

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Klinikum Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

Analyse der Proteomprofile im Serum polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Suren

aus

Hannover

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Peter Biberthaler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Matthias Jacob
Prof. Dr. Hans-Joachim Andreß

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Viktoria Bogner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

gewidmet meiner geliebten Familie

Inhalt

1. Einleitung und Hintergrund	1
1.1 Definition und Epidemiologie des Polytraumas	1
1.2 Das posttraumatische SIRS und MOF	4
2. Zielsetzung	7
3. Patienten und Methoden	9
3.1 Studiendesign	9
3.2 Probengewinnung	10
3.3 Technische Aspekte der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)	10
3.3.1 Prinzipien der Präanalytik für massenspektrometrische Untersuchungen	13
3.3.2 Vorbehandlung mit magnetischen Mikropartikeln	14
3.3.3 Targetpräparation	15
3.3.4 Durchführung der Massenspektrometrie	16
3.4 Statistische und bioinformatische Auswertung von Proteomprofilanalysen	16
3.4.1 Supervised Training	16
3.4.2 Univariate und multivariate Analyse	17
3.4.3 Cross-Validierung und externe Validierung	22
3.5 Identifizierung der relevanten Proteine	23
3.6 Gruppeneinteilung	23
4. Ergebnisse	29
4.1 Patienten und klinische Daten	29
4.2 Probengewinnung	29
4.3 Durchführung der Massenspektrometrie	30
4.4 Supervised Training	30
4.4.1 Veränderungen der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf	33
4.4.2 Verletzungsschwere	33
4.4.3 Massentransfusion	36
4.4.4 Auftreten eines Multiorganversagens	39
4.4.5 Outcome	42
4.5 Externe Validierung	46
4.5.1 Verletzungsschwere	46
4.5.2 Massentransfusion	47
4.5.3 Auftreten eines Multiorganversagens	48
4.5.4 Outcome	48
4.6 Proteinidentifizierung mittels TagIdent	49

5. Diskussion	49
5.1 Studiendesign.....	50
5.1.1 Vergleichbarkeit des Kollektivs	50
5.2 Probengewinnung	53
5.2.1 Serum als Probe für massenspektrometrische Untersuchungen	53
5.3 Präanalytik	56
5.4 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Massenspektrometrie	57
5.5 Statistische und bioinformatische Auswertung	59
5.5.1 Supervised Training.....	59
5.5.2 Externe Validierung.....	61
5.6 Datenbankabgleich zur Identifizierung relevanter Proteine	65
5.6.1 Im Zusammenhang mit SIRS und MOF bekannte Inflamationsproteine.....	65
5.6.2 Für klinische Klassen spezifische Markerproteine.....	66
5.6.3 Mehrfach gemessene Inflamationsproteine	69
6. Zusammenfassung	71
7. Beantwortung der Fragestellung	74
8. Anhang	75
8.1 Aufstellung der identifizierten Proteine	75
8.2 Übersicht der identifizierten Inflamationsproteine.....	81
8.3 Patientendaten.....	83
9. Literatur	89
10. Danksagung	99

1. Einleitung und Hintergrund

1.1 Definition und Epidemiologie des Polytraumas

Ein Polytrauma definiert sich nach *Tscherne* als gleichzeitige Verletzung mehrerer Körperregionen oder Organsysteme, von denen mindestens eine oder die Kombination aus mehreren Verletzungen lebensbedrohlich ist (133).

Im Jahr 2009 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 393.328 Menschen durch Verkehrsunfälle verletzt, 4.152 tödlich (124). Insgesamt starben 31.832 Personen durch Unfälle (123). Unfallverletzungsbedingte Todesfälle sind in der gesamten westlichen Welt die führende Todesursache bis zu einem Alter von 45 Jahren (29) und die dritthäufigste Todesursache aller Altersgruppen weltweit (78).

Darüberhinaus kommt es nach einer schweren Verletzung zu einer erheblichen psychischen Belastung der Patienten und ihrer Angehörigen, zu ethischen Fragestellungen im Rahmen der intensivmedizinischen Betreuung polytraumatisierter Patienten (132) und nicht zuletzt zu volkswirtschaftlichen Konsequenzen.

