

Transkriptionelle Sepsissignatur in Patienten mit Polytrauma

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

vorgelegt von Thierer, Felix Johannes
aus Pohlheim

Gießen 2010

Aus der Fakultät Medizinische Mikrobiologie
der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. T. Chakraborty

Gutachter: PD Dr. Dr. V. Alt

Tag der Disputation: 21.03.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung.....	14
1.1 Das Polytrauma.....	14
1.2 Geschichte der Sepsis	14
1.3 Definition der Sepsis	15
1.4 Epidemiologie der Sepsis.....	18
1.5 Pathophysiologie der Sepsis	22
1.5.1 Pathophysiologie des Polytraumas	25
1.6 Klinik der Sepsis.....	26
1.6.1 Systemische Zeichen	26
1.6.2 Organspezifische Zeichen	26
1.6.3 Differenzialdiagnosen	28
1.7 Diagnostik der Sepsis.....	28
1.8 Therapie der Sepsis	29
1.8.1 Die kausale Therapie.....	30
1.8.2 Die supportive Therapie	30
1.8.3 Die adjunktive Therapie.....	31
1.9 Funktion der Mikroarraytechnologie	31
1.10 Stand der Forschung.....	32
1.11 Ziele dieser Arbeit	34
2 Material und Methoden	36
2.1 Studiendesign	36
2.1.1 Klinisches Design	36
2.1.2 Auswahl der Patienten für die Mikroarrayanalyse	41
2.2 Das Mikroarray	41
2.2.1 Die Probengewinnung	42
2.3 Datenaufbereitung und Qualitätssicherung	45
2.3.1 Datenaufbereitung	45
2.3.2 Qualitätssicherung der Rohdaten	48
2.4 Validierung mittels RT-PCR	56

2.5	Analyseprogramme	56
2.5.1	Identifikation differenziell exprimierter Gene.....	56
2.5.2	Annotierung der signifikant regulierten Gene	57
2.5.3	Literatursuche.....	57
2.5.4	<i>Pathwayanalysen</i>	57
2.5.5	Visualisierung von Signalkaskaden	58
2.5.6	Annotierung überrepräsentierter Kategorien	58
2.5.7	<i>Differential Expression Effector Prediction</i>	60
2.5.8	Clusteranalyse.....	60
3	Ergebnisse.....	62
3.1	Eingeschlossene Patienten	62
3.1.1	Klinik zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation	62
3.1.2	Klinik zum Zeitpunkt der Sepsis	63
3.2	Mikroarrayanalyse	65
3.2.1	Datenaufbereitung der Mikroarrays	65
3.2.2	Qualitätssicherung der Mikroarrays.....	66
3.2.3	Statistische Analyse	73
3.2.4	Chromosomale Lokalisation der signifikant regulierten Gene.....	74
3.2.5	Visualisierung der Literatursuche	75
3.2.6	<i>Pathwayanalyse</i>	76
3.2.7	Überrepräsentierte Kategorien	77
3.2.8	Biomarker	91
3.2.9	Hierarchische Clusteranalyse.....	92
4	Diskussion.....	97
4.1	Studiendesign	97
4.2	Klinische Daten	101
4.3	Mikroarraydaten	101
4.3.1	Qualitätssicherung.....	101
4.3.2	Eigenschaften der signifikant regulierten Gene	103
4.3.3	Differenziell regulierte biologische Funktionen	104
4.3.4	Bekannte mRNA Regulationen.....	106
4.3.5	Biomarker	107
4.3.6	Clusteranalyse.....	108
5	Fazit.....	110
	Literaturverzeichnis.....	111
	Zusammenfassung	128
	Zusammenfassung (<i>Summary</i>).....	130
	Publikationen.....	132

Erklärung	133
Danksagung.....	134
Appendix.....	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz (Incidence) und Fälle (Cases) schwerer Sepsis in den USA [¹⁷]	19
Abbildung 2: Weibliche (Female) / Männliche (Male) Inzidenz (Incidence) und Mortalität (Mortality) [¹⁷]	19
Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Todesursachen 20 - 25 jähriger Personen nach ICD-10 Kapiteln [²¹].....	21
Abbildung 4: Prozentualer Anteil an den Todesursachen 20 - 25 Jähriger. Unterkategorien des Kapitel XX: Äußere Ursachen von Morbidität und Mortalität des ICD-10 [²¹]	21
Abbildung 5: Zelloberflächenerkennung von Bakterienbestandteilen. Sowohl Gram – als auch Gram + Bakterien haben verschiedenste Strukturen, die von Immunzellen erkannt werden. Dabei führen alle zu einer Aktivierung von TLR und über den Signalweg TLR → MyD88 oder TIRAP zur Aktivierung von NFκB, wodurch proinflammatorische Zyto- und Chemokine induziert werden.	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ablaufes von der mRNA zur Hybridisierung und Färbung auf dem Mikroarray.....	44
Abbildung 7: Ausschnitt aus einem Mikroarray mit Spots in der typischen Donutform.....	45
Abbildung 8: Ausschnitt aus der Rohdatentabelle nach der Auswertung des gescannten Mikroarraybildes. Im oberen Bereich sind allgemeine Informationen zu dem jeweiligen Array aufgeführt. Unter anderem der Dateiname des bearbeiteten Bildes (<i>Image File Name</i>), die Normalisierungsmethode (<i>Normalization Method</i>) und die Schwellenwerte als Rohdaten (<i>Raw Threshold</i>) und als normalisierte (<i>Normalized Threshold</i>) Daten. Darüber hinaus ist der Median aufgeführt, welcher als Quotient (x / Median) die Grundlage für die Normalisierung bietet. Im unteren Bereich ist ein Ausschnitt aus der Datentabelle aufgeführt. Für jede Gensonde, die alle mit fortlaufenden Nummern (<i>Number</i>) versehen sind, ist die <i>Accession Number</i> (ACCN#), der Name (<i>Probe_Name</i>) und der Typ der Gensonde (<i>Type</i>) aufgeführt. Darüber hinaus sind die Rohintensität (<i>Raw_Intensity</i>), die normalisierte Intensität (<i>Normalized_Intensity</i>), die Angabe, ob der Wert über dem Schwellenwert liegt (<i>Above_Threshold</i>) und das Qualitätsattribut jeder einzelnen Gensonde in dieser Tabelle enthalten	46
Abbildung 9: Die Mikroarraydaten wurden in eine einheitliche Struktur gebracht. Die Spalte ACCN beschreibt die einzelnen Gene, welche alphabetisch aufsteigend sortiert wurden. In den Spalten Array 1 bis	

Array p stehen die zu dem entsprechenden Gen zugehörigen Werte des entsprechenden Arrays.....	49
Abbildung 10: Arbeitsablauf der Qualitätssicherung, weiß hinterlegte Schritte wurden neu entwickelt, während grau hinterlegte Schritte von anderen Autoren übernommen wurden	54
Abbildung 11: Graphische Oberfläche der von uns entwickelten Qualitätssicherungsmodule	55
Abbildung 12: Present Call (Pcall) der einzelnen Arrays in Prozent. Eine massive Abweichung des Pcall kann Hinweise auf Qualitätsproblematiken geben, welche aber in diesem Datenset nicht gegeben sind.....	66
Abbildung 13. <i>Heatmap</i> der im Verlauf nicht septischen Patienten (NS_Pat). Die Farben entsprechen der Korrelation (Legende: vgl. Abbildung 14) ..	68
Abbildung 14: Legende zu Abbildung 13 und Abbildung 15. Die Farben entsprechen der Korrelation (Schwarz 0,7 bis Weiß 1,0)	68
Abbildung 15: <i>Heatmap</i> der im Verlauf septischen Patienten (S_Pat). Die Pfeile indizieren die von der weiteren Analyse ausgeschlossenen Arrays, da diese nur schlecht mit ihren technischen Replikaten korrelieren. Die Farben entsprechen der Korrelation (Legende: vgl. Abbildung 14)	69
Abbildung 16: Vergleich der prozentualen Ausreißerwerte ($ z >5$) der einzelnen Arrays mit (Schwarz) und ohne (Grau) Anwendung des Ausreißerwerte Filtermoduls. Das Ausreißerwerte Filtermodul zeigt eine absolute Ausreißerreduktion von über 35% in qualitativ schlechteren Arrays.....	70
Abbildung 17: Vergleich der durchschnittlichen Korrelation der einzelnen Arrays in Prozent mit (Schwarz) und ohne Anwendung (Grau) des Ausreißerwerte Filtermoduls. Die durchschnittliche Korrelation wurde durch die Anwendung des Ausreißerwerte Filtermoduls verbessert.....	71
Abbildung 18: Validierung der Genexpression mittels quantitativer RT-PCR. 14 Gene wurden ausgewählt. <i>Log2-Fold Change's</i> des Mikroarrayverfahrens (X-Achse) und <i>log2-Fold Change's</i> der RT-PCR (Y-Achse) sind gegeneinander aufgetragen. Die Korrelation beider Verfahren beträgt $r = 0,915$	73
Abbildung 19: Verteilung der signifikant regulierten Gene (Legende: Chr. indiziert das Chromosom, die Prozentzahlen geben den Anteil an allen signifikant regulierten Genen an)	74
Abbildung 20 Verteilung der signifikant regulierten Gene auf den einzelnen Chromosomen (Legende: MB indiziert die Megabase und gibt so die Lokalisation auf dem Chromosom an. Zur Visualisierung wurde STRIPE verwendet [⁸⁰])	75

- Abbildung 21: Visualisierung der aus *PubMed Abstracts* extrahierten Informationen. (Legende: Proteine werden grün, Zellen blau und Gewebe orange dargestellt; Linien indizieren Beziehungen zwischen den einzelnen Elementen) 76
- Abbildung 22: Anzahl der vermehrt und vermindert exprimierten Gene in den einzelnen überrepräsentierten Kategorien (Legende: Schwarze Balken repräsentieren die Anzahl vermehrt exprimierter Gene, grüne Balken die Anzahl vermindert exprimierter Gene) 79
- Abbildung 23: Vergleich der Expressionsmittelwerte von später septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. Gene, die eine TH1 Antwort fördern, sind vermindert in S_Pat exprimiert; währenddessen sind Gene, die eine TH2 Antwort fördern, in S_Pat vermehrt exprimiert zum Zp0. (Legende: MW indiziert den Mittelwert der Quantilen Normalisierten Rohdaten; grau hinterlegt sind S_Pat, schwarz hinterlegt sind NS_Pat)..... 82
- Abbildung 24: Der KEGG-*Pathway* Komplement- und Koagulationskaskade zeigt, dass in S_Pat zum Zp0 die Gene C1QB und C3AR1 vermehrt exprimiert sind; zusammen mit der verminderten Expression des Inhibitors SERPING1 könnte dies eine vermehrte Aktivierung des Komplementsystems bedeuten. Weiterhin sind Gene der Gerinnungskaskade differenziell exprimiert. Die vermehrt exprimierten Gene PROS1 und SERPINE1 hemmen die Aktivität des vermindert exprimierten PLAU. PLAU, der Urokinase Plasminogen Aktivator, der eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse spielt, könnte zu einer vermehrten Thrombenbildung führen. (Legende: die rot markierten Felder zeigen vermehrt exprimierte, die grün markierten Felder vermindert exprimierte Gene. Grau markierte Felder sind nicht signifikant differenziell reguliert und weiß markierte Felder sind nicht exprimierte oder nicht gemessene Gene in S_Pat zum Zp0. Die Zahlen neben den Feldern indizieren den FC) 84
- Abbildung 25: Vorhergesagte Aktivität TLR4 assoziierter Moleküle: Die DEEP Analyse zeigt, dass sowohl der Rezeptorkomplex (TLR4:MD-2:MyD88) für die Erkennung von PAMP sowie die Mediatoren dieses Rezeptorkomplexes (IRAK1, TRAF6, NF-kappaB, TNF-alpha) als aktiviert vorhergesagt werden. (Legende: Rote Punkte repräsentieren vermehrt aktivierte Moleküle, gelbe Punkte repräsentieren keine differenzielle Aktivierung und grüne Punkte repräsentieren vermindert aktivierte Moleküle. Große Punkte stellen Startmoleküle und kleine Punkte berechnete Moleküle dar)..... 85
- Abbildung 26: Zu sehen ist ein Netzwerk der *Ingenuity* Analyse. Dieses beinhaltet signifikant differentiell exprimierte Gene im Vergleich der später septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. (Legende: Rot markierte Gene sind vermehrt exprimiert, grün markierte Gene sind vermindert exprimiert, grau markierte Gene sind nicht signifikant reguliert und weiss markierte Gene sind nicht gemessene Gene) 89

- Abbildung 27: Vorhergesagte Aktivität von Molekülen, die an der Apoptose beteiligt sind. Die proapoptotischen Moleküle P53 und das antiapoptotische Molekül Bcl-xL werden in ihrer Aktivität als nicht reguliert vorhergesagt. Das antiapoptotische Molekül Bcl-2 und sein Inhibitor Bad werden in ihrer Aktivität beide als gehemmt vorhergesagt. (Legende: Rote Punkte repräsentieren vermehrt aktivierte Moleküle, gelbe Punkte repräsentieren keine differenzielle Aktivierung und grüne Punkte repräsentieren vermindert aktivierte Moleküle. Große Punkte stellen Startmoleküle und kleine Punkte berechnete Moleküle dar)90
- Abbildung 28: Potentielle Markergene, Vergleich der Expressionsmittelwerte von später septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. (Legende: MW indiziert den Mittelwert der Quantilen Normalisierten Rohdaten; grau hinterlegt sind S_Pat, schwarz hinterlegt sind NS_Pat)92
- Abbildung 29: Hierarchisches Cluster der signifikant regulierten Gene. Der Stammbaum zeigt, welche Patienten sich in ihrem Expressionsprofil am ähnlichsten sind. Es zeigt sich, dass sich zwei Cluster mit vorwiegend S_Pat und NS_Pat bilden. Dadurch wird deutlich, dass sich Genexpressionsdaten dazu eignen, bereits frühzeitig, d.h. 12 Stunden nach einem Polytrauma, septische (S_Pat) und nicht septische (NS_Pat) Patienten zu differenzieren. (Legende: Rot indiziert eine vermehrte und grün eine verminderte Expression, verglichen mit dem Mittelwert der Genzeile; die Patienten ID S_xx_00 entsprechen im Verlauf septischen Patienten, die Patienten ID N_xx_00 entsprechen im Verlauf nicht septischen Patienten)93
- Abbildung 30: Vergleich der klinisch- und transkriptionell phänotypischen Reaktion: Der klinische Unterschied des proximalen Phänotyps, kurze Zeit nach einem Trauma, ist sehr gering, transkriptionell ist er aber schon signifikant. Der distale Phänotyp, 3-5 Tage später, unterscheidet sich sowohl klinisch als auch transkriptionell bei septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. Das Messen von mRNA ermöglicht es, zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine klinisch phänotypischen Unterschiede existieren, transkriptionell unterschiedliche Regulationen zu erfassen und somit potentiell ursächliche Regulationen für eine Sepsis aufzuzeigen. 100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition der Sepsis [7]	16
Tabelle 2: Die Bedeutung der einzelnen Buchstaben des PIRO Konzeptes [9]	17
Tabelle 3: Sequenz des Organversagens bei MODS (Quellen: 1: [41], 2: [42], 3: [43], 4: [44], 5: [45], 6: [46])	27
Tabelle 4: Prozentualer Anteil verschiedener Eintrittspforten für Erreger [17]	28
Tabelle 5: Einschlusskriterien	37
Tabelle 6: Ausschlusskriterien	37
Tabelle 7: Die Qualitätsattribute der Bildauswertung	48
Tabelle 8: Paare der in die Mikroarrayanalyse eingeschlossenen Patienten im direkten Vergleich. (Legende: die Patienten ID S_xx entsprechen im Verlauf septischen Patienten, die Patienten ID N_xx entsprechen im Verlauf nicht septischen Patienten)	62
Tabelle 9: Charakteristika der klinischen Scores bei Aufnahme auf die Intensivstation (Zp0) und zum Zeitpunkt der Sepsis (ZpSepsis). (Legende: SD indiziert Standardabweichung, NS indiziert nicht signifikant)	64
Tabelle 10: Klinische Charakteristika der Patienten bei Aufnahme auf die Intensivstation (Zp0) und zum Zeitpunkt der Sepsis (ZpSepsis). (Legende: SD indiziert Standardabweichung, NS indiziert nicht signifikant)	65
Tabelle 11: Leerfelder im Datenset mit allen Arrays.....	67
Tabelle 12: Leerfelder im Datenset nach Entfernung der qualitativ schlechten Arrays	72
Tabelle 13: Beeinflusste <i>Pathways</i> durch die signifikant regulierten Gene, ähnliche <i>Pathways</i> der Analyse überrepräsentierter Kategorien sind fett markiert (Legende: %ID indiziert den prozentualen Anteil der zugeordneten Gene bezogen auf die Gesamtzahl der vorhandenen Gene im zugehörigen <i>Pathway</i> , Signifikanzlevel %ID => 2%).....	77
Tabelle 14: Überrepräsentierte DAVID Kategorien zum Zp0, 12 Stunden nach Polytrauma (Legende: GO:xxx indiziert GO-Kategorien, hsaxxx indiziert KEGG- <i>Pathways</i>)	78
Tabelle 15: Expression ausgewählter Gene im Vergleich S_Pat gegen NS_Pat	96

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ALI	Acute Lung Injury
APACHE-II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation-II
aPC	Aktiviertes Protein C
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrom
CARS	Kompensatorisches Antientzündliches Antwort Syndrom
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	Komplementäre Ribonukleinsäure
CRP	C-reaktives-Protein
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DEEP	Differential Expression Effector Prediction
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate
GO	Gene Ontologie
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen DR
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KNN	K Nearest Neighbor
LPS	Lipopolysaccharid
MARS	Gemischtes Antagonistisches Antwort Syndrom
MODS	Multiple Organ Dysfunction Score
MOF	Multi Organ Versagen
MOFilter	Microarray Outlier Filter
mRNA	Messenger RNA
MSR	Manufacturer Spot Removed
MVA-Plot	Mean versus Average Plot

MED	Median
MyD88	Myeloid Differentiationfactor 88
NFkB	Nuklear Faktor kappaB
NS_Pat	Im posttraumatischen Verlauf nicht septische Patienten
PAMP	Pathogen Assoziierte Molekulare Strukturen
Pcall	Present Call
PCT	Procalcitonin
PRR	Pathogen Erkennungsrezeptoren
PTS	Hannover Polytrauma Schlüssel
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S_Pat	Im posttraumatischen Verlauf septische Patienten
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	Standardabweichung
SHT	Schädel Hirn Trauma
SIRS	Systemisches Entzündliches Antwortsyndrom
SKNN	Sequential K Nearest Neighbor
TF	Tissue Faktor
TIRAP	Toll-IL1-Resistance Adaptor-Like Protein
TLR	Toll Like Rezeptor
TNF-a	Tumornekrosefaktor-alpha
VAP	Ventilator Assoziierte Pneumonie
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zp0	Zeitpunkt 0 - entspricht ca. 12 Stunden nach dem initialen Trauma
ZpSepsis	Zeitpunkt der klinischen Manifestation der Sepsis

1 Einleitung

1.1 Das Polytrauma

In den westlichen Industrienationen ist die häufigste Todesursache bei jungen Menschen das Trauma. An erster Stelle steht hierbei der tödliche Verkehrsunfall. Für die Zukunft wird darüber hinaus durch die rasante technische Entwicklung der Dritten Welt global mit einem Anstieg der Unfalltoten und Verletztenzahlen von 5,1 auf 8,4 Millionen Menschen pro Jahr gerechnet. Die durch äußere Gewalteinwirkung, wie Verkehrsunfälle, verursachten Traumata präsentieren sich bei den betroffenen Menschen meist als Polytrauma.

Unter dem Begriff „Polytrauma“ versteht man die Summation gleichzeitig entstandener Verletzungen mehrerer Körperregionen oder Organsysteme, von denen wenigstens eine Verletzung oder deren Kombination lebensbedrohlich ist.

Tritt der Tod durch ein traumatisches Ereignis ein, kann man zwischen der frühen und der späten Polytrauma assoziierten Mortalität differenzieren.

Die frühe Mortalität ist geprägt durch den Schweregrad einer primären Hirnverletzung und das Ausmaß des primären Blutverlustes. Dadurch ist die frühe Mortalität oftmals nicht beeinflussbar (z.B. Schädelhirntrauma III^o) oder sie ist fast ausschließlich vom Zeitfaktor abhängig (z.B. Blutverlust). Die späte Mortalität dagegen ist durch sekundäre Schädigungen des Gehirns oder ein eventuell entstehendes Multiorganversagen bedingt [1]. Das bedeutet, dass Komplikationen Tage oder Wochen nach dem initialen Trauma auftreten, die häufig zum Tod führen. Hierbei sind die häufigsten Todesursachen eine Sepsis oder das Versagen eines oder mehrerer Organe [2] [3].

1.2 Geschichte der Sepsis

Das Phänomen, dass sich bereits kurze Zeit nach einer Verletzung der Zustand eines Patienten wieder verschlechtert, war schon in der Antike bekannt. Circa

400 vor Christus wurde die Sepsis das erste Mal durch Hippokrates beschrieben. Damals als eine Erkrankung, die etwa sieben Tage nach der Verwundung als Fieber beginnt, „das verursacht wird durch eine Materie, die fault“ und die häufig mit dem Tod endet.

Pathophysiologische Erklärungsansätze gab es damals nur wenige und erst mit der Entdeckung der Bakterien durch Louis Pasteur Mitte des 19. Jahrhunderts wurde der Grundstein für das heutige Sepsisverständnis gelegt. Dennoch dauerte es lange, bis das Krankheitspotential der Bakterien verstanden wurde. Der Gynäkologe Ignaz Semmelweis vermutete, dass „die Leichenteilchen, die [nach der Obduktion der Leichen] in das Blutgefäßsystem [der Wöchnerinnen] gelangten“, für die Erkrankungen der Frauen auf seiner Station verantwortlich waren. Obwohl er daraufhin auf seiner Wöchnerinnenstation durch konsequente Chlorkalkwaschungen die Sterblichkeit von 9,7% auf 3,3% senkte, wurde er damals von der Wissenschaft nicht ernst genommen.

Das heutige Verständnis der Sepsis, dass diese nicht durch Fäulnis verursacht wird, sondern eine bakteriell bedingte Erkrankung ist, wurde von dem Internisten H. Lennhartz in Deutschland begründet. Dennoch war es sein Schüler, H. Schottmüller, der 1914 den Grundstein für ein modernes Verständnis der Sepsis mit der ersten Sepsisdefinition legte [4].

1.3 Definition der Sepsis

Die erste Definition des Begriffs Sepsis im Zusammenhang mit einem klinisch-infektiösen Geschehen stammt von Hugo Schottmüller aus dem Jahr 1914:

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ [5]

Schottmüller wusste zu diesem Zeitpunkt nicht, dass auch die Reaktion des Organismus eine Rolle spielt. Dies wurde erst 75 Jahre später, durch die 1989 von Roger C. Bone veröffentlichte Definition, aufgezeigt:

„Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“

Roger C. Bone begründete damit das moderne Verständnis der Sepsis, welches 1992 in der Definition der Sepsis von dem *American College of Chest Physicians (ACCP)* und der *Society of Critical Care Medizin (SCCM)* auf einer Konsensuskonferenz niedergeschrieben wurde [6]. Diese Definition teilte die Sepsis in die Schweregrade Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock ein und definierte diese Zustände.

Eine Sepsis liegt demnach vor, wenn eine Infektion und zwei Zeichen des *Systemischen Entzündlichen Antwortsyndroms (SIRS)* nachgewiesen werden können.

Bei einer schweren Sepsis wird eine vorhandene Sepsis durch ein Organversagen kompliziert.

Ein septischer Schock liegt vor, wenn die Sepsis mit einer anhaltenden Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution auftritt (vgl. Tabelle 1) [7].

Definition der Sepsis	
Sepsis	Eine systemische Reaktion auf eine Infektion, die durch zwei oder mehr der folgenden SIRS Symptome gekennzeichnet ist: 1. Körpertemperatur >38,0 C° oder <36,0 C° 2. Herzfrequenz >90/min 3. Atemfrequenz >20/min oder paCO ₂ <32 mmHg 4. Leukozyten > 12000/mm ³ oder <4000/mm ³ , oder > 10% unreife (stabförmige) Formen
Schwere Sepsis	Sepsis, assoziiert mit Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotonie Die Hypoperfusion kann sich z.B. als Hypoxämie, Oligurie, Laktazidose oder akute Verwirrtheit präsentieren.
Septischer Schock	Schwere Sepsis + arterielle Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr: systolischer Druck <90 mm Hg, mittlerer Druck <60 mm Hg oder Abfall des systolischen Drucks >40 mm Hg des Ausgangswertes

Tabelle 1: Definition der Sepsis [7]

Dabei ist zu beachten, dass der Begriff SIRS von dem der Sepsis abgegrenzt werden muss. Ein SIRS kann nicht nur durch einen Infekt, sondern auch durch ein Trauma, eine Verbrennung, eine Neutropenie oder eine Pankreatitis verursacht werden [7] [8].

Nunmehr war die Sepsis über diese Definitionen begrifflich genau definiert, dennoch konnte nicht der klinische Schweregrad quantifiziert werden [7]. Um diesem Fehlen des klinischen Schweregrades gerecht zu werden, wurde im Jahr 2001 das PIRO Konzept erarbeitet.

Das PIRO Konzept soll helfen, die klinische Relevanz für den Krankheitsverlauf der Sepsis zu erfassen, wobei die Buchstaben für einzelne Teilbereiche zur Evaluation des Status eines Patienten stehen (vgl. Tabelle 2) [9]. Die Funktionsweise ist ähnlich wie das in der Behandlung von Tumoren gebräuchliche TNM System, welches Tumore nach Stadium des Primärtumors (T), Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und Anzahl der Metastasen (M) klassifiziert. Dies bietet die Möglichkeit, unter einem ganzheitlichen Aspekt alle für die Krankheit relevanten und prognostischen Faktoren zu erfassen.

Leider konnte sich die Verwendung des PIRO Konzepts bis heute noch nicht durchsetzen. Dies liegt unter anderem daran, dass das Zuordnen einzelner Stadien zu bestimmten Prognosen sich als überaus schwierig gestaltet und so dieses Konzept erst in der Zukunft an Bedeutung gewinnen wird [10].

PIRO	
P	Predisposition (Prädisposition)
I	Infection / Injury (Infektion / Verletzung)
R	Response (Antwort des Organismus)
O	Organ Dysfunction (Organdysfunktion)

Tabelle 2: Die Bedeutung der einzelnen Buchstaben des PIRO Konzeptes [9]

Dennoch haben Schuster und Werdan 2005, basierend auf dem Gedanken des PIRO Konzeptes, die bis heute aktuellste Definition der Sepsis verfasst:

„Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“ [11]

Abschließend lässt sich somit sagen, dass das moderne Sepsisverständnis die Annahme abgelegt hat, dass ausschließlich ein mikrobiologischer Fokus für die Krankheit verantwortlich ist.

1.4 Epidemiologie der Sepsis

Obwohl die Sepsis eine epidemiologisch und gesundheitsökonomisch bedeutende Erkrankung ist, gibt es in Deutschland keine validen epidemiologischen Daten [12]. Um trotzdem einen Überblick über die Sepsisepidemiologie zu geben, werden im Folgenden deutsche und amerikanische Studien zusammen betrachtet.

In Deutschland erkranken jährlich 79.000 (116 von 100.000) Menschen an einer Sepsis. Weitere 75.000 (110 von 100.000) erleiden eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock (insgesamt 226 von 100.000) [13] [14]. Die 90 Tage Mortalitätsrate liegt bei 54% für Patienten mit schwerer Sepsis [13] [14] und im Falle eines septischen Schocks steigt sie auf über 80% [15]. In den USA erkranken mit 751.000 (300 von 100.000) vergleichbar viele Menschen an einer schweren Sepsis pro Jahr, von denen 28,6% versterben [16] [17].

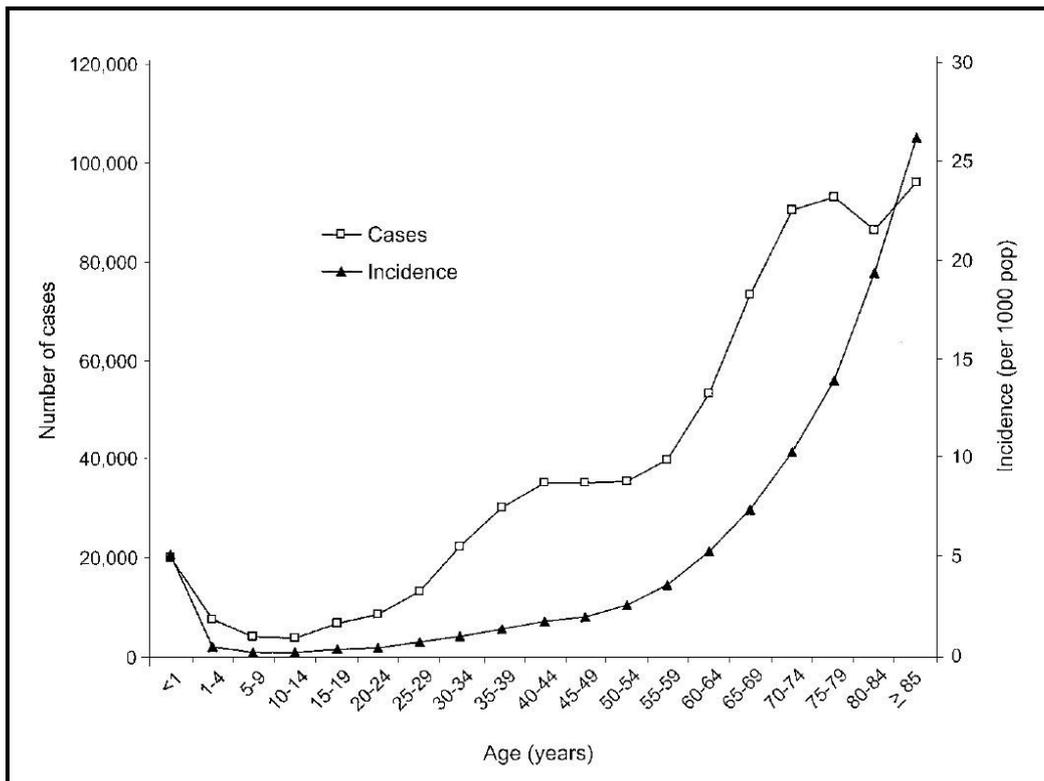


Abbildung 1: Inzidenz (Incidence) und Fälle (Cases) schwerer Sepsis in den USA [17]

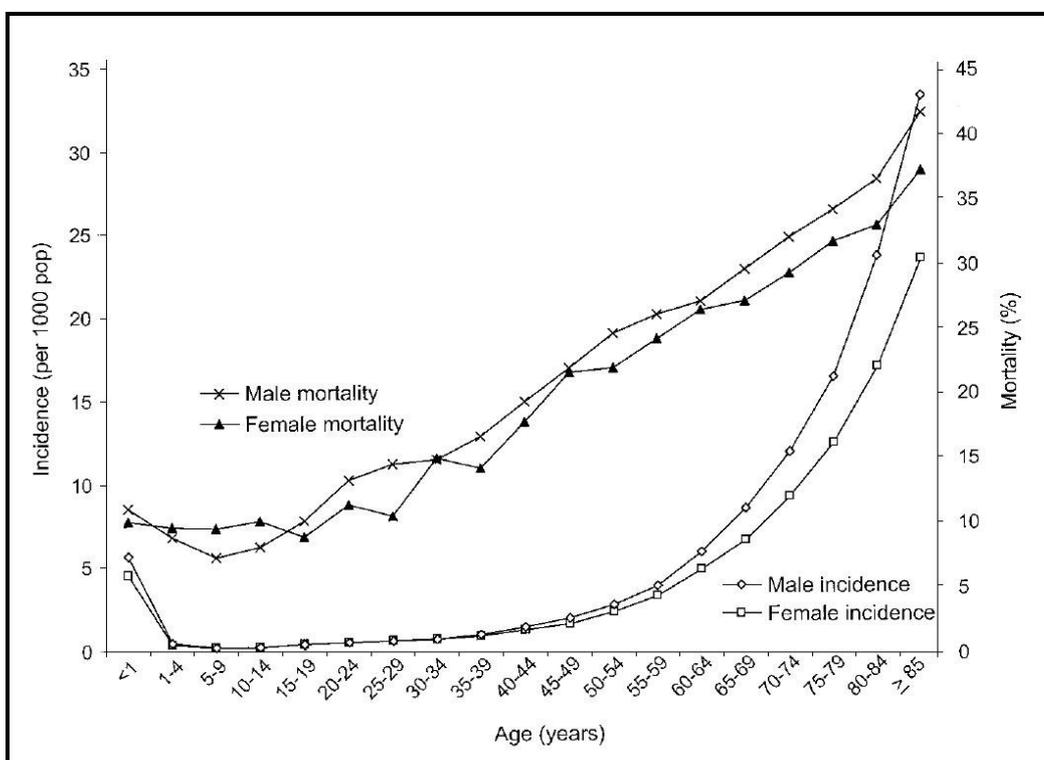


Abbildung 2: Weibliche (Female) / Männliche (Male) Inzidenz (Incidence) und Mortalität (Mortality) [17]

Die Inzidenz zeigt einen u-förmigen Verlauf, so ist bei Kleinkindern (<1 Jahr) die Inzidenz genau so hoch wie bei 60-64 Jährigen (530 von 100.000). Zwischen dem 5.-14. Lebensjahr ist die Inzidenz (20 von 100.000) am Geringsten. Bei Menschen ≥ 85 Jahren ist die Inzidenz am Höchsten (2620 von 100.000) (vgl. Abbildung 1) [17]. Die Mortalität steigt mit dem Alter kontinuierlich, bei Männern und Frauen gleichermaßen, von 10% im Kindesalter auf 38,4% bei ≥ 85 Jährigen (vgl. Abbildung 2) [17].

Die antimikrobielle Therapie und die Intensivmedizin haben im 20. Jahrhundert erhebliche Fortschritte gemacht. Trotz dieser Modernisierung ist die Letalität der Sepsis und des septischen Schocks immer noch unverändert hoch. Auf Intensivstationen, die keine kardiovaskulären Patienten behandeln, stellt Sepsis heutzutage die häufigste Todesursache dar [15] [18] [19]. Durch die Zunahme der Sepsishäufigkeit in der letzten Zeit kommt ihr ein gleichbedeutender Stellenwert wie dem Myokardinfarkt zu. Folglich ist es nicht überraschend, dass die Sepsis eines der kostenintensivsten Krankheitsbilder in Deutschland ist.

Pro Patient werden circa 23.000 Euro für die Sepsistherapie ausgegeben. Das entspricht 1,77 Milliarden Euro pro Jahr bzw. 30% der intensivmedizinischen Ausgaben [13] [16] [20]. Insgesamt betragen die Krankenhaus- und indirekten Kosten der Sepsis, die der Deutschen Gesellschaft durch den Produktivitätsverlust entstehen, 4 – 8 Milliarden Euro pro Jahr [12].

Datenerhebungen des Statistischen Bundesamtes von 2005 belegen, dass 64% der Todesfälle 20 – 25 Jähriger in Deutschland auf äußere Gewalt, vor allem Verkehrsunfälle, zurückgehen. Aber auch Selbstbeschädigung, tätliche Angriffe, Stürze oder Tod durch Ertrinken sind häufige Todesursachen (vgl. Abbildung 3 und Abbildung 4) [21]. Von den insgesamt 80.801 Menschen, die im Jahre 2004 schwer verunglückten, erkrankten 11% an einer Sepsis [22]. Daher überrascht es nicht, dass die Haupttodesursache in der Altersgruppe bis 45 Jahren in der westlichen Welt das Trauma ist [22]. Von diesem plötzlichen Tod sind demnach am häufigsten Menschen betroffen, die am Anfang ihres Berufslebens stehen. Zudem werden oftmals junge Familien auseinander gerissen und sind durch dieses Ereignis wirtschaftlich sowie emotional stark belastet.

Obwohl die Inzidenz und Mortalität der alten Menschen um ein Vielfaches höher liegt, ist die Trauma assoziierte Sepsis die Haupttodesursache junger

Erwachsener. Daraus folgt, dass die Sepsis, durch ihre Assoziation mit dem Trauma, nicht nur ein Problem der alten sondern vor allem auch der jungen Menschen ist [13].

ICD-10	Kategorie	Prozentualer Anteil
E00-E90	Insgesamt	100,0
A00-B99	KAPITEL I: Bestimmte infektiöse und parasitäre Krankheiten	0,8
F00-F99	KAPITEL II: Neubildungen	8,6
F10-F19	KAPITEL III: Krankheiten des Blutes und der blutbildenden Organe sowie bestimmte Störungen mit Beteiligung des Immunsystems	0,5
G00-G99	KAPITEL IV: Endokrine, Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten	1,5
I00-I99	KAPITEL IX: Krankheiten des Kreislaufsystems	6,4
I10-I15	KAPITEL V: Psychische- und Verhaltensstörungen	3,6
I20-I25	KAPITEL VI: Krankheiten des Nervensystems	3,9
I21	KAPITEL X: Krankheiten des Atmungssystems	2,1
I22	KAPITEL XI: Krankheiten des Verdauungssystems	1,3
I30-I52	KAPITEL XIV: Krankheiten des Urogenitalsystems	0,2
I60-I69	KAPITEL XVI: Bestimmte Zustände, die ihren Ursprung in der Perinatalperiode haben	0,2
I64	KAPITEL XVII: Angeborene Fehlbildungen, Deformitäten und Chromosomenanomalien	1,4
I70-I79	KAPITEL XVIII: Symptome und abnorme klinische und Laborbefunde, die andernorts nicht klassifiziert sind	5,1
V01-Y98	KAPITEL XX: Äußere Ursachen von Morbidität und Mortalität	63,9

Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Todesursachen 20 - 25 jähriger Personen nach ICD-10 Kapiteln [21]

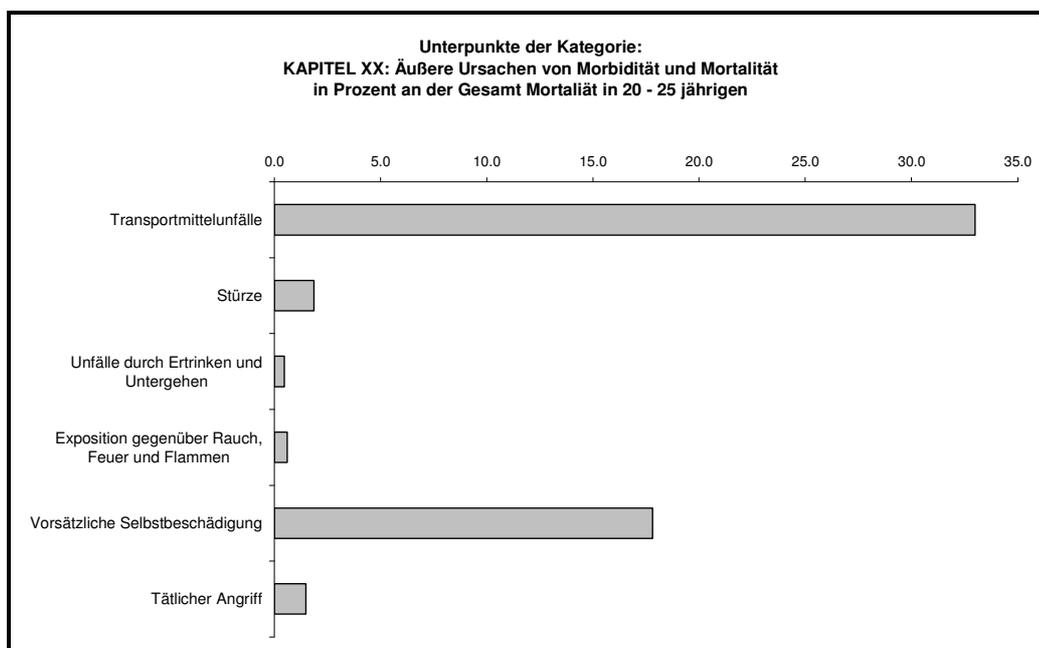


Abbildung 4: Prozentualer Anteil an den Todesursachen 20 - 25 Jähriger. Unterkategorien des Kapitel XX: Äußere Ursachen von Morbidität und Mortalität des ICD-10 [21]

1.5 Pathophysiologie der Sepsis

Eine Sepsis entwickelt sich, wenn der Organismus anfänglich adäquat auf eine Infektion reagiert, diese Reaktion sich aber im Verlauf verstärkt und letztendlich dereguliert wird^[23]. Diese Reaktion kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, zu denen auch ein Polytrauma zählt.

Die Pathophysiologie kann demnach in mehrere Schritte aufgeteilt werden:

1. Eindringen eines fremden Organismus in die Blutbahn
2. Frühe Antwort des Organismus, die noch klinisch physiologisch abläuft
3. Späte Antwort des Organismus, die klinisch pathologisch abläuft

Das Eindringen eines fremden Organismus erfolgt immer aufgrund eines Zusammenbruchs der Integrität von Epithelien oder Endothelien. Dieser Integritätsverlust kann verschiedene Ursachen haben:

Auf der einen Seite ist die Verletzung von Haut oder Schleimhäuten durch ein Polytrauma, eine ziliäre Dysfunktion der Epithelzellen des Tracheobronchialbaumes oder in Assoziation mit einem Fremdkörper bedingt.

Auf der anderen Seite kann die Last oder Virulenz eines Erregers so hoch sein, dass eigentlich intakte Abwehrbarrieren überwindbar werden.

Ist ein fremder Organismus in die Blutbahn eingedrungen, wird dieser vom Immunsystem durch Immunzellen erkannt. Dies geschieht über eine Interaktion von *Pathogen Assoziierten Molekularen Strukturen* (PAMP) mit *Pathogen Erkennungsrezeptoren* (PRR). Als PAMP werden Strukturen bezeichnet, die vom Organismus als fremd erkannt und aufgrund dessen vom Immunsystem bekämpft werden. Je nach Erregerart sind dies unterschiedliche Anteile des Erregers. Endo- und Exotoxine, *Lipopolysaccharid* (LPS) gramnegativer Bakterien, Zellwandbestandteile von Pilzen und Bakterien, wie Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren, sowie bakterielle und virale Nukleinsäuren^[23]^[24]. Zu den PRR gehört die Gruppe der *Toll Like Rezeptoren* (TLR), welche unter anderem auf Immunzellen und Endothelzellen lokalisiert sind.

Alle diese PAMP \leftarrow \rightarrow PRR Interaktionen führen zu einer Aktivierung der TLR, welche mit Hilfe von CD14 über die Aktivierung von intrazellulärem *Myeloid Differentiationfactor 88* (MyD88) oder *Toll-IL1-Resistance Adaptor-Like Protein*

(TIRAP) letztendlich zu einer Aktivierung von *Nuklear Faktor kappaB* (NFκB) führen und somit proentzündliche Zytokine induzieren ^[23] ^[24] ^[25]. Die zentrale Aktivierung von MyD88 und TIRAP führt dazu, dass trotz verschiedener auslösender Faktoren alle eine ähnliche Antwort im Organismus bewirken ^[23] ^[26] (vgl. Abbildung 5). Im Falle einer Sepsis wird diese Antwort pathologisch verstärkt und schließlich dereguliert, was sich vor allem in einer Fehlfunktion des Immunsystems, des Endothels und der Gerinnung zeigt ^[18] ^[23].

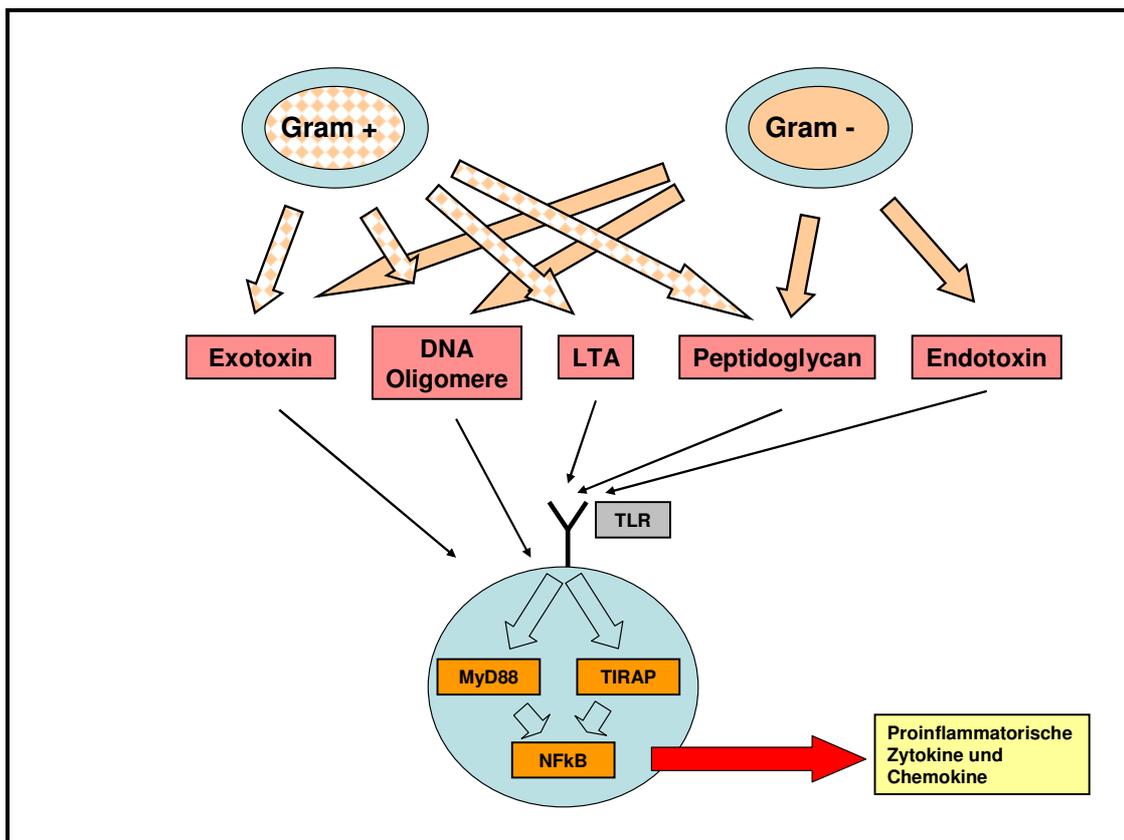


Abbildung 5: Zelloberflächenerkennung von Bakterienbestandteilen. Sowohl Gram – als auch Gram + Bakterien haben verschiedenste Strukturen, die von Immunzellen erkannt werden. Dabei führen alle zu einer Aktivierung von TLR und über den Signalweg TLR → MyD88 oder TIRAP zur Aktivierung von NFκB, wodurch proinflammatorische Zyto- und Chemokine induziert werden.

Das Immunsystem wird von aktivierenden und inhibierenden Faktoren geregelt. Hierbei bedeutet eine TH1 Antwort eine Aktivierung des Immunsystems, wodurch Immunzellen aktiviert und angelockt werden, welche für die Bekämpfung von Pathogenen benötigt werden. Eine TH2 Antwort dagegen

bedeutet ein Ruhen der Immunantwort, was dazu führt, dass B-Zellen aktiviert werden, die sich zu Gedächtniszellen differenzieren. Für eine funktionierende Abwehr ist die Balance zwischen diesen beiden Antworten essenziell, um adäquat auf ein Pathogen reagieren zu können [27].

Bei einer Sepsis ist das Immunsystem primär überaktiviert. Dies zeigt sich durch eine massive Aktivierung von Immunzellen mit erhöhten Blutspiegeln an proentzündlichen Botenstoffen, was anhand von SIRS Symptomen und dem Überwiegen einer TH1 Antwort deutlich wird [28]. Diese Überaktivierung wechselt aber im Verlauf, wenn die Sepsis über einen längeren Zeitraum besteht, in einen immun supprimierten Status [25] [26]. Dieser wird als *Kompensatorisches Antientzündliches Antwort Syndrom* (CARS) bezeichnet. Charakteristisch für CARS ist das Überwiegen einer TH2 Antwort, was durch hohe Blutspiegel an antientzündlichen Botenstoffen und einer verminderten Expression von *Humanem Leukozyten Antigen DR* (HLA-DR) in Erscheinung tritt. Folglich kommt es zu einer massiven Immunsuppression und einer Begünstigung nosokomialer Infektionen [28]. Treten das SIRS und CARS Syndrom repetitiv intermittierend auf, so spricht man von einem *Gemischten Antagonistischen Antwort Syndrom* (MARS) [29].

