Genexpression im Nabelschnurblut Frühgeborener mit konnataler Infektion

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

vorgelegt von Manuel Klein

aus Kreuztal

Gießen 2011

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH Standort Gießen Direktor: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

> Gutachter: Prof. Dr. T. Chakraborty Gutachter: Prof. Dr. R. F. Maier

Tag der Disputation: 01.10.2013

# Zusammenfassung

Trotz weitreichender Fortschritte in der neonatologischen Intensivmedizin stellt die systemische Infektion des Früh- und Neugeborenen auch heute noch eine große Herausforderung dar, da sie mit einer hohen Mortalität und zahlreichen Langzeitkomplikationen assoziiert ist. Wesentliches Hindernis einer frühen Diagnose und erfolgreichen Therapie ist hierbei das unzureichende Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie, das sich im Fehlen zuverlässiger und frühzeitig verfügbarer Marker widerspiegelt.

Ziel der vorgelegten explorativen Studie war deshalb, spezifische Unterschiede in der Genexpression von Frühgeborenen mit und ohne konnatale Infektion zum Zeitpunkt der Geburt zu identifizieren. Hierzu wurden Frühgeborene prospektiv in die Studie eingeschlossen und der Gruppe "konnatale Infektion" beziehungsweise der Kontrollgruppe ohne konnatale Infektion zugeordnet. Die Diagnose der konnatalen Infektion erfolgte anhand laborchemischer und klinischer Zeichen in den ersten 72 Lebensstunden. Die RNA für die genomweite Transkriptomanalyse wurde aus Nabelschnurblut gewonnen, das unmittelbar nach der Geburt asserviert wurde.

Unsere Ergebnisse zeigten Unterschiede in den Genexpressionsprofilen von Frühgeborenen mit und ohne konnatale Infektion. Frühgeborene mit konnataler Infektion wiesen höhere Expressionslevel von Genen auf, die im Zusammenhang mit der Funktion neutrophiler Granulozyten, Hypoxie und Kohlenhydratstoffwechsel stehen. Gleichzeitig zeigten sie eine geringere Expression von Genen, die die Reifung und Aktivität natürlicher Killerzellen beeinflussen. Die Beeinträchtigung der Funktion natürlicher Killerzellen und die erhöhte Aktivität von Neutrophilen stellen Schlüsselfunktionen dar, die beim Frühgeborenen zur systemischen Infektion einerseits und zum Gewebeschaden andererseits führen können.

Die Ergebnisse unserer Transkriptomanalyse tragen zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Prozesse bei, die der konnatalen Infektion des Frühgeborenen zugrunde liegen. Die Identifizierung von Schlüsselfaktoren und Signaltransduktionswegen kann die gezieltere Untersuchung potentieller diagnostischer Werkzeuge ermöglichen, die Voraussetzung für eine frühe und effiziente Therapie sind.

# Abstract

Despite the progress in neonatal intensive care, systemic infections in the term and preterm neonate remain a great challenge, as they are associated with a high mortality rate and numerous long-term complications. One of the major obstacles for an early diagnosis and a successful therapy is the poor understanding of the underlying pathophysiology, which is mirrored by the lack of markers that are both reliable and early available.

The goal of this explorative study was therefore to identify specific differences in the gene expression of preterm infants with and without early-onset infection at birth. For this purpose, we prospectively included preterm infants in the study, who were allocated either to the group "early-onset infection" or to the control group without early-onset infection. The diagnosis of early-onset infection was based on laboratory and clinical findings collected within the first 72 hours of life. The RNA for this genome wide transcriptome analysis was obtained from cord blood immediately after birth.

Our results revealed differences in the gene expression profiles of preterm infants with and without early-onset infection. Neonates suffering from early-onset infection displayed higher expression levels of genes associated with the function of neutrophil granulocytes, hypoxia and carbohydrate metabolism. At the same time they showed a lower expression of genes affecting the maturation and activity of natural killer cells. The functional impairment of natural killer cells as well as the increased activity of neutrophils in the preterm infant are key functions in the development of systemic infection and tissue damage.

The results of our transcriptome analysis contribute to a better understanding of the pathophysiological processes underlying early-onset infection in preterm infants. The identification of key factors and signal transduction pathways may enable further studies to develop diagnostic tools which are a prerequisite for an early and efficient therapy.

# Inhaltsverzeichnis

Zusan	nmenfassung	3
Abstra	act	4
Inhaltsverzeichnis		
Abbilo	lungsverzeichnis	10
Tabell	enverzeichnis	12
Abkür	zungsverzeichnis	13
1	Einleitung	16
1.1	Definition der neonatalen Sepsis	16
1.2	Epidemiologie der neonatalen Sepsis	16
1.3	Klassifikation der neonatalen Sepsis	17
1.3.1	Die konnatale Infektion des Neugeborenen	18
1.4	Pathophysiologie der neonatalen Sepsis	18
1.4.1	Die besondere Rolle der angeborenen Immunität	19
1.4.1.1	Zelluläre Komponenten der angeborenen Immunabwehr	19
1.4.1.2	2Humorale Komponenten der angeborenen Immunabwehr	20
1.4.2	Die Rolle der erworbenen Immunität	20
1.4.3	Zusammenfassende Darstellung der Pathophysiologie	21
1.5	Klinik, Diagnostik und Therapie bakterieller Infektionen des Neugeborenen	22
1.5.1	Anamnese und Klinik bakterieller Infektionen des Neugeborenen	22
1.5.2	Diagnostik bakterieller Infektionen des Neugeborenen	22
1.5.2.1		22
1.5.2.2	2Bakteriologische Untersuchungen	23
1.5.2.3	3Urindiagnostik	23
1.5.2.4	Therapie bakterieller Infektionen des Neugeborenen	∠ა 23
1.5.5	Hindernisse in der Therapie bakterieller Infektionen des Neugeborenen	23 24
1.6	Microarrays in der Erforschung konnataler Infektionen	24
1.6.1	RT-PCRs	25
1.7	Blut als Untersuchungsmaterial	26
1.8	Ziel dieser Arbeit	26
2	Patienten, Material und Methoden	27
2.1	Patientenkollektiv	27
2.1.1	Einschlusskriterien	27
2.1.2	Ausschlusskriterien	27
2.1.3	Zuordnung der Patienten	28

2.1.4	Definition peri- und postpartaler Ereignisse	28
2.2	Der Microarray	29
2.3	Probengewinnung, RNA-Aufbereitung und Hybridisierung der Arrays	30
2.3.1	Blutentnahme und Stabilisierung der gewonnenen RNA	30
2.3.2	RNA: Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle	30
2.3.3	RNA: Umschreibung, Markierung und Reinigung	30
2.3.4	Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung der Arrays	31
2.4	Analyse der gewonnenen Daten	31
2.4.1	Low-Level Analyse	31
2.4.1.1	Quantifizierung der Signale	31
2.4.1.2	Ausschluss einzelner Gene	32
2.4.1.3	Imputierung fehlender Werte	32
2.4.1.4	Identifikation und Elimination von technischen Ausreißern	33
2.4.1.5	Erneute Imputierung fehlender Werte	33
2.4.1.6	Identifikation und Elimination von Ausreißerarrays	33
2.4.1.7	'Entfernung der Ausreißerarrays	34
2.4.1.8	Wiederholung der bisherigen Analyseschritte	34
2.4.1.9	Quantile-Normalisierung des Datensatzes	34
2.4.1.1	0 Errechnung von Mittelwerten	35
2.4.2	High-Level Analyse	35
2.4.2.1	Errechnung von Rangprodukten	35
2.4.2.2	Annotierung der signifikant differenziell regulierten Gene	36
2.4.2.3	BLokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene	36
2.4.2.4	Identifizierung überrepräsentierter biologischer Gruppen	36
2.4.2.4	I.1 DAVID	37
2.4.2.4	I.2 Gene Ontology	38
2.4.2.5	5Visualisierung in aktuell verfügbaren Pathways	38
2.4.2.6	Analyse mit Ingenuity Pathways Analysis	39
2.4.2.6	6.1 Network Explorer	39
2.4.2.6	6.2 Functional Analysis	39
2.4.2.6	6.3 Canonical Pathways	39
2.4.2.7	Analyse mit BioBase ExPlain	40
2.4.2.7	7.1 Einfache Promotorenanalyse	40
2.4.2.7	7.2 Erweiterte Promotorenanalyse	40
2.4.2.7	7.3 Knotenpunktanalyse	40
2.4.2.8	BHierarchische Cluster-Analyse	41
25	Validierung	41
2.5.1	Durchführung der RT-PCR	41
2.6	Mitwirkende Personen	43
0	Freehoises	
3 0 1		44
3.1	Klinische Daten	44
3.2	Probengewinnung, RNA-Aufbereitung und Hybridisierung der Arrays	47
3.3	Analyse der gewonnenen Daten	47

3.3.1	Low-Level Analyse	47
3.3.2	High-Level Analyse	48
3.3.2.	1Errechnung von Rang-Produkten	48
3.3.2.2	2Annotierung der signifikant differenziell regulierten Gene	50
3.3.2.3	3Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene	50
3.3.2.4	Identifizierung überrepräsentierter biologischer Gruppen	54
3.3.2.4	4.1 Abwehrantwort (Defense Response)	57
3.3.2.4	4.2 Antwort auf Stimulus (Response to Stimulus)	58
3.3.2.5	5Visualisierung in aktuell verfügbaren Pathways	61
3.3.2.5	5.1 Ranking nach der absoluten Zahl gemappter Gene	61
3.3.2.5	5.2 Ranking nach dem prozentualen Anteil gemappter Gene	63
3.3.2.6	SAnalyse mit "Ingenuity Pathways Analysis"	68
3.3.2.6	6.1 Associated Network Functions	69
3.3.2.6	6.2 Top Bio Functions	71
3.3.2.6	6.3 Top Canonical Pathways	72
3.3.2.7	7Analyse mit "BioBase ExPlain"	72
3.3.2.7	7.1 Einfache Promotorenanalyse	73
3.3.2.7	7.2 Erweiterte Promotorenanalyse	75
3.3.2.7	7.3 Knotenpunktanalyse	76
3.3.2.7	7.4 Funktionelle Analyse	79
3.3.2.8	3Schwerpunkte der Analyse	80
3.3.2.8	3.1 Neutrophile Granulozyten	80
3.3.2.8	3.2 Natürliche Killerzellen	90
3.3.2.8	3.3 Kohlenhydratstoffwechsel	93
3.3.2.8	3.4 Нурохіе	96
3.3.2.9	9Hierarchische Cluster-Analyse mit dCHIP	
3.3.2.1	10 Biomarker der konnatalen Infektion	103
3.4	Validierung	104
4	Diskussion	
41	Studiendesign und klinische Daten	105
4 1 1	Studiendesign und Kimbolie Bater	105
4.1.1	Klinische Daten	107
4.0		400
4.2		108
4.2.1	Low-Level-Analyse	108
4.2.2	High-Level-Analyse	108
4.2.2.	I Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene	108
4.2.2.2	Zidentifizierung überrepräsentierter biologischer Gruppen	108
4.2.2.3	Analyse mit Ingenuity Dethysic Analysis"	
4.2.2.4	Analyse mit DieDeee Explain"	109
4.2.2.	DAridiyse IIII "DIUDdse EXPidiii	11U
4.2.2.0	Duaistellung der wichtigsten beelnitächtigten Funktionsbereiche	110
4.2.2.0	2. Netürliehe Killerzellen	110
4.2.2.0	0.2 Naturiilline Milerzeiten	
4.2.2.6	b.o noniennyaraisionwechsel	

4.2.2.6	6.4 Hypoxie	115
4.2.2.7	7Hierarchische Cluster-Analyse mit dCHIP	116
4.2.2.8	8Potentielle Biomarker der konnatalen Infektion	116
4.2.3	Validierung	118
5	Fazit	119
Litera	turverzeichnis	120
Erklär	rung	142
Danks	sagung	143
Apper	ndix	145

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Haupttodesursachen in Kindern unter 5 Jahren und in Neugeborenen.

	Seite 16
Abbildung 2: Bestandteile der angeborenen Immunabwehr.	Seite 19
Abbildung 3: DAVID. Oberfläche des Functional Annotation Chart.	Seite 38
Abbildung 4: Zahl der Gene mit einem Fold Change > x.	Seite 49
Abbildung 5: Zahl der Gene mit einem Fold Change < x.	Seite 49
Abbildung 6: Zahl der Gene mit einer False Discovery Rate < x.	Seite 50
Abbildung 7: Chromosomale Verteilung der signifikant differenziell regulierter	n Gene. Seite 51
Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der signifikant differenziell regulierten G die einzelnen Chromosomen.	Gene auf Seite 52
Abbildung 9: Prozentualer Anteil der signifikant differenziell regulierten Gene einzelnen Chromosomen.	e auf den Seite 53
Abbildung 10: Abschnitt mit einer höheren Regulationsdichte auf Chromosom	า 1.
	Seite 54
Abbildung 11: Die Kategorie "GO Biological Process" mit einer Auswahl ül sentierter Child Terms (Thresholds: Count $\geq$ 12, EASE Score $\leq$ 0,01).	berreprä- Seite 56
Abbildung 12: Pathway Explorer: Benutzer-Oberfläche.	Seite 61
Abbildung 13: BioCarta Pathway: "Glykolyse".	Seite 66
Abbildung 14: BioCarta Bathway: "Selektive Expression von Chemokin-Re während der T Zell-Polarisation".	zeptoren Seite 68
Abbildung 15: Ingenuity Pathways Analysis: Associated Network Functions: Netzwerke mit der größten Zahl signifikant differenziell regulierter Gene.	: die fünf Seite 69
Abbildung 16: Ingenuity Pathways Analysis: Associated Network Functions: pression", "Zell-Zell-Signaling" und "Entwicklung und Funktion des hämatol	"Genex- ogischen
	Seite 70

Abbildung 18: Die fünf Pathways mit den niedrigsten p-Werten. Seite 72

Abbildung 19: Das Promotoren-Modell mit der höchsten Fitness-Score. Seite 76 Abbildung 20: Graphische Darstellung des von dem Knotenpunkt MEKK1 ausgehen-

Abbildung 21: Ein neutrophiler Granulozyt mit verschiedenen antimikrobiellen Molekülen und ihren jeweiligen Ursprungskompartimenten <sup>1</sup>. Seite 81

Abbildung 22: Verbindung der von MEKK1 und RAD23A ausgehenden Netzwerke. Seite 86

Abbildung 23: Verschiedene signifikant differenziell regulierte Gene und die ihnen übergeordneten biologischen Prozesse "Respiratory Burst", "Migration von Neutrophilen", "Chemotaxis von Monozyten", "Aktivierung von Makrophagen", "Antibakterielle Antwort des Organismus". Seite 89

Abbildung 24: Verschiedene signifikant differenziell regulierte Gene und die ihnen übergeordneten biologischen Prozesse "Erkennung durch natürliche Killerzellen", "Aktivierung natürlicher Killerzellen", "Chemotaxis von natürlichen Killerzellen".

Seite 92

Abbildung 25: vgl. Abbildung 13.

den Netzwerks.

Abbildung 26: Die Verbindung zwischen HIF1A und einer Mehrexpression von Ge-nen, die mit Kohlenhydratstoffwechsel / Glykolyse assoziiert sind.Seite 99

Abbildung 27: Die Verbindung zwischen der Entzündungsantwort des Organismusund einer Funktionsstörung der Respiration.Seite 100

Abbildung 28: Das Ergebnis der hierarchischen Cluster-Analyse. Seite 102

Abbildung 29: Expression dreier potentieller Biomarker in den zwei Patientengruppen. Seite 103

Abbildung 30: Validierung. Korrelation der Werte von 25 ausgewählten Genen.

Seite 104

Seite 78

Seite 94

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Perinataldaten der verbliebenen 24 Patienten.	Seite 46
Tabelle 2: DAVID: Functional Annotation Chart.	Seite 54
Tabelle 3: DAVID: Die am stärksten überrepräsentierte Kategorie "Abwehrar	ntwort". Seite 57
Tabelle 4: DAVID: die am zweitstärksten überrepräsentierte Kategorie "Ar Stimulus".	twort auf Seite 59
Tabelle 5: Pathway Explorer: Ein Ausschnitt der Rangliste.	Seite 62
Tabelle 6: Pathway Explorer: Ein Ausschnitt der Rangliste.	Seite 63
Tabelle 7: Die zehn am stärksten überrepräsentierten Matrices (Ja/Nein-Rat	io).
	Seite 73
Tabelle 8: Die von ExPlain als bedeutsam vorhergesagten Transkriptionsfak	toren, die
sich durch eine signifikant differenzielle Expression auszeichnen.	Seite 74
Tabelle 9: Die 15 Knotenpunkte mit einer Score > 2.5.	Seite 77
Tabelle 10: Die Top Ten der am stärksten überrepräsentierten Gruppen.	Seite 79

# Abkürzungsverzeichnis

ACCN	Accession Number
ANCS	Antenatale Kortikosteroide
APC	Antigen präsentierende Zelle
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cr	Chrom
CRIB	Critical Risk Index for Babies
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
dCHIP	DNA-Chip Analyzer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASE	Expression Analysis Systemic Explorer
EOI	Early-Onset Infection, Konnatale Infektion
EONS	Early-Onset Neonatal Sepsis,
	Konnatale Sepsis des Neugeborenen
FDR	False-Discovery-Rate
FiO <sub>2</sub>	Fraction of Inspired Oxygen
GA	Gestationsalter
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GO	Gene Ontology

HIV1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
ICH	Intracerebral Hemorrhage, Intrazerebrale Blutung
IFN γ	Interferon gamma
IFNGR2	Interferon γ Rezeptor 2
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
IPA	Ingenuity Pathways Analysis
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
IVT	In vitro Transkription
KG	Körpergewicht
KNN	k-nächster Nachbar
LONS	Late-Onset Neonatal Sepsis,
	Nosokomiale Sepsis des Neugeborenen
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MHC	Major histocompatibility complex
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
mM	Millimol
pCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> -Partialdruck
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCT	Procalcitonin
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus
PPROM	Früher vorzeitiger Blasensprung
PROM	Vorzeitiger Blasensprung
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RDS	Respiratory Distress Syndrome, Atemnotsyndrom
RNA	Ribonukleinsäure

ROP	Retinopathy of Prematurity, Frühgeborenenretinopathie
SAM	Signifikanz-Analyse von Microarrays
SaO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SKNN	sequentieller k-nächster Nachbar
SNAP	Score for neonatal acute physiology
SSW	Schwangerschaftswoche

# 1 Einleitung

# 1.1 Definition der neonatalen Sepsis

In den Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft wird die Sepsis des Erwachsenen als eine "komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion" beschrieben, die "über eine Kombination von Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen definiert wird" <sup>1</sup>.

Im Neugeborenen stellt die Sepsis eine ebenso schwere Bedrohung dar. Anders als beim Erwachsenen gelingt hier jedoch seltener der Nachweis von Erregern in der Blutkultur. Da auch die Definition der neonatalen Sepsis eine positive Blutkultur voraussetzt, wird ihre Prävalenz unterschätzt <sup>2, 3</sup>.

# 1.2 Epidemiologie der neonatalen Sepsis

Nach einer im Jahr 2005 veröffentlichten Schätzung der WHO ist die neonatale Sepsis zusammen mit der Pneumonie für 26% aller Todesfälle in Neugeborenen verantwortlich und zählt damit weltweit zu den häufigsten Todesursachen in diesem Kollektiv <sup>4</sup>.



Abbildung 1: Haupttodesursachen in Kindern unter 5 Jahren und in Neugeborenen<sup>4</sup>. Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Jahre 2000 bis 2003. 37% der Kinder sterben noch als Neugeborene ("Neonatal"), 26% von ihnen an einer Sepsis oder einer Pneumonie ("Sepsis or pneumonia").

Besonders stark betroffen sind Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm. Obwohl nur in ein bis acht von 1000 Fällen eine durch eine positive Blutkultur nachgewiesene neonatale Sepsis vorliegt, wird die Inzidenz der durch klinische und laborchemische Parameter diagnostizierten konnatalen Infektion in diesem Kollektiv auf annähernd 50 Prozent geschätzt<sup>2</sup>. Ursache für diese große Diskrepanz sind die besonderen Hindernisse in der Diagnostik der neonatalen Sepsis. Aufgrund präpartaler antibiotischer Therapien der Mutter und kleiner Probenmengen kommen viele Blutkulturen zu einem falsch negativen Ergebnis<sup>2, 3</sup>. Die Mortalität der neonatalen Sepsis liegt je nach Publikation zwischen 2% und 50%<sup>2, 5 - 7</sup> und nimmt mit abnehmendem Gestationsalter zu<sup>5</sup>.

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Versorgung von Früh- und Neugeborenen ist die Inzidenz der konnatalen Sepsis in den vergangenen Jahren konstant geblieben. Im selben Zeitraum konnte jedoch eine Verschiebung des Erregerspektrums beobachtet werden. Während in früheren Jahrzehnten grampositive Erreger als Hauptauslöser der neonatalen Sepsis galten, lassen sich heute zunehmend häufiger gramnegative Keime in der Blutkultur nachweisen. Dieser Trend, der auf den verstärkten Einsatz peripartal verabreichter Antibiotika zurückzuführen ist, wird sich in den nächsten Jahren Vermutlich weiter fortsetzen <sup>5, 8, 9</sup>.

# 1.3 Klassifikation der neonatalen Sepsis

Während für Kinder und Erwachsene ein international gebräuchliches Klassifikationsschema vorliegt <sup>10</sup>, das eine Einteilung der Sepsis in die verschiedenen Stadien SIRS, Sepsis, Schwere Sepsis und Septischer Schock ermöglicht, fehlt für die Diagnose der neonatalen Sepsis ein vergleichbares, allgemein anerkanntes Schema <sup>11, 12</sup>.

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihres Auftretens wird zwischen einer frühen und einer späten Form der neonatalen Sepsis unterschieden, der konnatalen oder Early-Onset Neonatal Sepsis (EONS) und der nosokomialen oder Late-Onset Neonatal Sepsis (LONS). In den zahlreichen Fällen, in denen trotz des begründeten klinischen Verdachts einer Sepsis keine positive Blutkultur vorliegt, wird analog hierzu zwischen konnataler und nosokomialer Infektion des Neugeborenen differenziert.

#### 1.3.1 Die konnatale Infektion des Neugeborenen

Die konnatale Infektion des Neugeborenen (Early-onset infection: EOI) tritt innerhalb der ersten 72 Stunden nach Geburt auf. Von der nosokomialen Infektion unterscheidet sie sich außerdem durch die ihr zugrunde liegende Ätiologie und das für sie charakteristische Erregerspektrum.

Hauptursache der konnatalen Infektion ist eine vertikale Infektion durch vaginal aszendierende Keime der mütterlichen Genitalflora, die in das Fruchtwasser gelangen und so das ungeborene Kind infizieren. Begünstigt wird die konnatale Infektion des Neugeborenen durch eine bakterielle Vaginose der Mutter, die bei 15 – 20% aller Schwangerschaften beobachtet werden kann <sup>13 - 15</sup>. In ca. 1% aller Schwangerschaften kommt es im weiteren Verlauf zur Entwicklung einer Chorioamnionitis, meist durch aszendierende Keime der mütterlichen Vaginalflora. Die Infektion der Fruchthöhle kann über das Fruchtwasser auf das Ungeborene übergreifen und zur Frühgeburtlichkeit führen <sup>14</sup>. Tritt während der Schwangerschaft ein vorzeitiger Blasensprung auf, nimmt das Risiko einer Frühgeburt und einer Infektion des Neugeborenen weiter zu <sup>16</sup>.

Die Mehrzahl der Infektionen wird inzwischen durch gramnegative Keime hervorgerufen (60,7%), während grampositive Erreger in etwas mehr als einem Drittel der Fälle (36,9%) und Pilze nur selten (2,4%) bei den erkrankten Neugeborenen nachgewiesen werden <sup>8</sup>. In der erwähnten Studie war Escherichia Coli mit 44% der mit großem Abstand am häufigsten vertretene Erreger. Streptokokken der Gruppe B (10,7% aller Infektionen) spielten ebenso wie Koagulase-negative Staphylokokken (ebenfalls 10,7%) im Vergleich zu Escherichia Coli eine eher untergeordnete Rolle. Die Verschiebung des Keimspektrums in Richtung gramnegativer Erreger ist am ehesten auf den weit verbreiteten Einsatz der gegen B-Streptokoken gerichteten intrapartalen Antibiotikaprohylaxe zurückzuführen <sup>5</sup>.

# 1.4 Pathophysiologie der neonatalen Sepsis

Trotz zahlreicher Erkenntnisse über einzelne Mechanismen der neonatalen Immunabwehr und beteiligter Signaltransduktionswege bleiben größere Zusammenhänge zur Pathophysiologie in der neonatalen Sepsis bis zum heutigen Tag weitgehend ungeklärt. Hiedurch fehlt es an frühen Markern einer EOI bzw. EONS. Demzufolge kommt es im klinischen Alltag zu einer verspäteten Diagnosestellung und einer verspäteten zielgerichteten Therapie. Beides spiegelt sich in der hohen Morbidität und Mortalität wider.

## 1.4.1 Die besondere Rolle der angeborenen Immunität

Die angeborene Immunität spielt in der Pathophysiologie der konnatalen Infektion eine wesentliche Rolle. Dies erklärt sich dadurch, dass das Ungeborene unter physiologischen Bedingungen in utero steril heranwächst. Erst postpartal wird es einer Vielzahl von Antigenen ausgesetzt und es kommt zur Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses<sup>17, 18</sup>.

Wie die erworbene Immunabwehr besteht auch die angeborene Immunabwehr aus zwei Anteilen: den zellulären und den humoralen Komponenten.

# Bestandteile der angeborenen Immunabwehr

Humoraler Anteil



Abbildung 2: Bestandteile der angeborenen Immunabwehr.

Zellulärer Anteil

#### 1.4.1.1 Zelluläre Komponenten der angeborenen Immunabwehr

Zum zellulären Anteil der Immunabwehr zählen neben den neutrophilen Granulozyten Monozyten und Makrophagen. Sowohl Monozyten/Makrophagen als

auch neutrophile Granulozyten sind zur Phagozytose befähigt. Ihre Aufgabe besteht in der Erkennung, Bindung, Aufnahme und Abtötung eindringender Mikroorganismen. Als antigenpräsentierende Zellen tragen sie darüber hinaus wesentlich zur Aktivierung und Steuerung der erworbenen Immunität bei. Ebenfalls zur angeborenen Immunität gezählt werden die natürlichen Killerzellen. In den vergangenen Jahren wurde zunehmend deutlich, dass NK Zellen durch ihren Einfluss auf die Reifung und Selektion dendritischer Zellen zur Aktivierung und Modellierung einer gezielten Antwort der erworbenen Immunität beitragen <sup>19, 20</sup>.

## 1.4.1.2 Humorale Komponenten der angeborenen Immunabwehr

Zu den Komponenten der humoralen Immunabwehr des Neugeborenen zählen neben Defensinen und Komplementfaktoren spezifische Antikörper der Mutter, die den Föten über einen diaplazentaren Transfer erreichen.

Während über die Rolle von Defensinen im Rahmen der neonatalen Abwehr relativ wenig bekannt ist <sup>17</sup>, konnte nachgewiesen werden, dass selbst Frühgeborene mit schweren bakteriellen Infektionen in der Lage sind, C3a-Konzentrationen zu erreichen, die mit denen Erwachsener vergleichbar sind <sup>21, 22</sup>. Hingegen fehlt Frühgeborene, die vor dem dritten Trimenon der Schwangerschaft zur Welt kommen, der natürliche "Nestschutz" durch die maternalen Antikörper <sup>17, 23</sup>.

#### 1.4.2 Die Rolle der erworbenen Immunität

Im Gegensatz zur angeborenen scheint die erworbene Immunität nur eine untergeordnete Rolle in der Pathophysiologie der systemischen Infektion von Früh- und Neugeborenen zu spielen. Kernkompetenz der erworbenen Immunität ist die gezielte Eliminierung spezifischer Pathogene. Voraussetzung hierfür ist eine vorangegangene Stimulation durch entsprechende Antigene. Die Reifung von Lymphozyten, den Repräsentanten der adaptiven Immunität, ist deshalb eng verbunden mit extrauterinem Leben <sup>17, 24</sup>. Die nach Geburt zahlenmäßig massiv ansteigenden Lymphozyten sind in ihrer Funktionalität daher noch stark eingeschränkt <sup>25 - 27</sup>. Die supprimierte Zytotoxizität der noch unerfahrenen neonatalen T-Zellen führt zu einer Beeinträchtigung des zellulären Anteils der adaptiven Immunantwort, während die geringe Zahl von Gedächtnis-B-Zellen und der zumeist noch ausstehende Klassen-Switch hin zu IgG und IgA eine Beeinträchtigung des humoralen Anteils der adaptiven Immunantwort zur Folge haben <sup>24</sup>.

#### 1.4.3 Zusammenfassende Darstellung der Pathophysiologie

Bei der systemischen Infektion des Neugeborenen kommt es insbesondere bei Frühgeborenen, die über keine oder nur geringe Mengen mütterlicher Antikörper verfügen, zu einer unzureichenden Opsonierung bakterieller Antigenstrukturen. Zudem führt die sowohl qualitative als auch quantitative Beeinträchtigung der neonatalen Neutrophilen zwar zu einer raschen Erschöpfung der Granulozytenreserve, jedoch nicht zu einer erfolgreichen Elimination des Erregers. Die in ihrer immunologischen Kompetenz kaum oder nur in geringem Maße eingeschränkten Monozyten und Makwährenddessen zu einer maximalen rophagen führen Aktivierung der inflammatorischen Antwort, die sich klinisch als Sepsis manifestiert <sup>17, 28</sup>. Folge der Dysregulation der wirtseigenen Abwehrreaktion ist eine überschießende inflammatorische Immunantwort, die sich in einer massiven Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, einem so genannten Zytokinsturm, äußert. TNF, Interleukin 1 (IL1), IL2, IL6, IL8 und Interferon Gamma (IFNγ) zählen zu den prominentesten und am besten untersuchten Vertretern: in nahezu allen klinischen Studien finden sich massiv erhöhte Spiegel der genannten Zytokine im Plasma infizierter Neugeborener<sup>17, 28</sup>. Eine 2011 von Leviton et al. publizierte Studie zeigt außerdem, dass Frühgeborene mit einem geringeren Gestationsalter generell höhere Spiegel inflammatorischer Proteine aufweisen als Frühgeborene mit einem höheren Gestationsalter<sup>29</sup>. Demnach reagieren gerade unreife Neugeborene mit einer überschießenden systemischen Immunantwort auf bakterielle Infektionen <sup>30</sup>. Durch die systemische Freisetzung von Zytokinen kommt es über eine Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionswege zu einer allgemeinen Permeabilitätserhöhung und Weitstellung der Gefäße bei gleichzeitiger Okklusion kleinster Gefäße. Dies kann im weiteren Verlauf zu Schock, Multiorganversagen und Tod führen <sup>17, 23, 31</sup>.

Obwohl aktuelle klinische und experimentelle Studien Einblicke in die Prozesse, die der konnatalen Infektion mit ihren Begleiterkrankungen vorausgehen, vermitteln<sup>29, 32</sup>, bleiben die für die Pathogenese relevanten Signaltransduktionswege und ihre Vernetzung bis heute noch weitgehend unverstanden. Dies äußert sich in den Limitationen der verfügbaren diagnostischen Marker ebenso wie im Fehlen zielgerichteter Therapieansätze.

# 1.5 Klinik, Diagnostik und Therapie bakterieller Infektionen des Neugeborenen

Klinik, Diagnostik und Therapie bakterieller Infektionen bei Neugeborenen werden in den Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin beschrieben <sup>31, 33</sup>.

# 1.5.1 Anamnese und Klinik bakterieller Infektionen des Neugeborenen

Anamnestische Hinweise auf ein Amnioninfektionssyndrom der Mutter (vorzeitiger Blasensprung, vorzeitige Wehen, Fieber unter der Geburt oder ein erhöhtes CRP der Mutter (>20 mg/L)) deuten auf eine Infektion des Neugeborenen hin <sup>33</sup>.

Die Diagnosestellung wird durch die geringe Spezifität der klinischen Symptome einer bakteriellen Infektion des Neugeborenen erschwert. Veränderungen des Hautkolorits (blass oder grün-ikterisch), Störungen der Atmung (Apnoe, Dyspnoe, Stöhnen) oder des Blutkreislaufs (Zentralisierung mit Mikrozirkulationsstörung, arterieller Hypotonie, Tachykardie) sind sensible aber nicht spezifische Zeichen einer Infektion, die schon allein im Rahmen der Frühgeburtlichkeit gehäuft auftreten <sup>33</sup>.

Die Hindernisse in der Diagnosestellung einer konnatalen Infektion des Neugeborenen anhand klinischer und laborchemischer Kriterien wurde in den vergangenen Jahren durch Hofer et al. wiederholt aufgezeigt <sup>30, 34</sup>.

# 1.5.2 Diagnostik bakterieller Infektionen des Neugeborenen

Zur Diagnosesicherung werden neben Laboruntersuchungen bakteriologische Untersuchungen der Mutter und des Neugeborenen, sowie Untersuchungen von Urin und Liquor empfohlen.

#### 1.5.2.1 Laboruntersuchungen

Um eine Entzündung nachzuweisen, werden zu Beginn der Symptomatik und 24 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome folgende Parameter bestimmt: Blutbild mit Differenzialblutbild, C-reaktives Protein und Interleukin 6 oder 8.

Mit Hilfe des Differentialblutbildes lässt sich unter anderem die I/T-Ratio bestimmen, der Quotient aus der Zahl der unreifen und der Zahl aller neutrophilen Granulozyten. Liegt dieser > 0,25 spricht man von einer Linksverschiebung. Werte < 0,25 sprechen gegen eine Entzündung <sup>33</sup>. Die absolute Zahl neutrophiler Granulozyten variiert in

Abhängigkeit von Reifegrad und Geburtsgewicht des Neugeborenen und ermöglicht deshalb keine klare Unterscheidung zwischen infizierten und nicht infizierten Neugeborenen <sup>35</sup>. Das C-reaktive Protein hat aufgrund seines relativ späten Anstiegs zu Beginn einer Entzündung nur eine geringe Sensitivität. Interleukin 6 hingegen hat aufgrund seines raschen Anstiegs in den vergangenen Jahren für die Diagnostik akuter entzündlicher Erkrankungen an Bedeutung gewonnen <sup>36</sup>.

## 1.5.2.2 Bakteriologische Untersuchungen

Bereits vor der Geburt wird die Schwangere im Rahmen eines Screening-Programms oder aufgrund bestehender Risikofaktoren auf Streptokokken der Gruppe B untersucht. Beim Nachweis einer Besiedelung kann bereits intrapartal mit einer entsprechenden Chemoprophylaxe begonnen werden. Nach der Geburt wird dann, wenn möglich, ein Abstrich von der Plazenta vorgenommen. Liegt der Verdacht einer Infektion des Neugeborenen vor, wird eine erste Blutkultur aus Nabelschnurblut angelegt. Darüber hinaus können beidseitige, kurz nach der Geburt gewonnene Ohrabstriche Auskunft über die peripartale Besiedelung des Neugeborenen geben<sup>33</sup>.

#### 1.5.2.3 Urindiagnostik

Um eine Harnwegsinfektion als mögliche Ursache der beobachteten Symptome auszuschließen, werden die semiquantitative Urinzellzählung, die bakteriologische Kultur und der Nitrit-Nachweis als Teil der Teststreifenuntersuchung eingesetzt <sup>33</sup>.

#### 1.5.2.4 Liquordiagnostik

Zum Ausschluss einer Meningitis als Ursache der konnatalen Infektion ist eine Lumbalpunktion erforderlich. Der hierbei gewonnene Liquor wird dann einer Reihe unterschiedlicher Untersuchungen zugeführt (makroskopische Betrachtung, mikroskopische Zellzählung, Gramfärbung, Bestimmung von Albumin, Glukose- und Laktatspiegel, bakteriologische Kultur)<sup>33</sup>.

#### 1.5.3 Therapie bakterieller Infektionen des Neugeborenen

"Entscheidend für eine erfolgreiche Therapie ist der frühzeitige Beginn beim ersten klinischen Verdacht!" <sup>33</sup>. Das hat zur Folge, dass in der Mehrzahl der Fälle mit einer kalkulierten antibiotischen Therapie begonnen wird, noch bevor die Ergebnisse der Blutkultur vorliegen – und bevor klar ist, um welchen Erreger es sich handelt. Mit der kalkulierten antibiotischen Therapie sollten neben B-Streptokokken und Escherichia

coli auch Listerien und Enterokokken sowie für die entsprechende Klinik spezifische Keime abgedeckt werden. Hierdurch wird die Entwicklung resistenter Stämme begünstigt: Bis zu 40% der Escherichia coli zeigen mittlerweile Resistenzen gegenüber Ampicillin, 20% sind resistent gegenüber Mezlocillin oder Piperacillin. Auch die Aminoglykosid-Resistenzen nehmen zu <sup>37</sup>.

Neben der entsprechenden antibiotischen Therapie sind in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung weitere supportive Maßnahmen indiziert: Beatmung, Behandlung von Störungen des Säure-Basen-Haushalts oder Ausgleich von Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten.

1.5.3.1 Hindernisse in der Therapie bakterieller Infektionen des Neugeborenen Wesentliches Hindernis in der Therapie der bakteriellen Infektion des Neugeborenen stellt das unzureichende Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie dar, das sich in einer verzögerten Diagnosestellung, bedingt durch die unspezifische klinische Symptomatik und den Mangel an früh verfügbaren diagnostischen Markern, und einem Fehlen zielgerichteter Therapieansätze äußert.