Die Kosten, die bei der medizinischen Versorgung eines polytraumatisierten Patienten entstehen, lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Verletzungsschwere und der dadurch variablen stationären Verweildauer sowie des unterschiedlichen operativen und personellen Aufwandes nicht allgemeingültig angeben. *Schwermann* errechnet Kosten von 32.000€ pro polytraumatisiertem Patient, womit er im Vergleich zu anderen Autoren im mittleren Bereich liegt (72; 115; 140). In den USA werden jährlich 250 Mrd. US-Dollar für die Behandlung von Verletzungen aller Art ausgegeben (78). *Richter et al.* schätzen die jährlichen Kosten für die akutstationäre Behandlung Schwerverletzter in Deutschland auf 2 Mrd. Euro (107). Anhand des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie wird für 2006 eine durchschnittliche

stationäre Krankenhausverweildauer von 25,9 Tagen angegeben, wovon 11,6 auf die Intensivstation entfallen (107). Zusammen mit den therapiebedingten Aufwendungen auf der Intensivstation machen die primären und sekundären Operationen den größten Anteil der Kosten aus (96; 107). Fast 80% der Polytrauma-Patienten benötigen operative Eingriffe und werden durchschnittlich 4,3 mal operiert (17).

Mehrfach verletzt werden überwiegend junge Patienten. Europäische und amerikanische Autoren machen bezüglich des Alters vergleichbare Durchschnittsangaben [*Bardenheuer*: 38,5 Jahre; *Richter*: 42,2; *Cothren*: 47,3; *Potenza*: 34,1 (17; 35; 102; 107)]. Sowohl in den USA als auch in Europa sind Polytraumatisierte zu über 70% männlich (35; 102; 121). Unfälle sind nicht nur der Hauptgrund für den Verlust von qualitätsadjustierten Lebensjahren [*Quality Adjusted Life Years*, QALY (93)], sie verursachen darüberhinaus hohe Behandlungskosten und als volkswirtschaftlichen Faktor einen Verlust an Arbeitsjahren (13; 17; 96; 140).

Bei polytraumatisierten Verletzten finden sich in den europäischen Verkehrsballungsräumen ursächlich am häufigsten Verkehrsunfälle (56,3%), Stürze (27,7%) (107) und seltener mit unter 10% Suizide (17). Verletzungen durch stumpfe Gewalteinwirkung überwiegen in Deutschland mit 95% deutlich (107). In den urbanen Gebieten der USA mit ihrer höheren Kriminalität und Suizidalität sind penetrierende Verletzungen mit 24% (35) bis 50% (39; 112) häufiger.

Die Gesamtmortalität Polytraumatisierter liegt zwischen etwa 15% (107) und 20% (17) und hat im zeitlichen Verlauf drei Gipfel (132): Bis zu 50% versterben bereits in der präklinischen Phase am Unfallort oder auf dem Transport vor Erreichen der Klinik (35; 39; 112).

Ein weiterer Mortalitätsschwerpunkt ist mit 54,2% Häufigkeit (35) bzw. 51,7% (17) im Zeitraum bis 24h nach stationärer Klinikaufnahme zu registrieren. Als Ursachen für die

frühe Mortalität finden sich das schwere Schädel-Hirn-Trauma (SHT) und/oder die Folgen eines schweren hämorrhagischen Schocks (17). Durch Verbesserungen der Verkehrssicherheit, zum Beispiel Anschnall- und Helmpflicht, und Verbesserungen im Rettungswesen sowie der initialen Diagnostik und Versorgung der Patienten, im Sinne eines standardisierten Schockraummanagements (23; 66; 125), konnte die frühe Mortalität nach einem Polytrauma in den letzten Jahrzehnten reduziert werden. Dennoch sterben die meisten Patienten innerhalb dieses frühen Zeitraumes.

Die Mortalität Tage und Wochen nach stationärer Aufnahme wird zwar weiterhin vom Ausmaß des SHT dominiert, es kommen jedoch Komplikationen wie Sepsis, *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) und Multiorganversagen (*Multiple Organ Failure*, MOF) hinzu (57; 78; 87; 90).