Durch die Aktivierung der PRR werden aber auch Endothelzellen aktiviert, da sie genauso wie Leukozyten PRR tragen. Dies führt dazu, dass das Endothel permeabler wird und Adhäsionsmoleküle und gerinnungsfördernde Faktoren exprimiert [30]. Die erhöhte Permeabilität des Endothels führt zu Volumenumverteilungen und Ödemen, was letztendlich in einer Hypovolämie und Hypotension endet [31]. Das aktivierte Gerinnungssystem lässt Mikrothromben entstehen, welche die Kapillargefäße verlegen und / oder zu einer *Disseminierten Intravasalen Gerinnung* (DIC) führen können. Unter den gerinnungsfördernden Faktoren spielen der *Tissue Faktor* (TF) und die anschließende Thrombin Aktivierung, also das Extrinsische System, die wichtigste Rolle. Zum einen exprimieren aktivierte Monozyten und Endothelzellen vermehrt TF und zum anderen sind aktivierte Endothelzellen nicht mehr in der Lage, *aktiviertes Protein C* (aPC) zu bilden, welches normalerweise die TF Aktivität inhibiert. Darüber hinaus wird vom Endothel *von Willebrand Faktor* (vWF) an das Blut abgegeben, was zusätzlich zu einer Aktivierung und Agglutination von Thrombozyten führt [31] [32].

Die Mikrothromben zusammen mit der Hypovolämie und Hypotension verursachen eine gestörte Perfusion von Organen. Diese Minderversorgung zeigt sich als *Multi Organ Versagen* (MOF) [31] und im Extremfall als septischer Schock, was die schwerste Form der Reaktion des Organismus auf eine Infektion darstellt [33].

Diese Interaktionen verschiedener Moleküle werden auch durch genetische Faktoren beeinflusst. Die Mutationen innerhalb eines Gens können die Qualität eines Genproduktes verändern, während die Mutationen in einer Promotorregion die Quantität verändern können. So sind Mutationen bei einer Vielzahl von Genen und Promotoren bekannt, die unter anderem auch Gene beeinflussen, welche eine zentrale Rolle in einem Entzündungsgeschehen spielen [34] [35]. Dass die Genetik eine Rolle spielt, zeigt sich auch daran, dass die Empfänglichkeit und Reaktion des Organismus für infektiöse Krankheiten vererbbar ist [34].

1.5.1 Pathophysiologie des Polytraumas

Bei polytraumatisierten Patienten führt das initiale Trauma, der „erste Hit“, dazu, dass verschiedenste immunogene Substanzen in die Blutbahn gelangen. Dies sind PAMP tragende Bakterien, welche das verletzte Epithel und Endothel durchdringen, sowie gewebseigene Zellfragmente oder Strukturen, die normalerweise durch das Immunsystem nicht erreichbar sind. Dieses Eindringen exogener Moleküle und Freisetzen endogener Moleküle führt zu einer Schwemme an neuen unbekanntem Epitopen.

Diese Epitope werden durch das Immunsystem erkannt, und im Idealfall werden die zugehörigen Antigene unschädlich gemacht. Kommt es aber zu einem „zweiten Hit“, dessen Auslöser iatrogen durch operative oder anästhesiologische Eingriffe oder aber durch zusätzliche Stressoren wie Hypothermie, Hypoxie oder eine mikrobielle Invasion bedingt sein können, kann dieser zu einem unkontrollierten Entzündungsgeschehen führen. Dieses wird als SIRS oder bei Vorhandensein einer mikrobiologischen Invasion als Sepsis bezeichnet [36] [37].

Ein zusätzliches Risiko für Polytraumapatienten stellt die Administration von Blutprodukten, wie z.B. Erythrozytenkonzentraten, dar. Sie führt zur Ausbildung

eines SIRS und gilt als ein unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität nach einem Polytrauma [38] [39].

1.6 Klinik der Sepsis

Die einzelnen klinischen Zeichen einer Sepsis sind eher unspezifisch und können das schwere Krankheitsbild nur durch ihre Gesamtheit beschreiben. Diese klinischen Zeichen setzen sich aus systemischen Zeichen und organspezifischen Zeichen zusammen.

1.6.1 Systemische Zeichen

- Fieber gilt als klassisches systemisches Infektzeichen, welches definiert ist mit einer Körperkerntemperatur von $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$.
- Pulmonal kann es zu einer initialen Tachypnoe kommen.
- Kardial kann sich ein niedriger Blutdruck an einer Tachykardie zeigen.
- Symptome des *Zentralen Nervensystems* (ZNS) können von keiner Symptomatik bis hin zu Somnolenz und Koma reichen.
- Metabolische Symptome können sich in hypoglykämischen wie auch hyperglykämischen Zuständen manifestieren und so zu ZNS-Symptomen beitragen.
- Veränderungen des Blutbildes können zu einer Leukozytose mit mehr als 10.000 Leukozyten / mm^3 Blut oder einer Leukopenie mit weniger als 4.000 Leukozyten / mm^3 Blut führen. Darüber hinaus kommt es oftmals zu einer Thrombozytopenie [40].

1.6.2 Organspezifische Zeichen

Die organspezifischen Symptome können eines oder mehrere Organsysteme betreffen. Ist ein Organsystem betroffen, spricht man von einem Organversagen; sind dagegen mehrere Organsysteme betroffen, spricht man von einem MOF.

- Pulmonale Funktionsstörungen überwiegen als primäre Organmanifestation (vgl. Tabelle 3) [41] [42] [43] [44] [45] [46]. Diese können

sich als *Acute Lung Injury* (ALI), *Adult Respiratory Distress Syndrom* (ARDS) oder *Ventilator Assoziierte Pneumonie* (VAP) zeigen. Diese Funktionsstörungen prädisponieren für Pneumonien, welche heute die häufigste Eintrittspforte für bakterielle Erreger in septischen Patienten darstellt (vgl. Tabelle 4) [17]. Zudem werden polytraumatisierte Patienten künstlich beatmet, weshalb sie ein besonderes Risiko haben, eine VAP zu erleiden.

- Nephrologisch kann sich eine verminderte Ausscheidung an harnpflichtigen Substanzen, an erhöhten Kreatinin- und Harnsäurewerten im Blut zeigen.
- Gastrointestinal kann es zum Subilleus oder Ileus durch eine gestörte Darmfunktion kommen.
- Hepatisch zeigt sich ein Leberversagen an einem Ikterus oder einer gestörten Synthese von Plasmaproteinen.
- Die Haut kann Zeichen der DIC und ähnlicher Gerinnungsstörungen zeigen, wie Akrozyanosen, symmetrische periphere Gangrän und Purpura fulminans. Embolien von Endokarditiden können in die Haut streuen und Bakterien können direkt in Blutgefäße einwandern, was ähnlich wie Immunkomplexe zu Vaskulitiden führen kann [40].

Primär	Sekundär	Tertiär	Quelle
Lunge	Niere	Leber	1: Baue et al. (1975)
Lunge	Herz	Leber	2: Border et al. (1976)
Lunge	Leber	Niere	3: Cerra et al. (1980)
Lunge	Leber	Gastrointestinal	4: Goris et al. (1985)
Lunge	Leber	Herz	5: Moore et al. (1996)
Lunge	Leber	Herz	6: Regel et al. (1996)

Tabelle 3: Sequenz des Organversagens bei MODS (Quellen: 1: [41], 2: [42], 3: [43], 4: [44], 5: [45], 6: [46])

Infektionsquelle	Infektionen in %
Lungenentzündung	44,00%
Bakterien im Blut (positive Blutkultur)	17,30%
Infektionen der Harnwege und Geschlechtsorgane	9,10%
Infektionen der Bauchorgane	8,60%
Wund- und Weichteilinfektion	6,60%
Katheterinfektion	2,20%
Infektion des Nervensystems	0,80%
Herzklappenentzündung	0,60%
Andere Infektionen	10,80%

Tabelle 4: Prozentualer Anteil verschiedener Eintrittspforten für Erreger [17]

1.6.3 Differenzialdiagnosen

Alle diese klinischen Zeichen, systemische und organspezifische Zeichen, sind Symptome, die ein weites Feld an Differenzialdiagnosen eröffnen.

Diese umfassen systemische Erkrankungen wie Kollagenosen, Vaskulitiden und Neoplasien. Nichtinfektiöses Fieber kann durch Kokain, Salizylate, eine Hyperthyreose, eine Nebenniereninsuffizienz, ein Umwelt Hitze Schock Syndrom oder eine Hypothalamusverletzung verursacht werden. Die mit Schock und Azidose assoziierten klinischen Zeichen können auch durch einen akuten Myokardinfarkt, eine Lungenembolie oder einen anaphylaktischen Schock ausgelöst werden [40].

1.7 Diagnostik der Sepsis

Aus diesen klinischen Zeichen lässt sich folgern, dass die Sepsissymptome ein weites Feld an Differenzialdiagnosen eröffnen und geradezu unspezifisch für eine Sepsis sind. Deshalb wurde 1992 von der Konsensuskonferenz eine klare Definition der Sepsis veröffentlicht [6], um eine Diagnose zu erleichtern.

Die seit 1992 bestehende Definition, welche den Nachweis einer Infektion und zwei der SIRS Symptome voraussetzt, ist aber in ihrer Umsetzung problematisch, da die SIRS Symptome nicht zwischen einem infektiösen und nicht infektiösen Geschehen unterscheiden [8] und der kulturelle Nachweis einer Infektion oftmals zeitaufwendig, schwierig und in über 50% der Fälle falsch negativ ist [47] [48]. Deshalb wurden viele verschiedene Laborparameter dahingehend untersucht, ob sie eine Sepsis verlässlich anzeigen können.

Diese Laborparameter waren unter anderem das *Procalcitonin* (PCT), *C-reaktives-Protein* (CRP), *Tumornekrosefaktor-alpha* (TNF- α), lösliche-Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren, *Interleukin* (IL)-1, IL-1 Rezeptor Antagonist, IL-6, IL-8, E-Selektin, lösliches interzelluläres Adhisionsmolekül-1, aPC, Leukozyten Elastase, Granulozyten Koloniestimulierender Faktor, Komplement 3a, Erythropoietin, Serum Amyloid Protein, Neopterin und Plasma-Nitrit und Nitrat Konzentrationen.

Von den genannten Markern scheinen nur PCT und CRP zu helfen, eine infektiöse von einer nicht infektiösen SIRS zu unterscheiden [8]. Obwohl PCT und CRP die besten Marker sind, sind die Sensitivität (PCT: 0,42 – 1,00; CRP: 0,35 – 1,00) und Spezifität (PCT: 0,48 - 1,00; CRP: 0,18 – 0,85) weit entfernt von einem idealen Marker [48].

Dies hat zur Folge, dass der für die Sepsisdiagnose benötigte Infektionsnachweis weiterhin klassisch anhand von Blutkulturen und Abstrichen erfolgt, oder aber bei einem begründeten Verdacht für eine Infektion als gegeben angenommen wird [40]. In der Zukunft wird dieser Nachweis mittels Erreger-DNA-Nachweis möglich sein [49] [50].

Die Definition erlaubt eine Diagnostizierung, gibt aber keine Aussage darüber, wie schwer der Verlauf einer Sepsis sein wird. Um dessen Schwere abzuschätzen, wurden verschiedene Scores entwickelt. Hierbei soll die Scorehöhe mit dem Schweregrad der Sepsis korrelieren, wie z.B. der *Sepsis Score* von Elebute und Stoner. Dieser kann zwar zur Abschätzung des Schweregrades einer Sepsis herangezogen werden, liefert aber keine individuelle Prognoseabschätzung [29].

1.8 Therapie der Sepsis

Die Therapie einer Sepsis gliedert sich in drei Bereiche, die kausale, die supportive und die adjunktive Therapie. Hierbei ist das primäre Ziel, die vitalen Parameter zu stabilisieren und die auslösenden Faktoren zu entfernen.

1.8.1 Die kausale Therapie

Die kausale Therapie hat zum Ziel, die Ursachen der Sepsis zu behandeln. Da die Hauptursache der Sepsis in einer vorausgegangenen Infektion liegt, muss diese Infektion antibiotisch und eventuell chirurgisch behandelt werden.

Das chirurgische Vorgehen beinhaltet die Entfernung von Implantaten, eine Inzision bzw. CT-gestützte Drainage von Abszessen, Wunderöffnung und Nekrektomie, Amputation und Fasziotomie sowie eine operative Behandlung von Peritonitis, Anastomoseninsuffizienz und Ileus durch eine Peritoneallavage, Drainage oder Enterostomie.

Eine kausale antibiotische Behandlung sollte so früh wie möglich, direkt nach der Abnahme von Kulturen zum Erstellen eines Antibiogrammes, erfolgen und alle 48-72 Stunden anhand von klinischen und mikrobiologischen Kriterien neu evaluiert werden. Damit wird das antimikrobielle Spektrum verengt und das Risiko von Resistenzentwicklungen sowie die Toxizität und die Kosten vermindert [51].

1.8.2 Die supportive Therapie

Die supportive Therapie beinhaltet hauptsächlich die Unterstützung der Hämodynamik und der Atmung. Damit soll einer Minderperfusion sowie schlechten Oxygenierung und darauffolgendem Organversagen vorgebeugt werden.

Zur Unterstützung der Hämodynamik erfolgt initial eine Volumenersatztherapie mit Kristalloiden oder Kolloiden, die bei Bedarf mit Dobutamin und Erythrozytenkonzentraten erweitert werden kann. Diese Therapie wird fortgeführt, wobei bei einer ausgeprägten Hypotension oder einem arteriellen Mitteldruck von < 65 mmHg ein Vasopressor zum Einsatz kommt.

Die Atmung sollte bei septischen Patienten frühzeitig unterstützt werden. Indikationen sind eine Atemfrequenz von > 30 min^{-1} , eine muskuläre Erschöpfung der Atemmuskulatur oder eine Sauerstoffsättigung von $< 90\%$ trotz Sauerstoffgabe.

1.8.3 Die adjunktive Therapie

Die adjunktive Therapie unterstützt die Standardtherapie, welche aus der kausalen und der supportiven Therapie besteht. Sie beinhaltet die Gabe von niedrigdosiertem Hydrokortison, rekombinantem aPC, Antithrombin, Selen, *Immunoglobulin* (Ig)M und IgG.

Zusätzlich sollten eine Thromboseprophylaxe, eine Ernährungstherapie, eine Insulintherapie, eine Ulkusprophylaxe, ein Nierenersatzverfahren, eine Blutproduktgabe und eine Sedation, Analgesie und neuromuskuläre Blockade bei Bedarf durchgeführt werden [51].

1.9 Funktion der Mikroarraytechnologie

Einige Tage nach dem fast schon überstandenen initialen Trauma verschlechtert sich bei manchen Polytraumapatienten der Zustand. Bei den Betroffenen versagen Organe und systemische Entzündungszeichen manifestieren sich, was bis zu einer Sepsis führen kann. Obwohl alle Patienten ähnliche Traumata erlitten haben und von Anfang an mit den besten heute verfügbaren Mitteln versorgt werden, erholen sich manche Patienten ohne Komplikationen und andere zeigen diesen komplizierten Verlauf.

Zu einem Zeitpunkt weit vor dem septischen Ereignis bestehen nur marginale phänotypische Unterschiede, mit denen in der Vergangenheit oftmals vergeblich versucht wurde, die zugehörige Pathophysiologie zu verstehen. Auch Untersuchungen zur differenziellen Regulation einzelner Gene konnten die komplexe Pathophysiologie, die hinter der posttraumatischen Entzündungsreaktion steckt, nicht erklären [52] [53].

Die 1990 begonnene Sequenzierung des kompletten humanen Genoms bietet die Grundlage für die Identifikation und die Quantifizierung aller humanen Gene [54]. Inwieweit einzelne Gene aktiv sind, spiegelt sich in dem Vorhandensein von *Messenger RNA* (mRNA) wieder, da mRNA wörtlich übersetzt ein „Bote“ ist, der eine „Nachricht“ von der „Bibliothek“ (der *Desoxyribonukleinsäure* (DNA)) zur Proteinfabrik (dem Ribosom) übermittelt. Das heißt, die mRNA ist der Bauplan, nach welchem später ein Protein synthetisiert wird.

Reagiert der Organismus auf einen Reiz, setzt er in der initialen Phase Transmitter frei und reguliert das Vorhandensein von Rezeptoren auf der Zelloberfläche. In der zweiten Phase müssen diese Transmitter und Rezeptoren neu gebildet werden. Dies geschieht dadurch, dass die zugehörige mRNA vermehrt von Ribosomen abgelesen und die dazugehörigen Proteine synthetisiert werden. Das Messen von mRNA ermöglicht somit das Erfassen bestimmter Regulationen, noch bevor sich die Spiegel an Plasma- oder Oberflächenproteinen ändern.

Um die Menge an mRNA zu messen, gibt es heutzutage zwei verschiedene Möglichkeiten. Die 1995 entwickelte Mikroarraytechnologie ermöglicht es, mehrere tausend mRNA Transkripte in einem Arbeitsgang zu erfassen [55]. Diese Expressionsmuster beinhalten eine große Anzahl an differenziellen Regulationen und tragen so zu einer Identifikation von krankheitsassoziierten Genen und potentiellen Biomarkern bei. Mittels der *Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion* (RT-PCR) können dagegen einzelne mRNA Transkripte in einem Arbeitsgang nachgewiesen werden, dadurch eignet sich die RT-PCR hervorragend für Studien, die auf einzelne Gene fokussieren.

Zusammen mit der Sequenzierung des humanen Genoms bietet die Mikroarraytechnologie die Möglichkeit, mehrere tausend mRNA Transkripte im Vollblut in einem Arbeitsgang zu erfassen und so unterschiedliche Reaktionen bereits zu einem Zeitpunkt zu untersuchen, an dem noch keine klinisch phänotypischen Unterschiede messbar sind.

Die mithilfe der Mikroarray-Technologie gewonnenen Daten müssen mit einer unabhängigen Methode validiert werden. Dies kann anhand einzelner Gene mithilfe der RT-PCR durchgeführt werden.

1.10 Stand der Forschung

Durch den Fortschritt in der Molekular- und Computertechnologie sind heute komplett neue Forschungsansätze möglich. Konnte in der Vergangenheit nur der Phänotyp untersucht werden, so kann mittlerweile auch der Genotyp, welcher den Phänotyp bedingt, betrachtet werden. Hierbei muss man zwischen Methoden unterscheiden, welche die DNA untersuchen und denen, welche die mRNA untersuchen. Die DNA enthält die Erbinformation eines jeden

Individuums und ist im Normalfall unveränderlich. Die RNA dagegen wird, in Abhängigkeit auf exo- und endogene Reize, ständig neu synthetisiert und degradiert.

Qualitative Sequenzanalysen der DNA eignen sich hervorragend, um monogenetische Krankheiten zu erfassen, da diese Krankheiten auf einer Mutation der DNA beruhen, welche zu einem qualitativ oder quantitativ veränderten Genprodukt führt. Für polygenetisch vererbte Krankheiten ist dieser Zusammenhang nicht so trivial. Diese werden von vielen genetischen Faktoren bestimmt, so dass nur ein Zusammenhang (Assoziation) zwischen einer Veränderung der DNA und einer Krankheit besteht. Dieses Merkmal spricht demnach für ein gehäuftes, aber nicht obligates Auftreten einer Krankheit. Von diesen Assoziationen sind bereits einige für eine Sepsis bekannt [34] [35], unter anderem konnten wir eine solche Assoziation für Mutationen im TNF-Gen zeigen [56].

Da die Expression der mRNA ein Zusammenspiel von Reiz und Genom ist, beeinflussen DNA-Mutationen, bekannt oder unbekannt, deren Expression. Deshalb eignet sich die mRNA hervorragend, um die Reaktion auf einen Stimulus zu messen.

Anhand der Mikroarrayanalyse wurde das Verständnis der Pathophysiologie verschiedenster Krankheiten verbessert. Für Brustkrebs [57] [58] und Lungenerkrankungen [55] konnten mit Hilfe der Mikroarraytechnologie neue Pathomechanismen entdeckt und neue Behandlungsansätze gefunden werden.

Auch das Krankheitsbild septischer Patienten wurde mithilfe der Mikroarraytechnologie schon erfasst. mRNA Expressionsprofile konnten septische und nicht septische Patienten nach dem Beginn einer Sepsis trennen [19] [59]. Im Tierversuch wurde gezeigt, dass das mRNA Expressionsprofil sich dazu eignet, infektiöse und nicht infektiöse Entitäten einer SIRS zu unterscheiden [59].

Bisher existieren wenige Studien, welche auf die Expressionsprofile präseptischer Polytraumapatienten fokussieren. Diese untersuchen einzelne Zellpopulationen wie Monozyten [60] oder neutrophile Zellen [61], was die Schwierigkeit der Zellseparation mit sich bringt.

Allerdings gibt es einige Problematiken der Mikroarraytechnologie. Es existieren verschiedene Arrayplattformen, die Unterschiede hinsichtlich Sondenwahl, Sondenlänge, Sondendichte und Oberfläche der Arrays aufweisen. Diese Unterschiede erschweren direkte Vergleiche verschiedener Plattformen. Nur nach aufwendiger bioinformatischer Analyse können Ergebnisse, die aus verschiedenen Arrayplattformen stammen, miteinander verglichen werden. Auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Mikroarrays gibt es Unterschiede in den verschiedenen Arrayplattformen [62].

Ein Maß für die Reproduzierbarkeit sind Wiederholungen von Experimenten. Hier unterscheidet man die biologische Wiederholung (biologisches Replikat) von der technischen Wiederholung (technisches Replikat) des Experiments. Beim technischen Replikat wird das gleiche Experiment (= gleiche RNA) mehrmals auf Mikroarrays untersucht, um einen technischen systematischen Fehler auszuschließen, während beim biologischen Replikat das Experiment als solches wiederholt wird, um die biologische Varianz zu erfassen. Da bei klinischen Studien eine biologische Wiederholung des „Experiments“ ausgeschlossen ist, bleibt nur die Erfassung der technischen Reproduzierbarkeit. Zu Beginn unserer Studie war nicht klar, wie viele verschiedene Patienten in eine Studie eingeschlossen werden müssen und wie viele technische Replikate notwendig sind, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Wurden in der Vergangenheit ausschließlich phänotypische Regulationen erfasst, so können heute mithilfe der Mikroarraytechnologie transkriptionelle Regulationen in den verschiedensten Geweben gemessen werden. Dies bietet den Vorteil, intrazelluläre Steuerungsmechanismen zu erfassen, die zeitlich weit vor dem septischen Event liegen, obwohl zu diesem Zeitpunkt kein klinisch phänotypischer Unterschied besteht.

1.11 Ziele dieser Arbeit

Die posttraumatische Entzündungsreaktion kann nach zwei verschiedenen Mustern ablaufen. Einerseits können die betroffenen Patienten innerhalb einiger Wochen genesen, andererseits kann dieser Genesungsprozess durch eine

Sepsis kompliziert werden, was häufig zum Tod oder anderen Folgeschäden führt.

Welche Faktoren diesen unterschiedlichen Verlauf determinieren, ist bis heute weitgehend unbekannt. Obwohl Modelle bekannt sind, welche die späten pathophysiologischen Phänomene (z.B. das Organversagen) ansatzweise erklären, existieren derzeit nur Hypothesen hinsichtlich der initial kausalen Zusammenhänge.

Durch ein besseres Verständnis der frühen Pathophysiologie besteht die potenzielle Möglichkeit, sowohl das klinische Management zu verbessern als auch effektivere pharmakologische und therapeutische Verfahren zu entwickeln.

Um diese frühe Pathophysiologie zu untersuchen, wollen wir ein robustes Verfahren für die Mikroarrayanalyse entwickeln, welches auch für andere Mikroarraystudien angewendet werden kann.

Ziele dieser Arbeit sind:

- 1) die Etablierung eines Arbeitsablaufes (*Workflow*) zur Aufarbeitung und Qualitätssicherung von Rohdaten aus Mikroarray-Experimenten
- 2) die Etablierung eines nachgeschalteten, robusten bioinformatischen Analyseverfahrens zur Interpretation der Daten

Aus dieser Analyse heraus sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 3) Gibt es 12 Stunden nach einem Polytrauma bereits signifikante transkriptionelle Unterschiede, welche einen septischen oder nicht septischen posttraumatischen Verlauf unterscheiden?
- 4) Welche Teile des Pathomechanismus einer Sepsis spielen zu diesem frühen Zeitpunkt nach einem Polytrauma bereits eine Rolle?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission am Fachbereich Humanmedizin (Aktenzeichen 79/01) wurde die Studie an Patienten der Operativen Intensivstation der Abteilung für Anästhesiologie und Operativen Intensivmedizin am Universitätsklinikum Giessen / Marburg Standort Giessen durchgeführt. Das Studienprotokoll kann dort eingesehen werden.

Es folgt eine kurze Zusammenfassung dieses Studienprotokolls.

2.1.1 Klinisches Design

2.1.1.1 Gruppeneinteilung

Die Patienten werden in zwei Gruppen eingeteilt, welche später miteinander verglichen werden.

1. Die nicht septische Gruppe: *polytraumatisierte Patienten ohne septische Komplikationen im posttraumatischen Verlauf (NS_Pat)*.
2. Die septische Gruppe: *polytraumatisierte Patienten mit septischen Komplikationen im posttraumatischen Verlauf (S_Pat)*.

Die Diagnose Sepsis wird nach der Definition der ACCP/SCCM Konsensuskonferenz gestellt [6].

2.1.1.2 Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien

Um keine Patienten zu berücksichtigen, die lediglich einer intensiven Überwachung bedürfen, werden Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt (vgl. Tabelle 5 und Tabelle 6). Zudem wird die Verteilung der Verletzungsschwere nach dem *Hannoverschen Polytrauma-Schlüssel (PTS)* sowie nach dem *Injury Severity Score (ISS)* erfasst.

Einschlusskriterien	
I.	Vorliegen einer Einverständniserklärung oder bei nicht einwilligungsfähigen Patienten Erklärung zur mentalen Verfassung des Patienten durch einen nicht an der Studie beteiligten Arzt und nachträgliche Aufklärung des Patienten und/oder des gerichtlich bestellten Betreuers.
II.	Diagnose Polytrauma: Polytrauma nach allgemein gültiger Definition PTS > 20 Punkte ISS > 15
III.	PTS-Wert => 20 und/oder ISS-Wert => 15
IV.	Alter => 18 Jahre und =< 65 Jahre
V.	Aufnahme des Patienten auf die Intensivstation =< 12 Stunden nach dem Trauma.

Tabelle 5: Einschlusskriterien

Ausschlusskriterien	
I.	Patienten mit anzunehmendem Hirntod, aber dennoch funktionierendem Kreislauf
II.	Massive ZNS-Schädigung (Patienten mit im Vordergrund stehendem operativ zu versorgendem <i>Schädel-Hirn-Trauma</i> (SHT), SHT II°-III°)
III.	Patienten, die nach dem Unfall sekundär nach Giessen verlegt werden
IV.	Reanimation nach Herzstillstand oder schwerer kardiogener Schock
V.	Schwangere Frauen und Frauen in der Stillzeit
VI.	Patienten mit Verbrennungen aller Stadien
VII.	Versterben des Patienten innerhalb der ersten 3 Tage auf der Operativen Intensivstation
VIII.	Immundefizienz: angeborene Syndrome, HIV
IX.	Chronische Infektionskrankheiten
X.	Parallel stattfindende andere akute Infektionen (Endokarditis, EBV, etc.)
XI.	Zeichen eines akuten Myokardinfarkt
XII.	Zerebrovaskuläre Insuffizienz, Z.n. Apoplex
XIII.	Endokrine Störungen, die mit erhöhten Cortisol- Spiegeln einhergehen
XIV.	Immunsupprimierte Patienten
XV.	Entzündlich rheumatische Erkrankungen z.B. Vaskulitiden
XVI.	Begleitende schwere Erkrankungen mit einer Lebenserwartung unter 4 Monaten
XVII.	Bilirubinämie > 5 mg /dl zu Beginn der Baseline- Messungen

Tabelle 6: Ausschlusskriterien

2.1.1.3 Versorgung und Behandlung der Patienten

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Versorgung der Patienten gegeben. Für weitere Informationen kann das Studienprotokoll eingesehen werden.

2.1.1.3.1 Überwachung

Die Patienten werden nach den im Protokoll genannten Maßstäben überwacht. Dazu gehört unter anderem das kontinuierliche Monitoring des arteriellen Blutdruckes, der Körpertemperatur, der Flüssigkeitsbilanz und des Herzzeitvolumens. Darüber hinaus sind alle Patienten mit einem mehrlumigen zentralen Venenkatheter sowie einer Magen- und Duodenalsonde versorgt und mindestens während der ersten Behandlungswoche kontrolliert beatmet. Routinemäßige Laboruntersuchungen erfolgen täglich und beinhalten unter anderem Elektrolyte, Gerinnung, Blutbild, Blutzucker, Leberwerte, Nierenretentionswerte, Gesamteiweiß und Blutgase. Mikrobiologische Untersuchungen erfolgen aus Bronchial- und Trachealsekret, Urinkulturen, Abstrichen bei offenen Wunden oder bei einem Verdacht auf Infektion einer Wunde, sowie aus peripheren intravasalen Kathetern und venösem Blut als Blutkultur. Diese mikrobiologischen Proben werden bei klinischem Verdacht auf eine septische Reaktion zu Beginn eines Fieberanstieges von 38,5 °C auf über 39 °C gewonnen.

2.1.1.3.2 Intensivmedizinische Behandlung

Im Rahmen der intensivmedizinischen Behandlung werden druckkontrollierte und druckkontrollierte assistierende Beatmungsverfahren angewendet. Heparin wird kontinuierlich mit 125-150 IE / h infundiert. Adrenalin und / oder Noradrenalin werden bei einem systemischen vaskulären Widerstand unter 700 $\text{dyn}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{cm}^{-5}$ und einem mittleren arteriellen Blutdruck unter 60 mmHg appliziert. Die antimikrobielle Therapie wird entsprechend der mikrobiologischen Befunde angepasst. Homologe Erythrozytenkonzentrate werden bedarfsadaptiert, ab einem Hämoglobingehalt von unter 7 g/l, gegeben.

2.1.1.3.3 Operationen

Die operative Behandlung schwerer Verletzungen (Stabilisierung von Frakturen, Versorgung abdomineller Verletzungen, Wundbehandlung) erfolgt bei allen

Patienten nach vergleichbarem chirurgischem Management, d.h. Versorgung zum frühestmöglichen Zeitpunkt, jeweils unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes.

2.1.1.3.4 Kontrolle der Organsysteme

Sämtliche Organsysteme, Herz-Kreislauf-System, Lunge und Beatmung, Niere und Elektrolyte, Leber und Pankreas, Blutbild und Blutgerinnung sowie Infektionsparameter werden während der intensivmedizinischen Behandlung und für die Dokumentation der Studie engmaschig überwacht.

2.1.1.4 Prospektive Beurteilung des septischen Zustandes eines Patienten

Zu jedem Messzeitpunkt wird der Patient klinisch auf Vorliegen von Infekt- oder Sepsiszeichen hin untersucht. Als klinisch septisch gilt der Patient, wenn folgende, zuvor festgelegte, Kriterien durch die behandelnden Ärzte am Krankenbett festgestellt werden:

Obligat:

- I. Temperaturspitzen über 39 °C in den letzten 24 Stunden.
- II. Zunahme des Volumenbedarfs, nicht erklärt durch andere Ereignisse, z.B. Operationen, mit den klinischen Zeichen der Ödembildung, Schrankenstörung und positive Flüssigkeitsbilanz.
- III. Kreislaufzentralisierung mit peripher kalten Extremitäten.
- IV. Klinische Zeichen beginnender Organfunktionsstörungen mit:
 - Verschlechterung des Gasaustausches,
 - Störung/Rückgang der Darmfunktion (Ileuszeichen, Zunahme des Magen- und Duodenalsondenrücklaufes, Abnahme/Fehlen der Peristaltik),
 - zunehmender Ikterus,
 - zunehmende Eintrübung und verminderte Ansprechbarkeit bei wachen Patienten.
- V. Insgesamt akute, nicht erklärbare Verschlechterung des Allgemeinzustandes nach klinischer Beurteilung.

Fakultativ:

- VI. Makroskopisch nachweisbare Eiter- oder suspekt eitrig aussehende Sekretion aus Wunden, eitrig aussehendes Trachealsekret.

Diese klinische Beurteilung des Zustandes des Patienten gibt die „klinische Situation“ wieder, auf der letztlich viele Entscheidungen für den Patienten beruhen. In dieses Zustandsbild fließen Parameter wie Laborbefunde, bakteriologische Befunde und die quantitative Erfassung des Permeabilitätsschadens (Messung des extravaskulären Lungenwassers) nicht ein.

Die Frage nach einer vorliegenden Sepsis wird zu jedem Messzeitpunkt unabhängig von der vorherigen Bewertung durchgeführt. Die Feststellung der klinischen Situation erfolgt von verschiedenen intensivmedizinisch erfahrenen Kollegen. Bewusst sei darauf hingewiesen, dass es sich hierbei um eine

Beurteilung handelt, in die individuelle persönliche Erfahrungen und Gefühlsmomente als nicht rational zu validierende Einflussgrößen mit eingehen.

2.1.1.5 Messzeitraum

Der Messzeitraum für die klinischen Daten umfasst mit dem Aufnahmetag auf die Operative Intensivstation [*Zeitpunkt 0 (Zp0)*] die ersten 15 Tage nach dem Trauma. Tag 1 und erster Abnahmezeitpunkt ist der Aufnahmetag, wobei die Uhrzeit der Probengewinnung für diesen Tag variabel ist (innerhalb von zwei Stunden nach Aufnahme in die Klinik). Zu diesem Zeitpunkt wurden auch die Proben für die Genexpressionsanalyse entnommen. An den Tagen 2 bis 14 wird jeweils in der Zeit von 6 Uhr bis 8 Uhr morgens das Untersuchungsmaterial entnommen, um den Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf die Messparameter weitgehend auszuschließen.

2.1.2 Auswahl der Patienten für die Mikroarrayanalyse

Die hier betrachteten 26 Patienten für die Mikroarrayanalyse werden manuell nach der *Matched Pair* Methode aus dem Gesamtkollektiv der Studie ausgewählt. Bei der *Matched Pair* Methode werden Individuen einer Untersuchungsgruppe und einer Kontrollgruppe dadurch vergleichbar gemacht, dass diese anhand übergeordneter Parameter abgeglichen werden. Dies bietet den Vorteil, dass eben diese Faktoren das Ergebnis nicht beeinflussen. In unserer Studie wurden die Parameter Alter, ethnischer Hintergrund und Geschlecht für die Auswahl berücksichtigt.

2.2 Das Mikroarray

Das Grundprinzip des Mikroarrayverfahrens ist die genaue Positionierung von Nucleotid-Fragmenten in einer hohen Dichte auf einem festen Untergrund, so dass diese Fragmente als molekulare Detektoren dienen können^[63]. Alle Mikroarrays funktionieren nach dem gleichen Prinzip: der komplementären Bindung zweier Einzelstrang Doppelhelix Strukturen^[64]. Hierbei macht man es sich zunutze, dass einzelsträngige *Ribonukleinsäure* (RNA) an eine einzelsträngige *komplementäre RNA* (cRNA) bindet. Um die in der Probe enthaltene RNA in cRNA umzuwandeln, werden mehrere Arbeitsschritte angewendet. Danach wird die cRNA fragmentiert und kann dann mit den vorher

auf der Glasoberfläche des Mikroarrays fixierten RNA Fragmenten, sofern diese zusammenpassen, binden.

Nach deren Bindung wird die neue gebundene cRNA angefärbt und das angefärbte Array gescannt. Das daraus entstandene Bild hat einzelne, unterschiedlich stark fluoreszierende Punkte. Da die Verteilung der einzelnen RNA Transkripte auf der Glasoberfläche bekannt ist, kann anhand der Lokalisation und Intensität der Punkte auf das quantitative und qualitative Vorhandensein von *Messenger RNA* (mRNA) in der ursprünglichen Probe geschlossen werden.

Wir verwenden die Plattform CodeLink UniSet Human 10k Bioarray (GE Healthcare, Freiburg, Germany), welche insgesamt ca. 10.000 Gensonden (Probesets) besitzt.

2.2.1 Die Probengewinnung

Unabhängig von einer verlässlichen Mikroarrayplattform ist die Probengewinnung in klinischen Studien ein entscheidender und kritischer Arbeitsschritt für die spätere Transkriptionsanalyse. Die Gewinnung, der Transport und die Lagerung von verschiedensten Proben von unterschiedlichen Patienten benötigt eine gute Planung und Durchführung, um die mRNA Degradierung durch eine fehlerhafte Handhabung zu minimieren. Das von uns verwendete PAXgene Blut RNA System (PreAnalytiX, Heidelberg, Germany) ist ein System, in welchem alle Schritte, von der Blutabnahme über die Stabilisierung und Reinigung bis zur Konservierung der RNA, standardisiert sind. Dies bietet den Vorteil, dass nach einem Protokoll gearbeitet wird, welches überall, wo PaxGene eingesetzt wird, identisch ist und so vergleichbare Ergebnisse gewonnen werden können. Darüber hinaus ist die Sicherheit für das medizinische Personal nach modernen Standards gewährleistet.

Die Proben werden ca. 12 Stunden nach dem Trauma bei Einlieferung in den Schockraum am Universitätsklinikum Giessen / Marburg Standort Giessen gewonnen und die mRNA wird aus Vollblut stabilisiert und extrahiert. Vollblut bietet den Vorteil, einfach verfügbar zu sein und reduziert die Gefahr der mRNA Induktion nach der Probengewinnung, wie sie bei Verfahren zur Zellseparation besteht [65] [66].

2.2.1.1 Mikroarray-Hybridisierung und Scannen

Die Quantität der RNA wird mit Nanodrop (NanoDrop Technologies, Rockland DE, USA) und die Qualität mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland) gemessen. Wenn die gesamte RNA Ausbeute $> 2 \mu\text{g}$ beträgt, der 260/280 Wellenlängenquotient $> 1,9$ ist und das Elektrophoreseprofil saubere und scharfe ribosomale Ausschläge zeigt, wird die RNA in cRNA umgeschrieben.

Dabei wird, ausgehend von der isolierten Patienten mRNA (sense), zunächst mittels Erststrangsynthese anti sense *komplementäre Desoxyribonukleinsäure* (cDNA) gebildet. Diese beiden Stränge werden getrennt, die mRNA verworfen und im Rahmen der 2. Strangsynthese sense cDNA gebildet. Diese beiden Stränge werden nun erneut aufgetrennt und anti sense cRNA wird gebildet. Die cDNA wird nun lysiert und die vorhandene cRNA kann, nachdem sie fragmentiert wurde, mit der entsprechenden auf dem Mikroarray fixierten Sonde binden. Die cRNA Fragmentierung und Hybridisierung auf dem CodeLink UniSet Human 10k Bioarray (GE Healthcare, Freiburg, Germany) ist mit dem CodeLink Expression Assay Kit (GE Healthcare, Freiburg, Germany) wie im Handbuch beschrieben durchgeführt worden. Dabei ist jede Patientenprobe auf mindestens zwei oder maximal drei Bioarray's hybridisiert worden, um technische Replikate zu erhalten.

Nach der Bindung wird die gebundene cRNA mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Cy5TM-Streptavidin (GE Healthcare, Freiburg, Germany) gefärbt und mit dem GenePix 4000B Scanner und der GenePix Pro 4.0 Software (Axon Instruments, Arlington, USA) gescannt. Die Menge an gebundenem Farbstoff und dessen Fluoreszenzsignal ist dabei direkt proportional zu der Menge an mRNA in der Patientenprobe (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7).

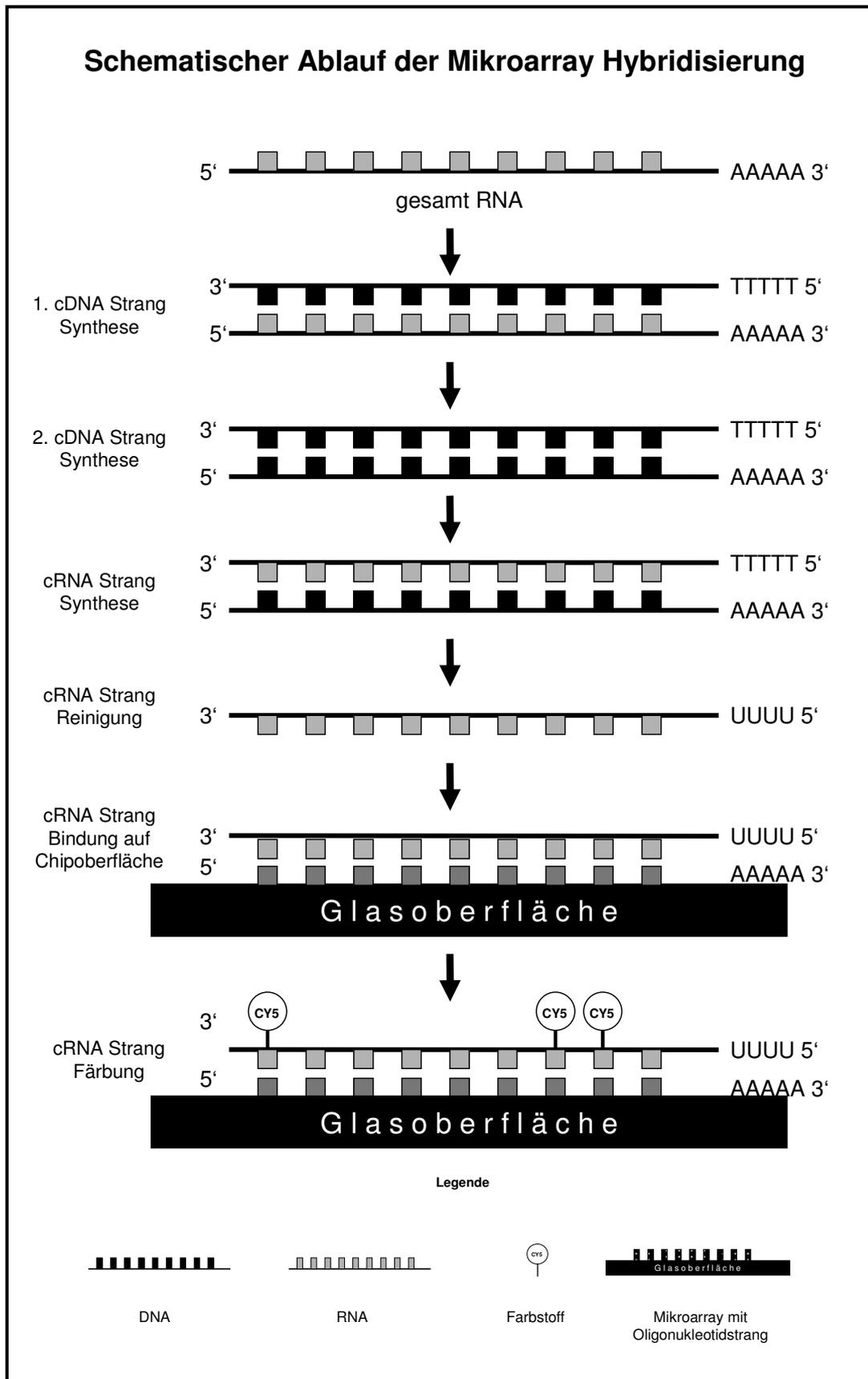


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ablaufes von der mRNA zur Hybridisierung und Färbung auf dem Mikroarray

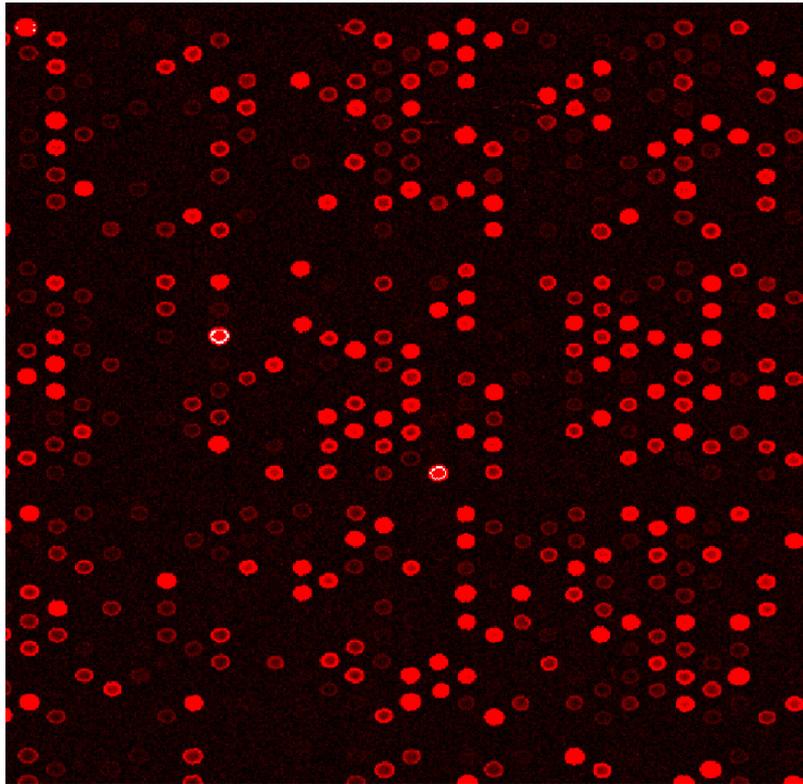


Abbildung 7: Ausschnitt aus einem Mikroarray mit Spots in der typischen Donutform

2.3 Datenaufbereitung und Qualitätssicherung

2.3.1 Datenaufbereitung

Als Resultat des Mikroarrayverfahrens erhält man ein digitales Bild (vgl. Abbildung 7). Auf diesem Bild werden die Signalstärken und die Qualität der einzelnen Spots mit der CodeLink Software Batch Submission (V2.2.27) und Expression Analysis (V2.2.25) (GE Healthcare, Freiburg, Germany) wie im Handbuch beschrieben quantifiziert. Daraufhin erhält man eine Tabelle mit Signalstärke und Qualitätsmerkmal für jeden einzelnen Spot sowie Qualitätsmerkmale für das gesamte Array. Darüber hinaus normalisiert die Software die Daten in einem ersten Schritt Intraslide, wobei alle Arrays unabhängig voneinander dadurch normalisiert werden, dass für alle Werte eines einzelnen Arrays der Quotient mit dem medianen Expressionswert dieses einzelnen Arrays gebildet wird (vgl. Abbildung 8).

