierte Patienten
- ♦ Ja () Nein () Entzündlich rheumatische Erkrankunen - Vaskuliti-den
- ♦ Ja () Nein () Begleitende schwere Erkrankungen mit einer Lebenserwartung unter 4 Monate
- ♦ Ja () Nein () Bilirubinämie > 5 mg /dl zu Beginn der Basline-Messungen
- ♦ Ja () Nein () Vorerkrankungen der Lunge und der Pleura
- ♦ Ja () Nein () Tumor der Lunge/ der Pleura oder Metastasen eines anderen Tumors
  in der Lunge/der Pleura
- ♦ Ja () Nein () Myeloproliferative Erkrankungen/ OMS/ Myelo-dysplasitsches Syndrom

II. Patienteninformation

Thema der Studie

Funktionelle Genetik der Wirts – Erreger – Interaktion bei Patienten mit schwerer Mehrfachverletzung, nekrotisierender Pankreatitis und Pneumonie (ARDS) Inzidenz von septisch-toxischen Komplikationen, Sepsis und Multiorganversagen

Untersuchungsleiter der Studie: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Hempelmann
Prof. Dr. med. Seeger,
Prof. Dr. med. Lohmeyer
Prof. Dr. med. Chakraborty

Ziel der Studie

Die an der Universität Giessen fachübergreifend angelegte Genomforschungs-Studie soll Zusammenhänge zwischen dem Verlauf schwerer Infektionen (Polytrauma, Bauchspeicheldrüsenentzündung, Lungenentzündung) und der entzündlichen Reaktion des Körpers sowie den hierbei aktiven Genen sowohl in Blutzellen als auch in Zellen der Lunge untersuchen. Die Studie hat das Ziel, vor dem Hintergrund dieser Gen-Analysen eine auf den Patienten individuell abgestimmte Behandlungsmethode zu entwickeln.

Ihr Arzt hat Sie zur Aufnahme in die Studie vorgeschlagen. Sie sollten sich nun genügend Zeit nehmen, um etwas über Ihre Erkrankung und unser Vorhaben sowie über die damit für Sie verbundenen "Belastungen" zu erfahren.

Über Ihre Erkankung ...

Das Polytrauma, die Bauchspeicheldrüsenentzündung, die Lungenentzündung stellt eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung dar. Der lokale Entzündungsprozess kann durch ein Ausschwemmen der Erreger kompliziert werden (Blutvergiftung oder Sepsis). Die Sepsis stellt auch heute noch - trotz vielfältiger antibiotischer Möglichkeiten - eine Komplikation der Erkrankung (Polytrauma, Bauchspeicheldrüsenentzündung, Lungenentzündung) dar, die mit einer hohen Sterblichkeit einhergeht. Eine weitere Komplikation ist das sog. Lungenversagen, bei dem der Körper nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden kann. Dies geht meist mit schweren Stoffwechselentgleisungen einher und muss mit einer künstlichen Beatmung überbrückt werden.

Ablauf und Durchführung der Studie

Sollten Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschließen, werden Ihnen zunächst innerhalb der ersten 12 Stunden einmal ca. 40ml Blut zusätzlich abgenommen. Die zusätzlichen Blutentnahmen (20 ml) werden im Rahmen der Routineblutentnahmen täglich bis zum 14. Tag und danach am 21. Und am 28. Tag wiederholt.

Risiken und unerwünschte Wirkungen

Aufgrund der Zeitabstände der Blutentnahmen und der im weiteren Verlauf geringen Entnahmemengen von 20 ml ist durch diese Maßnahme kein relevanter Abfall des roten Blutfarbstoffes zu erwarten. Es werden keine zusätzlichen Untersuchungen außerhalb der klinischen Notwendigkeit an Ihnen durchgeführt.

Medikamentöse Ansätze oder experimentelle Therapien, die in der Erprobung sind, sind im Verlauf der Studie nicht vorgesehen.
Insgesamt wird die Therapie Ihrer Erkrankung durch die Zusatzuntersuchungen im Rahmen der Studie nicht verändert. Sie wird unabhängig von den o.g. im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten zusätzlichen Blutentnahmen und den **laborchemischen** Zusatzuntersuchungen nach den üblichen standardisierten Behandlungsrichtlinien durchgeführt.

Versicherung

Für Sie besteht weiterhin eine Versicherung, die für körperliche Schäden haftet, die wider Erwarten aufgrund dieser Untersuchungen oder anderer studienbedingter Maßnahmen, wie etwa Blutentnahmen, auftreten.

Ethische und gesetzliche Aspekte

Dieses Forschungsvorhaben wurde einer unabhängigen Ethik-Kommission vorgelegt, diese hat der Durchführung zugestimmt.

Für die oben genannten Untersuchungen ist eine Einwilligung in schriftlicher Form notwendig, die Sie in der Anlage "Einverständnis-erklärung" finden. Diese Zustimmung kann jederzeit, auch nur mündlich und ohne Angaben von Gründen, widerrufen werden.

Die bei dieser Studie erhobenen Befunde und Daten unterliegen den Bestimmungen des Datenschutzgesetzes. Bei ihrer Veröffentlichung wird jeder Bezug zu Ihrer Person unkenntlich gemacht. Auch hierzu bitten wir um Ihre Zustimmung.

III. Patientenliste

Patienten- Nummer Name,Vorname Geburtsdatum Adresse/Tel. Patienten ID

IV. Kontaktadressen/ Ansprechpartner

*

*

*

*

*

*

*

*

V. **Ethikantrag** / Votum der Ethikkommis-

sion

F O R M A L I S I E R T E R A N T R A G

ZUR BEURTEILUNG EINES MEDIZINISCHEN FORSCHUNGSVORHABENS AM MENSCHEN IM FACHBEREICH HUMANMEDIZIN DER JLU-GIESSEN

Als Anlagen sind beizufügen:
Begründung und detaillierte Beschreibung des Vorhabens.
Patientenaufklärung.
Einverständniserklärung nach Muster.

I. Allgemeine Angaben

1. Datum der Antragstellung:*13.07.2001*

2. Titel des Vorhabens*:*

Funktionelle Genetik der Wirts – Erreger – Interaktion bei Patienten mit schwerer Mehrfachverletzung,
nekrotisierender Pankreatitis und Pneumonie (ARDS)
Inzidenz von septisch-toxischen Komplikationen, Sepsis und Multiorganversagen

evtl. Code des Sponsors*:* ***entfällt***

2a. Handelt es sich um eine multizentrische Studie
ja / ***nein***

2b. Erstbegutachtende Ethik-Kommission (deren Bescheid ggf. beifügen): *entfällt*

3. Leiter der Klinischen Prüfung gemäß AMG/MPG:
Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann

4. Hiesige(r) Prüfarzt / Prüfärzte:

- ***Prof. Chakraborty***
- ***Prof. Hempelmann,PD Dr. Menges, Dr. Langefeld, Dr. Welters, Dr. Junger, Dr. Quinzio, Dr. Benson, Dr. Sciuk***
- ***Prof. Lohmeyer, Dr. Walmrath, Prof. Grimminger, Dr. Mayer, B. Kroegel, A. Althoff***
- ***Prof. Gortner***

5. Gießener Institution, in der das Vorhaben durchgeführt werden soll:

Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Klinik II, Anästhesiologie, Allgemeinchirurgie, Unfallchirurgie, Pädiatrie.
Abteilungsleiter: ***Prof. Chakraborty, Prof. Seeger, Prof. Hempelmann, Prof. Gortner, Prof. Schnettler, Prof. Schwemmle***

6. Biometrische Bearbeitung durch: .
Abteilung für klinische und administrative Datenverarbeitung, Institut für Medizinische Informatik, MoreData GmbH Gießen

8. Kostenträger:
- ☐ Kommerzieller Sponsor (bitte nennen):
- = öffentliche Förderung (bitte nennen): ***Bundesministerium für Forschung und Bildung im Rahmen des Förder-Programmes „Krankheitsbekämpfung durch Humangenomforschung"***
- ☐ oder Klinikum der JLU

II. Beschreibung des Vorhabens

1. Ziel(e) der Studie: ..

Erfassung des Genom-weiten Gen-Expressionsprofils des Wirts bei Sepsis und septischem Organversagen zur Identifizierung pathogenetisch und prognostisch relevanter Kandidaten-Gene

2. Klassifkation der Studie (Zutreffendes ankreuzen; evtl. mehrfach ergänzen)
- ☐ Prüfung von Arzneimitteln gemäß AMG
- ☐ Prüfung von Medizinprodukten gemäß MPG
- ☐ Phase I
- ☐ Phase II
- ☐ Phase III
- ☐ Phase IV
- = **Diagnostische Prüfung**
- ☐ Therapeutische Prüfung
- ☐ Humanexperiment
- ☐ Interview
- ☐ Ermittlung von Normalwerten

3. Geplanter Beginn und voraussichtliche Dauer der Studie: 01.03.2002, voraussichtlich 3 Jahre

4a. Zahl der Patienten/Probanden: **50 Patienten pro Jahr und klinischer Entität**

Geschlecht: ☐ männlich, ☐ weiblich, = **gemischt**
Insgesamt: **50 davon in Gießen 50**
Stationär: **50**
ambulant*:* **entfällt**

4b: Voraussichtliche Dauer der Behandlung für den einzelnen Patienten/Probanden:.
14 Tage .

4c: Ist eine finanzielle Entschädigung vorgesehen?
ja / **nein**

4d: Alter der Patienten/Probanden: .
In den Patientengruppen 1 bis 3 liegt das Alter der Patienten über 18 Jahre, in der Untergruppe 4 handelt es sich um Früh- und Neugeborene.

4e: Sind die Patienten vor Durchführung der Studie zustimmungsfähig? **ja / nein**
... während der Forschungsmaßnahme zustimmungsfähig? **ja / nein**

5a: Einschlußkriterien:

Patientengruppe 1 (schweres Polytrauma) mit den Einschlußkriterien: Hannover polytrauma score > 20 points, Injury severity scale score > 25 , (J Trauma (1):10-6, Jul 2001)
Patientengruppe 2 (akute nekrotisierende Pankreatitis) mit den Einschlußkriterien CT Severitiy Index (Balthazar,EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH, Radiology 1990; 174 – 331) und den Ranson Criteria (Crt. Care Med. 27:901, 1999)
Patientengruppe 3 (schwere Pneumonie) gemäß den ATS- Kriterien (Am. Rev. Resp. Dis. 148: 1418 – 1426, 1993)

5b: Hauptzielkriterien:

Analyse des Genom-weiten Genexpressionsprofils bei Sepsis und Multiorganversagen mit Hochdurchsatzverfahren

5c: Nebenzielkriterien:

Bioinformatische Vernetzung klinischer Patientendaten mit dem Genexpressionsmuster

5d: Abbruchkriterien:

sind der Tod eines Patienten sowie Komplikationen im Verlauf, die die diagnostischen Routineprozeduren, in deren Rahmen die Probenentnahme erfolgt, nicht mehr durchführbar oder vertretbar machen.

In jedem Fall stellt der Wunsch des Patienten, seines Angehörigen oder seines Betreuers auch nach schriftlicher Einwilligung in die Studie durch Widerruf seiner Einverständniserklärung ein Abbruchkriterium dar sowie im Rahmen der klinischen Diagnostik zusätzlich erbrachte Informationen und Diagnosen des Patienten, welche die weiteren Belastungen ebenfalls nicht mehr vertretbar machen.

6. Studienart (Zutreffendes ankreuzen, eventuell mehrfach; ergänzen):

- ☐ offen
- ☐ randomisiert
- ☐ einfachblind
- ☐ doppelblind
- ☐ multizentrisch
- ☐ Prüfung gegen Standardtherapie
- ☐ Prüfung gegen Placebo

= explorative Beobachtungs- Studie, in deren Rahmen im definierten Patientenkollektiv pathophysiologisch relevante Daten anschließend bioinformatisch ausgewertet werden sollen

7. Studienbedingte Maßnahmen am Patienten/Probanden (bitte ankreuzen und ergänzen):

stationärer Aufenthalt ☐
Blutentnahmen =
Blasenkatheter ☐
Endoskopie =
Biopsien ☐
Röntgendiagnostik ☐
radioaktive Substanzen ☐

Therapiepausen □

8. Dient die Studie

- auch unmittelbar den individuellen Interessen jedes einzelnen Patienten? ja **/nein**

Wenn ja, worin besteht dieser Vorteil für den Patienten*:* **entfällt**

- einem rein wissenschaftlichen Ziel ohne unmittelbaren Nutzen für den Patienten, aber mit mittelbarem Nutzen für zukünftige Patienten? **ja** / nein

9a. Bei Arzneimittelprüfungen (bitte ankreuzen): entfällt

Das Medikament ist:

□ neu entwickelt, nicht registriert.
□ bekannt, nicht registriert.
□ bekannt, registriert, mit neuer Indikation oder Dosierung.
□ in anderen Ländern zugelassen oder registriert.
□ bekannt, registriert.

9b. Bei Medizinprodukten: Besitzt das Produkt eine CE-Nr.? ja / nein

10a. Inwieweit bedeutet die Studie eine zusätzliche Belastung für Patienten/Probanden?

Im Rahmen der routinemäßigen und klinisch indizierten Blutentnahmen wird zusätzliches Probenmaterial gewonnen:an Material der aus klinischer Indikation durchgeführten bronchoalveolären Lavagen werden zusätzliche Untersuchuungen durchgeführt.

Die Stunde- Null- Probe mit einem Volumen von 30 ml, die weiteren 4 Proben mit jeweils 20 ml. Die im Rahmen der routinemäßig durchgeführten und klinisch indizierten bronchoalveolären Lavagen gewonnenen Probenvolumina entsprechen den internationalen Richtlinien (7 x 20 ml); hierbei wird ein Teil des überschüssigen Materials für die Genexpressionsanalyse verwendet. Die Untersuchungen, die im Rahmen des RDS Frühgeborener durchgeführt werden, stellen ebenfalls keine zusätzliche Belastung dar, da die Blutentnahmen entweder aus der Nabelschnur (Stunde Null) oder aus übriggebliebenem Material der Routinediagnostik rekrutiert werden. Das gleiche gilt für die tracheale Absaugung, die lediglich im Rahmen der klinisch Routine und Notwendigkeit durchgeführt wird. Das hierbei anfallende überschüssige Material wird für die Genexpressionsanalyse verwendet.