Trotz ihres hohen negativ prädiktiven Wertes verfügt die I/T-Ratio über eine nicht ausreichende Spezifität. Das C-reaktive Protein hingegen ist zwar hoch spezifisch, steigt jedoch erst verspätet an. Obwohl die Kombination von CRP und IL6 oder IL8 für die frühzeitige Erkennung einer beginnenden Inflammation am besten geeignet zu sein scheint <sup>33</sup>, liefert auch sie nicht den Beweis, dass eine Infektion des Neugeborenen Auslöser der beobachteten Symptomatik ist. Die Blutkultur hingegen besitzt für die Diagnosesicherung einer bakteriellen Infektion des Neugeborenen aus mehreren Gründen eine nur geringe Aussagekraft: zum einen sind die entnommenen Blutvolumina häufig zu gering <sup>3</sup> und kontaminiert, zum anderen werden die Ergebnisse in vielen Fällen durch eine präpartale Antibiotikatherapie der Mutter beeinflusst <sup>38</sup>. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse der Kultur erst nach mehreren Tagen verfügbar sind.

# 1.6 Microarrays in der Erforschung konnataler Infektionen

Bevor es zu den klinisch oder laborchemisch fassbaren Veränderungen kommt, die zur Diagnose einer konnatalen Infektion führen, haben bereits zahlreiche Veränderungen in den verschiedenen Geweben und Zellen des Neugeborenen stattgefunden. Die Prozesse, die diesen Veränderungen vorausgehen, lassen sich mit Hilfe der Microarraytechnologie untersuchen.

Microarrays sind molekularbiologische Untersuchungssysteme, die eine simultane Analyse mehrerer tausend Einzelnachweise in einer geringen Menge biologischen Probenmaterials erlauben: bei den Arrays handelt es sich um Glasträger, auf deren Oberfläche DNA-Sonden fixiert sind. Die Sonden sind komplementär zu der im Probenmaterial enthaltenen mRNA. Damit die mRNA mit Hilfe des Microarrays analysiert werden kann, wird sie zunächst aus dem Probenmaterial isoliert und in komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben. Diese wird, nachdem sie mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurde, auf den Glasträger aufgebracht, wo sie an die auf dem Array fixierten komplementären DNA-Sonden bindet. Die Menge der gebundenen cRNA lässt sich dann über die Stärke der Fluoreszenz ermitteln. Auf diese Weise können mit Hilfe eines einzigen Arrays die Expressionswerte mehrerer tausend mRNA-Transkripte gleichzeitig gemessen werden.

Seit ihrer Entwicklung in den 90er Jahren sind Microarrays eingesetzt worden um Einblicke in die Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen zu gewinnen und potentielle Markerproteine zu identifizieren <sup>39 - 46</sup>.

Nachteile der Technologie sind das von Experiment zu Experiment variierende Fluoreszenzsignal und die geringe Übereinstimmung von Ergebnissen, die mit unterschiedlichen Plattformen gewonnen wurden <sup>47</sup>. Um die gewonnenen Ergebnisse dennoch interpretieren und vergleichen zu können, sind daher aufwendige bioinformatische Analysen erforderlich <sup>48</sup>. Darüber hinaus ist es erforderlich, die gewonnenen Ergebnisse mit Hilfe einer zweiten Methode, wie der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), zu validieren.

#### 1.6.1 **RT-PCRs**

Mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion kann die Expression spezifischer Gene in Zellen oder Zellverbänden untersucht werden: nachdem die in der Probe enthaltene mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) zunächst in komplementäre DNA umgeschrieben wurde, wird diese anschließend mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Die RT-PCR kann zum gezielten Nachweis einzelner mRNA-Transkripte eingesetzt werden und ist somit besonders geeignet für die Validierung von Microarays.

# 1.7 Blut als Untersuchungsmaterial

Blut bietet sich als Untersuchungsmaterial gleich aus mehreren Gründen an: es ist – im Allgemeinen – relativ leicht zugänglich. Darüber hinaus enthält Blut neben Erythrozyten eine große Zahl unterschiedlicher Leukozyten, die frühzeitig mit eindringenden Krankheitserregern in Kontakt treten – nahezu unabhängig davon, welches Organ primär betroffen ist (siehe hierzu auch 1.4 "Pathophysiologie der neonatalen Sepsis"). Eine resultierende Veränderung der Genexpression kann sich dadurch frühzeitig, z. B. im Blut erkrankter Kinder, nachweisen lassen.

Da Frühgeborene anders als erwachsene Patienten nur über ein sehr geringes Blutvolumen verfügen stellte die Verwendung von Blut als Material für die Untersuchung der Genexpression eine besondere Herausforderung dar.

# 1.8 Ziel dieser Arbeit

Die konnatale Infektion stellt bis heute eines der großen ungelösten Probleme in der perinatalen Medizin dar – trotz zahlreicher Fortschritte in der intensivmedizinischen Behandlung Früh- und Neugeborener. Die frühzeitige und adäquate Therapie wird durch das unzureichende Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie, das sich im Fehlen geeigneter diagnostischer Marker und zielgerichteter Therapieansätze äußert, wesentlich erschwert.

Die Microarraytechnologie ist ein leistungsfähiges Werkzeug, das eine zeitgleiche Untersuchung der Transkriptionslevel vieler Tausend Gene erlaubt. Für eine Analyse der spezifischen Genexpressionsmuster, die im Zusammenhang mit einer schweren Infektion des Neugeborenen auftreten, erscheint sie deshalb besonders geeignet.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem nicht hypothesengeleiteten Ansatz mit Hilfe der Microarraytechnologie die spezifische Genexpressionsantwort bei Frühgeborenen mit konnataler Infektion zum Zeitpunkt der Geburt zu identifizieren.

Eine Beschreibung der spezifischen Unterschiede auf Transkriptionsebene ermöglicht ein besseres Verständnis der Pathophysiologie und trägt zur Identifizierung früher Marker bei, die eine frühe Diagnosestellung ermöglichen könnten.

# 2 Patienten, Material und Methoden

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (Zeichen: 79/01; Sitzung am 24.09.2002) wurde die Studie in der Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Das methodische Vorgehen wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

# 2.1 Patientenkollektiv

# 2.1.1 Einschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden Frühgeborene mit einem Gestationsalter (GA) ≤ 32 Wochen, für die innerhalb von 24 Stunden nach der ersten vorläufigen Probennahme eine Einverständniserklärung der Eltern oder des gesetzlichen Vertreters vorlag.

# 2.1.2 Ausschlusskriterien

In die Studie nicht aufgenommen wurden Patienten, auf die mindestens eines der folgenden Kriterien zutraf:

- Pränatal oder postnatal diagnostizierte kongenitale Anomalien, die zu einer kardiopulmonalen Dysfunktion führen (z.B. hämodynamisch relevante Herzfehler, pulmonale Malformationen, congenitale Zwerchfellhernie).
- Ruptur der fetalen Membranen mit konsekutivem Oligo-/Anhydramnion, die früher als drei Wochen vor Geburt auftrat.
- Vorliegen eines schweren Stoffwechseldefektes, der eine Beeinträchtigung des Gesamtorganismus zur Folge hat.
- Behandlung der Mutter mit einem oder mehreren der folgenden Medikamente beziehungsweise Medikamentenklassen: Cytostatika, Immunsuppressiva (andere als zur Lungenreife eingesetzte).
- Eine postnatale Therapie des Patienten mit Dexamethason in einer Dosis von
   ≥ 1mg/kg KG f
  ür einen Zeitraum von ≥ 3 Tagen innerhalb der 1. bis 4. Lebenswoche.

#### 2.1.3 Zuordnung der Patienten

Die aufgenommenen Patienten wurden entsprechend ihrer Diagnose retrospektiv einer von zwei Gruppen zugeordnet:

Gruppe A) Patienten mit konnataler Infektion (EOI)

Gruppe B) Patienten ohne konnatale Infektion (non EOI)

Die Diagnose einer konnatalen Infektion wurde gestellt, wenn innerhalb der ersten 72 Lebensstunden eine pathologische IT-Ratio ( $\geq 0.2$ ) und / oder eine pathologische Leukozytenzahl (< 5 Giga/l oder > 25 Giga/l), zusammen mit oder gefolgt von einem CRP-Anstieg ( $\geq 6$  mg/l), vorlagen <sup>49-58</sup>.

Zusätzlich musste mindestens eines der folgenden klinischen Zeichen vorliegen:

Blässe; graues Hautkolorit; Mikrozirkulationsstörung mit einer Rekapillarisierungszeit > 3 Sekunden, die eine Therapie mit Volumen oder Katecholaminen erforderte; Dyspnoe oder Tachypnoe, die eine invasive oder nicht invasive Beatmung oder eine Sauerstoffgabe erforderte; thermale Instabilität, die sich nicht durch die Frühgeburtlichkeit erklären ließ; Hypo- oder Hyperglykämien ohne erkennbare Ursache; Probleme in der enteralen Nahrungsaufnahme; biliärer Reflux und Bauchdehnung; zunehmende Inzidenz von Apnoen oder Bradykardien; Lethargie; Irritabilität; erhöhter oder verminderter Muskeltonus<sup>2, 59</sup>.

Patienten, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden Gruppe B, der Gruppe der Patienten ohne konnatale Infektion, zugeordnet.

#### 2.1.4 Definition peri- und postpartaler Ereignisse

Der klinische Verlauf wurde umfassend überwacht und dokumentiert. An dieser Stelle folgt eine Liste mit Definitionen verschiedener peri- und postpartaler Ereignisse.

- Vollständige antenatale Kortikosteroidtherapie: 2 Dosen Betamethason; die erste nicht mehr als 7 Tage, die zweite nicht weniger als 24 Stunden vor Geburt appliziert.
- Vorzeitiger Blasensprung (PROM): Blasensprung mindestens 6 Stunden vor Geburt.
- Chorioamnionitis: Histologisch nachweisbare entzündliche Veränderungen des Chorions sowie Zeichen einer Infektion der Mutter.

- Intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR): Geburtsgewicht des Kindes unterhalb der 10. Perzentile.
- Atemnotsyndrom (RDS): Die Diagnose eines Atemnotsyndroms und die Einteilung seines Schweregrades erfolgte radiologisch wie von Couchard et al. beschrieben <sup>60</sup>.
- Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH): Die Diagnose einer intraventrikulären Hämorrhagie erfolgte sonographisch, die Einteilung in Grad I-IV entsprechend der Klassifikation nach Papile et al. <sup>61</sup>.
- Bronchopulmonale Dysplasie (BPD): Die Bronchopulmonale Dysplasie wurde als anhaltender Sauerstoffbedarf oder Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung zum Zeitpunkt der 36. postmenstruellen Woche definiert <sup>62</sup>.
- Frühgeborenenretinopathie (ROP): Die Diagnose einer Frühgeborenenretinopathie erfolgte entsprechend den Angaben des Committee for International Classification of Retinopathy of Prematurity <sup>63</sup>.
- Critical Risk Index for Babies (CRIB): Der Critical Risk Index for Babies wurde entsprechend den Angaben des International Neonatal Network berechnet <sup>64</sup>.
- Score for neonatal acute physiology (SNAP Score): Der Score for neonatal acute physiology wurde wie von Richardson et al. angegeben berechnet <sup>65</sup>.

# 2.2 Der Microarray

Die verwendeten CodeLink Uniset Human I Expression Bioarrays (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) enthalten 10458 Probesets inklusive Kontrollprobesets. Probesets entsprechen Oligonukleotiden, an die die mRNA eines Genes spezifisch bindet. Abzüglich der Kontrollprobesets gestattet der hier eingesetzte Microarray die simultane Bestimmung von bis zu 9945 Genen (=Probesets) in einer einzigen Reaktionskammer. Die Microarrays bestehen aus silanisiertem Glas und verfügen auf ihrer Oberfläche über einen Polymerfilm. Die in den Film eingelassenen aktivierten Ester dienen als Bindungsstellen für die 5'-Enden der jeweils 30 Basen langen Oligonukleotidproben (Probesets).

# 2.3 Probengewinnung, RNA-Aufbereitung und Hybridisierung der Arrays

### 2.3.1 Blutentnahme und Stabilisierung der gewonnenen RNA

Das benötigte Blut wurde bei Geburt durch Punktion der Arteria umbilicalis entnommen. 250 bis 300 µL wurden in ein PAXgene-Röhrchen (PreAnalytiX, Heidelberg, Deutschland) mit 750 µL RNA-Stabilisierungslösung überführt, zwischen 4 und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur Isolierung der RNA bei -80°C gelagert.

## 2.3.2 RNA: Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Die Isolierung der RNA aus Vollblut erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers PreAnalytiX. Die gewonnene RNA wurde zunächst über eine Messung mit NanoDrop (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA) quantifiziert. Unter Verwendung des Agilent Bioanalyzers (Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland) wurde ein Qualitätsprofil erstellt. Weiter verarbeitet wurden ausschließlich Proben mit einer RNA-Menge > 2  $\mu$ g, die ein regelrechtes Agilent-Profil aufwiesen und deren Wellenlängenratio bei 260/280 nm zwischen 1,8 und 2,1 lag.

#### 2.3.3 RNA: Umschreibung, Markierung und Reinigung

Die Umschreibung in markierte cRNA erfolgte mit mindestens 2 µg RNA und wurde entsprechend dem Protokoll "CodeLink Target Labeling and Array Hybridisation" mit dem "CodeLink Expression Assay Reagent Kit, Manual Prep" (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Die isolierte RNA wurde hierfür zunächst in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert, mit deren Hilfe in einem zweiten Schritt die markierte cRNA synthetisiert wurde <sup>66</sup>. Für die Markierung der cRNA diente Biotin-11-UTP (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, USA). Neben den 1,25 mM Biotin-11-UTP wurden weitere 3,75 mM unmarkiertes UTP sowie jeweils 5 mM GTP, ATP und CTP für die In vitro Transkription (IVT) verwendet. Die Mischung wurde für 14 Stunden bei 37°C inkubiert. Die so synthetisierte markierte cRNA wurde mit Hilfe des RNeasy mini kits (Qiagen) gereinigt.

#### 2.3.4 Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung der Arrays

30 µg cRNA wurden bei 94 °C für 20 Minuten in einem Fragmentierungspuffer, bestehend aus 40 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 100 mM KOAc und 31,5 mM MgOAc, fragmentiert <sup>67</sup>. Jeweils 10 µg der fragmentierten cRNA wurden auf einen CodeLink Uniset Human I Expression Bioarray gegeben. Die Triplikate wurden dann über Nacht bei 37 °C im Schüttler hybridisiert. Das Waschen, Färben und Scannen der Arrays erfolgte anschließend in entsprechenden Vorrichtungen nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Färbung wurde Cy5-Streptavidin (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet, für das Scannen der Arrays der GenePix 4000 B Scanner (Axon Instruments) eingesetzt. Die entstandenen Array-Abbildungen wurden als TIFF-Images gespeichert und der weiteren Analyse zugeführt.

# 2.4 Analyse der gewonnenen Daten

Der Prozess der Datenanalyse lässt sich in zwei wesentliche voneinander abgrenzbare Schritte einteilen, die Low-Level und die High-Level Analyse.

### 2.4.1 Low-Level Analyse

Zur Low-Level Analyse zählen Präprozessierung, Hintergrundevaluation und Normalisierung. Sie dient der Erkennung und Entfernung systemischer und technischer Variation und ist Voraussetzung für einen direkten Vergleich der Microarrays. Abgeschlossen ist die Low-Level Analyse, wenn die normalisierten Intensitäten in einen Expressionswert pro Gen umgewandelt wurden.

# 2.4.1.1 Quantifizierung der Signale

Für die Quantifizierung der Signale der CodeLink Bioarrays wurde die CodeLink Expression Software 1.21 den Anweisungen im Benutzerhandbuch entsprechend verwendet. Der Prozess der Bildsegmentierung und Quantifizierung ist im ImaGene 5.5 Benutzerhandbuch zusammengefasst.

Die CodeLink Expression Software dient der Analyse von Microarraybildern. Sie basiert auf dem ImaGene Batch Automation Package der Firma BioDiscovery (BioDiscovery, Marina del Rey, CA, USA) und wurde für CodeLink Bioarrays optimiert. Die Software berechnet die relativen Expressionsniveaus innerhalb eines Microarrayscans und liefert quantifizierte Expressionswerte; darüber hinaus ermöglicht sie eine Qualitätskontrolle der gewonnenen Daten. Die gewonnenen Ergebnisse werden in Form einer Textdatei gespeichert und können mit anderen Datenanalyse-Programmen weiter analysiert werden.

Die CodeLink Expression Software 1.21 erstellte sowohl ein Hintergrund-korrigiertes Original als auch einen Median-zentrierten intra-slide normalisierten Datensatz, der für die weitere Analyse verwendet wurde. Die Software berechnete zudem für jeden Array automatisch Schwellenwerte (Thresholds) für intra-slide normalisierte Intensitäten. Es handelt sich hierbei um einen globalen Wert, der für jedes Array einzeln berechnet wird. Der Threshold gibt Auskunft über das Maß unspezifisch gebundener cRNA und ermöglicht auf diese Weise eine Einschätzung, ob ein Expressionswert tatsächlich Ausdruck einer spezifischen Bindung von cRNA ist. Darüber hinaus kennzeichnete die Software jeden Gen-Wert als GOOD, EMPTY, POOR, NEG oder MSR und definierte auf diese Weise unterschiedliche Maße an Qualität, die im Benutzerhandbuch näher beschrieben sind. Nur Expressionswerte, die mit GOOD oder EMPTY gekennzeichnet wurden, gingen in die weitere Analyse mit ein.

Die Arrays der in zwei Gruppen eingeteilten Patienten (siehe: 2.1.3 "Zuordnung der Patienten") bildeten zusammen den ersten Datensatz (Datensatz 1).

#### 2.4.1.2 Ausschluss einzelner Gene

Die Daten der Arrays wurden auf fehlende Werte kontrolliert. Gene, für die innerhalb einer der beiden Gruppen (Konnatale Infektion/Keine konnatale Infektion) weniger als 50% der Werte vorlagen, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Gene, die in keiner der beiden Gruppen in mindestens 50% der Arrays über dem Threshold lagen, wurden ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Ermittlung fehlender Werte und der Vergleich von Expressionswerten mit dem Arrayspezifischen Threshold sowie der Ausschluss der entsprechenden Gene nach den genannten Kriterien erfolgte mit den Modulen eins und zwei einer von Jens Adelhelm entwickelten Software. Das Ergebnis dieser beiden Schritte bildete einen gefilterten zweiten Datensatz (Datensatz 2).

#### 2.4.1.3 Imputierung fehlender Werte

Die verbliebenen fehlenden Werte in Datensatz 2 wurden mit Hilfe von SKNN imputiert (sequentieller k-nächster Nachbar; SKNN mit k = 5). Der so vervollständigte Datensatz ging in die weitere Analyse ein.

SKNN <sup>68</sup> ist eine Cluster-basierte Imputationsmethode, die entwickelt wurde, um fehlende Werte in DNA-Microarray-Datensätzen einzufügen. Hierbei wird für einen fehlenden Wert jeweils der gewichtete Mittelwert der k nächsten Nachbargene (KNN; knächster Nachbar) <sup>69</sup> eingefügt. Vor der Imputierung werden die Gene mit fehlenden Werten anhand ihrer Ausfallrate geordnet. Die Imputierung der fehlenden Werte geschieht dann sequentiell; sie startet bei den Genen, die die geringste Ausfall-Rate aufweisen. Nach der Imputierung werden diese Gene dann für die Schätzung weiterer fehlender Werte verwendet.

## 2.4.1.4 Identifikation und Elimination von technischen Ausreißern

Um technisch bedingte Ausreißer einzelner Gene innerhalb einer Gruppe zu erkennen und zu eliminieren, wurden alle Expressionswerte, die mehr als 3 Standardabweichungen (SD) oberhalb oder unterhalb des Medians lagen, in Datensatz 2 gelöscht. Hiervon ausgenommen wurden solche Expressionswerte, die in mehr als 50% der technischen Replikate eines Patienten mehr als 3 Standardabweichungen jeweils oberhalb oder unterhalb des Medians lagen. In solchen Fällen wurde aufgrund der Konsistenz der Werte von einer biologischen Besonderheit ausgegangen. Die Identifikation und Elimination technischer Ausreißer erfolgte mit Modul 3 der von Jens Adelhelm entwickelten Software (siehe 2.4.1.2 "Ausschluss einzelner Gene").

#### 2.4.1.5 Erneute Imputierung fehlender Werte

Nach der beschriebenen Elimination technischer Ausreißer in Datensatz 2 wurden alle nun fehlenden Werte in Datensatz 2 mit Hilfe von SKNN geschätzt und eingefügt.

#### 2.4.1.6 Identifikation und Elimination von Ausreißerarrays

Mit Hilfe des Microarray Outlier Filter Moduls von AVADIS Pride (Strand Genomics, Redwood City, CA, USA) wurden nun Ausreißerarrays innerhalb des Datensatzes identifiziert. Hiermit sind Arrays gemeint, die sich insbesondere in der Expression so genannter Housekeeping Gene von anderen Arrays innerhalb des Datensatzes unterscheiden. Für die Identifikation der Ausreißerarrays wurde zum einen die Korrelation jedes einzelnen Arrays mit der Gesamtheit aller Arrays verglichen, zum anderen der prozentuale Anteil an Ausreißerwerten eines Arrays mit dem prozentualen Anteil an Ausreißerwerten aller anderen Arrays. Außerdem wurde eine Korrelationsmatrize errechnet, die eine visuelle Darstellung der Korrelation eines jeden Arrays mit jedem anderen Array ermöglicht. AVADIS Pride ist ein weit verbreitetes Bioinformatik-Tool, das für das DataMining und die visuelle Darstellung von Microarraygenexpressionsdaten eingesetzt wird. Den Angaben des Herstellers zu Folge kombiniert es skalierbare analytische Algorithmen mit einer leistungsfähigen und interaktiven Visualisierung und ermöglicht so Einblicke in die zu analysierenden Daten.

Für die Identifikation von Ausreißerarrays ebenfalls verwendet wurden MvA Plots. M versus A Plots (MvA Plots) dienen der Visualisierung des Bindungsverhalten eines einzelnen Arrays im Vergleich zum mittleren Bindungsverhalten aller Arrays; sie stellen eine Abwandlung des Bland-and-Altman-Plots dar <sup>70, 71</sup>. Auf der Abszisse wird der Mittelwert (A), auf der Ordinate die Differenz (M) der logarithmierten Expressionswerte der zu vergleichenden Arrays aufgetragen <sup>72</sup>. Sind die Intensitäten des untersuchten Arrays mit den mittleren Intensitäten aller Arrays vergleichbar, bewegen sich die Abweichungen gleichmäßig um y = 0. Liegen nicht biologisch bedingte Abweichungen vor, verändert sich die geplottete Punktwolke und nimmt beispielsweise die Form einer Trompete oder die einer Banane an. Abweichungen können entweder durch die Herstellung des Arrays oder durch die Durchführung des Experimentes verursacht werden.

# 2.4.1.7 Entfernung der Ausreißerarrays

Die Ausreißer-Arrays wurden aus Datensatz 1 entfernt (siehe 2.4.1.1 "Quantifizierung der Signale").

#### 2.4.1.8 Wiederholung der bisherigen Analyseschritte

Nach Entfernung der Ausreißer-Arrays wurden die in 2.4.1.2 bis 2.4.1.5 genannten Analyseschritte mit den verbliebenen Patienten und den zugehörigen Arrays wiederholt. Das Ergebnis bildete Datensatz 2<sup>c</sup>.

#### 2.4.1.9 Quantile-Normalisierung des Datensatzes

Datensatz 2' wurde daraufhin mit Hilfe der Quantile-Normalisierung in R normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Das Ergebnis bildete Datensatz 3.

Ziel der Quantile-Normalisierung <sup>73</sup> ist es, die Verteilung der Probenintensitäten aller Arrays eines Arraysets einander anzugleichen. Informationen aller Arrays werden mit einbezogen, um die Normalisierungsrelation zu bilden. Hintergrund der Methode ist der Gedanke, dass ein Quantile-Quantile-Plot zeigt, dass die Verteilung von zwei Datenvektoren *gleich* ist, wenn der Plot eine gerade, diagonal verlaufende Linie ist und *ungleich*, wenn der Plot keine diagonal verlaufende Linie ist.

## 2.4.1.10 Errechnung von Mittelwerten

Für Datensatz 3 wurden mit Hilfe von dChip<sup>74</sup> Mittelwerte für alle technischen Replikate eines Patienten errechnet. Das Ergebnis dieser Berechnungen bildete Datensatz 4.

DNA-Chip Analyzer (dChip) ist ein kostenloses Softwarepaket, das für die Analyse von Genexpressionsmicroarrays und SNP-Microarrays entwickelt wurde <sup>75</sup>. Es dient der Darstellung und Normalisierung gewonnener Daten und beinhaltet darüber hinaus eine Reihe weiterer Funktionen, wie zum Beispiel das hierarchische Clustering.

## 2.4.2 High-Level Analyse

Die High-Level Analyse beschäftigt sich mit der Identifizierung differenziell regulierter Gene sowie Genexpressionsmuster verschiedener funktioneller Gruppen. Sie beinhaltet neben der Annotation und funktionellen Kategorisierung von Genen die Clusteranalyse und die Visualisierung der Daten und dient unter anderem der Entwicklung von Vorhersagemodellen für prognostische Analysen.

# 2.4.2.1 Errechnung von Rangprodukten

Für Datensatz 4 wurden nun mit Hilfe von Rank Products (RP) <sup>76</sup> ein Fold Change (FC) und eine False Discovery Rate (FDR) berechnet.

Die RP-Technik ist eine einfache und zuverlässige statistische Methode, die mit dem Ziel entwickelt wurde, differenziell exprimierte Gene in replizierten Microarrayexperimenten zu identifizieren. Sie übertrifft moderne t-Test-basierte Methoden wie die von Tusher et. al. beschriebene SAM (Signifikanz-Analyse von Microarrays)<sup>77</sup> insbesondere bei solchen Experimenten, bei denen nur eine geringe Zahl technischer Replikate verfügbar ist.

Der FC gibt Auskunft darüber, um das Wievielfache der jeweilige Expressionswert von dem Expressionswert der Referenzgruppe abweicht. Die False Discovery Rate (FDR) ist eine 1995 von Benjamini und Hochberg <sup>78</sup> erstmalig beschriebene statistische Methode, die gerade bei Tests mit einer hohen Zahl simultan zu prüfender Hypothesen, wie Microarrayexperimenten, zum Einsatz kommt. Sie stellt den erwarteten Anteil fälschlicherweise verworfener Null-Hypothesen dar (Fehler 1. Art):

FDR = E[V/R]

V: Verworfene wahre Null-Hypothesen; R: Summe aller verworfenen Nullhypothesen.

### 2.4.2.2 Annotierung der signifikant differenziell regulierten Gene

Signifikant differenziell exprimierte Gene wurden mit dem Web-basierten Annotierungs-Tool SOURCE Stanford <sup>79</sup> annotiert.

SOURCE Stanford ist eine Web-basierte Datenbank, die entwickelt wurde, um eine einfachere und effizientere Analyse genomweiter Datensätze zu ermöglichen. Hierfür werden Informationen unterschiedlicher Quellen zusammengeführt. Die verschiedenen Berichte enthalten deshalb neben Parallelbezeichnungen des jeweiligen Gens und Beschreibungen seiner Funktion und chromosomalen Lokation auch GeneOntology-Annotationen sowie Links zu externen Datenbanken.

## 2.4.2.3 Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene

Mit Hilfe von STRIPE wurde die chromosomale Verteilung der signifikant differenziell regulierten Gene dargestellt.

STRIPE ist eine kostenlos verfügbare Software, die mit dem Ziel entwickelt wurde, die Integration, Visualisierung und Exploration von Datensätzen zu unterstützen, die das gesamte eukaryote Genom umfassen <sup>80</sup>. Es ermöglicht unter anderem eine visuelle Darstellung der chromosomalen Verteilung der zu analysierenden Gene.

# 2.4.2.4 Identifizierung überrepräsentierter biologischer Gruppen

Mit Hilfe des Functional Annotation Chart von DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)<sup>81</sup> wurden die signifikant differenziell regulierten Gene unterschiedlichen biologischen Kategorien zugeordnet und eine Tabelle von in der Genliste überrepräsentierten biologischen Prozessen erstellt. Das jeweilige Maß der Überrepräsentation wird hierbei durch die so genannte EASE-Score ausgedrückt, die jedem Thema zugeordnet wird. Die EASE-Score stellt eine Modifikation des p-Werts aus dem Exakten Test nach Fisher dar. Je kleiner, desto signifikanter ist sie. Die Themen mit den kleinsten EASE Scores sind die am stärksten überrepräsentierten. Bei den genannten Themen / Kategorien handelt es sich im Wesentlichen um Gene Ontology (GO) Terms Terms<sup>82</sup>. Neuere Versionen von DAVID beziehen zudem eine Reihe weiterer Annotationskategorien mit ein.
#### 2.4.2.4.1 DAVID

DAVID ist ein kostenloses und frei zugängliches Online-Tool des National Institute of Allergy and Infectious Diseases, das entwickelt wurde, um die Interpretation von Datensätzen zu vereinfachen, die durch den Einsatz moderner Hochdurchsatz-Technologien in der funktionellen Genomik gewonnenen wurden. Es setzt sich aus vier Hauptmodulen zusammen: dem Annotation Tool, GoCharts, KeggCharts und DomainCharts. Das Annotation Tool dient der automatischen funktionellen Annotierung von Genlisten. Go Charts stellt die Verteilung der signifikant differenziell regulierten Gene in funktionelle Kategorien graphisch dar und verwendet hierfür das Vokabular des Gene Ontology (GO) Konsortiums. KeggCharts stellt die Verteilung differenziell regulierter Gene in KEGG Pathways graphisch dar. DomainCharts zeigt die Verteilung differenzielle regulierter Gene in PFAM Protein Domänen<sup>83</sup> an.

#### 2.4.2.4.1.1 Functional Annotation Chart

Das Functional Annotation Chart bildet zusammen mit dem Functional Annotation Clustering und dem Functional Annotation Table das Functional Annotation Tool. Es ordnet die signifikant differenziell regulierten Gene unterschiedlichen biologischen Kategorien zu und errechnet automatisch eine Tabelle überrepräsentierter Prozesse.

🕘 DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics (L., 💷 🔳 💌									
<u>D</u> atei <u>B</u>	earbeiten <u>A</u> nsicht <u>C</u> hroni	k <u>L</u> esezeichen E <u>x</u> tras <u>H</u> ilfe							
	🗩 C 🗙 🏠 🤇	M http://david.abcc.ncifcrf.gov/char	tReport.jsp	)	☆ •	G• Google	2	۶	
DAVID Bioinformatics Resources 2008 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH									
Functional Annotation Chart       Help and Manual         Current Gene List: Uploaded List_1       Current Background: Uploaded Population_1         197 DAVID IDs       Options         Options       Thresholds: Count 12									
Thresh	Thresholds:     Count     12     EASE     0.01       Display:     Fold Enrichment     Bonferroni     Ø Benjamini     FDR     # of Records     1000								
Rerun Using Options Create Sublist Line State Sublist Create Sublist									
Sublist	Category	¢ Term	RT	Genes <u>Co</u>	<u>ount</u> \$ <u>%</u>	P-Value	Benjamini (		
	GOTERM_BP_ALL	detense response		29	14,/	2,9E-10	1,3E-6		
	GOTERM_BP_ALL	<u>response to stimulus</u>			29,9	1,/E-/	3,6E-4		
	SOTERM BD ALL	Direct protein sequencing			10.7	9,05-7	9.45-9		
	GOTERM_BP_ALL	inflammatory response		16	2.1	2,45-0	2.15-2		
	GOTERM BP ALL	response to external stimulus	RT =	10	11.7	2.3E-5	1.9E-2		
	GOTERM BP ALL	immune response	RT	23	11.2	8,2E-5	5,7E-2		
	GOTERM_BP_ALL	immune system process	RT	27	13,7	1,1E-4	6,7E-2		
	GOTERM_BP_ALL	cell activation	RT	13	6,6	1,7E-4	8,8E-2		
	GOTERM_BP_ALL	multi-organism process	<u>RT</u>	13	6,6	1,9E-4	8,5E-2		
	GOTERM_BP_ALL	response to chemical stimulus	RT 📰	20	10,2	2,2E-4	9,0E-2		
	GOTERM_BP_ALL	leukocyte activation	<u>RT</u>	12	6,1	2,5E-4	9,1E-2		
	GOTERM_CC_ALL	cytoplasmic membrane-bound vesicle	RT 🔳	15	7,6	3,1E-4	2,0E-1		
	UP_SEQ_FEATURE	disulfide bond	<u>RT</u>	39	19,8	3,1E-4	9,5E-1	+	
Fortig								_	

Abbildung 3: DAVID. Oberfläche des Functional Annotation Chart. Unter "Options" ist für Count ein Schwellenwert von 12 (geforderte Mindestzahl an Genen je Kategorie), unter EASE ein Schwellenwert von 0,01 eingestellt.

#### 2.4.2.4.2 Gene Ontology

Das Gene Ontology Project ist ein Gemeinschaftsprojekt mit dem Ziel, eine konsistente Beschreibung von Genprodukten in verschiedenen Datenbanken zu ermöglichen. Hierfür wurden drei strukturierte Wörterverzeichnisse (Ontologien) entwickelt, die Genprodukte hinsichtlich der mit ihnen assoziierten biologischen Prozesse, zellulären Komponenten und molekularen Funktionen beschreiben und sie auf diese Weise in ein hierarchisches System einordnen. Bausteine dieser Verzeichnisse sind die so genannten Gene Ontology Terms.

# 2.4.2.5 Visualisierung in aktuell verfügbaren Pathways

Mit Hilfe von PathwayExplorer<sup>84</sup> wurde die Expression der differenziell regulierten Gene in gängigen Pathways abgebildet. PathwayExplorer ist eine kostenlose und frei zugängliche Online-Anwendung, die Expressionsprofile von Genen oder Proteinen simultan in bedeutenden aktuell verfügbaren regulatorischen, metabolischen und zellulären Pathways von KEGG, BioCarta und GenMAPP abbildet.

# 2.4.2.6 Analyse mit Ingenuity Pathways Analysis

Die bisherigen Analyseschritte wurden mit Hilfe von Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems®, Redwood City, CA, USA; <u>www.ingenuity.com</u>) überprüft und ergänzt.

Ingenuity Pathways Analysis ist eine weit verbreitete, kostenpflichtige Web-basierte Anwendung, die unterschiedliche Funktionen in sich vereint. Sie wurde entwickelt, um eine komplette, schnelle und umfassende Analyse von Daten aus Genexpressions- oder SNP-Microarrays, Metabolom- und Proteomexperimenten zu ermöglichen. In den folgenden Zeilen sollen die drei Funktionen, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, näher beschrieben werden.

## 2.4.2.6.1 Network Explorer

Der Network Explorer dient der Visualisierung molekularer Beziehungen. Er stellt Enzyme, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Zytokine und weitere Moleküle mit jeweils unterschiedlichen Symbolen dar und zeigt die verschiedenen intermolekularen Beziehungen an.

#### 2.4.2.6.2 Functional Analysis

Die Functional Analysis ermöglicht eine funktionelle Analyse der gewonnenen Daten. Hierfür werden die Ergebnisse der entsprechenden Experimente mit biologischen Funktionen aus der Ingenuity Wissensbasis in Verbindung gebracht. Dies soll einen Überblick über die Biologie der gewonnenen Daten ermöglichen und einen Zugang zu relevanten, spezifischeren Informationen bieten.

#### 2.4.2.6.3 Canonical Pathways

Mit Canonical Pathways stellt Ingenuity eigene Pathways in den Bereichen Metabolismus und Zell-Signaling zur Verfügung, die ein Mapping der untersuchten Gene ermöglichen. Die in den Pathways enthaltenen Informationen stammen aus wissenschaftlichen Publikationen, Übersichtsartikeln, Lehrbüchern und von KEGG.

#### 2.4.2.7 Analyse mit BioBase ExPlain

Biobase ExPlain ist ein Produkt des 1997 in Wolfenbüttel, Deutschland, gegründeten Bioinformatik-Unternehmens Biobase. Es wurde entwickelt, um die biologische Interpretation umfangreicher Datensätze zu unterstützen. Zu den einzelnen Modulen zählen die einfache Promotorenanalyse, die erweiterte Promotorenanalyse und die Knotenpunktanalyse. Auch eine funktionelle Klassifizierung ist möglich.

## 2.4.2.7.1 Einfache Promotorenanalyse

In der einfachen Promotorenanalyse wird in den Promotoren der signifikant differenziell regulierten Gene nach überrepräsentierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) gesucht. Hierfür werden mit Hilfe des F-MATCH<sup>TM</sup> Algorithmus die von MATCH<sup>TM</sup> vorhergesagten Häufigkeiten von Bindungsstellen in den Promotoren der signifikant differenziell regulierten Gene und denen des Hintergrundsets miteinander verglichen.

#### 2.4.2.7.2 Erweiterte Promotorenanalyse

Die erweiterte Promotorenanalyse wird mit Hilfe der Komposit Modul Analyse (CMA) durchgeführt. Die Software-Anwendung generiert ein Modell häufig auftretender regulatorischer Regionen in Form eines Promotorensets, das durch Kombinationen einzelner Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) oder Paare von TFBS in Kompositmodulen beschrieben wird. Ein Kompositmodul wird hierbei als Region innerhalb eines Promotors definiert, innerhalb derer spezifische Kombinationen von Transkriptionsfaktorbindungsstellen in enger Nachbarschaft zueinander liegen. Diese tragen durch ihren Synergismus zu der beobachteten differenziellen Genexpression bei <sup>85</sup>. Ziel der CMA ist die Identifikation eines Modells, das optimal zwischen Promotoren des positiven Sets (des Sets signifikant differenziell regulierter Gene) und des negativen Sets (des Hintergrundsets) unterscheidet. Weitere Informationen hierzu finden sich in Kapitel 6 des ExPlain 3.0 Benutzerhandbuchs unter http://explain30.biobase.de/biobase/ExPlain 3.0/doc/cmatheory.html.