CodeLink™ System							
Software - Analysis							
Version: 2.2.25							
Analysis Report Name:		Expression Report					
Image File Name:		T00252735 xxxx-xx-xx.TIF					
Analysis Date and Time:		MM/DD/YYYY hh:mm:ss PM					
GEN file name:		EXP5280X2-649.22.GEN		Product:		UNISSET HUMAN I	
Normalization Method:		Median-Normalization					
Computation Method for Median and Threshold:		Spot Based					
Threshold Trim Percentage:		20					
Raw Threshold		10.3987593					
Normalized Threshold		0.08194367					
Median		126.90131					
Sample Name Array 1		NS_xx_00_x					
Number	ACCN#	Probe Name	Type	Raw Intensity	Normalized Intensity	Above Threshold	Quality Flag
1	AA001334	AA001334 PROBE1	DISCOVERY	92.72413793	0.730679126	TRUE	GOOD
2	AA002191	AA002191 PROBE1	DISCOVERY	119.7752809	0.943845902	TRUE	GOOD
3	AA004381	AA004381 PROBE1	DISCOVERY	152.4702381	1.20148672	TRUE	GOOD
4	AA005282	AA005282 PROBE1	DISCOVERY	15.60526316	0.122971648	TRUE	EMPTY
5	AA007376	AA007376 PROBE1	DISCOVERY	130.5197368	1.028513711	TRUE	GOOD
6	AA007633	AA007633 PROBE1	DISCOVERY	1573.629412	12.40041902	TRUE	GOOD
7	AA028166	AA028166 PROBE1	DISCOVERY	29.87179487	0.235393906	TRUE	GOOD
8	AA034179	AA034179 PROBE1	DISCOVERY	8.300268097	0.065407269	FALSE	EMPTY
9	AA037140	AA037140 PROBE1	DISCOVERY	2944.707182	23.20470288	TRUE	GOOD
10	AA477175	AA041442 PROBE1	DISCOVERY	17563.25225	138.4008748	TRUE	GOOD
11	AA053722	AA053722 PROBE1	DISCOVERY	12.140625	0.095669817	TRUE	EMPTY
12	BE737594	AA081973 PROBE1	DISCOVERY	847.7866242	6.680676719	TRUE	GOOD
13	AA094105	AA094105 PROBE1	DISCOVERY	35.73619632	0.281606206	TRUE	GOOD
42	AA291606	AA291606 PROBE1	DISCOVERY	47.62931034	0.375325602	TRUE	POOR
2317	BC012375	BC012375 PROBE1	DISCOVERY			FALSE	MSR
2324	BC012831	BC012831 PROBE1	DISCOVERY			FALSE	MSR
10448	Z22780	Z22780 PROBE1	DISCOVERY	-0.471502591	-0.003715506	FALSE	NEG
:	:	:	:	:	:	:	:

Abbildung 8: Ausschnitt aus der Rohdatentabelle nach der Auswertung des gescannten Mikroarraybildes. Im oberen Bereich sind allgemeine Informationen zu dem jeweiligen Array aufgeführt. Unter anderem der Dateiname des bearbeiteten Bildes (*Image File Name*), die Normalisierungsmethode (*Normalization Method*) und die Schwellenwerte als Rohdaten (*Raw Threshold*) und als normalisierte (*Normalized Threshold*) Daten. Darüber hinaus ist der Median aufgeführt, welcher als Quotient (x / Median) die Grundlage für die Normalisierung bietet. Im unteren Bereich ist ein Ausschnitt aus der Datentabelle aufgeführt. Für jede Gensonde, die alle mit fortlaufenden Nummern (*Number*) versehen sind, ist die *Accession Number* (ACCN#), der Name (*Probe Name*) und der Typ der Gensonde (*Type*) aufgeführt. Darüber hinaus sind die Rohintensität (*Raw Intensity*), die normalisierte Intensität (*Normalized Intensity*), die Angabe, ob der Wert über dem Schwellenwert liegt (*Above Threshold*) und das Qualitätsattribut jeder einzelnen Gensonde in dieser Tabelle enthalten

Alle Daten können bei Gene Expression Omnibus heruntergeladen werden [67]. Gene Expression Omnibus ist ein Internetportal, welches Mikroarraydaten von verschiedenen Experimenten im Internet verfügbar macht. Hier können die

gescannten Bilder, die Rohdaten und die Daten, welche für die Berechnung der differentiellen Regulation in Rankprodukt verwendet werden, in einem standardisierten Format heruntergeladen werden.

2.3.1.1 Schwellenwert

Der Schwellenwert (*Threshold*) ist ein globaler Wert, der für jedes einzelne Array errechnet wird. Die Bestimmung dieses Wertes erfolgt anhand von Gensonden, welche nicht im menschlichen Genom vorkommen, wie z.B. bakterielle oder fungale Gene. Dies bedeutet, dass im Idealfall keine cRNA an diesen Gensonden binden würde. Da es aber immer in geringem Maße eine unspezifische Bindung gibt, kann mithilfe der Intensität dieser sogenannten *Negative Control Summaries* die unspezifische Bindung für jedes einzelne Mikroarray quantifiziert werden.

Mit dem so errechneten Schwellenwert ist es nun möglich abzuschätzen, ob das Fluoreszenzsignal einer einzelnen Gensonde tatsächlich Ausdruck einer spezifischen Bindung von cRNA auf dem Mikroarray ist. Dies ist besonders für geringe Intensitäten wichtig, da Werte unterhalb des Schwellenwertes als nicht spezifische Bindung angesehen werden.

Der prozentuale Anteil der Werte, die über dem Schwellenwert liegen, wird als *Present Call* (Pcall) bezeichnet. Der Pcall macht eine Aussage darüber, bei wie vielen Genen in einer Probe tatsächlich mRNA vorliegt. Da jedes Mikroarray eine Vielzahl an Genen erfasst, geht man davon aus, dass alle Proben im Durchschnitt eine ähnliche Aktivität an Genen aufweisen. Deshalb bietet der Pcall die Möglichkeit, qualitativ schlechte Mikroarrays zu identifizieren.

2.3.1.2 Die Attribute

Die CodeLink Software *Batch Submission* (V2.2.27) und *Expression Analysis* (V2.2.25) (GE Healthcare, Freiburg, Germany) erstellt aus gescannten Mikroarrays Datentabellen, in denen der zu jeder Gensonde gehörende Expressionswert steht. Da die Dichte der Oligonukleotide einer Gensonde auf dem Mikroarray ringförmig zunimmt, führt das im Idealfall dazu, dass sich eine Donutstruktur bildet (vgl. Abbildung 7). Dadurch lassen sich anhand der Symmetrie und Morphologie der einzelnen Gensonden Aussagen über deren Qualität machen und minderwertige Gensonden identifizieren. Als

Qualitätsmerkmal gibt die Software jeder einzelnen Gensonde ein Attribut (Flag) mit, welches diese qualitative Beschreibung beinhaltet. Weiterhin sind einzelne Gensonden vom Hersteller markiert und entfernt, bei denen generell qualitative Probleme bekannt sind (vgl. Tabelle 7). Wir verwenden für unsere Analyse nur Werte mit den Attributen GOOD und EMPTY. Werte mit den Attributen POOR und NEG werden gelöscht, wodurch, wie bei *Manufacturer Spot Removed* (MSR) attribuierten Feldern, Leerfelder entstehen.

Flags (Attribute)	
GOOD	Die Struktur ist symmetrisch
EMPTY	Die Intensität ist geringer als der Hintergrund
POOR	Die Struktur ist teilweise symmetrisch
MSR	Vom Hersteller entfernt
NEG	Die Struktur ist unsymmetrisch

Tabelle 7: Die Qualitätsattribute der Bildauswertung

2.3.2 Qualitätssicherung der Rohdaten

Um bei einem Mikroarrayexperiment hoch qualitative und reproduzierbare Daten zu erhalten, muss nicht nur jeder experimentelle Schritt im Labor einer Qualitätskontrolle unterliegen, sondern auch einer Qualitätssicherung, welche nach dem Arbeitsablauf im Labor angewendet wird. Die Qualitätssicherung ist fundamental, da mit ihr verhindert wird, dass qualitativ schlechte Daten in die Auswertung gelangen und sie frühzeitig Hinweise auf teilweise misslungene Experimente gibt.

Die Qualitätssicherung kann spotbasierend und arraybasierend durchgeführt werden. Spotbasierend bedeutet, dass qualitativ schlechte Gensonden identifiziert werden, z.B. anhand der Attribute. Bei der arraybasierenden Qualitätssicherung werden anhand von Unterschieden und Gemeinsamkeiten (der Korrelation) zwischen den einzelnen Arrays „schlechte“ Arrays identifiziert und von der weiteren Analyse entfernt^[68]. Sind einzelne Gensonden als schlecht durch ihre Attribute qualifiziert, können diese gelöscht und mittels statistischer Methoden imputiert werden. Müssen aber Arrays aufgrund ihrer schlechten Korrelation von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden, gibt es bisher keine Möglichkeit, den Anteil qualitativ guter Daten trotzdem in die Analyse mit aufzunehmen.

Deshalb haben wir einen Arbeitsablauf entwickelt, der versucht, einzelne Ausreißerwerte zu identifizieren, um so zu verhindern, dass komplette Arrays von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden müssen.

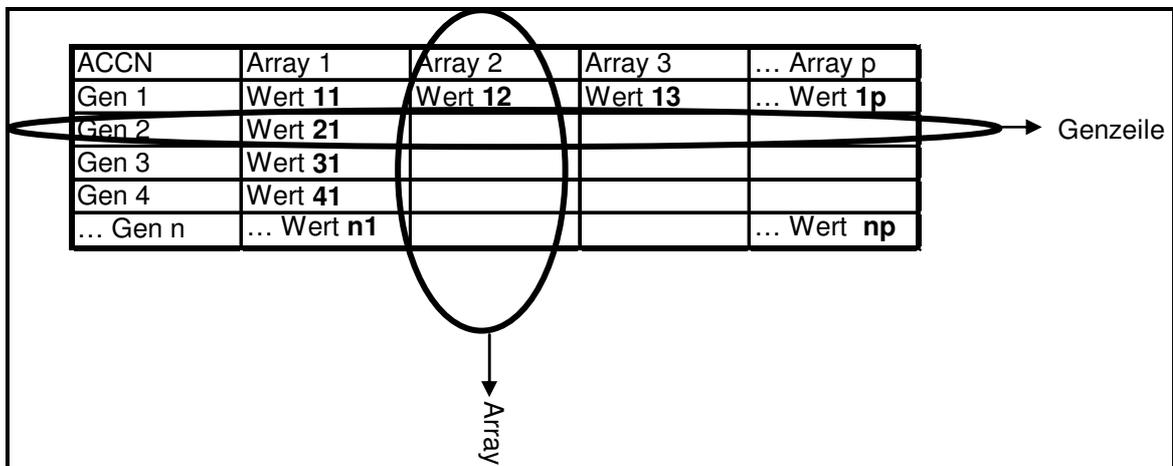


Abbildung 9: Die Mikroarraydaten wurden in eine einheitliche Struktur gebracht. Die Spalte ACCN beschreibt die einzelnen Gene, welche alphabetisch aufsteigend sortiert wurden. In den Spalten Array 1 bis Array p stehen die zu dem entsprechenden Gen zugehörigen Werte des entsprechenden Arrays

2.3.2.1 Elemente der Qualitätssicherung

Die Elemente der Qualitätssicherung bestehen aus einzelnen Modulen, welche sequenziell hintereinander ausgeführt werden (Cleantable-, Schwellenwert-, Ausreißerwerte Filter-, *Microarray Outlier Filter*- und MVA-Plot Modul) (vgl. Abbildung 10). Diese einzelnen Module werden zum Teil von Drittautoren übernommen, während andere, wie das Cleantable Modul, das Schwellenwert Modul und das Ausreißerwerte Filtermodul selbst entwickelt wurden.

2.3.2.1.1 Cleantable Modul

Cleantable ist ein von uns entwickelter Programmteil, welcher prüft, wie viele Leerfelder innerhalb einer Genzeile und einer zu vergleichenden Gruppe (hier S_Pat und NS_Pat) vorhanden sind. Liegt die Anzahl der Leerfelder innerhalb einer dieser Gruppen über 50%, wird die Genzeile gelöscht.

2.3.2.1.2 Schwellenwert Modul

Das Schwellenwert Modul wurde ebenfalls von uns entwickelt. Es vergleicht jeden vorhandenen Expressionswert eines Arrays mit dem dazugehörigen

Schwellenwert. Liegen mehr als 50% der vorhandenen Werte (ohne die Leerfelder) in allen Gruppen unterhalb des Schwellenwerts, wird davon ausgegangen, dass es sich um eine unspezifische Bindung auf dem Mikroarray handelt, und die entsprechende Genzeile wird gelöscht.

2.3.2.1.3 Imputation der Leerfelder

Das Imputieren der Leerfelder ist notwendig, da unter anderem das Ausreißerwerte Filtermodul, die Normalisierung und das *Microarray Outlier Filter* (MOFilter) Modul nur mit einer vollständigen Datentabelle angewendet werden können.

Als Routine für die Imputation von Leerfeldern wird das von Kim et al. (2004) [69] entwickelte *Sequential K Nearest Neighbor* (SKNN) verwendet. Diese Imputationsmethode baut auf dem klassischen *K Nearest Neighbor* (KNN) auf, welches zum Imputieren eines Wertes Genzeilen auswählt, welche in ihrer Expression ähnlich der des gesuchten Gens sind.

Wenn wir annehmen, dass in Genzeile A ein fehlender Wert ist, würde diese Methode insgesamt die ähnlichsten K anderen Genzeilen mit einem vorhandenen Wert finden, wobei K die Anzahl der Nachbarn angibt, welche in den gewichteten Mittelwert des fehlenden Wertes eingehen. Der gewichtete Mittelwert wird dadurch bestimmt, dass der Einfluss einer ähnlichen Genzeile durch seine Ähnlichkeit zur gesuchten Genzeile beeinflusst wird. Das heißt, ist die Genzeile sehr ähnlich der gesuchten Genzeile, hat sie einen großen Einfluss auf den späteren Wert und dementsprechend einen kleineren Einfluss, wenn sie weniger ähnlich ist [70]. Da die KNN Methode aber nur die Informationen der Genzeilen verwendet, welche vollständig vorhanden sind, fehlt es ihr an Genauigkeit. Hier hat SKNN einen klaren Vorteil.

SKNN sortiert initial die Genzeilen nach Anzahl der fehlenden Werte, dann imputiert es die erste Genzeile beginnend bei der Genzeile mit den wenigsten fehlenden Werten wie für KNN oben beschrieben. Nach der Imputation wird, anders als beim KNN, diese nun vollständige Genzeile zu den anderen vollständigen Genzeilen hinzugefügt, so dass für die weitere Imputation nun dieses größere, ständig wachsende Datenset verwendet werden kann [69].

2.3.2.1.4 Ausreißerwerte Filtermodul

Das Ausreißerwerte Filtermodul ist ein Programm, welches neu entwickelt wurde und die Aufgabe hat, einzelne Ausreißerwerte zu identifizieren. Dies gelingt dadurch, dass dieses Programm innerhalb der einzelnen Gruppen untersucht, ob die Expressionswerte eines Patienten gegenüber seinen technischen Replikaten und den Patienten in seiner Gruppe plausibel sind. Dabei macht sich dieses Modul zunutze, dass mindestens zwei technische Replikate von jedem Patienten angefertigt wurden. Liegt der Wert eines technischen Replikates nicht in einer ähnlichen Höhe wie der des dazugehörigen technischen Replikates, ist anzunehmen, dass der Wert desjenigen Replikates, welches weiter von der Gruppe entfernt ist, falsch ist.

Um diese Werte zu identifizieren, welche Ausreißer sind, berechnet das Programm die *Standardabweichung* (SD) und den *Median* (MED) einer Genzeile innerhalb einer Gruppe. Von jedem Patienten gibt es aufgrund der technischen Replikate 2 bzw. 3 Werte für das jeweilige Gen. Liegen $\geq 50\%$ der Einzelwerte eines Patienten innerhalb einer Range von $MED \pm 3SD$ der zugehörigen Gruppe, so werden diejenigen Werte, die außerhalb liegen, markiert. Liegen $> 50\%$ der Einzelwerte eines Patienten oberhalb einer Range von $MED + 3SD$ oder unterhalb von $MED - 3SD$, so werden die verbleibenden Werte markiert. Liegen alle Werte innerhalb der Range $MED \pm 3SD$, wird kein Wert markiert. Liegen alle Werte unterhalb $MED - 3SD$ oder oberhalb $MED + 3SD$, wird kein Wert markiert. Die letztendlich markierten Werte werden als Ausreißer betrachtet.

2.3.2.1.5 Quantilen Normalisierung

Das Ziel der Quantilen Normalisierung ist es, die Verteilung der Expressionswerte jedes Arrays in allen Arrays gleichzumachen.

Dies erfolgt mit dem folgenden Algorithmus:

1. Gegeben sind p Arrays mit der Länge n , welche X bilden mit der Dimension $n \times p$, in dem jedes Array eine Spalte darstellt.
2. Sortiere jede Spalte X , dies gibt X_{sort} .
3. Berechne den Mittelwert über jede Zeile von X_{sort} und jedes Element dieser Zeile bekommt diesen Mittelwert, was X'_{sort} ergibt.

4. Sortiere jede Spalte von X 'sort nach der Anordnung von X , dies ergibt X normalisiert [71].

(Für die Bezeichnung der Buchstaben n und p vgl. Abbildung 9).

2.3.2.1.6 *Microarray Outlier Filter* Modul

Da Mikroarrays, mit denen man einen Großteil des Genoms analysiert, auch viele Gene messen, welche immer in einem ähnlichen Maß exprimiert werden (z.B. *Housekeeping* Gene), geht man davon aus, dass die Expressionsdaten verschiedener Individuen zu einem hohen Prozentsatz gleich sind. Folglich stechen bei einem Vergleich aller Arrays diejenigen Arrays hervor, welche sich durch ihre (schlechte) Qualität unterscheiden.

Das *Microarray Outlier Filter* (MOFilter) Modul berechnet drei verschiedene Eigenschaften für eine Datentabelle:

1. Den prozentualen Anteil an Ausreißerwerten für jedes einzelne Array gegenüber dem gesamten Kollektiv.
2. Die Korrelation für jedes einzelne Array gegenüber dem gesamten Kollektiv.
3. Eine Korrelationsmatrize, in der die Korrelation jedes gegen jedes Array aufgeführt ist.

Liegen bei einem Array technische Probleme vor, zeigt sich das mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in einer großen Anzahl an Ausreißerwerten sowie einer geringen Korrelation des einzelnen Arrays zur Population sowie zu seinen technischen Replikaten [68].

Die Korrelationsmatrize, welche die Korrelation jedes gegen jedes Array beschreibt, wird in einer *Heatmap* visualisiert. Hierbei wird ausgehend vom niedrigsten bis zum höchsten Wert in der Matrize ein Farbverlauf erstellt und jeder Wert in der Matrize bekommt ein Quadrat zugewiesen, in das er einem Farbverlauf entsprechend geplottet wird. Anhand der Farbabweichungen lässt sich dann einfach erkennen, welche Arrays nicht mit dem restlichen Kollektiv korrelieren.

2.3.2.1.7 *Mean Versus Average Plot* Modul

Eine weitere Möglichkeit, die Unterschiede des Bindungsverhaltens eines einzelnen Arrays gegenüber dem Kollektiv graphisch darzustellen, bietet das *Mean Versus Average Plot* (MVA-PLOT) Modul.

Im normalisierten Datenset wird für jede Genzeile der Mittelwert berechnet sowie die einzelnen Genzeilen nach aufsteigenden Mittelwerten sortiert und entsprechende Ränge zugewiesen. Danach wird jeder Einzelwert eines Arrays gegenüber dem des Mittelwerts der zugehörigen Genzeile in einem Koordinatensystem geplottet. Dabei spiegelt die X-Achse den Rang des Mittelwertes einer Genzeile und die Y-Achse die Differenz, Expressionswert eines Arrays minus Mittelwert der Genzeile, wieder.

Im Falle einer natürlichen zufälligen Verteilung ist anzunehmen, dass die Abweichungen gleichmäßig um $y = 0$ oszillieren. Existiert aber ein technisches Problem, so verändert sich die geplottete Figur hin zu einer Bananen- oder Trompetenform, wenn in bestimmten Bereichen, z. B. hohe Expressionswerte, die cRNA besser bindet.

2.3.2.2 Ablauf der Qualitätssicherung

Für die Qualitätssicherung werden die einzelnen Elemente seriell hintereinander ausgeführt. Zuerst werden aus den medianzentrierten normalisierten Rohdaten mit dem Cleantable- und Schwellenwert Modul die entsprechenden Genzeilen entfernt, dies ergibt DatenSET A. Dann werden mit der SKNN Routine die Leerfelder berechnet und in dieser vollständigen Tabelle mit dem Ausreißerwerte Filtermodul einzelne Ausreißer identifiziert und markiert. Die markierten Felder werden dann in DatenSET A gelöscht und mit diesem neuen Datenset wird die SKNN Routine erneut ausgeführt, was den Vorteil hat, dass SKNN nun ohne die störenden Ausreißer die alten und neuen Leerfelder berechnet. Dieses DatenSET wird dann mit der Quantilen Normalisierung normalisiert und die Qualität der Daten wird mit dem MOFilter- und dem MVA-Plot Modul überprüft. Zeigen die Arrays Qualitätsmängel, werden diese aus den Rohdaten entfernt und der ganze Arbeitsablauf wird ohne diese identifizierten Arrays wiederholt (vgl. Abbildung 10).

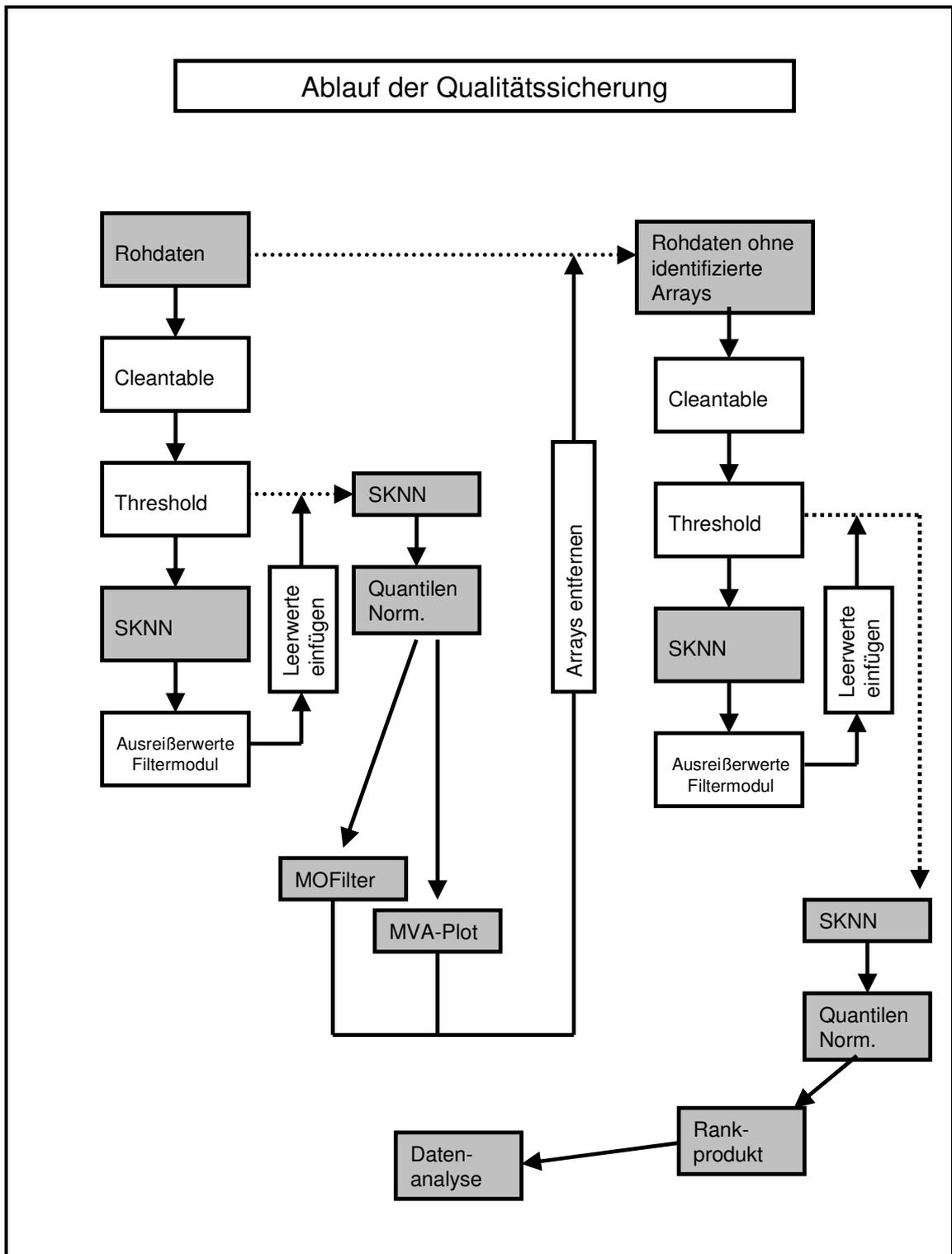


Abbildung 10: Arbeitsablauf der Qualitätssicherung, weiß hinterlegte Schritte wurden neu entwickelt, während grau hinterlegte Schritte von anderen Autoren übernommen wurden

2.3.2.3 Technische Umsetzung der Qualitätssicherung

Um den Ablauf und die Anwendung der Qualitätssicherung zu vereinfachen, wurde, nachdem das Cleantable Modul, Schwellenwert Modul und Ausreißerwerte Filtermodul in einem Tabellenkalkulationsprogramm entwickelt und getestet wurde, das Ganze in Visual Basic programmiert.

Dieses Programm bietet eine einfach zu bedienende GUI-Oberfläche, welche alle von uns entwickelten Module (Cleantable-, Schwellenwert- und Ausreißerwerte Filtermodul) automatisch ausführt.

Die in den Arbeitsablauf eingefügten, aus dritter Hand übernommenen Routinen SKNN, MVA-Plot Modul und die Quantilen Normalisierung sind für R als *Open Source Software* erhältlich (R erhältlich unter <http://www.r-project.org/>). Das MOFilter Modul wurde uns vom Entwickler freundlicherweise als R Skript zur Verfügung gestellt [68]. Das Erstellen der *Heatmaps* ist zwar generell mit MOFilter möglich, da AVADIS (Strand Genomics Pvt Ltd. 2003) aber graphische Vorteile bietet, wurde dieses für die Visualisierung der Korrelationsmatrizen verwendet.

The screenshot shows a graphical user interface for a data cleaning and outlier detection tool. It is titled 'Clean table' and has a version number 'Ver. 1.0.1' in the top right corner. The interface is organized into three main sections:

- Clean table:** This section allows users to specify the percentage of missing genes to be removed (set to 50%). It includes fields for the input file name ('Z:\Documents\Input.txt'), the output file name ('Z:\Documents\Input_clean.txt'), and the file for rejected genes ('Z:\Documents\Input_clean_false.txt').
- Threshold:** This section is used for setting a threshold for outlier detection. It includes fields for the input file name ('Z:\Documents\Input_clean.txt'), the threshold file ('Z:\Documents\Thresholds.txt'), the threshold value (50%), the path for the threshold run ('Z:\Documents\Input_clean_T50.txt'), and the file for rejected genes ('Z:\Documents\Input_clean_T50_false.txt'). There is also a 'Thresholds laden' button.
- 1. Ausreißer entfernen mit Betrachtung der einzelnen Gruppen:** This section is for outlier removal. It includes fields for the upper and lower median factors (both set to 5), the upper and lower standard deviation factors (both set to 3), and a checked box for 'Replikate benutzen'. There are also buttons for 'Median' and 'Standardabweichung'. It includes fields for the input file before SKNN ('Z:\Documents\Input_clean_T50.txt'), the input file after SKNN ('Z:\Documents\Input_clean_T50_sknnOUT_a.txt'), and the output file name ('Z:\Documents\Input_clean_T50_sknnOUT_a_3sdRAW.txt').

At the bottom right of the interface, there are two buttons: 'Beenden' (End) and 'Auswertung' (Evaluation).

Abbildung 11: Graphische Oberfläche der von uns entwickelten Qualitätssicherungsmodule

2.4 Validierung mittels RT-PCR

Unabhängig davon wurden die Mikroarraydaten mithilfe quantitativer RT-PCR anhand ausgewählter Gene validiert. Die RT-PCR wurde auf dem ABI PRISM® 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) ausgeführt. Die genaue technische Durchführung ist im Appendix beschrieben. (vgl. Appendix Kapitel 4).

Für jeden Patienten wurde eine eigene RT-PCR durchgeführt. Die gegen das *Housekeeping* Gen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase normalisierten Daten wurden logarithmiert (Basis = 2) und der Mittelwert der S_Pat und NS_Pat gebildet. Daraufhin wurde der *Fold Change* (FC) als Differenz des Mittelwertes NS_Pat und S_Pat berechnet. Der logarithmierte FC (RT-PCR) wurde gegen den logarithmierten FC (Mikroarray) geplottet und die Korrelation berechnet.

2.5 Analyseprogramme

Da Mikroarrays eine große Menge an Daten generieren, können diese nicht von Hand ausgewertet werden. Folglich wurden Programme entwickelt, welche diejenigen Gene identifizieren, welche differenziell zwischen zwei Gruppen reguliert sind.

2.5.1 Identifikation differenziell exprimierter Gene

Die Rankprodukt Routine ist ein Programm, das dazu entwickelt wurde, Unterschiede zwischen zwei Experimenten aufzuzeigen.

Als Ergebnis liefert es einen *Fold Change* (FC) und eine *False Discovery Rate* (FDR). Der FC gibt darüber Auskunft, um ein Wievielfaches der Expressionswert eines Genes von dem Expressionswert der Referenzgruppe abweicht und wird berechnet als der Quotient des Mittelwertes der Untersuchten (hier S_Pat) und der Kontrollgruppe (hier NS_Pat). Der FDR quantifiziert die zugehörige Fehlerwahrscheinlichkeit, so dass eine Aussage getroffen werden kann, wie wahrscheinlich eine Regulation ist, ergo dass sie tatsächlich stattfindet. Wir verwenden Rankprodukt mit 2000 Permutationen, das Signifikanzlevel setzen wir mit $FDR \leq 0,05$ und $FC \geq 1,5$ fest. Einen genauen Überblick über die mathematische Grundlage bietet die Veröffentlichung von Breitling et al. (2004) [72].

2.5.2 Annotierung der signifikant regulierten Gene

Alle signifikanten Gene wurden in einem ersten Schritt mithilfe des frei verfügbaren Programms *SOURCE* von der Universität Stanford, USA annotiert [73].

Das bedeutet, dass bekannte Eigenschaften für jedes Gen aus verschiedenen Datenbanken abgerufen wurden. Dabei umfasst *SOURCE* unter anderem die Datenbanken UniGene, Swiss-Prot, GeneMap99, RHDdb und Entrez Gene.

Weiterhin wurde aber auch noch manuell nach Publikationen gesucht, so dass die Informationen, die *SOURCE* liefert, mit einer internetweiten Suche kombiniert und erweitert wurden.

2.5.3 Literatursuche

Die internetweite Suche stellt in der Hinsicht ein Problem dar, dass sie eine Fülle von Informationen über Beziehungen zwischen den verschiedensten Molekülen bereithält, die manuell nicht ausgewertet werden können. Wenn man diese Informationen mit konventionellen Datenbanken wie *Pubmed* durchsucht, kann man nur ein *Abstract* auf einmal begutachten und muss nach den relevanten Daten im Text suchen.

Alibaba ist ein interaktives Programm für die graphische Darstellung von Suchergebnissen. Es durchsucht alle *Abstracts*, die eine *PubMed* Suche ergibt und präsentiert extrahierte Informationen in Form eines graphischen Netzwerkes. Mit dieser Information ist Alibaba in der Lage, Assoziationen zwischen den verschiedensten Elementen, wie z. B. Zellen, Proteinen, Medikamenten, Geweben und Spezies, zu erstellen und so komplexe Netzwerke, welche durch die verschiedensten *PubMed* Artikel beschrieben sind, auf einen Blick zu erfassen. Darüber hinaus bietet es die Möglichkeit, gezielt nach spezifischen Elementen im Netzwerk zu suchen und sich alle Interaktionen dieses Elementes anzeigen zu lassen [74].

2.5.4 Pathwayanalysen

Pathwayanalysen dienen dazu, Stoffwechselwege aufzuzeigen, welche von den signifikant regulierten Genen beeinflusst werden. Dazu werden die signifikant regulierten Gene einzelnen *Pathways* zugeordnet, um so diejenigen zu finden,

welche die meisten regulierten Gene abbilden. Wir verwenden hierfür das Programm *Pathwayexplorer* der TU Graz, welches die *Pathwaydatenbanken Biocarta, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* und *GenMAPP* durchsucht [75].

2.5.5 Visualisierung von Signalkaskaden

Für die Visualisierung von Signalkaskaden nutzen wir die kommerzielle Software *Ingenuity* (Ingenuity® Systems Inc. Redwood City, USA (www.ingenuity.com)). Als Grundlage für diese Software dient eine Datenbank, welche auf dem aktuellen Kenntnisstand der wissenschaftlichen Literatur basiert. Aus dieser werden Netzwerke anhand dieser bekannten Interaktionen gebildet, die zur besseren Übersicht maximal 35 Faktoren beinhalten. Diese Netzwerke stellen die biologischen Verbindungen zwischen einzelnen Faktoren anhand einer zweidimensionalen Grafik visuell dar. Somit kann gezeigt werden, welche Faktoren im Mittelpunkt für ein entsprechendes Expressionsmuster stehen und welche Signalkaskaden wichtig sind.

2.5.6 Annotierung überrepräsentierter Kategorien

Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) ist ein freies Projekt des *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. Ziel dieses Programms ist es, Prozesse zu entdecken, die signifikant in ihrer Regulation verändert sind. Dazu benutzt DAVID verschiedene Datenbanken, wie z.B. die von uns für diese Analyse gewählten Datenbanken *Gene Ontologie (GO) Terms, Biocarta-* und *KEGG-Pathways*.

KEGG- und *Biocarta-Pathways* sind Karten, welche die Funktionen einzelner Gene in einem funktionellen Signalweg darstellen.

GO-Terms sind Wörter, die von dem *GO-Konsortium* jedem einzelnen Gen zugewiesen werden. Sie sind als eine Sprache zu verstehen, welche die Funktionen aller Gene und Proteine in allen Organismen beschreibt.

Die *GO-Terms* sind hierarchisch gegliedert, wobei im Unterschied zu einer echten Hierarchie ein *Child Term* mehrere *Parent Terms* haben kann. Die Struktur von *GO* startet mit drei Hauptkategorien: *Biologischer Prozess, Molekulare Funktion* und *Zelluläre Komponente* [76].

- **Der Biologische Prozess** beschreibt die biologische Aktivität, die durch ein Molekül ausgeführt wird, wie z. B. Zellteilung oder Immunantwort.
- **Die Molekulare Funktion** beschreibt die Aufgaben, die verschiedene Genprodukte ausführen, so z. B. Transkriptionsfaktor oder Angiotensin II Bindung.
- **Die Zelluläre Komponente** beschreibt subzelluläre Strukturen und Orte, wie z.B. Kern oder Mitochondrium.

DAVID untersucht anfänglich alle Gene auf ihre unterschiedlichen Zugehörigkeiten. Im Vergleich der Liste aller Gene und der Gene, die von Rankprodukt als signifikant erkannt wurden, kann DAVID berechnen, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Regulation in einer bestimmten Kategorie stattgefunden hat. Dieser Wahrscheinlichkeit liegt folgende Annahme zugrunde:

- I. X sei eine Kategorie
- II. $X(S)$ sei die Anzahl der Gene, die in Kategorie X sind und signifikant reguliert sind
- III. $X(B)$ sei die Anzahl der Gene der Kategorie X, die signifikant und nicht-signifikant reguliert sind
- IV. Die Wahrscheinlichkeit P, dass innerhalb einer Kategorie eine Regulation stattgefunden hat, ist proportional zu $X(S) / X(B)$. [$P \sim X(S) / X(B)$].

Das bedeutet, je größer dieser Wert ist, desto wahrscheinlicher hat eine Regulation in dieser Genkategorie stattgefunden.

Diese Wahrscheinlichkeiten errechnet DAVID als p-Wert, wobei gilt, je kleiner dieser p-Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Kategorie tatsächlich einer Regulation unterliegt [77].

Wir verwenden ein Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ und einem *Thresholdcount* ≥ 6 . Da unsere Fragestellung sich auf biologische Prozesse bezieht, haben wir die Überrepräsentierung der GO Kategorie *Biological Process All* und der *Biocarta*- und *KEGG-Pathways* analysiert. Die identifizierten Kategorien werden daraufhin genauer untersucht. Das heißt, dass sowohl die den Kategorien zugeordneten Gene als auch alle signifikant regulierten Gene auf die überrepräsentierten Funktionen hin untersucht werden.

2.5.7 Differential Expression Effector Prediction

Differential Expression Effector Prediction (DEEP) ist eine Software, welche Genexpressionsdaten mit biologischen Daten aus molekularen Interaktionsnetzwerken kombiniert. Als Quelle für diese Interaktionen nutzt DEEP die *Transpath*® Datenbank (Biobase GmbH, Wolfenbüttel).

Dieses Kombinieren von Genexpressions- und Interaktionsdaten ermöglicht es zusätzliche, nicht notwendigerweise differenziell regulierte Gene oder Genprodukte zu identifizieren, welche in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen eine Rolle spielen könnten. Dabei wird, ausgehend von der Wahrscheinlichkeit der vermehrten oder verminderten Expression, mithilfe der bekannten Interaktionen die Wahrscheinlichkeit der unterschiedlichen Aktivität für zusätzliche Moleküle berechnet.

Dies funktioniert nach folgender Rationale:

Gene, die signifikant reguliert sind, fungieren zusammen mit ihrem FDR als Startpunkt. Aus diesen Genen wird ein Netzwerk konstruiert, welches Signalkomponenten als Punkte und Interaktionen zwischen diesen Komponenten als Linien darstellt. Ausgehend von den Genen, die als Startpunkt fungieren, wird für die neuen Punkte die Wahrscheinlichkeit einer differenziellen Aktivität berechnet, wobei alle neu gefundenen Punkte die Signifikanzwerte aller ihrer Startpunkte beinhalten. Die Signifikanzwerte werden als S angegeben, wobei $-1 \leq S \leq 1$ gilt. Dieses Netzwerk wird nun visualisiert, wobei für jeden Punkt die Wahrscheinlichkeit seiner differenziellen Aktivität mithilfe einer Farbskala [Rot vermehrte Aktivität in S_Pat ($S = -1$), Gelb nicht differenziell aktiviert ($S = 0$) und Grün vermehrte Aktivität in NS_Pat ($S = 1$)] dargestellt wird [78]. Daraus ergibt sich, dass bezogen auf den Vergleich der NS_Pat mit den S_Pat , rot für vermehrt aktivierte Moleküle in S_Pat steht und relativ dazu grün für eine verminderte Aktivität.

2.5.8 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse dient dazu, in ihrer Expression gleichartige Arrays zu finden. Dabei wird, ohne die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Arrays zu kennen, ein Zugehörigkeitsstammbaum gebildet. Deshalb wird dies auch als eine

unsupervised Analyse bezeichnet. Hierbei werden die Gene und Arrays so angeordnet, dass ähnliche Veränderungen nebeneinander stehen.

Als Clustering Algorithmus wurde der Standardalgorithmus von D-Chip in der Version 2006 (Build date: Feb. 16. 2006) mit den Standardeinstellungen verwendet [⁷⁹].

Für das Clustern von Genen ist die Distanz zweier Gene als $1-r$ definiert, wobei r der Pearson Korrelationskoeffizient zwischen den standardisierten Expressionswerten (Mittelwert = 0 und Standardabweichung = 1) zweier Gene über alle Proben, die verwendet werden, ist. Zwei Gene mit der kleinsten Entfernung werden als erstes in ein Super-Gen zusammengefasst und durch Arme verbunden, die ihre Entfernung repräsentieren. Diese werden dann von der folgenden Analyse ausgeschlossen. Die Expressionswerte des neu geformten Super-Gens sind der Mittelwert der standardisierten Expressionswerte der beiden Gene (Centroid-Linkage) über alle Proben. Dann wird das nächste Gen-Paar (Super-Gen) mit der geringsten Entfernung gewählt und zusammengefasst und dieser Prozess wird $n-1$ mal wiederholt, um alle n Gene zusammenzufassen. Eine ähnliche Methode verwenden wir, um unsere Arrays zu clustern.

Zur besseren visuellen Darstellung wird das Ergebnis in einem Clusterdendrogramm zusammengefasst, in welchem ähnliche Arrays und Gene nah beisammen sind und deren Nähe über einen Stammbaum visualisiert wird.

Weiterhin enthält das Clusterdendrogramm eine Farbskala, die von Rot [+3] über Schwarz [0] bis Grün [-3] geht. Diese Farbwerte geben das Verhältnis der Expression eines Gens zum Mittelwert der Expression der entsprechenden Genzeile an. Dies bedeutet, dass ein als rot dargestelltes Gen vermehrt in dem korrespondierenden Patienten exprimiert ist, als im Mittelwert aller Patienten und ein grün dargestelltes Gen dementsprechend vermindert. Da die Expressionslevel für jedes Gen standardisiert sind (Mittelwert = 0 und Standardabweichung = 1), fallen die Expressionswerte meist in den Bereich von -3 bis +3.

3 Ergebnisse

3.1 Eingeschlossene Patienten

Insgesamt wurden 85 Patienten im Zeitraum von 2002 bis 2006 in die Studie eingeschlossen. Im posttraumatischen Verlauf waren 26 Patienten mit einer Sepsis konfrontiert, 59 Patienten hatten keine septische Komplikation.

Für die Mikroarrayanalyse werden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt, welche sich initial klinisch nicht unterscheiden. Dafür werden 13 im Verlauf septische (S_Pat) und 13 im Verlauf nicht septische (NS_Pat) polytraumatisierte Patienten mithilfe der *Matched Pair* Methode aus dem Studienkollektiv in die Mikroarrayanalyse aufgenommen (vgl. Tabelle 8).

Paar	Patient ID	Alter	Geschlecht	Ethnischer Hintergrund	Patient ID	Alter	Geschlecht	Ethnischer Hintergrund
01	N_01	26	M	Kaukasier	S_06	19	M	Kaukasier
02	N_02	38	M	Kaukasier	S_07	19	M	Kaukasier
03	N_03	48	F	Kaukasier	S_05	27	F	Kaukasier
04	N_04	38	M	Kaukasier	S_10	20	M	Kaukasier
05	N_05	51	M	Kaukasier	S_04	50	M	Kaukasier
06	N_06	18	M	Kaukasier	S_08	19	M	Kaukasier
07	N_07	47	M	Kaukasier	S_01	38	M	Kaukasier
08	N_08	54	F	Kaukasier	S_09	63	F	Kaukasier
09	N_09	50	M	Kaukasier	S_02	50	M	Kaukasier
10	N_10	58	M	Kaukasier	S_12	73	M	Kaukasier
11	N_11	43	M	Kaukasier	S_11	27	M	Kaukasier
12	N_12	58	M	Kaukasier	S_03	76	M	Kaukasier
13	N_13	54	M	Kaukasier	S_13	68	M	Kaukasier

Tabelle 8: Paare der in die Mikroarrayanalyse eingeschlossenen Patienten im direkten Vergleich. (Legende: die Patienten ID S_xx entsprechen im Verlauf septischen Patienten, die Patienten ID N_xx entsprechen im Verlauf nicht septischen Patienten)

3.1.1 Klinik zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation

Zum Zeitpunkt der Aufnahme der Patienten auf die Intensivstation wird die Schwere des Polytraumas anhand des ISS Scores evaluiert. Dieser zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den S_Pat und NS_Pat.

Des Weiteren wird der *Multiple Organ Dysfunction Score* (MODS) und *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation-II* (APACHE-II) Score erhoben, mit denen der aktuelle Status der Organfunktionen bewertet wird. Lediglich der APACHE-II Score weist einen signifikanten Unterschied ($p = 0,019$) auf. Der Score beträgt bei den S_Pat im MED: 13 +/- SD: 3,44 Punkte und bei den NS_Pat im MED: 10,2 +/- SD: 6,2 Punkte (vgl. Tabelle 9).

Neben den klinischen Scores werden auch mehrere Laborwerte erfasst. Diese umfassen Parameter, die heute standardisiert auf Intensivstationen erhoben werden. Hier unterscheiden sich lediglich die Atemfrequenz und die Anzahl der Thrombozyten zum Zeitpunkt der Aufnahme signifikant.

Die Atemfrequenz ist signifikant ($p = 0,015$) niedriger bei den S_Pat (MED: 12,9 +/- SD: 1,29 Atemzüge pro Minute) im Vergleich zu den NS_Pat (MED: 15,9 +/- SD: 3,23 Atemzügen pro Minute). Die Anzahl der Thrombozyten ist bei den S_Pat (MED: 102,5 +/- SD: 54,5 Thrombozyten / mm^3) in Gegenüberstellung zu den NS_Pat (MED: 156,4 +/- SD: 61,2 Thrombozyten / mm^3) signifikant ($p=0,026$) niedriger.

Alle anderen Parameter wie der Base Exzess, das Laktat, der Blut PH, der Blutzuckerspiegel, die Leukozyten, das CRP, die Körpertemperatur, die Herzfrequenz und der arterielle Mitteldruck unterscheiden sich nicht signifikant zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation (vgl. Tabelle 10).

Dies veranschaulicht, dass die in die Mikroarrayanalyse eingeschlossenen Patienten nur einen marginalen klinischen Unterschied bei Aufnahme auf die Intensivstation, also ca. 12 Stunden nach dem Polytrauma, aufweisen.

3.1.2 Klinik zum Zeitpunkt der Sepsis

Zum Zeitpunkt der Sepsis sind der APACHE-II Score ($p=0,001$) (S_Pat: MED: 12,15 +/- SD: 4,93) (NS_Pat: MED: 5,92 +/- SD: 2,02) sowie der MODS Score ($p=0,019$) (S_Pat: MED: 4,54 +/- SD: 2,82) (NS_Pat: MED: 2,00 +/- SD: 1,38) signifikant höher (vgl. Tabelle 9).

Darüber hinaus deuten Laborparameter auf ein tatsächliches septisches Geschehen hin. Die Leukozyten sind in S_Pat mit (MED: 16,87 +/- SD: 5,83) im Vergleich zu den NS_Pat (MED: 8,00 +/- SD: 1,93) signifikant ($p=0,001$) erhöht. Das CRP ist ebenfalls in S_Pat (MED: 138,28 +/- SD: 57,78), im Vergleich zu

den NS_Pat (MED: 75,38 +/- SD: 56,78), signifikant ($p=0,031$) erhöht (vgl. Tabelle 10).

Alle anderen erfassten Parameter wie der Base Exzess, das Laktat, der Blut PH, die Thrombozytenzahl, der Blutzuckerspiegel, die Körpertemperatur, die Herzfrequenz und der arterielle Mitteldruck unterscheiden sich nicht zum Zeitpunkt der Sepsis (vgl. Tabelle 10).

Dass sich einige sepsistypische Laborparameter zum Zeitpunkt der Sepsis nicht unterscheiden, ist unter anderem dadurch bedingt, dass auf der Intensivstation vor einem Entgleisen vieler Parameter therapeutisch interveniert wird. Der Base Exzess und der Blut PH werden über die Beatmung und die Gabe von Puffern korrigiert, der Blutzuckerspiegel wird über Insulin- und Glukoseinfusionen eingestellt, die Thrombozytenzahl über die Gabe von Thrombozytenkonzentraten, die Körpertemperatur über Wärmezufuhr oder Medikamente sowie der arterielle Druck und die Herzfrequenz über eine Volumen- oder medikamentöse Therapie reguliert.

Zum Zeitpunkt der Sepsis herrscht ein Unterschied, der darauf hinweist, dass die als S_Pat eingeschlossenen Patienten tatsächlich mit einem schwereren posttraumatischen Krankheitsverlauf konfrontiert sind, obwohl sie sich klinisch nicht von den NS_Pat zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation unterscheiden.