10b. Welche typischen Nebenwirkungen oder Komplikationen sind zu erwarten? entfällt

10c. Welche Risiken bestehen für die Probanden oder Patienten?

Im Rahmen der routinemäßigen und klinisch indizierten Blutentnahmen und bronchoalveolären Lavagen wird zusätzliches Probenmaterial gewonnen:

Die Stunde- Null- Probe mit einem Volumen von 30 ml, die weiteren 4 Proben mit jeweils 10 ml. Die aus der BAL gewonnenen Probenvolumina entsprechen den internationalen Richtlinien (7x20 ml).

Die Untersuchungen, die im Rahmen des RDS Frühgeborener durchgeführt werden, stellen ebenfalls keine zusätzliche Belastung dar, da die Blutentnahmen entweder aus der Nabelschnur (Stunde Null) oder aus übriggebliebenem Material der Routinediagnostik rekrutiert werden. Das gleiche gilt für die tracheale Absaugung, die lediglich im Rahmen der klinisch notwendigen Routine und nicht extra für die Studie durchgeführt wird.

10d. Wie können Komplikationen erkannt und behandelt werden?

Die Patientenkollektive werden intensivmedizinisch betreut und haben daher einen Zugang zur Maximalversorgung.

11. Art und Höhe der Versicherung für Versuchspersonen, Projektleiter und Mitarbeiter

(bitte ankreuzen).

= Es handelt sich um ein Projekt, welches unter Verantwortung des Abteilungsleiters durchgeführt werden soll, so daß die allgemeinen Haftungsgrundsätze des Klinikums gelten.

☐ Es handelt sich um ein Projekt nach dem Arzneimittel- oder Medizinproduktegesetz. Es besteht eine Probandenversicherung mit einer Deckungssumme von 1 Mio. DEM (bitte **Police** beifügen!).

☐ Es handelt sich um ein weiteres Projekt. Für Personenschäden besteht eine Haftpflichtversicherung mit einer Deckungssumme von DEM ..... (bitte **Police** beifügen!).

12. Wenn ein zu prüfendes Medikament nicht zugelassen oder für die beabsichtigte Indikation nicht zugelassen ist: entfällt

Sind die Unterlagen beim Bundesinstitut für Arzneimittel hinterlegt? ja / nein

Mit der Durchführung
des Forschungsvorhabens
einverstanden

.....

.....

Unterschrift des Abteilungsleiters Unterschrift des Antragstellers

Adresse:

Abteilung Anaesthesiologie
und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann
Rudolf-Buchheim-Str. 7 D - 35385 Gießen
Telefon +49 641 99 44400
Telefax +49 641 99 44409
e-mail Thilo.Menges@chiru.med.uni-giessen.de

VI. Studienprotokoll

Funktionelle Genetik der Wirts – Erreger – Interaktion bei Patienten mit schwerer Mehrfachverletzung, nekrotisierender Pankreatitis und Pneumonie (ARDS)
Inzidenz von septisch-toxischen Komplikationen, Sepsis und Multiorganversagen

Darstellung des Forschungsvorhabens

Funktionelle Genetik der Wirts – Erreger – Interaktion bei Patienten mit schwerer Mehrfachverletzung, nekrotisierender Pankreatitis und Pneumonie (ARDS)

Inzidenz von septisch-toxischen Komplikationen, Sepsis und Multiorganversagen

A. Einführung

Die Mortalitätsraten der Sepsis, des septischen Schocks und des septischen Organversagens bleiben inakzeptabel hoch und haben sich in den letzen 20 Jahren nicht wesentlich gebessert. Das Zusammenspiel von mikrobiellem Angriff und Immun- und Entzündungsantwort des Wirtes ist komplex und unvollständig verstanden. Es wird geschätzt, dass ungefähr bei 1% aller stationären Patienten ein septischer Schock - mit Mortalitätsraten von 30 - 40% - diagnostiziert werden. Die Sepsis und das damit verbundene Syndrom des Multiorganversagens sind die Haupttodesursachen in der modernen Intensivmedizin.

Sepsis ist keine Krankheit sondern ein Syndrom, das als Konsequenz der direkten zellulären Effekte der mikrobiellen Agenzien und der Induktion einer systemischen Entzündungsantwort zu einem Multiorganversagen im betroffenen Wirt führt. Dies führt zu schweren Makro- und Mikrozirkulationsstörungen und damit zu Störungen der Organperfusion.

Das am Universitätsklinikum Gießen unterstützten Projekt im Teilbereich „Infektionen und Entzündungen“ des nationalen Genomforschungsprojekts untersucht einen klinisch angewandten Forschungzweig mit dem Ziel, Krankheits-relevante Genexpressionsmuster und die hierdurch vermittelten pathogenetischen Abläufe bei Sepsis und septischen Organversagen zu definieren. Klinische und experimentelle Studien zeigen, dass die individuelle genregulatorische Wirtsantwort auf eine Infektion wesentlich den klinischen Verlauf der Sepsis oder des septischen Organversagens mitbestimmt. In den vergangenen Jahren wurden Polymorphismen einzelner Zytokingene identifiziert, die das Zytokinexpressionsprofil und damit die individuelle Entzündungsreaktion bei Infektionsprozessen beeinflussen. Die Vermutung liegt nahe,

dass diese Gene und ihre Produkte eine wichtige Rolle bei der Initiierung und dem klinischen Verlauf von Sepsis und septischem Organversagen spielen.

Ergebnisse

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Risiko schwer polytraumatisierter- und septischer Patienten an einem Multiorganversagen zu versterben abhängig ist von spezifischen Genexpressionen (Genexpressionsprofilen). Als wichtigste exprimierte Gene sind vor allem Zytokingene (Tumor-nekrose-faktor-alpha TNF-alpha, TNF-beta, Interleukin-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10,IL-12, Interferon-gamma Chemokine wie CCR5 und Serinproteasen wie Plasminogen-aktivator-inhibitor-1 (PAI-1) zu nennen.

Projektbeschreibung

Im Rahmen des Projektes wird die Genexpression bei Patienten mit schwerem Polytrauma / SIRS, akut nekrotisierender Pankreatitis, Pneumonie / pneumogener Sepsis und IRDS mit einem Gestationsalter von < 32 Wochen analysiert, die eine Sepsis und/oder septisches Multiorganversagen entwickeln. Das Ziel ist, kompartiment- und zellspezifische Verlaufsmuster der genregulatorischen Wirtsantwort („gene expression profiling") zu erfassen. Dies erfolgt bei den definierten Patientenkollektiven sequentiell im Krankheitsverlauf und wendet unter anderem die „cDNA microarray chip technology" im Hochdurchsatzverfahren an.

Zu bearbeitende wissenschaftliche Probleme sind im einzelnen

1. Entdeckung Sepsis-relevanter Genvariaten

Ziel ist dabei die Identifizierung erblicher Varianten (single nucleotide polymorphisms, SNPs) der humanen Gene, die die individuelle Entzündungsreaktion bestimmen. Dies soll einerseits durch die Überprüfung von Genfamilien, die bekanntermassen eine zentrale Rolle in der Erkennung von Pathogenen und der Initiierung von Zellsignalen haben, geschehen, bezüglich ihrer funktionellen Mutation. Andererseits soll die Korrelation von genetischen Variationen in diesen Zielgenen mit dem klinischen Verlauf sowie der Prognose der Sepsis und des septischen Organversagens betrachtet werden.

2. Genexpression des Wirtes während klinischer Sepsis

Diese Projekt fokussiert auf die transkriptionelle Antwort im Rahmen einer Sepsis und deckt dabei das ganze Genom ab. Kompartiment- und Zellspezifität sowie der Zeitverlauf der Wirtsexpressionsprofile werden untersucht. Diese Studien werden an drei gut definierten Patientenkohorten untersucht, in denen die Abfolge der Ergebnisse vom Beginn der Sepsis bis zum voll entwickelten Endstadium (MODS) klinisch wie genomisch überwacht wird. Die Krankheitsbilder sind im einzelnen,

1. schweres Polytrauma
2. schwere nekrotisierende Pankreatitis
3. schwere Pneumonie

3. Klinische Daten Management/Bioinformatik

Das Ziel der Bioinformatik besteht darin, biostatistische und bioinformatorische Methoden weiter zu entwickeln, um klinische Informationen mit Daten funktioneller Genomik verbinden zu können. Dies bedeutet

Die Etablierung von standardisierten, robusten statistischen Methoden für die Evaluierung und das Gruppieren von Datensätzen.

Die Standardisierung medizinischer Daten zwischen verschiedenen Abteilungen, Entwicklung von Datenbanken.

Entwicklung biostatistischer Methoden für die Verbindung klinscher Daten und Daten der funktionellen Genomik

Erstellen grösserer Langsschnitt-Kohorten durch das Netzwerk, um klinische und biologische Daten zu sammeln.

B. Studienziel

Die Erfassung von örtlich und zeitlich reproduzierbaren Genexpressionsmustern in spezifischen Zellpopulationen mit krankheitsbezogenen

Schlüsselfunktionen wird die Identifikation neuer krankheitsrelevanter Gene im komplexen Geschehen der Hyperinflammation und Sepsis sehr erweitern. Es sollen Genexpressionsprofile (Marker) identifiziert werden, die eine Stratifizierung der intensivmedizinischen Therapie nach Risikogruppen ermöglichen. Dies verweist auf den klinischen Bezug dieser molekulargenetischen Untersuchungen.

C. Studiendesign

Patienten

Die Untersuchungen werden an Patienten der Operativen Intensivstation der Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin am Universitätsklinikum Gießen durchgeführt.

Bei allen Patienten werden als Komplikationen neben Infektionen, Organfunktionsstörungen bis hin zum Organversagen, Wundheilungsstörungen und Thrombosen auch Lungenembolien, Gewebsnekrosen sowie Blutungen und gastrointestinale Funktionsstörungen wie Ulzera und Ileuszustände verzeichnet. Nicht berücksichtigt werden Nervenläsionen und psychoorganische Durchgangssyndrome. Da die vorliegenden Informationen prospektiv erfaßt werden, enthalten sie nur die Komplikationen, die von den behandelnden Ärzten als bedeutsam angesehen werden.

Von den verstorbenen Patienten wird die Überlebenszeit dokumentiert und eine Einteilung nach den Todesursachen erstellt.

Gruppeneinteilung der Patienten

Die Patienten wurden nach klinischem Bild und Verlauf den folgenden Gruppen zugeordnet:

1. **Schweres Polytrauma**

   - Gruppe 1 - polytraumatisierte Patienten ohne weitergehende Komplikationen im Sinne der zugrundeliegenden Definitionen für Verletzungsscores, Polytrauma, Organfunktionsstörungen,

Ein- und Ausschlußkriterien sowie Sepsis und MODS , **nicht verstorben**

- Gruppe 2 - polytraumatisierte Patienten mit Sepsis und/oder MODS entsprechend den zugrundeliegenden Definitionen, **nicht verstorben**
- Gruppe 3 - polytraumatisierte Patienten mit Sepsis und/oder MODS entsprechend den zugrundeliegenden Definitionen, **verstorben**

2. Schwere nekrotisierende Pankreatitis

- Gruppe 1 - Patienten ohne weitergehende Komplikationen im Sinne der zugrundeliegenden Definitionen für Organfunktionsstörungen, Ein- und Ausschlußkriterien sowie Sepsis und MODS **, nicht verstorben**
- Gruppe 2 - Patienten mit Sepsis und/oder MODS entsprechend den zugrundeliegenden Definitionen, **nicht verstorben**
- Gruppe 3 - Patienten mit Sepsis und/oder MODS entsprechend den zugrundeliegenden Definitionen, **verstorben**

3. Schwere Pneumonie

Die Patienten werden entsprechend dem Studienprotokoll der Medizinischen Klinik eingeschlossen. Die Probenentnahmezeitpunkte und die Datenerfassung geschieht aber entsprechend dem Protokoll für polytraumatisierte Patienten und Patienten mit nekrotisierender Pankreatitis.

Grunddaten

Die Verteilung der Verletzungsschwere wird nach dem Hannoverschen Polytrauma-Schlüssel (PTS) sowie nach dem Injury Severity Score (ISS) erfaßt und die mittlere Anzahl der Einzelverletzungen pro Patient aufgelistet (PTS- und ISS-Score siehe Anhang) [19; 248]. Daneben werden die Rettungszeit und das Rettungsmittel dokumentiert. Die

für die Festlegung der Organfunktionen notwendigen hämodynamischen und respiratorischen Parameter sowie die laborchemischen Daten werden über ein Computer-gestütztes Patienten-Daten-Management-System (ICU-DATA System) prospektiv erfaßt.

Definitionen

Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien

Grundvoraussetzung für die Klassifizierung des Verletzungsausmaßes eines Patienten als Polytrauma ist die Erfüllung der Definitionskriterien nach Hempelmann et al., Trentz et al. und Tscherne et al. [150; 343; 347]. Um keine Patienten zu berücksichtigen, die lediglich einer intensiven Überwachung bedürfen, werden die folgenden Ein- und Ausschlußkriterien festgelegt.