Die Bedeutung dieser Komplikationen nimmt aus verschiedenen Gründen zu. Einerseits verbessert die Versorgung in spezialisierten Traumazentren durch dafür ausgebildete Teams und die Konzentration von diagnostischen und therapeutischen Ressourcen das initiale Überleben (38). Andererseits verschiebt sich dadurch für die Verletzten das Risiko von der Primärletalität aufgrund später Komplikationen hin zur Sekundärletalität [Reviews: (18; 35; 38; 100)]. Außerdem nimmt das Durchschnittsalter der Traumapatienten zu (35; 87). Mit zunehmendem Alter ist zwar vor allem die frühe Mortalität erhöht (17), ältere Patienten sind jedoch auch signifikant gefährdeter, Komplikationen zu entwickeln, wenn sie länger überleben (105; 121). Folglich kommt der Prävention, Diagnostik und Therapie des SIRS und MOF im Rahmen des Polytrauma-Managements zunehmende Aufmerksamkeit zu.

1.2 Das posttraumatische SIRS und MOF

Als Multiorganversagen (*Multiple Organ Failure*, MOF) wird die gleichzeitige oder sequenzielle Funktionseinschränkung bzw. das Versagen mehrerer Organsysteme bezeichnet (45; 119; 130). Charakteristisch ist hierbei eine generalisierte Immunreaktion (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) mit resultierender Gewebeschädigung (47; 92; 98).

Bereits 1969 erkannten und beschrieben *Skillman et al.* ein Syndrom auf einer chirurgischen Intensivstation mit einer Letalität von 80%, das aus Hypotension, Sepsis und Lungenversagen bestand, vergesellschaftet mit Ikterus und Magengeschwüren. Sie vermuteten einen pathogenetischen Zusammenhang dieses Syndroms mit Verletzungen und/oder operativen Eingriffen (119). Der Begriff des Multiorganversagens wurde 1977 von *Eiseman et al.* eingeführt (45). Die Hälfte des in ihrer Arbeit beschriebenen Patientenkollektivs war aufgrund von Verletzungen (40%) oder starkem Blutverlust (11%) hospitalisiert. Die Mortalität betrug 69%. Spätere Arbeiten konnten zeigen, dass sowohl die Verletzung allein (49; 57; 91; 138) als auch eine posttraumatische Infektion und Sepsis Auslöser eines MOF sein können [*Reviews*: (18; 55; 81)].

Für die Entstehung des SIRS und MOF infolge eines hämorrhagischen Schocks oder einer Verletzung ohne Infektion wurden verschiedene auslösende Ursachen vermutet. Dazu zählen die Diffusion bakterieller Endo- und Exotoxine aus dem durch Ischämie geschädigten Darm (36; 101; 142) sowie die Möglichkeit einer Organschädigung durch Störungen der Mikrozirkulation mit daraus resultierender Gewebehypoxie [(28; 53; 61); *Review*: (55)].

Ein mögliches Entstehungsmodell des Multiorganversagens lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Eine schwere Verletzung führt zu einer überschießenden Immunreaktion, dem SIRS (47). Bei einem Teil der Verletzten exazerbiert dieses SIRS zu einem frühen *Multiple Organ Dysfunction Syndrome (early-onset MODS)* (30). Ist dies nicht der Fall, wird die überschießende Immunreaktion durch eine Phase der Immunparalyse, das *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome (CARS)* (50; 73), abgelöst. Die weitere Provokation einer Immunreaktion in diesem Intervall, z.B. durch eine Infektion (84), eine weitere Gewebstraumatisierung (56; 88; 97; 138) oder eine Massentransfusion (60; 65), löst eine späte Organdysfunktion aus, das *late-onset MODS*. Sowohl *early-* als auch *late-onset MODS* können in ein Multiorganversagen münden [(84); *Review*: (55; 81)].

Die zellulären und humoralen Mechanismen, die zu diesen Immunreaktionen führen, sind nicht abschließend geklärt. Im Folgenden soll ein Überblick über die wichtigsten bekannten Vorgänge gegeben werden.