	S_Pat		NS_Pat		Signifikanz $p \leq 0,05$
	Median N = 13	SD (min - max)	Median N = 13	SD (min - max)	
ISS / Zp0	25.77	6.95 (17 - 34)	21.17	5.81 (17 - 34)	NS
APACHE II / Zp0	13.00	3.44 (8 - 18)	10.17	6.16 (4 - 28)	0.019
APACHE II / ZpSepsis	12.15	4.93 (6 - 21)	5.92	2.02 (2 - 9)	0.001
MODS / Zp0	3.23	1.92 (0 - 6)	2.00	1.86 (0 - 6)	NS
MODS / Zpsepsis	4.54	2.82 (0 - 9)	2.08	1.38 (0 - 5)	0.019

Tabelle 9: Charakteristika der klinischen Scores bei Aufnahme auf die Intensivstation (Zp0) und zum Zeitpunkt der Sepsis (ZpSepsis). (Legende: SD indiziert Standardabweichung, NS indiziert nicht signifikant)

	Einheit	Median N = 13	S_Pat SD (min - max)	Median N = 13	NS_Pat SD (min - max)	Signifikanz $p \leq 0.05$
Atemfrequenz / Zp0	x / min	12.86	1.29 (11.8 - 15.6)	15.92	3.23 (11.9 - 20.4)	0.015
Atemfrequenz / ZpSepsis	x / min	16.65	5.89 (7.2 - 32)	15.07	5.63 (8 - 25.05)	NS
Basenabweichung (BE) / Zp0	mmol / L	0.50	3.67 (-5.2 - 7.2)	1.00	2.08 (-2.1 - 3.45)	NS
Basenabweichung (BE) / ZpSepsis	mmol / L	4.18	4.53 (-3.6 - 13)	5.08	3.04 (1.2 - 10.1)	NS
Laktat / Zp0	g / dL	4.09	3.48 (0.8 - 14.4)	2.15	1.07 (0.8 - 3.6)	NS
Laktat / ZpSepsis	g / dL	1.30	0.72 (0.55 - 3.1)	0.90	0.38 (0.2 - 1.3)	NS
pH / Zp0		7.43	0.09 (7.26 - 7.59)	7.44	0.06 (7.34 - 7.54)	NS
pH / ZpSepsis		7.47	0.05 (7.38 - 7.53)	7.47	0.03 (7.43 - 7.49)	NS
Glukose / Zp0	mg / dL	140.15	27.70 (94 - 167)	136.58	22.54 (111 - 188)	NS
Glukose / ZpSepsis	mg / dL	141.12	27.23 (100 - 191)	134.55	21.31 (103 - 171)	NS
Leukozyten / Zp0	x / nL	9.73	3.21 (4.9 - 15.16)	9.18	4.08 (3.59 - 18)	NS
Leukozyten / ZpSepsis	x / nL	16.87	5.83 (9.3 - 25.9)	8.00	1.93 (5.2 - 11.75)	0.001
Thrombozyten / Zp0	x / nL	102.46	54.52 (22 - 251)	156.35	61.19 (87 - 273)	0.026
Thrombozyten / ZpSepsis	x / nL	144.62	108.06 (57 - 428)	201.56	139.79 (85 - 460)	NS
CRP / Zp0	g / dL	67.74	53.30 (6.6 - 180.8)	61.06	87.61 (0 - 228.5)	NS
CRP / ZpSepsis	g / dL	138.28	57.78 (49 - 230)	75.38	56.87 (9 - 147.9)	0.031
Körpertemperatur / Zp0	°C	35.80	1.22 (34.05 - 38.25)	35.74	1.51 (33.5 - 38.1)	NS
Körpertemperatur / ZpSepsis	°C	37.52	1.17 (35.25 - 39.1)	36.75	1.32 (33.85 - 38.4)	NS
Herzfrequenz / Zp0	x / min	93.73	22.38 (58 - 136)	86.35	9.40 (72.5 - 110)	NS
Herzfrequenz / ZpSepsis	x / min	95.15	15.79 (64 - 126)	89.00	20.72 (63 - 122)	NS
Arterieller Mitteldruck / Zp0	mmHG	86.65	16.86 (67.5 - 120.5)	92.95	14.01 (76.5 - 123)	NS
Arterieller Mitteldruck / ZpSepsis	mmHG	84.15	15.71 (64 - 111)	89.13	11.63 (76 - 108)	NS

Tabelle 10: Klinische Charakteristika der Patienten bei Aufnahme auf die Intensivstation (Zp0) und zum Zeitpunkt der Sepsis (ZpSepsis). (Legende: SD indiziert Standardabweichung, NS indiziert nicht signifikant)

3.2 Mikroarrayanalyse

Die Rohdaten der Mikroarrays können im Internet bei Gene Expression Omnibus unter der Serien Nummer GSE12624 heruntergeladen werden [67].

3.2.1 Datenaufbereitung der Mikroarrays

Nachdem die Mikroarrays gescannt wurden, erfolgte die Intensitätsauswertung der Bilder mithilfe der entsprechenden Software.

Als erster Schritt wird der Pcall der einzelnen Arrays verglichen. Alle Arrays weisen einen ähnlichen Pcall auf, weshalb kein Array aus dem weiteren Arbeitsablauf ausgeschlossen wird (vgl. Abbildung 12).

In allen Arrays werden im zweiten Schritt für die Gensonden mit den Qualitätsattributen POOR und NEG Leerfelder eingefügt. Diese qualitativ schlechten Werte können nun, wie die MSR attributierten Werte, als Leerfelder die weitere Analyse nicht mehr beeinflussen.

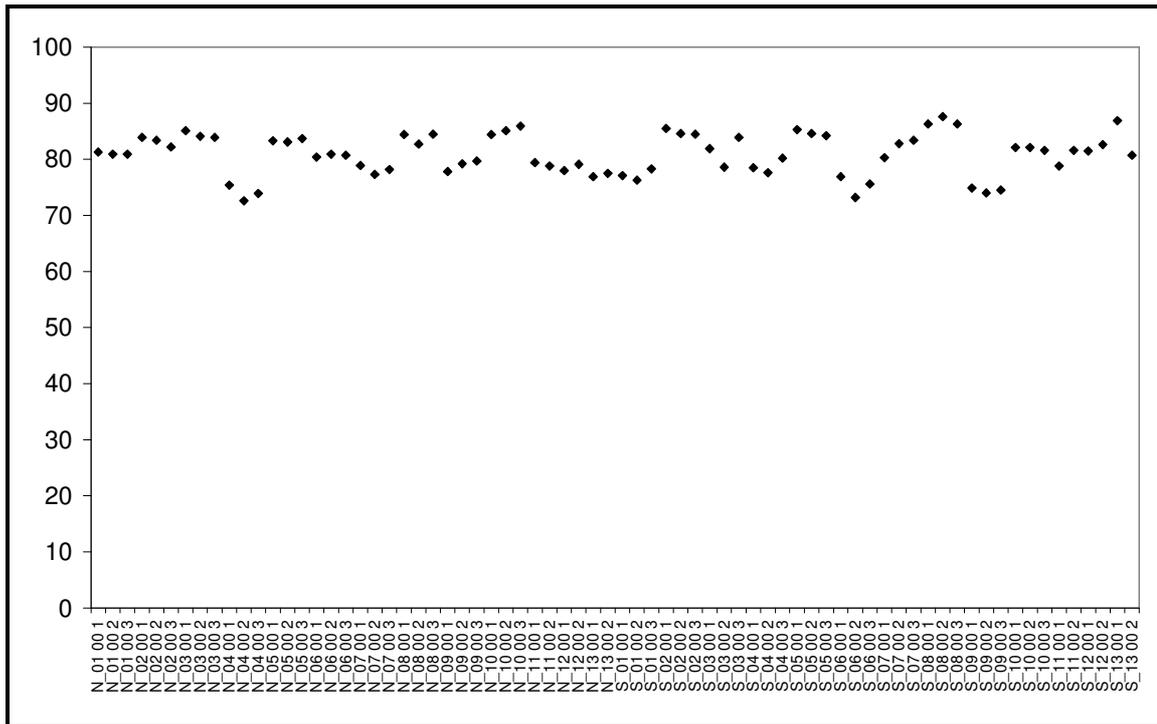


Abbildung 12: Present Call (Pcall) der einzelnen Arrays in Prozent. Eine massive Abweichung des Pcall kann Hinweise auf Qualitätsproblematiken geben, welche aber in diesem Datenset nicht gegeben sind

3.2.2 Qualitätssicherung der Mikroarrays

3.2.2.1 Erster Teil der Qualitätssicherung

Die Mikroarrays besitzen pro Array 9.945 Gensonden und da für die 26 Patienten insgesamt 72 Arrays präpariert werden, werden folglich 716.040 (72×9.945) verschiedene Gensonden bei dieser Analyse erfasst. Davon sind 694.698 Gensonden als GOOD oder EMPTY attribuiert und werden in das Rohdatenset übernommen. Dies entspricht 97,02% der gesamten Gensonden, die restlichen 2,98% respektive 21.342 Leerfelder entsprechen den Gensonden mit den Attributen POOR, FALSE und MSR (DATENSET 1.1).

In der Bearbeitung mit dem Cleantable Modul werden insgesamt 110 Genzeilen aufgrund zu vieler Leerfelder von der weiteren Analyse ausgeschlossen (DATENSET 1.2) und das Schwellenwert Modul identifiziert 1.355 Genzeilen „als nicht über den Schwellenwert exprimiert“ (DATENSET 1.3). Das

resultierende Datenset hat 8.480 Genzeilen mit insgesamt 6.472 Leerfeldern, was einem Anteil von 1,06% Leerfeldern entspricht.

Die leeren Felder werden mithilfe von SKNN (K=5) imputiert (DATENSET 1.4). In diesem Datenset werden nun insgesamt 4.891 Ausreißerwerte mithilfe des Ausreißerwerte Filtermoduls identifiziert, markiert und entsprechend in dem ursprünglichen Datenset vor SKNN (DATENSET 1.3) gelöscht. In diesem neuen Datenset (DATENSET 1.5) sind nun insgesamt 11.363 Leerfelder (1,86%) in 8.480 Genzeilen. Die Leerfelder werden nun wieder mit SKNN (K=5) (DATENSET 1.6) imputiert und mit der Quantilen Normalisierung normalisiert (DATENSET 1.7) (vgl. Tabelle 11).

Erster Teil der Qualitätssicherung					
Programmschritt	Datenset	Genzeilen	Gensonden	Leerwerte	prozentualer Anteil Leerwerte
Rohdaten	DATENSET 1.1	9945	716040	21342	2.98%
Cleantable Modul	DATENSET 1.2	9835	708120	14425	2.04%
Schwellenwert Modul	DATENSET 1.3	8480	610560	6472	1.06%
SKNN	DATENSET 1.4	8480	610560	0	0.00%
Ausreißerwerte Filter Modul	DATENSET 1.5	8480	610560	11363	1.86%
SKNN	DATENSET 1.6	8480	610560	0	0.00%

Tabelle 11: Leerfelder im Datenset mit allen Arrays

Dieses Datenset (DATENSET 1.7) wird nun mit dem MOFilter Modul und MVA-Plot Modul analysiert. Das MOFilter Modul zeigt eine Korrelation der einzelnen Arrays, welche $> 85\%$ beträgt (vgl. Abbildung 17). Die relative Anzahl der Ausreißerwerte pro Array beträgt $< 3,5\%$ ($|z| > 5$) (vgl. Abbildung 16). Die Korrelationsmatrizen werden mithilfe einer *Heatmap* für beide Gruppen einzeln visualisiert und zeigen gute Korrelationen der einzelnen Arrays untereinander. Allein die Arrays S_03 00 2 und S_07 00 1 korrelieren mit ihren technischen Replikaten nur zu 94%. Deshalb werden diese beiden Arrays von der weiteren Analyse ausgeschlossen (vgl. Abbildung 13 und Abbildung 15).

Das MVA-Plot Modul hebt hervor, dass keines der Arrays massive systematische Abweichungen hat. Daher werden keine weiteren Arrays von der folgenden Analyse ausgeschlossen (vgl. Appendix Kapitel 1).

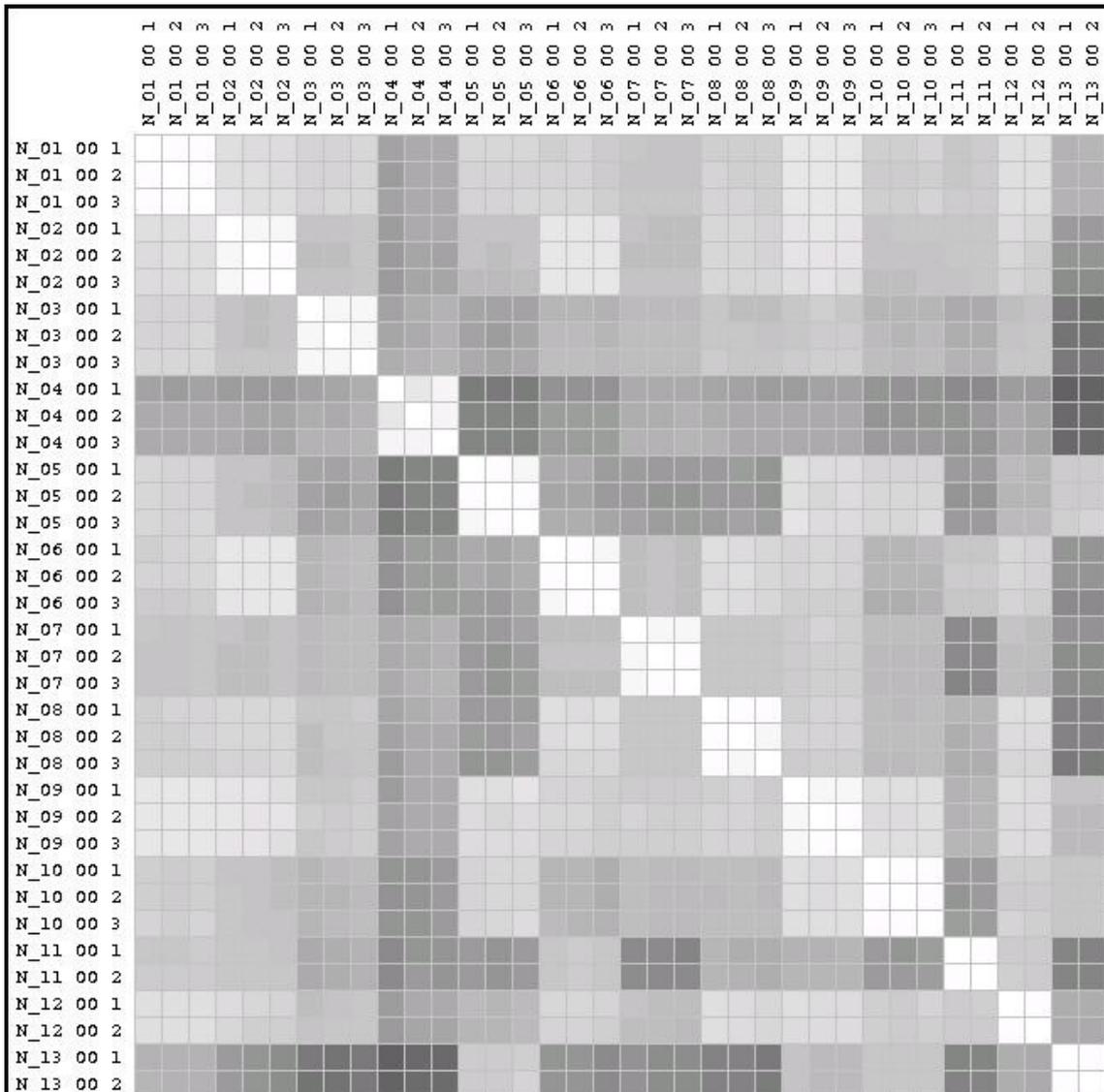


Abbildung 13. *Heatmap* der im Verlauf nicht septischen Patienten (NS_Pat). Die Farben entsprechen der Korrelation (Legende: vgl. Abbildung 14)

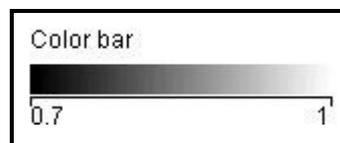


Abbildung 14: Legende zu Abbildung 13 und Abbildung 15. Die Farben entsprechen der Korrelation (Schwarz 0,7 bis Weiß 1,0)

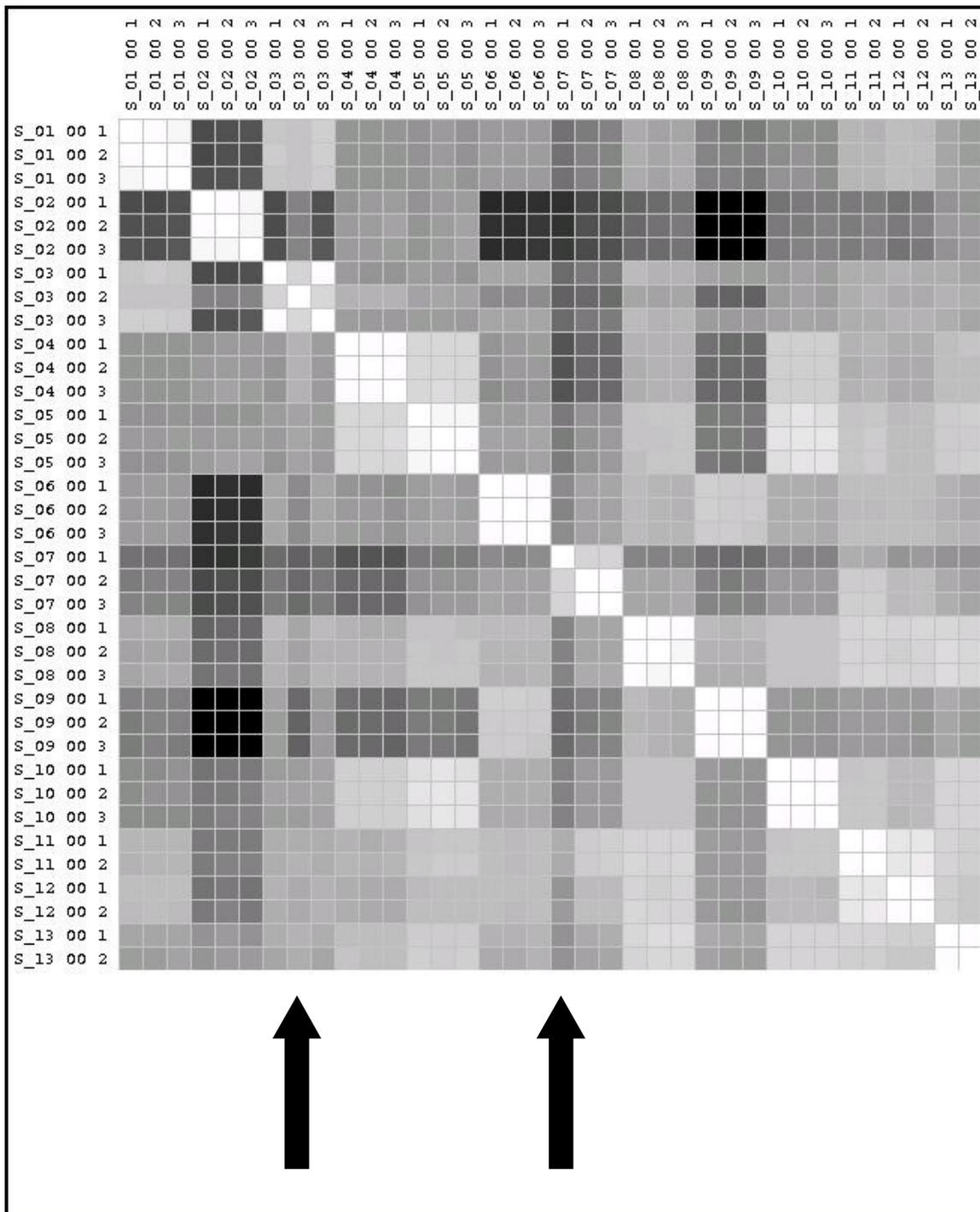


Abbildung 15: *Heatmap* der im Verlauf septischen Patienten (S_Pat). Die Pfeile indizieren die von der weiteren Analyse ausgeschlossenen Arrays, da diese nur schlecht mit ihren technischen Replikaten korrelieren. Die Farben entsprechen der Korrelation (Legende: vgl. Abbildung 14)

Durch das Anwenden des Ausreißerwerte Filtermoduls wird die Anzahl der prozentualen Ausreißerwerte in den qualitativ schlechteren Arrays um bis zu 1,5 Prozentpunkte ($|z| > 5$) reduziert. Dies entspricht einer absoluten Ausreißerreduktion von bis zu 35% (vgl. Abbildung 16). Weitere Folge der Ausreißerwerte Filtermodulanwendung ist eine Erhöhung der durchschnittlichen Korrelation der einzelnen Arrays (vgl. Abbildung 17). Dies zeigt, dass effektiv Ausreißer identifiziert und entfernt werden.

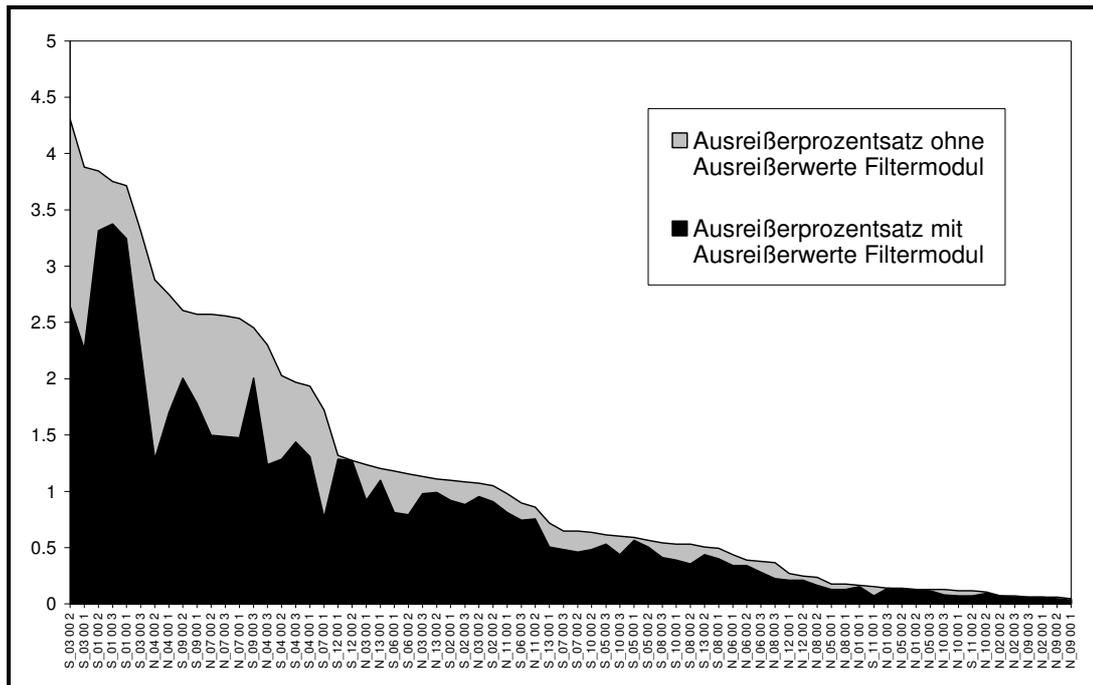


Abbildung 16: Vergleich der prozentualen Ausreißerwerte ($|z| > 5$) der einzelnen Arrays mit (Schwarz) und ohne (Grau) Anwendung des Ausreißerwerte Filtermoduls. Das Ausreißerwerte Filtermodul zeigt eine absolute Ausreißerreduktion von über 35% in qualitativ schlechteren Arrays

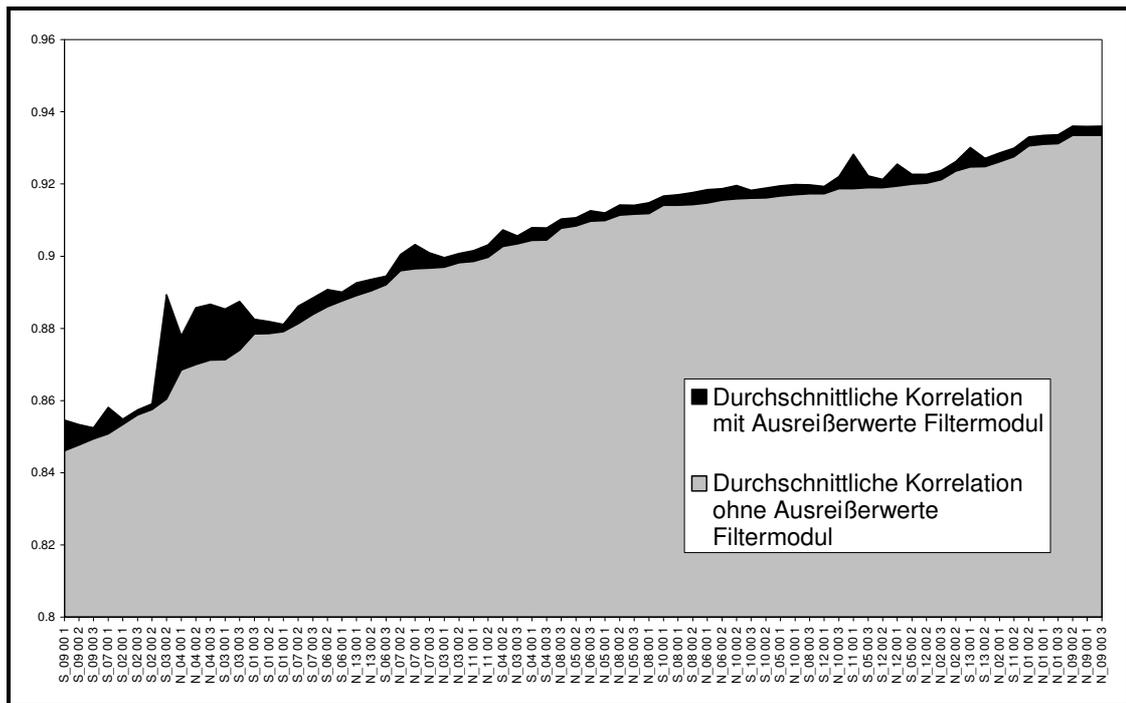


Abbildung 17: Vergleich der durchschnittlichen Korrelation der einzelnen Arrays in Prozent mit (Schwarz) und ohne Anwendung (Grau) des Ausreißerwerte Filtermoduls. Die durchschnittliche Korrelation wurde durch die Anwendung des Ausreißerwerte Filtermoduls verbessert

3.2.2.2 Zweiter Teil der Qualitätssicherung

In dem Rohdatenset (DATENSET 1.1) werden nun die beiden durch MOFilter Modul identifizierten Arrays gelöscht (DATENSET 2.1). Dieses Datenset besteht aus den verbleibenden 70 Arrays. Da die gelöschten Arrays bei Patienten mit drei technischen Replikaten auftraten, werden diese beiden Patienten mit den verbleibenden zwei technischen Replikaten in die Analyse aufgenommen und die Patientenanzahl bleibt mit 26 Patienten gleich.

Daraufhin wurde wieder der oben beschriebene Arbeitsablauf angewendet. Das Datenset (DATENSET 2.1) hat 9.945 Genzeilen und 675.320 Gensonden, die mit GOOD oder EMPTY attribuiert sind (97,01%). Es enthält weiterhin 20.830 Leerfelder, was 2,99% Leerfeldern entspricht. Das Cleantable Modul entfernt 110 Genzeilen (DATENSET 2.2) und das Schwellenwert Modul entfernt 1.316 Genzeilen (DATENSET 2.3).

Das daraus resultierende Datenset hat nun 8.519 Genzeilen mit 6.384 Leerfeldern (1,07%). Die Daten werden mit SKNN (K=5) imputiert

(DATENSET 2.4) und das Ausreißerwerte Filtermodul wird angewendet, welches 4.250 Gensonden als Ausreißer identifiziert. Die Gensonden, welche das Ausreißerwerte Filtermodul identifiziert hatte, werden in DATENSET 2.3 entfernt (DATENSET 2.5). Dieses neue Datenset enthält nun 8.519 Genzeilen und 10.634 Leerfelder, was 1,78% Leerfeldern entspricht.

In dem DATENSET 2.5 werden die Leerfelder mit SKNN (K=5) imputiert (DATENSET 2.6) und mit der Quantilen Normalisierung normalisiert (DATENSET 2.7) (vgl. Tabelle 12).

Die Mikroarraydaten (DATENSET 2.7) sind somit hinsichtlich ihrer Qualität geprüft.

Zweiter Teil der Qualitätssicherung					
Programmschritt	DATENSET	Genzeilen	Gensonden	Leerwerte	prozentualer Anteil Leerwerte
Rohdaten	DATENSET 2.1	9945	696150	20830	2.99%
Cleantable Modul	DATENSET 2.2	9835	688450	14081	2.05%
Schwellenwert Modul	DATENSET 2.3	8519	596330	6384	1.07%
SKNN	DATENSET 2.4	8519	596330	0	0.00%
Ausreißerwerte Filter Modul	DATENSET 2.5	8519	596330	10634	1.78%
SKNN	DATENSET 2.6	8519	596330	0	0.00%

Tabelle 12: Leerfelder im Datenset nach Entfernung der qualitativ schlechten Arrays

3.2.2.3 Validierung mittels RT-PCR

Die Mikroarraydaten wurden unabhängig mithilfe der quantitativen RT-PCR anhand 14 ausgewählter Gene validiert. Dies sind die Gene ADM, ANXA1, CASP8, CD163, GNLY, IL18R1, IL1R1, IL1R2, MMP9, MPO, ROCK1, SERP1, SOCS3 und SPP. Fünf dieser Gene wurden zufällig ausgewählt.

Die FC's der RT-PCR Daten korrelieren stark mit den Mikroarraydaten ($r = 0,915$) (vgl. Abbildung 18). Dadurch werden die Ergebnisse der Mikroarrayanalyse unabhängig bestätigt.

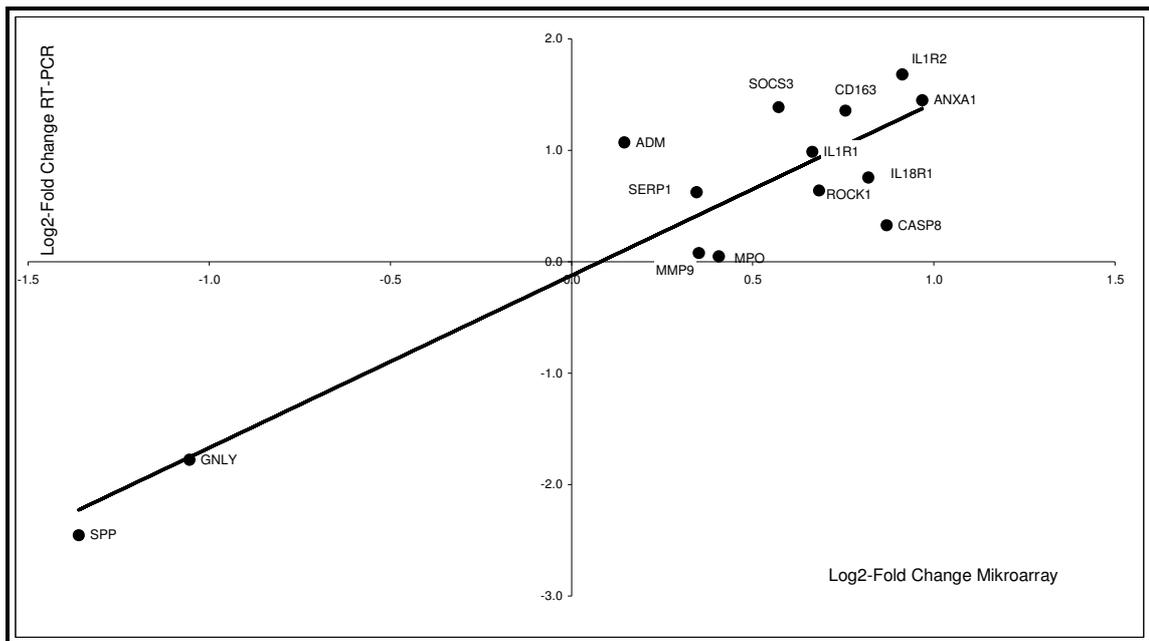


Abbildung 18: Validierung der Genexpression mittels quantitativer RT-PCR. 14 Gene wurden ausgewählt. *Log2-Fold Change's* des Mikroarrayverfahrens (X-Achse) und *log2-Fold Change's* der RT-PCR (Y-Achse) sind gegeneinander aufgetragen. Die Korrelation beider Verfahren beträgt $r = 0,915$

3.2.3 Statistische Analyse

Das Programm Rankprodukt ermöglicht es, den Unterschied einer Genexpression zwischen zwei Gruppen zu quantifizieren. Dies wird mithilfe des FC und des FDR, welche die Höhe und die Fehlerwahrscheinlichkeit der differentiellen Genexpression darstellen, aufgezeigt.

Die qualitätsgeprüften Mikroarraydaten (DATENSET 2.7) werden logarithmiert (Basis = 2) und für jeden Patienten wird der Mittelwert aus seinen technischen Replikaten für jedes einzelne Gen gebildet. Daraufhin werden mit Rankprodukt die differentiellen Expressionen und Fehlerwahrscheinlichkeiten berechnet.

In dieser Studie wird eine Fehlerwahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($FDR < 0,05$) und ein FC größer als 1,5 ($FC > 1,5$) als signifikant reguliert angesehen und in die Analyse mit aufgenommen. Insgesamt sind 225 Gene signifikant reguliert, wovon 130 vermehrt und 95 vermindert exprimiert sind, im Vergleich S_Pat mit NS_Pat zum Zp0. Die Liste der signifikant regulierten Gene kann im Appendix eingesehen werden (vgl. Appendix Kapitel 2).

3.2.4 Chromosomale Lokalisation der signifikant regulierten Gene

Bei der Zuordnung der signifikant regulierten Gene zu den zugehörigen Chromosomen zeigt sich eine homogene Verteilung. Die einzelnen Chromosomen beinhalten zwischen 1% und 9% der signifikant regulierten Gene und sind gleichmäßig auf alle Chromosomen verteilt (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20).

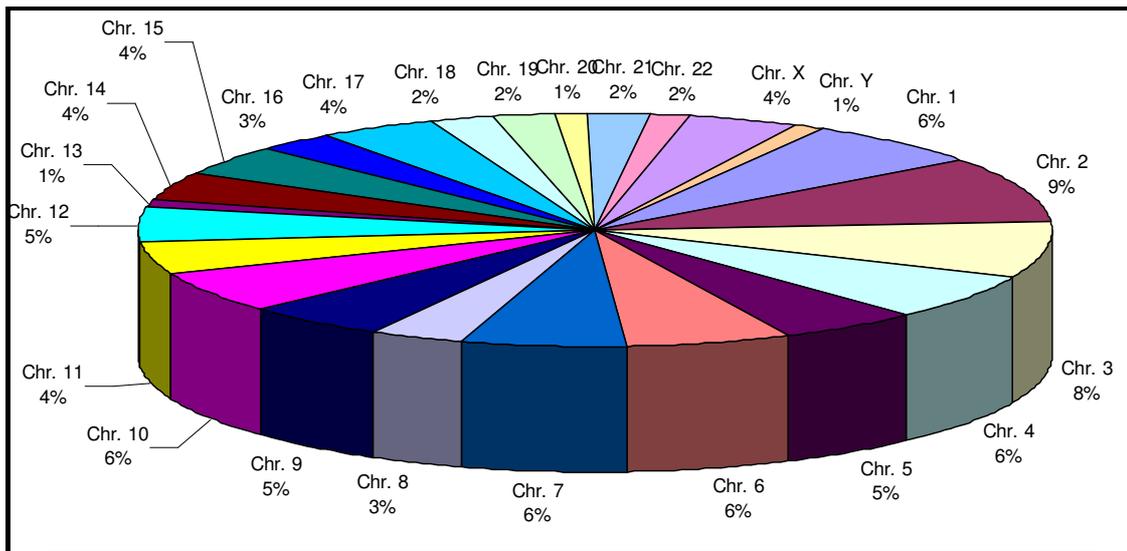


Abbildung 19: Verteilung der signifikant regulierten Gene (Legende: Chr. indiziert das Chromosom, die Prozentzahlen geben den Anteil an allen signifikant regulierten Genen an)

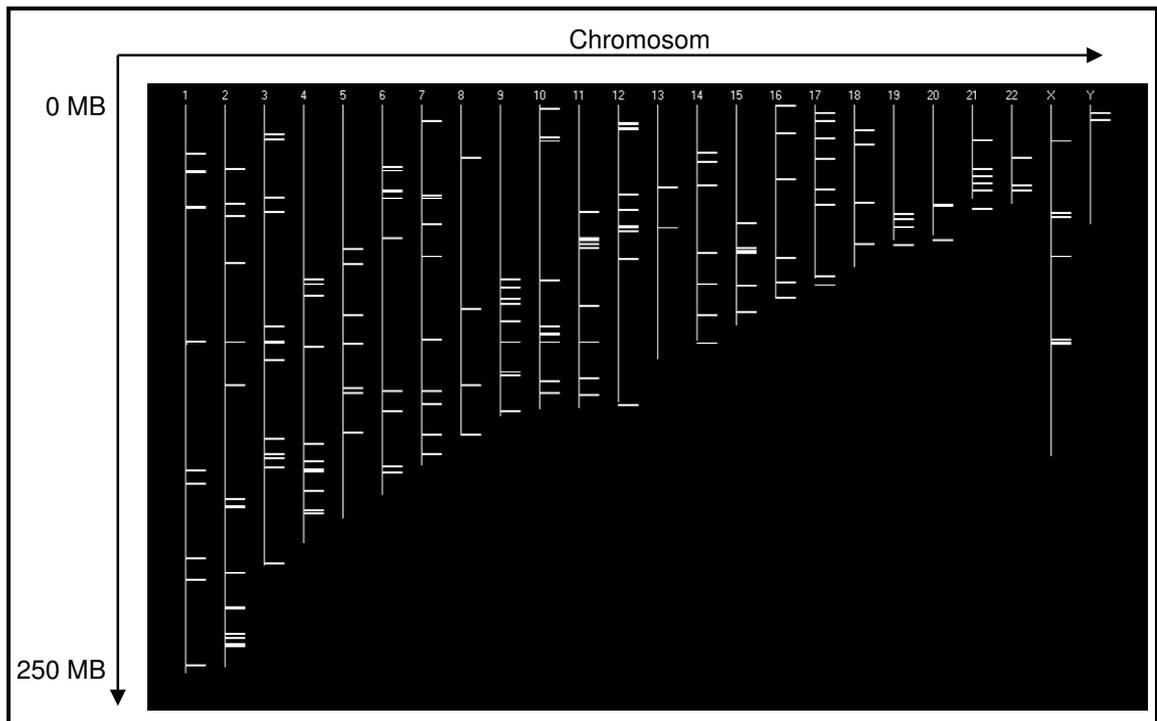


Abbildung 20 Verteilung der signifikant regulierten Gene auf den einzelnen Chromosomen (Legende: MB indiziert die Megabase und gibt so die Lokalisation auf dem Chromosom an. Zur Visualisierung wurde STRIPE verwendet [⁸⁰])

3.2.5 Visualisierung der Literatursuche

Die signifikant regulierten Gene werden mit Alibaba visualisiert, dessen Netzwerk als Grundlage für die internetweite Literatursuche verwendet wird. Hierfür werden die Elemente Proteine, Zellen und Gewebe in die Suche eingeschlossen (vgl. Abbildung 21) [⁷⁴]. Diese Suche wird weiterhin mit anderen gängigen Internetsuchmaschinen ergänzt.

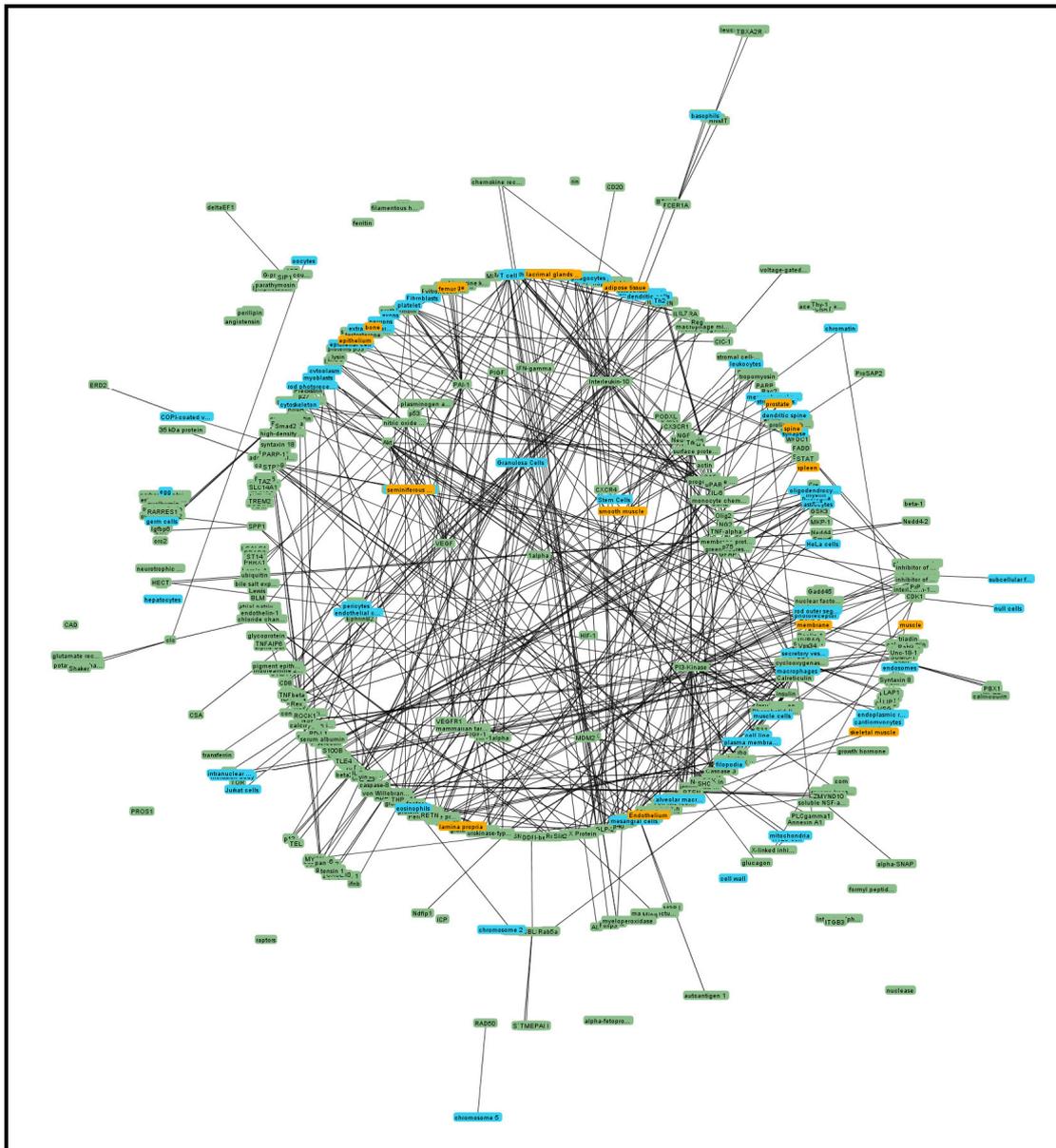


Abbildung 21: Visualisierung der aus *PubMed Abstracts* extrahierten Informationen. (Legende: Proteine werden grün, Zellen blau und Gewebe orange dargestellt; Linien indizieren Beziehungen zwischen den einzelnen Elementen)

3.2.6 Pathwayanalyse

Die *Pathwayanalyse* zeigt, welche *Pathways* viele der signifikant regulierten Gene beinhalten und kann so auf regulierte biologische Prozesse hinweisen. Es werden *Pathways* mit einem Mindestanteil von 2% an regulierten Genen als signifikant betrachtet (vgl. Tabelle 13).

	SectionName	PathwayName	% ID
1	BioCarta Pathways	Fibrinolysis Pathway	25.00
2	BioCarta Pathways	Platelet Amyloid Precursor Protein Pathway	13.33
3	GenMapp	Blood Clotting Cascade	11.54
4	BioCarta Pathways	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	9.52
5	GenMapp	Matrix Metalloproteinases	7.89
6	KEGG Pathways	Pantothenate and CoA biosynthesis	6.25
7	KEGG Pathways	Complement and coagulation cascades	5.26
8	GenMapp	G13 Signaling Pathway	4.55
9	KEGG Pathways	Glycine, serine and threonine metabolism	4.44
10	GenMapp	Chemotaxis	4.29
11	BioCarta Pathways	Cell Cycle: G2/M Checkpoint	4.26
12	GenMapp	TGF Beta Signaling Pathway	4.00
13	GenMapp	Enzyme inhibitor activity	3.97
14	GenMapp	Cell motility	3.82
15	KEGG Pathways	Arginine and proline metabolism	3.80
16	GenMapp	Cytokinesis	3.55
17	GenMapp	Cell surface receptor linked signal transduction	3.38
18	KEGG Pathways	p53 signaling pathway	3.17
19	KEGG Pathways	Nicotinate and nicotinamide metabolism	3.12
20	KEGG Pathways	Huntington's disease	2.86
21	KEGG Pathways	Cell cycle	2.72
22	KEGG Pathways	Apoptosis	2.68
23	KEGG Pathways	Colorectal Cancer	2.61
24	GenMapp	Peptide GPCRs	2.41
25	KEGG Pathways	Glycosphingolipid metabolism	2.39
26	KEGG Pathways	Gap junction	2.34
27	GenMapp	G1 to S cell cycle control	2.33
28	KEGG Pathways	Toll-like receptor signaling pathway	2.26
29	KEGG Pathways	Long-term depression	2.20
30	KEGG Pathways	Inositol phosphate metabolism	2.11
31	KEGG Pathways	Hematopoietic cell lineage	2.11
32	KEGG Pathways	Cytokine-cytokine receptor interaction	2.06

Tabelle 13: Beeinflusste *Pathways* durch die signifikant regulierten Gene, ähnliche *Pathways* der Analyse überrepräsentierter Kategorien sind **fett** markiert (Legende: %ID indiziert den prozentualen Anteil der zugeordneten Gene bezogen auf die Gesamtzahl der vorhandenen Gene im zugehörigen *Pathway*, Signifikanzlevel %ID => 2%)

Eine erweiterte Möglichkeit, biologische Funktionen zu erfassen, stellt die Analyse überrepräsentierter Kategorien dar. Deshalb wurden die Ergebnisse der *Pathwayanalyse* mit der folgenden Analyse überrepräsentierter Kategorien kombiniert.

3.2.7 Überrepräsentierte Kategorien

Überrepräsentierte Kategorien zeigen, welche biologischen Kategorien von den signifikant regulierten Genen beeinflusst werden. Damit sind diejenigen

Kategorien gemeint, bei welchen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine tatsächliche Regulation stattgefunden hat. DAVID identifizierte 23 Kategorien, 21 GO-Terms, 2 KEGG-Pathways und keinen *Biocarta-Pathway* zum Zp0 als signifikant überrepräsentiert ($Thresholdcount = 6$) ($P \leq 0,05$) (vgl. Tabelle 14). Sie zeigen, an welchen biologischen Prozessen die signifikant regulierten Gene beteiligt sind.

	Kategorie (in Englisch)	Sinngemäße Übersetzung ins Deutsche	PValue
1	GO:0009605~response to external stimulus	Reaktion auf einen externen Stimulus	0.00
2	GO:0042330~taxis	Taxis	0.00
3	GO:0006935~chemotaxis	Chemotaxis	0.00
4	GO:0009611~response to wounding	Reaktion auf eine Verletzung	0.00
5	GO:0006952~defense response	Abwehrreaktion	0.00
6	GO:0007626~locomotory behavior	Bewegungsverhalten	0.00
7	hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	Zytokin-Zytokin Rezeptorinteraktion	0.01
8	GO:0051301~cell division	Zellteilung	0.01
9	hsa04610:Complement and coagulation cascades	Komplement und Gerinnungskaskade	0.01
10	GO:0006954~inflammatory response	Entzündungsreaktion	0.01
11	GO:0006508~proteolysis	Protolyse	0.01
12	GO:0051674~localization of cell	Lokalisation der Zelle	0.01
13	GO:0006928~cell motility	Zellbewegung	0.01
14	GO:0008015~blood circulation	Blutzirkulation	0.02
15	GO:0003013~circulatory system process	Zirkulatorischer Systemprozess	0.02
16	GO:0000279~M phase	M-Phase	0.02
17	GO:0007610~behavior	Verhalten	0.03
18	GO:0007166~cell surface receptor linked signal transduction	Zelloberflächenabhängige Signaltransduktion	0.04
19	GO:0007067~mitosis	Mitose	0.04
20	GO:0022403~cell cycle phase	Zellzyklusphase	0.04
21	GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	M-Phase des mitotischen Zellzyklus	0.05
22	GO:0035295~tube development		0.05
23	GO:0006955~immune response	Immunreaktion	0.05

Tabelle 14: Überrepräsentierte DAVID Kategorien zum Zp0, 12 Stunden nach Polytrauma (Legende: GO:xxx indiziert GO-Kategorien, hsaxxx indiziert KEGG-Pathways)

Diese 23 Kategorien beinhalten Kategorien, welche an den verschiedensten Regulationen teilhaben und fast alle vermehrt und vermindert exprimierte Gene beinhalten (vgl. Abbildung 22). Die einzelnen Kategorien werden in Gruppen eingeteilt und analysiert:

- Die Abwehr- und Immunreaktion: Reaktion auf einen externen Stimulus, Reaktion auf eine Verletzung, Abwehrreaktion, Entzündungsreaktion und Immunreaktion.
- Die Zelllokalisierung: Taxis und Chemotaxis, Bewegungsverhalten, Lokalisation der Zelle sowie Zellbewegung.
- Das Kreislaufsystem: Blutzirkulation und zirkulatorischer Systemprozess.