2.4.2.7.3 Knotenpunktanalyse

Die Knotenpunktanalyse dient der Suche nach stromaufwärts gelegenen Schlüsselmolekülen, die die Aktivität der mit F-MATCH und CMA identifizierten Transkriptionsfaktoren regulieren. Weitere Informationen hierzu sind in Kapitel sieben des Benutzerhandbuchs unter <u>http://explain30.biobase.de/biobase/ExPlain\_3.0/doc/NWA.html</u> zu finden.

# 2.4.2.8 Hierarchische Cluster-Analyse

Die hierarchische Cluster-Analyse wurde mit dChip erstellt. Siehe auch 2.4.1.10 "Errechnung von Mittelwerten".

Mit Hilfe der Clusteranalyse werden Arrays mit ähnlichen Expressionsmustern identifiziert. Das Ergebnis wird anschließend in Form eines Cluster-Dendrogramms dargestellt. Die Ähnlichkeit zwischen Arrays und Genen wird durch deren Nähe innerhalb des Stammbaums visualisiert. Die Gruppenzugehörigkeit jedes einzelnen Arrays bleibt hierbei unberücksichtigt, man spricht deshalb von einer unbeaufsichtigten (unsupervised) Analyse. Die Standardisierungs- und Clustering-Methoden wurden 1998 von Eisen et al. <sup>86</sup> und 1999 von Golub et al. <sup>87</sup> beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Standardalgorithmus von dCHIP in der Version 05/2008 mit den Standardeinstellungen verwendet.

# 2.5 Validierung

Die mit den Microarrayexperimenten generierten Daten wurden mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) validiert. Hierfür wurden einzelne Gene ausgewählt. Die Durchführung erfolgte mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland.

Die Daten wurden jeweils gegen ein Haushaltsgen, in diesem Fall die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Aus den Ergebnissen der einzelnen Patienten wurden Mittelwerte für die beiden Gruppen errechnet. Die Differenz der beiden Mittelwerte bildete den Fold Change (FC). Der logarithmierte Fold Change der RT-PCR-Daten wurde gegen den logarithmierten Fold Change der Microarraydaten geplottet und die Korrelation zwischen beiden errechnet.

# 2.5.1 Durchführung der RT-PCR

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte anhand eines Standardprotokolls am Institut für Medizinische Mikrobiologie und wurde u. a. von Felix Thierer in seiner Dissertati-

on über die "Transkriptionelle Sepsissignatur in Patienten mit Polytrauma" ausführlich beschrieben:

"Die pre-optimized TaqMan primer/probe sets (Quantitect Primer Assays) der ausgewählten Gene wurden von dem Gene Globe Portal (Qiagen, Hilden, Deutschland) bezogen. Die TaqMan Proben wurden mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) als reporter Farbstoff und mit 6-Carboyx-Tetramethyl-Rhodamine (TAMRA) als quencher Farbstoff gelabelt. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Quantitect Primer Assays) wurde parallel als interne Kontrolle zur Normalisierung gemessen.

Vor der Durchführung der Probenmessung wurden alle primer/probe sets mit Hilfe einer kompletten Kontroll-RNA von PAXGene validiert.

Die Standardkurven der graduellen RNA-Verdünnung wurden durch das Plotten von Ct Werten gegen die log-transformierte Kontroll-RNA-Konzentration der Ausgangs-RNA (in ng) erstellt. Der Ct Wert stellt den Schwellenwert dar, indem er angibt, ab welcher Konzentration eine Reaktion gemessen werden kann.

Die Verstärkungseffizienz der ausgewählten Gene und der internen Kontrollen wurden nach folgender Formel kalkuliert:  $E = 10^{(-1/S) - 1}$ , wobei S die Steigung der Standardkurve darstellt.

Für die Probenmessung wurden 400 ng PAXGene RNA eines jeden Patienten zur cDNA Synthese mit Hilfe der Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) den Angaben des Herstellerhandbuchs entsprechend verwendet. Die RT-PCR wurde mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit Hilfe des Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Als Ausgangs-cDNA wurde eine Menge gewählt, die 2 ng (0,5%) der totalen Ausgangs-RNA entspricht. Alle Reaktionen wurden doppelt ausgeführt. Die Ct Werte der getesteten Gene wurden gemessen und mit den korrespondierenden Standardkurven verglichen. Der Antilogarithmus des Wertes am Schnittpunkt mit der Standardkurve entsprach dabei der Menge der humanen RNA des ausgewählten Gens. Die normalisierte Expression eines ausgewählten Gens und der internen Kontrolle berechnet"<sup>88</sup>.

# 2.6 Mitwirkende Personen

Die Patientenrekrutierung und Bereitstellung der Blutproben erfolgte durch Anne Hilgendorff. Microarrays und RT-PCRs wurden von Svetlin Tchatalbachev bearbeitet. Hamid Hossain stellte die ausgelesen Daten aus den Microarrays zur Verfügung (Datensatz 1). Die komplette bioinformatische / biostatistische Analyse und Aufarbeitung der Daten erfolgte durch Manuel Klein.

An der im Oktober 2013 bei Critical Care Medicine eingereichten Publikation "Early onset infection in preterm infants is characterized by dysregulation of NK cell activity with concomitant neutrophil activation" waren folgende Personen beteiligt: Anne Hilgendorff; Anita Hoeland; Manuel Klein; Svetlin Tchatalbachev; Christine Windemuth-Kieselbach; Jochen Kreuder; Matthias Heckmann; Anna Gkatzoflia; Harald Ehrhardt; Josef Mysliwietz; Michael Maier; Benjamin Izar; Andre Billion; Ludwig Gortner; Trinad Chakraborty; Hamid Hossain. Die drei erstgenannten Autoren trugen in gleicher Weise zur Studie bei, Hamid Hossain ist der korrespondierende Autor.

# 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Daten

Innerhalb des Untersuchungszeitraums (04/2003 bis 03/2005) wurden 38 Frühgeborene in die Studie eingeschlossen. Die Arrays von 24 der 38 Patienten gingen in die weitere Analyse ein. Die Arrays von 14 der 38 Patienten wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, weil sie die Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe 3.3.1 "Low-Level Analyse"). Bei 16 der 24 Patienten wurde eine konnatale Infektion diagnostiziert, die übrigen 8 Patienten waren nicht erkrankt und wurden der Vergleichsgruppe zugeordnet. Während die erkrankten Patienten mit einem durchschnittlichen Gestationsalter von 28 Schwangerschaftswochen (SSW) geboren wurden, kamen die Patienten der Vergleichsgruppe mit einem durchschnittlichen Gestationsalter von 30 SSW zur Welt. Das Geburtsgewicht in der Gruppe der Kinder mit konnataler Infektion bewegte sich zwischen 590 und 1730 g; der Median lag bei 1085g. Der Median in der Gruppe der gesunden Kinder lag mit 1445 g deutlich höher; die Spannweite zwischen minimalem und maximalem Geburtsgewicht war zudem deutlich kleiner. Während der maximale Wert nur 30 g über dem der anderen Gruppe lag, lag der Minimalwert mit 900 g mehr als 300 g (etwa 50%) über dem der Gruppe der erkrankten Patienten. Die Diagnose einer intrauterinen Wachstumsretardierung wurde in beiden Gruppen jeweils einmal gestellt. Der prozentuale Anteil der Patienten, die antenatale Kortikosteroide erhalten hatten, war in der Vergleichsgruppe höher; er betrug 71% und lag damit 12% über dem Wert der anderen Gruppe. Noch deutlicher wird dieser Unterschied beim Vergleich der Patienten, die präpartal eine vollständige Kortikosteroidtherapie erhalten hatten. In der Vergleichsgruppe erhielten alle Patienten, die antenatale Kortikosteroide erhalten hatten, eine vollständige Therapie. In der Gruppe der erkrankten Patienten hatten lediglich 41% der Patienten eine vollständige Therapie erhalten. Hinsichtlich der Häufigkeit vorzeitiger Blasensprünge bestand kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In der Gruppe der Patienten ohne konnatale Infektion kam es bei keiner der Geburten zu einem vorzeitigen Blasensprung, in der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion wurde ein einziger Fall dokumentiert. In der Häufigkeit intrauteriner Infektionen ist hingegen ein deutlicher Unterschied erkennbar: Während bei keinem einzigen der gesunden Kinder die Diagnose

einer Chorioamnionitis gestellt wurde, konnte bei sieben (43,75%) der erkrankten Kinder eine Entzündung der Eihäute nachgewiesen werden. In beiden Gruppen wurde die bei weitem überwiegende Mehrheit der Kinder per Kaiserschnitt entbunden. In der Vergleichsgruppe kamen 100% der Kinder auf diesem Wege zur Welt, in der Gruppe der erkrankten Kinder waren es 15 von 16. Nur bei einem der Patienten mit konnataler Infektion ließen sich Keime in der Blutkultur nachweisen. In der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion lag der Critical Risk Index for Babies (CRIB) zwischen 0 und 17; der Median lag bei 6. In der Gruppe der nicht erkrankten Patienten bewegte er sich mit Werten zwischen 0 und 13 in einem ähnlichen Bereich; der Median lag mit 0,5 jedoch deutlich niedriger. Beim Großteil der Patienten wurde ein Atemnotsyndrom diagnostiziert. Patienten der Vergleichsgruppe waren hinsichtlich des Schweregrades jedoch weniger stark betroffen. Von den 8 Patienten der Vergleichsgruppe wurde bei 7 ein RDS diagnostiziert, alle < Grad III. In der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion wurde bei allen Patienten ein Atemnotsyndrom diagnostiziert, 10 von 16 hatten ein RDS > Grad III. Intraventrikuläre Blutungen (43,75%) oder bronchopulmonale Dysplasien (62,5%) traten nahezu ausschließlich in mit konnataler der Gruppe der Patienten Infektion auf. Von der Frühgeborenenretinopathie waren in dieser Gruppe 56,25% betroffen, in der Vergleichsgruppe immerhin 50%. Kinder mit konnataler Infektion wurden zwischen 3 und 44 Tage maschinell beatmet, der Median lag bei sieben Tagen. In der Gruppe der Kinder ohne konnatale Infektion lag der Median bei null, die maximale Beatmungsdauer lag bei sieben Tagen. Weitere Unterschiede zeigen sich in der Länge des Krankenhausaufenthaltes. Erkrankte Patienten lagen zwischen 10 und 138 Tage im Krankenhaus, mit einer durchschnittlichen Aufenthaltsdauer von 65 Tagen. Eines der Kinder starb in dieser Zeit. Patienten der Vergleichsgruppe lagen zwischen 23 und 65 Tage stationär, die durchschnittliche Verweildauer lag bei 47 Tagen.

	Konnatale Infektion	Keine konnatale Infektion
n	16	8
GA (in Wochen)	28 (24-30)	30 (28-31)
Geburtsgewicht (g)	1085 (590-1730)	1445 (900-1760)
IUGR	1 (6,25%)	1 (12,5%)
ANCS	9 (56,25%)	6 (75%)
Chorioamnionitis	7 (43,75%)	0
PROM	1 (6,25%)	0
Kaiserschnitt	15 (93,75%)	8 (100%)
Positive Blutkultur	1 (6,25%)	0
CRIB	6 (0-17)	0,5 (0-13)
RDS	16 (100%)	7 (87,5%)
RDS ≥ Grad III	9 (56,25%)	0
IVH	7 (43,75%)	1 (12,5%)
BPD	10 (62,5%)	0
Künstliche Beatmung ( in Tagen)	7 (3-44)	0 (0-7)
ROP	9 (56,25%)	4 (50%)
Krankenhausaufenthalt (in Tagen)	65 (10-138)	47 (23-89)
Tod	1 (6,25%)	0

Tabelle 1. Perinataldaten der verbliebenen 24 Patienten

Die angegebenen Daten stellen jeweils Median und Range oder absoluten Wert und prozentualen Anteil dar.

**GA:** Gestationsalter; **IUGR:** Intrauterine Wachstumsretardierung; **PROM:** Vorzeitiger Blasensprung; **ANCS:** Antenatale Kortikosteroide: kompletter Kurs mit 2 Dosen Betamethason, die letzte > 24 Stunden vor Geburt, die erste < 7 Tage vor Geburt appliziert; **CRIB:** Critical Risk Index for Babies; **RDS:** Atemnotsyndrom; **IVH:** Intraventrikuläre Hämorrhagie; **BPD:** Bronchopulmonale Dysplasie; **ROP:** Frühgeborenenretinopathie

# 3.2 Probengewinnung, RNA-Aufbereitung und Hybridisierung der Arrays

Probengewinnung, RNA-Aufbereitung und Hybridisierung der Arrays erfolgten wie unter 2.3 "Probengewinnung, RNA-Aufbereitung und Hybridisierung der Arrays" beschrieben.

# 3.3 Analyse der gewonnenen Daten

## 3.3.1 Low-Level Analyse

Die verwendeten CodeLink Uniset Human I Expression Bioarrays (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verfügen über 10458 Spots. Die 105 eingesetzten Arrays mit je 9945 Probesets ergaben einen Datensatz mit insgesamt 1044225 Werten. Nach der Quantifizierung der Signale mit der CodeLink Expression Software 1.21 und nach Ausschluss der als POOR, NEG oder MSR gekennzeichneten Werte (siehe 2.4.1.1 "Quantifizierung der Signale") gingen 1009466 Werte in die weitere Analyse ein (Datensatz 1), 34759 Werte (3,3%) fehlten. 107 Probesets, für die innerhalb einer der beiden Gruppen (EOI / Non-EOI) weniger als 50% der Werte vorlagen, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. 2514 Probesets, die in keiner der beiden Gruppen in mindestens 50% der Arrays über dem Threshold lagen, wurden ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das Ergebnis beider Schritte bildete Datensatz 2 mit 7324 Probesets je Array. Leerwerte in Datensatz 2 wurden mit Hilfe von SKNN errechnet und eingefügt (imputiert). Mit Hilfe des 3SD-Tools (siehe 2.4.1.4 "Identifikation und Elimination von technischen Ausreißern") wurden in Datensatz 2 weitere 10912 Ausreißerwerte in Leerwerte umgewandelt (, d. h. gelöscht). Die resultierenden 23690 Leerwerte (12778 plus 10912) wurden mit Hilfe von SKNN erneut imputiert.

Die mit Hilfe des Microarray Outlier Filter Moduls von AVADIS Pride identifizierten Ausreißer-Arrays wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen: 9 Arrays wurden entfernt, weil die Korrelation der technischen Replikate unter 98% lag, 28 Arrays wurden entfernt, weil ihre Outlier Percentage, der prozentuale Anteil an Ausreißern innerhalb des jeweiligen Arrays, größer 2 war. Weitere 5 Arrays wurden wegen unvollständiger klinischer Daten für die entsprechenden Patienten entfernt. Insgesamt

wurden 42 der 105 Arrays aus Datensatz 1 von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Von den verbliebenen 63 Arrays bestehend aus jeweils 9945 Probesets mit einem Datensatz von 626535 Werten (Datensatz 1') gingen nach der Quantifizierung der Signale mit der CodeLink Expression Software 1.21 und nach Ausschluss der als POOR, NEG oder MSR gekennzeichneten Werte (siehe 2.4.1.1 "Quantifizierung der Signale") 605441 Werte in die weitere Analyse ein, 21094 Werte (3,3%) fehlten. 110 Probesets, für die innerhalb einer der beiden Gruppen (Sepsis / Non-Sepsis) weniger als 50% der Werte vorlagen, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. 2371 Probesets, die in keiner der beiden Gruppen in mindestens 50% der Arrays über dem Threshold lagen, wurden ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das Ergebnis bildete Datensatz 2' mit 7464 Probesets. Die verbliebenen 6593 Leerwerte wurden von SKNN imputiert. Mit Hilfe des 3SD-Tools (siehe 2.4.1.4 "Identifikation und Elimination von technischen Ausreißern") wurden in Datensatz 2' weitere 4018 Werte gelöscht. Die Gesamtzahl von nun 10611 Fehlwerten wurde mit Hilfe von SKNN errechnet und eingefügt. Der vervollständigte Datensatz wurde daraufhin wie unter 2.4.1.9 "Quantile-Normalisierung des Datensatzes" beschrieben normalisiert und logarithmiert. Das Ergebnis bildete Datensatz 3. Wie unter 2.4.1.10 "Errechnung von Mittelwerten" beschrieben wurden mit Hilfe von dChip für alle Replikate eines Patienten Mittelwerte berechnet (Datensatz 4).

#### 3.3.2 High-Level Analyse

#### 3.3.2.1 Errechnung von Rang-Produkten

Mit Hilfe von Rank Products wurden für jedes der 7464 Gene aus Datensatz 4 ein Fold Change (FC) und eine False Discovery Rate (FDR) berechnet.

3521 Gene zeigten eine vermehrte Expression, das heißt, ihr Fold Change lag über 1,0. Von diesen 3521 Genen hatten 926 Gene einen FC > 1,25; 316 Gene einen FC > 1,5; 152 Gene hatten einen FC > 1,75; 73 Gene hatten einen FC > 2,0; 20 Gene hatten einen FC > 2,5; 9 Gene hatten einen FC > 3,0; 6 Gene hatten einen FC > 3,5; 3 Gene hatten einen FC > 4,0. Der maximale Fold Change lag bei 4,256.



Abbildung 4: Zahl der Gene mit einem Fold Change > x.

3943 Gene zeigten eine verminderte Expression, das heißt, ihr Fold Change lag unter -1,0. Von diesen 3943 Genen hatten 918 Gene einen FC < -1,25; 199 Gene hatten einen FC < -1,5; 50 Gene hatten einen FC < -1,75; 15 Gene hatten einen FC < -2,0; 2 Gene hatten einen FC < -2,5. Der minimale Fold Change lag bei -7,422.



Abbildung 5: Zahl der Gene mit einem Fold Change < x.

Von den 7464 Genen aus Datensatz 5 hatten 102 Gene eine FDR < 0,01, 125 Gene hatten eine FDR < 0,02; 151 Gene hatten eine FDR < 0,025; 198 Gene hatten eine FDR < 0,05; 292 Gene hatten eine FDR < 0,1; 460 Gene hatten eine FDR < 0,2; 530 Gene hatten eine FDR < 0,25; 921 Gene hatten eine FDR < 0,5.



Abbildung 6: Zahl der Gene mit einer False Discovery Rate < x.

Gene mit einer FDR < 0,05 wurden als signifikant differenziell reguliert definiert. Von diesen 198 Genen waren 155 Gene vermehrt und 43 Gene vermindert exprimiert.

#### 3.3.2.2 Annotierung der signifikant differenziell regulierten Gene

Die Annotierung erfolgte wie unter 2.4.2.2 "Annotierung der signifikant differenziell regulierten Gene" beschrieben mit SOURCE Stanford.

#### 3.3.2.3 Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene

Mit Hilfe von STRIPE<sup>80</sup> (siehe 2.4.2.3 "Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene") wurde die chromosomale Verteilung der signifikant differenziell regulierten Gene untersucht. Von den 198 Genen konnten 187 dargestellt werden.

76 9	STRIPE 0.40				_	- 38			_								-	-			x
File	e Search Settings	Plot	Plot Uniform	Plot Lines	Remove Lin	ne Plots	Line Pl	ot Option:	s Clear	r Cha	nge Colo	ors Se	ttings	Set Gen	e Width	Curso	s				About
Data	aset FOLDCHANGE			💌 Tool Ti	GENEID				• P	LOT						Search	Result 9	Style Mar	k Genes	Tips	
					7 8	9								17	18			21			
		_							111	_			_		_	_	_		_		•

Abbildung 7: Chromosomale Verteilung der signifikant differenziell regulierten Gene. Jede der vertikalen Linien repräsentiert ein Chromosom. Die vermehrt exprimierten Gene werden durch rote Balken, die vermindert exprimierten durch grüne Balken dargestellt.

Die prozentuale Verteilung der signifikant differenziell regulierten Gene auf die einzelnen Chromosomen liegt zwischen 1 und 13%. Chromosom 1 enthält mit 13% den größten Anteil, gefolgt von Chromosom 19 mit 10% (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der signifikant differenziell regulierten Gene auf die einzelnen Chromosomen.

Berücksichtigt man neben der absoluten Zahl der regulierten Gene pro Chromosom die Zahl aller Gene pro Chromosom, weisen 22 von 24 Chromosomen eine "annähernd" gleiche Regulationsdichte (0,34% bis 1,47%) auf: der Anteil signifikant differenziell regulierter Gene je Chromosom liegt zwischen 0,34 und 1,47%. Lediglich die beiden Chromosomen 19 und Y weisen mit einem Anteil regulierter Gene von 5,29% bzw. 5,66% (19 von 359 bzw. drei von 53 Protein-codierenden Genen) eine überdurchschnittlich hohe "Regulationsdichte" auf (siehe Abbildung 9).



Abbildung 9: Prozentualer Anteil der signifikant differenziell regulierten Gene auf den einzelnen Chromosomen. Für die Berechnung wurde die Gesamtzahl proteincodierender Gene verwendet<sup>89</sup>.

Bei der Untersuchung der chromosomalen Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene (siehe Abbildung 7) zeigt sich auf den verschiedenen Chromosomen insgesamt eine überwiegend ausgewogene Verteilung. Zugleich sind auf verschiedenen Chromosomen einzelne "Hot Spots", Abschnitte mit einer höheren Regulationsdichte, erkennbar (siehe Abbildung 10): Der ausgewählte Abschnitt auf Chromosom 1 beispielsweise enthält acht regulierte Gene. Drei dieser Gene sind die weiter unten unter 3.3.2.8.1.1 "Calgranuline" beschriebenen Calgranuline A, B und C. Als mögliche Transkriptionsfaktoren werden JUN / AP1 und C/EBP diskutiert <sup>90</sup>, <sup>91</sup>. Sowohl CEBPA (FC: 2,10; FDR: 0,002) (s. Tabelle 8) als auch CEBPB (FC: 2,35; FDR: 0,00044) zeigen ebenso wie die drei genannten Calgranuline eine signifikant höhere Expression.



Abbildung 10: Abschnitt mit einer höheren Regulationsdichte auf Chromosom 1. In dem ausgewählten Bereich liegen unter anderem Calgranulin A, B und C auch Cathepsin S und FCGR1A; alle werden signifikant vermehrt exprimiert.

#### 3.3.2.4 Identifizierung überrepräsentierter biologischer Gruppen

Mit Hilfe des Functional Annotation Chart von DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) wurden die signifikant differenziell regulierten Gene unterschiedlichen biologischen Kategorien zugeordnet. Es wurde eine Tabelle von in der Genliste überrepräsentierten biologischen Prozessen erstellt. Bei einem Count-Threshold von 12 und einem EASE Score-Threshold von 0,01 wurden 27 Kategorien als signifikant überrepräsentiert aufgelistet (siehe Tabelle 2). 38 der 198 Gene konnten unter den genannten Voreinstellungen keiner der 27 aufgeführten Kategorien zugeordnet werden.

Kategorie	Bezeichnung	Zahl	P-Wert
GOTERM_BP_ALL	GO:0006952~Abwehrantwort	29	2.94E-10
GOTERM_BP_ALL	GO:0050896~Antwort auf Stimulus	59	1.68E-07
SP_PIR_KEYWORDS	Direkte Protein-Sequenzierung	62	4.83E-07
GOTERM_BP_ALL	GO:0009611~Antwort auf Verletzung	21	2.40E-06

GOTERM_BP_ALL	GO:0006954~Entzündungsantwort	16	1.99E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0009605~Antwort auf äußeren Reiz	23	2.26E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0006955~Immunantwort	22	8.18E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0002376~Immunsystem-Prozess	27	1.13E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0001775~Zell-Aktivierung	13	1.73E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0051704~Multi-organismaler Prozess	13	1.87E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0042221~Antwort auf chemischen Reiz	20	2.21E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0045321~Leukozyten-Aktivierung	12	2.46E-04
	GO:0016023~Zytoplasma-Membran gebun-		
GOTERM_CC_ALL	denes Vesikel	15	3.08E-04
UP_SEQ_FEATURE	Disulfid-Brücke	39	3.12E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0005576~Extrazelluläre Region	25	3.15E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0006950~Antwort auf Stress	31	3.64E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0031988~Membran-gebundenes Vesikel	15	3.70E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0005615~Extrazellulärer Raum	15	5.28E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0009607~Antwort auf biotischen Reiz	12	7.36E-04
	GO:0043066~Negative Regulation von		
GOTERM_BP_ALL	Apoptose	12	7.90E-04
	GO:0043069~Negative Regulation von		
GOTERM_BP_ALL	programmiertem Zelltod	12	8.48E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0031410~Cytoplasmatisches Vesikel	15	0.0018432
GOTERM_CC_ALL	GO:0031982~Vesikel	15	0.00222005
GOTERM_BP_ALL	GO:0051674~Zell-Lokalisation	15	0.00284073
GOTERM_BP_ALL	GO:0006928~Zell-Motilität	15	0.00284073
UP_SEQ_FEATURE	Sequenzvariante	83	0.00891993
GOTERM_MF_ALL	GO:0005515~Protein-Bindung	112	0.0099942

Tabelle 2: DAVID. Functional Annotation Chart. Die Tabelle zeigt alle 27 überrepräsentierten Kategorien mit einem Count  $\geq$  12 und einer EASE-Score  $\leq$  0,01.

Bei der weiteren Auswertung wurden nur Kategorien berücksichtigt, die dem Wörterverzeichnis "Gene Ontology Biological Process" angehören ("GOTERM\_BP\_ALL").

Angeführt wird die Tabelle der überrepräsentierten biologischen Prozesse von der Kategorie "Abwehrantwort" (Defense Response); laut GO-Definition eine Reaktion, die als Antwort auf die Anwesenheit von Fremdkörpern oder das Auftreten einer Verletzung eingeleitet wird. Auf den Plätzen zwei bis sieben folgen die Kategorien "Antwort auf Stimulus" (Response to Stimulus), "Antwort auf Verletzung" (Response to

Wounding), "Entzündungsantwort" (Inflammatory Response), "Antwort auf äußeren Reiz" (Response to External Stimulus), "Immunantwort" (Immune Response) und "Immunsystem-Prozess" (Immune System Process). An 11. bis 13. Stelle schließen sich "Leukozyten-Aktivierung" (Leukocyte Activation), "Antwort auf Stress" (Response to Stress) und "Antwort auf biotischen Reiz" (Response to biotic Stimulus) an. Für eine "hierarchische" Darstellung der genannten Kategorien siehe Abbildung 11.



Abbildung 11: Die Kategorie "GO Biological Process" mit einer Auswahl überrepräsentierter Child Terms (Thresholds: Count  $\geq$  12, EASE Score  $\leq$  0,01).

Bei der Auswertung des Functional Annotation Charts wird unter Berücksichtigung der hierarchischen Gliederung der aufgeführten Terms deutlich, dass sich der bei weitem überwiegende Anteil der überrepräsentierten Kategorien auf zwei übergeordnete biologische Prozesse zurückführen lässt: "Antwort auf Stimulus" (Response to Stimulus) (an zweiter Stelle) und "Immunsystem-Prozess" (Immune System Process) (an siebter Stelle) (siehe Abbildung 11). Der erstgenannte "Response to Stimulus" (59 Gene) ist definiert als eine durch einen Reiz hervorgerufene Änderung des Zustandes oder der Aktivität einer Zelle oder eines Organismus. Der zweitgenannte "Immune System Process" (27 Gene) beinhaltet sämtliche an der Entwicklung oder Funktion des Immunsystems beteiligten Prozesse.

In den folgenden Abschnitten soll auf die beiden am stärksten überrepräsentierten Kategorien, "Abwehrantwort" (Defense Response) und "Antwort auf Stimulus" (Response to Stimulus) eingegangen werden. Die weiteren Kategorien auf den Plätzen 3 bis 12 sind zum großen Teil Child / Descendent Terms der beiden erstgenannten (siehe Abbildung 11); sie enthalten somit keine zusätzlichen Gene. Auch jene Kate-

gorien, die sich nicht auf einen der beiden Parent Terms zurückführen lassen, beinhalten wenige bis keine Gene, die nicht bereits in "Response to Stimulus" / "Defense Response" enthalten wären.

#### 3.3.2.4.1 Abwehrantwort (Defense Response)

Die an erster Stelle aufgeführte Kategorie "Abwehrantwort" (Defense Response) ist die mit Abstand am stärksten überrepräsentierte. Der ihr zugeordnete P-Wert liegt mit 2,94E-10 deutlich unter dem der an zweiter Stelle aufgeführten Kategorie "Antwort auf Stimulus" (Response to Stimulus), für die ein P-Wert von 1,68E-07 errechnet wurde. Tabelle 3 listet die signifikant differenziell regulierten Gene auf, die mit Hilfe des Functional Annotation Charts der Kategorie "Defense Response" zugeordnet wurden.

GENBANK_ACC	DAVID Gene Name	FDR	FC
NM_002343	LACTOTRANSFERRIN	0.00000	2.82
NM_005091	PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEIN 1	0.00012	2.42
	S100 CALCIUM BINDING PROTEIN A12		
NM_005621	(CALGRANULIN C)	0.00003	2.42
	CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN (C/EBP),		
NM_005194	BETA	0.00044	2.35
AA868493	LEUKOTRIENE A4 HYDROLASE	0.00270	2.34
	PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR		
NM_002838	TYPE, C	0.00137	2.30
NM_002029	FORMYL PEPTIDE RECEPTOR 1	0.00018	2.26
NM_000250	MYELOPEROXIDASE	0.00013	2.24
	S100 CALCIUM BINDING PROTEIN A9		
AA318707	(CALGRANULIN B)	0.00112	2.14
NM_000433	NEUTROPHIL CYTOSOLIC FACTOR 2	0.00428	2.08
	S100 CALCIUM BINDING PROTEIN A8		
NM_002964	(CALGRANULIN A)	0.00066	2.07
	B-CELL CLL/LYMPHOMA 6 (ZINC FINGER PROTEIN		
NM_001706	51)	0.01698	2.00
NM_002211	INTEGRIN, BETA 1	0.04490	1.97
NM_000572	INTERLEUKIN 10	0.02171	1.71
NM_000700	ANNEXIN A1	0.04243	1.69
NM_003467	CHEMOKINE (C-X-C MOTIF) RECEPTOR 4	0.02170	1.69

	LEUKOCYTE IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR,		
NM_006864	SUBFAMILY B, MEMBER 3	0.04691	1.63
	AZUROCIDIN 1 (CATIONIC ANTIMICROBIAL		
NM_001700	PROTEIN 37)	0.00126	1.57
NM_000584	INTERLEUKIN 8	0.00283	1.19
	KILLER CELL LECTIN-LIKE RECEPTOR SUBFAMILY		
NM_002260	C, MEMBER 2	0.02950	-1.64
M77140	GALANIN	0.00083	-1.66
NM_016509	C-TYPE LECTIN DOMAIN FAMILY 1, MEMBER B	0.03649	-1.70
NM_002051	GATA BINDING PROTEIN 3	0.04270	-1.84
NM_002984	CHEMOKINE (C-C MOTIF) LIGAND 4	0.01493	-2.01
	FC FRAGMENT OF IGE, HIGH AFFINITY I,		
NM_002001	RECEPTOR FOR; ALPHA POLYPEPTIDE	0.00345	-2.20
U20350	CHEMOKINE (C-X3-C MOTIF) RECEPTOR 1	0.00492	-2.22
NM_012483	GRANULYSIN	0.00090	-2.48

Tabelle 3: DAVID: Die am stärksten überrepräsentierte Kategorie "Abwehrantwort" enthält 27 Gene (Thresholds: Zahl (Count)  $\geq$  12, EASE Score  $\leq$  0,01). In der linken Spalte sind die zugehörigen Genbank Accession Numbers aufgeführt.

Von den 27 verschiedenen Genen in der Kategorie "Abwehrantwort" (Defense Response) zeigen 19 Gene eine vermehrte, 8 Gene eine verminderte Expression.

Zu den vermehrt exprimierten Genen zählen neben Calgranulin A (FC: 2,07), B (FC: 2,14) und C (FC: 2,42), die Myeloperoxidase (FC: 2,24), der Neutrophil cytosolic factor 2 (FC: 2,08), der Formyl peptide receptor 1 (FC: 2,26), Lactotransferrin (FC: 2,82) sowie Azurocidin1 (FC: 1,57). Weitere Gene mit einer vermehrten Expression sind zum Beispiel das Peptidoglycan recognition protein 1 (FC: 2,42), Integrin  $\beta$ 1 (FC: 1,97) und Interleukin 10 (FC: 1,71). Auch Interleukin 8 zeigt eine signifikant höhere Expression (FDR: 0,00283), der Fold Change liegt mit 1,19 noch knapp über 1.

Zu den vermindert exprimierten Genen zählen neben anderen der Killer cell lectinlike receptor KLRC2 (FC: -1,64), Granulysin (FC: -2,48), die C-Type lectin domain family 1, member B (FC: -1,70) sowie das GATA binding protein 3 (FC: -1,84).

3.3.2.4.2 Antwort auf Stimulus (Response to Stimulus)

"Antwort auf Stimulus" (Response to Stimulus) ist die in der Liste der überrepräsentierten Themen an zweiter Stelle aufgeführte Kategorie. Sie ist ein Ancestor / Parent Term der an erster Stelle stehenden Kategorie "Defense Response" und beinhaltet zusätzlich zu den in "Defense Response" bereits enthaltenen Genen 30 weitere Gene.

Tabelle 4 listet die signifikant differenziell regulierten Gene auf, die mit Hilfe des Functional Annotation Charts der Kategorie "Response to Stimulus" zugeordnet wurden. Aus praktischen Gründen werden an dieser Stelle nur jene Gene aufgeführt, die nicht zugleich in "Defense Response" enthalten sind (siehe Tabelle 3).

GENBANK_ACC	DAVID Gene Name	FDR	FC
	STRESS-ASSOCIATED ENDOPLASMIC		
AL136807	RETICULUM PROTEIN 1	0.00000	4.17
NM_001752	CATALASE	0.00000	3.51
NM_021105	PHOSPHOLIPID SCRAMBLASE 1	0.00016	2.55
NM_000175	GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASE	0.00096	2.42
	PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, NON-		
NM_015967	RECEPTOR TYPE 22 (LYMPHOID)	0.00273	2.33
	HEAT SHOCK PROTEIN 90KDA ALPHA		
NM_007355	(CYTOSOLIC), CLASS B MEMBER 1	0.00161	2.31
NM_001124	ADRENOMEDULLIN	0.00011	2.27
	HEMATOPOIETIC CELL-SPECIFIC LYN		
NM_005335	SUBSTRATE 1	0.00200	2.21
NM_001166	BACULOVIRAL IAP REPEAT-CONTAINING 2	0.01360	2.12
	FC FRAGMENT OF IGG, HIGH AFFINITY IA,		
NM_000566	RECEPTOR (CD64)	0.00022	2.10
	DAMAGE-SPECIFIC DNA BINDING PROTEIN 1,		
NM_001923	127KDA	0.00595	2.05
	ACYL-COA SYNTHETASE LONG-CHAIN FAMILY		
NM_022977	MEMBER 4	0.01609	1.90
NM_005534	INTERFERON GAMMA RECEPTOR 2	0.00439	1.88
NM_000717	CARBONIC ANHYDRASE IV	0.02657	1.87
NM_004079	CATHEPSIN S	0.01898	1.76
NM_020980	AQUAPORIN 9	0.00753	1.76
	PALMITOYL-PROTEIN THIOESTERASE 1		
	(CEROID-LIPOFUSCINOSIS, NEURONAL 1,		
NM_000310	INFANTILE)	0.04897	1.76
NM_005053	RAD23 HOMOLOG A (S. CEREVISIAE)	0.03203	1.75
	HIPPOCAMPUS ABUNDANT GENE TRANSCRIPT-		
NM_032558	LIKE 2	0.04477	1.70

GENBANK_ACC	DAVID Gene Name	FDR	FC
	TUMOR NECROSIS FACTOR (LIGAND)		
AW963062	SUPERFAMILY, MEMBER 13B	0.00426	1.66
NM_012072	CD93 ANTIGEN	0.02185	1.61
	CYTOCHROME P450, FAMILY 1, SUBFAMILY B,		
NM_000104	POLYPEPTIDE 1	0.02600	1.48
NM_014358	C-TYPE LECTIN DOMAIN FAMILY 4, MEMBER E	0.04990	1.34
	TRANSCRIPTION FACTOR 8 (REPRESSES		
NM_030751	INTERLEUKIN 2 EXPRESSION)	0.00679	-1.72
NM_000216	KALLMANN SYNDROME 1 SEQUENCE	0.00256	-1.79
NM_012445	SPONDIN 2, EXTRACELLULAR MATRIX PROTEIN	0.04279	-1.81
AL137763	GRAINYHEAD-LIKE 3 (DROSOPHILA)	0.00868	-1.88
NM_004380	CREB BINDING PROTEIN	0.02253	-1.95
BC015510	REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1	0.00086	-1.96
NM_002180	IMMUNOGLOBULIN MU BINDING PROTEIN 2	0.00504	-2.23

Tabelle 4: DAVID: die am zweitstärksten überrepräsentierte Kategorie "Antwort auf Stimulus" enthält 57 Gene (Thresholds: Count  $\geq$  12, EASE Score  $\leq$  0,01). Dargestellt sind nur jene Gene, die nicht auch in "Defense Response" enthalten sind.

Von den 57 Genen der Kategorie "Response to Stimulus" weisen 42 eine vermehrte, 15 eine verminderte Expression auf. Von den in Tabelle 4 aufgeführten 30 Genen weisen 23 Gene eine vermehrte, 7 Gene eine verminderte Expression auf.

Im Folgenden sollen nur solche Gene genannt werden, die nicht bereits unter 3.4.2.4.1: "Abwehrantwort" (Defense Response) erwähnt wurden.