Die Einschlußkriterien umfassen:

I. Vorliegen einer Einverständniserklärung

II. Diagnose Polytrauma, Pankreatitis, ARDS (Pneumonie, Sepsis)

1. Schweres Polytrauma

Kriterien:

- Hannover polytrauma score > 20 points
- Injury severity Scale Score ISS > 25 (J Trauma (1):10-6, Jul 2001)
- Ausschluss von Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma

2. Akute nekrotisierende Pankreatitis

Kriterien:

- CT- Severity- Index (Balthazar,EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH, Radiology 1990; 174 – 331)
- Ranson Criteria (Crit. Care Med; 27:901, 1999)

3. Schwere Pneumonie

gemäß den **ATS-** Kriterien (Am. Rev Respir Dis 148: 1418 - 1426, 1993)

III. PTS-Wert ≥ 20 und/oder ISS-Wert ≥ 25

IV. Alter ≥ 18 Jahre und ≤ 65 Jahre

V. Aufnahme des Patienten auf die Intensivstation ≤12 Stunden nach dem Trauma bzw. der Diagnosestellung (Pankreatitis, ARDS/Pneumonie)

Als Ausschlußkriterien gelten:

I. Schwere Einzelverletzungen wie Wirbelsäulen- und Beckenverletzungen (Barytraumen)

II. Patienten mit anzunehmendem Hirntod, aber dennoch funktionierendem Kreislauf

III. Massive ZNS-Schädigung (Patienten mit im Vordergrund stehendem operativ zu versorgendem Schädel-Hirn-Trauma, SHT II°-III°)

IV. Patienten, die nach dem Unfall sekundär nach Gießen verlegt werden

V. Reanimation nach Herzstillstand oder schwerer kardiogener Schock

VI. Verabreichung steroidaler und nicht-steroidaler Antiphlogistika

VII. Schwangere Frauen und Frauen in der Stillzeit

VIII. Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie

IX. Patienten mit Verbrennungen aller Stadien

X. Versterben des Patienten innerhalb der ersten 3 Tage auf der Operativen Intensivstation

XI. Immundefizienz - angeborene Syndrome, HIV

XII. Chronische Infektionskrankheiten

XIII. Parallel stattfindende andere akute Infektionen (Endokarditis, EBV, etc.)

XIV. Zeichen eines akuten Myokardinfarkt

XV. Zerebrovaskuläre Insuffizienz, Z.n. Apoplex

XVI. Endokrine Störungen, die mit erhöhten Cortisol- Spiegeln ein-

hergehen

XVII. Immunsupprimierte Patienten

XVIII. Entzündlich rheumatische Erkrankunen - Vaskulitiden

XIX. Begleitende schwere Erkrankungen mit einer Lebenserwartung unter 4 Monate (?)

XX. Bilirubinämie > 5 mg /dl zu Beginn der Basline- Messungen wg. Score (?)

Todesursachen

Die eindeutige Definition der folgenden Begriffe ist für die korrekte Interpretation der Befunde notwendig. Bei den Todesursachen wurde unterschieden zwischen Frühtodesfällen, Todesfällen hervorgerufen durch ZNS-Schäden, akutes Nierenversagen, respiratorische Insuffizienz (ARDS), Pneumonie, Lungen-embolie, einem Multiorganversagen ohne nachweisbaren septisch-toxischen Insult, Patienten mit einem sanierbaren septischen Fokus sowie einem Multiorganversagen mit dokumentierter septischer Reaktion.

I. Frühtodesfälle

Tod innerhalb von 24 Stunden nach schwerer Mehrfachverletzung. Zu diesen Verletzungen zählen ausgedehnte intraabdominelle Verletzungen wie Leberzerreissungen, Gefäßverletzungen, komplexe Beckenfrakturen und Thoraxtraumen mit Lungenparenchymzerreissungen. Bei diesen Patienten ist entweder durch starke Blutungen ein ausreichender Kreislauf nicht mehr aufrechtzuerhalten, oder der Gasaustausch ist durch das direkte Thoraxtrauma nicht mehr ausreichend möglich.

II. Schädel-Hirn-Trauma

Schweres Schädelhirntrauma (SHT III°) mit Glasgow-Coma-Scale (GCS) [333] von weniger als fünf Punkten. Dieses Kollektiv umfaßt nur Patienten, bei denen nach entsprechender Diagnostik (Kranielles Computertomogramm, neurochirurgische Konsultationsuntersuchung) aufgrund der schwerwiegenden Verletzungen eine Behandlung auf der neurochirurgischen Intensivstation notwendig ist.

III. Akutes Nierenversagen

Posttraumatische Niereninsuffizienz ohne Hinweis auf ein Multiorganversagen.

IV. Pneumonie

Respiratorische Insuffizienz durch bakteriologisch wie klinisch nachgewiesene Pneumonie ohne Hinweis auf ein Multiorganversagen oder ARDS.

V. Lungenembolie

Akutes kardiorespiratorisches Versagen mit prämortal (Computertomographie) oder postmortal festgestellter Lungenembolie.

VI. ARDS

Respiratorische Insuffizienz, nicht auf dem Boden einer Pneumonie basierend, als Monoorganversagen ohne wesentliche Funktionseinschränkung anderer Organsysteme.

VII. ARDS/Pneumonie

Respiratorische Insuffizienz auf dem Boden einer Pneumonie basierend, als Monoorganversagen ohne wesentliche Funktionseinschränkung anderer Organsysteme.

VIII. Pankreatitis

Pankreatitis (nekrotisierend) als Monoorganversagen ohne oder mit wesentlicher Funktionseinschränkung anderer Organsysteme.

IX. Multiorganversagen ohne nachweisbaren septisch-toxischen Insult

Organversagen in zwei oder mehr Organsystemen ohne Nachweis eines septischen Insultes, definiert als eine bakterielle Streuung (positive Blutkultur) oder ein klinisch wie bakteriologisch nachgewiesener Infektionsherd. Ein Organversagen wird in Anlehnung an Fry (1988), Faist (1983) und Manship (1984) wie folgt definiert [116; 128; 202]:

a) **Lunge:** respiratorische Insuffizienz mit der Notwendigkeit einer maschinellen
   Beatmung mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von über
   40% (FiO_2 >0,4).

b) **Niere:** dialysepflichtiges akutes Nierenversagen (Cr>2,5mg/dl, Hst>250mg/dl)

c) **Leber:** Leberinsuffizienz mit klinisch manifestem Ikterus (Bilirubin über 50µmol/L, SGOT- und LDH-Erhöhung auf mindestens das Doppelte der Norm)

d) **Herz/Kreislauf:** kardiozirkulatorische Insuffizienz mit der Notwendigkeit zur Gabe positiv inotroper Substanzen (Dopamin, Dobutamin, Suprarenin, Adrenalin) in kreislaufwirksamer, vasokonstringierender Dosierung

e) **Gerinnungssystem:** Gerinnungsstörungen im Sinne einer disseminierten intravasalen Koagulation (DIC) mit der Notwendigkeit der Gerinnungsfaktorensubstitution bei klinisch manifester Blutung

X. Patienten mit einem septischen Fokus

Makroskopisch manifester, in der Regel chirurgisch sanierbarer Infektionsherd, der zu Lebzeiten durch das Spektrum der diagnostischen Möglichkeiten nicht erfaßt werden kann. Der Nachweis einer systemischen Streuung, d.h. eine positive Blutkultur, ist dabei nicht Voraussetzung. Gefordert war vielmehr eine stark ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion auf den nachweisbaren septischen Herd. Dies ist zu dokumentieren an Hand des sich akut verschlechternden Allgemeinzustandes mit verstärkter Ausprägung vorbestehender Organfunktionsstörungen oder durch das Bild des septischen Schocks.

XI. Multiorganversagen mit dokumentierter Sepsis

Versagen mehrerer Organsysteme mit deutlichen Zeichen septisch-toxischer Komplikationen. Dieses ist definiert durch das Vorliegen eines Infektionsherdes, wie z.B. einer klinisch und bakteriologisch erfaßten Pneumonie, oder den Zeichen einer systemischen Streuung durch eine positive Blutkultur. Bei diesem Patientenkollektiv kann aber trotz aller diagnostischen Maßnahmen kein Infektionsherd festgestellt werden, der einer chirurgischen Therapie zugänglich ist.

Behandlung der Patienten

Monitoring

Bei allen Patienten erfolgt kontinuierlich eine EKG-, Puls- sowie Sauerstoffsättigungsüberwachung und eine Messung des arteriellen Blutdrucks. Die Körpertemperatur wird rektal registriert, die tägliche Urinausscheidung gemessen, um eine Flüssigkeitsgesamtbilanz zu erstellen. Hämodynamische Parameter werden bei allen Patienten mittels eines Pulmonaliskatheters erfaßt. Zudem sind alle Patienten mit einem mehrlumigen zentralen Venenkatheter sowie einer Magen- bzw. Duodenalsonde versorgt und mindestens während der ersten Behandlungswoche kontrolliert beatmet. Täglich werden bei den Patienten routinemäßig Laboruntersuchungen (Elektrolyte, Gerinnung, Blutbild, Blutzucker, Leberwerte, Nierenretentionswerte, Gesamteiweiß) und Blutgasanalysen, entsprechend der weitgehend standardisierten Therapie, aber auch bedarfsadaptiert an die individuelle Situation des einzelnen Patienten vorgenommen. Das bakteriologische Screening beinhaltet Bronchial- und Trachealsekret, Urinkulturen sowie Abstriche bei offenen Wunden oder Wundinfektverdacht. Die regelmäßige Bebrütung von entfernten intravasalen Kathetern wird ergänzt durch die Abnahme von venösem Blut für Blutkulturen. Diese werden, bei klinischem Verdacht auf eine septische Reaktion, zu Beginn eines Fieberanstieges von 38,5°C auf über 39°C gewonnen.

Intensivmedizinische Behandlung

Für alle überlebende Patienten werden bis zur endgültigen Entwöhnung von der maschinellen Beatmung druckkontrollierte und druckkontrolliert assistierende Beatmungsverfahren angewendet. Hierbei werden immer ein paO_2 zwischen 100 und 150 mmHg und ein $paCO_2$ zwischen 38 und 48 mmHg angestrebt. Heparin wurde im Normalfall in einer Dosierung von 125-500 I.E./h kontinuierlich infundiert. Adrenalin und/oder Noradrenalin werden bei einem systemischen vaskulären Widerstand (SVR) unter 700 $dyn*sec^{-1*}*cm^{-5}$ und einem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) unter 60 mmHg appliziert. Die Antibiotikatherapie wird dem täglichen mikrobiologischen Monitoring angepaßt. Die Gabe von homologen Erythrozytenkonzentraten erfolgt bedarfsadap-

tiert, in der Regel bei einem Hb-Wert <7 g/l. Modalitäten der Beatmungs-, Ernährungs- und Infusionstherapie bestimmen grundsätzlich die behandelnden Ärzte. Falls notwendig aber auch in Absprache mit PD. Dr. Th. Menges, Frau Dr. T. Langefeld und Frau PD Dr. I. Welters. Patienten mit einem akuten Nierenversagen werden einer kontinuierlichen Hämodiafiltration zugeführt, wenn trotz intensiver diuretischer Therapie mit Furosemid die Retentionswerte und die Urinausscheidung folgende Grenzen überschritten: Kreatinin im Serum >3 mg/dl, Harnstoff im Serum >250 mg/dl, Urinausscheidung <20 ml/h.

Operationen

Die operative Behandlung schwerer Verletzungen (Stabilisierung von Frakturen, Versorgung abdomineller Verletzungen, Wundbehandlung) erfolgt bei allen Patienten nach vergleichbarem chirurgischen Management, d.h. Versorgung zum frühestmöglichen Zeitpunkt, jeweils unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes. Die einzelnen Operationen werden dokumentiert.

Kontrolle der Organsysteme

Sämtliche Organsysteme werden sowohl für die intensivmedizinische Behandlung als auch für die Dokumentation während der Studie engmaschig überwacht. Dabei wird auf folgende Parameter geachtet:

I. **Herz-Kreislauf-System:** Herzfrequenz, systemischer Blutdruck (syst., diast., MAP), zentraler Venendruck, Herzzeitvolumen, Cardiac Index, pulmonalarterieller Druck, pulmonalkapillärer Verschlußdruck, systemischer Widerstand, pulmonaler Widerstand, arteriovenöse Sauerstoffdruckdifferenz.

II. **Lunge und Beatmung:** arterielle Blutgase: Sauerstoffpartialdruck (paO_2), Kohlendioxydpartialdruck ($paCO_2$), pH-Wert, Base Excess, arterielle Sauerstoffsättigung, gemischtvenöser Sauerstoffpartialdruck (pvO_2), gemischtvenöser Kohlendioxydpartialdruck ($pvCO_2$), gemischtvenöse O_2-Sättigung, Röntgenthorax, Atemfrequenz, Atemminutenvolumen, Atemzeitverhältnis (I:E), inspiratorische Sauerstoffkonzentration, positiv endexspiratorischer Partialdruck (PEEP), statische Compliance, Resistance, Beatmungsdrucke.

III. **Niere und Elektrolyte:** Urin- und Flüssigkeitsbilanz, Serum-Werte von Natrium, Kalium, Kalzium, Kreatinin und Harnstoff.

IV. **Leber und Pankreas:** Serum-Werte Bilirubin, Albumin, Cholinesterase, Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ-GT), Kreatin-Kinase (CK) alkalische Phosphatase (APH), Amylase, Lipase.

V. **Blutbild und Blutgerinnung:** Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk), Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Differentialblutbild, Thromboplastinzeit (TPZ, Quickwert), partielle Thromboplastinzeit (PTT), Plasmathrombinzeit (PTZ), Fibrinogen, Antithrombin III.

VI. **Infektiologische Parameter:** Mikrobiologisches Probenmaterial, C-reaktives Protein (CRP), Blutkulturen.

Prospektive Beurteilung des septischen Zustandes eines Patienten

Zu jedem Meßzeitpunkt wird der Patient klinisch auf Vorliegen von Infekt- oder Sepsiszeichen hin untersucht. Als klinisch septisch gilt der Patient, wenn folgende, zuvor festgelegte Kriterien durch die behandelnden Ärzte am Krankenbett festgestellt werden:

I. Temperaturspitzen über 39°C in den letzten 24 Stunden.

II. Zunahme des Volumenbedarfs, nicht erklärt durch andere Ereignisse (Operationen) mit den klinischen Zeichen der Ödembildung, Schrankenstörung und positive Flüssigkeitsbilanz.

III. Kreislaufzentralisierung mit peripher kalten Extremitäten.

IV. Klinische Zeichen beginnender Organfunktionsstörungen mit:

- Verschlechterung des Gasaustausches,
- Störung/Rückgang der Darmfunktion (Ileuszeichen, Zunahme des Magen- und Duodenalsondenrücklaufes, Abnahme/Fehlen der Peristaltik),
- zunehmender Ikterus,

- zunehmende Eintrübung und verminderte Ansprechbarkeit bei wachen Patienten.

V. Insgesamt akute, nicht erklärbare Verschlechterung des Allgemeinzustandes nach klinischer Beurteilung.

Fakultativ:

VI. Makroskopisch nachweisbare Eiter- oder suspekt eitrig aussehende Sekretion aus Wunden, eitrig aussehendes Trachealsekret.