- Die Zellteilung: Zellteilung, M-Phase, Mitose, Zellzyklusphase und M-Phase des mitotischen Zellzyklus.
- Das Komplement- und Gerinnungssystem.
- Sonstige Kategorien: Proteolyse, Verhalten, Zytokin-Zytokin Rezeptorinteraktion, zelloberflächenabhängige Signaltransduktion und *Tube Development*.

Da für einige Begriffe keine deutsche Übersetzung existent ist, wurden diese Begriffe, soweit möglich, sinngemäß übersetzt. Die genauen Bedeutungen der einzelnen Kategorien können bei dem GO-Konsortium eingesehen werden [76] (vgl. Tabelle 14). Die Gene, welche die einzelnen Kategorien beinhalten, sind im Appendix aufgeführt (vgl. Appendix Kapitel 3).

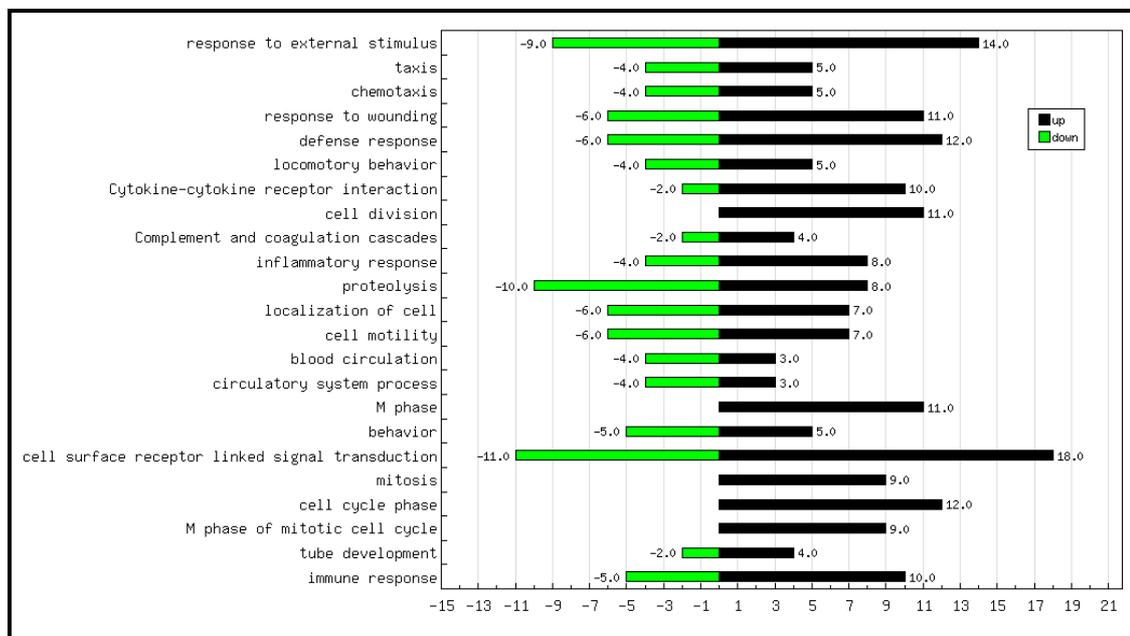


Abbildung 22: Anzahl der vermehrt und vermindert exprimierten Gene in den einzelnen überrepräsentierten Kategorien (Legende: Schwarze Balken repräsentieren die Anzahl vermehrt exprimierter Gene, grüne Balken die Anzahl vermindert exprimierter Gene)

In der gemeinsamen Betrachtung der *Pathwayanalyse* und der überrepräsentierten Kategorien zeigt sich, dass einige biologische Funktionen von beiden Ansätzen erkannt werden, andere dagegen nur von der *Pathwayanalyse*. Deshalb werden vordergründig die gemeinsamen Kategorien analysiert.

3.2.7.1 Die Abwehrreaktion, Immunreaktion und Zelllokalisierung

Das Immunsystem wird von aktivierenden und inhibierenden Faktoren geregelt. Hierbei bedeutet eine TH1 Antwort eine Aktivierung des Immunsystems. Das führt dazu, dass Immunzellen wie Makrophagen, Neutrophile, T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten aktiviert und angezogen werden, welche für die Bekämpfung von Pathogenen benötigt werden. Im Falle einer TH2 Antwort ruht die Immunantwort, was zur Folge hat, dass B-Zellen aktiviert werden, welche sich zu Antikörper produzierenden Zellen und Gedächtniszellen differenzieren. Für eine funktionierende Abwehr ist die Balance zwischen diesen beiden Antworten essenziell, um adäquat auf ein Pathogen reagieren zu können [27].

Bei S_Pat sind zum Zp0 folgende Immunzellaktivatoren weniger exprimiert: SERPING1 [81], SPON2 [82], CX3CR1 [83], CXCL10 [84], CLC [85] und GNLY [86]. Dies führt zu einer verminderten Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen, T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten und bewirkt somit eine verminderte TH1 Antwort. Zusätzlich sind die Immunzellaktivatoren SPP1 [87] und PI3 [88], welche für die Induktion einer TH1 Antwort notwendig sind, weniger exprimiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei Patienten mit Sepsis wichtige Gene, welche die Immunzellen aktivieren, weniger exprimiert sind. Dies führt zu einer verminderten TH1 Antwort.

Diese verminderte TH1 Antwort spiegelt sich nicht nur in einer verminderten Aktivierung der Zellen, sondern auch in einer verminderten Expression chemotaktischer Gene wieder. Die chemotaktischen Gene PLAU [89], SLIT1 [90], SPP1 [91], CXCL10 [84] [92] und CX3CR1 [83] sind alle in S_Pat zum Zp0 weniger exprimiert. Das Fehlen dieser chemotaktischen Gene bewirkt eine verminderte Migration von Immunzellen und trägt zu einer schlechteren Immunabwehr bei.

Neben der verminderten TH1 Antwort gibt es auch Hinweise auf eine vermehrt exprimierte TH2 Antwort in S_Pat zum Zp0. Die vermehrt exprimierten Gene CD163 [93], TLE1 [94], VSIG4 [95] und ARG1 [96] hemmen die T-Zell Aktivierung. Das vermehrt exprimierte Gen IL10 induziert Apoptose via dem FAS-FASL *Pathway* in T-Zellen [97] und inhibiert die Aktivität von Makrophagen und die Aktivität von Monozyten [98] [99]. Darüber hinaus wird das vermehrt exprimierte Gen ARG1 von TH2 Molekülen auf mRNA Ebene induziert [100], was zusammen mit dem vermehrt exprimierten Gen CCR9 [101] die Induktion einer TH2 Antwort

in S_Pat zum Zp0 anzeigt. Ferner spiegelt sich die Aktivierung der TH2 Antwort in der vermehrten Expression B-Zell spezifischer Gene wieder, da diese spezifisch für eine TH2 Antwort sind. Dies ist das Gen TNFRSF17 [102], dessen Genprodukt als ein Marker reifer B-Zellen diskutiert wird und SAMS1 [103], welches in aktivierten B-Zellen vermehrt exprimiert wird.

Hinweise auf eine TH1 Antwort in S_Pat zum Zp0 liefern lediglich die vermehrte Expression von ANXA1 [104], welches die Differenzierung von T-Zellen fördert und die vermehrte Expression von IL18R1 [105] und LEPR [106], welche eine TH1 Antwort induzieren.

Abschließend lässt sich sagen, dass bei Patienten, die eine Sepsis im posttraumatischen Verlauf entwickeln (S_Pat), bereits zum Zp0 die TH1 Antwort vermindert und die TH2 Antwort verstärkt ist.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass bei S_Pat eine TH2 Antwort überwiegt, während bei NS_Pat eine TH1 Antwort zum Zp0 dominiert (vgl. Abbildung 23).

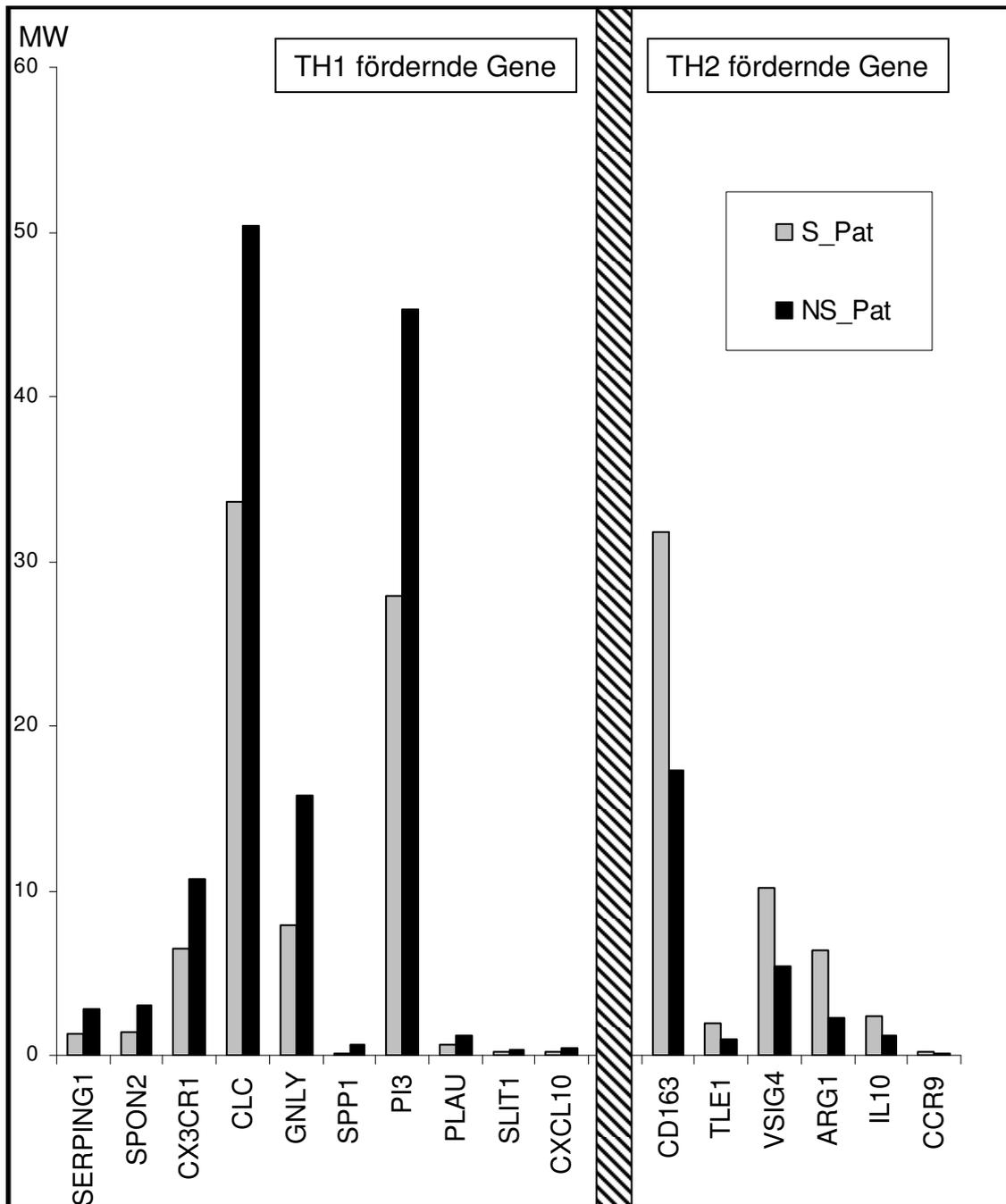


Abbildung 23: Vergleich der Expressionsmittelwerte von später septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. Gene, die eine TH1 Antwort fördern, sind vermindert in S_Pat exprimiert; währenddessen sind Gene, die eine TH2 Antwort fördern, in S_Pat vermehrt exprimiert zum Zp0. (Legende: MW indiziert den Mittelwert der Quantilen Normalisierten Rohdaten; grau hinterlegt sind S_Pat, schwarz hinterlegt sind NS_Pat)

Die schlechte Immunabwehr des Organismus spielt eine essenzielle Rolle zum Zeitpunkt der Manifestation einer Sepsis. Ein funktionierendes Immunsystem ist notwendig für die Abwehr von exogenen und endogenen Krankheitserregern. Dies geschieht durch die Erkennung und Elimination dieser Pathogene durch Immunzellen und Antikörper. Gene, die an diesem Prozess beteiligt sind, codieren für Komplementfaktoren, TLR, Zytokine, Akute Phase Proteine, die Gerinnung und die humorale und zelluläre Immunantwort.

Eine vermehrte Expression komplementaktivierender Gene ist in S_Pat gegeben, wobei die vermehrt exprimierten Gene C1QB und C3AR1 Initiierungsmoleküle der Komplementkaskade sind. Weiterhin ist der potente Inhibitor der Komplementkaskade SERPING1 vermindert exprimiert, was zu einer vermehrten Aktivierung der Komplementkaskade führt (vgl. Abbildung 24).

Darüber hinaus konnten keine Hinweise auf eine differenzielle Regulation von TLR auf mRNA Ebene gefunden werden (vgl. Tabelle 15).

Trotzdem zeigte die *Pathwayanalyse* eine Regulation des TLR-Signalweges an. Weiterhin zeigte sich in der DEEP Analyse, welche Aktivitäten von Molekülen vorhersagen kann, dass der für die LPS Erkennung wichtige Molekülkomplex, bestehend aus TLR4:MyD88:MD-2 sowie dessen Mediatoren IRAK1, TRAF6, NF- κ B und TNF-alpha, als vermehrt aktiviert vorhergesagt wird (vgl. Abbildung 25).

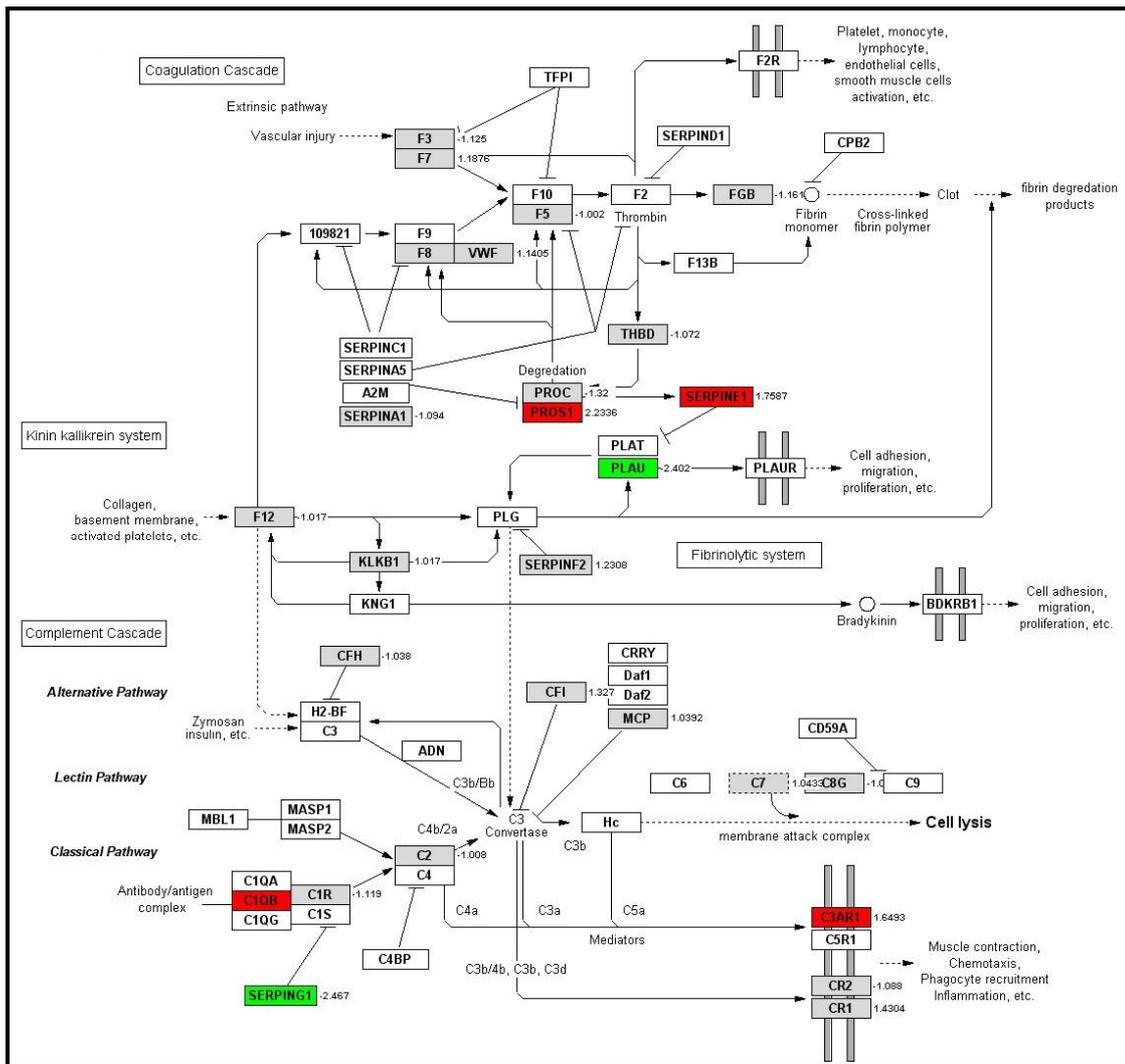


Abbildung 24: Der KEGG-Pathway Komplement- und Koagulationskaskade zeigt, dass in S_Pat zum Zp0 die Gene C1QB und C3AR1 vermehrt exprimiert sind; zusammen mit der verminderten Expression des Inhibitors SERPING1 könnte dies eine vermehrte Aktivierung des Komplementsystems bedeuten. Weiterhin sind Gene der Gerinnungskaskade differenziell exprimiert. Die vermehrt exprimierten Gene PROS1 und SERPINE1 hemmen die Aktivität des vermindert exprimierten PLAU. PLAU, der Urokinase Plasminogen Aktivator, der eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse spielt, könnte zu einer vermehrten Thrombenbildung führen. (Legende: die rot markierten Felder zeigen vermehrt exprimierte, die grün markierten Felder vermindert exprimierte Gene. Grau markierte Felder sind nicht signifikant differenziell reguliert und weiß markierte Felder sind nicht exprimiert oder nicht gemessene Gene in S_Pat zum Zp0. Die Zahlen neben den Feldern indizieren den FC)

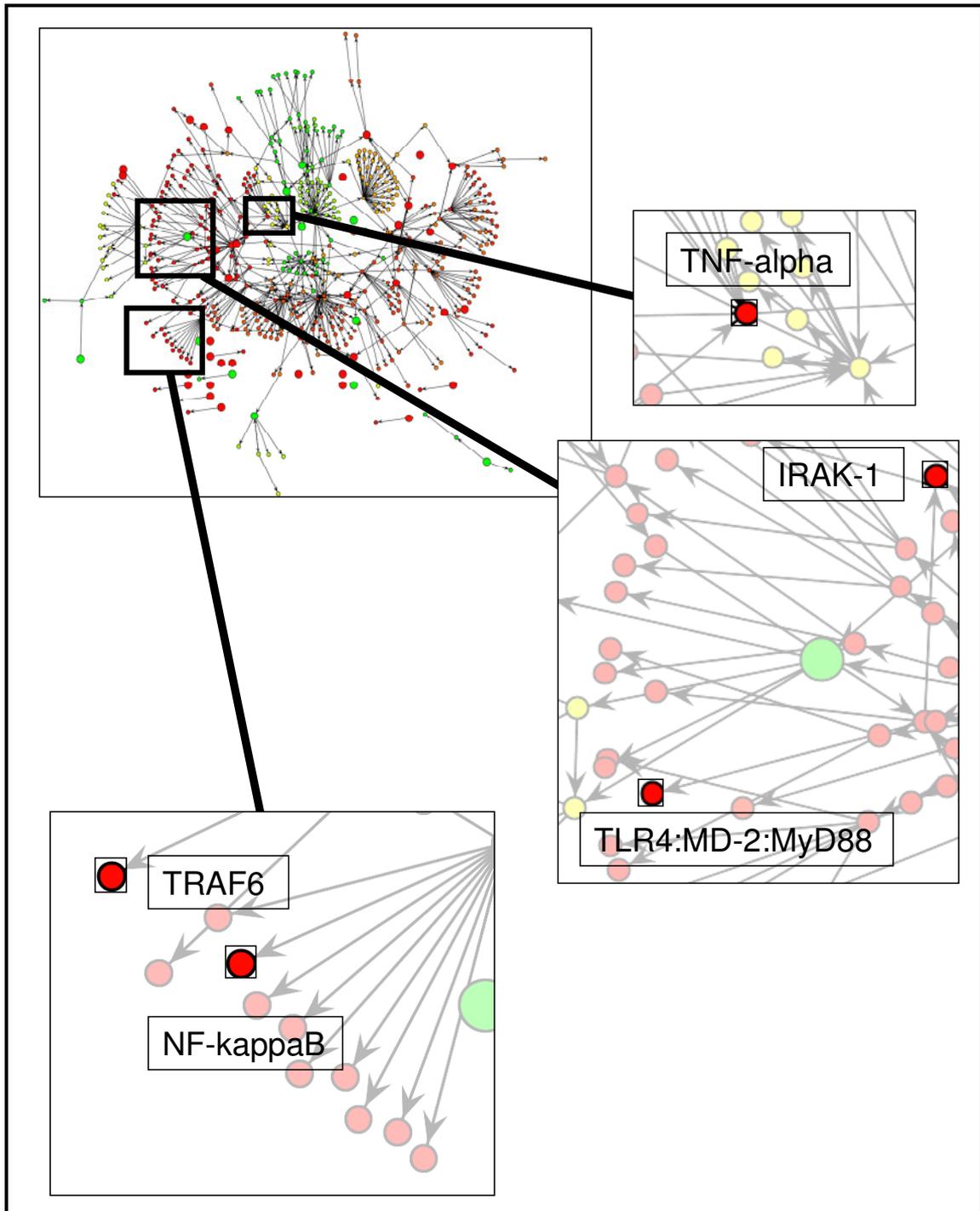


Abbildung 25: Vorhergesagte Aktivität TLR4 assoziierter Moleküle: Die DEEP Analyse zeigt, dass sowohl der Rezeptorkomplex (TLR4:MD-2:MyD88) für die Erkennung von PAMP sowie die Mediatoren dieses Rezeptorkomplexes (IRAK1, TRAF6, NF-kappaB, TNF-alpha) als aktiviert vorhergesagt werden. (Legende: Rote Punkte repräsentieren vermehrt aktivierte Moleküle, gelbe Punkte repräsentieren keine differenzielle Aktivierung und grüne Punkte repräsentieren vermindert aktivierte Moleküle. Große Punkte stellen Startmoleküle und kleine Punkte berechnete Moleküle dar)

3.2.7.2 Das Kreislaufsystem

Das Kreislaufsystem spielt eine wichtige Rolle bei einer Sepsis. Der septische Schock ist dadurch charakterisiert, dass das Kreislaufsystem trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution versagt. Dies geschieht aufgrund einer Volumenumverteilung durch Gefäßwandschäden und der Ausbildung von Mikrothromben durch eine gestörte Gerinnungsaktivierung.

Folgende in S_Pat differenziell exprimierten Gene sind an der Regulation des Blutdruckes beteiligt. Die verminderte Expression von AGTR2 und GUCY1A3 [107] fördert einen hohen Blutdruck und das Myokard als zentrales Organ der adäquaten Blutzirkulation wird durch die vermehrte Expression von ADORA3 [108] vor ischämischen Schäden geschützt.

Darüber hinaus ist durch die vermehrte Expression von PROS1 und SERPINE1 die Funktion des vermindert exprimierten Gens PLAU reduziert. Da PLAU im Normalfall die Fibrinolyse aktiviert, könnte dies, zusätzlich begünstigt durch die Aktivierung der Komplementkaskade, die Blutzirkulation negativ beeinflussen [23] (vgl. Abbildung 24 und Tabelle 15).

3.2.7.3 Zellteilung

In S_Pat zeigt der Zellzyklus eine Regulation hin zu einer beschleunigten Proliferation. Die Gene CCNA2, KLHL2 [109], CCNB1, CENPE [110] und BAZ1A [111] sind vermehrt exprimiert während der G1/S und G2/M Übergänge oder fördern diese. Die vermehrt exprimierten Gene RCC1 [112] und CDC20 werden für den Beginn der Chromosomenkondensation und für die Kernbewegung vor der Chromosomenseparation benötigt.

Darüber hinaus sind auch Gene, welche das Zellwachstum beeinflussen, differenziell reguliert. Deren Funktionen sind aber verschiedensten Geweben zugeordnet, da deren wachstumregulierende Eigenschaften mit maligne entarteten Geweben assoziiert wurden. Inwieweit diese deshalb eine wachstumsregulierende Funktion in Vollblut ausüben, ist fraglich und daher könnte durchaus eine andere biologische Funktion im Vordergrund stehen. Wachstumsregulierend sind die signifikant regulierten Gene, welche sowohl als wachstumsfördernd (vermehrt exprimiert: KIAA0101 [113]; vermindert exprimiert: CAMK2N1 [114] und NKX3-1 [115]) als auch wachstumshemmend (vermehrt

exprimiert: HHIP [¹¹⁶]; vermindert exprimiert EIF1AY) beschrieben sind. Folglich kann man hier nicht von einer richtungsweisenden Regulation sprechen.

Patienten, welche in ihrem posttraumatischen Verlauf eine Sepsis entwickeln, exprimieren vermehrt Gene, welche die Progredienz des Zellzyklus, also eine Proliferation, fördern. Wachstumsregulierende Gene dagegen zeigen beides, sowohl eine aktivierende als auch eine inhibierende Regulation (vgl. Tabelle 15).

Im Gegensatz zur Proliferation, welche zur Vermehrung von Zellen führt, steht die Apoptose, welche einen geordneten Prozess des Zellsterbens darstellt. In S_Pat ist die Kategorie der apoptotischen Gene in der *Pathwayanalyse* signifikant, aber nicht überrepräsentiert; trotzdem sind Gene, die in die Apoptose involviert sind, differenziell reguliert.

Zu einer vermehrten Apoptose tragen die vermehrt exprimierten proapoptotischen Gene CASP8, C1D, SNCAIP [¹¹⁷], ANXA1 [¹¹⁸], ROCK1 [¹¹⁹] und die vermindert exprimierten antiapoptotischen Gene SERPINB2 [¹²⁰], AKT3 [¹²¹], SPP1 [¹²²], PLAU [¹²³] und XAF1 bei.

Dem gegenüber stehen die vermehrt exprimierten antiapoptotischen Gene RALB [¹²⁴], WSB1 [¹²⁵] [¹²⁶], BIRC5 [¹²⁷], BCL2A1 sowie die vermindert exprimierten proapoptotischen Gene DYRK2, GZMH [¹²⁸], GNLY [¹²⁹] und AGTR2, welche zu einer Antiapoptose beitragen.

Dies zeigt, dass sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Gene reguliert sind und die Apoptose zu diesem Zeitpunkt noch keine großen Unterschiede in ihrer Regulation beinhaltet.

Den engen Zusammenhang der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Entzündungsreaktion veranschaulicht die Analyse der Signalkaskaden mit *Ingenuity*. Diese Analyse zeigt ein Netzwerk, welches vor allem für diese drei Bereiche zuständig ist. Die Gene CCNB1, CCNA1, CCNA2, BIRC5 und CDC20 sind alle an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Ein anderer Abschnitt zeigt Gene, welche an der Apoptose beteiligt sind, wie CASP8 oder BCL2A1. In einem weiteren Abschnitt finden sich Gene der Entzündungsreaktion, allen voran das klassische NFκB, aber auch C3AR1, CX3CR1 und IL18R1 (vgl. Abbildung 26).

Um einen genaueren Einblick in die balancierte Regulation der Apoptose zu bekommen, wurde in DEEP, welches die differenzielle Aktivität von Molekülen vorhersagen kann, nach Apoptose regulierenden Molekülen gesucht. DEEP zeigte, dass das klassische Apoptose regulierende Gen p53 sowie das Gen BCL-XL in ihrer Aktivität nicht differenziell vorhergesagt werden. Darüber hinaus wird die Aktivität des antiapoptotischen Moleküls BCL-2, aber auch seines Inhibitors Bad in S_Pat als reduziert prognostiziert (vgl. Abbildung 27).

Dies verdeutlicht, dass mit einer hohen Wahrscheinlichkeit keine differenzielle Regulation der Apoptose der S_Pat zum Zp0 existent ist.

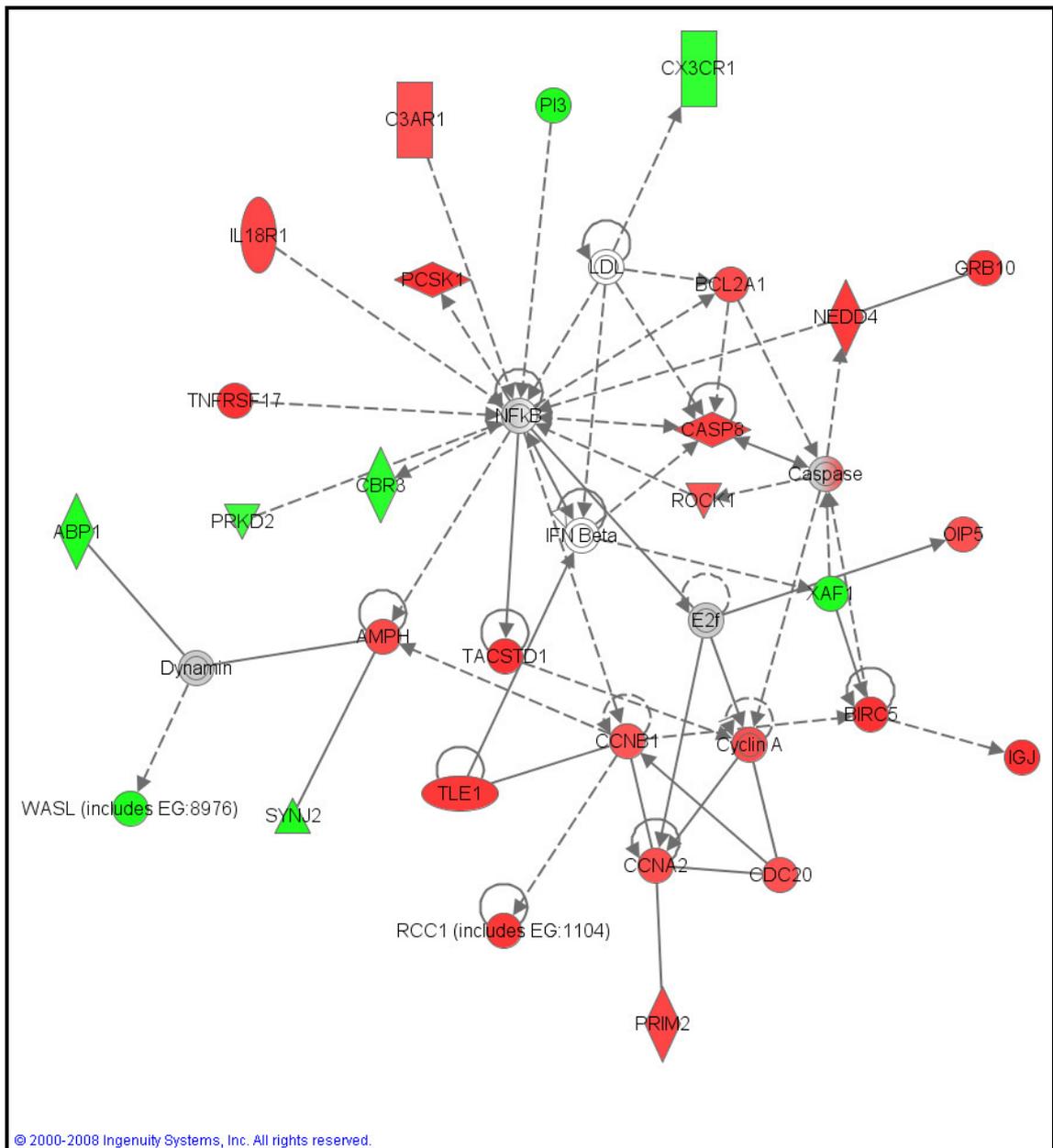


Abbildung 26: Zu sehen ist ein Netzwerk der *Ingenuity Analyse*. Dieses beinhaltet signifikant differentiell exprimierte Gene im Vergleich der später septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. (Legende: Rot markierte Gene sind vermehrt exprimiert, grün markierte Gene sind vermindert exprimiert, grau markierte Gene sind nicht signifikant reguliert und weiss markierte Gene sind nicht gemessene Gene)

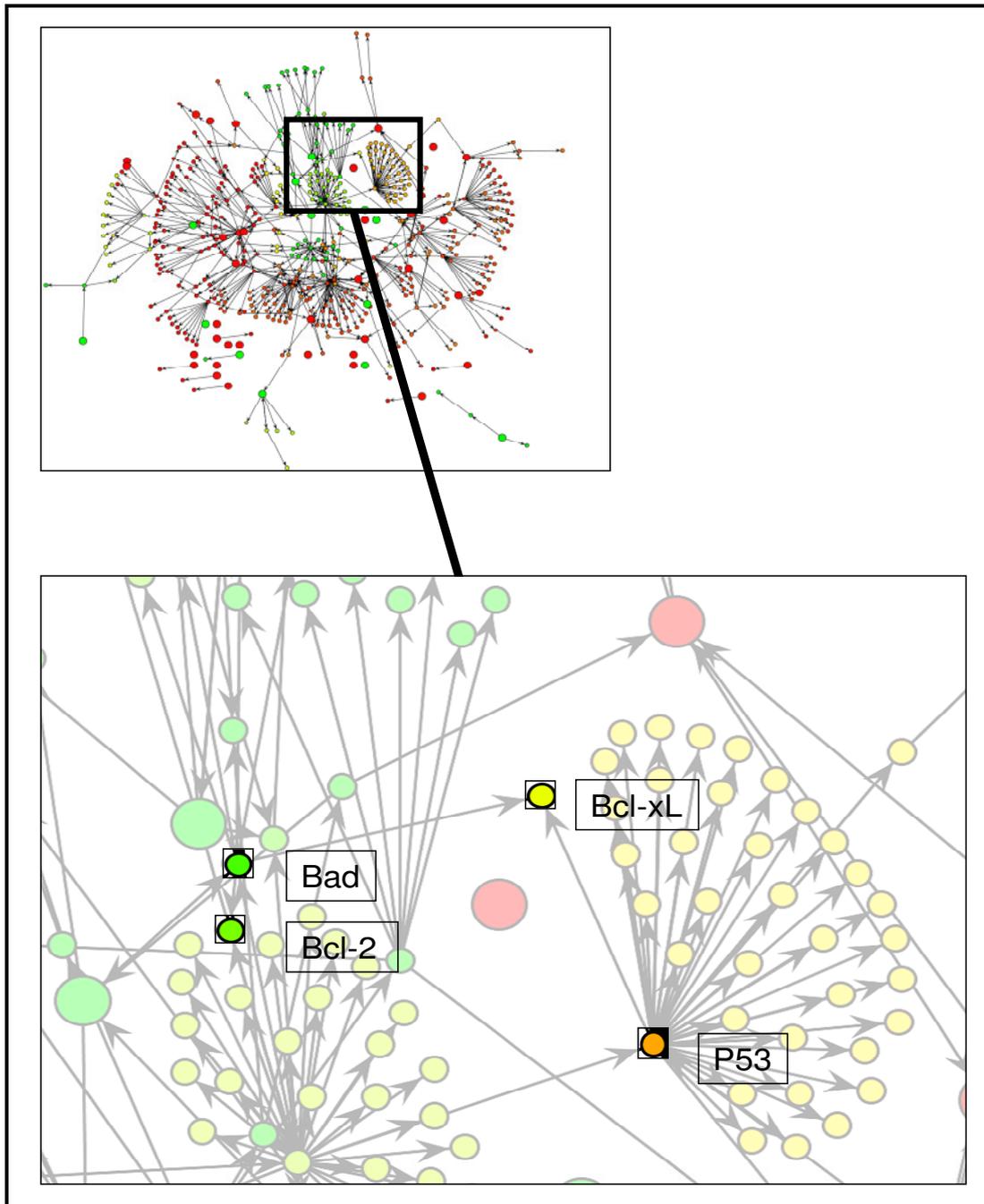


Abbildung 27: Vorhergesagte Aktivität von Molekülen, die an der Apoptose beteiligt sind. Die proapoptotischen Moleküle P53 und das antiapoptotische Molekül Bcl-xL werden in ihrer Aktivität als nicht reguliert vorhergesagt. Das antiapoptotische Molekül Bcl-2 und sein Inhibitor Bad werden in ihrer Aktivität beide als gehemmt vorhergesagt. (Legende: Rote Punkte repräsentieren vermehrt aktivierte Moleküle, gelbe Punkte repräsentieren keine differenzielle Aktivierung und grüne Punkte repräsentieren vermindert aktivierte Moleküle. Große Punkte stellen Startmoleküle und kleine Punkte berechnete Moleküle dar)

3.2.8 Biomarker

Mikroarrayanalysen können dazu dienen, neue Biomarker zu entdecken. Da wir ein Mikroarray mit annähernd 10.000 Sonden verwenden, ist es uns aber nicht möglich, das gesamte menschliche Genom zu untersuchen. Einige ausgewählte Gene sind beschrieben eine wichtige Rolle in einer Sepsis zu spielen und könnten so einzeln oder in Kombination als Marker dienen.

Das Gen COX7A2L ist Teil der letzten Komponente der Atmungskette und mit verantwortlich für deren strukturellen Aufbau. Durch seine verminderte Expression zum Zp0 könnte es so zur gestörten Energieverwertung zum Zeitpunkt einer Sepsis beitragen.

Das Gen CX3CR1 codiert für einen Rezeptor auf Monozyten und ist zum Zp0 vermindert exprimiert. Die verminderte Expression zum ZpSepsis wird als ein Teil der durch die Sepsis induzierten Immunsuppression angesehen [¹³⁰].

Das Gen ARG1 codiert für das Enzym Arginase Typ 1, welches Arginin hydrolysiert. Arginin ist eine Aminosäure, dessen Spiegel im Blut zum Zeitpunkt einer Sepsis durch den Arginasekatabolismus reduziert ist [¹³¹] (vgl. Abbildung 28).

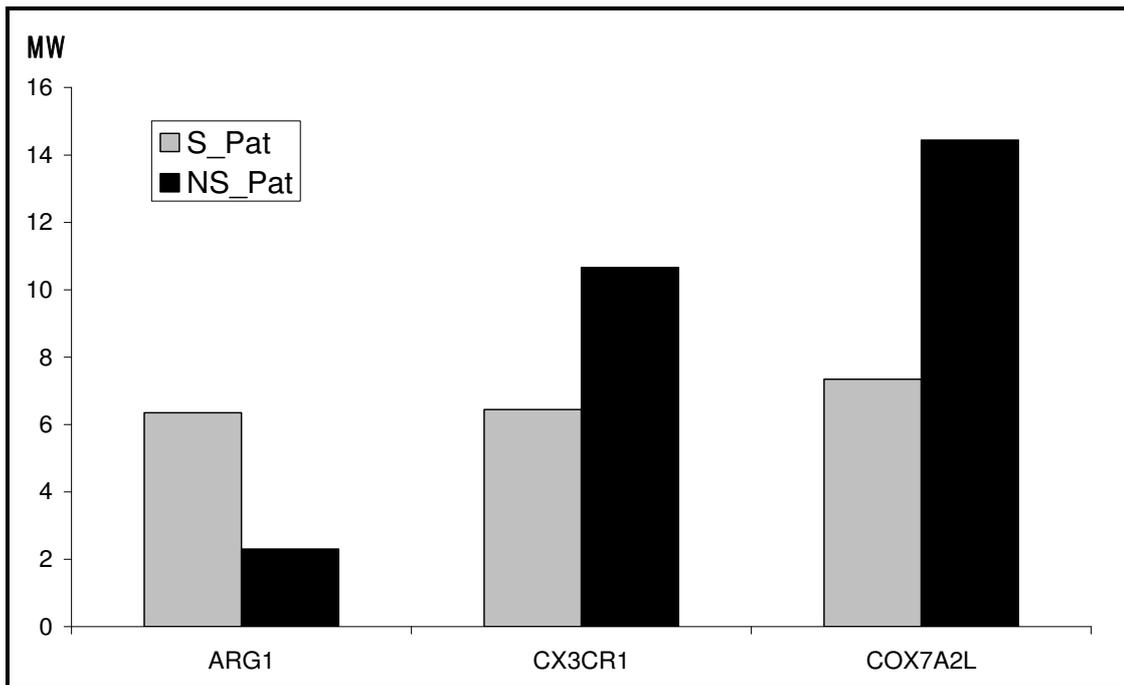


Abbildung 28: Potentielle Markergene, Vergleich der Expressionsmittelwerte von später septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. (Legende: MW indiziert den Mittelwert der Quantilen Normalisierten Rohdaten; grau hinterlegt sind S_Pat, schwarz hinterlegt sind NS_Pat)

3.2.9 Hierarchische Clusteranalyse

Mithilfe der Clusteranalyse lässt sich hervorheben, welche mRNA Profile Ähnlichkeiten aufweisen. Da diese Berechnung der Gemeinsamkeiten ohne das Wissen der Gruppenzugehörigkeit geschieht (*unsupervised analysis*), ist es erlaubt, eine Aussage darüber zu machen, inwieweit unterschiedliche Expressionen zwei verschiedene Gruppen beschreiben.

Die mit den signifikant regulierten Genen durchgeführte Clusteranalyse zeigt, dass sich zwei Cluster bilden, wovon sich das erste Cluster hauptsächlich aus S_Pat und das zweite Cluster hauptsächlich aus NS_Pat zusammensetzt.

Nur zwei septische und drei nicht septische Patienten clustern in der „falschen“ Gruppe. Dies zeigt, dass Genexpressionsdaten schon 12 Stunden nach einem Polytrauma zwischen später septischen oder nicht septischen Patienten differenzieren können (vgl. Abbildung 29).

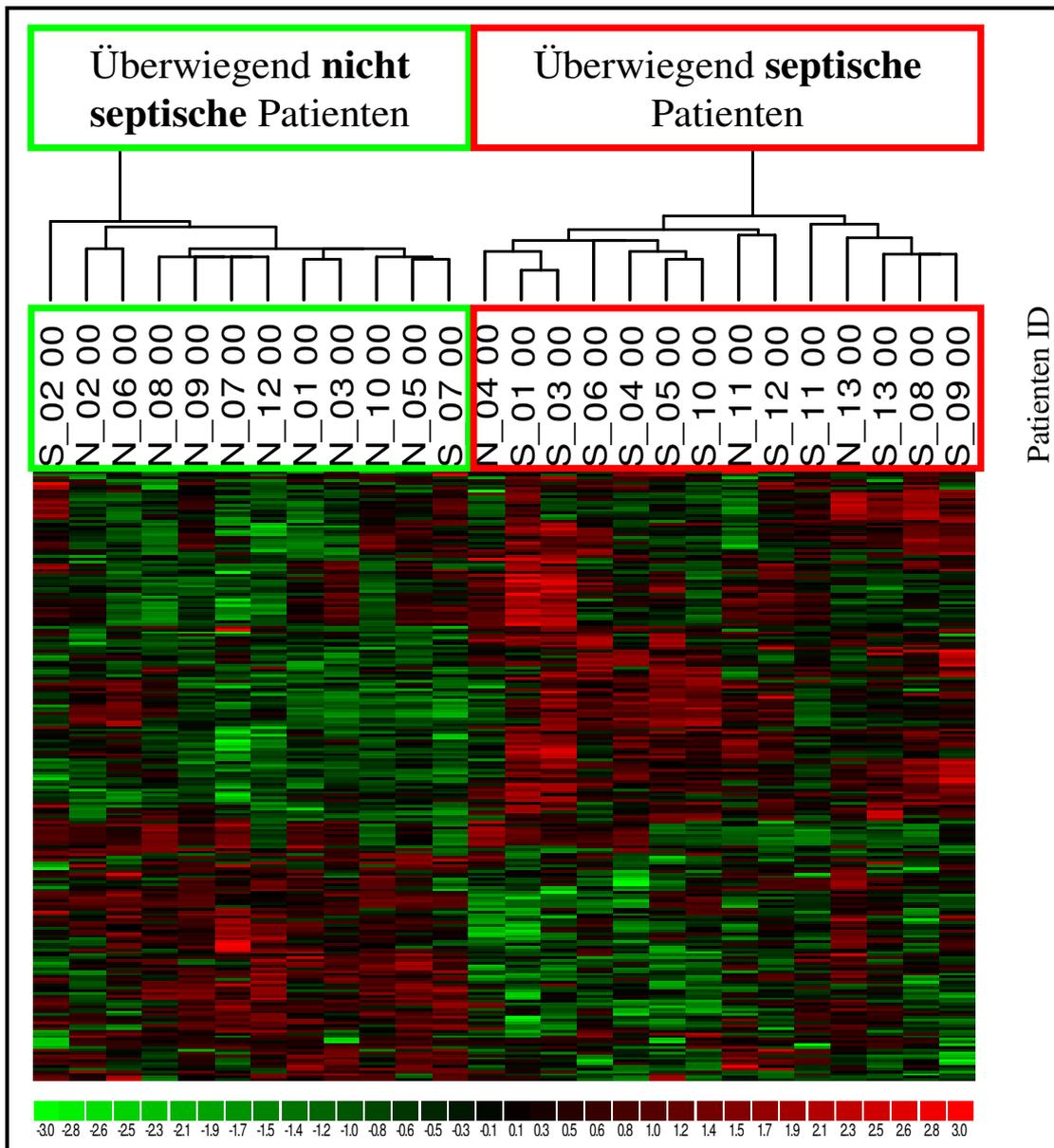


Abbildung 29: Hierarchisches Cluster der signifikant regulierten Gene. Der Stammbaum zeigt, welche Patienten sich in ihrem Expressionsprofil am ähnlichsten sind. Es zeigt sich, dass sich zwei Cluster mit vorwiegend S_Pat und NS_Pat bilden. Dadurch wird deutlich, dass sich Genexpressionsdaten dazu eignen, bereits frühzeitig, d.h. 12 Stunden nach einem Polytrauma, septische (S_Pat) und nicht septische (NS_Pat) Patienten zu differenzieren. (Legende: Rot indiziert eine vermehrte und grün eine verminderte Expression, verglichen mit dem Mittelwert der Genzeile; die Patienten ID S_xx_00 entsprechen im Verlauf septischen Patienten, die Patienten ID N_xx_00 entsprechen im Verlauf nicht septischen Patienten)

Expression ausgewählter Gene im Vergleich S_Pat gegen NS_Pat					
Name	Symbol	FC	FDR	ACCN	Ontologie / Funktion
Zellzyklus					
Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	BAZ1A	2.083	0.007	NM_013448	Zellzyklus
Kelch-like 2, Mayven (Drosophila)	KLHL2	2.029	0.007	NM_007246	Zellzyklus
Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	1.906	0.012	NM_001269	Zellzyklus
Centromere protein E, 312kDa	CENPE	1.734	0.022	NM_001813	Zellzyklus
Cyclin A2	CCNA2	1.683	0.049	NM_001237	Zellzyklus
Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	1.647	0.026	NM_001255	Zellzyklus
Cyclin B1	CCNB1	1.618	0.022	NM_031966	Zellzyklus
Wachstum					
KIAA0101	KIAA0101	1.701	0.017	NM_014736	Wachstum
Hedgehog interacting protein	HHIP	1.613	0.036	AY009951	Wachstum
Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	EIF1AY	-1.501	0.017	NM_004681	Wachstum
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	CAMK2N1	-1.623	0.017	NM_018584	Wachstum
NK3 homeobox 1	NKX3-1	-1.713	0.035	AF247704	Wachstum
Proapoptose					
Annexin A1	ANXA1	1.956	0.021	NM_000700	Proapoptose
Nuclear DNA-binding protein	C1D	1.953	0.004	NM_006333	Proapoptose
Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP8	1.827	0.031	NM_001228	Proapoptose
Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	ROCK1	1.606	0.048	NM_005406	Proapoptose
Synuclein, alpha interacting protein (synphilin)	SNCAIP	1.537	0.014	NM_005460	Proapoptose
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	-1.661	0.050	NM_000686	Proapoptose
Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	DYRK2	-1.780	0.008	NM_006482	Proapoptose
Granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	GZMH	-1.968	0.008	NM_033423	Proapoptose
Granulysin	GNLY	-2.077	0.003	NM_012483	Proapoptose
Antiapoptose					
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	2.054	0.001	NM_001168	Antiapoptose
BCL2-related protein A1	BCL2A1	1.699	0.049	NM_004049	Antiapoptose

Expression ausgewählter Gene im Vergleich S_Pat gegen NS_Pat					
Name	Symbol	FC	FDR	ACCN	Ontologie / Funktion
V-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)	RALB	1.592	0.018	NM_002881	Antiapoptose
WD repeat and SOCS box-containing 1	WSB1	1.514	0.015	NM_015626	Antiapoptose
V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	AKT3	-1.608	0.021	NM_005465	Antiapoptose
Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	SERPINB2	-1.860	0.003	NM_002575	Antiapoptose
XIAP associated factor-1	XAF1	-1.931	0.005	NM_017523	Antiapoptose
Plasminogen activator urokinase	PLAU	-2.402	0	NM_002658	Antiapoptose
Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	SPP1	-2.566	0	NM_000582	Antiapoptose
Immunantwort					
CD163 molecule	CD163	1.688	0.010	NM_004244	Immunantwort
Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	1.902	0.011	NM_005077	Immunantwort
V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4	2.057	0	NM_007268	Immunantwort
Arginase, liver	ARG1	2.379	0	NM_000045	Immunantwort
Interleukin 10	IL10	1.574	0.031	NM_000572	Immunantwort
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	1.700	0.014	NM_031200	Immunantwort
Slit homolog 1 (Drosophila)	SLIT1	-1.541	0.008	AB011537	Immunantwort
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	-1.640	0.028	U20350	Immunantwort
Granulysin	GPLY	-2.077	0.003	NM_012483	Immunantwort
Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	PI3	-2.119	0	NM_002638	Immunantwort
Spondin 2, extracellular matrix protein	SPON2	-2.145	0.001	NM_012445	Immunantwort
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	-2.402	0.000	NM_002658	Immunantwort
Charcot-Leyden crystal protein	CLC	-2.504	0	NM_001828	Immunantwort
Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	SPP1	-2.566	0	NM_000582	Immunantwort
Kreislaufsystem					
Adenosine A3 receptor	ADORA3	2.155	0	AF226731	Kreislaufsystem

Expression ausgewählter Gene im Vergleich S_Pat gegen NS_Pat					
Name	Symbol	FC	FDR	ACCN	Ontologie / Funktion
Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	KCNMA1	1.608	0.001	U11058	Kreislaufsystem
Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	GUCY1A3	-1.648	0.018	NM_000856	Kreislaufsystem
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	-1.661	0.050	NM_000686	Kreislaufsystem
Toll Like Rezeptor					
Toll-like receptor 2	TLR2	1.391	0.566	NM_003264	Toll Like Rezeptor
Toll-like receptor 1	TLR1	1.126	1.168	NM_003263	Toll Like Rezeptor
Toll-like receptor 3	TLR3	1.118	1.039	NM_003265	Toll Like Rezeptor
Toll-like receptor 5	TLR5	1.115	1.113	NM_003268	Toll Like Rezeptor
Toll-like receptor 4	TLR4	1.002	1.022	NM_003266	Toll Like Rezeptor
Potentielle Marker					
Arginase, type 1	ARG1	2.379	0.000	NM_000045	
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	-1.640	0.028	U20350	
Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	COX7A2L	-4.395	0.000	NM_004718	

Tabelle 15: Expression ausgewählter Gene im Vergleich S_Pat gegen NS_Pat

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit veranschaulicht die Ergebnisse einer genomweiten mRNA Analyse nach Polytrauma im Vergleich eines unkomplizierten Verlaufes zu dem einer Sepsis. Zum ersten Mal wurden die Proben, Vollblut zur mRNA Extraktion, bereits 12 Stunden nach dem initialen Trauma gewonnen. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Ergebnisse und Untersuchungen sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Studiendesign

Wir verwendeten zum ersten Mal ein Studiendesign, in welchem Patienten frühzeitig, d.h. 12 Stunden nach einem Polytrauma, rekrutiert wurden, um frühzeitige Unterschiede einer Sepsis vor deren klinischer Manifestation aufzuzeigen. Dieses Design kam aufgrund verschiedener Überlegungen zur Anwendung.