Zu den vermehrt exprimierten Genen zählen das Stress-associated endoplasmatic reticulum protein 1 (FC: 4,17), Catalase (FC: 3,51), CEBPB (FC: 2,35), BCL6 (FC: 2,00; FDR: 0,01698), Adrenomedullin (FC: 2,27), HSP90AB1 (FC: 2,31), Damage-specific DNA binding protein 1 (FC: 2,05), Interferon γ Rezeptor 2 (FC: 1,88), Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (PTPN22) (FC: 2,33), Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC) (FC: 2,30), TNFSF13B (FC: 1,66) und BIRC2 (FC: 2,12).

Zu den vermindert exprimierten Genen zählen Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) (FC: -1,72), CREB binding protein (FC: -1,95) und Regulator of G-protein signaling 1 (FC: -1,96).

#### 3.3.2.5 Visualisierung in aktuell verfügbaren Pathways

Mit Pathway Explorer wurden die regulierten Gene in aktuell verfügbare Pathways von BioCarta, GenMapp und Kegg gemappt (siehe 2.4.2.5 "Visualisierung in aktuell verfügbaren Pathways"). Es wurde eine Rangliste der Pathways erstellt, die neben dem Namen des jeweiligen Pathways die absolute Zahl und den prozentualen Anteil der gemappten Gene sowie eine Reihe weiterer Angaben enthält. 93 (46,97%) der 198 Gene wurden in einen oder mehrere Pathways gemappt. Die übrigen 105 Gene (53,03%) konnten keinem der 544 verfügbaren Pathways zugeordnet werden.

🥹 Pathway Mapping Center Graz - Mozilla Fi	irefox											Ŀ	- 0 -	x
Datei Bearbeiten Ansicht Chronik Lesez	zeichen	E <u>x</u> tras <u>F</u>	lilfe											1.1
🔇 🕑 - C 🗙 🏠 🎦 http	ps://pa	thwayexplo	rer.genome.tugraz.at/					습·	G٠	Google				٩
🌇 GoPubMed 👿 WikiGenes 🔟 DAVID 🧱	Sourc	ce 😒 Publ	Ved 📄 VPN_Zugang 🎉 LeoDio	t K Kicker	PodMedics	ExpertVillage								
🛞 Bioinformatics Graz									P	athv	vay	Ex	plor	er
	(	P			1	ar,	l VÎ	Web service for	visuali:	zing high	-throug	hput ex	pression	iata
🚯 Tutorial 📙 🖪 🛛 Feedback Cita	ation	Downlo	oad Contact Links	Log in					La	st update	Wed, 2	1 Feb, 2	07 🗗	
Homo Sapiens 👻	🖻 Ch	oose Data	set 🕴 🗋 Ranking 👘 🖓	Filter Datase	t 👘 s	ettings 🛛 🚪	Searc	ch I 🔍 Return Current L	oaded E	)ataset tp	0_only_	mof_he	atmap_z	_rp_oι
RefSeqID (loc2ref)	*	🔒 Save Ra	inking List 🔀 Close	Ranking List										
[544] pathways available (958519310.97%)		STATISTIC	CS	-0- Passe	d UniqIDs		<u>44</u> F	Filtered out UniqIDs	Σ					
🖻 🥮 [2] Pathways (272 9 3.31%)		Mapped to	Pathways	93 0			0		93					
E Self Annotated (272 9 3.31%) E 149 KEGG Pathways (5223 42 0.8%)		Not Mapped to Pathways 105					0		105					
1. Metabolism (2001/22/1.1%)	Σ			198			0		198					1
<ul> <li>2. Genetic Information Processing (85)</li> <li>3. Environmental Information Processing</li> </ul>														-
		No.	⊜ ld		Section		tion	Pathway		eathway UniqID		⊜% Passed UniqID	Filtered UniqID	
Main Categories (2234 30 1.34%)		Σ						547		9588	93	0.97	0	
[83] GenMapp (6423 69 1.07%)		1	go_innate_immune_res	oonse	GenMapp	Biological Proce	ess	innate immune response		271	13	4.8	0	
GO Mapps (5265 61 1.16%)	Ŧ	2	hsa_kay_th12diff		Pathways	Immunology		T HELPER CELLS DIFFERENTIATI PATHWAY	ION	248	9	3.63	0	
4		3	go_apoptosis		GenMapp	Biological Proce	ess	apoptosis		460	7	1.52	0	
		4	go_enzyme_inhibitor_a	ctivity	GenMapp	Molecular Funkt	ion	enzyme inhibitor activity		277	7	2.53	0	
_		5	go_chemotaxis		GenMapp	<b>Biological Proce</b>	ess	chemotaxis		163	7	4.29	0	
		6	go_cytosol		GenMapp	Cellular Compo	nent	cytosol		224	6	2.68	0	
Graz		7	hsa04060		KEGG Pathways	3.3 Ligand-Reco Interaction	eptor	Cytokine-cytokine receptor interacti	on	389	5	1.29	0	
Petersgasse 14, 8010 Graz, Austria		8	go_cytokine_activity		GenMapp	Molecular Funkt	ion	cytokine activity		301	5	1.66	0	-
Sequer lead: 0.28 (14.0%)						© 2006 Institute	a for Cor	nomics and Rininformation Oran University	v of Tech	unology <b>in</b>	ncint		Time	104-05
Fertio						⊌ 2000 - Institute	e ioi Ger	nomics and bioinformatics - Graz University	yortech	nology - In	iprinc /avexploi	er.geno	ne iugraz	24.05
										patrice		Jungenio		

Abbildung 12: Pathway Explorer: Benutzeroberfläche. Am linken Bildrand die Zahl der verfügbaren Pathways, daneben die der gemappten Gene. Die Rangliste ist im unteren Bildanteil erkennbar.

Die in der Rangliste enthaltenen Pathways lassen sich nach unterschiedlichen Kriterien ranken ("Passed UniqID" oder "% Passed UniqID"). Die "Passed UniqID" ist die absolute Zahl der in einen Pathway gemappten Gene. Die "% Passed UniqID" gibt an, wie hoch der prozentuale Anteil gemappter Gene an der Gesamtzahl aller in einem Pathway enthaltenen Gene ist.

#### 3.3.2.5.1 Ranking nach der absoluten Zahl gemappter Gene

Erfolgt die Ordnung der Pathways anhand der "Passed UniqID", wird die Liste von den folgenden Pathways angeführt (siehe Tabelle 5):

	Section	Pothway Nama	Pathway	Passed	% Passed	
	Name	Falliway Name	UniqID	UniqID	UniqID	
1	GenMapp	Antwort der angeborenen Immunität	271	13	4.8	
2	Pathways	T Helfer-Zell Differenzierungs-Pathway	248	9	3.63	
3	GenMapp	Enzym-Inhibitor-Aktivität	277	7	2.53	
4	GenMapp	Chemotaxis	163	7	4.29	
5	GenMapp	Apoptose	460	7	1.52	
6	GenMapp	Zytosol	224	6	2.68	
7	GenMapp	GPCRs, Class A Rhodopsin-like	230	5	2.17	
8	KEGG	Zytokin-Zytokin Rezeptor-Interaktion	389	5	1.29	
9	GenMapp	Zytokin-Aktivität	301	5	1.66	
10	GenMapp	Humorale Immunantwort	235	5	2.13	
		Zelloberflächen-Rezeptor vermittelte				
11	GenMapp	Signaltransduktion	207	5	2.42	
12	GenMapp	Zellmotilität	157	5	3.18	
13	KEGG	Glykolyse / Gluconeogenese	86	5	5.81	
14	KEGG	Axon-Führung	207	4	1.93	
15	GenMapp	Aktin-Bindung	329	4	1.22	
16	KEGG	Fokale Adhäsion	377	4	1.06	
		Selektive Expression von Chemokin-				
17	BioCarta	Rezeptorer während der T Zell-Polarisation	32	3	9.38	
18	KEGG	NK Zell vermittelte Zytotoxizität	183	3	1.64	
19	KEGG	T Zell-Rezeptor-Signaling Pathway	149	3	2.01	
20	KEGG	Insulin-Signaling Pathway	203	3	1.48	
21	BioCarta	Glykolyse Pathway	16	3	18.75	
22	KEGG	Regulation des Aktin-Zytoskeletts	326	3	0.92	
23	KEGG	Regulation des Aktin-Zytoskeletts	325	3	0.92	
24	KEGG	Jak-STAT Signaling Pathway	161	3	1.86	
25	GenMapp	Endozytose	175	3	1.71	
26	GenMapp	Lipid-Biosynthese	202	3	1.49	
27	GenMapp	Lipid-Bindung	207	3	1.45	
28	GenMapp	Zell-Proliferation	351	3	0.85	
29	GenMapp	Translation	206	3	1.46	
30	KEGG	MAPK-Signaling Pathway	454	3	0.66	
31	KEGG	Stärke- und Saccharose-Metabolismus	157	3	1.91	
		Interaktion neuroaktiver Liganden und Re-				
32	KEGG	zeptoren	412	3	0.73	
33	KEGG	Langzeit-Potenzierung	101	3	2.97	
34	KEGG	Antigenprozessierung und -präsentation	117	3	2.56	

35	KEGG	Transendotheliale Migration von Leukozyten	133	3	2.26

Tabelle 5: Pathway Explorer: Dargestellt ist ein Ausschnitt der Rangliste. Die Pathways sind nach "Passed UniqID", der absoluten Zahl gemappter Gene, sortiert.

Auf Platz eins der Rangliste liegt der Pathway "Antwort der angeborenen Immunität" (Innate immune response) von GenMapp (271 enthaltene Gene, davon 13 reguliert). Die Pathways "T Helfer-Zell Differenzierungs-Pathway" (T helper cells differentiation pathway) (248 enthaltene Gene, davon 9 reguliert) und "Enzym-Inhibitor-Aktivität" (Enzyme inhibitor activity) (277 enthaltene Gene, davon 7 reguliert) folgen auf den Plätzen zwei und drei. Trotz dieser auf den ersten Blick relativ hohen Zahl gemappter Gene liegt der prozentuale Anteil gemappter Gene nur bei drei der aufgeführten Pathways über 5 Prozent. Auf die entsprechenden Pathways wird in den folgenden Abschnitten eingegangen werden:

#### 3.3.2.5.2 Ranking nach dem prozentualen Anteil gemappter Gene

Erfolgt die Ordnung anhand der "% Passed UniqID", dem prozentualen Anteil gemappter Gene innerhalb eines Pathways, beginnt die Rangliste mit den folgenden Pathways (siehe Tabelle 6):

	Section	Dethuroutlama	Pathway	Passed	% Passed
	Name	FattiwayName	UniqID	UniqID	UniqID
		Inhibierung der Neurodegeneration im Zusam-			
1	BioCarta	menhang mit Morbus Huntington	5	1	20
		Konversion von Proepithelin zu Epithelin und			
2	BioCarta	Wund-Reparatur-Kontrolle	5	1	20
3	BioCarta	Glykolyse Pathway	16	3	18.75
4	KEGG	Retinol Metabolismus	6	1	16.67
5	BioCarta	Regulatoren der Knochen-Mineralisation	6	1	16.67
6	BioCarta	IFN gamma Signaling Pathway	7	1	14.29
		Katabolische Pathways für Arginin, Histidin, Glu-			
7	BioCarta	tamat, Glutamin und Prolin	7	1	14.29
		Informations-verarbeitender Pathway am IFN-			
8	BioCarta	beta Enhancer	8	1	12.5
9	KEGG	Methan Metabolismus	17	2	11.76
		IL-10-abhängiger antiinflammatorischer			
10	BioCarta	Signaling Pathway	9	1	11.11

	Section	Defining Nores	Pathway	Passed	% Passed
	Name	PatnwayName	UniqID	UniqID	UniqID
		Pelp1 Modulation der Östrogen-Rezeptor-			
11	BioCarta	Aktivität	9	1	11.11
		Selektive Expression von			
		Chemokinrezeptoren während der T Zell-			
12	BioCarta	Polarisation	32	3	9.38
13	BioCarta	Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten	22	2	9.09
		Zellen und Moleküle, die an einer lokalen akuten			
14	BioCarta	Entzündungsantwort beteiligt sind	22	2	9.09
15	BioCarta	SARS Coronavirus Protease	11	1	9.09
16	BioCarta	Zytokin-Netzwerk	24	2	8.33
17	BioCarta	Durch freie Radikale induzierte Apoptose	12	1	8.33
		SUMOylierung als ein Mechanismus zur Modula-			
18	BioCarta	tion CtBP-abhängiger Gen-Antworten	13	1	7.69
		Pertussis Toxin-insensitives CCR5-Signaling in			
19	BioCarta	Makrophagen	27	2	7.41
		Aktivierung von Csk durch cAMP-abhängige			
		Protein-Kinase inhibiert Signaling durch den T			
20	BioCarta	Zell-Rezeptor	27	2	7.41
		Regulation der Transkription von CARM1 durch			
21	BioCarta	Methyltransferase	14	1	7.14
22	GenMapp	Cholesterol Biosynthese	14	1	7.14
		Rolle von PPAR-gamma Coaktivatoren in			
23	BioCarta	Adipositas und Thermogenese	14	1	7.14
		Down-Regulation von MTA-3 in ER-negativen			
24	BioCarta	Brusttumoren	15	1	6.67
		Acetylierung und Deacetylierung von RelA im			
25	BioCarta	Nukleus	15	1	6.67
26	GenMapp	Nukleotid-GPCRs	16	1	6.25
27	BioCarta	Oberflächenmoleküle von T Helfer-Zellen	16	1	6.25
28	BioCarta	Zytokine und Entzündungsantwort	33	2	6.06
		Regulation von MAP Kinase Pathways durch			
29	BioCarta	Dual Specificity Phosphatasen	17	1	5.88
30	BioCarta	Granzym A-vermittelter Apoptose Pathway	17	1	5.88
31	BioCarta	Oberflächenmoleküle von zytotoxischen T Zellen	17	1	5.88
32	KEGG	Glykolyse / Glukoneogenese	86	5	5.81

Tabelle 6: Pathway Explorer: Dargestellt ist ein Ausschnitt der Rangliste. Die Pathways sind nach "% Passed UniqID", dem prozentualen Anteil gemappter Gene, sortiert.

Bei der Analyse der Rangliste ist neben dem prozentualen Anteil gemappter Gene auch die so genannte "Pathway UniqueID", die Gesamtzahl der in ein einem Pathway enthaltenen Gene, zu berücksichtigen, denn: je niedriger die Gesamtzahl der Gene innerhalb eines Pathway ist, desto weniger Aussagekraft besitzt ein hoher prozentualer Anteil gemappter Gene – und umgekehrt. Lediglich drei von elf Pathways mit einer "% Passed UniqueID" > 5 enthalten mehr als zwei differenziell regulierte Gene: "Glykolyse Pathway" (Glycolysis Pathway) von Biocarta (an 3. Stelle; 16 enthaltene Gene, davon 3 reguliert), "Selektive Expression von Chemokinrezeptoren während der T Zell-Polarisation" (Selective expression of chemokine receptors during T-cell polarization) von Biocarta (an 12. Stelle; 32 enthaltene Gene, davon 3 reguliert) und "Glykolyse / Glukoneogenese" (Glycolysis / Gluconeognesis) von Kegg (an 32. Stelle; 86 enthaltene Gene, davon 5 reguliert).

#### 3.3.2.5.2.1 Glykolyse / Glukoneogenese

Der auffälligste Pathway ist der an dritter Stelle aufgeführte "Glykolyse Pathway" (Glycolysis Pathway) von BioCarta (BioCarta, San Diego, CA, USA: www.biocarta.com). Drei der sechzehn enthaltenen Gene (18,75%) zeigen eine signifikant differenzielle Regulation. Bei den gemappten Genen handelt es sich um die Hexokinase 1, die Glukose-6-phopsphat-Isomerase sowie die Phosphoglyceratkinase 1 (siehe Abbildung 13). Nicht dargestellt ist die Phosphofruktokinase 2 / Fruktose-2,6-Bisphosphatase.



Experiments: (Homo Sapiens|tp0\_only\_mof\_heatmap\_z\_rp\_out\_annot\_all\_sort\_FDR\_005\_PWE\_in.txt)



Abbildung 13: BioCarta Pathway: "Glykolyse": Im Pathway sind die Hexokinase 1, die Glukose-6phosphat-Isomerase sowie die Phosphoglyceratkinase dargestellt. Die erste Hälfte des farbigen Balkens gibt jeweils den Fold Change, die zweite Hälfte die False Discovery Rate an. Die Legende ist oberhalb des Pathways abgebildet. Der an 32. Stelle genannte Pathway "Glykolyse / Glukoneogenese" (Glycolysis / Gluconeogenesis) von Kegg (nicht abgebildet) enthält insgesamt 86 Gene. Fünf dieser Gene (5,81%) sind als signifikant differenziell reguliert gekennzeichnet. Zu den gemappten Genen zählen neben den drei bereits erwähnten die Laktatdehydrogenase A sowie die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase.

# 3.3.2.5.2.2 Selektive Expression von Chemokinrezeptoren während der T Zell-Polarisierung

Weniger auffällig ist der an zwölfter Stelle aufgeführte Pathway "Selektive Expression von Chemokinrezeptoren während der T Zell-Polarisation" (Selective expression of chemokine receptors during T-cell polarization) von Biocarta. Er enthält 32 Gene, von denen 3 signifikant differenziell reguliert sind, und weist mit 9,38% einen deutlich geringeren prozentualen Anteil gemappter Gene auf. Bei den gemappten Genen handelt es sich um die bereits weiter oben beschriebenen Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4: im Pathway als MIP-1B bezeichnet) und Interferon  $\gamma$  Rezeptor 2 (IFNGR2).



Experiments: (Homo Sapiens|tp0\_only\_mof\_heatmap\_z\_rp\_out\_annot\_all\_sort\_FDR\_005\_PWE\_in.txt)

Abbildung 14: BioCarta Bathway: "Selektive Expression von Chemokin-Rezeptoren während der T Zell-Polarisation": Im Pathway sind Chemokine (C-X-C motif) receptor 4, Chemokine (C-C motif) ligand 4 sowie Interferon γ Rezeptor 2 dargestellt. Die erste Hälfte des farbigen Balkens gibt den Fold Change, die zweite Hälfte die False Discovery Rate an. Die Legende ist oberhalb des Pathways abgebildet.

#### 3.3.2.6 Analyse mit "Ingenuity Pathways Analysis"

Mit Ingenuity Pathways Analysis (IPA) wurden die bisherigen Analyseschritte ergänzt und erweitert. Hierfür wurden sämtliche 7464 Gene (siehe 3.3.2.1 "Errechnung von Rang-Produkten") in Ingenuity importiert. Insgesamt 6900 Gene gingen in die weitere Analyse mit ein, die übrigen 564 wurden nicht berücksichtigt. Für die FDR wurde ein Cut-off von 0,05 angegeben. In die Erstellung von Netzwerken gingen 163 der 198 signifikant differenziell regulierten Gene ein. Der Datensatz wurde dann mit den verschiedenen Modulen weiter analysiert.

#### 3.3.2.6.1 Associated Network Functions

Mit Hilfe von Ingenuity konnten zahlreiche der signifikant differenziell regulierten Gene verschiedenen Netzwerken mit jeweils unterschiedlichen Funktionen zugeordnet werden (siehe Abbildung 15). Das an erster Stelle aufgeführte Netzwerk mit den Funktionen "Genexpression", "Zell-Zell-Signaling" und "Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems" enthielt im Ganzen 26 Gene. Dem an zweiter Stelle genannten Netzwerk mit den Hauptfunktionen "Entzündungsantwort", "Entwicklung und Funktion des Nervensystems" und "Gewebsentwicklung" wurden 17 Gene zugewiesen. In den an dritter bis fünfter Stelle aufgeführten Netzwerken fanden sich jeweils 17, 16 beziehungsweise 15 signifikant differenziell regulierte Gene.

FDR_all_cu	ıt_005_filter - 2009-04-18 04:10 PM	** <b>*</b> 2 ×				
Summary Networks Functions Canonical Pathways Lists Pathways Molecules Network Explorer Ov						
Analysis settings						
Top Networks						
ID	Associated Network Functions	Score				
1 View	Gene Expression, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Fu	nction 50				
2 View	Inflammatory Response, Nervous System Development and Function, Tissue Development	28				
3 View	Immunological Disease, Antigen Presentation, Cell-mediated Immune Response	26				
4 View	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	25				
5 View	Cancer, Cellular Movement, Dermatological Diseases and Conditions	23 👻				
•						

Abbildung 15: Ingenuity Pathways Analysis: Associated Network Functions: Von oben nach unten aufgeführt sind die fünf Netzwerke, die die größte Zahl signifikant differenziell regulierter Gene enthalten.



Network 1 : FDR\_all\_cut\_005\_filter - 2009-04-18 04:10 PM : Ingenuity\_FDR\_all.txt : FDR\_all\_cut\_005\_filter - 2009-04-18 04:10 PM

© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abbildung 16: Ingenuity Pathways Analysis: Associated Network Functions: Abgebildet ist das an erster Stelle aufgeführte Netzwerk mit den Funktionen "Genexpression", "Zell-Zell-Signaling" und "Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems". Gut sichtbar wird die zentrale Bedeutung der Transkriptionsfaktoren CEBPA, CEBPB und CREBBP für die Regulation zahlreicher differenziell regulierter Gene. Gene mit einer signifikant vermehrten Expression sind rot hinterlegt, Gene mit einer signifikant verminderten Expression grün. Grau hinterlegte Gene zeigen keine signifikant differenzielle Expression, weiß hinterlegte Gene wurden nicht gemessen. Zytokine werden durch Rechtecke, Enzyme durch Rauten, Transkriptionsfaktoren durch liegende Ovale, Transmembranrezeptoren durch stehende Ovale, alle Anderen durch Kreise symbolisiert. Direkte Interaktionen zwischen den dargestellten Proteinen sind durch durchgezogene, indirekte Interaktionen durch gestrichelte Linien dargestellt. Für weitere Informationen bezüglich CEBPA siehe Tabelle 8 unter 3.3.2.7.1. Für weitere Informationen bezüglich CEBPB siehe Tabelle 8 unter 3.3.2.7.1, 3.3.2.8.1.2 "Mit neutrophilen Granulozyten assoziierte Gene" sowie 3.3.2.8.1.6 "Neutrophile Granulozyten - Zusammenfassende Darstellung".

#### 3.3.2.6.2 Top Bio Functions

Mit Hilfe von Ingenuity wurde eine funktionelle Analyse durchgeführt, in der die signifikant differenziell regulierten Gene mit biologischen Funktionen aus der Ingenuity Wissensbasis in Verbindung gebracht wurden. Die Signifikanz der aufgeführten Kategorien wird durch den jeweils zugeordneten p-Wert ausgedrückt.



Abbildung 17: Abgebildet sind die sieben signifikantesten Kategorien: "Antigenpräsentation", "zellvermittelte Immunantwort", Humorale Immunantwort", Entzündungsantwort", "Infektiöse Erkrankung", "Respiratorische Erkrankung" und "Funktionsstörung des Bindegewebes".

#### 3.3.2.6.3 Top Canonical Pathways

Mit Hilfe von Ingenuity wurden die signifikant differenziell regulierten Gene in die verfügbaren Pathways gemappt. Es wurde eine Rangliste erstellt, in der sämtliche Pathways anhand ihres p-Wertes gerankt werden.

Angeführt wird die Liste von "Glykolyse / Glukoneogenese". Der Pathway weist mit 5,82E<sup>-04</sup> den niedrigsten p-Wert auf. Sechs der 141 enthaltenen Gene zeigen eine signifikant differenzielle Expression. An zweiter bis vierter Stelle liegen die Pathways "Fremdstoff-Metabolismus-Signaling", "Chemokin-Signaling", "Methan-Metabolismus" und "Glukokortikoidrezeptor-Signaling" (siehe Abbildung 18).

FDR_all_cut_005_filter - 2009-04-18 04:10 PM						
Summary Networks Functions Canonical Pathways Lists Pathways Molecules				Þ		
2						
Analysis settings			1900	▲ 3000		
Top Networks						
<b>Top Bio Functions</b>						
Top Canonical Pathways						
Name	p-value		Ratio			
Glycolysis/Gluconeogenesis	5,82E-04		6/141 (0,043)			
Xenobiotic Metabolism Signaling	5,96E-03		9/242 (0,037)			
Chemokine Signaling	6,46E-03		5/75 (0,067)			
Methane Metabolism	7,65E-03		2/65 (0,031)			
Glucocorticoid Receptor Signaling	1,08E-02		10/276 (0,036)	•		
•	5555555					

Abbildung 18: Aufgeführt sind die fünf Pathways mit den niedrigsten p-Werten. Neben den p-Werten wird unter "Ratio" auch der Quotient aus der Zahl der signifikant differenziell regulierten Gene und der Gesamtzahl aller im Pathway enthaltenen Gene angezeigt.

#### 3.3.2.7 Analyse mit "BioBase ExPlain"

Die bisherigen Analyseschritte wurden mit BioBase ExPlain ergänzt und erweitert. 187 der 198 signifikant differenziell regulierten Gene wurden von BioBase ExPlain erkannt. Die 187 Gene enthalten 345 Promotoren und codieren für 125 Moleküle. In aufeinander folgenden Schritten wurden eine Stromaufwärtsanalyse, bestehend aus einfacher Promotorenanalyse, erweiterter Promotorenanalyse und Knotenpunktana-
lyse, sowie eine Stromabwärtsanalyse, bestehend aus einer funktionellen Klassifizierung, durchgeführt.

#### 3.3.2.7.1 Einfache Promotorenanalyse

Mit Hilfe der einfachen Promotorenanalyse wird nach überrepräsentierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den Promotoren der signifikant differenziell regulierten Gene gesucht. Für die Analyse wurden die Standardeinstellungen mit Cut-off-Optimierung und einem proximal gelegenen Promotorenfenster von -500bp bis 100bp verwendet (500 Basenpaare stromaufwärts bis 100 Basenpaare stromabwärts). Als Hintergrund der Berechnungen dienten die Promotoren des nicht überlappenden Sets humaner Haushaltsgene "Human housekeeping genes [548, 87, 892, 463]". Im Folgenden eine Liste der zehn am stärksten überrepräsentierten Matrices:

Matrixname	Ja (Stellen/1000bp)	Nein (Stel- len/1000bp)	Ja/Nein	p-Wert	p-Wert passen- der Promotoren
<u>V\$EVI1_04</u>	0,2914	0,0518	5,6265	3,4271E-09	0,0012
<u>V\$IPF1_03</u>	0,173	0,0366	4,7327	0,000021046	0,0083
<u>V\$OCT1_07</u>	0,1821	0,0396	4,5985	0,000016184	0,000013242
<u>V\$EVI1_01</u>	0,3279	0,0731	4,4836	1,0512E-08	0,00065553
<u>V\$OCT4_01</u>	0,2459	0,0548	4,4836	7,202E-07	3,7281E-06
<u>V\$HNF3_Q6</u>	0,173	0,0396	4,3686	0,000039603	0,000034862
<u>V\$EVI1_02</u>	0,1913	0,0457	4,1847	0,000022706	0,001
<u>V\$EVI1_03</u>	0,2641	0,064	4,1277	7,6531E-07	0,0001852
<u>V\$TITF1_Q3</u>	0,173	0,0427	4,0566	0,000071385	0,000064796
<u>V\$FOXP3_Q4</u>	0,2186	0,0579	3,7756	0,000016766	0,000023988

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt die zehn am stärksten überrepräsentierten Matrices (Ja/Nein-Ratio). Aus den Spalten "Ja" / "Nein" geht hervor, wie häufig die jeweilige Transkriptionsfaktorbindungsstelle in der Gruppe der signifikant differenziell regulierten Gene / dem Hintergrundset humaner Haushaltsgene zu finden war.

Im nächsten Schritt trifft ExPlain eine Vorhersage über den Einfluss stromaufwärts liegender Transkriptionsfaktoren, indem es – ausgehend von der oben beschriebe-

nen Überrepräsentation der verschiedenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen – eine Liste passender, potentiell bedeutsamer Transkriptionsfaktoren generiert. Aus dieser Liste wurde ein Subset von 64 Transkriptionsfaktoren erstellt, deren Matrices sich durch eine 2-fache Überrepräsentation, einen p-Wert < 0.001 sowie einen p-Wert passender Promotoren < 0.001 auszeichnen. In der Annahme, dass Transkriptionsfaktoren, die einen relevanten Einfluss auf die Expression ihrer Zielgene nehmen, sich ebenso wie ihre Zielgene durch eine differenzielle Regulation auszeichnen, wurde daraufhin im folgenden Schritt im Set der signifikant differenziell regulierten Gene nach den von ExPlain als bedeutsam vorhergesagten Transkriptionsfaktoren pranskriptionsfaktoren eine signifikant differenzielle Regulation auf:

Gensymbol	BKL Beschreibung	FC	FDR
	B-cell CLL-lymphoma 6; ein Repressor der Transkription, der an Antiapoptose beteiligt ist; Entwicklung der Epidermis; Re- gulation der Zellproliferation; vermehrt exprimiert in Neoplasien von Brust und Haut; Genmutation verursacht folli-		
BCL6	kuläre und non-Hodgkin-Lymphome	1.995	0.017
	CCAAT-enhancer binding protein alpha; ein Transkriptions- faktor, der an der Differenzierung myeloider Zellen beteiligt ist; aberrante Expression ist mit Adipositas assoziiert; hepatozelluläre Karzinome und verschiedene weitere Neoplasien; Genmutation verursacht myelodysplastische	0.404	0.000
	Syndrome	2.101	0.002
	CCAAT-enhancer binding protein beta; ein Aktivator der Transkription, der eine Rolle in der IL-8 Biosynthese spielt; Arrest des Zellzyklus; erhöhte Expression korreliert mit Mor- bus Alzheimer; kolorektales Karzinom; hepatozelluläres Kar-		
<u>CEBPB</u>	zinom und multiple Neoplasien	2.346	0.000
	GATA-binding protein 3; ein Regulator der Transkription, der am Chromatin-Remodeling beteiligt ist; Entwicklung der Haut und Formation der Riechplakode; vermindert exprimiert bei Hodgkin-Lymphomen; Genmutation verursacht Hypoparathyroidismus und Taubheit; mRNA ist in Psoriasis	-	
<u>GATA3</u>	vermindert exprimiert	1.845	0.043

Tabelle 8: Die Tabelle zeigt diejenigen der von ExPlain als bedeutsam vorhergesagten Transkriptionsfaktoren, die sich durch eine signifikant differenzielle Expression auszeichnen. Für weitere Informationen bezüglich CEBPA siehe 3.3.2.6.1 "Associated Network Functions", Abbildung 16 sowie 4.2.2.6.4 "Hypoxie". Für weitere Informationen bezüglich CEBPB siehe 3.3.2.6.1 "Associated Network Functions", Abbildung 16 sowie 3.3.2.8.1.2 "Mit neutrophilen Granulozyten assoziierte Gene". Für weitere Informationen bezüglich GATA3 siehe 3.3.2.8.2 "Natürliche Killerzellen".

Die differenzielle Expression der vier Transkriptionsfaktoren legt – ebenso wie die von ExPlain vorhergesagte Überrepräsentation der zugehörigen Bindungsstellen – eine reale differenzielle Regulation weiter stromabwärts gelegener Zielgene nahe.

#### 3.3.2.7.2 Erweiterte Promotorenanalyse

Mit Hilfe der erweiterten Promotorenanalyse wird wie unter 2.4.2.7.2 "Erweiterte Promotorenanalyse" beschrieben ein Komposit Modul – eine Kombination von Transkriptionsfaktorbindungsstellen – gesucht, das eine optimale Diskrimination zwischen Promotoren des Sets signifikant differenziell regulierter Gene und Promotoren des Hintergrund-Sets ermöglicht.

Für den ersten Schritt der Analyse wurden die Standardeinstellungen mit einem proximal gelegenen Promotorenfenster von -500bp bis 100bp ohne Cut-off Optimierung verwendet; als Hintergrund der Berechnungen dienten die Promotoren des nicht überlappenden Sets humaner Haushaltsgene "Human housekeeping genes [548, 87, 892, 463]". Für den zweiten Schritt wurden ein Stop nach 500 Iterationen und eine Populationsgröße von 500 voreingestellt. Gesucht wurde nach zehn Paaren mit einer Distanz von 3 bis 80 Basenpaaren und einer Modulgröße von 200. Hierbei wurden die einzelnen Faktoren je nach Gewichtung in unterschiedlichem Maße berücksichtigt (optimized factors impact).



Abbildung 19: Die Abbildung zeigt das Promotorenmodell mit der höchsten Fitness-Score. Es besteht aus zehn Matrixpaaren. Der p-Wert des berechneten Modells wird mit 3.2901e<sup>-36</sup>, die Wahrscheinlichkeit falsch positiver (FP) beziehungsweise falsch negativer (FN) Ergebnisse mit 34.55% beziehungsweise mit 13.66%, der Gesamt Cut-off mit 0.084394 angegeben.

Im letzten Schritt der erweiterten Promotorenanalyse werden nun die Promotoren der Gene, die keine signifikant differenzielle Regulation aufwiesen, mit Hilfe des gespeicherten Promotorenmodells (siehe Abbildung 19) durchsucht, um auf diese Weise weitere Gene zu identifizieren, die zu dem errechneten Modell passen. Dabei wird angenommen, dass die Höhe der berechneten Sequenz-Score mit der Ähnlichkeit der Promotorenstruktur korreliert: je höher die Score eines Gens, desto mehr ähneln seine Promotoren dem errechneten Promotorenmodell.

Unter den so identifizierten Genen mit der höchsten Sequenz Score finden sich unter anderem Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3; FC: 1,29; FDR: 0,7) mit einer Score von 0,304 oder Serum Amyloid A4 (SAA4; FC: 1,09; FDR: 1,19) mit einer Score von 0,274. Leptin Receptor overlapping transcript (LEPROT; FC: -1,53; FDR: 0,12) weist mit 0,323 die höchste Score auf.

#### 3.3.2.7.3 Knotenpunktanalyse

Die Knotenpunktanalyse dient der Suche nach stromaufwärts gelegenen Schlüsselmolekülen, die die Aktivität der mit F-MATCH und CMA identifizierten Transkriptionsfaktoren regulieren. Weitere Informationen über den zu Grunde liegenden Algorithmus finden sich in Kapitel sieben des ExPlain 3.0 Benutzerhandbuchs unter http://explain30.biobase.de/biobase/ExPlain 3.0/doc/NWA.html. Als Genset diente eine aus zwei Sets zusammengefügte Liste, die neben den Transkriptionsfaktoren des Promotorenmodells die mit F-MATCH ermittelten Transkriptionsfaktoren mit einer "Ja"/"Nein"-Ratio > 2.0 enthielt. Es wurde ein maximaler Radius von vier Molekülen angegeben und eine FDR < 0.05 als Schwellenwert voreingestellt. Genregulations- und Transregulationsreaktionen wurden bei der Suche nach stromaufwärts gelegenen Knotenpunkten ebenso berücksichtigt wie annotierte Pathways und Reaktionsketten.

Biobase ExPlain ermittelte 44 Knotenpunkte mit einer FDR < 0.05; die maximale Signifikanz-Score lag bei 4.35 (siehe Tabelle 9), die minimale Signifikanz-Score bei 1,48.

Molekülname	Trafferzahl im Netzwerk	Distanz	Zahl nicht relevanter erreichbarer Knoten	Score	FDR
MEKK1	26	4	165	4,35376	0,02
МАРКАРК2	20	4	113	3,51351	0,026
p38beta2	18	4	91	2,99411	0,012
<u>AR (NR3C4): p300</u>	13	4	61	2,95661	0,032
RAD23A	13	4	61	2,95661	0,032
ROCK2	13	4	63	2,94434	0,032
<u>SIRT1</u>	15	4	69	2,92891	0,006
<u>RhoA</u>	13	4	67	2,92134	0,038
<u>AKT1</u>	15	4	82	2,8124	0,034
PDK2	15	4	83	2,80868	0,034
ILK	15	4	88	2,79094	0,042
ING1b	15	4	96	2,63868	0,044
<u>НІРК2</u>	15	4	69	2,56001	0,01
<u>SKIP</u>	13	4	69	2,50116	0,048
calcitriol: VDR{pS51} {pS208}:					
9-cis-retinoic acid: RXR-alpha	13	4	69	2,50116	0,048

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt die 15 Knotenpunkte mit einer Score > 2.5. Die Trefferzahl im Netzwerk gibt die Zahl von Inputmolekülen an, die innerhalb der geforderten Distanz mit dem jeweiligen Knotenpunkt verbunden sind. Die Anzahl nicht relevanter erreichbarer Knoten gibt die Zahl der Moleküle an, die innerhalb der geforderten Distanz lagen, in der Inputliste jedoch nicht aufgeführt waren. Die Tabelle wurde mit Biobase ExPlain erstellt und leicht modifiziert (Englische Begriffe wurden übersetzt und die Spalten "molecule classification", "hits list" und "Z-score" gestrichen).



Abbildung 20: Die Abbildung stellt das von dem Knotenpunkt MEKK1 ausgehende Netzwerk graphisch dar. Für die Abbildung wurde das von BioBase generierte Netzwerk modifiziert: irrelevante Moleküle wurden entfernt, relevante Moleküle hinzugefügt. Pfeile weisen auf eine Beeinflussung der nachgeschalteten Gene hin, wobei die grünen Quadrate für Aktivierung und rote für Inhibierung stehen. Für gelbe und braune Quadrate ist die exakte Art der Beeinflussung in Biobase nicht beschrieben. NF-IL6-1 / NF-IL6-3 entspricht dem Transkriptionsfaktor CCAAT/enhancer binding protein,  $\beta$ (CEBPB). Eine farblich codierte Darstellung der Expressionswerte war nicht möglich. Anbei die Werte der signifikant differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren: CBP (FC:-1.95; FDR:0.02); C/EBP,  $\alpha$ (FC: 2,10; FDR: 0,00); NF-IL6-1 / NF-IL6-3 (FC: 2,34; FDR: 0,00). Signifikant vermehrt exprimiert werden BCL6, S100A9, IL8, MPO, LTF, CTSS sowie NCF2; nur GNLY weist eine signifikant verminderte Expression auf. Weitere Informationen zu verschiedenen der abgebildeten Gene sind unter 3.3.2.8.1.2 "Mit neutrophilen Granulozyten assoziierte Gene" zu finden.