Diese klinische Beurteilung des Zustandes des Patienten gibt die „klinischen Situation" wieder, auf der letztlich viele Entscheidungen für den Patienten beruhen. In dieses Zustandsbild fließen Parameter wie Laborbefunde, bakteriologische Befunde, quantitative Erfassung des Permeabilitätsschadens (Messung des extravaskulären Lungenwassers) nicht ein. Die Frage nach einer vorliegenden Sepsis wird zu jedem Meßzeitpunkt unabhängig von der vorherigen Bewertung durchgeführt. Die Feststellung der klinischen Situation erfolgt von verschiedenen intensivmedizinisch erfahrenen Kollegen. Bewußt sei darauf hingewiesen, daß es sich hierbei um eine Beurteilung handelt, in die individuelle persönliche Erfahrungen und Gefühlsmomente als nicht rational zu validierende Einflußgrößen mit eingehen.

Die prospektive Sepsisklassifizierung mittels Scores

Die prospektive Sepsisklassifizierung entspricht dem allgemein üblichen Modus der Auswahl einer Reihe von als bedeutsam angesehenen Parametern mit Grenzwertangabe, nach denen die Patienten als septisch oder nicht septisch klassifiziert werden. Als septisch wird ein Patient beurteilt, wenn eine mindestens 24 Stunden dauernde Reaktion des Organismus wie bei einer Sepsis nachweisbar ist, ohne daß gleichzeitig ein anderes Ereignis (Operation) stattgefunden hat. Zur Beschreibung dieses septischen Zustandsbildes dienen die in Tabelle 5 angeführten Kriterien der Sepsis und des septischen Schocks. Als septisch wird ein Patient bewertet, wenn fünf der Kriterien zur Festlegung einer septischen Reaktion erfüllt sind (Tabelle 5).

Das Ausmaß des Schweregrades der Erkrankung des einzelnen Patienten wird anhand folgender Scores festgelegt:

I. Acute Physiology Chronic Health Evaluation II (APACHE II) [].

II. Acute Physiology Chronic Health Evaluation III (APACHE III) [].

III. Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) [Vincent et al., 1998]

IV. Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) [].

Mit diesen Scores – der APACHE II und III bewertet physiologische Parameter, Vorerkrankungen und das Alter des Patienten, der SSS- und der MODS-Score einzelne Organsysteme – wird für das Ausmaß an Entgleisungen des physiologischen Gleichgewichts summarisch eine Gesamtpunktzahl errechnet. Die Berechnung jedes Zahlenwertes wird für jeden Patienten täglich durchgeführt und im Zeitverlauf nach Gruppeneinteilung dargestellt.

Zur Ermittlung der Zahlenwerte des APACHE II und III wird jeweils der schlechteste Wert für die einzelnen Parameter innerhalb von 24 h beachtet. Auf die Beurteilung des ZNS wird verzichtet, da alle Patienten zumindest in der ersten Woche analgosediert und beatmet sind.

Da nahezu alle Patienten, die mehrere Kriterien dieser Definition erfüllen, Dysfunktion zumindest eines Organes aufwiesen, kann in diesen Fällen zusätzlich von einem MODS gesprochen werden. Nach einer Empfehlung der ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz wird als MODS die Dysfunktion mehrerer Organe bezeichnet, die einer Intensivtherapie bedarf [46]. Da das MODS einen dynamischen Verlauf haben kann, prinzipiell reversibel ist und nicht zu allen Zeitpunkten gleich viel Organe betroffen sein müssen, ist es häufig problematisch, einen definierten Zeitpunkt für die Diagnose festzulegen. Eindeutig zu diagnostizieren sind diejenigen Patienten, die an einem MODS erkranken und im Verlauf versterben. Nur in diesen Fällen liegt ein therapierefraktäres Multiorganversagen (MOV) vor, eine Diagnose, die bei der Mehrzahl der Patienten durch eine Obduktion gesichert werden sollte. Um in der Gruppe der Patienten mit Sepsis hinsichtlich der Schwere zu differenzieren, wird zwischen Überlebenden und Verstorbenen unterschieden. Das Multiorganversagen wird in dieser Studie somit als Endstrecke eines MODS betrachtet, das im ungünstigsten Fall zum Tode führt. Da der MODS- wie auch die APACHE-Scores lediglich die Schwere, nicht jedoch die Dauer bzw. den zeitlichen Verlauf des Organver-

sagens erfassen, wird bei jedem Patienten zu jedem Meßzeitpunkt der Zahlenwert ermittelt. Es wird jeweils der schlechteste Wert für die einzelnen Parameter innerhalb von 24 h beachtet. Auch beim MODS-Score wird auf die Beurteilung des ZNS aus den genannten Gründen verzichtet. Zahlenwerte innerhalb der ersten 48 h werden nicht berücksichtigt, da dies reversible Veränderungen, die durch das initiale Ereignis oder ungenügende Erstversorgung bedingt sind reflektieren könnten [53]. Regel et al. (1991) wiesen zudem darauf hin, daß die Beurteilung von polytraumatisierten Patienten durch den Score ein verzerrtes Bild ergibt, da die Patienten initial regelhaft, auch aus prophylaktischen Gründen, intubiert und beatmet werden [281]. Dies bedeutet nach Goris bereits ein Lungenversagen [135]. Ein MODS/MOV ist demnach anzunehmen, wenn ein täglicher MODS-Score ≥6 Punkte über mehr als drei Tage erreicht wird.

Alle Patienten mit einem letalen Verlauf versterben während des Aufenthaltes auf der Intensivstation. Von überlebenden Patienten wurde gesprochen, wenn diese zur weiteren Behandlung auf eine periphere Station oder in ein anderes Krankenhaus verlegt werden. Anhand des MODS-Scores werden auch Einzelorganversagen in ihrer Häufigkeit und Reihenfolge in den Gruppen verglichen und das Ausmaß des Multiorganversagens zum Zeitpunkt des ersten Sepsisnachweises in Beziehung gesetzt.

Meßzeitraum

Der Meßzeitraum umfasst mit dem Aufnahmetag auf die Operative Intensivstation die ersten 15 Tage nach Trauma bzw. Diagnosestellung (Polytrauma ,nekrotisierende Pankreatitis, Pneumonie,). Tag 1 und erster Abnahmezeitpunkt ist der Aufnahmetag, wobei die Uhrzeit der Probengewinnung für diesen Tag variabel ist (innerhalb von zwei Stunden nach Aufnahme in die Klinik). An den Tagen 2 bis 14 sowie Tag 21 und 28 wird jeweils in der Zeit von 8 Uhr bis 9 Uhr morgens das Untersuchungsmaterial entnommen, um den Einfluß der zirkadianen Rhythmik auf die Meßparameter weitgehend auszuschließen. Im Anschluß wurde die Krankengeschichte bis zum Abschluß dokumentiert.

Labormethodik und Meßparameter

Sämtliche Routinelaborparameter (Tabelle 9) werden täglich für alle Patienten der prospektiven Studie im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums erfasst.

Das mikrobiologische Monitoring der Patienten umfasst den Nachweis von grampositiven und gramnegativen Bakterien, von Pilzspezies (Candida, Aspergillus, Kryptokokkus) und den Nachweis von atypischen Erregern wie Mykoplasmen, Chlamydien und Rickettsien aus aeroben und anaeroben Abstrichen sowie aus Blutproben.

Täglich wird eine Sputumprobe oder ein Trachealsekret zum Probeentnahmezeitpunkt entnommen. Zusätzlich werden falls klinisch evident Abstriche aus Wundflächen, Sekrethöhlen und Körperöffnung entnommen sowie Urinproben bei Entzündungsverdacht gewonnen.

Die Untersuchungen werden im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums durchgeführt. Als immunologische Meßparameter werden die in einer gesonderten Liste aufgeführten Mediatoren und immunologischen Parameter an verschiedenen Laborarbeitsplätzen bestimmt.

D. Nebenwirkungen / Komplikationen

-Definition und Dokumentation **(entfällt für den anaesthesiologischen Bereich)**

E. Statistische Analyseverfahren

Alle Daten werden in Datenbanken eingelesen. Signifikante Unterschiede werden mit einem $p<0,05$ erfaßt, hochsignifikante Unterschiede mit einem $p<0,01$ (d. h. 1% Fehlerwahrscheinlichkeit). Als Kennzeichnungszahlen galten die Mittelwerte (ξ) und die Standardabweichungen (s) der Variablen jeweils getrennt für die einzelnen Untersuchungsgruppen und Faktoren.

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Scores wird der CHi (χ^2)-Quadrat-Test nach Pearson verwendet [174]. Durch geeignete biometrische Verfahren wird der Versuch unternommen, die septische Reaktion durch Auswahl und Wichtung verschiedener Parameter zu bestimmen. Dadurch sollte eine quantitative Zustandsbeschreibung der septischen Reaktion erreicht werden. Die zur Analyse eingesetzten Verfahren werden im folgenden kurz erläutert. Auf eine Darstellung der dabei verwendeten Formeln und des mathematischen Hintergrundes wird verzichtet.

Methodik der univariaten Statistik

Deskriptive Statistik und Häufigkeitsverteilung

Um einen Parametervergleich zu ermöglichen und neben dieser anfänglichen Ordnung zugleich einen Überblick über das Datenmaterial zu geben, wurde eine Reihe deskriptiver Statistiken erstellt. Als Kennzeichnungszahlen gelten hierbei die Mittelwerte (ξ) und die Standardabweichungen (s) der Untersuchungsvariablen, jeweils getrennt für die einzelnen Untersuchungsgruppen und Variablen.

Um die Wertigkeit des immunologischen Monitorings von schwerverletzten Patienten zu erfassen, liegt ein Schwerpunkt in der Auswertung der immunologischen Parameter. Weiterhin werden die Variablen ISS, PTS und KG einmalig gemessen. Zusätzlich werden die demographischen Merkmale wie Alter und Geschlecht bewertet.

Test auf Normalverteilung der untersuchten Variablen

Für die weiteren Analysenmethoden wie die Diskriminanzanalyse, die normalverteilte Variablen voraussetzt, werden die Variablen auf Normalverteilung untersucht. Der hierbei verwendete Test ist der von Lilliefors modifizierte Kolmogorov-Smirnov-Test mit einem Signifikanzniveau von p=0,05. Dabei werden die nach diesem Test nicht normalverteilten Variablen zu allen Zeitpunkten einer logarithmischen Transformation unterzogen und erneut getestet.

Kreuztabellen

Bei Untersuchungen von nichtmetrisch skalierten Variablen wird der CHi (χ^2)-Quadrat-Test nach Pearson benutzt [174]. Dieser prüft die Unabhängigkeit der jeweiligen Variablen und damit indirekt den Zusammenhang der beiden Merkmale. Die tabellarische Darstellung erfolgt in Kontingenztafeln oder Kreuztabellen und zeigt für die Merkmalskombinationen deren absolute und prozentuale Häufigkeit. Zwei Variablen einer Kontingenztafel gelten dann als voneinander unabhängig, wenn die beobachteten Häufigkeiten mit denen unter der H_o-Hypothese zu erwartenden Größe übereinstimmen. In der Version SPSS 6.1.3 ist durch das Modul „Exact Test" auch ein exakter Test für Kontingenztafeln mit mehr als zwei Zeilen oder Spaltenmerkmalen verfügbar. Wird dieser exakte Test angewendet, so steht hinter dem p-Wert das Kürzel „exakt". Der exakte Test benutzt nicht mehr die asymptotische CHi (χ^2)-Quadrat-Verteilung der Testgröße.

Diskriminanzanalyse

Ein wichtiges Ergebnis der Arbeit ist die frühzeitige Erkennung der sepsisgefährdeten und damit hochgradig in ihrem Leben bedrohten Patienten anhand der Entwicklung der verschiedenen immunologischen Parameterverläufe. Hierzu wird die Diskriminanzanalyse verwendet. Sie ist eine Sonderform der Regressionsanalyse. Im Unterschied zur Regressionsanalyse muß die abhängige Variable lediglich nominal oder ordinal skaliert sein [323]. Da eine große Variablenzahl ebenso wie ein kleiner Stichprobenumfang die Trennschärfe einer Diskriminanzfunktion überschätzen würde, sollte sie mit den Variablen durchgeführt werden, welche die beste Trennung zwischen den zu bildenden

Gruppen ermöglichen. Für jede gemessene Variable und jeden Zeitpunkt wird dazu als Kennzeichnungsmaßzahl zunächst der Diskriminanzkoeffizient (D) ermittelt, der Aufschluß darüber gibt, wie der Einfluß dieses Präkursors zu gewichten ist. Durch Standardisierung der Variablen macht man sie vergleichbar. Betragsmäßig hohe Werte dieses Koeffizienten tragen mehr zur Trennung bei. Die hohe Anzahl an diskriminierenden Variablen und Merkmalen, die zunächst in diese Funktion eingehen, wird dann im nächsten Schritt reduziert. Die endgültige Rangfolge und die Variablenauswahl erfolgten nach der Prüfgröße Wilks-Lambda, einer sogenannten U-Statistik. Diese Prüfgrößen machen die Variablen vergleichbar. Kleine Dezimalwerte weisen auf deutliche Unterschiede der Gruppenmittelwerte hin und sind für die Diskriminierung am besten geeignet. Die Variablenreduzierung erfolgt schließlich in einem schrittweisen Verfahren, dem „Wilks-stepwise". Dabei wird wie folgt verfahren: die Variable mit dem kleinsten Lambdawert wird in die Diskriminanzfunktion aufgenommen und in die gemeinsame Varianz aus den übrigen Variablen herauspartialisiert. Dadurch nimmt man gemeinsame Informationen aus den Prädiktoren. Danach werden die Lambdawerte erneut berechnet. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis keine deutliche Verbesserung der Trennschärfe mehr erreicht wird.

Die so entwickelten Trennfunktionen, deren Anzahl jeweils um 1 geringer ist als die Zahl der Kriterienstufen, erlauben schließlich die Berechnung eines individuellen Diskriminanzscores (DS). Anhand der Bayes'schen Formel läßt sich daraus bei der späteren Anwendung die wahrscheinliche Gruppenzugehörigkeit eines Individuums bestimmen. Der Eigenwert einer Funktion, dessen theoretisches Maximum bei 1 liegt, gibt entsprechend seiner Größe an, wie gut die Diskriminanzfunktion und damit die Trennung zwischen den Gruppen ist. In diese Formel geht außerdem die sogenannte „a priori Wahrscheinlichkeit" der jeweiligen Gruppenzugehörigkeit ein. Die Güte der Funktion ergibt sich letztlich aus einer Gegenüberstellung von prognostizierter und tatsächlicher Gruppenzugehörigkeit.