Erstens haben Polytraumapatienten den Vorteil, dass deren Erkrankung einen definierten Krankheitsbeginn beinhaltet, so dass alle Patienten die gleiche Zeit haben, um auf das Ereignis Trauma zu reagieren und sich im Idealfall wieder zu erholen. Weiterhin sind Polytraumapatienten mit Epithel- und Endothelschäden konfrontiert, wodurch sie sich alle mit fremden Materialien, wie z.B. eingedrungenen Erregern, auseinandersetzen müssen.

Diese Vorgehensweise spiegelt die eines Laborexperiments wider, den Stimulus und die darauffolgende Messung, soweit dies in einer solchen Studie möglich ist. Folglich bietet diese Studie einen erheblichen Vorteil gegenüber anderen Sepsisstudien, in denen kritisch kranke Patienten rekrutiert wurden [61] [132] [133]. Diese Patienten haben keinen definierten Erkrankungsbeginn und leiden an verschiedenartigen, zum Teil chronischen Grundkrankheiten. Ihr Organismus ist unterschiedlich lange mit der Krankheit konfrontiert und hat einen dementsprechend unterschiedlichen Reaktionszeitraum.

Zweitens wurden die Polytraumapatienten 12 Stunden nach ihrem traumatischen Ereignis rekrutiert, also 3-5 Tage vor dem potenziellen Auftreten

erster klinischer Symptome der Sepsis. Dies war notwendig, um zu untersuchen, welche Pathomechanismen zu einer Sepsis nach einem Polytrauma führen und nicht, welche Pathomechanismen eine Sepsis ausmachen. Dies ist auch der Grund, warum wir keine gesunden Probanden in unsere Studie aufgenommen haben. Wir haben den Unterschied der physiologischen und pathologischen Polytraumaantwort untersucht (vgl. Abbildung 30).

Die dritte Überlegung war die Verwendung von Vollblut zur mRNA Extraktion, welches nicht organspezifisch ist und eine gemischte Population von weißen Blutzellen beinhaltet. Daraus folgt, dass Regulationen in einzelnen Zellpopulationen evtl. nicht detektierbar sind [134]. Trotzdem birgt das Vollblut auch Vorteile, denn es ist leichter zugänglich, die *PAXGene Methode* ist standardisiert und die Gefahr der *Ex vivo* mRNA Induktion, wie sie bei Verfahren zur Zellseparation besteht, ist geringer [65] [66]. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass dieses System dazu benutzt werden kann, um Immunfunktionen zum Zeitpunkt einer Sepsis zu beschreiben und septische und nicht septische Patienten zu unterscheiden [19] [135].

Dennoch ist eine generelle Limitierung von Mikroarrayexperimenten durch das ausschließliche Messen von mRNA gegeben. Wir haben dargestellt, dass sich die klinischen Daten der einzelnen Patienten zum Zeitpunkt der mRNA Erhebung nur marginal unterscheiden. Da aber die Änderungen der mRNA Menge häufig nicht mit der Änderung der Proteinmenge korreliert, benötigen unsere Ergebnisse eine phänotypische Validierung [136]. Trotzdem konnten wir zentrale pathophysiologische Komponenten anhand der unterschiedlichen mRNA Expression aufzeigen, zu einem Zeitpunkt im posttraumatischen Krankheitsverlauf, an dem bisher keine klinischen phänotypischen Unterschiede bekannt sind. Dies zeigt, dass das mRNA Profil Hinweise auf Regulationen geben kann, bevor diese klinisch manifest werden. Somit kann ein entscheidender Zeitvorteil gegenüber klassischen phänotypbasierten Untersuchungsmethoden erzielt werden.

Wie viele Patienten notwendig sind, um eine valide Aussage in einem Mikroarrayexperiment treffen zu können, wurde in der Vergangenheit immer wieder diskutiert. Es gibt statistische Berechnungen, welche bei unserer

Zielsetzung von 13 Proben pro Gruppe ausgehen [¹³⁷]. Nichtsdestotrotz müssen unsere Ergebnisse an einer größeren Kohorte validiert werden. Die Validierung muss aber nicht zwangsläufig mit teuren Mikroarrays erfolgen, sondern kann auch kostengünstig mit wenigen Genen als RT-PCR durchgeführt werden, da die Gene von Interesse bereits in dieser Kohorte identifiziert worden sind.

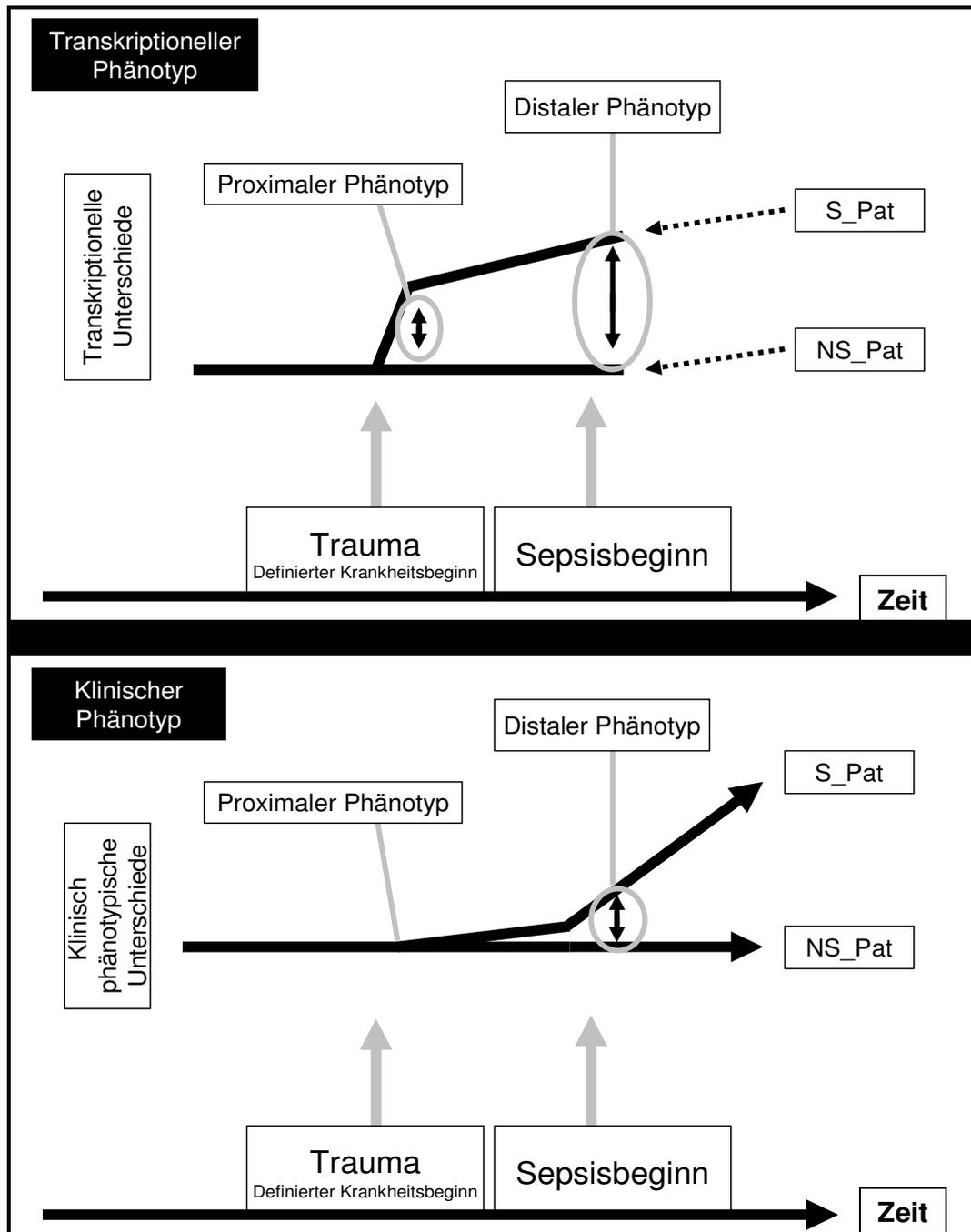


Abbildung 30: Vergleich der klinisch- und transkriptionell phänotypischen Reaktion: Der klinische Unterschied des proximalen Phänotyps, kurze Zeit nach einem Trauma, ist sehr gering, transkriptionell ist er aber schon signifikant. Der distale Phänotyp, 3-5 Tage später, unterscheidet sich sowohl klinisch als auch transkriptionell bei septischen (S_Pat) und nicht septischen (NS_Pat) Patienten. Das Messen von mRNA ermöglicht es, zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine klinisch phänotypischen Unterschiede existieren, transkriptionell unterschiedliche Regulationen zu erfassen und somit potentiell ursächliche Regulationen für eine Sepsis aufzuzeigen.

4.2 Klinische Daten

Die klinischen Daten der in die Mikroarrayanalyse eingeschlossenen Patienten unterscheiden sich nur marginal bei Aufnahme auf die Intensivstation. Der ISS Score ist in beiden Gruppen nicht signifikant verschieden. Lediglich der APACHE-II Score ist signifikant höher in S_Pat. Da der absolute mediane Unterschied aber 2,8 Punkte beträgt, ist dieser Unterschied bei einer Scoreskala des APACHE-II von 0 - 71 Punkten [¹³⁸], obwohl er signifikant ist, als vernachlässigbar klein anzusehen.

Auch die anderen erhobenen klinischen Parameter und Laborparameter zeigen, dass beide Gruppen sehr ähnlich sind. Lediglich die Anzahl der Thrombozyten und die Atemfrequenz unterscheiden sich signifikant in den beiden Gruppen zum Zp0.

Im posttraumatischen Verlauf zeigt sich zum ZpSepsis ein größerer Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen. Die für eine Sepsis und Infektion charakteristischen Laborwerte CRP und Leukozyten sind erhöht. Weiterhin sind der MODS und APACHE-II Score erhöht. Wir können deshalb davon ausgehen, dass wir Patienten eingeschlossen haben, die, obwohl sie sich initial bei Aufnahme auf die Intensivstation klinisch nur marginal unterscheiden, später mit einem posttraumatisch unterschiedlichen Verlauf konfrontiert sind.

4.3 Mikroarraydaten

4.3.1 Qualitätssicherung

Die Qualitätssicherung stellt einen entscheidenden Schritt in der Mikroarrayanalyse dar. Wir etablieren einen neuen modularen Arbeitsablauf, welcher einzelne Ausreißerwerte identifiziert und eliminiert. Obwohl die mRNA vor der Hybridisierung qualitativ untersucht wird und jeder einzelne Messpunkt durch die Morphologie der einzelnen Messpunkte einer eigenen Qualitätskontrolle unterliegt, kann es zu systematischen sowie individuellen Fehlern bei der Herstellung und dem Verarbeiten von Mikroarrays kommen.

Die systematischen Fehler werden durch das MOFilter- und MVA-Plot Modul erfasst, da hier untersucht wird, wie sich einzelne Arrays gegeneinander verhalten [⁶⁸]. Werden hierbei aber Arrays als fehlerhaft analysiert, gibt es

bisher nur die Möglichkeit, die Daten zu verwerfen. Unsere Methode erlaubt es, einzelne Ausreißerwerte zu identifizieren und daraufhin diese einzelnen Werte zu löschen und mit der SKNN Routine zu imputieren.

Es wurde gezeigt, dass mit der SKNN Routine fehlende Werte in einem großen Datenset mit einer hohen Verlässlichkeit imputiert werden können. Darüber hinaus bietet SKNN gegenüber anderen Methoden, wie dem klassischen *K Nearest Neighbor* (KNN), erhebliche Vorteile [69]. Folglich ist es wahrscheinlich, dass ein als „Ausreißer“ markierter und gelöschter Wert richtiger als zuvor errechnet wird, zumal die Markierung als Ausreißer nur erfolgt, wenn Werte einzelner technischer Replikate unplausibel sind.

Durch die Anwendung unserer Methode, des Ausreißerwerte Filtermoduls, wird gezeigt, dass die absolute prozentuale Anzahl an Ausreißerwerten im vorliegenden Beispiel um bis zu 1,5 Prozentpunkte in qualitativ schlechteren Arrays reduziert wird. Dies entspricht einer relativen Ausreißerreduktion von bis zu 35 Prozent, wodurch die Qualität der Daten deutlich erhöht wird.

Die Methode des Ausreißerwerte Filtermoduls kann jedoch nur angewendet werden, wenn die einzelnen Gruppen relativ groß sind, da die Berechnung der Standardabweichung nicht geeignet ist, für kleine Gruppen Ausreißer zu detektieren. Falls z.B. bei gepoolten Laborversuchen nur wenige Arrays zur Verfügung stehen, ist für die Zukunft geplant, Ausreißer anhand anderer statistischer Mittel zu erkennen. Trotzdem können die anderen Teile der Qualitätssicherung auch bei kleinen Gruppen als reduzierter Arbeitsablauf, ohne das Ausreißerwerte Filtermodul, angewendet werden.

Um die Anwendung der oben genannten Qualitätssicherungspipeline zu vereinfachen, wurde ein Programm entwickelt, welches die von uns entwickelten Programmteile automatisiert ausführt und so eine schnelle und einfache Ausführung durch eine einfach zu bedienende graphische Oberfläche ermöglicht.

Die genannte Qualitätssicherungspipeline wurde bereits komplett [56] sowie als reduzierter Arbeitsablauf für wenige Arrays [139] angewendet und publiziert.

Im weiteren Verlauf kamen die Quantilen Normalisierung und das Programm Rankprodukt zur Anwendung. Die Quantilen Normalisierung stellt eine Methode dar, die den anderen Normalisierungsmethoden wie der Kontrast Methode oder

der *Cyclic Loess* Methode in Experimenten mit einem einzelnen Zeitpunkt überlegen ist. Darüber hinaus ist die Quantilen Normalisierung auch die technisch einfachste Methode, wobei sie sich unter anderem durch eine sehr geringe Rechenzeit auszeichnet [71] [140].

Das Programm Rankprodukt ist ein Perl-Softwareskript, welches in der Lage ist, Unterschiede zwischen zwei Experimenten auch bei wenigen Replikaten verlässlich aufzuzeigen. Es bietet klare Vorteile gegenüber modernen t-Test basierten Methoden, vor allem bei Experimenten mit einer geringen Anzahl an Replikaten [72] [141].

Die Mikroarraydaten wurden darüber hinaus unabhängig mittels RT-PCR erfolgreich validiert.

4.3.2 Eigenschaften der signifikant regulierten Gene

In einem ersten Schritt wurde die Lokalisation der signifikant regulierten Gene auf dem Chromosom untersucht, um so eventuelle *Hot Spots* zu identifizieren. Hier zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Chromosom.

Die darauffolgende Zuordnung zu den *Pathways* zeigte bereits eine Involvierung verschiedenster Kategorien. Kategorien, welche an der Immunantwort, Blutgerinnung und dem Zellzyklus beteiligt sind, konnten auch mit der Analyse überrepräsentierter Kategorien bestätigt werden.

Die Überrepräsentierung bietet eine bessere Methode, regulierte biologische Funktionen zu erfassen, da die Identifizierung überrepräsentierter Kategorien zusätzlich die Gene, welche nicht differenziell reguliert sind, in die Berechnung mit einbezieht. Dies bietet den Vorteil, dass diese Informationen zur Berechnung einer Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Regulation herangezogen werden können.

Die überrepräsentierten Kategorien zeigen, welche biologischen Prozesse mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit differenziell reguliert sind. Insgesamt wurden 21 GO-Term biologische Prozess Kategorien und 2 KEGG-*Pathways* durch DAVID als überrepräsentiert identifiziert. Von diesen identifizierten Kategorien sind einige bekannt dafür, dass sie eine Rolle in der Pathophysiologie einer Sepsis spielen. Dies deutet darauf hin, dass diese Mechanismen transkriptionell bereits zu einem frühen Zeitpunkt, also

12 Stunden nach einem Trauma, differenziell reguliert sind, obwohl sich die phänotypischen Unterschiede erst 3-5 Tage später zeigen.

4.3.3 Differenziell regulierte biologische Funktionen

Eines der Hauptergebnisse dieser Studie ist, dass der *Shift* hin zu einer TH2 dominierenden Immunantwort bereits 12 Stunden nach einem Trauma initiiert ist.

Es ist bekannt, dass ein Trauma zu einer TH2 Dominanz führt und diese TH2 Dominanz aufgrund des zeitlichen Zusammenhanges mit dem Trauma assoziiert zu sein scheint [26]. Da wir Polytraumapatienten untersuchen, sind alle Patienten mit einem Trauma und der folgenden TH2 Dominanz konfrontiert. Interessanterweise ist diese TH2 Dominanz aber in S_Pat, auf mRNA Ebene, stärker ausgeprägt, als in den NS_Pat. Weiterhin wird vermutet, dass eine Sepsis durch das Fehlen von Genen, welche die TH1 Antwort fördern, ausgelöst wird [142]. Genau dieses vermutete Fehlen von Genen können wir bereits 12 Stunden nach dem Polytrauma aufzeigen.

Wir zeigen, dass die TH2 Dominanz bereits 12 Stunden nach einem Trauma induziert ist. Dies wird dadurch deutlich, dass nur Gene vermindert exprimiert sind, die eine TH1 Antwort fördern, während die vermehrt exprimierten Gene beides, eine TH1 und TH2 Antwort, hemmen.

Diese genetische Regulation, das Fehlen TH1 fördernder Gene, scheint eine entscheidende Rolle im gesamten Krankheitsverlauf einer Sepsis zu spielen. Diese Regulation wurde schon in verschiedenen Blutzellen zum Zeitpunkt nach der klinischen Manifestation einer Sepsis nachgewiesen [61] [143] [144]. Parallel dazu dominiert aber auch phänotypisch zum Zeitpunkt einer Sepsis eine TH2 Antwort [145] [146], was mit dem Auftreten infektiöser Komplikationen assoziiert ist [147]. Durch diese Assoziation kann die Regulation hin zu einer TH2 Dominanz direkt zum septischen Geschehen beitragen.

Weiterhin zeigen wir, dass in S_Pat eine Aktivierung des Zellzyklus auf mRNA Ebene dominiert. Es ist bereits bekannt, dass zum Zeitpunkt einer Sepsis verschiedene proliferationsfördernde Mechanismen aktiviert sind. Zum einen wurde im Tierversuch gezeigt, dass Knochenmarkzellen eine gesteigerte Proliferation zum Zeitpunkt einer Sepsis aufweisen [148]. Weiterhin, dass das

Serum von polytraumatisierten Patienten zu einer vermehrten Proliferation von Fibroblasten führt [149]. Aufgrund der Tatsache, dass wir Vollblut in unserer Mikroarrayanalyse verwenden, ist es aber sehr wahrscheinlich, dass wir fast ausschließlich Regulationen des Immunsystems erfassen. Die Aktivierung des Zellzyklus auf mRNA Ebene könnte somit Ausdruck der späteren vermehrten Proliferation von Lymphozyten sein, die zum Zeitpunkt einer Sepsis [150] und in traumatisierten und infizierten Patienten [151] bereits beschrieben wurde.

Trotz dieser massiven Aktivierung der Lymphozytenproliferation ist zum Zeitpunkt einer Sepsis die proliferative Nettokapazität von Lymphozyten reduziert [152] [153]. Dies wird, trotz aktivierter Proliferation, auf eine massive lymphozytäre Apoptose zum Zeitpunkt einer Sepsis zurückgeführt [154], was den charakteristischen erhöhten Zellumsatz zum Zeitpunkt einer Sepsis mitverursacht [148]. Dieser apoptotische Prozess scheint aber 12 Stunden nach einem Trauma noch nicht aktiviert zu sein. Obwohl einige apoptotische Gene differenziell reguliert sind und die Apoptose in der *Pathwayanalyse* auftaucht, scheint die Apoptose in ihrer Funktion noch nicht richtungsweisend differenziell reguliert zu sein. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die zentralen Moleküle der Apoptose, P53 und Bcl-xL, als nicht differenziell aktiviert in der DEEP Analyse vorhergesagt werden.

Ebenso ist bekannt, dass die Dysregulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle in der TH1 / TH2 Regulation, hin zu einer TH2 Dominierung, spielt. Dies wurde anhand von SIV Infektionen bei Affen gezeigt [155]. Dieser Zusammenhang konnte durch *Ingenuity* visualisiert werden. Dadurch wird deutlich, dass die differenzielle Regulierung des Zellzyklus darüber hinaus zusätzlich direkt zu dem TH2 dominierenden Geschehen beitragen könnte.

Weiterhin war die Kategorie kreislaufsystemassoziierter Gene überrepräsentiert. Da gezeigt wurde, dass Abweichungen von der normalen Zirkulationsrate des Blutes mit einer höheren Mortalität einer Sepsis einhergehen [156], könnten Regulationen von Genen, die das Kreislaufsystem beeinflussen, eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin könnte die vermehrte Aktivierung des Komplementsystems und die gehemmte Fibrinolyse, welche zum Zeitpunkt einer Sepsis bekannt ist [157] [158], diesen Effekt der

Kreislaufdysregulation durch eine vermehrte Thrombenbildung und eine erhöhte Permeabilität der Gefäße begünstigen [23].

Darüber hinaus spielt Adenosin in der Sepsis eine wichtige Rolle. Die Aktivierung des Adenosinrezeptors, welcher durch das vermehrt exprimierte Gen ADORA3 kodiert wird, wird als protektiver Faktor im septischen Mausmodell beschrieben [159].

Andere Mechanismen scheinen zu diesem frühen Zeitpunkt aber noch keine Rolle zu spielen. Dazu gehört unter anderem die Hemmung mitochondrialer Gene [160] [161], obwohl gezeigt wurde, dass Endotoxin in gesunden Menschen mitochondriale mRNA der Atmungskette signifikant verringert [162]. Ferner finden wir einerseits keinen Hinweis für eine differenzielle mRNA Regulation von TLR's, obwohl verschiedene TLR's 12 Stunden vor dem Ausbruch einer Sepsis in SIRS Patienten als vermehrt exprimiert beschrieben wurden [163]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TLR's auf mRNA- und Proteinebene zum Zeitpunkt einer Sepsis in septischen Patienten und in experimentellen Modellen der Sepsis vermehrt exprimiert sind [164] [165]. Andererseits gibt aber die *Pathwayanalyse* Hinweise auf eine Regulation des TLR-Signalweges. Weiterhin sagt die DEEP Analyse eine erhöhte Aktivität des TLR4-Signalweges zum Zp0 in später septischen Patienten voraus. Dies deutet darauf hin, dass die vermehrte mRNA Expression von TLR erst im späten Verlauf eines septischen Geschehens aktiviert wird.

Bewusst sei aber darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse der DEEP Analyse eine Validation benötigen, da dieses Programm erst kürzlich entwickelt wurde und noch keine Erfahrungswerte über die Genauigkeit dieser Vorhersagen bestehen.

4.3.4 Bekannte mRNA Regulationen

Bereits bekannte Regulationen einer Sepsis finden schon 12 Stunden nach dem Polytrauma, also ca. 3-5 Tage vor der Manifestation klinisch septischer Zeichen, statt.

Die vermehrte Expression der Gene IL18R1, IL1R1, IL1R2 und BCL2A1 wurde erst kürzlich als vermehrt exprimiert in septischen Patienten, 0 - 48 Stunden vor

dem Auftreten klinischer Symptome, beschrieben [132]. Wir zeigen, dass diese vermehrte Expression bereits noch früher vor dem septischen Ereignis beginnt.

Weiterhin wurde die vermehrte Expression der Gene VNN1, ITGA7, HPGD, RPS27L und die verminderte Expression von MME als signifikant in Neutrophilen zum Zeitpunkt einer Sepsis beschrieben [61]. Wir können zeigen, dass diese Regulation schon zu einem viel früheren Zeitpunkt im Vollblut nachweisbar ist.

4.3.5 Biomarker

Ziel von Biomarkern ist es, anhand einiger weniger Marker oder Surrogatmarker eine Krankheit, hier Sepsis, zu diagnostizieren oder vorherzusagen.

Der Rezeptor CX3CR1 wurde schon im Zusammenhang mit Sepsis untersucht. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle in der Abwehr einer septischen bakteriellen Peritonitis spielt [166]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die verminderte Expression des Rezeptors mit einer höheren Mortalität in septischen Patienten assoziiert ist [167] und diese als ein Teil der durch die Sepsis induzierten Immunsuppression angesehen wird [130]. Da wir zeigen, dass dieser Rezeptor bereits 3-5 Tage vor dem septischen Event vermindert exprimiert ist, könnte dieser als früher Surrogatmarker für die Immunsuppression einer Sepsis dienen.

Das Gen COX7A2L ist Teil der letzten Komponente der Atmungskette und mitverantwortlich für dessen strukturellen Aufbau. Die mitochondriale Energieverwertung ist zum Zeitpunkt einer Sepsis trotz eines adäquaten Sauerstoffangebots gestört [168] [169]. Es wird vermutet, dass dieses Gen zu einer vermehrten Energieproduktion in Krebszellen auf regulatorischer Ebene führt. Folglich kann die verminderte Expression ein früher Hinweis auf eine später gestörte Energieproduktion mit darauffolgender gestörter Sauerstoffverwertung in S_Pat sein.

Sollte sich die Annahme bestätigen, dass das Gen COX7A2L eine entscheidende Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes spielt, bietet sich die Möglichkeit einer vielversprechenden therapeutischen Intervention. Bei diesem einzelnen Gen, welches den Energiehaushalt regelt, ist eine pharmakologische Intervention in der nahen Zukunft denkbar.

Weiterhin ist bekannt, dass ARG1 extrazellulär in der Entzündungsphase akkumuliert und so zu einer Immunsuppression beiträgt [170]. Darüber hinaus wurde im Laborversuch gezeigt, dass bereits die in Erythrozytenkonzentraten enthaltene Arginase einen supprimierenden Effekt auf das Immunsystem hat [96]. Zum Zeitpunkt einer Sepsis herrscht ein Arginin defizienter Status vor, weshalb Arginin als essentielle Aminosäure in einer Sepsis angesehen wird [171]. Dieses Defizit wird hauptsächlich durch den Katabolismus des Arginasestoffwechsels ausgelöst und führt dazu, dass Arginin nicht mehr für die NO-Synthese zur Verfügung steht. Dies führt unter anderem zu einer gestörten Mikrozirkulation und Organperfusion [131]. Folglich könnte die vermehrte Expression von ARG1 dem Katabolismus von Arginin vorausgehen und so frühzeitige Hinweise auf eine mögliche Sepsis geben.

Da ARG1 in den S_Pat bereits zum Zp0 vermehrt exprimiert ist, zeigt das, dass dieser Mechanismus bereits frühzeitig initiiert ist und so eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer Sepsis spielen könnte. Durch die frühzeitige Identifikation dieser Patienten bietet sich die potentielle Möglichkeit einer präventiven Intervention, zumal Arginin als Aminosäure einfach substituiert werden könnte.

Die Identifizierung dieser mRNA Transkripte bietet die Möglichkeit der klinischen Applikation auf drei Ebenen. Erstens auf Gen-Ebene mithilfe von Assoziationsstudien, zweitens auf mRNA-Ebene mithilfe der RT-PCR und drittens auf Genprodukt-Ebene mithilfe von Antikörpern oder funktionellen Assays. Es ist aber wahrscheinlich, dass nicht ein einzelnes Gen, dessen mRNA oder Genprodukt als Biomarker geeignet sein wird, eine spätere Sepsis zu diagnostizieren oder vorherzusagen. Dennoch bietet die Kombination einiger weniger Gene oder deren mRNA oder Genprodukte potentiell eine solche Möglichkeit, Patienten mit einem erhöhten Risiko zu identifizieren und dementsprechend frühzeitig zu therapieren. Schon heute kann mithilfe der RT-PCR innerhalb von Stunden mRNA semiquantitativ gemessen werden, was eine klinische Applikation begünstigen wird.

4.3.6 Clusteranalyse

Mithilfe der Clusteranalyse ist es in der Vergangenheit gelungen, unterschiedliche Patienten anhand von Genexpressionsdaten in Gruppen einzuteilen [172] [173]. Unsere Clusteranalyse zeigt, dass die Patienten anhand

der signifikant differenziell exprimierten Gene in zwei Gruppen aufgeteilt werden können. Diese beiden Gruppen zeigen Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihres späteren klinischen Verlaufs.

Durch die Anwendung der Clusteranalyse wird deutlich, dass die Unterscheidung zwischen einem septischen und nicht septischen Verlauf bereits 12 Stunden nach einem Polytrauma generell möglich ist. Aufgrund unseres kleinen Patientenkollektivs ist allerdings die Möglichkeit der Entwicklung eines Vorhersagemodells limitiert. Trotzdem könnte, begünstigt durch die gute Verfügbarkeit von Vollblut, eine klinische Anwendung in der nahen Zukunft möglich sein.

5 Fazit

Die Mikroarray-Technologie erlaubt detaillierte Einblicke in die Zellbiologie durch die Generierung umfangreicher Datensätze. Obwohl zahlreiche kommerzielle und öffentliche Softwarelösungen zur abschließenden statistischen und bioinformatischen Analyse der Mikroarray-Daten existieren (Annotierung, *Pathwayanalysen*), gibt es kaum Software, die eine vorgeschaltete Qualitätssicherung dieser Hochdurchsatzdaten erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden statische und bioinformatische Module für die Vor-Analyse von Mikroarray-Daten entwickelt, um diese einer Qualitätskontrolle zu unterziehen. Mit Hilfe dieser Module können minderwertige Mikroarray-Daten eliminiert und damit Verzerrungen der biologischen Interpretation vermieden werden. Diese Module der Vor-Analyse wurden mit bereits etablierten Softwarelösungen zur Interpretation der Mikroarray-Daten kombiniert und zu einer Analyse-Pipeline weiterentwickelt.

Mithilfe dieser Pipeline ist es gelungen, eine transkriptionelle Signatur für die Entwicklung einer Sepsis bereits 12 Stunden nach einem Polytrauma sichtbar zu machen, obwohl die Sepsis sich erst 3-5 Tage später klinisch manifestiert.

Da dieser „molekulare Phänotyp“ für die Sepsis sich zeitlich früher darstellt als der klinische Phänotyp, kann er sich als Frühmarker der Sepsis eignen.

Als zentraler Mechanismus dieser Sepsis-Signatur kristallisierte sich die fehlende TH1 Antwort in später septischen Patienten heraus. Dieses Fehlen mit darauffolgender dominierender TH2 Antwort konnte als bedeutsamster proseptischer Faktor identifiziert werden.

Die Gene, die in der Sepsis-Signatur enthalten sind, stellen nicht nur potentielle frühe diagnostische Marker der Sepsis dar, sondern geben auch Hinweise auf zukünftige therapeutische Ziele zur Vorbeugung und Behandlung der Sepsis.

Literaturverzeichnis

1. J. Meier and O. Habler, "The polytrauma patient in the intensive care unit," *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* **42**, 724-730 (2007).
2. R. J. Goris, "Conclusions of the workshops held during the Second International Congress on The Integrated Approach to Trauma Care, Nijmegen, May 1995," *Eur. J. Emerg. Med.* **2**, 236-238 (1995).
3. A. Sauaia, F. A. Moore, E. E. Moore, K. S. Moser, R. Brennan, R. A. Read, and P. T. Pons, "Epidemiology of trauma deaths: a reassessment," *J. Trauma* **38**, 185-193 (1995).
4. Kreymann, G. and Wolf, M. History and definition of sepsis--do we need new terminology? *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* **31**[1], 9-14. 1996.
5. H. Schottmüller, "Wesen und Behandlung der Sepsis," *Verhandl dt Kongress Inn Med* **31**, 257-280 (1914).
6. "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.* **20**, 864-874 (1992).
7. M. M. Levy, M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, and G. Ramsay, "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference," *Crit Care Med.* **31**, 1250-1256 (2003).
8. P. E. Marik, "Definition of sepsis: not quite time to dump SIRS?," *Crit Care Med.* **30**, 706-708 (2002).
9. D. C. Angus, D. Burgner, R. Wunderink, J. P. Mira, H. Gerlach, C. J. Wiedermann, and J. L. Vincent, "The PIRO concept: P is for predisposition," *Crit Care* **7**, 248-251 (2003).
10. C. Meisel, C. Hoflich, and H. D. Volk, "[Immune monitoring in SIRS and sepsis based on the PIRO model]," *Dtsch. Med. Wochenschr.* **133**, 2332-2336 (2008).
11. H. Schuster and U. Müller-Werdan, "Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen in Sepsis und MODS," in *Sepsis und MODS*, (Springer Berlin Heidelberg, 2005), pp. 3-22.

12. O. Moerer, L. de Rossi, R. Rossaint, and H. Burchardi, "Epidemiologische und ökonomische Aspekte der Sepsis," in *Sepsis und MODS*, (Springer Berlin Heidelberg, 2005), pp. 135-140.
13. F. M. Brunkhorst, "Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)," *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* **41**, 43-44 (2006).
14. C. Engel, F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart, "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study," *Intensive Care Med.* **33**, 606-618 (2007).
15. J. Macdonald, H. F. Galley, and N. R. Webster, "Oxidative stress and gene expression in sepsis," *Br. J. Anaesth.* **90**, 221-232 (2003).
16. O. Moerer and H. Burchardi, "Epidemiologie und Kosten der Sepsis," *kliniker* **33**, 177-180 (2004).
17. D. C. Angus, W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky, "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care," *Crit Care Med.* **29**, 1303-1310 (2001).
18. W. C. Aird, "The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome," *Blood* **101**, 3765-3777 (2003).
19. M. Prucha, A. Ruryk, H. Boriss, E. Moller, R. Zazula, I. Herold, R. A. Claus, K. A. Reinhart, P. Deigner, and S. Russwurm, "Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics," *Shock* **22**, 29-33 (2004).
20. F. M. Brunkhorst, "Leitlinien Sepsis- Update 2007," *MedReport* **31**, 4 (2007).
21. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland - Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen - Fachserie 12 Reihe 4 - 2005. (2007).
22. M. Bardenheuer, U. Obertacke, C. Waydhas, and D. Nast-Kolb, "Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU," *Unfallchirurg* **103**, 355-363 (2000).

23. J. Cohen, "The immunopathogenesis of sepsis," *Nature* **420**, 885-891 (2002).
24. R. Medzhitov, "Toll-like receptors and innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145 (2001).
25. R. S. Hotchkiss and I. E. Karl, "The pathophysiology and treatment of sepsis," *N. Engl. J. Med.* **348**, 138-150 (2003).
26. T. J. Murphy, H. M. Paterson, J. A. Mannick, and J. A. Lederer, "Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses," *J. Leukoc. Biol.* **75**, 400-407 (2004).
27. A. Berger, "Th1 and Th2 responses: what are they?," *BMJ* **321**, 424 (2000).
28. H. Takahashi, Y. Tsuda, M. Kobayashi, D. N. Herndon, and F. Suzuki, "CCL2 as a trigger of manifestations of compensatory anti-inflammatory response syndrome in mice with severe systemic inflammatory response syndrome," *J. Leukoc. Biol.* **79**, 789-796 (2006).
29. U. Muller-Werdan, "Septic shock and systemic inflammatory response syndrome--diagnosis," *Dtsch. Med. Wochenschr.* **128**, 2368-2371 (2003).
30. P. Henneke and D. T. Golenbock, "Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells," *Crit Care Med.* **30**, S207-S213 (2002).
31. M. Schouten, W. J. Wiersinga, M. Levi, and P. T. van der, "Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis," *J. Leukoc. Biol.* **83**, 536-545 (2008).
32. J. L. Vincent, "Microvascular endothelial dysfunction: a renewed appreciation of sepsis pathophysiology," *Crit Care* **5**, 1-5 (2001).
33. A. G. Tsiotou, G. H. Sakorafas, G. Anagnostopoulos, and J. Bramis, "Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective," *Med. Sci. Monit.* **11**, RA76-RA85 (2005).
34. A. M. Sutherland and K. R. Walley, "Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis," *Crit Care* **13**, 210 (2009).
35. A. Namath and A. J. Patterson, "Genetic polymorphisms in sepsis," *Crit Care Clin.* **25**, 835-56, x (2009).
36. H. Tscherne, H. J. Oestern, and J. Sturm, "Osteosynthesis of major fractures in polytrauma," *World J. Surg.* **7**, 80-87 (1983).

37. F. Gebhard and M. Huber-Lang, "Polytrauma-pathophysiology and management principles," *Langenbecks Arch. Surg.* (2008).
38. S. Gould, M. J. Cimino, and D. R. Gerber, "Packed red blood cell transfusion in the intensive care unit: limitations and consequences," *Am. J. Crit Care* **16**, 39-48 (2007).
39. J. R. Dunne, D. L. Malone, J. K. Tracy, and L. M. Napolitano, "Allogenic blood transfusion in the first 24 hours after trauma is associated with increased systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and death," *Surg. Infect. (Larchmt.)* **5**, 395-404 (2004).
40. J. L. Vincent, J. Carlet, and S. M. Opal, *The sepsis Text*, (Kluwer Academic Publishers, 2002).
41. A. E. Baue, "Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s," *Arch. Surg.* **110**, 779-781 (1975).
42. J. R. Border, R. Chenier, R. H. McManamy, D. J. La, R. Seibel, R. Birkhahn, and L. Yu, "Multiple systems organ failure: muscle fuel deficit with visceral protein malnutrition," *Surg. Clin. North Am.* **56**, 1147-1167 (1976).
43. F. B. Cerra, J. H. Siegel, B. Coleman, J. R. Border, and R. R. McMenamy, "Septic autocannibalism. A failure of exogenous nutritional support," *Ann. Surg.* **192**, 570-580 (1980).
44. R. J. Goris, T. P. te Boekhorst, J. K. Nuytinck, and J. S. Gimbere, "Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation?," *Arch. Surg.* **120**, 1109-1115 (1985).
45. F. A. Moore, A. Sauaia, E. E. Moore, J. B. Haenel, J. M. Burch, and D. C. Lezotte, "Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon," *J. Trauma* **40**, 501-510 (1996).
46. G. Regel, M. Grotz, T. Weltner, J. A. Sturm, and H. Tscherne, "Pattern of organ failure following severe trauma," *World J. Surg.* **20**, 422-429 (1996).
47. A. Lever and I. Mackenzie, "Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis," *BMJ* **335**, 879-883 (2007).
48. B. Uzzan, R. Cohen, P. Nicolas, M. Cucherat, and G. Y. Perret, "Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis," *Crit Care Med.* **34**, 1996-2003 (2006).

49. S. M. Yoo, J. Y. Choi, J. K. Yun, J. K. Choi, S. Y. Shin, K. Lee, J. M. Kim, and S. Y. Lee, "DNA microarray-based identification of bacterial and fungal pathogens in bloodstream infections," *Mol. Cell Probes* **24**, 44-52 (2010).
50. P. Tissari, A. Zumla, E. Tarkka, S. Mero, L. Savolainen, M. Vaara, A. Aittakorpi, S. Laakso, M. Lindfors, H. Piiparinen, M. Maki, C. Carder, J. Huggett, and V. Gant, "Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study," *Lancet* **375**, 224-230 (2010).
51. K. Reinhart, F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, H. Gerlach, M. Gruending, G. Kreyman, P. Kujath, G. Marggraf, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, C. Peckelsen, C. Putensen, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, and K. Werdan, "Diagnose und Therapie der Sepsis: S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V.," *Deutsche Sepsis-Gesellschaft e. V.* 1-40 (2005).
52. W. Ertel, M. Keel, D. Marty, R. Hoop, A. Safret, R. Stocker, and O. Trentz, "Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients," *Unfallchirurg* **101**, 520-526 (1998).
53. A. E. Baue, "Multiple organ failure--the discrepancy between our scientific knowledge and understanding and the management of our patients," *Langenbecks Arch. Surg.* **385**, 441-453 (2000).
54. "Finishing the euchromatic sequence of the human genome," *Nature* **431**, 931-945 (2004).
55. M. M. Wurfel, "Microarray-based analysis of ventilator-induced lung injury," *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**, 77-84 (2007).
56. T. Menges, I. R. Konig, H. Hossain, S. Little, S. Tchatalbachev, F. Thierer, H. Hackstein, I. Franjkovic, T. Colaris, F. Martens, K. Weismuller, T. Langefeld, J. Stricker, G. Hempelmann, P. E. Vos, A. Ziegler, B. Jacobs, T. Chakraborty, and G. Bein, "Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor," *Crit Care Med.* **36**, 1456 (2008).
57. S. Paik, S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F. L. Baehner, M. G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E. R. Fisher, D. L. Wickerham, J. Bryant, and N. Wolmark, "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer," *N. Engl. J. Med.* **351**, 2817-2826 (2004).
58. Y. Hu, L. M. Hines, H. Weng, D. Zuo, M. Rivera, A. Richardson, and J. LaBaer, "Analysis of genomic and proteomic data using advanced literature mining," *J. Proteome. Res.* **2**, 405-412 (2003).

59. T. P. Chung, J. M. Laramie, D. J. Meyer, T. Downey, L. H. Tam, H. Ding, T. G. Buchman, I. Karl, G. D. Stormo, R. S. Hotchkiss, and J. P. Cobb, "Molecular diagnostics in sepsis: from bedside to bench," *J. Am. Coll. Surg.* **203**, 585-598 (2006).
60. V. Bogner, C. Kirchhoff, H. V. Baker, J. C. Stegmaier, L. L. Moldawer, W. Mutschler, and P. Biberthaler, "Gene expression profiles are influenced by ISS, MOF, and clinical outcome in multiple injured patients: a genome-wide comparative analysis," *Langenbecks Arch. Surg.* **392**, 255-265 (2007).
61. B. M. Tang, A. S. McLean, I. W. Dawes, S. J. Huang, and R. C. Lin, "The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis," *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **176**, 676-684 (2007).
62. R. Shippy, S. Fulmer-Smentek, R. V. Jensen, W. D. Jones, P. K. Wolber, C. D. Johnson, P. S. Pine, C. Boysen, X. Guo, E. Chudin, Y. A. Sun, J. C. Willey, J. Thierry-Mieg, D. Thierry-Mieg, R. A. Setterquist, M. Wilson, A. B. Lucas, N. Novoradovskaya, A. Papallo, Y. Turpaz, S. C. Baker, J. A. Warrington, L. Shi, and D. Herman, "Using RNA sample titrations to assess microarray platform performance and normalization techniques," *Nat. Biotechnol.* **24**, 1123-1131 (2006).
63. A. J. Holloway, R. K. van Laar, R. W. Tothill, and D. D. Bowtell, "Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II," *Nat. Genet.* **32 Suppl**, 481-489 (2002).
64. E. Southern, K. Mir, and M. Shchepinov, "Molecular interactions on microarrays," *Nat. Genet.* **21**, 5-9 (1999).
65. C. Hartel, G. Bein, M. Muller-Steinhardt, and H. Kluter, "Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples," *J. Immunol. Methods* **249**, 63-71 (2001).
66. L. Rainen, U. Oelmueller, S. Jurgensen, R. Wyrich, C. Ballas, J. Schram, C. Herdman, D. Bankaitis-Davis, N. Nicholls, D. Trollinger, and V. Tryon, "Stabilization of mRNA expression in whole blood samples," *Clin. Chem.* **48**, 1883-1890 (2002).
67. T. Barrett, D. B. Troup, S. E. Wilhite, P. Ledoux, D. Rudnev, C. Evangelista, I. F. Kim, A. Soboleva, M. Tomashevsky, and R. Edgar, "NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles--database and tools update," *Nucleic Acids Res.* **35**, D760-D765 (2007).
68. Y. Song, G. Xiang, Y. Yaw-Ching, P. Denise, H. Caroline, H. Jeffrey, D. S. Craig, N. L. Michael, and H. Hai, "Detecting Outlier Microarray Arrays by Correlation and Percentage of Outliers Spots," *Cancer Informatics* **2**, 351-360 (2006).