#### 3.3.2.7.4 Funktionelle Analyse

Von den 198 der Analyse zugeführten, signifikant differenziell regulierten Genen wurden 179 Gene erkannt. Die übrigen 19 Gene blieben unberücksichtigt. Das verbliebene Gen-Set enthielt demnach 187 Gene, 38 Matrices, 345 Promotoren und 125 Moleküle. Die Gene wurden mit Hilfe der BKL Datenbank klassifiziert. Die manuell gepflegte Datenbank basiert auf den Terms der entsprechenden Gene Ontology Hierarchie. Weitere Informationen hierzu finden sich in Kapitel vier des Benutzerhandbuchs unter

http://explain30.biobase.de/biobase/ExPlain\_3.0/doc/FAinterface.html#user-functioninterface.

Die Ergebnisse der mit ExPlain <sup>92</sup> durchgeführten funktionellen Analyse ähneln denen der funktionellen Annotierung mit DAVID. Am stärksten überrepräsentiert ist erneut die Gruppe "Abwehrantwort" (Defense Response) mit einem p-Wert von 1.90407e<sup>-15</sup>.

GO Ken-	GO Term	Trefferzahl in	Größe der	erwartete	p-Wert	
nung		der Gruppe	Gruppe	Trefferzahl		
<u>GO:0006952</u>	Abwehrantwort	47	1182	13	1,9041E-15	
<u>GO:0006954</u>	Entzündungsantwort	33	718	8	1,3165E-12	
<u>GO:0002376</u>	Immunsystem-Prozess	55	1892	21	2,2324E-12	
	Antwort auf Verwun-					
<u>GO:0009611</u>	dung	40	1078	12	3,482E-12	
<u>GO:0006955</u>	Immunantwort	42	1208	14	7,3477E-12	
	Antwort auf externen					
<u>GO:0009605</u>	Stimulus	47	1620	18	1,659E-10	
<u>GO:0006950</u>	Stressantwort	67	2926	32	2,0017E-10	
	Antwort auf anderen					
<u>GO:0051707</u>	Organismus	34	964	11	7,5418E-10	
<u>GO:0050896</u>	Antwort auf Stimulus	96	5306	58	1,2106E-09	
	Positive Regulation von					
<u>GO:0040017</u>	Bewegung	10	66	1	2,09754E-09	

Tabelle 10: Die Tabelle zeigt die Top Ten der am stärksten überrepräsentierten Gruppen. An erster Stelle steht erneut die Gruppe "Abwehrantwort" (Defense Response).

#### 3.3.2.8 Schwerpunkte der Analyse

Bei der Untersuchung der signifikant differenziell regulierten Gene mit STRIPE, DAVID, Pathway Explorer, Ingenuity Pathways Analysis und BioBase ExPlain konnten verschiedene biologische Schwerpunkte identifiziert werden, die in der Pathogenese der konnatalen Infektion eine besondere Rolle zu spielen scheinen. Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden.

#### 3.3.2.8.1 Neutrophile Granulozyten

Mit DAVID ließ sich eine deutliche Überrepräsentation von Genen nachweisen, die im direkten Zusammenhang mit einer Abwehrreaktion des Organismus stehen (siehe Tabelle 2): In der Gruppe der erkrankten Kinder zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression insbesondere solcher Gene, die mit der Migration, Chemotaxis, Aktivierung und Degranulierung neutrophiler Granulozyten assoziiert sind. Hierzu zählen neben den Calgranulinen A, B und C weitere Gene wie Myeloperoxidase, Lactotransferrin, Neutrophil cytosolic factor 2, Peptidoglycan recognition protein 1 oder Interleukin 8. Gene, die an Prozessen wie Chemotaxis, der Prozessierung und Präsentation von Antigenen oder der Reparation von DNA-Schäden beteiligt sind, wurden in der Gruppe der Kinder mit neonataler Sepsis ebenfalls signifikant höher exprimiert.

#### 3.3.2.8.1.1 Calgranuline

Alle drei der mit DAVID identifizierten Calgranuline, Calgranulin A (FC: 2,07; FDR: 0,00066), B (FC: 2,14; FDR: 0,00112) und C (FC: 2,42; FDR: 0,00003), werden in der Gruppe der Kinder mit konnataler Infektion signifikant vermehrt exprimiert: die FCs der drei Gene liegen jeweils über 2, die FDRs unter 0,01.

Calgranuline sind mit Myelozyten assoziierte Calcium bindende Proteine. Sie werden in neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf hohem Niveau exprimiert und gehören der S100 Familie an <sup>93</sup>. Calgranulin A und B bilden gemeinsam ein unter dem Namen Calprotectin bekanntes Heterodimer <sup>90</sup>. Das von Neutrophilen sezernierte Calprotectin (siehe Abbildung 21) ist ein wichtiger proinflammatorischer Mediator in akuten und chronischen Entzündungsreaktionen. Calgranulin C, auch bekannt unter den Namen S100A12 oder ENRAGE (extracellular newly identified RAGE-binding protein) <sup>94</sup>, ist ein von aktiven neutrophilen Granulozyten sezernierter Chemoattraktor. Es induziert die Mobilisierung Neutrophiler aus dem Knochenmark und fördert ihre Migration in entzündetes Gewebe <sup>95</sup>. Die Rezeptoren für einige Mitglieder der S100-ähnlichen Proteine werden als RAGE (Receptor for advanced glycosylation end products) bezeichnet.

## 3.3.2.8.1.2 Mit neutrophilen Granulozyten assoziierte Gene

In der Kategorie "Defense Response" waren insgesamt acht Gene enthalten, die direkt mit neutrophilen Granulozyten assoziiert sind: Sechs dieser acht Gene – CEBPB (FC: 2,35; FDR: 0,00044), Neutrophil cytosolic factor 2 (FC: 2,08; FDR: 0,00428), Myeloperoxidase (FC: 2,24; FDR: 0.00013), Lactotransferrin (FC: 2,82; FDR: 0,00000), Formyl peptide receptor 1 (FC: 2,26; FDR: 0,00018) und Peptidoglycan recognition protein 1 (FC: 2,42; FDR: 0,0012) – werden mit einem Fold Change > 2 und einer False Discovery Rate < 0,01 signifikant höher exprimiert. Die übrigen zwei – Azurocidin1 (FC: 1,57; FDR: 0,00126) und Interleukin 8 (FC: 1,19; FDR: 0,00283) – weisen ebenfalls eine signifikant vermehrte Expression auf (FDR jeweils < 0,01), die jedoch weniger stark ausgeprägt ist. Nicht alle der signifikant differenziell regulierten und mit neutrophilen Granulozyten assoziierten Gene werden in der Kategorie "Defense Response" aufgeführt. Neben den bereits genannten Genen werden auch Grancalcin, Serpin B1 und CD177 in der Gruppe der erkrankten Kinder signifikant vermehrt exprimiert.



Abbildung 21: Ein neutrophiler Granulozyt mit verschiedenen antimikrobiellen Molekülen und ihren jeweiligen Ursprungskompartimenten <sup>96</sup>.

CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), β (CEBPB) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedener Proteine, die im Zusammenhang mit wichtigen Funktionen von Makrophagen oder Neutrophilen stehen, reguliert: Lysozym, Myeloperoxidase, neutrophile Elastase, CSF3 / G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) sowie verschiedene Rezeptoren <sup>97 - 102</sup>. Für weitere Informationen siehe auch Tabelle 8. Azurocidin (AZU1) ist ein antimikrobiell wirksames Protein in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten (siehe Abbildung 21), das ebenso wie die neutrophile Elastase, die Protease 3 und Cathepsin G zur Familie der Serprocidine gezählt wird. AZU1 ist ein wichtiger multifunktioneller Entzündungsmediator: es reguliert die Migration und Differenzierung von Monozyten und verfügt darüber hinaus über eine starke antibiotische Aktivität gegen gramnegative Bakterien <sup>103</sup>. Neutrophil cytosolic factor 2 (NCF2) ist eine Untereinheit der aus mehreren Proteinen bestehenden NADPH Oxidase in neutrophilen Granulozyten. Es erzeugt den so genannten superoxidativen Burst. Das hierbei entstehende Hyperoxid-Anion  $(O_2)$ bildet die Grundlage unterschiedlicher antimikrobiell wirksamer Verbindungen <sup>96</sup>. Myeloperoxidase (MPO) ist ein in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten enthaltenes Enzym. Es wandelt das relativ harmlose Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in andere. schlagkräftigere Antiseptika um: hypobromige Säure (HOBr), hypoiodige Säure (HOI), hypochlorige Säure (HOCI) und Chloramine <sup>96</sup>. MPO ist vermutlich an der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen bei Frühgeborenen mit RDS beteiligt <sup>104</sup>. Lactotransferrin (LTF) ist ein in den sekundären oder spezifischen Granula neutrophiler Granulozyten gespeichertes Eisen bindendes Protein<sup>105</sup>, das zu den Transferrinen gerechnet wird. Es wirkt antimikrobiell und antiinflammatorisch und hat daneben eine Vielzahl weiterer Funktionen. Formyl peptide receptor 1 (FPR1) ist ein G Protein-gekoppelter Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Es hat eine hohe Affinität zu den chemotaktisch stark wirksamen bakteriellen Formyl-Peptiden und vermittelt Chemotaxis, Degranulation und Hyperoxid-Produktion <sup>106, 107</sup>. Das in den tertiären Granula neutrophiler Granulozyten gespeicherte Peptidoglycan recognition protein 1 (PGLYRP1) gehört einer neuen Familie von Pattern recognition molecules (PRMs) an <sup>108</sup>. Es bindet an Peptidoglykane in der Zellwand grampositiver Bakterien <sup>109</sup>, interagiert mit Toll-like Rezeptor 2 <sup>110</sup> und wirkt direkt antibakteriell. Interleukin 8 (IL-8) / CXCL8 ist ein Chemokin der CXC Familie, das von Makrophagen und anderen Zellen sezerniert wird und auch unter dem Namen Neutrophil chemotactic factor bekannt ist. Es ist ein bedeutender Mediator der angeborenen Immunantwort; seine primäre Aufgabe besteht in der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Interleukin 8 fördert die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und die Phagozytose. Grancalcin (FC:2,79; FDR:0) ist ein speziell in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiertes Calcium bindendes Protein, über dessen Funktion bisher wenig bekannt ist <sup>111</sup>. Serin Protease Inhibitor 1 (Serpin B1) ist ein im Cytosol neutrophiler Granulozyten lokalisierter Inhibitor neutrophiler Elastasen. Durch die Regulation von neutrophiler Elastase, Cathepsin G und weiteren Proteasen wirkt es protektiv und verringert so möglicherweise zum Beispiel die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie <sup>112, 113</sup>. Serpin B1 weist einen FC von 2,27 und eine FDR von 0,0017 auf. CD177 (FC:3,49; FDR:0) ist ein ausschließlich auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten sowie unreifer Vorläuferzellen exprimiertes Glykoprotein. Als heterophiler Bindungspartner von PECAM-1 trägt es zur Interaktion zwischen Neutrophilen und Endothelzellen bei und somit zur Transmigration neutrophiler Granulozyten<sup>114, 115</sup>.

#### 3.3.2.8.1.3 Mit Chemotaxis assoziierte Gene

Mit DAVID konnten fünf Gene identifiziert werden, die im direkten Zusammenhang mit Chemotaxis stehen: LTA4H (FC: 2,34; FDR: 0,00270), CXCR4 (FC: 1,69; FDR: 0,02170), AZU1 (FC: 1,57; FDR: 0,00126) und IL8 (FC: 1,19; FDR: 0,00283), weisen eine signifikant vermehrte Expression auf. Lediglich CCL4 (FC: -2,01; FDR: 0,01493) wird in der Gruppe der erkrankten Kinder vermindert exprimiert.

Leukotriene A4 hydrolase (LTA4H) ist ein ubiquitär exprimiertes bifunktionales Enzym, das die Reaktion von Leukotrien A4 zu Leukotrien B4 katalysiert <sup>116</sup>. Leukotrien B4 wirkt stark chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und trägt zur Entwicklung des systemischen Schocks bei <sup>117 - 120</sup>. Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) ist ein Chemokinrezeptor für CXCL12, auch bekannt als Stromal cell-derived factor 1 (SDF1). Die Interaktion zwischen SDF1 mit CXCR4 trägt einerseits zur Retention neutrophiler Granulozyten im Knochenmark bei <sup>121, 122</sup>; andererseits spielt sie während der späten Phase einer Entzündung eine wichtige Rolle in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten <sup>123</sup>. Azurocidin (AZU1) reguliert die Migration und Differenzierung von Monozyten. Für weitere Informationen siehe 3.3.2.8.1.2 "Mit neutrophilen Granulozyten assoziierte Gene". Interleukin 8 (IL8) ist ein bedeutender Mediator der angeborenen Immunantwort; seine primäre Aufgabe besteht in der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Weitere Informationen zu IL8 sind unter 3.3.2.8.1.2 "Mit neutrophilen Granulozyten assoziierte Gene" zu finden. Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4) ist ein potenter Chemoattraktor und zugleich ein natürlicher Ligand für den Corezeptor CCR5 (Chemokine receptor 5) des HI Virus (HIV1). Es wird von Makrophagen, natürlichen Killerzellen, Fibroblasten, Mastzellen und T Zellen produziert <sup>124</sup>. In der Kategorie "Defense Response" nicht enthalten, aber in diesem Zusammenhang ebenfalls zu erwähnen ist Heme binding protein 1 (HEBP1). HEBP1 ist ein Chemoattraktor, der über die Bindung an Formyl peptide receptor-like receptor 2 (FPRL2) zur Chemotaxis von Monozyten und dendritischen Zellen beiträgt <sup>125, 126</sup>. HEBP1 (FC: 3,13; FDR: 0) wird signifikant vermehrt exprimiert.

#### 3.3.2.8.1.4 Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Vier Gene der Kategorie "Response to stimulus" sind mit der Prozessierung und Präsentation von Antigenen assoziiert: IFNGR2 (FC: 1,88; FDR: 0,00439) sowie CTSS (FC: 1,76; FDR: 0,01898) haben einen aktivierenden Einfluss, LILRB3 (FC: 1,63; FDR: 0,04691) und IL10 (FC: 1,71; FDR: 0,02171) hingegen wirken inhibierend. Alle vier Gene weisen eine signifikant vermehrte Expression auf.

Interferon γ Rezeptor 2 (IFNGR2) ist eine Untereinheit des aus jeweils 2 IFNGR1und IFNGR2-Ketten zusammengesetzten Interferon γ Rezeptors <sup>127</sup>. Da IFNGR1 im Überschuss vorhanden ist, limitiert die Expression des streng regulierten IFNGR2 die Empfindlichkeit für IFN γ. Das ursprünglich als Macrophage-activating factor bezeichnete IFN γ zählt zu den bedeutendsten Zytokinen sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort. Es wirkt stimulierend auf Makrophagen, induziert direkte antimikrobielle Mechanismen und fördert die Prozessierung und Präsentierung von Antigenen <sup>127</sup>. Zusätzlich nimmt IFN γ wesentlichen Einfluss auf die Attraktion, Reifung und Differenzierung vieler verschiedener Zellen <sup>128, 129</sup>; es steigert die Aktivität natürlicher Killerzellen und reguliert die Immunglobulinproduktion und den Klassen-Switch von B Zellen <sup>130</sup>. Cathepsin S (CTSS) ist eine überwiegend in professionellen Antigen präsentierenden Zellen exprimierte Cystein Protease. Es spielt eine essentielle Rolle in der Degradation der invarianten Peptidkette von MHC II Molekülen und wird zum Beispiel in B Zellen und dendritischen Zellen für eine effektive Prozessierung und Präsentierung von Antigenen benötigt <sup>131, 132</sup>. Seine Aktivität wird durch IFN γ verstärkt <sup>133</sup>. Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 3 (LILRB3) ist ein auf verschiedenen Immunzellen exprimierter inhibierender Rezeptor. Bei der Bindung an MHC I Moleküle auf der Oberfläche Antigen präsentierender Zellen verhindert es eine intrazelluläre Aktivierung und wirkt so antiinflammatorisch <sup>134 - 136</sup>. Interleukin 10 (IL10) ist ein antiinflammatorisch wirksames Cytokin und als solches ein entscheidender Regulator der Immunantwort. Es inhibiert die Expression von MHC II und costimulierenden Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen, limitiert die Produktion proinflammatorischer Cytokine und Chemokine und reguliert die Aktivität von T Zellen und natürlichen Killerzellen. IL10 wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, B Zellen sowie Untergruppen von T Zellen produziert <sup>137</sup>.

## 3.3.2.8.1.5 DNA-Schädigung

In der Gruppe "Response to stimulus" finden sich zwei Gene, die an der Reparatur von DNA beteiligt sind, DDB1 (FC: 2,05; FDR: 0,00595) und RAD23A (FC: 1,75; FDR: 0,03203). Beide weisen eine signifikant höhere Expression auf.

Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1) bindet an geschädigte DNA und trägt zur Reparatur via Nucleotidexcision bei <sup>138</sup>. RAD23A ist ein Homolog von Saccharomyces cerevisiae Rad 23, das an der DNA-Reparatur via Nucleotidexzision beteiligt ist; wahrscheinlich spielt es eine Rolle in der Erkennung von DNA-Schäden <sup>139</sup>.

Darüber hinaus inhibiert RAD23A offensichtlich p300 und kontrolliert auf diese Weise die Transkription unterschiedlicher proinflammatorisch wirksamer Proteine (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: Die Abbildung verbindet die beiden von MEKK1 und RAD23A ausgehenden Netzwerke miteinander. Die Abbildung wurde mit BioBase ExPlain 3.0 generiert und modifiziert: irrelevante Mole-küle wurden entfernt, relevante Moleküle wurden hinzugefügt. Die grünen Quadrate stehen für Aktivie-rung, rote für Inhibierung, gelbe für einen anderen Effekt. NF-IL6-1 und NF-IL6-3 entsprechen dem Transkriptionsfaktor CCAAT/enhancer binding protein,  $\beta$  (CEBPB). Eine Darstellung der Expressionswerte war leider nicht möglich. Anbei die Werte der signifikant differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren: RAD23A (FC: 1,75; FDR: 0,03), CBP (FC: -1,95; FDR: 0,02); C/EBP,  $\alpha$  (FC: 2,10; FDR: 0,00); NF-IL6-1 / NF-IL6-3 (FC: 2,34; FDR: 0,00). Signifikant vermehrt exprimiert werden BCL6, S100A9, IL8, MPO, LTF, CTSS, CXCR4 sowie NCF2; nur GNLY weist eine signifikant verminderte Expression auf. Die Abbildung zeigt unter anderem wie RAD23A die Expression unterschiedlicher, weiter stromabwärts gelegener Zielgene kontrolliert.

#### 3.3.2.8.1.6 Neutrophile Granulozyten - Zusammenfassende Darstellung

Die Mehrexprexpression von Genen, die mit der Funktion neutrophiler Granulozyten, Chemotaxis, Antigenprozessierung- und präsentation und DNA-Schädigung assoziiert sind, weist auf eine Hyperinflammation in Frühgeborenen mit konnataler Infektion hin.

Die simultane Mehrexpression der drei Calgranuline kann als Ausdruck einer erhöhten Aktivität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten interpretiert werden. Sie weist darauf hin, dass die Kinder, bei denen im weiteren Verlauf die Diagnose einer konnatalen Infektion gestellt wurde, bereits zum Zeitpunkt der Geburt von einer stärkeren Proinflammation betroffen waren.

Die chromosomale Nachbarschaft der drei Calgranuline sowie verschiedener weiterer signifikant vermehrt exprimierter Gene (siehe Abbildung 10) legt zudem nahe, dass der beschriebenen Mehrexpression eine übergeordnete Regulation zu Grunde liegt. Hierfür spricht nicht zuletzt die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors CEBPB. Die Annahme, dass die beobachtete Mehrexpression Folge übergeordneter Regulationsprozesse ist, wird darüber hinaus durch die Ergebnisse der einfachen Promotorenanalyse mit BioBase ExPlain unterstützt; sie zeigen neben der Mehrexpression des Transkriptionsfaktors CEBPB eine Überrepräsentation der passenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen (siehe 3.3.2.7.1). Die vermehrte Expression verschiedener weiterer, zum Teil sehr spezifischer Gene weist auf eine insgesamt erhöhte Aktivität neutrophiler Granulozyten hin. Die gemessenen Unterschiede in der Genexpression lassen deshalb darauf schließen, dass sich die Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion bereits wenige Minuten postnatal durch eine stärkere Antwort der angeborenen Immunität auszeichnete.

Die erhöhte Aktivität insbesondere neutrophiler Granulozyten spiegelt sich in der Analyse mit Pathway Explorer ebenso wider wie die allgemeine Überrepräsentation von Genen, die mit einer Abwehrreaktion des Organismus assoziiert sind: die Rangliste relevanter Pathways beispielsweise wird von dem GenMapp Pathway "Angeborene Immunantwort" (Innate immune response) angeführt. Zu den im Pathway enthaltenen Genen zählen unter anderem die erwähnten Calgranuline A und C, Interleukin 8, PGLYRP1, Azurocidin 1, FPR1 oder CEBPB (siehe Tabelle 5). Die Mehrexpression Neutrophilen-spezifischer Gene lässt sich mit Ingenuity Pathways Analysis gut visualisieren (siehe Abbildung 23): anhand des weiter unten abgebildeten Netzwerks lassen sich die engen Zusammenhänge zwischen der Migration neutrophiler Granulozyten, dem Respiratory Burst als einer Form der antibakteriellen Antwort sowie der Chemotaxis von Monozyten und der Aktivierung von Makrophagen nachvollziehen. calgranulins\_neutrophils\_2



© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abbildung 23: Dargestellt sind verschiedene signifikant differenziell regulierte Gene und die ihnen übergeordneten biologischen Prozesse "Respiratory Burst", "Migration von Neutrophilen", "Chemotaxis von Monozyten", "Aktivierung von Makrophagen", "Antibakterielle Antwort des Organismus". Deutlich wird, dass IL8 zahlreiche der differenziell regulierten Gene beeinflusst. IL8 selbst wird hingegen durch den unter 3.3.2.8.1.2 "Mit neutrophilen Granulozyten assoziierte Gene" beschriebenen Transkriptions-faktor CEBPB beeinflusst. Signifikant differenziell regulierte Gene sind rot hinterlegt, nicht gemessene Gene weiß. Das abgebildete S100A8 entspricht Calgranulin A, S100A9 entspricht Calgranulin B, S100A12 entspricht Calgranulin C.

Für eine stärkere Antwort der angeborenen Immunität spricht neben der erhöhten Expression der drei Calgranuline und verschiedener neutrophilenspezifischer Gene auch die insgesamt vermehrte Expression von Genen, die im Zusammenhang mit Chemotaxis stehen: Leukotrien A4 Hydrolase beispielsweise fördert durch die Synthese von Leukotrien B4 die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten, an deren Rekrutierung auch CXCR4 beteiligt ist. Das von eingewanderten Neutrophilen sezernierte Azurocidin 1 reguliert wiederum die Migration und Differenzierung von Monozyten.

Die erhöhten Expressionwerte von Cathepsin S und Interferon  $\gamma$  Rezeptor 2 können als Hinweis auf eine gesteigerte Prozessierung und Präsentation von Antigenen verstanden werden; die weiter oben ausführlicher beschriebene Cystein Protease Cathepsin S spielt eine wesentliche Rolle in der Beladung von MHC II Molekülen; ihre Aktivität wird durch Interferon  $\gamma$  zusätzlich verstärkt. IFNG2R, ebenfalls vermehrt exprimiert, reguliert die Empfindlichkeit des aus zwei Untereinheiten bestehenden Interferon  $\gamma$  Rezeptors für Interferon  $\gamma$  – und fördert über eine Aktivierung von Cathepsin S die Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch professionelle Antigen präsentierende Zellen.

Auch die Folgen der verstärkten Inflammation – die Schädigung von Zellen und genetischer Information – scheinen sich bereits zu diesem frühen Zeitpunkt auf Genexpressionsebene widerzuspiegeln: DDB1 und RAD23A, beides Gene, die im Zusammenhang mit DNA-Reparatur stehen, werden in der Gruppe der Kinder mit konnataler Infektion signifikant vermehrt exprimiert.

#### 3.3.2.8.2 Natürliche Killerzellen

Ein auffallend hoher Anteil der Gene, die mit Hilfe von DAVID der am stärksten überrepräsentierten GO Kategorie "Abwehrantwort" (Defense response) zugeordnet werden konnten, steht im direkten Zusammenhang mit natürlichen Killerzellen. Da NK Zellen anders als neutrophile Granulozyten nur einen sehr geringen Anteil der im Blut zirkulierenden Leukozyten ausmachen, ist dies umso bemerkenswerter. Die verschiedenen Gene, Killer cell lectin-like receptor 2 (KLRC2) (FC: -1,64; FDR: 0,02950), C-Type lectin domain family 1, member B (FC: -1,70; FDR: 0,03649), Granulysin (FC: -2,48; FDR: 0,00090), GATA binding protein 3 (FC: -1,84; FDR: 0,04270) und CX3CR1 (FC: -2,22; FDR: 0,00492), zeichnen sich dabei ausnahmslos – und zwar unabhängig von ihrer jeweiligen Funktion – durch eine signifikant niedrigere Expression aus. Auch KLRD1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1) (FC: 1,83; FDR: 0,05329) und KLRB1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1) (FC: -1,74; FDR: 0,06857), deren False Discovery Rate jeweils nur geringfügig oberhalb des Thresholds von 0,05 liegt, werden in der Gruppe der Kinder mit konnataler Infektion vermindert exprimiert.

Killer cell lectin-like receptor 2 (KLRC2) bildet zusammen mit CD94 einen aktivierenden Rezeptor auf der Oberfläche natürlicher Killerzellen sowie einer Untergruppe von T Zellen. Der HLA-E bindende Heterodimer assoziiert mit dem Adapterprotein DAP12 und vermittelt so neben der Degranulierung die Transkription verschiedener Cytokine und Chemokine<sup>140</sup>. Granulysin ist ein antimikrobiell wirksames zytolytisches Molekül in den Granula von NK Zellen und zytotoxischen T Zellen. Es wird in aktivierten Zellen vermehrt exprimiert und als potentieller Marker für die Aktivität von NK Zellen und zytotoxischen T Zellen gehandelt <sup>141, 142</sup>. In Zielzellen fördert Granulysin die Freisetzung von Cytochrom C und wirkt auf diese Weise proapoptotisch <sup>143, 144</sup>. C-Type lectin domain family 1, member B (CLEC1B) wird als C-type lectin zu den Pattern Recognition Receptors (PRRs) gezählt, denen auch die bekannteren Toll-like Rezeptoren (TLRs) angehören <sup>145</sup>. C-type lectins finden sich auf der Oberfläche von NK Zellen und Myelozyten. In NK Zellen kontrollieren sie durch die Erkennung von MHC Klasse I Molekülen den Grad der Aktivität; in Myelozyten besitzen sie zusätzliche Funktionen und beeinflussen unter anderem die Interaktion mit NK Zellen<sup>146, 147</sup>. GATA binding protein 3 ist ein überwiegend in T Zellen und natürlichen Killerzellen exprimierter Transkriptionsfaktor, der eine bedeutende Rolle in der frühen Phase der NK Zell-Entwicklung spielt. Seine Aktivität ist entscheidend für den Erwerb einer potenten IFN-y Produktion und die Diversifizierung des Rezeptor-Repertoires. GATA binding protein 3 wird zudem für eine effektive NK Zell-Antwort gegen Viren oder intrazelluläre Bakterien wie zum Beispiel Listeria monocytogenes benötigt 148, 149. Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (CX3CR1) ist ein Rezeptor auf der Oberfläche von natürlichen Killerzellen und Monozyten. Seine Expression ist in ruhenden CD16+ NK Zellen hoch, in ruhenden CD56- NK Zellen niedrig <sup>150</sup>. Sie wird durch Interleukin 15 spezifisch reprimiert, durch IL2 erhöht <sup>151</sup>. KLRD1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1), auch bekannt unter dem Namen CD94, bildet zusammen mit KLRC2 einen aktivierenden Rezeptor auf der Oberfläche Natürlicher Killerzellen <sup>140</sup>. Für mehr weitere Informationen siehe weiter oben unter "KLRC2". KLRB1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1) ist ein Rezeptor auf der Oberfläche von natürlichen Killerzellen und einer Untergruppe von T Zellen <sup>152</sup>. Sein Ligand ist das auf der Oberfläche von aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen und B Zel-Ien exprimierte CLEC2D (FC: -1,56; FDR: 0,12516). Die Interaktion mit CLEC2D führt zu einer Inhibierung der NK Zell-vermittelten Zytotoxizität und Zytokin-Produktion und reguliert auf diese Weise die Wechselwirkung zwischen NK Zellen und professionellen APCs <sup>153</sup>.

#### 3.3.2.8.2.1 Natürliche Killerzellen - Zusammenfassende Darstellung

Sämtliche der aufgeführten NK Zell-spezifischen Gene weisen, unabhängig von ihrer jeweiligen Funktion, eine geringere Expression auf; fünf der sieben Gene werden signifikant vermindert exprimiert. Obwohl die geringere Expression des Transkriptionsfaktors GATA binding protein 3 auf eine fehlerhafte zelluläre Entwicklung schließen lässt, bleibt unklar, ob die Ursache der Minderexpression NK Zell-spezifischer Gene tatsächlich eine ausgeprägtere Unreife von NK Zellen ist, oder eine Depletion, eine Reduktion der absoluten Zahl natürlicher Killerzellen in der Gruppe der Kinder mit konnataler Infektion. Der bereits wenige Minuten nach Geburt zu beobachtende Unterschied in der Genexpression der beiden Gruppen deutet jedoch unabhängig hiervon auf eine insgesamt beeinträchtigte Funktion natürlicher Killerzellen hin. Die möglichen Konsequenzen dieses Defizites werden unter 4.2.2.6.2 "Natürliche Killerzellen" diskutiert.

Besonders deutlich zeigt sich die verminderte Expression der verschiedenen NK Zellspezifischen Gene in dem abgebildeten Netzwerk, das mit Ingenuity Pathways Analysis erstellt wurde (siehe Abbildung 24).



natural\_killers

© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abbildung 24: Dargestellt sind verschiedene signifikant differenziell regulierte Gene und die ihnen übergeordneten biologischen Prozesse "Erkennung durch natürliche Killerzellen", "Aktivierung natürlicher Killerzellen", "Chemotaxis von natürlichen Killerzellen". Vermindert regulierte Gene sind grün hinterlegt: die Abbildung zeigt somit eindrücklich die durchgehend verminderte Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der Funktion natürlicher Killerzellen stehen. Der Einfluss GATA3s auf die Transkription der verschiedenen Gene ließ sich mit Ingenuity leider nicht darstellen.

#### 3.3.2.8.3 Kohlenhydratstoffwechsel

Mit Pathway Explorer wurden deutliche Unterschiede in der Expression von unmittelbar an der Glykolyse beteiligten Enzymen detektiert. In der Gruppe der Kinder mit konnataler Infektion wiesen drei von zehn Genen im Glykolyse Pathway von Biocarta eine signifikant vermehrte Expression auf: Hexokinase1 (FC: 2,43; FDR: 0,00027), Glukose-6-phosphat-Isomerase (FC: 2,42; FDR: 0,00096) und Phosphoglyceratkinase 1 (FC: 4,16; FDR: 0,00000). Vier weitere, im Pathway nicht enthaltene Enzyme werden ebenfalls vermehrt exprimiert: Phosphofruktokinase 2 / Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3 (PFKFB3 / PFK2) (FC: 2,00; FDR: 0,02148), Laktatdehydrogenase A (FC: 1,95; FDR: 0,01777), Dihydrolipoamiddehydrogenase (FC: 2,36; FDR: 0,00123) und Glycogenin 1 (FC: 3,29; FDR: 0) zeigen eine signifikant höhere Expression.



Experiments: (Homo Sapiens|tp0\_only\_mof\_heatmap\_z\_rp\_out\_annot\_all\_sort\_FDR\_005\_PWE\_in.txt)



Abbildung 25: Im Glykolyse-Pathway von BioCarta sind die Hexokinase 1, die Glukose-6-phosphat-Isomerase sowie die Phosphoglyceratkinase dargestellt. Die erste Hälfte des farbigen Balkens gibt den Fold Change, die zweite Hälfte die False Discovery Rate an. Die Legende ist oberhalb des Pathways abgebildet.

Die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels spiegelt sich auch in der Analyse mit Ingenuity Pathways Analysis wider: In der Rangliste der kanonischen Signalwege ("Top Canonical Pathways") wird der Pathway "Glykolyse / Glukoneogenese" mit einem p-Wert von 5,82E<sup>-04</sup> an erster Stelle aufgeführt (siehe Abbildung 19 unter 3.3.2.6.3 "Top Canonical Pathways"). Gegenüber den mit Pathway Explorer untersuchten Pathways enthält er keine wesentlichen zusätzlichen Informationen (siehe 3.3.2.5 "Visualisierung in aktuell verfügbaren Pathways"): Die PFKFB3 bleibt erneut unerwähnt, neu hinzu kommt Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (ALDH1A1), ein Enzym, das am Alkohol-Stoffwechsel beteiligt ist.

Hexokinase 1 (HK1) ist das erste von insgesamt drei Schlüsselenzymen der Glykolyse. Es katalysiert die Reaktion von Glukose zu Glukose-6-Phosphat und soll darüber hinaus antiapoptotische Eigenschaften besitzen <sup>154</sup>. Die Glukose-6-phosphat-Isomerase (GPI) ist ein an der ersten Phase der Glykolyse beteiligtes, cytoplasmatisches Enzym, das die reversible Umwandlung von Glukose-6-Phosphat in Fruktose-6-Phosphat katalysiert. Extrazellulär wirkt es zytokin, indem es die Motilität verschiedener Zellen stimuliert. GPI wird unter Hypoxie vermehrt exprimiert und durch HIF1a kontrolliert <sup>155 - 157</sup>. Die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1) ist ein Enzym der Glykolyse. Es katalysiert die Reaktion von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat. Pro Molekül Glukose werden hierbei 2 ATP gewonnen <sup>158</sup>. Seine Expression wird durch HIF1α induziert <sup>159</sup>. Die Phosphofruktokinase 2 / Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3 (PFKFB3 / PFK2) ist ein bifunktionales Enzym. Durch Bildung und Abbau von Fruktose-2,6-Bisphosphat nimmt es wesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Glykolyse: die N-terminale Hälfte wirkt als Kinase und phosphoryliert Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-2,6-Bisphosphat, während die C-terminale Hälfte als Bisphosphatase arbeitet. Fruktose-2,6-Bisphosphat ist ein starker allosterischer Stimulator der Phosphofruktokinase 1, des wichtigsten von drei Schlüsselenzymen der Glykolyse <sup>160</sup>. Die Expression von PFKFB3 wird durch Hypoxie induziert <sup>161, 162</sup>. Die Laktatdehydrogenase A (LDHA) codiert für die M-Untereinheit der aus jeweils vier Untereinheiten zusammengesetzten Laktatdehydrogenase. Sie ist in den Isoenzymen der Laktatdehydrogenase in Leber und quer gestreifter Muskulatur, Nieren, Lunge und retikuloendothelialem System enthalten. Die aus vier M-Untereinheiten bestehende LDH-5 ist auf die Reduktion von Pyruvat zu Laktat bei gleichzeitiger Umwandlung von NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> spezialisiert und spielt eine zentrale Rolle in der anaeroben Glykolyse <sup>158</sup>. Die Dihydrolipoamiddehydrogenase (DLD) verschiedener Enzymkomplexe, ist ein Bestandteil unter anderem der Pyruvatdehydrogenase. Die Pyruvatdehydrogenase ist ein aus drei Enzymen und fünf Coenzymen bestehender Multienzymkomplex, der die irreversible Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert und auf diese Weise den aeroben Abbau von Pyruvat zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O ermöglicht <sup>158</sup>. Mit Glykolyse / Glukoneogenese nicht direkt verbunden ist Glycogenin 1 (GYG1). Als Startermolekül bildet es den zentralen Ausgangspunkt für den Neuaufbau von Glykogen. Eine vermehrte Expression von GYG1 in Leukozyten wurde in Verbindung mit einem schweren akuten respiratorischen Syndrom beschrieben <sup>163</sup>.

#### 3.3.2.8.3.1 Kohlenhydratstoffwechsel - Zusammenfassende Darstellung

Die vermehrte Expression von Hexokinase 1, Glukose-6-phosphat-Isomerase, Phosphoglyceratkinase 1 sowie Phosphofruktokinase 2 / Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3 legt nahe, dass sich die Gruppe der erkrankten Patienten bereits wenige Minuten postnatal durch eine signifikant differenzielle Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels auszeichnete, wobei die vermehrte Expression von Hexokinase 1 und Phosphofruktokinase 2 / Fruktose-2,6-Bisphosphatase in diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben ist: beide Enzyme spielen eine zentrale Rolle im Abbau von Glukose, da sie zwei der insgesamt drei geschwindigkeitsregulierenden Reaktionen katalysieren beziehungsweise kontrollieren: HK1 ist das erste von drei Schlüsselenzymen der Glykolyse; PFKFB3 / PFK2 kontrolliert die Aktivität der Phosphofruktokinase 1, des dritten und wichtigsten Schlüsselenzyms. Die Beobachtung, dass gerade diese Enzyme an den so genannten Bottlenecks, den Engstellen der Glykolyse, signifikant vermehrt exprimiert werden, muss als Hinweis auf eine tiefgreifende Regulation des gesamten Stoffwechselweges verstanden werden. Die Annahme einer Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels erscheint darüber hinaus auch deshalb besonders naheliegend, weil verschiedene weitere Enzyme wie die Laktatdehydrogenase A, die Dihydrolipoamiddehydrogenase und Glycogenin 1 in der Gruppe der erkrankten Kinder ebenfalls in höherem Maße exprimiert werden. Neben der Glykolyse im engeren Sinn scheinen hiervon somit auch der weitere aerobe und anaerobe Abbau von Pyruvat sowie die Glykogensynthese betroffen zu sein.