Die Trennschärfe der so ermittelten Diskriminanzfunktion läßt sich tabellarisch in einer Klassifikationstafel oder –matrix darstellen, welche die korrekten Gruppenzuordnungen und als Durchschnitt daraus

die Gesamttrefferquote angibt. Die graphische Darstellung erfolgt mittels Diskriminierungsgraphik.

Das Ziel einer solchen Diskriminanzberechnung sollte sein, eine möglichst hohe Zuverlässigkeit bei der späteren Anwendung auf ein weiteres unabhängiges Untersuchungsmaterial zu erzielen. So sollten für eine annähernd unverzerrte Schätzung der Trennschärfe die Klassifikationsergebnisse mittels einer zweiten Stichprobe kontrolliert werden. Dazu ist es notwendig, die Diskriminanzfunktion an einer Gruppe von Patienten zu überprüfen, deren Individuen nicht zur Entwicklung der Funktion herangezogen worden sind.

Meßwiederholungsanalyse

Werden mehrere Messungen an der gleichen experimentellen Einheit (Person) durchgeführt, so tendieren die erhobenen Messungen dazu, untereinander korreliert zu sein. Repräsentieren die Messungen qualitativ unterschiedliche Dinge, wie etwa Gewicht, Größe und Alter, so wird dieser Korrelation qualitativ mit multivariaten Methoden, wie der multivariaten Varianzanalyse, Rechnung getragen. Können die Messungen hingegen als Stufe eines experimentellen Faktors wie Zeit, Behandlung oder Dosis aufgefaßt werden, so wird die bestehende Korrelation mit der Durchführung einer Varianzanalyse mit Meßwiederholung berücksichtigt. In der in dieser Arbeit erstellten Analyse sollen die folgenden Fragen geklärt werden:

I. Unterscheiden sich die beobachteten Daten zwischen den betrachteten Gruppen im zeitlichen Durchschnitt?

II. Unterscheiden sich die beobachteten Daten zwischen den betrachteten Gruppen im zeitlichen Verlauf?

III. Ist der Verlauf der betrachteten Meßzeitpunkte im zeitlichen Verlauf konstant?

Um die Einflüsse der Gruppenzugehörigkeit auf den zeitlichen Durchschnitt der untersuchten Parameter zu analysieren, wird eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Weiterhin wird geprüft, wie sich die Werte der zu analysierenden Parameter im zeitlichen Verlauf verändern. Zur Analyse solcher Meßwiederholungsdesigns kann sowohl ein univariater als auch ein multiva-

riater Ansatz verwendet werden [174]. Welches der beiden Verfahren zur Analyse herangezogen wurde, basiert auf einer Empfehlung von Maxwell und Denlaney [208]. Der multivariate Ansatz sollte demnach bei einer Stichprobenzahl von $n < k + 10$ vermieden werden (k = Anzahl der Meßwiederholungsstufen). In diesem Fall ist der univariate Ansatz trennschärfer. In dieser Arbeit fand somit das univariate Verfahren Anwendung. Dazu wurden im Hinblick auf die eben gemachten Bemerkungen die notwendigen Voraussetzungen zur Anwendung des univariaten Verfahrens überprüft. Zunächst ist es notwendig, die Sphärizität zu prüfen. Diesem Zweck dient der Test von Mauchly [208]. War die Voraussetzung der Sphärizität nicht gewährleistet, wurde alternativ eine modifizierte Form des univariaten Ansatzes verwendet, die auf der Multiplikation der Zähler und Nennerfreiheitsgrade mit Korrekturfaktoren (Epsilons) basiert. Dabei tendiert das Greenhouse-Geisser-Epsilon, dazu das wahre „ε" zu überschätzen [208]. Für den Fall, daß die Voraussetzungen der Sphärizität nicht erfüllt waren, wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur verwandt. Sind, wie in dieser Studie, mehrere Gruppen involviert, kommt eine weitere Voraussetzung zur Durchführung des univariaten Verfahrens hinzu. Diese verlangt die Gleichheit aller Varianz-Kovarianz-Matrizen der Gruppen. Diese Voraussetzung wurde mit dem Box-M-Test überprüft. Handelt es sich um balancierte Daten, ist die Verletzung gleicher Varianz-Kovarianz-Matrizen nicht schwerwiegend, d. h. die verwendete univariate Teststatistik ist robust [323].

Bei der Interpretation muss zwischen einer horizontalen (Veränderung im Zeitverlauf) und einer vertikalen Betrachtung (Unterschiede zwischen den Gruppen) unterschieden werden. Die drei oben angeführten Fragestellungen lassen sich unterscheiden in eine horizontale Betrachtung (Unterschiede im zeitlichen Mittel, Frage 1), in eine vertikale Betrachtung (Unterschiede im Gruppenmittel, Frage 3) und in eine gemischte Betrachtung (Profilanalyse, Frage 2). Die anschließend durchgeführten Einzelbetrachtungen zu den einzelnen Zeitpunkten und in den einzelnen Gruppen blenden einen der anderen Faktoren vollständig aus und können daher auch, auf den ersten Blick, zu widersprüchlichen Ergebnissen führen. Daher wurde z. B. bei der Analyse auf eine Einzelbetrachtung zu den Zeitpunkten verzichtet, wenn in

der ersten Fragestellung keine signifikanten Unterschiede vorkamen. Die Einzelbetrachtung in den Gruppen ist aber allein deshalb schon interessant, da sie als „Post Hoc Analyse" in der Meßwiederholungs-analyse selbst durchgeführt wird (Testen von Kontrasten) [38; 148].

F. Ethische und gesetzliche Voraussetzungen

- Ethikkommission (siehe Kap. V)
- Patienteninformation (siehe Kap. II)

G. Literaturverzeichnis

1. Baker SP, O'Neill B. The injury severity score: an update. J.Trauma 1976;16:882-885.

2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992;101:1644-1655.

3. Bouillon B, Kramer M, Tiling T, Neugebauer E. Trauma-Score-Systeme als Instrumente der Qualitätskontrolle. Eine prospektive Studie zur Validierung von 7 Trauma-Score-Systemen an 612 Traumapatienten. Unfallchirurg 1993;96:55-61.

4. Bouillon B, Lefering R, Vorweg M, Tiling T, Neugebauer E, Troidl H. Trauma score systems: Cologne Validation Study. J.Trauma 1997;42:652-658.

5. Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. J.Trauma 1983;23:775-787.

6. Faist E, Hartl WH, Baue AE. Immunmechanistik der posttraumatischen Hyperinflammation und Sepsis. Immun.Infekt. 1994;22:203-213.

7. Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE. Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. Arch.Surg. 1986;121:1000-1005.

8. Faist E, Mewes A, Baker CC, Strasser T, Alkan SS, Rieber P, Heberer G. Prostaglandin E2 (PGE_2)-dependent suppression of interleukin alpha (IL-2) production in patients with major trauma. J.Trauma 1987;27:837-848.

9. Friedl HP, Trentz O. Polytrauma: Definition, Schock, Multiorganversagen. Unfallchirurgie 1992;18:64-68.

10. Fry DE. Multiple system organ failure. Surg.Clin.North Am. 1988;68:107-122.

11. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk-HC J. Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. Arch.Surg. 1980;115:136-140.

12. Goris RJ. Conclusions of the workshops held during the Second International Congress on The Integrated Approach to Trauma Care, Nijmegen, May 1995. Eur.J.Emerg.Med. 1995;2:236-238.

13. Goris RJ. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? World J.Surg. 1996;20:418-421.

14. Goris RJ. MODS/SIRS conditions. World J.Surg. 1997;21:344

15. Hempelmann G, Trentz OA, Trentz O, Muller H, Oestern HJ, Sturm J. Die Behandlung des Schocks bei polytraumatisierten Patienten. Unfallchirurgie 1981;7:116-121.

16. Hermans PWM, Hibberd ML, Booy R, Daramola OA, Hazelzet JA, de Groot R, Levin M, and the Meningococcal Research Group. 4G/5G promotor polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Lancet 1999;354:556-559.

17. Hosmer, Leneshaw. Applied logistic regression. In: Hosmer, Leneshaw, ed. SPSS Advanced Statistics 6.1. New York: John Wiley and Sons., 1994;374-383.

18. Hoyt DB, Ozkan AN. Immunosuppression in Trauma Patients. Intensive Care Med. 1991;6:71-90.

19. Kirk, R. E. Experimental design. 29. 1982. Monterey CA, Brooks Cole.

20. Kirkpatrick JR, Youmans RL. Trauma index. An aide in the evaluation of injury victims. J.Trauma 1971;11:711-714.

21. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Crit.Care Med. 1985;13:818-829.

22. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE. Prognosis in acute organ-system failure. Ann.Surg. 1985;202:685-693.

23. Knaus WA, Wagner DP. Acute physiology and chronic health evaluation and Glasgow coma scores Crit.Care Med. 1992;20:1736-1738.

24. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA. The development of APACHE. Crit.Care Med. 1989;17:181-185.

25. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmermann JE, Bergner M, Bastos PG, Sirio CA, Murphy DJ, Lotring T, Damiano A, et a. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. Chest 1991;100:1619-1636.

26. Knaus WA, Zimmermann JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. Crit.Care Med. 1981;9:591-597.

27. Manship L, McMillin RD, Brown JJ. The influence of sepsis and multisystem and organ failure on mortality in the surgical intensive care unit. Am.Surg. 1984;50:94-101.

28. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. Crit.Care Med. 1995;23:1638-1652.

29. Maxwell S, Delany H. Designing experiments and analyzing data. Belmont,CA.: Wadsworth, 1990.

30. Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definition for sepsis and organ failure and guidelinesfor the way of innovative therapies in sepsis. Crit.Care Med. 1992;20:864-874.

31. Oestern HJ, Kabus K. Vergleich unterschiedlicher Trauma Score Systeme-Ein Überblick. Unfallchirurg 1994;97:177-184.

32. Oestern HJ, Kabus K, Neumann G. Der Hannoversche Polytraumaschlüssel. Hefte Unfallheilkunde 1991;97:210-215.

33. Regel G, Lobenhoffer P, Grotz M, Pape HC, Lehmann U, Tscherne H. Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center. J.Trauma 1995;38:70-78.

34. Stevens J. Applied multivariate statistics for the social science. New Jersey: Lawrence Erlbaum, 1992.

35. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet 1974;2:81-84.

36. Trentz OA, Hempelmann G, Trentz O, Mellmann J, Stender HS, Oestern HJ. Hämodynamik, Gasaustausch und Röntgenbefunde des Thorax bei Mehrfachverletzten mit Thoraxtrauma. Anaesthesist 1980;29:468-474.

37. Tscherne H, Trentz O, Sturm J. Mehrfachverletzungen. In: Heberer G, Köle, Tscherne H, eds. Lehrbuch der Chirugie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1986:720-725.

H. Studienprotokolle, Dokumentation und Archivierung der Daten

Flowcharts

Studien-Zeitpunkt	LABOR	BGA	Pulsoxy-soxy-metrie/ Vitalzei-chen	Labor PCR-Probe 10 ml Vollblut	Labor Zytokine 5 ml Heparinblut	BAL/ Keime	Röntgen Score	Apache II	MOD	Sofa	PTS	ISS
0												
12 Stunden												
Tag 1												
Tag 2												
Tag 3												
Tag 4												
Tag 5												
Tag 6												
Tag 7												
Tag 8												
Tag 9												
Tag 10												
Tag 11												
Tag 12												
Tag 13												
Tag 14												
Tag 21												
Tag 28												

Fakulatative Blutentnahmen

Obligat durchzuführen

1.1. Pat.-Initialen: □□ **Pat.-Nr.: □□□**

BEATMUNGSPARAMETER, BGA, VITALZEICHEN, LABORPARAMETER

Datum:	□□.□□.□□ Tag Monat Jahr
Respiratorische Parameter	
Beatmung ja/nein	**Ja** □ **Nein** □
FiO_2	□,□□
AZV [ml]	□□□□
AF [min^{-1}]	□□
PIP bzw. IPAP [cm H_2O]	□□
PEEP bzw. EPAP [cm H_2O]	□□
P_{Plat} [cm H_2O]	□□
I:E Ratio	□,□:□,
BLUTGASANALYSE	
Abnahme	□ arteriell □ kapillär
BGA temperaturkorrigiert?	□ Ja □ Nein
PaO_2 [mmHg]	□□□,□
$PaCO_2$ [mmHg]	□□□,□
PH arteriell	□,□□
Base Excess [mmol/l]	□□,□
SaO_2 [%] Falls Pat. nicht beatmet.	□□□
Standardbikarbonat [mmol/l]	□□,□
VITALZEICHEN	
Blutdruck [mmHg]	□□□/□□□
Temperatur [°C]	□□,□
Herzfrequenz [min^{-1}]	□□
MAP	□□□

Uhrzeit	□□,□□
BLUTBILD	
Erythrozyten [10^6/µl]	□□,□
Hämoglobin [mg/dl]	□□,□
Hämatokrit [%]	□□,□
Thrombozyten [10^3/µl]	□□□
Leukozyten [10^3/µl]	□□,□
Neutrophile [10^3/µl]	□□,□
KLINISCHE CHEMIE	
Harnstoff [mg/dl]	□□,□
Kreatinin [mg/dl]	□,□
Bilirubin [mg/dl]	□□,□
SGOT (AST) [U/l]	□□□,□
SGPT (ALT) [U/l]	□□□,□
Gamma GT [U/l]	□□□,□
Alkalische Phosphatase [U/l]	□□□
Glucose [mg/dl]	□□□
Serum-Natrium [mmol/l]	□□□
Serum-Kalium [mmol/l]	□,□
Laktat [mmol/l]	□□,□
GERINNUNG	
INR	□,□
PTT [sec]	□□□

Handzeichen : _____

RÖNTGENTHORAX-SCORE

Schlüssel des Röntgenthorax-Score:

1 = Normal

2 = Diffuse, milde interstitielle Zeichnung / Verschattung

3 = Diffuse, merkliche interstitielle Zeichnung / milde Verschattung

4 = Diffuse, moderate Konsolidierung

5 = Diffuse, schwere Konsolidierung

BORG SCORE

Schlüssel des Borg-Score:

0 =	**Überhaupt keine Dyspnoe (gerade zu bemerken)**
0,5 =	**Sehr sehr leicht**
1 =	**Sehr leicht**
2 =	**Leicht**
3 =	**Mittelmäßig**
4 =	**Ein bisschen schwer**
5 =	**Schwer**
6	
7 =	**Sehr schwer**
8	
9 =	**Sehr sehr schwer (beinahe maximal)**
10 =	**Maximal**

GLASGOW COMA SCALE

Schlüssel der Glasgow-Coma-Scale:		
Augenöffnen	**Spontan**	**4 Punkte**
	Auf Aufforderung	**3 Punkte**
	Auf Schmerzreiz	**2 Punkte**
	Kein Augenöffnen	**1 Punkt**
Sprachliche Antwort	**Orientiert**	**5 Punkte**
	Unvollständig orientiert	**4 Punkte**
	Verworren	**3 Punkte**
	Unverständlich	**2 Punkte**
	Keine	**1 Punkt**
Motorische Antwort	**Adäquat**	**6 Punkte**
	Gezielte Abwehr auf Schmerz	**5 Punkte**
	Ungezielte Abwehr auf Schmerzreiz	**4 Punkte**
	Beugesynergismen auf Schmerzreiz	**3 Punkte**
	Strecksynergismen auf Schmerzreiz	**2 Punkte**
	Keine	**1 Punkt**

Bei der Frage nach der Katecholamingabe geben Sie bitte die maximale Dosis im Zeitraum zwischen 05:00 und 11:00 Uhr des jeweiligen Tages an.