69. K. Y. Kim, B. J. Kim, and G. S. Yi, "Reuse of imputed data in microarray analysis increases imputation efficiency," *BMC. Bioinformatics*. **5**, 160 (2004).
70. O. Troyanskaya, M. Cantor, G. Sherlock, P. Brown, T. Hastie, R. Tibshirani, D. Botstein, and R. B. Altman, "Missing value estimation methods for DNA microarrays," *Bioinformatics*. **17**, 520-525 (2001).
71. B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, M. Astrand, and T. P. Speed, "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias," *Bioinformatics*. **19**, 185-193 (2003).
72. R. Breitling, P. Armengaud, A. Amtmann, and P. Herzyk, "Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments," *FEBS Lett.* **573**, 83-92 (2004).
73. M. Diehn, G. Sherlock, G. Binkley, H. Jin, J. C. Matese, T. Hernandez-Boussard, C. A. Rees, J. M. Cherry, D. Botstein, P. O. Brown, and A. A. Alizadeh, "SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data," *Nucleic Acids Res.* **31**, 219-223 (2003).
74. C. Plake, T. Schiemann, M. Pankalla, J. Hakenberg, and U. Leser, "AliBaba: PubMed as a graph," *Bioinformatics*. **22**, 2444-2445 (2006).
75. B. Mlecnik, M. Scheideler, H. Hackl, J. Hartler, F. Sanchez-Cabo, and Z. Trajanoski, "PathwayExplorer: web service for visualizing high-throughput expression data on biological pathways," *Nucleic Acids Res.* **33**, W633-W637 (2005).
76. M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, and G. Sherlock, "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium," *Nat. Genet.* **25**, 25-29 (2000).
77. G. Dennis, Jr., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, and R. A. Lempicki, "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery," *Genome Biol.* **4**, 3 (2003).
78. J. Degenhardt, M. Haubrock, J. Donitz, E. Wingender, and T. Crass, "DEEP--a tool for differential expression effector prediction," *Nucleic Acids Res.* **35**, W619-W624 (2007).

79. C. Li and W. H. Wong, "Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 31-36 (2001).
80. R. Ghai, H. Lindemann, and T. Chakraborty, "Integrated functional visualization of eukaryotic genomes," *BMC. Bioinformatics*. **7**, 348 (2006).
81. T. Armbrust, S. Schwogler, G. Zohrens, and G. Ramadori, "C1 esterase inhibitor gene expression in rat Kupffer cells, peritoneal macrophages and blood monocytes: modulation by interferon gamma," *J. Exp. Med.* **178**, 373-380 (1993).
82. Y. W. He, H. Li, J. Zhang, C. L. Hsu, E. Lin, N. Zhang, J. Guo, K. A. Forbush, and M. J. Bevan, "The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens," *Nat. Immunol.* **5**, 88-97 (2004).
83. O. Yoneda, T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae, and H. Umehara, "Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells," *J. Immunol.* **164**, 4055-4062 (2000).
84. K. M. Kelly-Scumpia, P. O. Scumpia, M. J. Delano, J. S. Weinstein, A. G. Cuenca, J. L. Wynn, and L. L. Moldawer, "Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10," *J. Exp. Med.* **207**, 319-326 (2010).
85. M. J. Abedin, Y. Kashio, M. Seki, K. Nakamura, and M. Hirashima, "Potential roles of galectins in myeloid differentiation into three different lineages," *J. Leukoc. Biol.* **73**, 650-656 (2003).
86. A. Deng, S. Chen, Q. Li, S. C. Lyu, C. Clayberger, and A. M. Krensky, "Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator," *J. Immunol.* **174**, 5243-5248 (2005).
87. S. Ashkar, G. F. Weber, V. Panoutsakopoulou, M. E. Sanchirico, M. Jansson, S. Zawaideh, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, M. J. Glimcher, and H. Cantor, "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity," *Science* **287**, 860-864 (2000).
88. A. Roghanian, S. E. Williams, T. A. Sheldrake, T. I. Brown, K. Oberheim, Z. Xing, S. E. Howie, and J. M. Sallenave, "The antimicrobial/elastase inhibitor elafin regulates lung dendritic cells and adaptive immunity," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 634-642 (2006).
89. P. A. de, N. Montuori, N. Prevete, I. Fiorentino, F. W. Rossi, V. Visconte, G. Rossi, G. Marone, and P. Ragno, "Urokinase induces basophil

- chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2," *J. Immunol.* **173**, 5739-5748 (2004).
90. K. Wong, H. T. Park, J. Y. Wu, and Y. Rao, "Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes," *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 583-591 (2002).
91. S. A. Khan, C. A. Lopez-Chua, J. Zhang, L. W. Fisher, E. S. Sorensen, and D. T. Denhardt, "Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors," *J. Cell Biochem.* **85**, 728-736 (2002).
92. N. Ogawa, L. Ping, L. Zhenjun, Y. Takada, and S. Sugai, "Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome," *Arthritis Rheum.* **46**, 2730-2741 (2002).
93. P. Hogger and C. Sorg, "Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 841-843 (2001).
94. D. Levanon, R. E. Goldstein, Y. Bernstein, H. Tang, D. Goldenberg, S. Stifani, Z. Paroush, and Y. Groner, "Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 11590-11595 (1998).
95. L. Vogt, N. Schmitz, M. O. Kurrer, M. Bauer, H. I. Hinton, S. Behnke, D. Gatto, P. Sebbel, R. R. Beerli, I. Sonderegger, M. Kopf, P. Saudan, and M. F. Bachmann, "VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation," *J. Clin. Invest* **116**, 2817-2826 (2006).
96. A. Bernard, M. Kasten, C. Meier, E. Manning, S. Freeman, W. Adams, P. Chang, B. Boulanger, and P. Kearney, "Red blood cell arginase suppresses Jurkat (T cell) proliferation by depleting arginine," *Surgery* **143**, 286-291 (2008).
97. H. Wang, J. Xu, X. Ji, X. Yang, K. Sun, X. Liu, and Y. Shen, "The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus," *Cell Immunol.* **235**, 117-121 (2005).
98. C. G. Feng, M. C. Kullberg, D. Jankovic, A. W. Cheever, P. Caspar, R. L. Coffman, and A. Sher, "Transgenic mice expressing human interleukin-10 in the antigen-presenting cell compartment show increased susceptibility to infection with *Mycobacterium avium* associated with decreased macrophage effector function and apoptosis," *Infect. Immun.* **70**, 6672-6679 (2002).

99. A. Ayala, C. S. Chung, G. Y. Song, and I. H. Chaudry, "IL-10 mediation of activation-induced TH1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis," *Cytokine* **14**, 37-48 (2001).
100. A. L. Pauleau, R. Rutschman, R. Lang, A. Pernis, S. S. Watowich, and P. J. Murray, "Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression," *J. Immunol.* **172**, 7565-7573 (2004).
101. Y. Sen, B. Yongyi, H. Yuling, X. Luokun, H. Li, X. Jie, D. Tao, Z. Gang, L. Junyan, H. Chunsong, X. Zhang, J. Youxin, G. Feili, J. Boquan, and T. Jinquan, "V alpha 24-invariant NKT cells from patients with allergic asthma express CCR9 at high frequency and induce Th2 bias of CD3+ T cells upon CD226 engagement," *J. Immunol.* **175**, 4914-4926 (2005).
102. M. P. Gras, Y. Laabi, G. Linares-Cruz, M. O. Blondel, J. P. Rigaut, J. C. Brouet, G. Leca, R. Haguener-Tsapis, and A. Tsapis, "BCMAP: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes," *Int. Immunol.* **7**, 1093-1106 (1995).
103. Y. X. Zhu, S. Benn, Z. H. Li, E. Wei, E. Masih-Khan, Y. Trieu, M. Bali, C. J. McGlade, J. O. Claudio, and A. K. Stewart, "The SH3-SAM adaptor HACS1 is up-regulated in B cell activation signaling cascades," *J. Exp. Med.* **200**, 737-747 (2004).
104. F. D'Acquisto, A. Merghani, E. Lecona, G. Rosignoli, K. Raza, C. D. Buckley, R. J. Flower, and M. Perretti, "Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation," *Blood* **109**, 1095-1102 (2007).
105. T. Sareneva, I. Julkunen, and S. Matikainen, "IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells," *J. Immunol.* **165**, 1933-1938 (2000).
106. C. Martin-Romero, J. Santos-Alvarez, R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet, "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes," *Cell Immunol.* **199**, 15-24 (2000).
107. M. Saino, T. Maruyama, T. Sekiya, T. Kayama, and Y. Murakami, "Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3," *Oncol. Rep.* **12**, 47-52 (2004).
108. C. Dougherty, J. Barucha, P. R. Schofield, K. A. Jacobson, and B. T. Liang, "Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A1 or A3 receptor," *FASEB J.* **12**, 1785-1792 (1998).
109. X. Bu, H. K. Avraham, X. Li, B. Lim, S. Jiang, Y. Fu, R. G. Pestell, and S. Avraham, "Mayven induces c-Jun expression and cyclin D1 activation in breast cancer cells," *Oncogene* **24**, 2398-2409 (2005).

110. D. Liu, X. Ding, J. Du, X. Cai, Y. Huang, T. Ward, A. Shaw, Y. Yang, R. Hu, C. Jin, and X. Yao, "Human NUF2 interacts with centromere-associated protein E and is essential for a stable spindle microtubule-kinetochore attachment," *J. Biol. Chem.* **282**, 21415-21424 (2007).
111. N. Collins, R. A. Poot, I. Kukimoto, C. Garcia-Jimenez, G. Dellaire, and P. D. Varga-Weisz, "An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin," *Nat. Genet.* **32**, 627-632 (2002).
112. M. Ohtsubo, H. Okazaki, and T. Nishimoto, "The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA," *J. Cell Biol.* **109**, 1389-1397 (1989).
113. K. Mizutani, M. Onda, S. Asaka, J. Akaishi, S. Miyamoto, A. Yoshida, M. Nagahama, K. Ito, and M. Emi, "Overexpressed in anaplastic thyroid carcinoma-1 (OEATC-1) as a novel gene responsible for anaplastic thyroid carcinoma," *Cancer* **103**, 1785-1790 (2005).
114. C. Wang, N. Li, X. Liu, Y. Zheng, and X. Cao, "A novel endogenous human CaMKII inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest via p27 stabilization," *J. Biol. Chem.* **283**, 11565-11574 (2008).
115. Q. Lei, J. Jiao, L. Xin, C. J. Chang, S. Wang, J. Gao, M. E. Gleave, O. N. Witte, X. Liu, and H. Wu, "NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss," *Cancer Cell* **9**, 367-378 (2006).
116. H. Taniguchi, H. Yamamoto, N. Akutsu, K. Nosho, Y. Adachi, K. Imai, and Y. Shinomura, "Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer," *J. Pathol.* **213**, 131-139 (2007).
117. G. Lee, E. Junn, M. Tanaka, Y. M. Kim, and M. M. Mouradian, "Synphilin-1 degradation by the ubiquitin-proteasome pathway and effects on cell survival," *J. Neurochem.* **83**, 346-352 (2002).
118. C. H. Hsiang, T. Tunoda, Y. E. Whang, D. R. Tyson, and D. K. Ornstein, "The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells," *Prostate* **66**, 1413-1424 (2006).
119. J. Chang, M. Xie, V. R. Shah, M. D. Schneider, M. L. Entman, L. Wei, and R. J. Schwartz, "Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 14495-14500 (2006).

120. J. L. Dickinson, B. J. Norris, P. H. Jensen, and T. M. Antalis, "The C-D interhelical domain of the serpin plasminogen activator inhibitor-type 2 is required for protection from TNF-alpha induced apoptosis," *Cell Death. Differ.* **5**, 163-171 (1998).
121. J. M. Stahl, A. Sharma, M. Cheung, M. Zimmerman, J. Q. Cheng, M. W. Bosenberg, M. Kester, L. Sandirasegarane, and G. P. Robertson, "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma," *Cancer Res.* **64**, 7002-7010 (2004).
122. M. K. El-Tanani, "Role of osteopontin in cellular signaling and metastatic phenotype," *Front Biosci.* **13**, 4276-4284 (2008).
123. C. S. Gondi, N. Kandhukuri, D. H. Dinh, M. Gujrati, and J. S. Rao, "Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase-mediated apoptosis and inhibits the PI3K/AKT pathway," *Int. J. Oncol.* **31**, 19-27 (2007).
124. Y. Chien, S. Kim, R. Bumeister, Y. M. Loo, S. W. Kwon, C. L. Johnson, M. G. Balakireva, Y. Romeo, L. Kopelovich, M. Gale, Jr., C. Yeaman, J. H. Camonis, Y. Zhao, and M. A. White, "RalB GTPase-mediated activation of the I κ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival," *Cell* **127**, 157-170 (2006).
125. D. W. Choi, Y. M. Seo, E. A. Kim, K. S. Sung, J. W. Ahn, S. J. Park, S. R. Lee, and C. Y. Choi, "Ubiquitination and degradation of homeodomain-interacting protein kinase 2 by WD40 repeat/SOCS box protein WSB-1," *J. Biol. Chem.* **283**, 4682-4689 (2008).
126. Q. R. Chen, S. Bilke, J. S. Wei, B. T. Greer, S. M. Steinberg, F. Westermann, M. Schwab, and J. Khan, "Increased WSB1 copy number correlates with its over-expression which associates with increased survival in neuroblastoma," *Genes Chromosomes. Cancer* **45**, 856-862 (2006).
127. F. Li, G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio, and D. C. Altieri, "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin," *Nature* **396**, 580-584 (1998).
128. H. Johnson, L. Scorrano, S. J. Korsmeyer, and T. J. Ley, "Cell death induced by granzyme C," *Blood* **101**, 3093-3101 (2003).
129. A. A. Kaspar, S. Okada, J. Kumar, F. R. Poulain, K. A. Drouvalakis, A. Kelekar, D. A. Hanson, R. M. Kluck, Y. Hitoshi, D. E. Johnson, C. J. Froelich, C. B. Thompson, D. D. Newmeyer, A. Anel, C. Clayberger, and A. M. Krensky, "A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin," *J. Immunol.* **167**, 350-356 (2001).

130. A. Pachot, M. A. Cazalis, F. Venet, F. Turrel, C. Faudot, N. Voirin, J. Diasparra, N. Bourgoin, F. Poitevin, B. Mouglin, A. Lepape, and G. Monneret, "Decreased Expression of the Fractalkine Receptor CX3CR1 on Circulating Monocytes as New Feature of Sepsis-Induced Immunosuppression," *J. Immunol.* **180**, 6421-6429 (2008).
131. Y. C. Luiking, M. Poeze, C. H. Dejong, G. Ramsay, and N. E. Deutz, "Sepsis: an arginine deficiency state?," *Crit Care Med.* **32**, 2135-2145 (2004).
132. S. B. Johnson, M. Lissauer, G. V. Bochicchio, R. Moore, A. S. Cross, and T. M. Scalea, "Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis," *Ann. Surg.* **245**, 611-621 (2007).
133. B. M. Tang, A. S. McLean, I. W. Dawes, S. J. Huang, M. J. Cowley, and R. C. Lin, "Gene-expression profiling of gram-positive and gram-negative sepsis in critically ill patients," *Crit Care Med.* **36**, 1125-1128 (2008).
134. M. Maier, S. Wutzler, M. Bauer, P. Trendafilov, D. Henrich, and I. Marzi, "Altered gene expression patterns in dendritic cells after severe trauma: implications for systemic inflammation and organ injury," *Shock* (2008).
135. H. R. Wong, T. P. Shanley, B. Sakthivel, N. Cvijanovich, R. Lin, G. L. Allen, N. J. Thomas, A. Doctor, M. Kalyanaraman, N. M. Tofil, S. Penfil, M. Monaco, M. A. Tagavilla, K. Odoms, K. Dunsmore, M. Barnes, and B. J. Aronow, "Genome-level expression profiles in pediatric septic shock indicate a role for altered zinc homeostasis in poor outcome," *Physiol Genomics* **30**, 146-155 (2007).
136. J. E. McDunn, T. P. Chung, J. M. Laramie, R. R. Townsend, and J. P. Cobb, "Physiologic genomics," *Surgery* **139**, 133-139 (2006).
137. C. A. Tsai, S. J. Wang, D. T. Chen, and J. J. Chen, "Sample size for gene expression microarray experiments," *Bioinformatics.* **21**, 1502-1508 (2005).
138. W. A. Knaus, E. A. Draper, D. P. Wagner, and J. E. Zimmerman, "APACHE II: a severity of disease classification system," *Crit Care Med.* **13**, 818-829 (1985).
139. I. Fenic, H. M. Hossain, V. Sonnack, S. Tchatalbachev, F. Thierer, J. Trapp, K. Failing, K. S. Edler, M. Bergmann, M. Jung, T. Chakraborty, and K. Steger, "In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis," *J. Androl* **29**, 172-185 (2008).

140. W. Wu, N. Dave, G. C. Tseng, T. Richards, E. P. Xing, and N. Kaminski, "Comparison of normalization methods for CodeLink Bioarray data," *BMC. Bioinformatics.* **6**, 309 (2005).
141. R. Breitling and P. Herzyk, "Rank-based methods as a non-parametric alternative of the T-statistic for the analysis of biological microarray data," *J. Bioinform. Comput. Biol.* **3**, 1171-1189 (2005).
142. L. L. Moldawer, "Opening the window on genome-wide expression analyses in sepsis," *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **176**, 631-632 (2007).
143. K. Laudanski, C. Miller-Graziano, W. Xiao, M. N. Mindrinos, D. R. Richards, A. De, L. L. Moldawer, R. V. Maier, P. Bankey, H. V. Baker, B. H. Brownstein, J. P. Cobb, S. E. Calvano, R. W. Davis, and R. G. Tompkins, "Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 15564-15569 (2006).
144. B. M. Tang, A. S. McLean, I. W. Dawes, S. J. Huang, and R. C. Lin, "Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis," *Crit Care Med.* **37**, 882-888 (2009).
145. J. E. McDunn, I. R. Turnbull, A. D. Polpitiya, A. Tong, S. K. MacMillan, D. F. Osborne, R. S. Hotchkiss, M. Colonna, and J. P. Cobb, "Splenic CD4+ T cells have a distinct transcriptional response six hours after the onset of sepsis," *J. Am. Coll. Surg.* **203**, 365-375 (2006).
146. H. Iwasaka and T. Noguchi, "Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS)," *Nippon Rinsho* **62**, 2237-2243 (2004).
147. H. Tatsumi, H. Ura, S. Ikeda, K. Yamaguchi, T. Katsuramaki, Y. Asai, and K. Hirata, "Surgical influence on TH1/TH2 balance and monocyte surface antigen expression and its relation to infectious complications," *World J. Surg.* **27**, 522-528 (2003).
148. W. Barthlen, N. Zantl, K. Pfeffer, C. D. Heidecke, B. Holzmann, and J. Stadler, "Impact of experimental peritonitis on bone marrow cell function," *Surgery* **126**, 41-47 (1999).
149. K. Eid, L. Labler, W. Ertel, O. Trentz, and M. Keel, "Systemic effects of severe trauma on the function and apoptosis of human skeletal cells," *J. Bone Joint Surg. Br.* **88**, 1394-1400 (2006).
150. K. G. Kreymann, "Stoffwechsel und Ernährung bei Sepsis," in *Sepsis und MODS*, (Springer Berlin Heidelberg, 2005), pp. 427-459.

151. M. Soop, A. Soop, and K. G. Sundqvist, "Spontaneous lymphocyte proliferation during trauma and infection," *Scand. J. Immunol.* **28**, 659-665 (1988).
152. S. Morgera, M. Haase, J. Rocktaschel, T. Bohler, H. C. von, O. Vargas-Hein, D. Krausch, H. Zuckermann-Becker, J. M. Muller, W. J. Kox, and H. H. Neumayer, "High permeability haemofiltration improves peripheral blood mononuclear cell proliferation in septic patients with acute renal failure," *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 2570-2576 (2003).
153. L. M. Napolitano and C. Campbell, "Polymicrobial sepsis following trauma inhibits interleukin-10 secretion and lymphocyte proliferation," *J. Trauma* **39**, 104-110 (1995).
154. R. S. Hotchkiss and D. W. Nicholson, "Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis," *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 813-822 (2006).
155. M. D. George, S. Sankaran, E. Reay, A. C. Gelli, and S. Dandekar, "High-throughput gene expression profiling indicates dysregulation of intestinal cell cycle mediators and growth factors during primary simian immunodeficiency virus infection," *Virology* **312**, 84-94 (2003).
156. S. M. Zuev, S. F. Kingsmore, and D. D. Gessler, "Sepsis progression and outcome: a dynamical model," *Theor. Biol. Med. Model.* **3**, 8 (2006).
157. P. A. Ward, "Role of the complement in experimental sepsis," *J. Leukoc. Biol.* **83**, 467-470 (2008).
158. K. Werdan, M. Buerke, C. Kuhn, U. Müller-Werdan, and Schuster HP, "Systematik der Therapie bei Sepsis und Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS)," in *Sepsis und MODS*, (Springer Berlin Heidelberg, 2005), pp. 77-133.
159. H. T. Lee, M. Kim, J. D. Joo, G. Gallos, J. F. Chen, and C. W. Emala, "A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis," *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **291**, R959-R969 (2006).
160. D. Brealey, M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer, "Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock," *Lancet* **360**, 219-223 (2002).
161. S. V. Baudouin, D. Saunders, W. Tiangyou, J. L. Elson, J. Poynter, A. Pyle, S. Keers, D. M. Turnbull, N. Howell, and P. F. Chinnery, "Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study," *Lancet* **366**, 2118-2121 (2005).

162. S. E. Calvano, W. Xiao, D. R. Richards, R. M. Felciano, H. V. Baker, R. J. Cho, R. O. Chen, B. H. Brownstein, J. P. Cobb, S. K. Tschoeke, C. Miller-Graziano, L. L. Moldawer, M. N. Mindrinos, R. W. Davis, R. G. Tompkins, and S. F. Lowry, "A network-based analysis of systemic inflammation in humans," *Nature* **437**, 1032-1037 (2005).
163. M. E. Lissauer, S. B. Johnson, G. V. Bochicchio, C. J. Feild, A. S. Cross, J. D. Hasday, C. C. Whiteford, W. A. Nussbaumer, M. Towns, and T. M. Scalea, "Differential expression of toll-like receptor genes: sepsis compared with sterile inflammation 1 day before sepsis diagnosis," *Shock* **31**, 238-244 (2009).
164. B. Schaaf, K. Luitjens, T. Goldmann, B. T. van, F. Sayk, C. Dodt, K. Dalhoff, and D. Droemann, "Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes," *Diagn. Pathol.* **4**, 12 (2009).
165. H. Tsujimoto, S. Ono, P. A. Efron, P. O. Scumpia, L. L. Moldawer, and H. Mochizuki, "Role of Toll-like receptors in the development of sepsis," *Shock* **29**, 315-321 (2008).
166. Y. Ishida, T. Hayashi, T. Goto, A. Kimura, S. Akimoto, N. Mukaida, and T. Kondo, "Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis," *J. Immunol.* **181**, 4208-4218 (2008).
167. A. Pachot, A. Lepape, S. Vey, J. Bienvenu, B. Mougin, and G. Monneret, "Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study," *Immunol. Lett.* **106**, 63-71 (2006).
168. M. P. Fink, "Cytopathic hypoxia. Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration?," *Crit Care Clin.* **18**, 165-175 (2002).
169. T. Regueira, M. Andresen, and S. Djafarzadeh, "[Mitochondrial dysfunction during sepsis, impact and possible regulating role of hypoxia-inducible factor-1alpha]," *Med. Intensiva.* **33**, 385-392 (2009).
170. M. Munder, H. Schneider, C. Luckner, T. Giese, C. D. Langhans, J. M. Fuentes, P. Kropf, I. Mueller, A. Kolb, M. Modolell, and A. D. Ho, "Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase," *Blood* **108**, 1627-1634 (2006).
171. Y. C. Luiking, M. Poeze, G. Ramsay, and N. E. Deutz, "The role of arginine in infection and sepsis," *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **29**, S70-S74 (2005).

172. P. Biberthaler, V. Bogner, H. V. Baker, M. C. Lopez, P. Neth, K. G. Kanz, W. Mutschler, M. Jochum, and L. L. Moldawer, "Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome," *Shock* **24**, 11-19 (2005).

173. J. P. Cobb, M. N. Mindrinos, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, H. V. Baker, W. Xiao, K. Laudanski, B. H. Brownstein, C. M. Elson, D. L. Hayden, D. N. Herndon, S. F. Lowry, R. V. Maier, D. A. Schoenfeld, L. L. Moldawer, R. W. Davis, R. G. Tompkins, H. V. Baker, P. Bankey, T. Billiar, B. H. Brownstein, S. E. Calvano, D. Camp, I. Chaudry, J. P. Cobb, R. W. Davis, C. M. Elson, B. Freeman, R. Gamelli, N. Gibran, B. Harbrecht, D. L. Hayden, W. Heagy, D. Heimbach, D. N. Herndon, J. Horton, J. Hunt, K. Laudanski, J. Lederer, S. F. Lowry, R. V. Maier, J. Mannick, B. McKinley, C. Miller-Graziano, M. N. Mindrinos, J. Minei, L. L. Moldawer, E. Moore, F. Moore, R. Munford, A. Nathens, G. O'keefe, G. Purdue, L. Rahme, D. Remick, M. Sailors, D. A. Schoenfeld, M. Shapiro, G. Silver, R. Smith, G. Stephanopoulos, G. Stormo, R. G. Tompkins, M. Toner, S. Warren, M. West, S. Wolfe, W. Xiao, and V. Young, "Application of genome-wide expression analysis to human health and disease," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 4801-4806 (2005).

Zusammenfassung

Trotz bester intensivmedizinischer Versorgung sind die Sepsis und der septische Schock nach einem Trauma mit einer hohen Mortalitätsrate auf Intensivstationen assoziiert. Ursächlich dafür ist unter anderem das fehlende Wissen über die pathophysiologischen Mechanismen der Polytrauma assoziierten Sepsis. Der Mangel am Verständnis spiegelt sich darüber hinaus in einer späten Diagnose und Risikostratifikation wieder, was vor allem den Beginn einer adäquaten Therapie verzögert.

In dieser prospektiven Studie werden Patienten eingeschlossen, die alle mit einem schweren Polytrauma konfrontiert sind (n=26), von denen Transkriptomdaten 12 Stunden nach dem initialen Trauma (Zp0) gewonnen werden. Dies entspricht einem Zeitraum von 3 bis 5 Tagen vor der klinischen Manifestation einer Sepsis. Diese Transkriptomdaten bieten den Vorteil, zum Zeitpunkt eines einheitlichen klinischen Phänotyps bereits differenzielle biologische Regulationen aufzuzeigen.

Ziel dieser Studie ist es, eine Qualitätssicherungspipeline für Mikroarraydaten zu etablieren und aus dieser Analyse heraus frühzeitig die biologischen Unterschiede zwischen einem komplikationslosen und einem septischen posttraumatischen Krankheitsverlauf aufzuzeigen.

Wir verwenden Vollblut, aus welchem mit dem PaxGene System (PreAnalytiX, Heidelberg, Germany) die mRNA isoliert wird und deren Quantität mit dem CodeLink UniSet 10K Bioarray (GE Healthcare, Freiburg, Germany) für ca. 10.000 verschiedene Gene erfasst wird.

Mithilfe der neu entwickelten Qualitätssicherungspipeline verbessern wir die Qualität der Mikroarraydaten signifikant. Die darauffolgende Analyse der Transkriptomdaten zeigt signifikante Unterschiede zwischen im Krankheitsverlauf septischen (S_Pat) und nicht septischen Patienten (NS_Pat). Diese Unterschiede eignen sich als septische Signatur, welche in der Clusteranalyse bereits 12 Stunden nach dem initialen Trauma S_Pat und NS_Pat trennen kann. Darüber hinaus zeigen wir, dass in S_Pat zum Zp0 bereits einige biologische Funktionen differenziell reguliert sind. Unter anderem

zeigt sich eine Dysbalance in der TH1/TH2 Antwort mit einer dominierenden TH2 Antwort. Der unausgeglichene TH1/TH2 Shift zusammen mit der Inaktivierung von T Zellen, Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen könnten kritische auslösende Faktoren für eine Sepsis sein. Weiterhin zeigen sich eine Aktivierung des Zellzyklus und eine Aktivierung der Komplementkaskade.

In dieser Studie präsentieren wir eine Pipeline, welche von den Rohdaten bis zu der differentiellen Regulation in der Zukunft die Möglichkeit bietet, qualitativ hochwertige standardisierte Mikroarrayanalysen durchzuführen.

Mithilfe dieser Pipeline ist es gelungen, eine transkriptionelle Signatur für die Entwicklung einer Sepsis bereits 12 Stunden nach einem Polytrauma sichtbar zu machen, obwohl die Sepsis sich erst 3-5 Tage später klinisch manifestiert. Durch diese frühzeitig ausgebildete Signatur illustriert diese Arbeit die Notwendigkeit einer sehr frühen Intervention in potentiell septischen Patienten. Darüber hinaus kann diese Signatur dazu dienen, den späteren posttraumatischen Verlauf vorherzusagen. Transkriptomdaten bieten die Möglichkeit einer klinischen Applikation in der Zukunft, für die wir sowohl potentielle diagnostische als auch therapeutische Ansatzpunkte demonstrieren.

Zusammenfassung (*Summary*)

Despite best supportive intensive care the development of severe sepsis and septic shock after trauma still remains associated with a high mortality rate in intensive care units. Our incomplete knowledge of the pathophysiological and biochemical mechanisms underlying the onset of sepsis in critical care is reflected in the delay of both diagnosis of the condition as well as in the stratification of patients at risk. Thus the severe course of sepsis is compounded by the inability to initiate adequate therapy in a timely manner.

In this prospective study we included 26 patients, with severe multiple trauma, and performed a genome-wide transcriptome analysis of cells derived from peripheral blood 12 hours after the onset of trauma (Zp0). Statistical analysis of transcriptome data deriving from these patients allowed us to generate a signature expression profile that is predictive of sepsis outcome and precedes its clinical definition, which is based on clinical definitions and organ scores, by at least 3 to 5 days. Indeed at a posttraumatic time point where no clinical differences are apparent, changes at the transcriptome reveal already the onset of dysfunction of cellular and biological processes.

In this study a robust pipeline for the quality-assurance of data deriving from whole genome-based transcriptome studies was first established and subsequently used to analyse large data sets in order to catalogue and uncover dysfunctional regulation of the cellular pathways and biological processes underlying questions as to why patients with multiple trauma can have dramatically different outcomes despite suffering similar traumatic insults.

In this analysis mRNA isolated from whole blood from patients using the PaxGene System (PreAnalytiX, Heidelberg, Germany) was labeled and hybridized to pre-spotted glass slides harbouring the Codelink Uniset 10k Bioarray (GE Healthcare, Freiburg, Germany) for simultaneous quantification of approximately 10.000 different genes.

The establishment of a workflow incorporating the quality-assurance-pipeline developed in this study enhanced both the quality and robustness of the data obtained in this study. Thus analysis revealed significant differences between

patients confronted by sepsis (S_Pat) and patients with no complications (NS_PAT) in their posttraumatic course. These differences were used to derive a signature for the onset of sepsis following cluster analysis, and also to discriminate S_Pat and NS_Pat only 12 hours after the initial trauma. Further we were able to show that in S_Pat, biological functions are regulated differentially even at this short time period after trauma. It was evident that patients who developed sepsis in the course of the disease (3 to 5 days after admission), showed an imbalance in the TH1/TH2 response leading to a pronounced TH2 response soon after trauma. The imbalanced TH1/TH2 response is accompanied by cellular changes that suggest an inactivation of T cells, neutrophils, monocytes and macrophages whose biological functions are critical factors for the initiation of processes leading to sepsis. Furthermore, evidence for an enhanced activation of cell cycle genes as well as genes involved in activation of the complement cascade were evident.

An important outcome of this study is the use of peripheral blood as a source for whole-genome transcriptome analysis and its suitability in providing information on biological processes dysregulated during sepsis, the cell types that contribute to these changes as well as to provide diagnostic information allowing us to predict sepsis outcome, at least 3 to 5 days preceding currently used clinical scoring systems. Thus transcriptome analysis provides us with a wealth of information to generate diagnostic tests that will allow early clinical intervention in combination with current treatment protocols to ameliorate disease outcome as well as offering possible targets for therapy.

Publikationen

Journalartikel

1. T. Menges, I. R. König, H. Hossain, S. Little, S. Tchatalbachev, **F. Thierer**, H. Hackstein, I. Franjkovic, T. Colaris, F. Martens, K. Weismüller, T. Langefeld, J. Stricker, G. Hempelmann, P. E. Vos, A. Ziegler, B. Jacobs, T. Chakraborty, and G. Bein, "Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor," *Crit Care Med.* **36**, 1456 (2008).
2. Fenic I, H. M. Hossain, V. Sonnack, S. Tchatalbachev, **F. Thierer**, J. Trapp, K. Failing, K. S. Edler, M. Bergmann, M. Jung, T. Chakraborty, and K. Steger, "In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis," *J. Androl* **29**, 172-185 (2008)

Vorträge

1. **F. Thierer**, "Gene expression analysis of septic patients with fatal outcome," Grid Seminar 05/2006 Giessen, Deutschland.

Posterpräsentationen

1. H. M. Hossain, S. Tchatalbachev, **F. Thierer**, T. Chakraborty, "The death signature in severely injured patients," NGFN 06/2006 Giessen, International Symposium, Deutschland.
2. H. M. Hossain, **F. Thierer**, S. Little, S. Tchatalbachev, T. Colaris, J. Stricker, F. Martens, T. Menges, G. Hempelmann, T. Chakraborty, "Gene expression profiling of patients with severe trauma," NGFN 11/2006 Heidelberg, 5. NGFN Meeting, Deutschland.
3. **F. Thierer**, „Kennen Sie diese Infektionskrankheiten?“ Fakultät Medizinische Mikrobiologie zu Giessen, 10/2007 Giessen, Tag der offenen Tür, Deutschland.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben 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.

Gießen, den:

Felix Johannes Thierer

Danksagung

Prof. Dr. T. Chakraborty: Dass er diese Arbeit ermöglicht hat

Dr. H. Hossain: Für die ausgesprochen engagierte Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit

S. Tchatalbachev: Für die Präparation der Mikroarrays und RT-PCRs

Dr. S. Little: Für die klinischen Daten

A. Billion: Für's Programmieren und vor allem den guten Kaffee

M. Maier: Für Hilfe mit technischen Problemen jeglicher Art

I. Ruocco: Für Hilfe in allen administrativen Dingen

Und allen anderen im **2. Stock der Gaffkystrasse**

Christina W.: für Korrekturen und unbezahlbare Unterstützung und Motivation

Meinen Eltern: Dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben

Appendix

Inhaltsverzeichnis des Appendix

Inhaltsverzeichnis des Appendix.....	1
Abbildungsverzeichnis des Appendix	2
Tabellenverzeichnis des Appendix.....	3
1 Mean versus average Plots	4
2 Signifikant regulierte Gene	12
3 Gene der überrepräsentierten Kategorien.....	19
4 Durchführung der RT-PCR.....	31

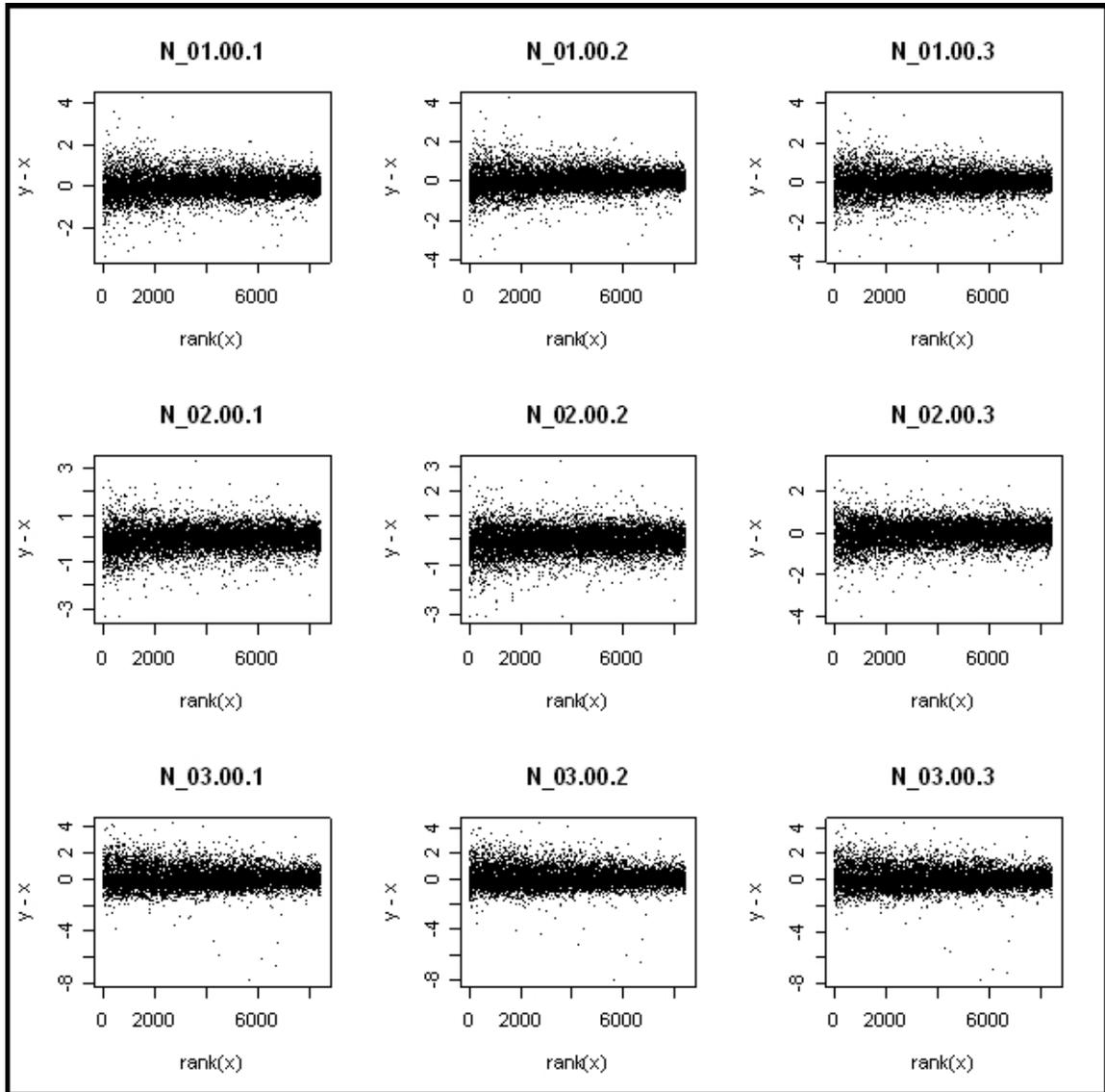
Abbildungsverzeichnis des Appendix

App. Abbildung 1: MVA-Plot NS_Pat Bild 1 von 4.....	4
App. Abbildung 2: MVA-Plot NS_Pat Bild 2 von 4.....	5
App. Abbildung 3: MVA-Plot NS_Pat Bild 3 von 4.....	6
App. Abbildung 4: MVA-Plot NS_Pat Bild 4 von 4.....	7
App. Abbildung 5: MVA-Plot S_Pat Bild 1 von 4	8
App. Abbildung 6: MVA-Plot S_Pat Bild 2 von 4	9
App. Abbildung 7: MVA-Plot S_Pat Bild 3 von 4	10
App. Abbildung 8: MVA-Plot S_Pat Bild 4 von 4	11

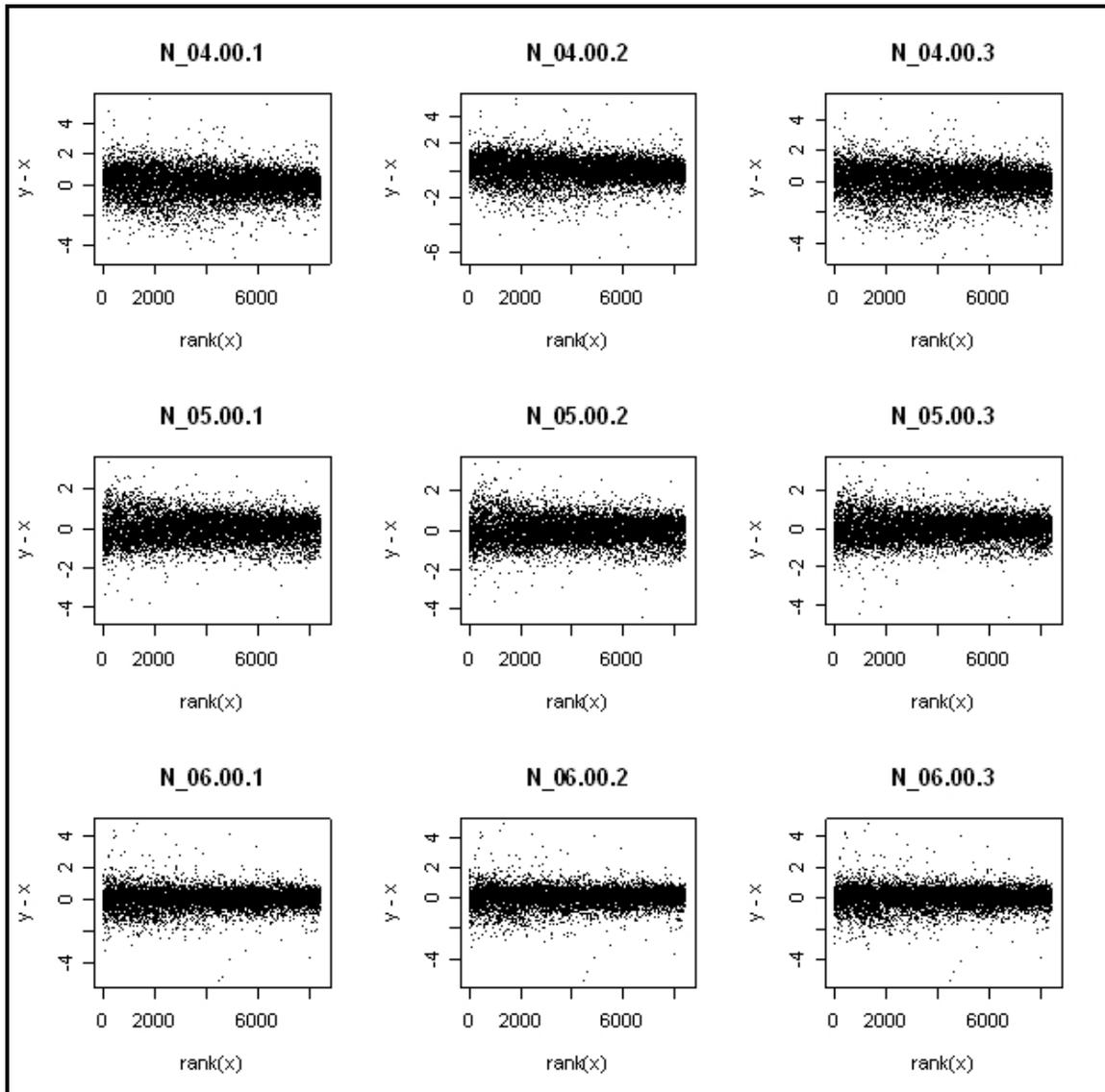
Tabellenverzeichnis des Appendix

App. Tabelle 1: Signifikant regulierte Gene, alphabetisch nach Symbol geordnet	18
App. Tabelle 2: GO:0009605~response to external stimulus	19
App. Tabelle 3: 2_GO:0042330~taxis	20
App. Tabelle 4: 3_GO:0006935~chemotaxis	20
App. Tabelle 5: 4_GO:0009611~response to wounding.....	21
App. Tabelle 6: 5_GO:0006952~defense response	22
App. Tabelle 7: 6_GO:0007626~locomotory behavior	22
App. Tabelle 8: 7_hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction.....	23
App. Tabelle 9: 8_GO:0051301~cell division	23
App. Tabelle 10: 9_hsa04610:Complement and coagulation cascades.....	23
App. Tabelle 11: 10_GO:0006954~inflammatory response	24
App. Tabelle 12: 11_GO:0006508~proteolysis	25
App. Tabelle 13: 12_GO:0051674~localization of cell	25
App. Tabelle 14: 13_GO:0006928~cell motility	26
App. Tabelle 15: 14_GO:0008015~blood circulation.....	26
App. Tabelle 16: 15_GO:0003013~circulatory system process	26
App. Tabelle 17: 16_GO:0000279~M phase.....	27
App. Tabelle 18: 17_GO:0007610~behavior.....	27
App. Tabelle 19: 18_GO:0007166~cell surface receptor linked signal transduction	28
App. Tabelle 20: 19_GO:0007067~mitosis	29
App. Tabelle 21: 20_GO:0022403~cell cycle phase	29
App. Tabelle 22: 21_GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	29
App. Tabelle 23: 22_GO:0035295~tube development	30
App. Tabelle 24: 23_GO:0006955~immune response	30