#### 3.3.2.8.4 Hypoxie

Vier Gene der am zweitstärksten überrepräsentierten GO Kategorie "Response to Stimulus" sind mit Sauerstoffmangel direkt assoziiert. Alle vier werden durch Hypoxie induziert und in der Gruppe der Kinder mit konnataler Infektion signifikant vermehrt exprimiert: Adrenomedullin (FC: 2,27; FDR: 0,00011), Heat shock protein 90 kDa  $\alpha$ ,

class B member 1 (HSP90AB1) (FC: 2,31; FDR: 0,00161), Stress-associated endoplasmatic reticulum protein 1 (SERP1) (FC: 4,17; FDR: 0,00000) und Glukose-6phosphat-Isomerase (FC: 2,42; FDR: 0,00096) zeichnen sich jeweils durch eine signifikante Mehrexpression aus. Den mit Abstand höchsten Fold Change (FC: 4,17) weist SERP1 auf. Weitere Gene, die in diesem Zusammenhang unbedingt erwähnt werden sollten, sind Phosphoglycerat-Kinase 1 und Phosphofruktokinase 2 / Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3, vor allem aber HIF1A. Die beiden erstgenannten wurden bereits unter 3.3.2.8.3 "Kohlenhydratstoffwechsel" behandelt. HIF1A (FC: 1,75; FDR: 0,055) liegt mit einer False Discovery Rate von 0,055 knapp oberhalb des Thresholds.

Adrenomedullin (ADM) ist ein von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen sezerniertes Peptid mit einer stark Gefäß relaxierenden, Blutdruck senkenden Wirkung. Es wird im Zusammenhang mit verschiedenen Stressoren wie Trauma, Infektion, Hypoxie oder Sepsis vermehrt exprimiert und scheint eine wichtige Rolle in der Einleitung und Ausbreitung einer Entzündungsreaktion zu spielen, indem es die Sekretion von MIF (Macrophage migration inhibitory factor) und die Produktion weiterer Zytokine moduliert <sup>164 - 166</sup>. Heat shock protein 90 kDa  $\alpha$ , class B member 1 (HSP90AB1) ist die konstitutiv exprimierte Form des zytosolischen Hitzeschockproteins 90. Die beiden bekannten Hitzeschockproteine 90 AA1 und AB1 sind mit verschiedenen Co-Chaperonen assoziiert und an der Faltung und Stabilisierung von Proteinen beteiligt. Sie interagieren mit zahlreichen nukleären Hormonrezeptoren, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren sowie weiteren Regulatorproteinen und beeinflussen auf diese Weise eine große Auswahl zellulärer Prozesse wie das Hormon Signaling, Zellzyklus, -proliferation und -differenzierung, die Apoptose, Immunantwort und Stressabwehr. Sie werden unter Stress, wie zum Beispiel Anoxie, Gewebstrauma oder bakterieller Infektion, vermehrt synthetisiert <sup>167</sup>. Das auch unter dem Namen Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) bekannte Stressassociated endoplasmatic reticulum protein 1 (SERP1) wird durch Hypoxie induziert <sup>168, 169</sup>. Über seine Funktion ist wenig bekannt. Die Glukose-6-phosphat-Isomerase (GPI) ist ein an der ersten Phase der Glykolyse beteiligtes Enzym, das unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird <sup>155 - 157</sup>. Für weitere Informationen siehe 3.4.2.8.3: Kohlenhydratstoffwechsel. Die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1) ist ein Enzym der Glykolyse. Ihre Expression wird durch HIFα1 induziert <sup>159</sup>. Für weitere Informationen siehe auch hier 3.4.2.8.3: Kohlenhydratstoffwechsel. Die Phosphofruktokinase 2 / Fruktose2,6-Bisphosphatase 3 (PFKFB3 / PFK2) ist ein bifunktionales Enzym, das wesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Glykolyse nimmt. Seine Expression wird durch Hypoxie induziert <sup>161, 162</sup>. Für weitere Informationen siehe 3.3.2.8.3 "Kohlenhydratstoffwechsel". Hypoxie-induzierbarer Faktor 1  $\alpha$  (HIF1A) ist die  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF1. HIF1 ist ein aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehenden Heterodimer. Er spielt eine zentrale Rolle in der zellulären und systemischen Anpassung auf eine Sauerstoffunterversorgung, indem er die Transkription zahlreicher Zielgene induziert <sup>170</sup>.

#### 3.3.2.8.4.1 Hypoxie - Zusammenfassende Darstellung

Alle der genannten Gene werden durch Sauerstoffmangel induziert; ihre Mehrexpression spricht somit für eine bereits peripartal stärker ausgeprägte Hypoxie in der Gruppe der erkrankten Kinder. Drei der sieben Gene – GPI, PGK1 und PFKFB3 / PFK2 – sind zudem an der Energiegewinnung durch den Abbau von Glukose unmittelbar beteiligt. Diese gemeinsame Schnittmenge unterstreicht den engen Zusammenhang zwischen Hypoxie und einer Beeinträchtigung des Kohlenhydratstoffwechsels, der sich mit Ingenuity Pathways Analysis (siehe Abbildung 26) nur bedingt darstellen ließ: in der folgenden Abbildung wird immerhin deutlich, dass durch HIF1A eine Mehrexpression sowohl der Laktatdehydrogenase A als auch der Phosphoglyceratkinase 1 induziert wird.





#### © 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abbildung 26: Das Netzwerk zeigt die enge Verbindung zwischen HIF1A und einer Mehrexpression von Genen, die mit Kohlenhydratstoffwechsel / Glykolyse assoziiert sind: HIF1A nimmt demnach direkten Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel. Gene mit einer signifikant vermehrten Expression sind rot hinterlegt, solche mit einer signifikant verminderten Expression grün.

Die Analyse mit Ingenuity Pathways Analysis zeigte darüber hinaus eine bedeutende Regulation von Genen, die mit Erkrankungen des Atmungssystems assoziiert sind. Der enge Zusammenhang zwischen der Regulation der Entzündungsantwort des Organismus und einer Funktionsstörung der Respiration ließ sich gut visualisieren (siehe Abbildung 27). Er ist auch dadurch zu erklären, dass die differenzielle Regulation verschiedene zentraler Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren wie HIF1A, CEBPB oder CREBBP Inflammation und Respiration gleichermaßen beeinflusst. Die Abbildung unterstreicht das Ausmaß der Regulation in der Gruppe der erkrankten Kinder und lässt erahnen, wie die vermehrte Inflammation zum Beispiel zur Pathogenese einer bronchopulmonalen Dysplasie beiträgt. inflammatory\_response\_and\_respiratory\_disorder\_2



Abbildung 27: Die mit IPA erstellte Abbildung zeigt die enge Verbindung zwischen der Entzündungsantwort des Organismus und einer Funktionsstörung der Respiration. Verknüpft werden die beiden Prozesse durch IL8 und vier Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung: CEBPA, CEBPB, CREBBP und HIF1A.

## 3.3.2.9 Hierarchische Cluster-Analyse mit dCHIP

Mit dCHIP wurde eine hierarchische Cluster-Analyse durchgeführt: Arrays mit ähnlichen Expressionsmustern wurden identifiziert, gruppiert und in Form eines Dendrogramms visualisiert. Die Berechnung lief als unbeaufsichtigte Analyse (unsupervised clustering), die Zugehörigkeit der Arrays blieb somit unberücksichtigt. Im Idealfall lassen sich hierbei zwei untersuchte Patientengruppen anhand ihrer spezifischen Expressionsmuster eindeutig voneinander trennen.

In das hierarchische Clustering gingen alle 198 signifikant differenziell regulierten Gene ein. Die Arrays jedes Patienten wurden gemittelt; jede Reihe repräsentiert somit die gemittelte Genexpression eines Patienten (siehe Abbildung 28). Die Patienten ließen sich in zwei Hauptcluster A und B trennen. Cluster A enthält zehn Patienten, von denen acht der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion und zwei der Gruppe der Patienten ohne konnatale Infektion angehören. Cluster B enthält 14 Patienten, von denen acht der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion und sechs der Gruppe der Patienten ohne konnatale Infektion zuzuordnen sind. Cluster B lässt sich in zwei Subcluster B1 und B2 trennen. Zu B1 zählen sieben Patienten, von denen fünf zur Gruppe der Patienten ohne konnatale Infektion und zwei der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion und zwei der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion und zwei der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion und zwei der Gruppe der Patienten, von denen sechs der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion und zwei der Gruppe der Patienten, von denen sechs der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion und zwei der Gruppe der Patienten ohne konnatale Infektion angehören.

Das hierarchische Clustering zeigt, dass Patienten mit und ohne konnatale Infektion sich nicht eindeutig in zwei Gruppen voneinander trennen lassen, sondern dass Cluster mit einer Häufung der jeweiligen Patientengruppe bestehen: Cluster B1 enthält zu 71% Patienten ohne konnatale Infektion, während Cluster A zu 80% und Cluster B2 zu 86% Patienten mit konnataler Infektion enhalten. Der überwiegende Anteil der Patienten mit konnataler Infektion ließ sich demnach in zwei Subklassen 1 und 2 aufteilen (zu finden in Cluster A und B2).



Abbildung 28: Abgebildet ist das Ergebnis der hierarchischen Cluster-Analyse. Die gemittelten Arrays der 24 Patienten wurden in zwei Hauptgruppen A und B geclustert, wobei Gruppe A 10, Gruppe B 14 Patienten zugeordnet wurden. Oben sind die Patienten IDs aufgeführt. Gene mit einem Expressionslevel oberhalb der mittleren Expression aller Probesets werden rot dargestellt. Schwarz steht für eine mittlere Expression, grün zeigt an, dass die Expression unterhalb des Mittelwertes liegt. Die meisten der Expressionswerte liegen innerhalb von +/-3 Standardabweichungen. Die gemittelten Arrays der Patienten mit konnataler Infektion sind rot umrandet. Die zwei Subklassen 1 und 2 der Patienten mit konnataler Infektion sind gelb umrandet.

#### 3.3.2.10 Biomarker der konnatalen Infektion

Wie unter 4.2.2.8 näher ausgeführt werden PCT, CD64 oder MBL gegenwärtig als potentielle Biomarker der neonatalen Sepsis diskutiert.

Unter den Genen mit einer signifikant differenziellen Expression fand sich eines dieser drei Proteine, CD64. Der auf Granulozyten und anderen Fresszellen exprimierte aktivierende Rezeptor vermittelt zum Beispiel die Phagozytose von Pathogenen.

Mit dCHIP wurden die Unterschiede in der Expression von CD64 zwischen beiden Gruppen untersucht. Die Expression von Myeloperoxidase (MPO) und Granulysin (GNLY) wurde aus gegebenem Anlass mit untersucht (siehe Abbildung 29).



Abbildung 29: Abgebildet ist die Expression dreier potentieller Biomarker in den zwei Patientengruppen. Die Expressionswerte der Kinder mit konnataler Infektion sind grün, die der Kinder ohne konnatale Infektion sind rot umrandet.

Deutlich wird: keines der drei Proteine ermöglicht trotz seiner signifikanten Mehroder Minderexpression für sich allein betrachtet eine klare Differenzierung zwischen erkrankten und nicht erkrankten Patienten. Dennoch ist beispielsweise erkennbar, dass ein großer Anteil der nicht erkrankten Patienten eine überdurchschnittliche Expression von Granulysin aufweist.

# 3.4 Validierung

Die Validierung erfolgte mit Hilfe der RT-PCR anhand der folgenden 25 Gene: ANXA1, AZU1, CD163, CX3CR1, GATA3, HIF1A, HLA-DPB1, IL18, IL8, KLRB1, KLRD1, LRP10, LY96, MMP9, MPO, NFAT5, PGLYRP1, PRV1, SPON2, TANK, TLR1, TNFRSF10A, TNFRSF17, GNLY, SERPING1. Die Korrelation der FCs von RT-PCR- und Microarray-Daten beträgt 0,74 und bestätigt die Ergebnisse der Microarray-Analyse somit nur bedingt (siehe Abbildung X). Die geringe Korrelation der beiden Datensätze ist unter anderem dadurch zu erklären, dass von zwei Patienten der Gruppe ohne neonatale Sepsis und einem Patienten der Gruppe mit neontaler Sepsis keine RT-PCR angefertigt werden konnte, da die Menge an zur Verfügung stehender RNA nicht ausreichte. Die Werte der entsprechenden Patienten konnten somit bei der Errechnung des FCs der RT-PCR-Daten nicht berücksichtigt werden.



Abbildung 30: Validierung. Korrelation der Werte von 25 ausgewählten Genen. Log2 FC der Microarray-Daten (X-Achse) und Log2 FC der RT-PCR-Daten sind gegeneinander aufgetragen.

# 4 Diskussion

# 4.1 Studiendesign und klinische Daten

Microarrays wurden in den vergangenen Jahren zunehmend für genomweite Analysen eingesetzt, etwa um die Wirtsantwort intensivpflichtiger polytraumatisierter Patienten auf Transkriptionsebene zu erforschen <sup>43, 44</sup>, und auch die dem kindlichen septischen Schock zu Grunde liegenden pathophysiologischen Prozesse sind zurzeit Gegenstand intensiver Forschung <sup>45, 46</sup>. Eine mit dieser Arbeit vergleichbare Studie wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. Erstmalig wurden mit Hilfe von Microarrays Unterschiede in der Genexpression von Frühgeborenen mit konnataler Infektion und Frühgeborenen ohne konnatale Infektion untersucht. In den beiden folgenden Abschnitten sollen zunächst das Design der Studie und die dahinter stehenden Überlegungen diskutiert werden.

### 4.1.1 Studiendesign

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten weisen einen klar definierten, gemeinsamen Startpunkt auf: den Zeitpunkt ihrer Geburt. Die Wahl dieses natürlichen Startpunktes soll eine Vergleichbarkeit der gewonnen Daten ermöglichen. Hierbei ist zu beachten, dass der exakte Erkrankungsbeginn dennoch unberücksichtigt bleibt, da sich anders als beispielsweise bei polytraumatisierten Patienten<sup>88</sup>, deren Erkrankung auf einen zeitlich klar definierten Stimulus – ein Trauma – zurückzuführen ist, bei Frühgeborenen nur schwer nachvollziehen lässt, seit welchem Zeitpunkt der Schwangerschaft eine intrauterine Infektion besteht. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass die hierdurch bedingte zeitliche Verschiebung zu einer Unschärfe der Genexpressionsprofile von erkrankten beziehungsweise nicht erkrankten Patienten führt. Dies würde erklären, warum eine korrekte Zuordnung der Frühgeborenen in die zwei Gruppen "Konnatale Infektion" / "Vergleichsgruppe" mit der hierarchischen Clusteranalyse – anders als bei polytraumatisierten Patienten – nicht möglich ist (siehe 4.2.2.7 "Hierarchische Clusteranalyse mit dCHIP").

Die Blutentnahme erfolgte bei Geburt. Dieser Zeitpunkt wurde aus mehreren Gründen gewählt: Erstens sollte untersucht werden, ob und wenn ja wie sich die Genexpression beider Gruppen schon Stunden vor Erkrankungsbeginn, oder korrekter: vor Diagnosestellung, unterscheidet. Die Beobachtung jeweils charakteristischer Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene könnte so dazu beitragen die Frage zu beantworten, warum einige Frühgeborene innerhalb der ersten 72 Stunden nach Geburt eine konnatale Infektion entwickeln und einige nicht. Zweitens sollte eine Beeinträchtigung durch postpartale Ereignisse, wie zum Beispiel den Einsatz invasiver Maßnahmen, ausgeschlossen werden. Drittens besäße die Identifizierung charakteristischer Genexpressionsprofile zu diesem frühen Zeitpunkt eine umso höhere klinische Relevanz: die korrekte Diagnose könnte früher gestellt, eine adäquate Therapie früher begonnen und der unnötige Einsatz von Antibiotika in Zeiten steigender Resistenzen vermieden werden.

Erschwert wurde unsere Analyse durch die geringen Probenmengen. Aufgrund der geringen Blutvolumina der von uns untersuchten Frühgeborenen war eine regelmäßige Gewinnung größerer Probenmengen, wie sie zum Beispiel in der intensivmedizinischen Betreuung kritisch kranker erwachsener Patienten möglich ist, nicht realisierbar.

Die gemessene mRNA wurde aus Vollblut gewonnen. Dies hat einerseits zur Folge, dass Veränderungen in der Genexpression einzelner Zellpopulationen teilweise nicht oder nur in geringerem Maße detektiert werden und beobachtete Veränderungen sich nur schwer einer spezifischen Zellpopulation zuordnen lassen <sup>171</sup>. Andererseits ist Vollblut deutlich leichter zu gewinnen und eine durch die Zellseparation bedingte Beeinflussung der zu untersuchenden Expressionswerte ausgeschlossen <sup>172 - 174</sup> – beides Eigenschaften, die im Falle einer klinischen Anwendung einen nicht zu unterschätzenden Vorteil bringen. Hinzu kommt, dass die Eignung von Vollblut für die Erstellung Microarray-gestützter Expressionsprofilen in den vergangenen Jahren immer wieder nachgewiesen werden konnte <sup>175, 176</sup>.

An dieser Stelle soll auch darauf hingewiesen werden, dass die von uns durchgeführten Microarrayexperimente nur bedingt Aussagen über die reale Regulation einzelner Signal- oder Stoffwechselwege ermöglichen; dies ist im Wesentlichen auf die geringe Korrelation von Transkriptom, Proteom und Metabolom zurückzuführen: so korreliert beispielsweise eine Änderung der mRNA-Menge häufig in keiner Weise mit der Menge an neu synthetisiertem Protein<sup>177</sup>, und auch die Menge an verfügbarem Protein korreliert nur in bestimmten Fällen und unter bestimmten Voraussetzungen mit dem Aktivitätszustand der verschiedenen Signal- oder Stoffwechselwege. Unabhängig davon sind für beide Gruppen jeweils charakteristische Genexpressionsprofile auf mRNA-Ebene zu beobachten, die Unterschiede in der Regulation biologischer Prozesse reflektieren und im weiteren Verlauf die Ausbildung des entsprechenden klinischen Phänotyps beeinflussen.

Die durchgeführte explorative Studie mit insgesamt 24 Patienten ermöglicht erste Einblicke in die aufzuklärenden Zusammenhänge, für eine Validierung der gewonnenen Erkenntnisse werden weitere, gezieltere Studien mit größeren Fallzahlen erforderlich sein. Unsere Studie hat in diesem Zusammenhang unter anderem dazu beigetragen, relevante Gene sowie Signal- und Stoffwechselwege von Interesse zu identifizieren.

#### 4.1.2 Klinische Daten

Es wurde bereits deutlich, dass sich die den beiden Gruppen zugeordneten Patienten nicht allein hinsichtlich ihrer Genexpression voneinander unterschieden, sondern auch hinsichtlich ihrer klinischen Daten (siehe 3.1 "Klinische Daten"): so lag beispielsweise das mediane Gestationsalter in der Gruppe der erkrankten Patienten mit 28 Wochen klar unter dem der Vergleichsgruppe (30 Wochen). Während in der Vergleichsgruppe nur eines von acht Kindern vor der Vollendung der 29. Schwangerschaftswoche zur Welt kam, wurden in der Gruppe der erkrankten Patienten immerhin fünf von sechzehn Kindern schon nach 24 Schwangerschaftswochen geboren. Noch größer wird dieser Unterschied, wenn man das mediane Geburtsgewicht beider Gruppen betrachtet: mit 1085 g lag es in der Gruppe der Patienten mit konnataler Infektion deutlich unter dem der Vergleichsgruppe (1445 g).

Unter Berücksichtigung der Ätiologie der konnatalen Infektion sowie weiterer klinischer Daten wird deutlich, dass die beschriebene Ungleichheit der klinischen Daten durch die spezielle Fragestellung, den Vergleich eben dieser beiden Patientengruppen, bedingt werden: Chorioamnionitis und Frühgeburtlichkeit zählen zu den Hauptrisikofaktoren der konnatalen Infektion: die intrauterine Infektion führt zur Frühgeburtlichkeit und im weiteren Verlauf zur Infektion des Neugeborenen. Das geringere Gestationsalter und das niedrigere Geburtsgewicht sind eine Folge der Frühgeburtlichkeit. Dies spiegelt sich nicht zuletzt in dem hohen Anteil intrauteriner Infektionen in der Gruppe der erkrankten Kinder wider: Bei immerhin 43,75% konnte eine Chorioamnionitis nachgewiesen werden. Das geringere Alter ebenso wie das niedrigere Gewicht der erkrankten Kinder ist demnach als ein Aspekt der zu Grunde liegenden Erkrankung und nicht losgelöst hiervon zu betrachten – was nicht ausschließt, dass einzelne der beobachteten Unterschiede auf Genexpressionsebene tatsächlich primär Ausdruck der unterschiedlichen Reifegrade sein können.

# 4.2 Analyse der Microarraydaten

## 4.2.1 Low-Level-Analyse

Für die Low-Level-Analyse der Microarraydaten wurde ein modularer Arbeitsablauf entwickelt, der in der Zwischenzeit mehrfach publiziert wurde <sup>178, 179</sup> und von Felix Thierer in seiner Dissertation über die "Transkriptionelle Sepsissignatur in Patienten mit Polytrauma <sup>88</sup> ausführlich diskutiert wird. Durch die aufeinander folgenden Schritte werden sowohl individuelle als auch systematische Fehler identifiziert und eliminiert. Der hohe Anteil verworfener Arrays erklärt sich durch Hindernisse in der Gewinnung ausreichender Mengen qualitativ hochwertiger RNA aus kleinsten Mengen Nabelschnurblut.

## 4.2.2 High-Level-Analyse

## 4.2.2.1 Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene

Mit STRIPE ließ sich die chromosomale Lokalisation der signifikant differenziell regulierten Gene visualisieren: es zeigte sich eine insgesamt ausgewogene Verteilung über alle Chromosomen. Zugleich waren einzelne Abschnitte mit einer höheren Dichte differenziell regulierter Gene erkennbar. Auffällig ist die überdurchschnittliche hohe Regulationsdichte auf den beiden Chromosomen 19 und X; während der hohe Anteil regulierter Gene auf Chromosom X vermutlich Ausdruck der geringen absoluten Zahl proteincodierender Gene ist, findet sich für den hohen Prozentsatz regulierter Gene auf Chromosom 19 bisher keine schlüssige Erklärung – weder auf der Ebene übergeordneter Transkriptionsfaktoren noch auf der Ebene stromaufwärts gelegener Schlüsselmoleküle.

## 4.2.2.2 Identifizierung überrepräsentierter biologischer Gruppen

Die Suche nach überrepräsentierten biologischen Kategorien ließ eine massive Überrepräsentation von Prozessen erkennen, die im Zusammenhang mit einer Entzün-
dungsantwort des Organismus stehen. Da hierbei neben signifikant differenziell regulierten Genen auch Gene berücksichtigt werden, die keine signifikant differenzielle Regulation aufweisen, legen die Ergebnisse der Analyse erstens nahe, dass mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine reale Regulation der Immunantwort vorliegt. Zweitens deuten sie darauf hin, dass die Unterschiede in der Genexpression der beiden Gruppen im Wesentlichen Prozesse betreffen, die im unmittelbaren Zusammenhang mit einer Entzündungsantwort des Organismus stehen. Da DAVID für seine Analyse auf Gene Ontology Terms zurückgreift, hängt die Qualität der Analyse wesentlich von der Vollständigkeit der GO Terms ab.

#### 4.2.2.3 Visualisierung in aktuell verfügbaren Pathways

Die Analyse mit Pathway Explorer bestätigte die bereits zuvor beobachtete Überrepräsentation von Genen, die mit Inflammation / Abwehrreaktion assoziiert sind, lieferte darüber hinaus jedoch kaum neue Erkenntnisse. Mit einer Ausnahme: die ausgeprägte Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels, die mit DAVID nicht detektiert worden war, zeigte sich in der Pathway Analyse umso eindrücklicher. Deutlich wurde jedoch auch: Die Analyse mit Pathway Explorer – oder vergleichbaren Anwendungen - hat zwei wesentliche Nachteile: 1. Die begrenzte Zahl / Auswahl verfügbarer Pathways: Stoffwechsel- oder Signalwege, für die kein Pathway existiert, bleiben unberücksichtigt. 2. Den begrenzten Umfang der verfügbaren Pathways: darstellen lassen sich nur solche Gene, die Elemente eines vorhandenen Pathways sind. Gene, die zwar Bestandteil eines Stoffwechsel- oder Signalweges sind, aber kein Element des zugehörigen Pathways, bleiben – unabhängig von ihrer realen Bedeutung – unberücksichtigt. Ein besonders treffendes Beispiel hierfür ist die Phosphofruktokinase 2 / Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3 (PFKFB3 / PFK2): das bifunktionale Enzym, das die Aktivität der Phosphofruktokinase 1, des bedeutendsten Schlüsselenzyms der Glykolyse, reguliert und so wesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Glukoseabbaus nimmt, ist weder bei BioCarta noch bei KEGG als Element des Glykolyse-Pathways aufgeführt. Die Analyse mit Pathway Explorer oder ähnlichen Anwendungen kann daher eine sinnvolle Ergänzung darstellen, eine gewissenhafte Analyse und Grundkenntnisse in Biochemie kann sie nicht ersetzen.

#### 4.2.2.4 Analyse mit "Ingenuity Pathways Analysis"

Mit Ingenuity Pathways Analysis konnten die bereits gewonnenen Ergebnisse bestätigt und ergänzt werden. Die differenzielle Expression in den Bereichen Immunantwort und Glykolyse ließ sich erneut nachweisen und die Interaktion der verschiedenen Moleküle visualisieren. Erstmals detektiert wurde eine Regulation, die auf eine respiratorische Erkrankung hindeutet (siehe: 3.3.2.6.2 "Top Bio Functions", Abbildung 16). IPA bot darüber hinaus eine Reihe weiterer Möglichkeiten zur gezielten Analyse relevanter Prozesse oder einzelner Gene.

## 4.2.2.5 Analyse mit "BioBase ExPlain"

Die Analyse mit BioBase ExPlain ermöglichte die Identifikation überrepräsentierter Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den Promotoren des Sets signifikant differenziell regulierter Gene sowie die Identifikation passender Transkriptionsfaktoren. Es ist anzunehmen, dass die so identifizierten Transkriptionsfaktoren, die sich wie ihre Zielgene durch eine signifikant differenzielle Regulation auszeichnen, einen wesentlichen Einfluss auf die beobachtete Mehr- oder Minderexpression haben. Mit Hilfe der Knotenpunktanalyse gelang es, stromaufwärts gelegene Schlüsselmoleküle zu identifizieren und deren Verbindung zu ihren weiter stromabwärts gelegenen Zielgenen in Form von Netzwerken zu visualisieren. Die Ergebnisse der funktionellen Analyse bestätigten die bereits zuvor mit DAVID gewonnenen Ergebnisse.

### 4.2.2.6 Darstellung der wichtigsten beeinträchtigten Funktionsbereiche

Die von uns beobachteten Unterschiede in der Genexpression erkrankter, beziehungsweise nicht erkrankter Frühgeborener lassen vier beeinträchtigte Funktionsbereiche erkennen: neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, Kohlenhydratstoffwechsel und Hypoxie. Auf diese soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden.

### 4.2.2.6.1 Neutrophile / Chemotaxis / Antigene / DNA-Schädigung

Die quantitative und qualitative Beeinträchtigung neonataler Neutrophiler wird in mehreren Studien und Übersichtsartikeln als eine der wesentlichen Ursachen für die erhöhte Suszeptibilität Frühgeborener gegenüber peripartal auftretenden Infektionen genannt <sup>17, 180, 181</sup>: während die quantitative Beeinträchtigung, bedingt durch die geringe Zahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten, die limitierte Leistungsfähigkeit der Vorläuferzellen und die rasche Erschöpfung der vorhandenen Reserven, innerhalb kurzer Zeit zu einer Neutropenie führt, betrifft die qualitative Beeinträchtigung endotheliale Adhäsion, transendotheliale Migration, Chemotaxis, Phagocytose und Bakterizidität der verfügbaren Zellen <sup>182</sup>. Verursacht wird sie durch die verminderte

Expression von Adhäsionsmolekülen <sup>183 - 186</sup> und Chemokin-Rezeptoren, den in seiner Wirkung abgeschwächten Respiratory Burst, einen Mangel an Opsoninen <sup>187 - 190</sup> und die reduzierte Konzentration antibakteriell wirksamer Proteine <sup>191, 192</sup>. Die verzögerte Apoptose neutrophiler Granulozyten trägt darüber hinaus zur Pathogenese einer ungerichteten Hyperinflammation bei <sup>182, 193 - 196</sup> und begünstigt ebenso wie das Ungleichgewicht zwischen neutrophiler Elastase und ihren Inhibitoren die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie <sup>113, 197, 198</sup>. Von den genannten Defiziten sind Neutrophile von Frühgeborenen jeweils stärker betroffen als solche von reifen Neugeborenen <sup>17, 18</sup>.

Die Ergebnisse unserer Analyse lassen deutliche Unterschiede in der Expression neutrophilenspezifischer Gene zwischen Frühgeborenen mit konnataler Infektion und Frühgeborenen ohne konnatale Infektion erkennen; zahlreiche Gene, die im direkten Zusammenhang mit der Funktion neutrophiler Granulozyten stehen, werden in der Gruppe der erkrankten Kinder signifikant vermehrt exprimiert. Die differenziell regulierten Gene nehmen Einfluss auf alle der oben genannten Bereiche: endotheliale Adhäsion, transendotheliale Migration, Chemotaxis, Phagocytose und Bakterizidität. IL8 fördert die endotheliale Adhäsion neutrophiler Granulozyten, indem es die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche induziert, CD177 unterstützt die transendotheliale Migration durch die Interaktion mit PECAM-1, Calgranulin C, LTA4H, CXCR4, HEBP1 und FPR1 tragen zur Chemotaxis bei und unterstützen so die Migration neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe. NCF2 ist als Untereinheit der NADPH Oxidase an der Erzeugung des superoxidativen Burst beteiligt. AZU1, MPO, LTF und PGLYRP1 sind antimikrobiell wirksame Proteine, deren Expression durch den Transkriptionsfaktor CEBPB reguliert wird.

Die von uns beobachtete differenzielle Regulation lässt unterschiedliche Interpretationen zu: Sie kann – wie unter 3.3.2.8.1.6 "Neutrophile Granulozyten - Zusammenfassende Darstellung" ausgeführt – A) Ausdruck einer erhöhten Aktivität neutrophiler Granulozyten in der Gruppe der erkrankten Kinder sein oder B) als Ausdruck einer stärker ausgeprägten Unreife verstanden werden. Im ersten Fall wäre die vermehrte Expression neutrophilenspezifischer Gene Vorbote einer bevorstehenden Hyperinflammation, die über eine stärker ausgeprägte Gewebsschädigung im weiteren Verlauf zum Beispiel die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie begünstigt <sup>104, 113, 197, 198</sup>. Im zweiten Fall hingegen könnte die Mehrexpression neutrophilenspezifischer Gene einen verzögert ablaufenden Reifungsprozess reflektieren, der in den Granulozyten der nicht erkrankten Kinder schon vorangeschritten oder bereits abgeschlossen ist. Denkbar wäre auch eine Kombination aus beiden: eine Unreife neutrophiler Granulozyten, die sich in Form einer unkontrollierten Hyperinflammation äußert. Die ebenfalls vermehrte Expression DNA-reparierender Werkzeuge jedenfalls legt nahe, dass die erkrankten Kinder schon peripartal an einer stärkeren Schädigung leiden.

Die Frage, ob die vermehrte Expression neutrophilenspezifischer Gene Ausdruck einer Hyperinflammation oder einer stärkeren Unreife ist, sollte sich mit Hilfe von Neutrophilenfunktionstests beantworten lassen: den Nachweis von CD11a, CD11b, CD18, eine Durchflusszytometrie für Superoxid oder eine Anti-Lactoferrin-Färbung.

Unabhängig von den tatsächlichen Gründen für die beschriebenen Expressionsunterschiede zeigen die Ergebnisse unserer Analyse, dass Neugeborene, die mit einer konnatalen Infektion geboren werden, sich auf mRNA-Ebene bereits wenige Minuten nach Geburt durch eine vermehrte Expression neutrophilenspezifischer Gene auszeichnen – zu einem Zeitpunkt, zu dem klinisch noch keine Unterscheidung möglich ist.

#### 4.2.2.6.2 Natürliche Killerzellen

Ein direkter Zusammenhang zwischen einem Defekt natürlicher Killerzellen und dem Schweregrad neonataler Infektionen wurde erstmals 2000 von Mazur et al. hergestellt <sup>199</sup>. Im darauf folgenden Jahr gelang es dann Georgeson et al., einen im Vergleich mit gesunden Neugeborenen dramatischen Abfall der NK zellulären Zytotoxizität in Neugeborenen mit neonataler Sepsis nachzuweisen <sup>200</sup>. El-Sameea et al. folgerten aus den Ergebnissen ihrer 2004 veröffentlichten Studie, dass nicht die absolute Zahl natürlicher Killerzellen, sondern die reduzierte Aktivität der vorhandenen Zellen mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine neonatale Sepsis assoziiert sei. Sie berichteten von einer Korrelation zwischen NK zellulärer Aktivität und Schwere der Erkrankung / klinischem Outcome. Ihren Untersuchungen zufolge erwies sich die NK zelluläre Zytotoxizität zudem als guter Marker der neonatalen Sepsis. Sensitivität, Spezifität und prädiktiver Wert sollen der von CRP, IL8 sowie einer Kombination aus beiden überlegen gewesen sein <sup>201</sup>. 2007 beobachteten Shanley et al. bei Kindern mit septischem Schock eine verminderte Expression von Genen, die am Signaling von NK Zellen beteiligt sind, auf mRNA-Ebene <sup>46, 45</sup>. Die Ergebnisse unserer Analyse bestätigen, dass die konnatale Infektion mit einer Beeinträchtigung natürlicher Killerzellen assoziiert ist. Darüber hinaus zeigen sie, dass sich diese Beeinträchtigung auf mRNA-Ebene bereits wenige Minuten nach Geburt nachweisen lässt. Als mögliche Ursachen für die verminderte Expression NK Zell-spezifischer Gene kommen sowohl eine geringere Aktivität als auch eine Reduktion der absoluten Zahl natürlicher Killerzellen im Blut in Frage. Da die isolierte Bestimmung der Genexpression keine Festlegung zulässt, sind zur Beantwortung dieser Frage weitere Experimente wie beispielsweise die <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Analyse <sup>202</sup> zur Untersuchung der NK zellulären Zytotoxizität erforderlich. Unter Berücksichtigung bereits publizierter Forschungsergebnisse <sup>201</sup> ist jedoch eher von einer geringeren Aktivität als von einer Depletion natürlicher Killerzellen auszugehen.

2008 wurden gleich mehrere Arbeiten publiziert, in denen der Einfluss von NK Zellen auf die adaptive Immunität untersucht und beschrieben wird: Yoshida et al. gelang der experimentelle Nachweis einer Beeinträchtigung der adaptiven Immunität in NK Zell-depletierten Mäusen<sup>203</sup>. Sie schlossen daraus, dass natürlichen Killerzellen eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Antigen-spezifischen Antwort der erworbenen Immunität zukommt. Brilot et al. beschrieben in einem im Mai 2008 veröffentlichten Review die molekularen Mechanismen, die dem Cross-Talk zwischen natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen zu Grunde liegen. Sie stellten dar, wie die Interaktion von dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen sowohl zu einer Förderung der angeborenen Immunantwort als auch zu einer Modellierung der erworbenen Immunantwort führt <sup>19</sup>. Moretta et al. ebenso wie Reschner et al. unterstrichen die besondere Bedeutung von NK Zellen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität: Ihren Angaben zufolge ist der Einfluss natürlicher Killerzellen auf die Reifung dendritischer Zellen unabdingbar für die Induktion einer protektiven Th1 Antwort <sup>20, 204</sup>: die adäquate Aktivierung neonataler T-Zellen wird demnach von Qualität und Quantität der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen bestimmt 17, 205 - 207

Die von uns beobachtete verminderte Expression von NK Zell-spezifischen Genen auf mRNA-Ebene gewinnt in Anbetracht des besonderen Einflusses natürlicher Killerzellen auf die Aktivierung und Modellierung einer effektiven Antwort der adaptiven Immunität an Bedeutung. Der in den vergangenen Jahren mehrfach beschriebene Zusammenhang zwischen der Sepsis des Neugeborenen und einer Beeinträchtigung neonataler NK-Zellen legt nahe, dass den natürlichen Killern für das Verständnis der Pathophysiologie der konnatalen Infektion möglicherweise eine wichtigere Rolle zukommt als zunächst angenommen.

#### 4.2.2.6.3 Kohlenhydratstoffwechsel

Während die Rolle des Glukosestoffwechsels in der Pathophysiologie und der Therapie der adulten Sepsis in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Forschung war <sup>208 - 210</sup>, sind die Zusammenhänge zwischen der Infektion des Neugeborenen und einer Störung des Kohlenhydratstoffwechsels in den letzten drei Jahrzehnten kaum untersucht worden. 2008 beschrieben Hollis et al. die Korrelation zwischen einer Störung des Blutglukosespiegels und dem klinischen Outcome neonater Fohlen <sup>211</sup>. Leake et al. hatten 27 Jahre zuvor eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels in infizierten Neugeborenen feststellen können, für die sie jedoch keine Erklärung fanden <sup>212</sup>.