Der Apache II Score: Severity of Disease Classification System (Knaus et al., 1985)

Physiologische Variabel		**Hoch abnormaler Range**						**Niedrig abnormaler Range**	
	+4	**+3**	**+2**	**+1**	**0**	**-1**	**-2**	**-3**	**-4**
Temperatur (rektal) [°C]	≥ 41°	39°-40,9°		38,5°-38,9°	36°-38,4°	34°-35,9°	32°-33,9°	30°-31,9°	≤ 29,9°
Mittl. Arterieller Druck [mmHg]	≥ 160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤ 49
Herzfrequenz (ventrikuläre Antwort) [pro Minute]	≥ 180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤ 39
Respiratorische Frequenz (non-ventilated or ventilated) [pro Minute]	≥ 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤ 5
Oxygenierung: $AaDO_2$ oder PaO_2 [mmHg] a. $FiO_2 \geq 0,5$ nur $AaDO_2$ b. $FiO_2 < 0,5$ nur PaO_2	≥ 500	350-499	200-349		< 200 > 70	61-70		55-60	<55
Arterieller pH	≥ 7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	< 7,15
Serum Natrium [mmol/l]	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤ 110
Serum Kalium [mmol/l]	≥ 7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		< 2,5
Serum Kreatinin [mg/dl] (doppelter Score für **akutes** Nierenversagen)	≥ 3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		< 0,6		
Hämatokrit [%]	≥ 60		50-59,9	46-46,9	30-45,9		20-29,9		< 20
Leukozyten [1.000/mm³]	≥ 40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		< 1
Glasgow Coma Scale (Score=15-GCS)									
Totaler akuter physiologischer Score (APS)									

B = **Alterspunkte**:

Alter [Jahre]	Punkte
≤ 44	0
45-54	2
55-64	3
65-74	5
≥ 75	6

C = **Chronische Gesundheits Punkte:**

Falls der Patient eine Anamnese mit schwerer Organinsuffizienz hat oder immunsupprimiert ist, weisen sie folgende Punkte zu:

a. für non-operative oder Patienten mit Notfallchirurgie – **5 Punkte**

b. für elektiv operierte postoperative Patienten – **2 Punkte**

Definition Die Organinsuffizienz oder die Immunsupprimierung muß **vor** diesem Krankenhausaufenthalt bewiesen sein worden und den folgenden Kriterien entsprechen:

Leber: Durch Biopsie bestätigte Zirrhose und dokumentierte Portalvenenstauung; Episoden einer oberen gastrointestinalen Blutung aufgrund der portalen Hypertension oder vorhergehende Episoden eines Leberversagens / Enzephelopathie / Koma.

Kardiovaskulär: NYHA IV.

Atmung: Chronisch restriktive, obstruktive oder vaskuläre Erkrankung aufgrund der es zu einer schweren Einschränkung der Belastungsfähigkeit kommt, z.B. Unfähigkeit Treppen zu steigen oder den Haushalt zu versehen; dokumentierte chronische Hypoxie; Hyperkapnie; sekundäre Polyzythämie, schwere pulmonale Hypertonie (> 40mmHg) oder Abhängigkeit von einem Beatmungsgerät.

Renal: Chronische Hämodialyse.

Immunsupprimiert: Der Patient hat eine Therapie bekommen, welche die Abwehr gegen Infektionen schwächt, z.B. Immunsupprimierung, Chemo-Therapie, Bestrahlung, Langzeittherapie mit hochdosierten Steroiden oder eine Erkrankung, welche die Infektabwehr schwächt, z.B. Leukämie, Lymphome, AIDS.

APACHE II SCORE:

A. APS Punkte _____

B. Alterspunkte _____

C. Chronische Gesundheitspunkte _____

Totaler Apache II _____

Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) (Vincent et al., 1998)

Punkte	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Respiration **(Pa O2/ Fi O2)**	**> 400**	**<400**	**<300**	**<200** **mit respiratorischer Unterstützung**	**<100** **mit respiratorischer Unterstützung**
Koagulation Plättchen **(x 10^3/ mm^3)**	**> 150**	**<150**	**<100**	**<50**	**<20**
Leber Bilirubin (mg/dl)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12,0
Kardiovaskuläre Hypotension	**Keine Hypotension**	**MAP < 70 mmHg**	**Dopamin < 5 oder Dopitamin-Dosis**	**Dopamin > 5 od. EPI <1 od. NOREPI <0,1**	**Dopamin > 15 od. EPI > 0,1 od. NOREPI > 0,1**
Zentrales Nervensystem Glascow Coma Scale	**15**	**13 -14**	**10 - 12**	**6 - 9**	**<6**
Nieren Kreatinin (mg/ dl)	**< 1,2**	**1,2 – 1,9**	**2,0 – 3,4**	**3,5 – 4,9**	**> 5,0**
Urinmenge				**< 500 ml /Tag**	**<200 ml /Tag**

ALIS-Lung Injury Score System (Murray et al.)

1. Röntgen-Thorax Übersichtsaufnahme		
Keine alveoläre Verschattung		
Alveoläre Verschattung in einem Quadranten:		1
Alveoläre Verschattung in zwei Quadranten		2
Alveoläre Verschattung in drei Quadranten		3
Alveoläre Verschattung in vier Quadranten		4

2. Hypoxämie		
PaO2 / Fi O2	über 300	
Pa O2/ FI O2	225 – 299	1
Pa O2/ FI O2	175 – 224	2
Pa O2/ FI O2	100 – 174	3
Pa O2/ FI O2	unter 100	4

3. PEEP (wenn beatmet)		
PEEP	bis 5 cm H2O	
PEEP	6 – 8 cm H2O	1
PEEP	9 – 11 cm H2O	2
PEEP	12 – 14 cm H2O	3
PEEP	ab 15 cm H2O	4

4. Compliance des respiratorischen Systems (wenn vorhanden)	
Compliance	> 80 ml/ cm H2O
Compliance	60 – 79 ml/cm H2O
Compliance	40 – 59 ml/ cm H2O
Compliance	20 – 39 ml/ cm H2O
Compliance	< 19 ml/cm H2O

Die einzelnen ermittelten Werte werden zusammengezählt und durch die Anzahl der verwendeten klinischen Komponenten geteilt. Der ermittelte Score gibt dann den Grad der Lungenschädigung an-

SCORE 0	keine Lungenschädigung
SCORE 0,1 bis 2,5	mäßige bis mittelschwere Lungenschädigung
SCORE > 2,5	schwere Lungenschädigung / ARDS

1.2. Pat.-Initialen: □□ Pat.-Nr.: □□□

SCREENING

Datum:	□□.□□.□□ Tag Monat Jahr
RÖNTGENTHORAX-SCORE	
Score-Schlüssel	□ □ □ □ □ 1 2 3 4 5
BORG-SCORE	
Score-Schlüssel	□ □ □ □ 0 0.5 1 2 □ □ □ □ 3 4 5 6 □ □ □ □ 7 8 9 10
GLASGOW-COMA-SCALE	
Augenöffnen	□ □ □ □ 1 2 3 4
Sprachliche Antwort	□ □ □ □ □ 1 2 3 4 5
Motorische Antwort	□ □ □ □ □ □ 1 2 3 4 5 6
Gesamt	□□
KATECHOLAMIN-GABE	
Dopamin [µg/kg/min]	□□□□
Dobutamin [µg/kg/min]	□□□□
Adrenalin / Epinephrin [µg/kg/min]	□□□□
Noradrenalin / Norepinephrin [µg/kg/min]	□□□□
Urinmenge (letzte zwei Stunden) [ml/h]	□□□□

Handzeichen _____

1.3. Pat.-Initialen: □□ **Pat.-Nr.: □□□**

SCREENING

A.

Score- Punkt	+4	+3	+2	+1	0	-1	-2	-3	-4	APS
Temperatur rektal	**≥ 41**	**39,0-40,90**		**38,5 – 38,9**	**36-38,4**	**34-35,9**	**32-33,9**	**30-31,9**	**≤ 29,9**	
Mittlerer arterieller Druck	**≥ 160**	**130-159**	**110-129**		**70-109**		**55-69**	**40 - 54**	**≤ 39**	
Herzfrequenz (ventrikuläre Antwort)	**≥ 180**	**140-179**	**110-139**		**70-109**		**55-69**	**40-54**	**≤ 39**	
Oxygenierung Pa O2 (mmHg)	**≥ 500**	**350-499**	**200-349**		**<200 >70**	**61-70**		**55-60**	**<55**	
Arterieller pH	**≥7,7**	**7,6 – 7,69**		**7,5-7,50**	**7,33-7,49**		**7,25-7,32**	**7,15-7,24**	**<7,15**	
Serum-Natrium	**≥ 180**	**160-179**	**155-159**	**150-154**	**130-149**		**120-129**	**111-119**	**≤110**	
Serum- Kalium	**≥ 7**	**6 – 6,9**		**5,5-5,9**	**3,5-5,4**	**3,0-3,4**	**2,5-2,9**		**<2,5**	
Serum Kreatinin	**≥ 3,5**	**2,0 – 3,4**	**1,5 – 1,9**		**0,6 – 1,4**		**<0,6**			
Hämatokrit	**≥ 60**		**50-59,9**	**46 – 46,9**	**30 – 45,9**		**20-29,9**		**<20**	
Leukozyten	**≥ 40**		**20-39,9**	**15-19,9**	**3-14,9**		**1 – 2,9**		**<1**	
GCS										
Totaler akuter physiologischer Score APS										
Alterspunkte										
Chronische Gesundheits-punkte										

Apache II Score, Probe 1

B = **Alterspunkte**: Alter [Jahre] Punkte

Alter (Jahre)	**Punkte**	**Hier bitte eintragen:**
< 44 Jahre	0	
45 bis 54 Jahre	2	
55 bis 64 Jahre	3	
65 bis 74 Jahre	5	
über 75 Jahre	6	

C = **Chronische Gesundheits Punkte:**

Falls der Patient eine Anamnese mit **schwerer Organinsuffizienz** hat oder immunsupprimiert ist, weisen sie folgende Punkte zu:

b. für non-operative oder Patienten mit Notfallchirurgie – **5 Punkte**

b. für elektiv operierte postoperative Patienten – **2 Punkte**

Definition: Die Organinsuffizienz ider die Immunsuppression muß vor diesem Krankenhausaufenthalt bewiesen sein worden und den folgenden Kriterien entsprechen:

Leber: Durch Biopsie bestätigte Zirrhose und dokumentierte Portalvenenstauung; Episoden einer oberen gastrointestinalen Blutung aufgrund der portalen Hypertension oder vorhergehende Episoden eines Leberversagens / Enzephelopathie / Koma.

Herz/Kreislauf: NYHA IV.

Atmung: Chronisch restriktive, obstruktive oder vaskuläre Erkrankung aufgrund der es zu einer schweren Einschränkung der Belastungsfähigkeit kommt, z.B. Unfähigkeit Treppen zu steigen oder den Haushalt zu versehen; dokumentierte chronische Hypoxie; Hyperkapnie; sekundäre Polyzythämie, schwere pulmonale Hypertonie (> 40mmHg) oder Abhängigkeit von einem Beatmungsgerät.

Niere: Chronische Hämodialyse.

Immunsuppression: Der Patient hat eine Therapie bekommen, welche die Abwehr gegen Infektionen schwächt, z.B. Immunsupprimierung, Chemo-Therapie, Bestrahlung, Langzeittherapie mit hochdosierten Steroiden oder eine Erkrankung, welche die Infektabwehr schwächt, z.B. Leukämie, Lymphome, AIDS.