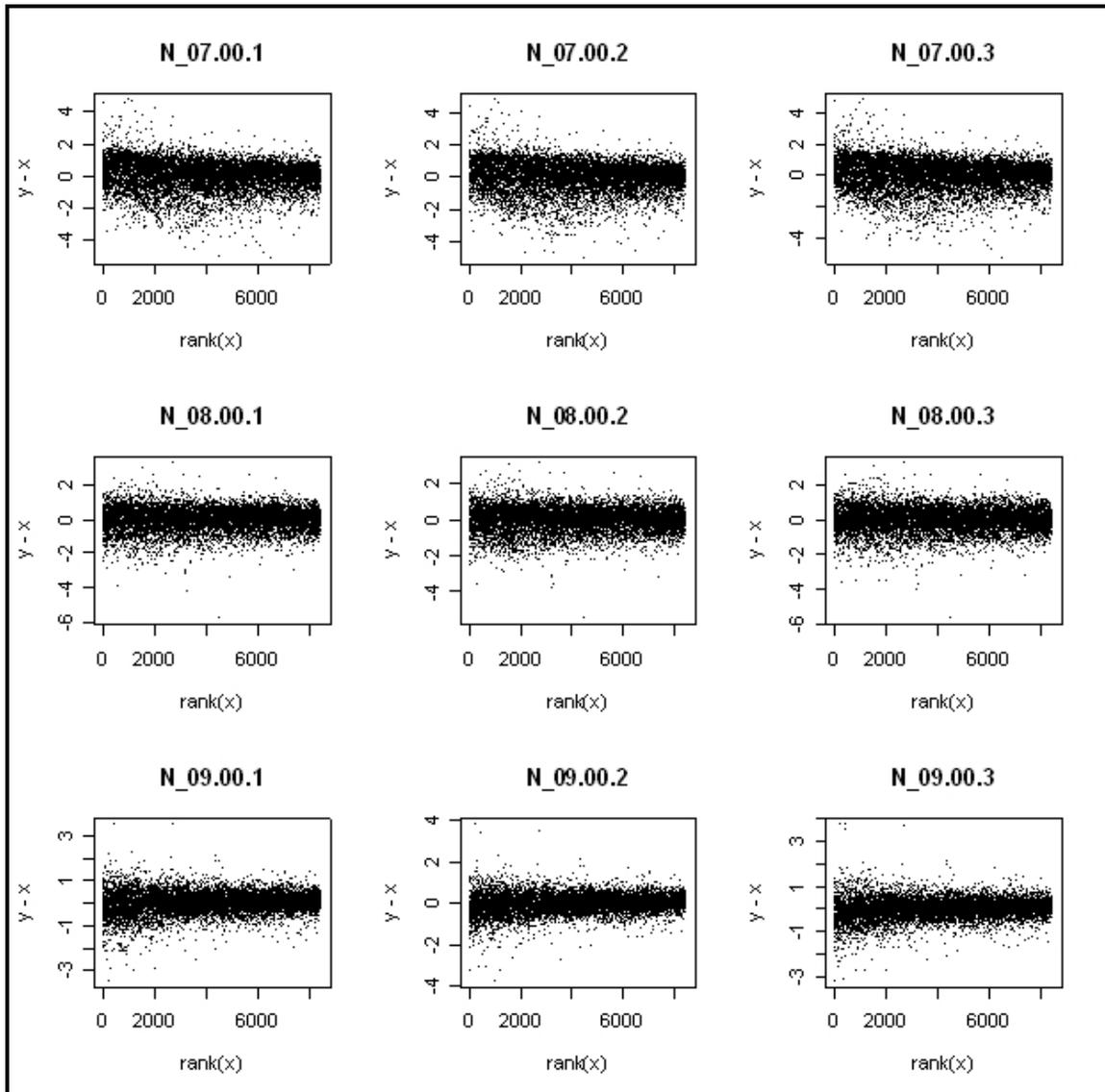
1 Mean versus average Plots



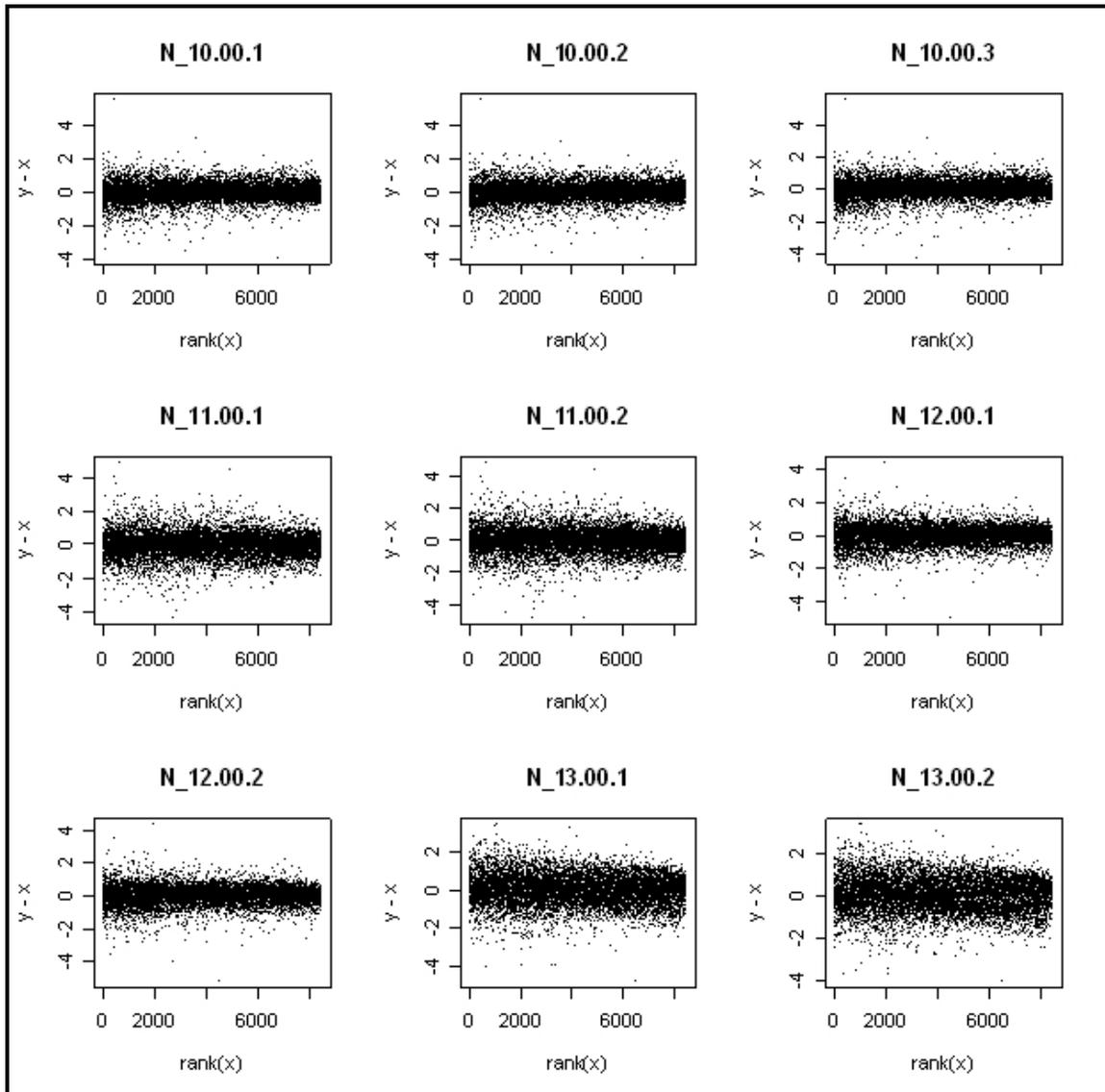
App. Abbildung 1: MVA-Plot NS_Pat Bild 1 von 4



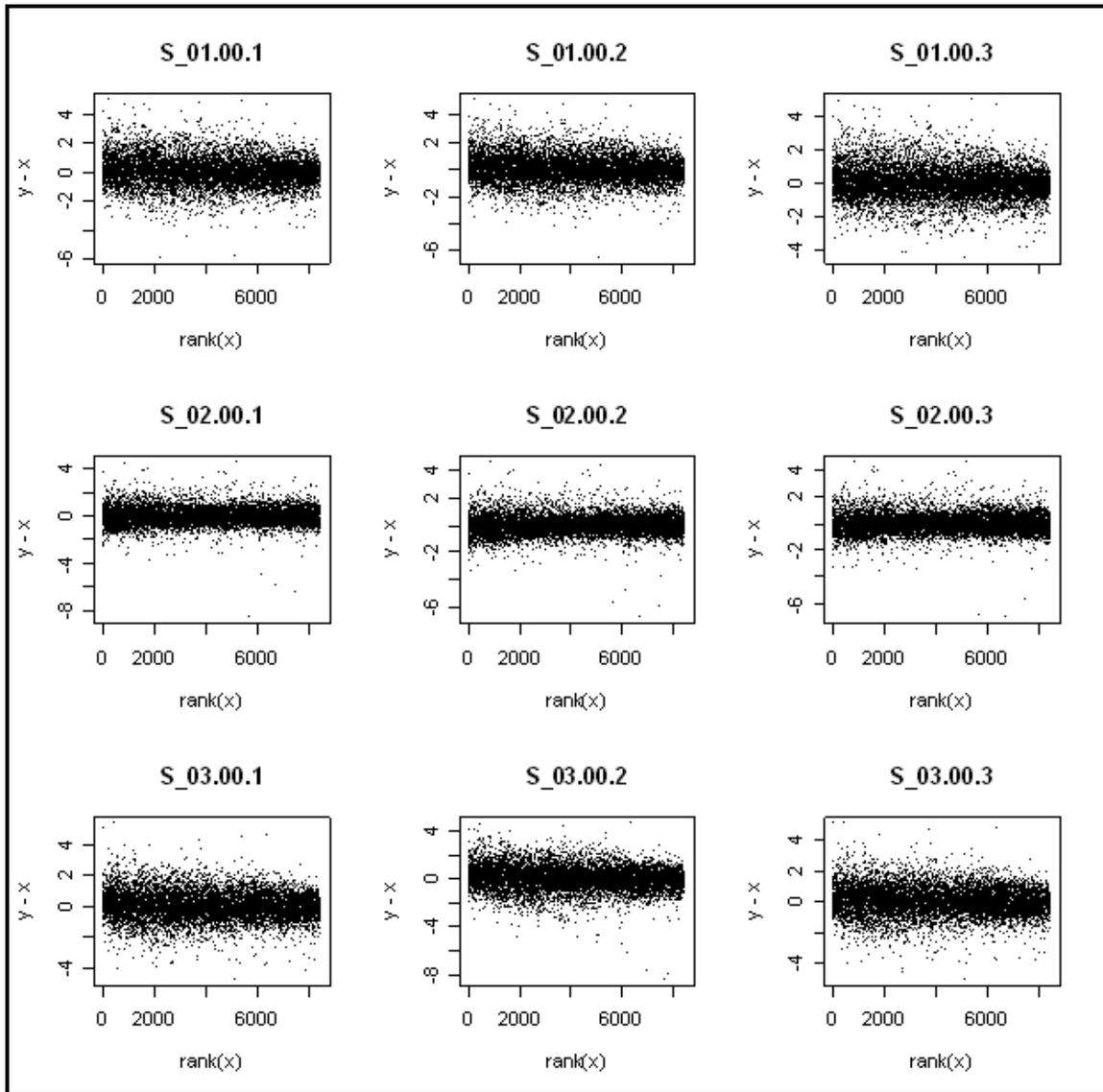
App. Abbildung 2: MVA-Plot NS_Pat Bild 2 von 4



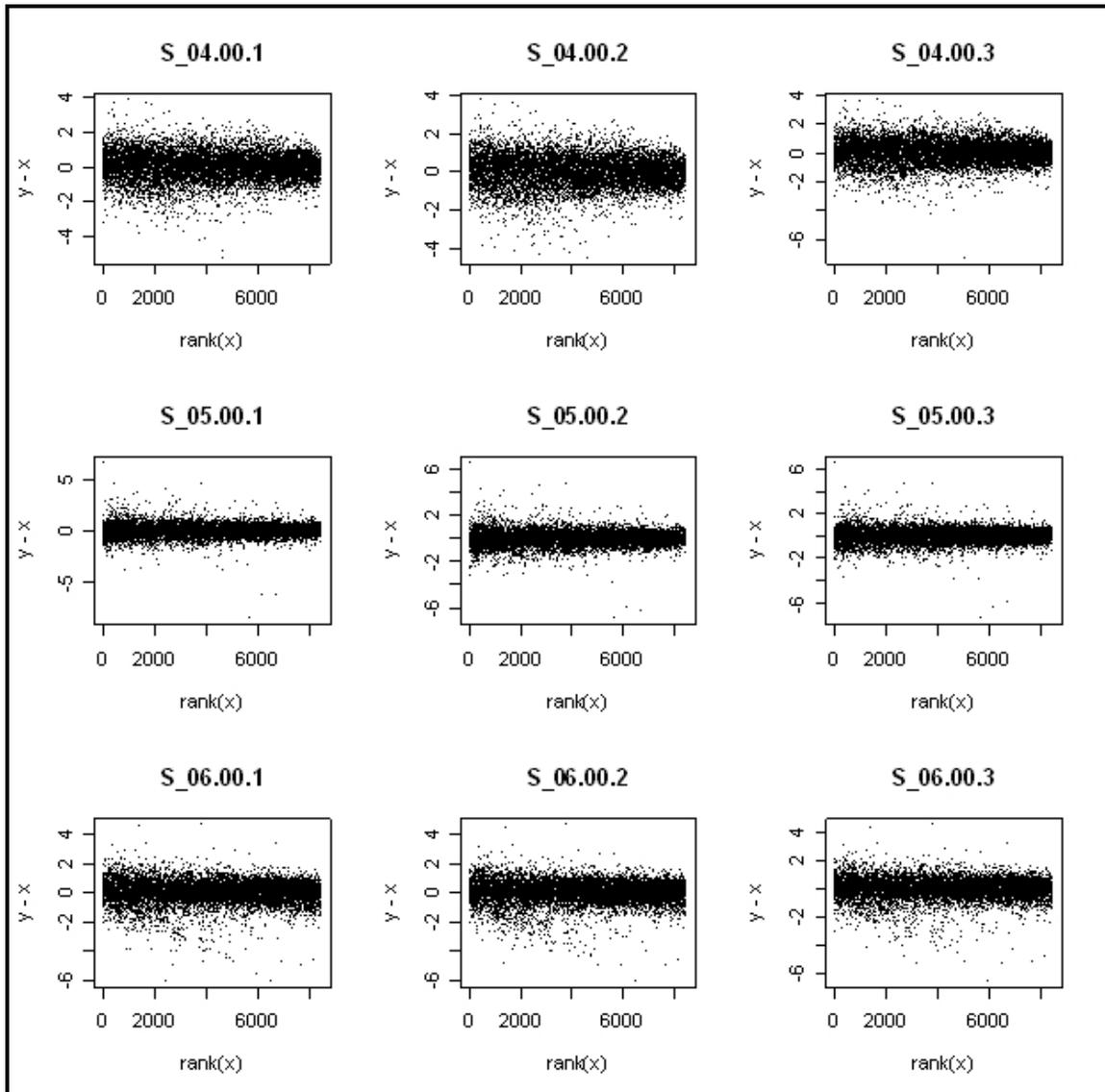
App. Abbildung 3: MVA-Plot NS_Pat Bild 3 von 4



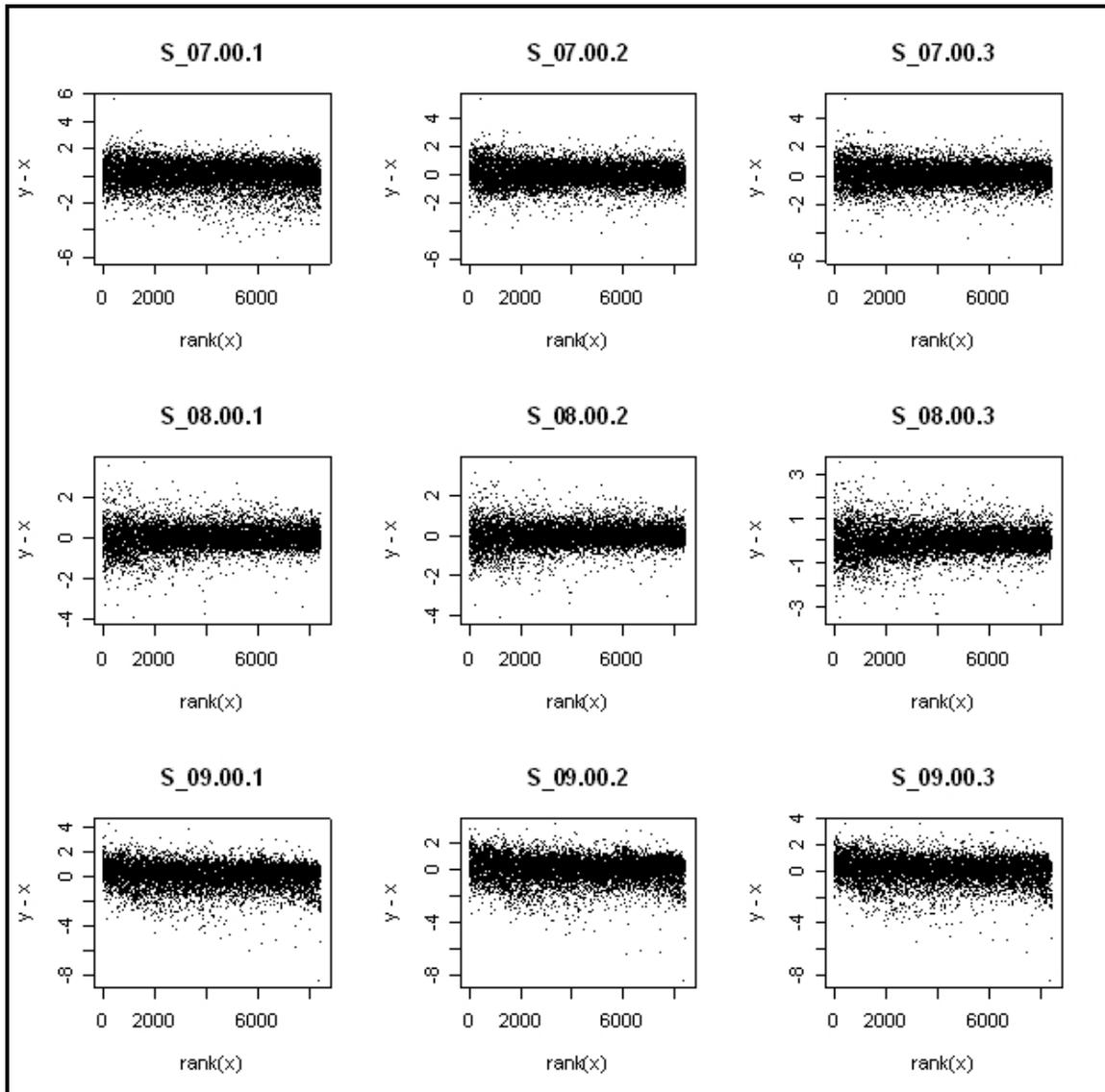
App. Abbildung 4: MVA-Plot NS_Pat Bild 4 von 4



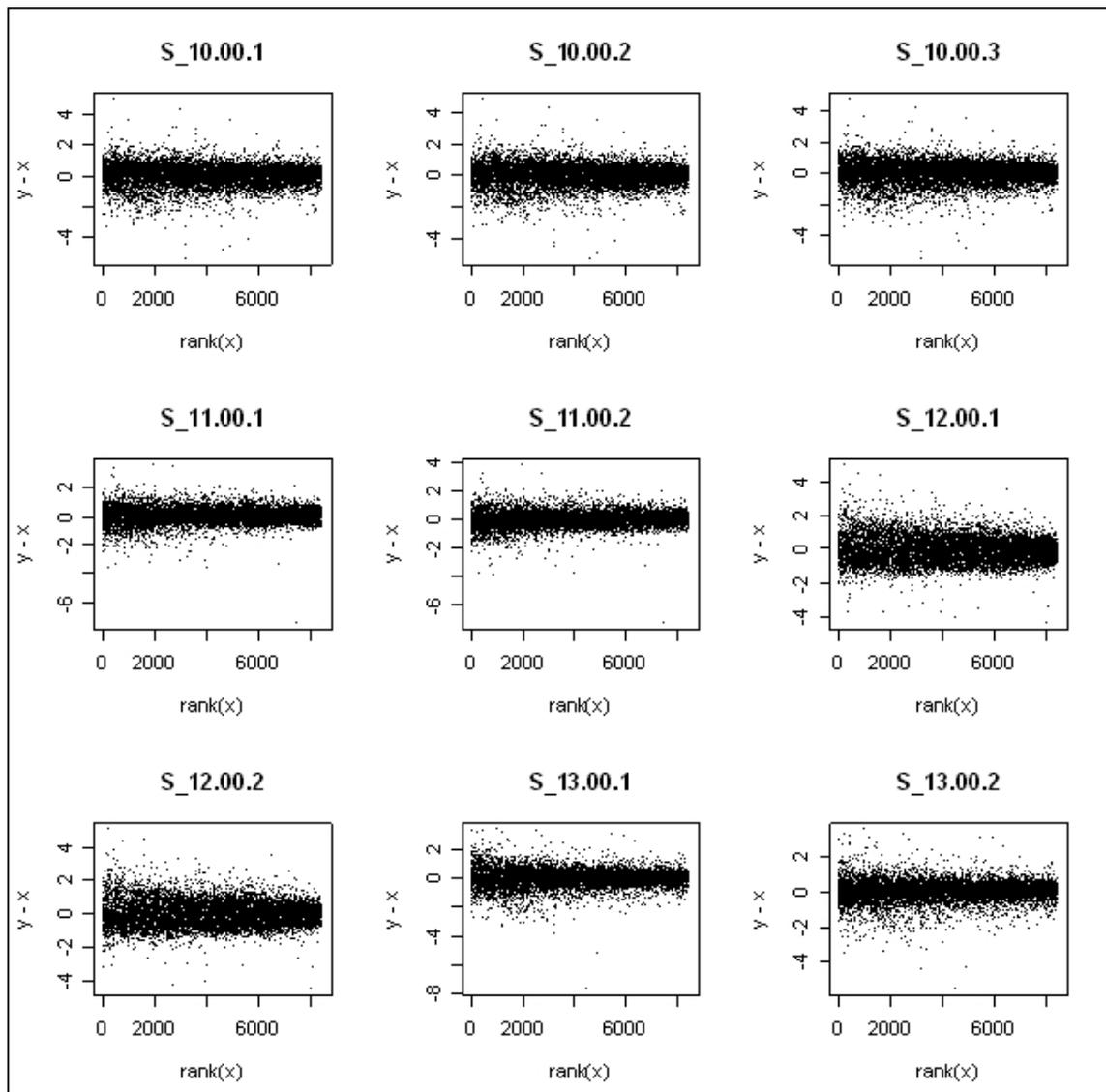
App. Abbildung 5: MVA-Plot S_Pat Bild 1 von 4



App. Abbildung 6: MVA-Plot S_Pat Bild 2 von 4



App. Abbildung 7: MVA-Plot S_Pat Bild 3 von 4



App. Abbildung 8: MVA-Plot S_Pat Bild 4 von 4

2 Signifikant regulierte Gene

Alle Signifikant regulierten Gene.

Das Signifikanzlevel ist mit $FDR \leq 0.05$ und $FC \geq 1.5$ festgelegt.

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	ABCB11	NM_003742	0.011	-1.896
Amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))	ABP1	NM_001091	0.000	-2.471
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	ADAMTS5	NM_007038	0.000	-2.605
adenosine A3 receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	NM_000686	0.050	-1.661
V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	AKT3	NM_005465	0.021	-1.608
Amphiphysin	AMPH	NM_001635	0.008	1.727
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	APCDD1	AL110199	0.001	-2.072
Arginase, liver	ARG1	NM_000045	0.000	2.379
Arrestin domain containing 3	ARRDC3	AB037797	0.046	-1.688
Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM	NM_018136	0.007	1.640
ATG16 autophagy related 16-like 2 (S. cerevisiae)	ATG16L2	AA741058	0.011	-1.860
Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	BAZ1A	NM_013448	0.007	2.083
BCL2-related protein A1	BCL2A1	NM_004049	0.049	1.699
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	NM_001168	0.001	2.054
Bloom syndrome	BLM	NM_000057	0.013	1.884
BUTYROPHILIN-LIKE 3	BTNL3	NM_006707	0.000	3.081
Nuclear DNA-binding protein	C1D	NM_006333	0.004	1.953
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
Chromosome 5 open reading frame 30	C5orf30	NM_033211	0.000	2.563
Chromosome 9 open reading frame 103	C9orf103	AF086281	0.003	1.984
Chromosome 9 open reading frame 91	C9orf91	AF038174	0.047	-1.702
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	CAMK2N1	NM_018584	0.017	-1.623
Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP8	NM_001228	0.031	1.827
Carbonyl reductase 3	CBR3	NM_001236	0.030	-1.696
Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	0.049	1.683
Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	0.022	1.618
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
CD163 molecule	CD163	NM_004244	0.010	1.688

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC20	NM_001255	0.026	1.647
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	NM_005195	0.019	1.615
Centromere protein E, 312kDa	CENPE	NM_001813	0.022	1.734
Centrosomal protein 55kDa	CEP55	NM_018131	0.042	1.530
Centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	CETN3	NM_004365	0.001	1.963
CHK1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>)	CHEK1	NM_001274	0.028	1.707
Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7	CHST7	NM_019886	0.050	-1.758
Charcot-Leyden crystal protein	CLC	NM_001828	0.000	-2.504
C-type lectin domain family 1, member B	CLEC1B	NM_016509	0.024	1.539
C-type lectin domain family 2, member B	CLEC2B	NM_005127	0.001	2.200
Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	COX7A2L	NM_004718	0.000	-4.395
Carboxypeptidase A3 (mast cell)	CPA3	NM_001870	0.000	-2.102
Copine V	CPNE5	AB046819	0.001	2.138
CWF19-like 1, cell cycle control (<i>S. pombe</i>)	CWF19L1	NM_018294	0.000	2.551
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Dishevelled associated activator of morphogenesis 2	DAAM2	AB002379	0.000	2.220
Disabled homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	DAB1	AF263547	0.010	-1.776
Doublecortin-like kinase 1	DCLK1	NM_004734	0.022	1.609
Diacylglycerol kinase, gamma 90kDa	DGKG	NM_001346	0.006	-1.878
Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHRS9	NM_005771	0.002	2.062
Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	DYRK2	NM_006482	0.008	-1.780
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	EIF1AY	NM_004681	0.017	-1.501
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
EPH receptor B4	EPHB4	NM_004444	0.008	-2.029
excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	ERCC1	M30855	0.006	-1.826
ER lipid raft associated 1	ERLIN1	NM_006459	0.013	1.849
Ets variant gene 7 (TEL2 oncogene)	ETV7	NM_016135	0.000	-2.307
Exosome component 5	EXOSC5	NM_020158	0.000	-2.195
Family with sequence similarity 82, member B	FAM82B	AK000672	0.036	1.733
F-box and WD repeat domain containing 7	FBXW7	NM_018315	0.006	-1.812
Fc fragment of IgA, receptor for	FCAR	U56237	0.007	1.679
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.002	-1.666
Folate receptor 1 (adult)	FOLR1	NM_000802-1	0.041	-1.567
Frizzled homolog 6 (<i>Drosophila</i>)	FZD6	NM_003506	0.009	1.911
Glycine C-acetyltransferase (2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase)	GCAT	NM_014291	0.010	-1.860
G kinase anchoring protein 1	GKAP1	NM_025211	0.046	-1.643

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	GNG11	BC009709	0.040	1.545
Granulysin	GPLY	NM_012483	0.003	-2.077
G protein-coupled receptor associated sorting protein 1	GPRASP1	NM_014710	0.008	-1.617
G protein pathway suppressor 1	GPS1	NM_004127	0.030	-1.710
Growth factor receptor-bound protein 10	GRB10	D86962	0.026	1.887
Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	GUCY1A3	NM_000856	0.018	-1.648
Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	GUCY1B3	NM_000857	0.002	2.156
Granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	GZMH	NM_033423	0.008	-1.968
Histone acetyltransferase 1	HAT1	NM_003642	0.005	2.158
Hedgehog interacting protein	HHIP	AY009951	0.036	1.613
Histone cluster 1, H4c	HIST1H4C	NM_003542	0.000	2.195
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')	HNRPH2	NM_019597	0.000	1.602
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	HPGD	NM_000860	0.000	2.988
HIV-1 Rev binding protein	HRB	NM_004504	0.010	1.773
Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3	HSD17B3	NM_000197	0.000	-2.282
Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	IDI1	NM_004508	0.030	1.839
Insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	NM_000599	0.006	-1.626
Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	IGJ	M12759	0.000	2.783
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Interleukin 18 receptor 1	IL18R1	NM_003855	0.007	1.765
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	NM_004633	0.018	1.883
Inversin	INVS	NM_014425	0.000	-1.976
Importin 11	IPO11	AK001696	0.005	2.114
Integrin, alpha 7	ITGA7	NM_002206	0.001	2.059
Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	ITGB3	S70348	0.026	1.682
Jumonji, AT rich interactive domain 1D	JARID1D	NM_004653	0.024	-1.650
Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	KCNMA1	U11058-1	0.001	1.608
KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	KHSRP	NM_003685	0.000	-1.948
KIAA0101	KIAA0101	NM_014736	0.017	1.701
Kazrin	KIAA1026	AB028949	0.006	-1.882
KIAA1576 protein	KIAA1576	AB046796	0.011	1.633
Kinesin family member 21A	KIF21A	AF155117	0.000	-2.547
Kelch-like 2, Mayven (<i>Drosophila</i>)	KLHL2	NM_007246	0.007	2.029
Leukocyte receptor cluster (LRC) member 4	LENG4	S82470	0.004	1.765
Leptin receptor	LEPR	NM_017526	0.026	1.841
Lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)	LGALS9	NM_009587	0.014	1.640
LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	LSM3	NM_014463	0.049	1.666
Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	MAPK8IP1	AF074091	0.000	-3.095

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Mediator complex subunit 18	MED18	NM_017638	0.000	2.378
Membrane metallo-endopeptidase	MME	NM_007289	0.010	-1.953
MATRIX METALLOPROTEINASE 23A	MMP23A	NM_004659	0.035	-1.575
Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	MMP8	NM_002424	0.000	3.338
Myelin protein zero-like 2	MPZL2	NM_005797	0.003	-2.163
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)	MS4A3	NM_006138	0.031	1.505
Myosin VC	MYO5C	NM_018728	0.005	-1.987
Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	NEDD4	D42055	0.021	1.874
Nuclear factor I/A	NFIA	AK024964	0.044	-1.669
NK3 homeobox 1	NKX3-1	AF247704	0.035	-1.713
N-ethylmaleimide-sensitive factor	NSF	NM_006178	0.011	1.862
Opa interacting protein 5	OIP5	BC015050	0.026	1.653
Oleoyl-ACP hydrolase	OLAH	NM_018324	0.000	2.264
Olfactomedin 4	OLFM4	NM_006418	0.000	2.409
Oligodendrocyte lineage transcription factor 2	OLIG2	NM_005806	0.049	-1.527
Organic solute transporter alpha	OSTalpha	AA442232	0.017	1.815
Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2RY14	NM_014879	0.017	-1.572
Pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	AK022962	0.007	-1.747
Protocadherin 12	PCDH12	NM_016580	0.020	-1.629
Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	PCOLCE2	NM_013363	0.000	2.887
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	PCSK1	NM_000439	0.002	2.025
Platelet derived growth factor C	PDGFC	NM_016205	0.010	1.863
PDZ and LIM domain 2 (mystique)	PDLIM2	AI246523	0.039	-1.790
PDZ domain containing 8	PDZD8	AL122051	0.023	1.888
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	PECR	NM_018000	0.033	1.887
Phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAR amidotransferase)	PFAS	AB002359	0.007	1.796
Pleckstrin homology-like domain, family B, member 3	PHLDB3	BC007947	0.044	-1.602
Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	PI3	NM_002638	0.000	-2.119
Phosphotyrosine interaction domain containing 1	PID1	NM_017933	0.047	-1.682
Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)	PIGA	NM_020473	0.031	1.653
phosphatidylinositol glycan, class C	PIGC	AL035301	0.020	1.748
Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	PLA2G7	NM_005084	0.001	-2.098
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1	PLEKHA1	NM_021622	0.035	-1.575
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1	PPEF1	NM_006240	0.028	1.793
Primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)	PRIM2	NM_000947	0.023	1.776
Protein kinase D2	PRKD2	AF309082	0.026	-1.536
Protein S (alpha)	PROS1	NM_000313	0.003	2.234

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	PRPF18	NM_003675	0.022	1.973
proline rich 12	PRR12	BAA86519	0.035	-1.681
Protease, serine, 1 (trypsin 1)	PRSS1	M22612	0.002	-1.717
Protease, serine, 23	PRSS23	AF193611	0.040	-1.608
Prune homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	PRUNE2	AB002365	0.000	2.556
Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	PSTPIP2	NM_024430	0.011	1.863
Putative neuronal cell adhesion molecule	PUNC	AF063936	0.049	1.520
RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1	RAB3IL1	NM_013401	0.031	1.550
V-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)	RALB	NM_002881	0.018	1.592
RNA binding motif protein 9	RBM9	AL009266	0.018	1.841
Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	NM_001269	0.012	1.906
RIMS binding protein 2	RIMBP2	AB002316	0.025	1.621
Ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	RNASE1	NM_002933	0.001	1.911
Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	ROCK1	NM_005406	0.048	1.606
Ribonuclease P/MRP 38kDa subunit	RPP38	NM_006414	0.006	-1.708
Ribosomal protein S27-like	RPS27L	NM_015920	0.029	1.545
Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	RPS6KA5	NM_004755	0.001	-2.186
SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1	SAMSN1	NM_022136	0.014	1.969
Scrapie responsive protein 1	SCRG1	NM_007281	0.026	1.527
Selenoprotein T	SELT	NM_016275	0.049	1.600
SUMO1/sentrin specific peptidase 7	SENP7	NM_020654	0.004	1.839
Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	SERPINB2	NM_002575	0.003	-1.860
Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	NM_000602	0.019	1.759
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 11	SLC2A11	NM_030807	0.002	-1.571
Solute carrier family 38, member 1	SLC38A1	NM_030674	0.020	1.604
Solute carrier family 45, member 4	SLC45A4	AB032952	0.002	-2.018
Solute carrier family 46, member 2	SLC46A2	NM_033051	0.011	-1.784
Solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6	SLC5A6	NM_021095	0.023	-1.548
Slit homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	SLIT1	AB011537	0.008	-1.541
Sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	SMPDL3A	BC018999	0.003	1.996
Synuclein, alpha interacting protein (synphilin)	SNCAIP	NM_005460	0.014	1.537
Spondin 2, extracellular matrix protein	SPON2	NM_012445	0.001	-2.145
Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	SPP1	NM_000582	0.000	-2.566
Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	SPTLC2	NM_004863	0.009	1.780
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	ST3GAL3	NM_006279	0.002	-1.783

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Synaptonemal complex protein 2	SYCP2	NM_014258	0.008	2.110
Spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	SYNE2	NM_015180	0.000	-1.670
Synaptojanin 2	SYNJ2	AL157424	0.002	-1.923
Tumor-associated calcium signal transducer 1	TACSTD1	NM_002354	0.000	2.594
Transcription factor B1, mitochondrial	TFB1M	NM_016020	0.006	-1.571
TIMP metalloproteinase inhibitor 4	TIMP4	NM_003256	0.045	1.714
Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	NM_005077	0.011	1.902
Transmembrane protein 176A	TMEM176A	NM_018487	0.000	-3.295
Transmembrane protein 45A	TMEM45A	NM_018004	0.020	1.847
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	TNFRSF17	NM_001192	0.000	2.336
Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	TPPP3	NM_016140	0.008	-1.561
Tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1	NM_003596	0.002	1.854
TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	AF110908	0.016	-1.849
transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	TRPM7	AY032950	0.012	2.021
Ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	UBE2H	NM_003344	0.037	1.719
Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	UQCRB	NM_006294	0.001	2.193
Vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin)	VAMP8	NM_003761	0.036	-1.659
Vanin 1	VNN1	NM_004666	0.022	1.769
V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4	NM_007268	0.000	2.057
Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	NM_003941	0.002	-1.950
WAP four-disulfide core domain 1	WFDC1	NM_021197	0.000	3.065
WD repeat and SOCS box-containing 1	WSB1	NM_015626	0.015	1.514
XIAP associated factor-1	XAF1	NM_017523	0.005	-1.931
Zinc finger E-box binding homeobox 2	ZEB2	NM_014795	0.008	1.877
Zinc finger protein 12	ZNF12	AK022691	0.005	-1.990
Zinc finger protein 267	ZNF267	NM_003414	0.017	1.637
Zinc finger protein 608	ZNF608	AL117587	0.011	1.614
CDNA clone IMAGE:4346813	"none"	AL137723	0.047	-1.723
CDNA clone IMAGE:4820713	"none"	AF131787	0.003	2.072
CDNA FLJ39064 fis, clone NT2RP7014583	"none"	AF339775	0.014	1.939
CDNA: FLJ21652 fis, clone COL08582	"none"	AK025305	0.015	1.691
CDNA: FLJ23006 fis, clone LNG00414	"none"	AK026659	0.023	1.763
MRNA; cDNA DKFZp434K1111 (from clone DKFZp434K1111)	"none"	AL157491	0.031	-1.635
MRNA; cDNA DKFZp564A023 (from clone DKFZp564A023)	"none"	AL049233	0.006	-1.882
MRNA; cDNA DKFZp586G021 (from clone DKFZp586G021)	"none"	AL050127	0.025	1.789
MRNA; cDNA DKFZp761E2423 (from clone DKFZp761E2423)	"none"	AL157466	0.023	-1.632
HLS	"none"	AAB35476	0.001	2.353
"HOMO SAPIENS HYPOTHETICAL PROTEIN MGC14433 (MGC14433), MRNA."	"none"	NM_032904	0.002	-1.737
"HOMO SAPIENS KIAA0748 GENE PROD-	"none"	NM_014796	0.006	-1.742

Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
UCT (KIAA0748), MRNA."				
"HOMO SAPIENS MRNA, CHROMOSOME 1 SPECIFIC TRANSCRIPT KIAA0484"	"none"	AB007953	0.000	-2.535
"HUMAN LSFR2 GENE, LAST EXON."	"none"	Y17456	0.015	-1.744
"ZH99G07.S1 HOMO SAPIENS CDNA, 3'	"none"	AA007633	0.015	1.867

App. Tabelle 1: Signifikant regulierte Gene, alphabetisch nach Symbol geordnet

3 Gene der überrepräsentierten Kategorien

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Adenosin A3 Receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
MRNA; cDNA DKFZp434K1111 (from clone DKFZp434K1111)	"none"	AL157491	0.031	-1.635
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Protein S (alpha)	PROS1	NM_000313	0.003	2.234
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	NM_000602	0.019	1.759
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.002	-1.666
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1	NM_003596	0.002	1.854
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
CD163 molecule	CD163	NM_004244	0.010	1.688
Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	RPS6KA5	NM_004755	0.001	-2.186
Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	PLA2G7	NM_005084	0.001	-2.098
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	ITGB3	S70348	0.026	1.682
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 2: GO:0009605~response to external stimulus

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 3: 2_GO:0042330~taxis

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 4: 3_GO:0006935~chemotaxis

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Adenosin A3 Receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Protein S (alpha)	PROS1	NM_000313	0.003	2.234
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	NM_000602	0.019	1.759
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.002	-1.666
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1	NM_003596	0.002	1.854
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
CD163 molecule	CD163	NM_004244	0.010	1.688
Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	PLA2G7	NM_005084	0.001	-2.098
Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	ITGB3	S70348	0.026	1.682
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 5: 4_GO:0009611~response to wounding

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Adenosin A3 Receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.002	-1.666
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1	NM_003596	0.002	1.854
Interleukin 18 receptor 1	IL18R1	NM_003855	0.007	1.765
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
CD163 molecule	CD163	NM_004244	0.010	1.688
Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	PLA2G7	NM_005084	0.001	-2.098
Granulysin	GNLY	NM_012483	0.003	-2.077
C-type lectin domain family 1, member B	CLEC1B	NM_016509	0.024	1.539
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 6: 5_GO:0006952~defense response

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 7: 6_GO:0007626~locomotory behavior

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
MRNA; cDNA DKFZp586G021 (from clone DKFZp586G021)	"none"	AL050127	0.025	1.789
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	TNFRSF17	NM_001192	0.000	2.336
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Interleukin 18 receptor 1	IL18R1	NM_003855	0.007	1.765
Interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	NM_004633	0.018	1.883
Platelet derived growth factor C	PDGFC	NM_016205	0.010	1.863
Leptin receptor	LEPR	NM_017526	0.026	1.841
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 8: 7_hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	NM_001168	0.001	2.054
Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	0.049	1.683
Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	0.026	1.647
Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	NM_001269	0.012	1.906
Centromere protein E, 312kDa	CENPE	NM_001813	0.022	1.734
Centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	CETN3	NM_004365	0.001	1.963
Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	ROCK1	NM_005406	0.048	1.606
Synaptonemal complex protein 2	SYCP2	NM_014258	0.008	2.110
Centrosomal protein 55kDa	CEP55	NM_018131	0.042	1.530
Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM	NM_018136	0.007	1.640
Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	0.022	1.618

App. Tabelle 9: 8_GO:0051301~cell division

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Protein S (alpha)	PROS1	NM_000313	0.003	2.234
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	NM_000602	0.019	1.759
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649

App. Tabelle 10: 9_hsa04610:Complement and coagulation cascades

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Adenosin A3 Receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.002	-1.666
Tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1	NM_003596	0.002	1.854
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
CD163 molecule	CD163	NM_004244	0.010	1.688
Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	PLA2G7	NM_005084	0.001	-2.098

App. Tabelle 11: 10_GO:0006954~inflammatory response

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Protease, serine, 23	PRSS23	AF193611	0.040	-1.608
Protease, serine, 1 (trypsin 1)	PRSS1	M22612	0.002	-1.717
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	PCSK1	NM_000439	0.002	2.025
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP8	NM_001228	0.031	1.827
Cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC20	NM_001255	0.026	1.647
Carboxypeptidase A3 (mast cell)	CPA3	NM_001870	0.000	-2.102
Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	MMP8	NM_002424	0.000	3.338
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	UBE2H	NM_003344	0.037	1.719
Matrix metalloproteinase 23A	MMP23A	NM_004659	0.035	-1.575
Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	RPS6KA5	NM_004755	0.001	-2.186
N-ethylmaleimide-sensitive factor	NSF	NM_006178	0.011	1.862
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	ADAMTS5	NM_007038	0.000	-2.605
Membrane metallo-endopeptidase	MME	NM_007289	0.010	-1.953
SUMO1/sentrin specific peptidase 7	SEN7	NM_020654	0.004	1.839
Granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	GZMH	NM_033423	0.008	-1.968

App. Tabelle 12: 11_GO:0006508~proteolysis

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Slit homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	SLIT1	AB011537	0.008	-1.541
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	NM_003941	0.002	-1.950
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
Vanin 1	VNN1	NM_004666	0.022	1.769
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Spondin 2, extracellular matrix protein	SPON2	NM_012445	0.001	-2.145
Zinc finger E-box binding homeobox 2	ZEB2	NM_014795	0.008	1.877
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	CAMK2N1	NM_018584	0.017	-1.623
Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	ITGB3	S70348	0.026	1.682

App. Tabelle 13: 12_GO:0051674~localization of cell

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Slit homolog 1 (Drosophila)	SLIT1	AB011537	0.008	-1.541
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	NM_003941	0.002	-1.950
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
Vanin 1	VNN1	NM_004666	0.022	1.769
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Spondin 2, extracellular matrix protein	SPON2	NM_012445	0.001	-2.145
Zinc finger E-box binding homeobox 2	ZEB2	NM_014795	0.008	1.877
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	CAMK2N1	NM_018584	0.017	-1.623
Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	ITGB3	S70348	0.026	1.682

App. Tabelle 14: 13_GO:0006928~cell motility

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Adenosin A3 Receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	NM_000686	0.050	-1.661
Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	GUCY1A3	NM_000856	0.018	-1.648
Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	GUCY1B3	NM_000857	0.002	2.156
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649

App. Tabelle 15: 14_GO:0008015~blood circulation

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Adenosin A3 Receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	NM_000686	0.050	-1.661
Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	GUCY1A3	NM_000856	0.018	-1.648
Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	GUCY1B3	NM_000857	0.002	2.156
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649

App. Tabelle 16: 15_GO:0003013~circulatory system process

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	NM_001168	0.001	2.054
Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	0.049	1.683
Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	0.026	1.647
Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	NM_001269	0.012	1.906
CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	CHEK1	NM_001274	0.028	1.707
Centromere protein E, 312kDa	CENPE	NM_001813	0.022	1.734
Centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	CETN3	NM_004365	0.001	1.963
Synaptonemal complex protein 2	SYCP2	NM_014258	0.008	2.110
Centrosomal protein 55kDa	CEP55	NM_018131	0.042	1.530
Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM	NM_018136	0.007	1.640
Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	0.022	1.618

App. Tabelle 17: 16_GO:0000279~M phase

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	NM_000686	0.050	-1.661
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	NM_002658	0.000	-2.402
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 18: 17_GO:0007610~behavior

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Adenosin A3 Receptor	ADORA3	AF226731	0.000	2.155
Hedgehog interacting protein	HHIP	AY009951	0.036	1.613
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	GNG11	BC009709	0.040	1.545
Growth factor receptor-bound protein 10	GRB10	D86962	0.026	1.887
Growth factor receptor-bound protein 10	GRB10	D86962	0.026	1.887
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	NM_000686	0.050	-1.661
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	0.021	1.956
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15- (NAD)	HPGD	NM_000860	0.000	2.988
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Diacylglycerol kinase, gamma 90kDa	DGKG	NM_001346	0.006	-1.878
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	NM_001400	0.000	2.653
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.002	-1.666
Integrin, alpha 7	ITGA7	NM_002206	0.001	2.059
Frizzled homolog 6 (Drosophila)	FZD6	NM_003506	0.009	1.911
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	NM_004054	0.042	1.649
EPH receptor B4	EPHB4	NM_004444	0.008	-2.029
Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	RPS6KA5	NM_004755	0.001	-2.186
Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	NM_005077	0.011	1.902
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	ENPP2	NM_006209	0.023	-1.602
Inversin	INVS	NM_014425	0.000	-1.976
Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2RY14	NM_014879	0.017	-1.572
C-type lectin domain family 1, member B	CLEC1B	NM_016509	0.024	1.539
Leptin receptor	LEPR	NM_017526	0.026	1.841
Leptin receptor	LEPR	NM_017526	0.026	1.841
F-box and WD repeat domain containing 7	FBXW7	NM_018315	0.006	-1.812
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	ITGB3	S70348	0.026	1.682
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	U20350	0.028	-1.640

App. Tabelle 19: 18_GO:0007166~cell surface receptor linked signal transduction

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	NM_001168	0.001	2.054
Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	0.049	1.683
Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	0.026	1.646
Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	NM_001269	0.012	1.905
Centromere protein E, 312kDa	CENPE	NM_001813	0.021	1.734
Centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	CETN3	NM_004365	0.001	1.963
Centrosomal protein 55kDa	CEP55	NM_018131	0.041	1.529
Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM	NM_018136	0.007	1.639
Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	0.021	1.618

App. Tabelle 20: 19_GO:0007067~mitosis

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Prune homolog 2 (Drosophila)	PRUNE2	AB002365	0.000	2.556
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	NM_001168	0.001	2.054
Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	0.049	1.683
Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	0.026	1.647
Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	NM_001269	0.012	1.906
CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	CHEK1	NM_001274	0.028	1.707
Centromere protein E, 312kDa	CENPE	NM_001813	0.022	1.734
Centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	CETN3	NM_004365	0.001	1.963
Synaptonemal complex protein 2	SYCP2	NM_014258	0.008	2.110
Centrosomal protein 55kDa	CEP55	NM_018131	0.042	1.530
Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM	NM_018136	0.007	1.640
Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	0.022	1.618

App. Tabelle 21: 20_GO:0022403~cell cycle phase

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	NM_001168	0.001	2.054
Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	0.049	1.683
Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20	NM_001255	0.026	1.647
Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	NM_001269	0.012	1.906
Centromere protein E, 312kDa	CENPE	NM_001813	0.022	1.734
Centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	CETN3	NM_004365	0.001	1.963
Centrosomal protein 55kDa	CEP55	NM_018131	0.042	1.530
Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM	NM_018136	0.007	1.640
Cyclin B1	CCNB1	NM_031966	0.022	1.618

App. Tabelle 22: 21_GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	AK022962	0.007	-1.747
Hedgehog interacting protein	HHIP	AY009951	0.036	1.613
Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	NM_000686	0.050	-1.661
Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP8	NM_001228	0.031	1.827
Frizzled homolog 6 (Drosophila)	FZD6	NM_003506	0.009	1.911
Zinc finger E-box binding homeobox 2	ZEB2	NM_014795	0.008	1.877

App. Tabelle 23: 22_GO:0035295~tube development

Gen Name	Symbol	ACCN	FDR	FC
Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	IGJ	M12759	0.000	2.783
Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	SERPING1	NM_000062	0.000	-2.467
Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	NM_000491	0.007	1.608
Interleukin 10	IL10	NM_000572	0.031	1.574
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	NM_000877	0.040	1.585
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	TNFRSF17	NM_001192	0.000	2.336
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	0.039	-1.522
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	NM_002001	0.002	-1.666
Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	NM_002704	0.009	1.966
Interleukin 18 receptor 1	IL18R1	NM_003855	0.007	1.765
Interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	NM_004633	0.018	1.883
Spondin 2, extracellular matrix protein	SPON2	NM_012445	0.001	-2.145
Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2RY14	NM_014879	0.017	-1.572
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	NM_031200	0.014	1.700
Fc fragment of IgA, receptor for	FCAR	U56237	0.007	1.679

App. Tabelle 24: 23_GO:0006955~immune response

4 Durchführung der RT-PCR

Pre-optimized TaqMan primer/probe sets (Quantitect Primer Assays) der ausgewählten Gene wurden von dem *Gene Globe Portal* (Qiagen, Hilden, Germany) bezogen. Die TaqMan Proben wurden mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) als *reporter* Farbstoff und mit 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine (TAMRA) als *quencher* Farbstoff gelabelt. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD; Quantitect Primer Assays) wurde parallel als interne Kontrolle zur Normalisierung gemessen.

Bevor die Probenmessung durchgeführt wurde, wurden alle *primer/probe sets* mithilfe 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. Wobei der Ct Wert den Schwellenwert darstellt, 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 (diese Daten werden nicht gezeigt).

Für die Probenmessung wurden 400 ng PAXgene RNA eines jeden Patienten zur cDNA Synthese mithilfe der *Superscript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) laut dem Herstellerhandbuch verwendet. Die RT-PCR wurde auf dem ABI PRISM® 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mithilfe des *Quantitect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) durchgeführt. Als Ausgangs cDNA wurde eine Menge gewählt welche 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, daraufhin wurde die normalisierte Expression eines ausgewählten Gens als Ratio zwischen totaler Expression des untersuchten Gens und der internen Kontrolle (G6PD) berechnet.