Die Ergebnisse unserer Analyse bestätigen diese Beobachtungen, indem sie belegen, dass die konnatale Infektion mit einer Beeinträchtigung des Kohlenhydratstoffwechsels einhergeht. Wir finden darüber hinaus Hinweise darauf, dass den beschriebenen Störungen umfassende Änderungen der genetischen Expression vorausgehen, die sich auf mRNA-Ebene bereits wenige Minuten nach Geburt nachweisen lassen. Diese betreffen Enzyme sowohl der aeroben und anaeroben Glykolyse als auch des Glykogenstoffwechsels.

Mehrfach beschrieben wurde, dass Frühgeborene generell ein erhöhtes Risiko haben, eine Hypoglykämie zu erleiden. Hierzu trägt neben ihrer Unreife bei, dass sie besonders oft von Hypoxie und Sepsis betroffen sind <sup>213</sup>. Als Ursache der Unterzuckerung wird zum Beispiel eine Beeinträchtigung der Leberfunktion angenommen, die bei Frühgeborenen häufiger als bei normalen Neugeborenen beobachtet wird. Auch diese wird durch Hypoxie und Sepsis begünstigt <sup>214</sup>.

Die von uns beobachteten Veränderungen auf Genexpressionsebene zeigen, dass Frühgeborene mit konnataler Infektion von den beschriebenen Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels in stärkerem Maße betroffen sind als Frühgeborene ohne konnatale Infektion. Sie legen darüber hinaus nahe, dass bereits eine Beeinträchtigung vorgelegen hat, bevor die konstante Versorgung des Neugeborenen mit mütterlicher Glukose nach Durchtrennung der Nabelschnur unterbrochen wurde. Die vermehrte Expression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels ist möglicherweise Ausdruck eines schon bestehenden Energiemangels der im Blut zirkulierenden Leukozyten.

#### 4.2.2.6.4 Hypoxie

Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Frühgeborene mit konnataler Infektion peripartal von einer stärkeren Hypoxie betroffen sind als andere Frühgeborene. Die hierdurch bedingte vermehrte Expression von HIF1A und verschiedener weiterer Gene, die ebenso mit Sauerstoffmangel assoziiert sind, lässt sich bereits zu diesem frühen Zeitpunkt auf Genexpressionsebene nachweisen. Mit Hilfe von literaturbasierten Netzwerken konnte darüber hinaus der enge Zusammenhang zwischen Hypoxie, Inflammation und Kohlenhydratstoffwechsel nachvollzogen werden. Die Regulation zentraler Transkriptionsfaktoren wie HIF1A, CEBPA, CEBPB oder CREBBP führt dabei zu einer zeitgleichen Beeinflussung unterschiedlicher Pathways. Dass eine vermehrte Expression von HIF1A nicht zwangsläufig als Ausdruck einer Hypoxie sondern stattdessen auch als Ausdruck eines entzündlichen Geschehens verstanden werden kann, zeigt die Arbeit von Boeuf et. al. aus dem Jahr 2008. Ihre Untersuchungen der plazentaren Malaria ergaben erhöhte Transkriptionswerte für HIF1A, obwohl keine Anzeichen einer plazentaren Hypoxie erkennbar waren <sup>215</sup>.

Studien der vergangen Jahre weisen darauf hin, dass HIF1A einen wichtigen Einfluss auf die Lungenreifung nimmt; eine Alteration des HIF1A-Signalings, wie sie bei Frühgeborenen auftritt, soll sowohl zur Entwicklung eines neonatalen Atemnotsyndrom beitragen als auch zur Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie. So konnte 2007 im Mausmodell nachgewiesen werden, dass der Verlust des Transkriptionsfaktors eine beeinträchtigte Entwicklung des Alveolarepithels zur Folge hat, der sich ein Atemnotsyndrom (RDS) anschließt <sup>216</sup>. Im gleichen Jahr wurde bei frühgeborenen Schafen mit RDS eine Verminderung von HIF1A auf Proteinebene beobachtet <sup>217</sup>.

Vor diesem Hintergrund könnte die von uns bereits kurz nach Geburt beobachtete Beeinträchtigung des HIF-Pathways mit einer Schädigung des Alveolarepithels in Zusammenhang stehen, die sich in Form eines Atemnotsyndroms äußern und im weiteren Verlauf in eine bronchopulmonale Dysplasie übergehen könnte.

#### 4.2.2.7 Hierarchische Cluster-Analyse mit dCHIP

Bei der hierarchischen Clusteranalyse werden Patienten mit ähnlichen Genexpressionsmustern Gruppen zugeordnet. Im Idealfall lassen sich auf diese Weise Patientengruppen anhand ihres Genexpressionsmusters klar voneinander differenzieren.

Unsere Analyse zeigte anhand des Genexpressionsmusters keine eindeutige Trennung zwischen Frühgeborenen mit und ohne konnatale Infektion. Das ist möglicherweise einerseits dadurch zu begründen, dass die hier untersuchten Patintengruppen für eine eindeutige Trennung nicht groß genug sind und anderseits dadurch, dass die durch die unbekannte Erkrankungsdauer bedingte interindividuelle zeitliche Verschiebung des Genexpressionsmusters zu einer Unschärfe der spezifischen Genexpressionsmuster zum Zeitpunkt der Geburt führt, die eine eindeutige Zuordnung der Patienten mittels Cluster-Analyse verhindert.

Die Cluster-Analyse erlaubte aber die Identifikation von Clustern mit Häufungen der jeweiligen Patientengruppe (Abb. 28). So machten Patienten mit konnataler Infektion 80% des Clusters A und 86% des Clusters B2 aus, während Patienten ohne konnatale Infektion 71% des Clusters B1 ausmachten. Die Gruppe der Frühgeborenen mit konnataler Infektion zeigte eine Unterteilung in zwei Subklassen mit jeweils eigenen Genexpressionsprofilen (Subklasse 1 und 2). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen von Wong et al. 2009, die bei pädiatrischen Patienten mit septischem Schock Subklassen mit jeweils spezifischen Genexpressionsprofilen identifizieren konnten <sup>218, 219</sup>.

#### 4.2.2.8 Potentielle Biomarker der konnatalen Infektion

Zu den ungelösten Problemen der konnatalen Infektion zählt insbesondere das Fehlen eines geeigneten Biomarkers, der eine sichere und frühzeitige Diagnosestellung ermöglicht – und dabei möglichst einfach zu bestimmen ist. In den vergangenen Jahren wurden deshalb Proteine wie PCT <sup>220 - 222</sup>, CD64 <sup>223, 224</sup> und MBL <sup>225 - 228</sup> als potentielle neue Marker der neonatalen Sepsis diskutiert. Auch der Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Detektion kleinster Mengen bakterieller DNA wird beforscht.

In ihrer Publikation von 2006 schätzten López Sastre et. al. <sup>220</sup> Procalcitonin als einen Marker mit moderater Verlässlichkeit ein; zugleich wiesen sie darauf hin, dass PCT als einzelner Marker für die Erkennung der nosokomialen neonatalen Sepsis nicht ausreicht, in Kombination mit weiteren Parametern hingegen von Nutzen sein kann. 2007 berichteten López Sastre et al <sup>221</sup>, dass Procalcitonin auch für die Diagnose der vertikal übertragenen Sepsis eingeschränkt nutzbar sei, sofern innerhalb der ersten 48 Lebensstunden jeweils spezifische Grenzwerte gewählt werden. Kocabas et. al. veröffentlichten 2007 eine Arbeit, in der sie eine Gruppe gesunder Neugeborener (n=26) mit einer Gruppe septischer Patienten (n=29) verglichen. In ihrer Studie untersuchten sie den Wert unterschiedlicher Parameter in der Diagnose der neonatalen Sepsis. Nach Auswertung der Ergebnisse kamen sie zu dem Schluss, dass TNF $\alpha$  und Procalcitonin für die Diagnose der neonatalen Sepsis besser geeignet seien als CRP, IL6 und IL8<sup>222</sup>.

In einer im Januar 2008 publizierten Studie untersuchten Bhandari et. al. CD64 auf seinen Nutzwert als diagnostischer Marker der neonatalen Sepsis. CD64 ist ein Fc $\gamma$ -Rezeptor auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten. Sie bezeichneten CD64 als einen hoch sensitiven Marker, der ihren Untersuchungen zu Folge in Kombination mit der absoluten Zahl neutrophiler Granulozyten über eine Sensitivität von 95% sowie einen negativen Vorhersagewert von 93% verfüge. Als weitere Vorteile nannten sie die rasche Verfügbarkeit der Ergebnisse sowie die im Vergleich mit anderen Parametern geringeren Blutvolumina, die für die Bestimmung benötigt würden <sup>223</sup>.

In den vergangenen Jahren sind der Zusammenhang zwischen dem Mannosebindenden Lektin (MBL) und neonataler Infektion zunehmend untersucht worden. Im Juli 2006 berichteten Frakking et al., dass unreife Frühgeborene über geringere Konzentrationen an MBL verfügen als reifere Neugeborene mit einem höherem Gestationsalter. Sie stellten eine positive Korrelation zwischen MBL Konzentration und Alter des Neugeborenen fest <sup>225</sup>. Im November des darauf folgenden Jahres stellten sie zudem einen Zusammenhang her zwischen einer niedrigen MBL Konzentration bei Geburt und einem erhöhten EONS-/Pneumonie-Risiko <sup>226</sup>. Im Februar 2008 berichteten van der Zwet et. al., dass sie in ihren Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen MBL Genotyp und dem Risiko einer nosokomialen Sepsis oder einer Pneumonie feststellen konnten <sup>227</sup>. Etwa zeitgleich bestätigten Dzwonek et al, dass niedrige MBL Konzentrationen in Frühgeborenen mit einem erhöhten Infektionsrisiko einher gehen <sup>228</sup>. Für die frühzeitige Diagnose der konnatalen Infektion spielt die Blutkultur aus praktischen Gründen nur eine untergeordnete Rolle: ihre Ergebnisse liegen erst spät vor und sind in vielen Fällen falsch negativ (siehe: 1.5.3.1: Hindernisse in der Therapie der neonatalen Sepsis). In einer im Jahr 2006 veröffentlichten Studie <sup>6</sup> wurde deshalb untersucht, ob mit Hilfe der 16s rDNA Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ein früherer und sicherer Bakteriennachweis möglich ist. Hierbei zeigte sich eine hohe Spezifität bei geringer Sensitivität: eine signifikante Zahl erkrankter Kinder mit positiver Blutkultur wurde nicht erkannt. Die unzureichende Sensitivität wurde auf Schwächen im Studiendesign zurückgeführt.

Unsere Analyse zeigt, dass keines der 198 signifikant differenziell regulierten Gene für sich allein betrachtet eine klare Differenzierung zwischen erkrankten und nicht erkrankten Neugeborenen erlaubt und als alleiniger früher Biomarker fungieren könnte. Jedoch können ausgehend von unseren Ergebnissen Kombinationen aus mehreren Genen als zukünftige Biomarker in Frage kommen. Hierbei wären vor allem die genannten Gene bzw. deren Genprodukte der Neutrophilenaktivierung und Deaktivierung von natürlichen Killerzellen sowie des Kohlenhydratstoffwechsels und des HIF-Pathways zu nennen. Diese Gene bzw. deren Genprodukte stellen potentielle Biomarker dar, die früh auf das Vorliegen einer konnatalen Infektion hinweisen könnten und in weiterführenden Studien überprüft werden müssen.

#### 4.2.3 Validierung

Die Microarraydaten konnten mit der durchgeführten RT-PCR mit einem r=0.74 validiert werden. Dass die Korrelation der Ergebnisse der beiden Verfahren nicht höher ausgefallen ist, ist am ehesten zurückzuführen auf die heterogene Zusammensetzung der Gruppe der Frühgeborenen mit konnataler Infektion, welche sich vor allem im hierarchischen Clustering in Form von Subklassen gezeigt hat. Die hierfür zugrunde liegende heterogene Genexpression zeigt bei Einzelgennachweisen wie der RT-PCR eine höhere Schwankungsbreite über alle Individuen hinweg als bei Microarrays.

## 5 Fazit

Trotz zahlreicher Fortschritte in der intensivmedizinischen Behandlung Früh- und Neugeborener stellt die konnatale Infektion des Neugeborenen bis heute eines der großen ungelösten Probleme in der perinatalen Medizin dar. Vor diesem Hintergrund eröffnet der Einsatz von Microarrays über die Identifizierung spezifischer Genexpressionsmuster tiefere Einblicke in die zugrunde liegende Pathophysiologie und ermöglicht auf diese Weise eine Weiterentwicklung der diagnostischen Möglichkeiten einer konnatalen Infektion.

Im Rahmen unserer Studie ist es uns gelungen nachzuweisen, dass bereits wenige Minuten postpartal Unterschiede in der Genexpression erkrankter und nicht erkrankter Frühgeborener bestehen. Diese betreffen im Wesentlichen Prozesse, die im Zusammenhang mit einer Entzündungsantwort des Organismus stehen. Die Ergebnisse unserer Analyse weisen auf eine höhere Aktivität neutrophiler Granulozyten, eine beeinträchtigte Funktion natürlicher Killerzellen, eine stärker ausgeprägte Hypoxie sowie eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels in der Gruppe der erkrankten Kinder hin. Als potentielle frühe Biomarker der konnatalen Infektion kommen daher Kombinationen mehrerer Gene dieser Funktionsbereiche in Frage. Um die gewonnenen Erkenntnisse einer klinischen Anwendung zugänglich zu machen, sind weiterführende Studien erforderlich.

## Literaturverzeichnis

1 Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Diagnose und Therapie der Sepsis. S-2 Leitlinien der deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). Intensivmed 2006: 369–84.

2 Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, et al. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. J. Pediatr. 1996; 129: 72–80.

3 Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. Pediatrics 2007; 119: 891–96. doi:10.1542/peds.2006-0440.

4 Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. Lancet 2005; 365: 1147–52. doi:10.1016/S0140-6736(05)71877-8.

5 Weston EJ, Pondo T, Lewis MM, et al. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008. Pediatr. Infect. Dis. J. 2011; 30: 937–41. doi:10.1097/INF.0b013e318223bad2.

6 Jordan JA, Durso MB, Butchko AR, Jones JG, Brozanski BS. Evaluating the nearterm infant for early onset sepsis: progress and challenges to consider with 16S rDNA polymerase chain reaction testing. J Mol Diagn 2006; 8: 357–63. doi:10.2353/jmoldx.2006.050138.

7 Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. Pediatrics 2005; 116: 595–602. doi:10.1542/peds.2005-0552.

8 Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 240–47. doi:10.1056/NEJMoa012657.

9 Bizzarro MJ, Dembry L, Baltimore RS, Gallagher PG. Changing patterns in neonatal Escherichia coli sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. Pediatrics 2008; 121: 689–96. doi:10.1542/peds.2007-2171. 10 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit. Care Med. 1992; 20: 864–74.

11 Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17: 638-80, table of contents. doi:10.1128/CMR.17.3.638-680.2004.

12 Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med 2005; 6: 2–8. doi:10.1097/01.PCC.0000149131.72248.E6.

13 Eschenbach DA, Gravett MG, Chen KC, Hoyme UB, Holmes KK. Bacterial vaginosis during pregnancy. An association with prematurity and postpartum complications. Scand J Urol Nephrol Suppl 1984; 86: 213–22.

14 Martius J, Eschenbach DA. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infection, chorioamnionitis and prematurity--a review. Arch. Gynecol. Obstet. 1990; 247: 1–13.

15 McGregor JA, French JI. Bacterial vaginosis in pregnancy. Obstet Gynecol Surv 2000; 55: S1-19.

16 Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. N. Engl. J. Med. 1998; 338: 663–70. doi:10.1056/NEJM199803053381006.

17 Berner R. Molekulare Mechanismen der neonatalen Abwehr von bakteriellen Infektionen. In: Ganten D, Ruckpaul K, Wauer, eds. Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; Springer, 2005: 477–505.

18 Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. Nat. Rev. Immunol. 2007; 7: 379–90. doi:10.1038/nri2075.

19 Brilot F, Strowig T, Munz C. NK cells interactions with dendritic cells shape innate and adaptive immunity. Front. Biosci. 2008; 13: 6443–54.

20 Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. Cell Death Differ. 2008; 15: 226–33. doi:10.1038/sj.cdd.4402170. 21 Zilow EP, Brüssau J, Linderkamp O, Zilow G. In vitro activation of classical and alternative pathway of the complement system. Pediatr Res 1995; 38: 462.

22 Zilow G, Zilow EP, Burger R, Linderkamp O. Complement activation in newborn infants with early onset infection. Pediatr. Res. 1993; 34: 199–203. doi:10.1203/00006450-199308000-00020.

23 Janeway CA, JR, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology. The immune system in health and disease. New York: Garland Science Publishing, 2005.

24 Ygberg S, Nilsson A. The developing immune system - from foetus to toddler. Acta Paediatr. 2012; 101: 120–27. doi:10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x.

25 Comans-Bitter WM, Groot R de, van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. J. Pediatr. 1997; 130: 388–93.

26 Walker JC, Smolders MAJC, Gemen EFA, Antonius TAJ, Leuvenink J, Vries E de. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. Scand. J. Immunol. 2011; 73: 53–58. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02473.x.

27 Juretić E, Juretić A, Uzarević B, Petrovecki M. Alterations in lymphocyte phenotype of infected preterm newborns. Biol. Neonate 2001; 80: 223–27.

28 Cairo MS. Neonatal neutrophil host defense. Prospects for immunologic enhancement during neonatal sepsis. Am. J. Dis. Child. 1989; 143: 40–46.

29 Leviton A, Fichorova R, Yamamoto Y, et al. Inflammation-related proteins in the blood of extremely low gestational age newborns. The contribution of inflammation to the appearance of developmental regulation. Cytokine 2011; 53: 66–73. doi:10.1016/j.cyto.2010.09.003.

30 Hofer N, Müller W, Resch B. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) definition and correlation with early-onset bacterial infection of the newborn. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2010; 95: F151. doi:10.1136/adc.2009.161638.

31 Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. J Intensive Care Med 2007; 22: 63–72. doi:10.1177/0885066606297123.

32 O'Shea TM, Allred EN, Kuban KCK, et al. Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at 2 years of age in extremely preterm infants. J. Pediatr. 2012; 160: 395-401.e4. doi:10.1016/j.jpeds.2011.08.069.

33 Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin. Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. Elektronische Publikation im Auftrag des Vorstands der GNPI: AWMF online, Stand 02/2006. http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll/024-008.htm.

34 Hofer N, Zacharias E, Müller W, Resch B. Performance of the definitions of the systemic inflammatory response syndrome and sepsis in neonates. J Perinat Med 2012; 0: 1–4. doi:10.1515/jpm-2011-0308.

35 Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sánchez PJ, Risser R. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates. Pediatrics 1994; 94: 76–82.

36 Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2004; 89: F229-35.

37 Friedman S, Shah V, Ohlsson A, Matlow AG. Neonatal escherichia coli infections: concerns regarding resistance to current therapy. Acta Paediatr. 2000; 89: 686–89.

38 Sanghvi KP, Tudehope DI. Neonatal bacterial sepsis in a neonatal intensive care unit: a 5 year analysis. J Paediatr Child Health 1996; 32: 333–38.

39 Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? Mol Oncol 2010; 4: 192–208. doi:10.1016/j.molonc.2010.04.004.

40 Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999; 96: 9212–17.

41 Bluth M, Lin Y, Zhang H, Viterbo D, Zenilman M. Use of gene expression profiles in cells of peripheral blood to identify new molecular markers of acute pancreatitis. Arch Surg 2008; 143: 227-33; discussion 233-4. doi:10.1001/archsurg.2007.73.

42 Laudanski K, Miller-Graziano C, Xiao W, et al. Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006; 103: 15564–69. doi:10.1073/pnas.0607028103. 43 Cobb JP, Mindrinos MN, Miller-Graziano C, et al. Application of genome-wide expression analysis to human health and disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005; 102: 4801–06. doi:10.1073/pnas.0409768102.

44 Russom A, Sethu P, Irimia D, et al. Microfluidic leukocyte isolation for gene expression analysis in critically ill hospitalized patients. Clin. Chem. 2008; 54: 891–900. doi:10.1373/clinchem.2007.099150.

45 Wong HR. Pediatric septic shock treatment: new clues from genomic profiling. Pharmacogenomics 2007; 8: 1287–90. doi:10.2217/14622416.8.10.1287.

46 Shanley TP, Cvijanovich N, Lin R, et al. Genome-level longitudinal expression of signaling pathways and gene networks in pediatric septic shock. Mol. Med. 2007; 13: 495–508. doi:10.2119/2007-00065.Shanley.

47 Pedotti P, Hoen PAC 't, Vreugdenhil E, et al. Can subtle changes in gene expression be consistently detected with different microarray platforms? BMC Genomics 2008; 9: 124. doi:10.1186/1471-2164-9-124.

48 Zhang Y, Szustakowski J, Schinke M. Bioinformatics analysis of microarray data. Methods Mol. Biol. 2009; 573: 259–84. doi:10.1007/978-1-60761-247-6\_15.

49 Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. J. Pediatr. 1988; 112: 761–67.

50 Squire E, Favara B, Todd J. Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fatal and nonfatal cases. Pediatrics 1979; 64: 60–64.

51 Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. J. Pediatr. 1979; 95: 89–98.

52 Schelonka RL, Yoder BA, desJardins SE, Hall RB, Butler J. Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. J. Pediatr. 1994; 125: 603–06.

53 Mathers NJ, Pohlandt F. Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. Eur. J. Pediatr. 1987; 146: 147–51.

54 Berger C, Uehlinger J, Ghelfi D, Blau N, Fanconi S. Comparison of C-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicaemia. Eur. J. Pediatr. 1995; 154: 138–44.

55 Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. Pediatrics 1998; 102: E41.

56 Xanthou M. Leucocyte blood picture in healthy full-term and premature babies during neonatal period. Arch. Dis. Child. 1970; 45: 242–49.

57 Xanthou M. Leucocyte blood picture in ill newborn babies. Arch. Dis. Child. 1972; 47: 741–46.

58 Polin RA. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. Pediatrics 2012; 129: 1006–15. doi:10.1542/peds.2012-0541.

59 Gerdes JS, Polin R. Early diagnosis and treatment of neonatal sepsis. Indian J Pediatr 1998; 65: 63–78.

60 Couchard M, Polge J, Bomsel F. Maladie des membranes hyalines. diagnostic et surveillance radiologiques, traitement, complications étude radioclinique de 589 cas. Ann Radiol (Paris) 1974; 17: 669–83.

61 Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. J. Pediatr. 1978; 92: 529–34.

62 Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 163: 1723–29.

63 An international classification of retinopathy of prematurity. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. Arch. Ophthalmol. 1984; 102: 1130–34.

64 The CRIB (clinical risk index for babies) score: a tool for assessing initial neonatal risk and comparing performance of neonatal intensive care units. The International Neonatal Network. Lancet 1993; 342: 193–98.

65 Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldmann DA. Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. Pediatrics 1993; 91: 617–23.

66 Ma C, Lyons-Weiler M, Liang W, LaFramboise W, Gilbertson JR, Becich MJ, Monzon FA. In vitro transcription amplification and labeling methods contribute to the variability of gene expression profiling with DNA microarrays. J Mol Diagn 2006; 8: 183–92. doi:10.2353/jmoldx.2006.050077. 67 Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, et al. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. Nucleic Acids Res. 2002; 30: e30.

68 Kim K, Kim B, Yi G. Reuse of imputed data in microarray analysis increases imputation efficiency. BMC Bioinformatics 2004; 5: 160. doi:10.1186/1471-2105-5-160.

69 Troyanskaya O, Cantor M, Sherlock G, et al. Missing value estimation methods for DNA microarrays. Bioinformatics 2001; 17: 520–25.

70 Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. The Statistician 1983; 32: 307–17.

71 Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinincal measurement. Lancet 1986; 1: 307–10.

72 Boes T. Auswirkungen der Low-Level-Analyse auf die Ergebnisse von Genexpressionsdaten der Firma Affymetrix. Duisburg-Essen, 2007.

73 Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics 2003; 19: 185–93.

74 Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. Genome Biol. 2001; 2: RESEARCH0032.

75 Schadt EE, Li C, Ellis B, Wong WH. Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data. J. Cell. Biochem. Suppl. 2001; 37: 120–25.

76 Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. FEBS Lett. 2004; 573: 83–92. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.055.

77 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001; 98: 5116–21. doi:10.1073/pnas.091062498.

78 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological); 1995: 289–300.

79 Diehn M, Sherlock G, Binkley G, et al. SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. Nucleic Acids Res. 2003; 31: 219–23.

80 Ghai R, Lindemann H, Chakraborty T. Integrated functional visualization of eukaryotic genomes. BMC Bioinformatics 2006; 7: 348. doi:10.1186/1471-2105-7-348.

81 Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol. 2003; 4: P3.

82 Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat. Genet. 2000; 25: 25–29. doi:10.1038/75556.

83 Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. Proteins 1997; 28: 405–20.

84 Mlecnik B, Scheideler M, Hackl H, Hartler J, Sanchez-Cabo F, Trajanoski Z. PathwayExplorer: web service for visualizing high-throughput expression data on biological pathways. Nucleic Acids Res. 2005; 33: W633-7. doi:10.1093/nar/gki391.

85 Kel A, Konovalova T, Waleev T, Cheremushkin E, Kel-Margoulis O, Wingender E. Composite Module Analyst: a fitness-based tool for identification of transcription factor binding site combinations. Bioinformatics 2006; 22: 1190–97. doi:10.1093/bioinformatics/btl041.

86 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95: 14863–68.

87 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286: 531–37.

88 Thierer FJ. Transkriptionelle Sepsissignatur in Patienten mit Polytrauma. Dissertation. Gießen, 2010.

89 Ensembl Project. VEGA BLAST/BLAT Human Location based displays Whole genome. http://vega.sanger.ac.uk/Homo\_sapiens/Location/Genome?r=20:2613152-2748055 (accessed Sep 18, 2012).

90 Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. Biochem. Pharmacol. 2006; 72: 1622–31. doi:10.1016/j.bcp.2006.05.017.

91 Klempt M, Melkonyan H, Hofmann HA, Sorg C. Identification of epithelial and myeloid-specific DNA elements regulating MRP14 gene transcription. J. Cell. Biochem. 1999; 73: 49–55.

92 Kel A, Voss N, Valeev T, Stegmaier P, Kel-Margoulis O, Wingender E. ExPlain: finding upstream drug targets in disease gene regulatory networks. SAR QSAR Environ Res 2008; 19: 481–94. doi:10.1080/10629360802083806.

93 Robinson MJ, Hogg N. A comparison of human S100A12 with MRP-14 (S100A9). Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 275: 865–70. doi:10.1006/bbrc.2000.3407.

94 Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. Cell 1999; 97: 889– 901.

95 Rouleau P, Vandal K, Ryckman C, Poubelle PE, Boivin A, Talbot M, Tessier PA. The calcium-binding protein S100A12 induces neutrophil adhesion, migration, and release from bone marrow in mouse at concentrations similar to those found in human inflammatory arthritis. Clin. Immunol. 2003; 107: 46–54.

96 Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol 2006; 6: 173–82.

97 Poli V. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. J. Biol. Chem. 1998; 273: 29279–82.

98 Goethe R, Loc PV. The far upstream chicken lysozyme enhancer at -6.1 kilobase, by interacting with NF-M, mediates lipopolysaccharide-induced expression of the chicken lysozyme gene in chicken myelomonocytic cells. J. Biol. Chem. 1994; 269: 31302–09.

99 Ford AM, Bennett CA, Healy LE, Towatari M, Greaves MF, Enver T. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996; 93: 10838–43.

100 Oelgeschläger M, Nuchprayoon I, Lüscher B, Friedman AD. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. Mol. Cell. Biol. 1996; 16: 4717–25.

101 Dunn SM, Coles LS, Lang RK, Gerondakis S, Vadas MA, Shannon MF. Requirement for nuclear factor (NF)-kappa B p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte colony-stimulating factor promoter. Blood 1994; 83: 2469–79.

102 Zhang DE, Hohaus S, Voso MT, Chen HM, Smith LT, Hetherington CJ, Tenen DG. Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1996; 211: 137–47.

103 Pereira HA. CAP37, a neutrophil-derived multifunctional inflammatory mediator. J. Leukoc. Biol. 1995; 57: 805–12.

104 Buss IH, Senthilmohan R, Darlow BA, Mogridge N, Kettle AJ, Winterbourn CC. 3-Chlorotyrosine as a marker of protein damage by myeloperoxidase in tracheal aspirates from preterm infants: association with adverse respiratory outcome. Pediatr. Res. 2003; 53: 455–62. doi:10.1203/01.PDR.0000050655.25689.CE.

105 Jacobsen LC, Sørensen OE, Cowland JB, Borregaard N, Theilgaard-Mönch K. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils. J. Leukoc. Biol. 2008; 83: 1155–64. doi:10.1189/jlb.0706442.

106 Zhang Y, Syed R, Uygar C, et al. Evaluation of human leukocyte N-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients. Genes Immun. 2003; 4: 22–29. doi:10.1038/sj.gene.6363900.

107 Downey GP, Butler JR, Tapper H, Fialkow L, Saltiel AR, Rubin BB, Grinstein S. Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. J. Immunol. 1998; 160: 434–43.

108 Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. J. Leukoc. Biol. 2004; 76: 909–25. doi:10.1189/jlb.0604320.

109 Dziarski R, Platt KA, Gelius E, Steiner H, Gupta D. Defect in neutrophil killing and increased susceptibility to infection with nonpathogenic gram-positive bacteria in peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S)-deficient mice. Blood 2003; 102: 689– 97. doi:10.1182/blood-2002-12-3853.

110 Hauswirth DW, Sundy JS. Bioaerosols and innate immune responses in airway diseases. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004; 4: 361–66.

111 Xu P, Roes J, Segal AW, Radulovic M. The role of grancalcin in adhesion of neutrophils. Cell. Immunol. 2006; 240: 116–21. doi:10.1016/j.cellimm.2006.07.004.

112 Perani P, Zeggai S, Torriglia A, Courtois Y. Mutations on the hinge region of leukocyte elastase inhibitor determine the loss of inhibitory function. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 274: 841–44. doi:10.1006/bbrc.2000.3191.

113 Yasumatsu R, Altiok O, Benarafa C, Yasumatsu C, Bingol-Karakoc G, Remold-O'Donnell E, Cataltepe S. SERPINB1 upregulation is associated with in vivo complex formation with neutrophil elastase and cathepsin G in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2006; 291: L619-27. doi:10.1152/ajplung.00507.2005.

Sachs UJH, Andrei-Selmer CL, Maniar A, et al. The neutrophil-specific antigen
CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31).
J. Biol. Chem. 2007; 282: 23603–12. doi:10.1074/jbc.M701120200.

115 Lalezari P, Murphy GB, Allen FH. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. J. Clin. Invest. 1971; 50: 1108– 15. doi:10.1172/JCI106582.

116 Thunnissen MM, Nordlund P, Haeggström JZ. Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. Nat. Struct. Biol. 2001; 8: 131–35. doi:10.1038/84117.

117 Haeggström JZ, Tholander F, Wetterholm A. Structure and catalytic mechanisms of leukotriene A4 hydrolase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007; 83: 198–202. doi:10.1016/j.prostaglandins.2007.01.006.

118 Griffiths RJ, Pettipher ER, Koch K, et al. Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1995; 92: 517–21.

119 Haeggström JZ, Kull F, Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MMGM. Leukotriene A4 hydrolase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002; 68-69: 495–510. 120 Byrum RS, Goulet JL, Snouwaert JN, Griffiths RJ, Koller BH. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. J. Immunol. 1999; 163: 6810–19.

121 Vietinghoff S von, Ley K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. J. Immunol. 2008; 181: 5183–88.

122 Kucia M, Jankowski K, Reca R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. J. Mol. Histol. 2004; 35: 233–45.

123 Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC, et al. Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. J. Immunol. 2007; 178: 8148–57.

Modi WS, Lautenberger J, An P, et al. Genetic variation in the CCL18-CCL3-CCL4 chemokine gene cluster influences HIV Type 1 transmission and AIDS disease progression. Am. J. Hum. Genet. 2006; 79: 120–28. doi:10.1086/505331.

125 Migeotte I, Riboldi E, Franssen J, et al. Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. J. Exp. Med. 2005; 201: 83– 93. doi:10.1084/jem.20041277.

Gao J, Guillabert A, Hu J, et al. F2L, a peptide derived from heme-binding protein, chemoattracts mouse neutrophils by specifically activating Fpr2, the low-affinity N-formylpeptide receptor. J. Immunol. 2007; 178: 1450–56.

127 Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J. Leukoc. Biol. 2004; 75: 163–89. doi:10.1189/jlb.0603252.

128 Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. J. Leukoc. Biol. 1995; 58: 373–81.

129 Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferongamma. Annu. Rev. Immunol. 1997; 15: 749–95. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749.

130 Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. J. Immunol. 1988; 140: 1022–27. 131 Hsing LC, Rudensky AY. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. Immunol. Rev. 2005; 207: 229–41. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x.

132 Gupta S, Singh RK, Dastidar S, Ray A. Cysteine cathepsin S as an immunomodulatory target: present and future trends. Expert Opin. Ther. Targets 2008; 12: 291–99. doi:10.1517/14728222.12.3.291.

133 Beers C, Honey K, Fink S, Forbush K, Rudensky A. Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages. J. Exp. Med. 2003; 197: 169–79.

134 Tedla N, Lee C, Borges L, Geczy CL, Arm JP. Differential expression of leukocyte immunoglobulin-like receptors on cord-blood-derived human mast cell progenitors and mature mast cells. J. Leukoc. Biol. 2008; 83: 334–43. doi:10.1189/jlb.0507314.

135 Borges L, Hsu ML, Fanger N, Kubin M, Cosman D. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. J. Immunol. 1997; 159: 5192–96.

136 Sloane DE, Tedla N, Awoniyi M, Macglashan DW, Borges L, Austen KF, Arm JP. Leukocyte immunoglobulin-like receptors: novel innate receptors for human basophil activation and inhibition. Blood 2004; 104: 2832–39. doi:10.1182/blood-2004-01-0268.

137 Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. J. Immunol. 2008; 180: 5771–77.

138 Keeney S, Chang GJ, Linn S. Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. J. Biol. Chem. 1993; 268: 21293–300.

139 van der Spek PJ, Visser CE, Hanaoka F, Smit B, Hagemeijer A, Bootsma D, Hoeijmakers JH. Cloning, comparative mapping, and RNA expression of the mouse homologues of the Saccharomyces cerevisiae nucleotide excision repair gene RAD23. Genomics 1996; 31: 20–27. doi:10.1006/geno.1996.0004.

140 Lanier LL. NK cell recognition. Annu. Rev. Immunol. 2005; 23: 225–74. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.

141 Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. Tuberculosis (Edinb) 2007; 87: 312–21. doi:10.1016/j.tube.2007.01.002.

142 Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: a novel host defense molecule. Am. J. Transplant. 2005; 5: 1789–92. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00970.x.

143 Kaspar AA, Okada S, Kumar J, et al. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. J. Immunol. 2001; 167: 350–56.

144 Obata-Onai A, Hashimoto S, Onai N, et al. Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8(+) T lymphocytes. Int. Immunol. 2002; 14: 1085–98.

145 Pyz E, Marshall ASJ, Gordon S, Brown GD. C-type lectin-like receptors on myeloid cells. Ann. Med. 2006; 38: 242–51. doi:10.1080/07853890600608985.

146 Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. Nat. Immunol. 2006; 7: 1258–65. doi:10.1038/ni1417.

147 Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. Eur. J. Immunol. 2000; 30: 697–704. doi:10.1002/1521-4141(200002)30:2<697::AID-IMMU697>3.0.CO;2-M.

148 Samson SI, Richard O, Tavian M, et al. GATA-3 promotes maturation, IFNgamma production, and liver-specific homing of NK cells. Immunity 2003; 19: 701– 11.

149 Marusina AI, Kim D, Lieto LD, Borrego F, Coligan JE. GATA-3 is an important transcription factor for regulating human NKG2A gene expression. J. Immunol. 2005; 174: 2152–59.

150 Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. J. Leukoc. Biol. 2002; 71: 173–83.

151 Barlic J, Sechler JM, Murphy PM. IL-15 and IL-2 oppositely regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1. Blood 2003; 102: 3494–503. doi:10.1182/blood-2003-03-0946.

152 Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. J. Immunol. 1994; 153: 2417–28.

153 Rosen DB, Cao W, Avery DT, Tangye SG, Liu Y, Houchins JP, Lanier LL. Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. J. Immunol. 2008; 180: 6508–17.

154 Birnbaum MJ. On the InterAktion between hexokinase and the mitochondrion. Dev. Cell 2004; 7: 781–82. doi:10.1016/j.devcel.2004.11.016.

155 Funasaka T, Yanagawa T, Hogan V, Raz A. Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression by hypoxia. FASEB J. 2005; 19: 1422– 30. doi:10.1096/fj.05-3699com.

156 Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H. Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells. Int. J. Cancer 2002; 101: 217–23. doi:10.1002/ijc.10617.

157 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat. Rev. Cancer 2003; 3: 721–32. doi:10.1038/nrc1187.

158 Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B. Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 2003.

159 Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. J. Biol. Chem. 1994; 269: 23757–63.

160 Arden C, Hampson LJ, Huang GC, et al. A role for PFK-2/FBPase-2, as distinct from fructose 2,6-bisphosphate, in regulation of insulin secretion in pancreatic beta-cells. Biochem. J. 2008; 411: 41–51. doi:10.1042/BJ20070962.

161 Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for trans-

activation in response to hypoxia. J. Biol. Chem. 2004; 279: 53562–70. doi:10.1074/jbc.M406096200.

162 Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL, Moenner M, Caro J, Esumi H, Minchenko OH. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. Acta Biochim. Pol. 2006; 53: 789–99.