APACHE II SCORE:

1.A. APS Punkte	_____
B. Alterspunkte	_____
C. Chronische Gesundheitspunkte	_____
Totaler Apache II	_____

1.4. Pat.-Initialen: □□ Pat.-Nr.: □□□

SCREENING

Hier die Punkte notieren

SOFA-Score

Punkte	0	1	2	3	4
Respiration (Pa O2/ Fi O2)	> 400	<400	<300	<200 mit respiratorischer Unterstützung	<100 mit respiratorischer Unterstützung
Koagulation Plättchen (x 10^3/ mm^3)	> 150	<150	<100	<50	<20
Leber Bilirubin (mg/dl)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12,0
Kardiovaskuläre Hypotension	Keine Hypotension	MAP < 70 mmHg	Dopamin < 5 oder Dopitamin-Dosis	Dopamin > 5 od. EPI <1 od. NOREPI <0,1	Dopamin > 15 od. EPI > 0,1 od. NOREPI > 0,1
Zentrales Nervensystem Glascow Coma Scale	15	13 -14	10 – 12	6 – 9	<6
Nieren Kreatinin (mg/ dl)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9	> 5,0
Urinmenge				< 500 ml /Tag	<200 ml /Tag

SUMME:

1.5. Pat.-Initialen: □□ Pat.-Nr.: □□□

SCREENING

ALIS – Lung Injury Score System

	0	1	2	3	4	Punkte
Röntgen-thorax (alveoläre Verschattung)	Keine	in einem Quadranten	in zwei Quadranten	in drei Quadranten	iIn vier Quadranten	
Hypoxämie PaO2/ Fi O2	über 300	225 - 299	175 - 224	100 – 174	unter 100	
PEEP Cm H2O (wenn beatmet)	Bis 5 cm H2O	6 bis 8	9 - 11	12 – 14	> 15	
Compliance ml/ cm H2O	> 80	60 - 79	40- 59	20 – 39	<19	

Auswertung

Score 0 keine Lungenschädigung

Score 0,1 – 2,5 mäßige bis mittelschwere Lungenschädigung

Score > 2,5 schwere Lungenschädigung

Ergebnis _____

Handzeichen _____

1.6. Pat.-Initialen: □□ Pat.-Nr.: □□□

Bitte machen Sie ein X wo es zutrifft und füllen Sie alle vorgegebenen Datenfelder (□) aus.

ANAMNESE(die folgenden Daten dienen der Erhebung des APACHE II-Score)

Bei dem Patienten wurde

Ja□ **Nein**□ Ein chirurgischer Noteingriff vorgenommen bevor er sich in dem jetzigen Zustand befand

Ja□ **Nein**□ Ein elektiver chirurgischer Eingriff vorgenommen bevor er sich in dem jetzigen Zustand befand

Hat der Patient eine der folgenden Organerkrankungen :

1.) Leber:

Ja□ **Nein**□ Durch Biopsie bestätigte Zirrhose

Ja□ **Nein**□ Dokumentierte Portale Hypertension

Ja□ **Nein**□ Episode oberer gastrointestinaler Blutung aufgrund einer portalen Hypertension

Ja□ **Nein**□ Vorhergehendes Leberversagen

Ja□ **Nein**□ Enzephalopathie

Ja□ **Nein**□ Vorhergehendes Leberkoma

2.) Kardiovaskulär

Ja□ **Nein**□ NYHA °IV

3.) Atmung

Ja□ **Nein**□ Chronische Hypoxie

Ja□ **Nein**□ Hyperkapnie ($PaCO_2$ > 50 mmHg)

Ja□ **Nein**□ Sekundäre Polyzythämie (Hämatokrit > 60 %)

Ja□ **Nein**□ Schwere pulmonale Hypertonie (> 40mmHg)

Ja□ **Nein**□ Heimbeatmung

4.) Renal:

Ja□ **Nein**□ Chronische Hämodialyse

5.) Immunsuppression:

Ja□ **Nein**□ Immunsupprimierung

Ja□ **Nein**□ Bestrahlung

Ja□ **Nein**□ Chemotherapie

Ja□ **Nein**□ Langzeittherapie mit hochdosierten Steroiden (> 10 mg Prednison pro Tag)

Ja□ **Nein**□ Leukämie

Ja□ **Nein**□ AIDS

Ja□ **Nein**□ Lymphome

Ja☐ Nein☐ Keine der oben genannten Erkrankungen

EKG

Das EKG des Patienten ist **normal** ☐ **abnormal** ☐**.**

Falls das EKG abnormal erscheint, kommentieren Sie bitte inwiefern:

Datum: ☐☐.☐☐.☐☐ **Untersucher :**_____

1.7. Pat.-Initialen: □□ Pat.-Nr.: □□□

Bitte machen Sie ein X wo es zutrifft und füllen Sie alle vorgegebenen Datenfelder (□) aus.

ANAMNESE

Keine bedeutende Anamnese □

Krankheit / Syndrom / Eingriff	Datum der Diagnosestellung Monat.Jahr	Zur Zeit andauernd? Ja	Nein
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□
	□□.□□	□	□

Datum: □□.□□.□□ **Untersucher :** _____

1.8. Pat.-Initialen: □□ **Pat.-Nr.: □□□**

Bitte machen Sie ein X wo es zutrifft und füllen Sie alle vorgegebenen Datenfelder (□) aus.

MEDIKAMENTÖSE THERAPIE

Vor Aufnahme und jetzige stationäre Therapie.

Keine □

Medikamenten-Name (generischer Name bevorzugt; falls Kombinationsprodukt Markenname)	**Dosis / Einheiten** (z.B. mg, g, ml, I.E.)	Frequenz Menge/Tag	**Behandlungsdatum (Tag, Monat)**		
			Beginn *	**Ende**	**Noch andauernd**
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□

*Falls der Beginn der Therapie vor der Aufnahme liegt, schreiben Sie bitte "vorher".

Datum: □□.□□.□□ **Untersucher :**_____

1.9. Pat.-Initialen: □□ **Pat.-Nr.: □□□**

Bitte machen Sie ein X wo es zutrifft und füllen Sie alle vorgegebenen Datenfelder (□) aus.

MEDIKAMENTÖSE THERAPIE

Vor Aufnahme und jetzige stationäre Therapie.

Keine □

Medikamenten-Name (generischer Name bevorzugt; falls Kombinationsprodukt Markenname)	**Dosis / Einheiten** (z.B. mg, g, ml, I.E.)	**Menge/Tag**	**Behandlungsdatum (Tag, Monat)**		
			Beginn *	**Ende**	**Noch andauernd**
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□
					□

*Falls der Beginn der Therapie vor der Aufnahme liegt, schreiben Sie bitte "vorher".

Datum: □□.□□.□□ **Untersucher :**_____

H. Anhang: Verzeichnis der Risiko-Scores, Labor- und Meßparameter

Der ISS-Score

	Schweregrad				
	1	2	3	4	5
Allgemein	KleinereWeich-teilverletzung	Verbrennung von 10-20% KO, ausgedehnte Weich-teilverletzung an 1 oder 2 Extremitäten	3.gradige Verbrennung von 20-30% KO, ausgedehnte Weichteilverletzung an > 2 Extremitäten	2.-3.gradige Verbrennung von 30-50% KO, ausgedehnte Weich-teilverletzung mit bedrohlicher Blutung	2.-3.gradige Verbrennung > 50%
Kopf / Hals	Schädeltrauma ohne Bewußtseinsein-trübung, HWS-Schleudertrauma ohne path. Röntgen-befund	Schädeltrauma mit Bewußtlosigkeit < 15min, ohne retrograde Amnesie, HWS-Schleuder-trauma mit röntgeno-logischen Zeichen	Schädel-Hirn-Trauma mit Bewußt-losigkeit > 15min, ohne Seitenzeichen, retrograde Amnesie bis 3h, dislozierte Frakturen von Kalotte bis Mittel-gesicht, Orbita oder Nasennebenhöhlen, HWS-Fraktur ohne Rückenmarksver-letzung, Zerstörung des Auges, Optikus-abriß	Schädel-Hirn-Trauma mit Bewußt-losigkeit >15min oder Seitenzeichen, retrograde Amnesie 3-12h, mehrfache Schädelfrakturen	Schädel-Hirn-Trauma mit Bewußt-losigkeit >24h, retrograde Amnesie >12h, intrakranielle Blutung, Hirn-druckerhöhung, HWS-Fraktur mit Querschnitt-symptomatik
Thorax	Thoraxprellung	Einfache Rippen- / Sternumfraktur, Kontusion ohne Behinderung der Atmung	Mehrfache Rippen-frakturen und Lungenkontusion ohne Behinderung der Atmung, Pneumothorax, Hämatothorax, Zwerchfellruptur	Offenes Thorax-trauma, instabiler Thorax, Pneumo-mediastinum, Peri-kardverletzung, Herzkontusion ohne Kreislauf-beeinträchtigung	Thoraxverletzung mit schwerer Atem-behinderung, Trachealabriß, Hämomediastinum, Aortenruptur, Myokardruptur, schwere Herzkontusion
Abdomen	Bauchwand-kontusion	Ausgedehnte Kontusion des Abdomens	Kontusion von Bauchorganen, retroperitoneales Hämatom, extra-peritoneale Blasen-ruptur, Ureter- und Urethraverletzung, BWS- oder LWS-Fraktur ohne Neurologie	Weniger schwere Verletzung von Abdominalorganen (Milz- / Nieren-ruptur, Pankreas-schwanzkontusion), intraperitoneale Blasenruptur, Genitalverletzung, BWS- oder LWS-Fraktur mit Quer-schnittsymptomatik	Ruptur oder Per-foration ab-dominaler Organe außer Milz, Blase und Pankreas-schwanz
Extremitäten	Verstauchung, Fraktur von Fingern und Zehen	Geschlossene Frakturen von Becken / Röhren-knochen, Ver-stauchung großer Gelenke	dislozierte ge-schlossene oder einfache offene Röhernknochen-frakturen, dislozierte Beckenfraktur, mehrfache Hand- / Fußfrakturen, Luxation großer Gefäße, Verletzung von großen Extremitätennerven / -gefäßen	Mehrfache Röhren-knochenfrakturen, Gliedmaßen-amputation	Mehrfache offene Röhrenknochen-frakturen

Tabelle 1: Injury-Severity-Score (ISS) nach Baker et al. (1974)

Der PTS-Schlüssel

Variable	Punkte	Variable	Punkte
Schädel		***Thorax***	
GCS 9-12	2	Sternum / Rippenfrakturen	1
GCS 6-8	4	Rippenserienfraktur	4
GCS 3-5	16	Rippenserienfraktur bds.	10
Mittelgesichtsfraktur	1	Pneumothorax	2
Schwere Mittelgesichtsfraktur	2	Hämatothorax	1
		Lungenkontusion	3
Abdomen		Lungenkontusion bds.	5
Milzruptur	5	Aortenruptur	16
Leberruptur	8		
Leberruptur ausgedehnt	10	***Becken***	
Pankreas	8	Beckenfraktur einfach	2
Magen, Darm, Niere, Mesenterium	5	Beckenfraktur kombiniert	5
		Becken- / Urogenitalverletzung	8
Extremitäten / -frakturen		Beckenquetschung	12
Oberschenkeltrümmerfraktur	8	Wirbelbruch	2
Oberschenkelfraktur	6	Wirbelbruch mit Querschnitt	8
Oberarm, Schulter	4		
Unterschenkelfraktur	2	***Alter [Jahre]***	
Patella, OSG, Unterarm, Knieband	1	0-39	0
Gefäßverletzung Oberschenkel	5	40-54	1
Gefäßverletzung Oberarm	4	55-59	2
Gefäßverletzung Unterschenkel/ -arm	3	60-64	3
2° und 3° offene Fraktur	2	65-69	5
Weichteilverletzung	1	70-74	8
		≥ 75	17
p_aO_2 / F_iO_2		***„base excess“***	
≤ 50	22	≤ -16	26
50-99	12	-14 bis -15,9	20
100-149	8	-12 bis -13,9	14
150-199	5	-10 bis -11,9	9
200-249	3	-08 bis -09,8	5
250-299	2	-06 bis -07,9	3
300-349	1	-04 bis -05,9	1
> 350	0	> -3,9	0

PTS revidiert = Summe der Punktwerte der Einzelverletzungen

Tabelle 2: Polytrauma-Schlüssel (PTS) nach Oestern et al. (1991)

Der APACHE II-Score

Laborchemische Daten und Vitalzeichen

Parameter	Einheit	Erhöhte Werte					Erniedrigte Werte			
		4	3	2	1	0	1	2	3	4
Rektaltemperatur	[°C]	> 41	39 - 40,9		38,5 - 38,9	36 - 38,4	34 - 35,9	32 - 33,9	30 - 31,9	< 29,9
Art. Mitteldruck	[mmHg]	< 160	130 - 159	110 – 129		70 - 109		50 - 69		<49
Herzfrequenz		< 180	140 - 179	110 – 139		70 - 109		55 - 69	40 - 54	< 39
Atemfrequenz		< 50	35 - 49		25 - 34	12 - 24	10 - 11	6 - 9		< 5
Oxygenation a) $FiO_2 > 0,5$ $AaDO_2$ b) $FiO_2 < 0,5$ PaO_2		> 500	350 - 499	200 – 349		< 200 > 70	61 - 70		55 - 60	< 55
Art. PH-Wert		> 7,7	7,6 - 7,69		7,5 - 7,59	7,33 - 7,49		7,25 - 7,32	7,15 - 7,24	< 7,15
Na^{2+} im Serum	[mmol/l]	> 180	160 - 179	155 – 159	150 - 154	130 - 149		120 - 129	111 - 119	< 110
K^{+} im Serum	[mmol/l]	> 7	6 - 6,9		5,5 - 5,9	3,5 - 5,4	3 - 3,4	2,5 - 2,9		< 2,5
Kreatinin im Serum [bei akutem Nieren-versagen x2]	[mg/dl]	< 3,5	2 - 3,4	1,5 – 1,9		0,6 - 1,4		<0,6		
Hämatokrit	[%]	< 60		50 – 59,9	46 - 49,9	30 - 45,9		20 - 29,9		< 20
Leukozyten	[1.000 mm^3]	> 40		20 – 39,9	15 - 19,9	3 – 14,9		1 - 2,9		< 1
Glasgow Coma Scale										
HCO^{3-} [venöses Blut, wenn keine BGA]	[mmol/l]	< 52	41 - 51,9		32 - 40,9	22 - 31,9		18 - 21,9	15 - 17,9	< 15

Alterspunkte:	Alter in Jahren	Punkte
	< 44	0
	45 – 54	2
	55 – 64	3
	65 – 74	5
	≥ 75	6

Chronische Punkte:
Für Patienten mit vorbestehenden schweren Insuffizienzen eines Organsystems oder Patienten mit Immunschwäche gelten folgende Punkte:
a) für nichtoperative Patienten oder Notfalloperationen: 5 Punkte
b) für Elektivoperationen 2 Punkte

Definition der schweren Organinsuffizienz und Immunschwäche

- Leber: bioptisch gesicherte Zirrhose und nachgewiesene portale Hypertension, stattgehabte Episoden oberer gastrointestinaler Blutungen als Folge portaler Hypertension, frühere Episoden von Leberversagen / hepatische Enzephalopathie / Leberkoma.
- Kardiovaskulär: Herzinsuffizienz NYHA IV.
- Respiratorisch: chronisch restriktive, obstruktive oder vaskuläre Lungenerkrankungen mit schwerer Einschränkung der Belastbarkeit oder nachgewiesener chronischer Hypoxie, Hyperkapnie, sekundärer Polyzythämie, schwerer pulmonaler Hypertension [> 40 mmHg] oder Respiratorabhängigkeit.
- Renal: terminale Niereninsuffizienz mit chronischer Dialysebehandlung.
  Immunschwäche: immunsuppressive Therapie, z.B. Immunsuppressiva, Chemotherapie, Radiatio, Steroidtherapie oder krankheitsbedingte Immunsuppression [Leukämie, AIDS].