163 Reghunathan R, Jayapal M, Hsu L, Chng H, Tai D, Leung BP, Melendez AJ. Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. BMC Immunol. 2005; 6: 2. doi:10.1186/1471-2172-6-2.

164 Wong LYF, Cheung BMY, Li Y, Tang F. Adrenomedullin is both proinflammatory and antiinflammatory: its effects on gene expression and secretion of cytokines and macrophage migration inhibitory factor in NR8383 macrophage cell line. Endocrinology 2005; 146: 1321–27. doi:10.1210/en.2004-1080.

165 Elsasser TH, Kahl S. Adrenomedullin has multiple roles in disease stress: development and remission of the inflammatory response. Microsc. Res. Tech. 2002; 57: 120–29. doi:10.1002/jemt.10058.

166 Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. Cancer Res. 2005; 65: 4690–97. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3877.

167 Manchado M, Salas-Leiton E, Infante C, et al. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (Solea senegalensis Kaup). Gene 2008; 416: 77–84. doi:10.1016/j.gene.2008.03.007.

168 Yamaguchi A, Hori O, Stern DM, Hartmann E, Ogawa S, Tohyama M. Stressassociated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. J. Cell Biol. 1999; 147: 1195–204.

169 Hori O, Miyazaki M, Tamatani T, et al. Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. Mol. Cell. Biol. 2006; 26: 4257–67. doi:10.1128/MCB.02055-05. 170 Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ. The human side of hypoxia-inducible factor. Br. J. Haematol. 2008; 141: 325–34. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07029.x.

171 Maier M, Wutzler S, Bauer M, Trendafilov P, Henrich D, Marzi I. Altered gene expression patterns in dendritic cells after severe trauma: implications for systemic inflammation and organ injury. Shock 2008; 30: 344–51. doi:10.1097/SHK.0b013e3181673eb4.

172 Härtel C, Bein G, Müller-Steinhardt M, Klüter H. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. J. Immunol. Methods 2001; 249: 63–71.

173 Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. J. Immunol. Methods 1997; 200: 173–79.

174 Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. 2002; 48: 1883–90.

175 Wong HR, Shanley TP, Sakthivel B, et al. Genome-level expression profiles in pediatric septic shock indicate a role for altered zinc homeostasis in poor outcome. Physiol. Genomics 2007; 30: 146–55. doi:10.1152/physiolgenomics.00024.2007.

176 Prucha M, Ruryk A, Boriss H, et al. Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics. Shock 2004; 22: 29–33.

177 Jansen RC, Nap J, Mlynárová L. Errors in genomics and proteomics. Nat. Biotechnol. 2002; 20: 19. doi:10.1038/nbt0102-19b.

178 Menges T, König IR, Hossain H, et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor. Crit. Care Med. 2008; 36: 1456-62, e1-6. doi:10.1097/CCM.0B013E318170ABB6.

179 Fenic I, Hossain HM, Sonnack V, et al. In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis. J. Androl. 2008; 29: 172–85. doi:10.2164/jandrol.107.003848.

180 Anderson DC, Rothlein R, Marlin SD, Krater SS, Smith CW. Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent adherence reactions. Blood 1990; 76: 2613–21.

181 Anderson DC, Hughes BJ, Smith CW. Abnormal mobility of neonatal polymorphonuclear leukocytes. Relationship to impaired redistribution of surface adhesion sites by chemotactic factor or colchicine. J Clin Invest 1981; 68: 863–74.

182 Petrova A, Mehta R. Dysfunction of innate immunity and associated pathology in neonates. Indian J Pediatr 2007; 74: 185–91.

183 Anderson DC, Abbassi O, Kishimoto TK, Koenig JM, McIntire LV, Smith CW. Diminished lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells in vitro. J. Immunol. 1991; 146: 3372–79.

184 Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. Annu. Rev. Med. 1987; 38: 175–94. doi:10.1146/annurev.me.38.020187.001135.

185 Rebuck N, Gibson A, Finn A. Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. Clin. Exp. Immunol. 1995; 101: 183–89.

186 Koenig JM, Simon J, Anderson DC, Smith E, Smith CW. Diminished soluble and total cellular L-selectin in cord blood is associated with its impaired shedding from activated neutrophils. Pediatr. Res. 1996; 39: 616–21. doi:10.1203/00006450-199604000-00009.

187 Baker CJ, Rench MA, Noya FJ, Garcia-Prats JA. Role of intravenous immunoglobulin in prevention of late-onset infection in low-birth-weight neonates. The Neonatal IVIG Study Group. Rev. Infect. Dis. 1990; 12 Suppl 4: S463-8; discussion S468-9.

188 Dyke MP, Forsyth KD. Plasma fibronectin levels in extremely preterm infants in the first 8 weeks of life. J Paediatr Child Health 1994; 30: 36–39.

189 Källman J, Schollin J, Schalèn C, Erlandsson A, Kihlström E. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 1998; 78: F46-50.

190 Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. Lancet 1989; 2: 1236–39.

191 Kjeldsen L, Sengeløv H, Lollike K, Borregaard N. Granules and secretory vesicles in human neonatal neutrophils. Pediatr. Res. 1996; 40: 120–29. doi:10.1203/00006450-199607000-00021.

192 Levy O, Martin S, Eichenwald E, et al. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. Pediatrics 1999; 104: 1327–33.

193 Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999; 160: S5-11.

194 Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. Biol. Neonate 2001; 79: 205–09.

195 Allgaier B, Shi M, Luo D, Koenig JM. Spontaneous and Fas-mediated apoptosis are diminished in umbilical cord blood neutrophils compared with adult neutrophils. J. Leukoc. Biol. 1998; 64: 331–36.

196Koenig JM, Stegner JJ, Schmeck AC, Saxonhouse MA, Kenigsberg LE. Neo-<br/>natal neutrophils with prolonged survival exhibit enhanced inflammatory and cytotoxic<br/>responsiveness.Pediatr.Res.2005;57:424–29.doi:10.1203/01.PDR.0000153945.49022.96.

197 Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. Semin Fetal Neonatal Med 2006; 11: 354–62. doi:10.1016/j.siny.2006.03.004.

198 Altiok O, Yasumatsu R, Bingol-Karakoc G, et al. Imbalance between cysteine proteases and inhibitors in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006; 173: 318–26. doi:10.1164/rccm.200503-425OC.

199 Mazur B, Godula-Stuglik U, Domarecki A, Stojewska M. Wpływ ciezkich zakazeń na naturalne komórki cytotoksyczne u noworodków o róznym stopniu dojrzałości płodowej. Ginekol. Pol. 2000; 71: 542–49.

200 Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovacs A, Kovacs L, Laszlo A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. Eur J Pediatr 2001; 160: 478–82.

201 el-Sameea ER, Metwally SS, Mashhour E, el-Bendary A, Am Hassan, el-Sharkawy H, el-Shennawy FA. Evaluation of natural killer cells as diagnostic markers of early onset neonatal sepsis: comparison with C-reactive protein and interleukin-8. Egypt J Immunol 2004; 11: 91–102.

202 Zons P von, Crowley-Nowick P, Friberg D, Bell M, Koldovsky U, Whiteside TL. Comparison of europium and chromium release assays: cytotoxicity in healthy individuals and patients with cervical carcinoma. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1997; 4: 202–07.

203 Yoshida O, Akbar F, Miyake T, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Impaired dendritic cell functions because of depletion of natural killer cells disrupt antigenspecific immune responses in mice: restoration of adaptive immunity in natural killerdepleted mice by antigen-pulsed dendritic cell. Clin. Exp. Immunol. 2008; 152: 174– 81. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03601.x.

204 Reschner A, Hubert P, Delvenne P, Boniver J, Jacobs N. Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. Clin. Exp. Immunol. 2008; 152: 219–26. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03624.x.

205 Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. Science 1996; 271: 1728–30.

206 Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. Science 1996; 271: 1723–26.

207 Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. Nature 1998; 393: 474–78.

208 van Cromphaut SJ, Vanhorebeek I, van den Berghe G. Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. Curr. Pharm. Des. 2008; 14: 1887–99.

209 Vanhorebeek I, Langouche L, van den Berghe G. Tight blood glucose control: what is the evidence? Crit. Care Med. 2007; 35: S496-502. doi:10.1097/01.CCM.0000278051.48643.91.

210 Gearhart MM, Parbhoo SK. Hyperglycemia in the critically ill patient. AACN Clin Issues 2006; 17: 50–55.

211 Hollis AR, Furr MO, Magdesian KG, Axon JE, Ludlow V, Boston RC, Corley KTT. Blood glucose concentrations in critically ill neonatal foals. J. Vet. Intern. Med. 2008; 22: 1223–27. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0174.x.

Leake RD, Fiser RH, Oh W. Rapid glucose disappearance in infants with infection. Clin Pediatr (Phila) 1981; 20: 397–401.

213 Mitanchez D. Glucose regulation in preterm newborn infants. Horm. Res. 2007; 68: 265–71. doi:10.1159/000104174.

214 Beath SV. Hepatic function and physiology in the newborn. Semin Neonatol 2003; 8: 337–46. doi:10.1016/S1084-2756(03)00066-6.

215 Boeuf P, Tan A, Romagosa C, et al. Placental hypoxia during placental malaria. J. Infect. Dis. 2008; 197: 757–65. doi:10.1086/526521.

216 Saini Y, Harkema JR, LaPres JJ. HIF1alpha is essential for normal intrauterine differentiation of alveolar epithelium and surfactant production in the newborn lung of mice. J. Biol. Chem. 2008; 283: 33650–57. doi:10.1074/jbc.M805927200.

217 Grover TR, Asikainen TM, Kinsella JP, Abman SH, White CW. Hypoxiainducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha are decreased in an experimental model of severe respiratory distress syndrome in preterm lambs. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2007; 292: L1345-51. doi:10.1152/ajplung.00372.2006.

218 Wong HR, Cvijanovich N, Lin R, et al. Identification of pediatric septic shock subclasses based on genome-wide expression profiling. BMC Med 2009; 7: 34. doi:10.1186/1741-7015-7-34.

219 Wong HR. Genetics and genomics in pediatric septic shock. Crit. Care Med. 2012; 40: 1618–26. doi:10.1097/CCM.0b013e318246b546.

220 López Sastre JB, Pérez Solís D, Roqués Serradilla V, et al. Procalcitonin is not sufficiently reliable to be the sole marker of neonatal sepsis of nosocomial origin. BMC Pediatr 2006; 6: 16. doi:10.1186/1471-2431-6-16.

221 López Sastre JB, Solís DP, Serradilla VR, Colomer BF, Cotallo GDC. Evaluation of procalcitonin for diagnosis of neonatal sepsis of vertical transmission. BMC Pediatr 2007; 7: 9. doi:10.1186/1471-2431-7-9.

222 Kocabaş E, Sarikçioğlu A, Aksaray N, Seydaoğlu G, Seyhun Y, Yaman A. Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. Turk. J. Pediatr. 2007; 49: 7–20.

223 Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. Pediatrics 2008; 121: 129–34. doi:10.1542/peds.2007-1308.

224 Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. Mediators Inflamm. 2008; 2008: 202646. doi:10.1155/2008/202646.

225 Frakking FNJ, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, Dolman KM. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. Clin. Exp. Immunol. 2006; 145: 5–12. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03093.x.

226 Frakking FNJ, Brouwer N, van Eijkelenburg NKA, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, Dolman KM. Low mannose-binding lectin (MBL) levels in neonates with pneumonia and sepsis. Clin. Exp. Immunol. 2007; 150: 255–62. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03479.x.

227 van der Zwet WC, Catsburg A, van Elburg RM, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Mannose-binding lectin (MBL) genotype in relation to risk of nosocomial infection in pre-term neonates in the neonatal intensive care unit. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14: 130–35. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01886.x.

228 Dzwonek AB, Neth OW, Thiébaut R, et al. The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. Pediatr. Res. 2008; 63: 680–85. doi:10.1203/PDR.0b013e31816fdbff.

## Erklärung

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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 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."

Regensburg, den

Manuel Klein

# Danksagung

Danken möchte ich ...

- zuerst meiner Frau Cora, unserem Sohn Elijah und unserer Tochter Selah
   Elise. Diese Arbeit ist unsere Arbeit. Nicht meine.
- Meiner Mutter. Ohne Dich ... womit soll ich anfangen?
- Professor Chakraborty. Sie haben mir die Möglichkeit gegeben, mich mit diesem Thema zu beschäftigen. Und mich insbesondere auf der Zielgeraden ermutigt und begleitet. Vielen Dank dafür!
- Dr. Hamid Hossain. Für die zahllosen Gespräche, Ihr beständiges Hinterfragen und Ihre kritische - aber stets konstruktive - Begleitung meiner Arbeit. Besonderen Dank für Ihre Unterstützung während der "finalen Phase"!
- **PD Dr. med. Anne Hilgendorff**. Für die kompetente und engagierte Unterstützung besonders im Zusammenhang mit der Korrektur meiner Arbeit.
- Herrn Schklarenko. Für die Präparation der Microarrays und RT-PCRs.
- Herrn Tchatalbachev. Für die Präparation der Microarrays.
- Dr. Felix Thierer. Für Deine Unterstützung.
- André Billion und Carsten Künne. Für Eure praktische Unterstützung. Und manches mehr. Es war eine besondere Zeit mit Euch.
- Mike Maier. Für den technischen Support. Und alles Weitere.
- Irene Ruocco. Für Ihre Hilfsbereitschaft. Ihren Locher, ....
- Benjamin Izar. Für Deine Unterstützung. Dir persönlich das Allerbeste!
- Daniel Müller. Für die Unterstützung im Umgang mit Excel und Word.
- Wolf-Fritz Riekert. Für die Dokument-Vorlage.
- All denen, die mich ermutigt und für mich gebetet haben. Besonders Euch, Horst und Iris. Vielen Dank!

Soli Deo Gloria!
# Appendix

# Inhaltsverzeichnis des Appendix

Inhaltsverzeichnis des Appendix	146
Abbildungsverzeichnis des Appendix	147
Mean-versus-Average-Plots	147
Tabellenverzeichnis des Appendix	154
Laborwerte und klinische Angaben der in die Microarrayanalyse eingegangenen Frühgeborenen	154
Signifikant differenziell regulierte Gene	156
Überrepräsentierte Kategorien nach DAVID	163



# Abbildungsverzeichnis des Appendix

Mean-versus-Average-Plots

App. Abbildung 1: MVA-Plot Bild 1 von 7.



App. Abbildung 2: MVA-Plot Bild 2 von 7.



App. Abbildung 3: MVA-Plot Bild 3 von 7.



App. Abbildung 4: MVA-Plot Bild 4 von 7.



App. Abbildung 5: MVA-Plot Bild 5 von 7.



App. Abbildung 6: MVA-Plot Bild 6 von 7.



App. Abbildung 7: MVA-Plot Bild 7 von 7.

### Tabellenverzeichnis des Appendix

### Laborwerte und klinische Angaben der in die Microarrayanalyse eingegangenen Frühgeborenen

EOI	CRP max (mg/l)	IT-Ratio max	Leukozyten max (Giga/I)	Leukozyten min (Giga/I)	Beatmungsdauer (d)	Katecholamine	CRIB_Score	SNAP min
747	15,7	0,28	4,8	3,5	4	Nein	4	5
751	28,4	0,44	3,8	2,1	80	Ы	14	5
816	18,9	0,52	8,7	4,8	4	Nein	6	7
896	14,5	0,29	32	9,4	3	Nein	5	34
1004	16,6	0,38	8,1	5,2	9	Ы	11	15
1069	7,1	0,35	11,4	8,8	5	Nein	4	0
1074	41,6	0,28	6,95	6,95	7	Ы	6	5
1073	22,7	0,4	4	4	8	Ja		5
1087	24	0,7	10,2	5,6	4	Ы	6	
1091	12,4	0,2	4,7	3,5	44	ы	11	23
1133	14,2	0,14	5,4	4,4	23	ы	8	5
1140	7,7	0,62	25	13,6	7	Nein		
1149	49,3	0,14	4,8	3,2	7	Ы	1	12
1150	24,3	0,11	6,5	3,9	7	Ы	2	5
1155	52,3	0,8	20,9	1,4	10	Ja	17	16
1157	9,4	0,21	9,8	6,3	5	Nein	1	5
non EOI								
912	<4	0,04	6,9	6,9	•	Nein		0
1005	<4	0,37	6,6	2,8	7	Ja	13	15
1006	<4	0,04	4	2,5	•	Nein	1	0
1038	<4	0,08	5,6	2,3	-	Nein	1	5
1080	5,5	0,22	5,2	5,2	-	Nein		5
1081	5,5	0,19	11,7	7,1	-	Nein	2	5
1082	5,1	0,17	8,2	4,9	•	Nein	0	5
1086	<4	0	8,4	7,8	1	Nein		0

App. Tabelle 1: Laborwerte und klinische Angaben der in die Microarrayanalyse eingegangenen Frühgeborenen mit konnataler Infektion (EOI) und ohne konnatale Infektion (non EOI). "CRP max" gibt das maximale CRP innerhalb der ersten 72 Lebensstunden an. "IT-Ratio max" gibt die maximale IT-Ratio innerhalb der ersten 72 Lebensstunden an. "Leukozyten max / min" gibt die maximale / minimale Zahl von Leukozyten innerhalb der ersten 72 Lebensstunden an. Unter "Beatmungsdauer" ist die Dauer der Beatmung in Tagen angegeben. "Katecholamine" gibt Auskunft darüber, ob Katecholamine appliziert wurden. "CRIB Score" enthält den Critical Risk Index for Babies (CRIB Score). "SNAP min" gibt den minimalen Score for neonatal acute physiology (SNAP Score) innerhalb der ersten 72 Lebensstunden an.

# Signifikant differenziell regulierte Gene

Im Folgenden eine Übersicht aller signifikant differenziell regulierten Gene. Gene mit einer FDR < 0,05 wurden als signifikant differenziell reguliert definiert.

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
5-hydroxytryptamine (serotonin)				
receptor 5A	HTR5A	NM_024012	0.02523	1.66
6-phosphofructo-2-				
kinase/fructose-2,6-			0.00140	2.00
Diphosphatase 3	PFKFB3	NM_004566	0.02148	2.00
complex subunit 2	45002	NM 032204	0 01053	2 02
Acyl-CoA synthetase long-chain	A0002	1101_032204	0.01333	2.02
family member 4	ACSL4	NM 022977	0.01609	1.90
AcvI-CoA synthetase long-chain				
family member 6	ACSL6	AB020644	0.00013	1.98
ADAM metallopeptidase domain				
9	ADAM9	NM_003816	0.03464	1.55
ADP-ribosylation factor-like 2				
binding protein	ARL2BP	NM_012106	0.03319	1.91
Adrenomedullin	ADM	NM_001124	0.00011	2.27
Aftiphilin	AFTPH	NM_017657	0.01882	2.00
AL539691 Homo sapiens FETAL				
BRAIN Homo sapiens cDNA				
clone CS0DF036YH19 5-PRIME,		41 500004	0.04.440	4 77
MRNA sequence		AL539691	0.01442	-1.77
Aldenyde denydrogenase i fami-		NM 000689	0 00469	1 73
Alkaline phosphatase liv-		1101_000003	0.00403	1.75
er/bone/kidnev	ALPL	NM 000478	0.00043	2.32
Amphiregulin	AREG	NM 001657	0.00034	2.23
Ankyrin repeat and SOCS box				
containing 8	ASB8	NM_024095	0.02129	1.93
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.04243	1.69
Annexin A3	ANXA3	NM 005139	0.00017	2.60
Aquaporin 9	AQP9	NM 020980	0.00753	1.76
ArfGAP with FG repeats 1	AGFG1	NM 004504	0.00999	2.08
Armadillo repeat containing 8	ARMC8	NM 015396	0.02124	1.96
Ataxin 10	ATXN10	NM 013236	0.01444	2.00
Azurocidin 1	A7U1	NM 001700	0.00126	1 57
Baculoviral IAP repeat containing			0.00120	1.07
2	BIRC2	NM 001166	0.01360	2.12
B-cell CLL/lymphoma 6	BCL6	NM 001706	0.01698	2.00
BCL2-like 13 (apoptosis				
facilitator)	BCL2L13	NM_015367	0.00017	2.66
BCL2-related protein A1	BCL2A1	NM_004049	0.00389	1.83
Bromodomain containing 4	BRD4	NM_014299	0.01943	1.78
Calponin 2	CNN2	NM_004368	0.00395	2.27

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Capping protein (actin filament),				
gelsolin-like	CAPG	NM_001747	0.03899	1.53
Carbonic anhydrase IV	CA4	NM_000717	0.02657	1.87
Carcinoembryonic antigen-related				
alvcoprotein)	CEACAM1	X16354	0.03194	1.78
Catalase	CAT	NM 001752	0.00000	3.51
Catenin (cadherin-associated				
protein), alpha-like 1	CTNNAL1	NM_003798	0.02134	1.76
Cathepsin D	CTSD	NM_001909	0.00724	2.00
Cathepsin S	CTSS	NM_004079	0.01898	1.76
CCAAT/enhancer binding protein				
(C/EBP), alpha	CEBPA	NM_004364	0.00243	2.10
(C/ERP) beta	CERDR	NM 005194	0.00044	2 35
		NM 020406	0.00044	2.33
		NM 012072	0.00000	1.61
	CD93	NM_012072	0.02165	1.01
CDNA CIONE IMAGE 4799578		DIVI4/2007	0.03320	1.00
PLACE1007242		AK002028	0.04739	-1.78
Cell division cycle 16 homolog (S.				
cerevisiae)	CDC16	NM_003903	0.00142	2.36
Chaperonin containing TCP1,	0.0701			4.00
subunit 6A (zeta 1)	CC16A	NM_001762	0.04711	1.89
Charcot-Leyden crystal protein	CLC	NM_001828	0.00876	-1.60
Chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4	NM_002984	0.01493	-2.01
tor 1	CX3CP1	1120350	0 00492	-2.22
Chemokine (C-X-C motif) recep-		020330	0.00432	-2.22
tor 4	CXCR4	NM_003467	0.02170	1.69
Chromosome 12 open reading				
frame 5	C12orf5	NM_020375	0.04524	1.67
Chromosome 5 open reading	C Forf22	NM 019256	0.02720	1.05
	0501122	AE070620	0.02739	1.90
Cione 24694 mRINA sequence		AF070620	0.01383	-2.12
Coatomer protein complex, subu-	COBBS	NM 004766	0 00280	2.22
		NM 003015	0.00209	1.70
		NM 004290	0.02472	1.79
CSE1 chromosome segregation	CREDDF	<u>INIVI_004360</u>	0.02255	-1.95
1-like (yeast)	CSE1L	NM 001316	0.00712	2.14
C-type lectin domain family 1,				
member B	CLEC1B	NM_016509	0.03649	-1.70
C-type lectin domain family 4,			0.04000	1.04
		NM_014358	0.04990	1.34
Cystain A (Stefin A)	USTA	INIVI_005213	0.04316	1.39
	CSRP1	NM 004078	0 02481	1 91
Cytidine deaminase		NM 001785	0.00431	1.01
Cytochrome c oxidase subunit			0.00401	1.00
VIIa polypeptide 2 like	COX7A2L	NM_004718	0.02077	-2.06

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Cytochrome P450 family 1 sub	- <b>,</b>			
family B polypentide 1	CYP1B1	NM 000104	0.02600	1 48
Damage-specific DNA binding		14101_000104	0.02000	1.40
protein 1 127kDa	DDB1	NM 001923	0 00595	2 05
Data not found	0001	NM_006276	0.00035	2 55
Data not found		NM 022010	0.00000	1.05
Data not found		NIM_033019	0.01793	1.95
Data not found		NM_018468	0.03950	-1.65
Data not found		NM_003832	0.00000	-7.42
DDB1 and CUL4 associated fac-	504540	10007470	0.00004	0.00
	DCAF12	AB067479	0.00221	2.33
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	ענעסס		0.00492	1 50
DEAH (App Clu Ala Hip) box	DDA31	11110_004000	0.00462	-1.59
polypentide 29		AI 079292	0.02436	1 95
Dibydrolinoamido dobydrogonaso		NM 000108	0.02400	2.36
Dispevelled associated activator		NIN_000108	0.00123	2.30
of morphogenesis 2		AB002379	0 02466	1 72
Dual specificity phosphatase 2		NM 004418	0.02400	1.72
EE hand calcium hinding domain	DUSFZ	11110_004416	0.00001	-1.92
	FFCAB2	AK001393	0.02750	1 89
Estoraça D		AE112210	0.00162	2.21
Esterase D	ESD	AF112219	0.00102	2.21
factor 1A Y-linked	FIF1AY	NM 004681	0.00017	-1 02
Eukarvotic translation initiation			0.00011	1.02
factor 3, subunit C	EIF3C	NM 003752	0.00000	3.71
Eukaryotic translation initiation				
factor 4 gamma, 2	EIF4G2	NM_001418	0.00014	2.70
Family with sequence similarity				
167, member A	FAM167A	AJ301564	0.00897	-1.94
Family with sequence similarity				. – .
198, member B	FAM198B	NM_016613	0.02112	1.74
Fc fragment of IgE, high affinity I,				
receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.00345	-2.20
Fc fragment of IgG, high affinity	500044		0.00000	0.40
la, receptor (CD64)	FCGR1A	NM_000566	0.00022	2.10
Formyl peptide receptor 1	FPR1	NM_002029	0.00018	2.26
FXYD domain containing ion			0.00040	4.40
transport regulator 5	FXYD5	NM_014164	0.02946	-1.12
G protein pathway suppressor 1	GPS1	NM_004127	0.00017	2.68
G protein-coupled receptor 17	GPR17	NM_005291	0.03840	1.55
Galanin prepropeptide	GAL	M77140	0.00083	-1.66
GATA binding protein 3	GATA3	NM_002051	0.04270	-1.84
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	NM 000175	0.00096	2.42
Glutaminyl-peptide		_		
cyclotransferase	QPCT	NM_012413	0.00014	2.66
Glycogenin 1	GYG1	NM 004130	0.00000	3.29
Gon-4-like (C. elegans)	GON4L	NM 032292	0.03743	1.92
Grainyhead-like 3 (Drosophila)	GRHL3	AI 137763	89800.0	_1 88
Grancalcin EE-hand calcium			0.00000	-1.00
binding protein	GCA	NM 012198	0.00000	2.79
Granulysin	GNLY	NM 012483	0.00090	-2.48

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Guanine nucleotide binding prote-				
in (G protein), gamma 10	GNG10	NM_004125	0.00608	1.83
H.sapiens gene from PAC 106H8		AL035301	0.00289	1.34
Haptoglobin-related protein	HPR	NM_020995	0.00000	4.26
Heat shock protein 90kDa alpha				
(cytosolic), class B member 1	HSP90AB1	NM_007355	0.00161	2.31
Hematopoietic cell-specific Lyn				
substrate 1	HCLS1	NM_005335	0.00200	2.21
Heme binding protein 1	HEBP1	NM_015987	0.00000	3.13
Hevokinase 1	HK1	NM_000188-	0 00027	2 / 3
Hippocampus abundant		1	0.00027	2.43
transcript-like 1	HIATL1	NM_032558	0.04477	1.70
Homo sapiens cDNA FLJ10281				
fis, clone HEMBB1001289		AK001143	0.00088	2.31
Homo sapiens F-box and leucine-				
rich repeat protein 5 (FBXL5),				
transcript variant 2, non-coding		NM 033535	0.00246	2 30
Homo saniens I SER2 gene last		1001_033333	0.00240	2.30
exon		Y17456	0.02676	-1.98
Homo sapiens metallothionein 1L				
(gene/pseudogene) (MT1L), non-				
coding RNA		NM_002450	0.00150	-2.26
Homo sapiens midline 1 fetal				
complete cds		AF041209	0.01050	-2.19
Homo sapiens signal transducer				
and activator of transcription 3				
(acute-phase response factor)				
(STAT3), transcript variant 1,			0.02954	1 07
		100007	0.03654	1.07
Human pepsinogen gene, exon 9	1 0 0 4 0 0 5 0 5 0 7 0	JUU287	0.00152	2.19
Hypothetical LOC100505876	LOC100505876	AK001814	0.03199	1.69
tein 2	IGHMBP2	NM 002180	0.00504	-2.23
Integrin, beta 1 (fibronectin recep-				
tor, beta polypeptide, antigen				
CD29 includes MDF2, MSK12)	ITGB1	NM_002211	0.04490	1.97
Interferon gamma receptor 2				
(interferon gamma transducer 1)	IFNGR2	NM_005534	0.00439	1.88
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.02171	1.71
Interleukin 8	IL8	NM_000584	0.00283	1.19
Inversin	INVS	NM_014425	0.02230	-1.21
Kallmann syndrome 1 sequence	KAL1	NM_000216	0.00256	-1.79
Kelch domain containing 4	KLHDC4	AK024496	0.03724	-2.04
KIAA1109	KIAA1109	AB029032	0.00943	1.96
Killer cell lectin-like receptor sub-				
family C, member 2	KLRC2	NM_002260	0.02950	-1.64
Lactate dehydrogenase A	LDHA	NM_005566	0.01777	1.95
Lactotransferrin	LTF	NM_002343	0.00000	2.82
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	NM_052972	0.03211	1.80

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
1				
Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains) member 3		NM 006864	0 04691	1 63
Leukotriene A4 bydrolase		AA868493	0.04091	2.34
LIM domain kinaso 2		NM 016733	0.00270	1 79
Livi homolog (chickon)		N67256	0.01099	2.43
Low density lipoprotein receptor- related protein 10	LRP10	NM_014045	0.00035	2.46
Lysine (K)-specific demethylase 5D	KDM5D	NM_004653	0.01377	-1.13
Lysophosphatidic acid receptor 6	LPAR6	NM_005767	0.02123	1.71
Lysyl oxidase-like 2	LOXL2	NM_002318	0.00176	2.04
Mediator complex subunit 16	MED16	NM_005481	0.00243	2.02
Membrane bound O- acyltransferase domain contain- ing 7	MBOAT7	S82470	0.03506	1.62
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hemato- poietic cell-specific)	MS4A3	NM_006138	0.00019	2.34
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	MS4A4A	NM_024021	0.00534	1.91
Methyltransferase like 21B	METTL21B	AL050100	0.00126	2.49
Molybdenum cofactor sulfurase	MOCOS	NM_017947	0.00006	2.72
Multiple C2 domains, transmemb-	MOTOO		0.04407	4.55
rane 2	MCTP2	NM_018349	0.04497	1.55
Muscle RAS oncogene nomolog	MRAS	NM_012219	0.03492	1.57
Myeloperoxidase	MPO	NM_000250	0.00013	2.24
Nicotinamide N- methyltransferase	NCF2	NM_000433	0.00428	2.08
Nuclear receptor interacting pro- tein 1	NRIP1	NM_003489	0.02121	1.95
Ornithine aminotransferase	OAT	NM_000274	0.00062	2.44
Pallidin homolog (mouse)	PLDN	AF131859	0.03010	1.80
Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	NM_000310	0.04897	1.76
PDZ and LIM domain 7 (enigma)	PDLIM7	NM_005451	0.03002	1.78
Pellino homolog 1 (Drosophila)	PELI1	NM_020651	0.02216	1.52
Peptidase inhibitor 3, skin-derived	PI3	NM_002638	0.00850	-2.18
Peptidoglycan recognition protein			0.00040	0.40
1 Deptidul argining deiminage, tung	PGLYRP1	NM_005091	0.00012	2.42
IV	PADI4	NM_012387	0.00380	2.14
Peroxisomal biogenesis factor 2	PEX2	NM_000318	0.00975	2.13
PH domain and leucine rich re- peat protein phosphatase 2	PHLPP2	AB023148	0.02747	-1.93
choline, beta	PCYT1B	NM_004845	0.01498	-1.73
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	NM_000291	0.00000	4.16
Phospholipase B domain containing 1	PLBD1	NM_024829	0.00000	3.60

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Phospholipid scramblase 1	PLSCR1	NM 021105	0.00016	2.55
Plexin C1	PLXNC1	 AF035307	0.02058	1.96
Protein phosphatase 1 catalytic				
subunit, beta isozyme	PPP1CB	NM 002709	0.02145	1.94
Protein tyrosine phosphatase			0.021.0	
non-receptor type 22 (lymphoid)	PTPN22	NM 015967	0 00273	2 33
Protein tyrosine phosphatase,			0.0000	
receptor type, C	PTPRC	NM_002838	0.00137	2.30
Proteinase 3	PRTN3	NM_002777	0.00160	1.76
RAD23 homolog A (S. cerevisiae)	RAD23A	NM 005053	0.03203	1.75
Recombination signal binding		—		
protein for immunoglobulin kappa				
J region	RBPJ	BE737594	0.03760	1.99
Regulator of chromosome	D004	A 1000005	0.04770	1.04
	RUUT	AJ006835	0.01770	1.84
Regulator of G-protein signaling 1	RGS1	BC015510	0.00086	-1.96
Ribophorin I	RPN1	NM_002950	0.04181	1.86
Ribosomal protein S29	RPS29	AA381384	0.03066	1.58
RNA binding motif protein 8A	RBM8A	AL049219	0.02124	1.79
S100 calcium binding protein A12	S100A12	NM_005621	0.00003	2.42
S100 calcium binding protein A8	S100A8	NM_002964	0.00066	2.07
S100 calcium binding protein A9	S100A9	AA318707	0.00112	2.14
S100 calcium binding protein P	S100P	NM_005980	0.00004	2.55
SEC31 homolog A (S. cerevisiae)	SEC31A	NM 016211	0.01347	2.12
Selenium binding protein 1	SELENBP1	NM 003944	0.00385	2.09
Serine/arginine-rich splicing fac-	-			
tor 3	SRSF3	AL050041	0.02063	-1.92
Serpin peptidase inhibitor, clade				
B (ovalbumin), member 1	SERPINB1	NM_030666	0.00179	2.27
SET domain containing 2	SETD2	AJ238403	0.02138	1.97
SH3KBP1 binding protein 1	SHKBP1	AF258553	0.03031	1.92
Similar to hCG2018832	LOC100292444	U60873	0.01471	-1.67
SLIT-ROBO Rho GTPase activat-				
ing protein 2	SRGAP2	AB007925	0.00995	-1.89
Solute carrier family 2 (facilitated				
glucose transporter), member 11	SLC2A11	NM_030807	0.00043	2.15
Spondin 2, extracellular matrix				
protein	SPON2	NM_012445	0.04279	-1.81
Sterol-C4-methyl oxidase-like	SC4MOL	NM_006745	0.01602	1.87
Stress-associated endoplasmic		AL 400007	0,00000	4 4 7
Syntrophin, alpha 1 (dystrophin	SERPI	AL 130807	0.00000	4.17
associated protein A1 59kDa				
acidic component)	SNTA1	NM 003098	0.04627	1.63
Synuclein alpha (non A4 compo-		—		
nent of amyloid precursor)	SNCA	AI929792	0.03675	-1.66
Transmembrane BAX inhibitor				
motif containing 6	TMBIM6	NM_003217	0.02121	2.02
Tripartite motif containing 23	TRIM23	NM_001656	0.02571	1.94
TRK-fused gene	TFG	NM_006070	0.02230	1.97

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	TNFSF13B	AW963062	0.00426	1.66
Vacuolar protein sorting 35 homolog (S. cerevisiae)	VPS35	NM_018206	0.01590	2.05
V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	MAF	AF055376	0.01391	1.95
X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	XIST	X56196	0.00004	1.47
X-linked Kx blood group (McLeod syndrome)	ХК	NM_021083	0.02168	1.94
Zer-1 homolog (C. elegans)	ZER1	NM_006336	0.00390	2.20
Zinc finger E-box binding homeobox 1	ZEB1	NM_030751	0.00679	-1.72
Zinc finger protein 671	ZNF671	NM_024833	0.00000	-2.69
Zinc finger, CCHC domain con- taining 2	ZCCHC2	NM_017742	0.00975	-2.14

App. Tabelle 2: Signifikant differenziell regulierte Gene, alphabetisch nach Namen geordnet.

### Überrepräsentierte Kategorien nach DAVID

		Absolute Zahl ent-	
Kategorie	Name	Gene	p-Wert
GOTERM_BP_ALL	GO:0006952~defense response	29	2.94E-10
GOTERM_BP_ALL	GO:0050896~response to stimulus	59	1.68E-07
GOTERM_BP_ALL	GO:0009611~response to wounding	21	2.40E-06
GOTERM_BP_ALL	GO:0006954~inflammatory response	16	1.99E-05
	GO:0009605~response to external stimu-		
GOTERM_BP_ALL	lus	23	2.26E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0006955~immune response	22	8.18E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0002376~immune system process	27	1.13E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0001775~cell activation	13	1.73E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0051704~multi-organism process	13	1.87E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0042221~response to chemical stimulus	20	2.21E-04
GOTERM BP ALL	GO:0045321~leukocyte activation	12	2.46E-04
GOTERM BP ALL	GO:0006950~response to stress	31	3.64E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0009607~response to biotic stimulus	12	7.36E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0043066~negative regulation of apoptosis	12	7.90E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0043069~negative regulation of pro- grammed cell death	12	8.48E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0051674~localization of cell	15	0.00284073
GOTERM_BP_ALL	GO:0006928~cell motility	15	0.00284073
GOTERM CC ALL	GO:0016023~cytoplasmic membrane- bound vesicle	15	3.08E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0005576~extracellular region	25	3.15E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0031988~membrane-bound vesicle	15	3.70E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0005615~extracellular space	15	5.28E-04
GOTERM_CC_ALL	GO:0031410~cytoplasmic vesicle	15	0.0018432
GOTERM_CC_ALL	GO:0031982~vesicle	15	0.00222005
GOTERM_MF_ALL	GO:0005515~protein binding	112	0.0099942
SP_PIR_KEYWORDS	Direct protein sequencing	62	4.83E-07
UP_SEQ_FEATURE	disulfide bond	39	3.12E-04
UP_SEQ_FEATURE	sequence variant	83	0.00891993

App. Tabelle 3: Überrepräsentierte biologische Gruppen nach DAVID.