Tabelle 3: APACHE II – Score nach Knaus et al. (1985)

Der APACHE III-Score

Punkte für laborchemische Daten und Vitalzeichen

Parameter	Einheit								
Rektaltemperatur	[°C]	33,5 - 33,9 13	34 – 34,9 8	35 - 35,9 2	36 – 39,9 0	< 40,0 4			
Art. Mitteldruck	[mmHg]	40 - 59 15	60 – 69 7	70 - 79 6	80 – 99 0	100 – 119 4	120 - 129 7	130 - 139 9	< 140 10
Herzfrequenz			< 39 8	40 - 49 5	50 – 99 0	100 – 109 1	110 - 119 5	120 - 139 7	>14 13
Atemfrequenz		< 5 17	6 – 11 8	12 - 13 7	14 – 24 0	25 – 34 6	35 - 39 9	40 – 49 11	>50 18
PO_2	[mmHg]	< 49 15	50 - 69 5	70 - 79 2	> 80 0				
Kreatinin im Serum	[mg/dl]			< 0,4 3	0,5 - 1,4 0	1,5 – 1,94 4	< 1,95 7		
Kretainin im Serum unter akutem Nierenversagen	[mg/dl]				0 - 1,4 0	> 1,5 10			
Hämatokrit	[%]			< 40,9 3	41 – 49 0	> 50 3			
Leukozyten	[1.000 mm^3]		< 1 19	1 - 2,9 5	3 – 19,9 0	20 – 24,9 1	> 25 5		
24h Sammelurin	[ml]	600 - 800 7	900 - 1499 5	1500 - 1999 4	2000 - 3999 0	> 4000 1			
Harnstoff	[mg/dl]				< 16,9 0	17 – 19 2	20 - 39 7	40 - 79 11	> 80 12
Na^{2+} im Serum	[mmol/l]		< 119 3	120 - 134 2	134 - 154 0	> 155 4			
Albumin	[g/l]		< 19 11	20 - 24 6	25 – 44 0	> 45 4			
Bilirubin	[mg/dl]				< 1,9 0	2 - 2,9 5	3 - 4,9 6	5 - 7,9 8	> 8 16
Glucose	[mg/dl]	< 39 12	40 - 59 9	60 - 120 0	200 - 349 3	> 350 5			

Alterspunkte:

Alter in Jahren	Punkte
< 44	0
45 – 59	5
60 – 64	11
65 – 69	13
70 – 74	16
75 – 84	17
> 85	24

Chronische Punkte (wird bei Elektivoperationen nicht berücksichtigt):

Erkrankung	Punkte
AIDS	23
Leberversagen	16
Lymphome	13
Metastasierendes Ca	11
Leukämie	10
Immunsuppression	10
Leberzirrhose	04

Punkte für Abweichungen im Säure-Basen-Haushalt:

<table>
<tr><th>PCO_2 (mmHg)
PH</th><th>< 25</th><th>25 – <30</th><th>30 - < 35</th><th>35 - < 40</th><th>40 - < 45</th><th>45 - < 50</th><th>50 - < 55</th><th>55 - < 60</th><th>> 60</th></tr>
<tr><td>< 7,15</td><td colspan="5" rowspan="2">1 2</td><td colspan="4" rowspan="2">4</td></tr>
<tr><td>7,15 - < 7,2</td></tr>
<tr><td>7,2 - < 7,25</td><td colspan="2" rowspan="2">9</td><td colspan="2" rowspan="2">6</td><td colspan="2" rowspan="2">3</td><td colspan="3" rowspan="2">2</td></tr>
<tr><td>7,25 - < 7,3</td></tr>
<tr><td>7,3 - < 7,35</td><td colspan="3" rowspan="2">0</td><td colspan="5">1</td></tr>
<tr><td>7,35 - < 7,4</td><td colspan="2" rowspan="2">5</td><td colspan="5" rowspan="2">1</td></tr>
<tr><td>7,4 - < 7,45</td></tr>
<tr><td>7,45 - < 7,5</td><td colspan="2">0</td><td colspan="2">2</td><td colspan="5" rowspan="3">12</td></tr>
<tr><td>7,5 - < 7,55</td><td colspan="4" rowspan="2">3</td></tr>
<tr><td>7,55 - < 7,6</td></tr>
<tr><td>7,6 - < 7,65</td><td>0</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>> 7,65</td><td colspan="9"></td></tr>
</table>

Tabelle 4: APACHE III - Score nach Knaus et al. (1991)

Klinische Kriterien der Sepsis

Klinische Kriterien der Sepsis

1. Infektiöse Ätiologie der Inflammation
2. Mikrobiologisch dokumentierte Infektion oder Infektion nach klinischen Kriterien
3. Schwere inflammatorische Wirtsreaktion [mind. 2 Kriterien]
   - Fieber: Körperkerntemperatur >38°C oder
     Hypothermie: Körperkerntemperatur < 36°C
   - Tachykardie: Kammerfrequenz > 90/min
   - Tachypnoe: > 20 Atemzüge/min oder
     Hyperventilation: $PaCO_2$ < 4,3 kPa (=33 mmHg)
   - Leukozytose > 12 G/l oder
     Leokopenie < 4 G/l oder
     Linksverschiebung im Differentialblutbild [unreife/Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten > 0,1]
4. Zeichen der generalisierten Inflammation: akute infektionsferne Organdysfunktionen/-versagen [mind. 1 Kriterium]
   - Akute Enzephalopathie: reduzierte Vigilanz, Desorientierung, Unruhe, Delir
     (bei fehlender Beeinflussung durch psychotrope Pharmaka, endokrine oder metabolische Ursachen)
   - Arterielle Hypotension: systolischer Blutdruck zumindest 1 Stunde lang < 90 mmHg bei einem zuvor normotensiven Patienten oder ein anhaltender Blutdruckabfall > 40 mmHg gegenüber dem Ausgangsblutdruck

Bei Abwesenheit anderer Schockursachen

- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Thrombozytenabfall > 30%/24h oder
  Thrombozytenzahl < 100 G/l

Ohne Blutverluste als Ursache

- Arterielle Hypoxämie: PaO_2 < 10 kPa (=75 mmHg) unter Atmung von Raumluft oder
  PaO_2 [kPa]/FiO_2 < 33kPa [=PaO_2mmHg/FiO_2 < 250 mmHg] unter Sauerstoffsupplementierung

Ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache

- Renale Dysfunktion/Oligurie: Urinausscheidung < 0,5 ml/kg KG zumindest für 2 Stunden oder
  ein Abfall der Kreatininclearance
- Metabolische Azidose: negativer base excess > 5 mmol/l, der nicht anderweitig erklärbar ist oder
  eine Laktatkonzentration im Plasma außerhalb des Referenzbereiches des jeweiligen Labors

Klinische Kriterien des septischen Schocks

Kriterium 1, 2, 3 und 4 sowie

- Zumindest 2 Stunden lang bestehender systolischer arterieller Blutdruck < 90 mmHg ohne Ansprechen auf eine adäquate Volumenexpansion oder
  Einsatz von α-adrenerg wirksamen Katecholaminen erforderlich, um den mittleren arteriellen Blutdruck auf > 60 mmHg anzuheben und zu stabilisieren
  [nicht berücksichtigt wird eine Dopamindosis < 5 µg/kg KG]

Tabelle 5: Klinische Kriterien der Sepsis und des septischen Schocks

Der MOF-Score

	0 Nicht nachweisbar	1 Mittelschwer	2 Schwer
Lungenversagen	Keine Beatmung	Beatmung mit PEEP $\leq$ 10 cm H_2O und $F_iO_2 \leq 0,4$	Beatmung mit PEEP > 10 cm H_2O und $F_iO_2 > 0,4$
Herz-Kreislauf-Versagen	Normaler Blutdruck ohne vasoaktive Substanzen	Therapie erforderlich, um systolischen Blutdruck > 100 mmHg zu halten: Volumensubstitution oder Dopamin $\leq$ 10µg/kg KG/min oder Nitroglyzerin $\leq$ 20µg/kg KG/min	Phasen arterieller Hypotension mit Blutdruck unter 100 mmHg und / oder Dopamin > 10µg/kg KG/min und / oder Nitroglyzerin > 20µg/kg KG/min
Nierenversagen	Serumkreatinin < 2mg/dl	Serumkreatinin $\geq$ 2mg/dl	Hämodialyse / Hämofiltration
Leberversagen	SGOT < 25U/l Bilirubin < 2mg/dl	SGOT > 25U/l Bilirubin > 2mg/dl, < 6mg/dl	SGOT > 50U/l Bilirubin $\geq$ 6mg/dl
Versagen der Blutgerinnung	Thrombozyten normal Leukozyten normal	Thrombozyten < 50.000 und / oder Leukozyten $\geq$ 3.000, < 6.000	Hämorrhagische Diathese oder Leukozyten < 2.500 oder $\geq$ 6.000
Gastrointestinales Versagen	Normale Funktion	Cholezystitis oder Streßulkus	Streßblutung mit Transfusion mehrmals 2E/24h und / oder nekrotisiernde Enterokolitis und / oder Pankreatitis und / oder Gallenblasenperforation
ZNS-Versagen	Normale Funktion	Eindeutig eingeschränktes Reaktionsvermögen	Schwer gestörtes Reaktionsvermögen und / oder diffuse Neuropathie

Tabelle 6: MOF-Score nach Goris (1985]

Der MOD-Score

Organ	Parameter	Einheit	0	1	2	3	4
Lunge	PO_2/F_iO_2	-	> 300	226 - 300	151 - 225	76 - 150	≤ 75
Niere	Kreatinin	[µmol/l]	≤ 100	101 - 200	201 - 350	351 - 500	> 500
Leber	Bilirubin	[µmol/l]	≤ 20	21 - 60	61 - 120	121 - 240	> 240
Herz	Pressure adjusted Heart Rate	[l/min]	≤ 10	10,1 - 15	15,1 - 20	20,1 - 30	>30
Blut	Thrombozyten	[1.000/ml]	≤ 120	81 - 120	51 - 80	21 - 50	< 20
ZNS	GCS	-	15	13 - 14	10 - 12	9 - 7	< 6

Tabelle 7: MOD-Score nach Marshall (1994)

Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) (Vincent et al., 1998)

Punkte	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Respiration **(Pa O2/ Fi O2)**	**> 400**	**<400**	**<300**	**<200** **mit respiratorischer Unterstützung**	**<100** **mit respiratorischer Unterstützung**
Koagulation Plättchen **(x 10^3/ mm^3)**	**> 150**	**<150**	**<100**	**<50**	**<20**
Leber Bilirubin (mg/dl)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12,0
Kardiovaskuläre Hypotension	**Keine Hypotension**	**MAP < 70 mmHg**	**Dopamin < 5 oder Dopitamin-Dosis**	**Dopamin > 5 od. EPI <1 od. NOREPI <0,1**	**Dopamin > 15 od. EPI > 0,1 od. NOREPI > 0,1**
Zentrales Nervensystem **Glascow Coma Scale**	**15**	**13 -14**	**10 - 12**	**6 - 9**	**<6**
Nieren **Kreatinin** **(mg/ dl)**	**< 1,2**	**1,2 – 1,9**	**2,0 – 3,4**	**3,5 – 4,9**	**> 5,0**
Urinmenge				**< 500 ml /Tag**	**<200 ml /Tag**

Tabelle 8: MOD-Score nach Marshall (1994)

Liste der Routinelaborparameter

- **Niere und Elektrolyte**

Urin- und Flüssigkeitsbilanz, Serum-Werte Natrium, Kalium, Kalzium, Kreatinin und Harnstoff.

- **Leber und Pankreas**

Serum-Werte Bilirubin, Albumin, Cholinesterase, Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ-GT), Kreatin-Kinase (CK) alkalische Phosphatase (APH), Amylase, Lipase.

- **Blutbild und Blutgerinnung**

Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk), Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Differentialblutbild, Thromboplastinzeit (TPZ, Quickwert), partielle Thromboplastinzeit (PTT), Plasmathrombinzeit (PTZ), Fibrinogen, Antithrombin III.

Tabelle 9: Liste der Routinelaborparameter

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

Danksagung

Am Schluss angekommen, bin ich nicht so vermessen zu denken, dass diese Arbeit in einem leeren Raum entstanden ist, in dem ich allein gewirkt habe. Vielmehr bin ich in hohem Maße fachlich und emotional begleitet worden, und so gilt es, für diese Unterstützung Danke zu sagen bei allen, die in dieser Zeit an meiner Seite waren.

Herrn Prof. Chakraborty danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie durchführen zu können.

Herrn Dr. Hossain danke ich für die gute Betreuung meiner Arbeit. Seine Begeisterung für das Thema und die wertvollen Anregungen und Ratschläge haben mich immer wieder mitgerissen und motiviert.

Herrn J. Schklarenko und Herrn S. Tchatalbachev danke ich für die praktische Durchführung der Microarrays und der RT-PCR.

Vielen Dank an Herrn Michael Maier und Herrn Andreas Billion für die Unterstützung bei jeglichen IT-Fragen.

Danken möchte ich auch dem restlichen Team aus der Gaffkystraße, insbesondere Marie und Tanja, den beiden besten Mitstreiterinnen, die ich mir wünschen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ich niemals das erreicht hätte, was ich geschafft hab.

An Thomas geht mein Dank sowohl für die fachlichen Ratschläge und Gespräche als auch für die menschliche Unterstützung und Motivation.