Die traumatische Zerstörung von Gewebe setzt eine Reihe von immunogenen Stimuli frei, die eine Aktivierung des Komplementsystems und der unspezifischen zellulären Immunantwort, vor allem der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Monozyten, zur Folge haben. Durch Komplementspaltprodukte, Kontakt mit immunogener Gewebematrix und Phagozytose von Zellfragmenten werden diese zur Antigenpräsentation und Degranulation von reaktiven Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (NO) angeregt und verursachen so eine weitere Schädigung des Gewebes. Ferner sezernieren die PMN proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), die zusammen mit o.g. Antigenpräsentation Einfluss auf das spezifische zelluläre Immunsystem nehmen.

Vor allem die T-Lymphozyten reagieren bei Stimulation des T-Zellrezeptors (TCR) mit gesteigerter Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).

IFN- γ ist ein Botenstoff, der vor allem auf die Zellen des unspezifischen Immunsystems wirkt und besonders Makrophagen zur Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine und NO-Moleküle anregt. Vermehrt gebildeter TNF- α stößt in der Leber die Produktion von Akutphaseproteinen, wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und Fibrinogen, an. Weitere Funktionen von TNF- α beinhalten die Aktivierung der Gerinnung durch vermehrte Ausschüttung von *Platelet-Activating Factor* (PAF) und Expression von Selektinen. Weil TNF- α zusammen mit IL-1 β außerdem die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle (*Intercellular Adhesion Molecules*, ICAMs) verstärkt, begünstigt TNF- α Gewebeschäden an Organen, die nicht von der eigentlichen Verletzung betroffen sind. An dieser Stelle ist auch das aktivierte Komplementspaltprodukt C5a zu nennen, das PMN und Makrophagen aktiviert und durch Chemotaxis in entferntere Gewebe lenkt, wo sie, von ICAMs vermittelt, in den Extravasalraum übertreten und oben genannte Gewebsschäden verursachen [Übersichtsarbeiten: (38; 55; 62; 81)].

Bereits während dieser hyperinflammatorischen Phase gibt es Anzeichen für die auf das SIRS folgende Immunparalyse. So ist das von Makrophagen ebenfalls sezernierte Prostaglandin E₂ (PGE₂) ein endogener Immunsuppressor und bewirkt u.a. eine Verschiebung im Verhältnis der T-Helferzellen (T_H-Zellen) zugunsten einer immunsuppressiv wirkenden Subpopulation von T_{H2}-Zellen. T-Lymphozyten, die einige Tage nach der Verletzung aus dem Blut polytraumatisierter Patienten isoliert wurden, gingen *in vitro* nach Stimulation nicht in die Mitose und produzierten kein IL-2 mehr (86; 108; 141). Andere Beobachtungen zeigten, dass im Gegensatz dazu die Ausschüttung der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 erhöht ist (42; 79; 117), was *Faist* und Mitarbeiter mit der im Verhältnis zur T_{H1}- vermehrten T_{H2}- Zellpopulation in Verbindung bringen [(11; 143); *Review*: (10)]. Des Weiteren bewirkt PGE₂ eine Hemmung der IgM-Synthese in B-Lymphozyten, der Expression von

proinflammatorischem IL-2 und IL-2-Rezeptoren in T-Zellen sowie der Produktion von IL-1 und TNF- α in den Makrophagen selbst. Neben seinen oben genannten Funktionen induziert TNF- α in Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen den programmierten Zelltod. Hinzu kommt die Erschöpfung des aktivierbaren Reservoirs an Makrophagen und Komplement durch ihre überschießende Aktivierung. [Übersichtsarbeiten: (10; 62)].

Für die Entwicklung und Ausprägung des SIRS und MOF ist offensichtlich ein sehr komplexes Zusammenspiel von zellulärer Aktivität, Zytokinen und anderen Mediatoren sowohl im örtlichen als auch im zeitlichen Kontext von Bedeutung (10; 38; 62; 81).

2. Zielsetzung

In einer vorangegangenen Oligonukleotid-*Microarray*-Studie konnten erstmals Hinweise dafür entdeckt werden, dass es hochspezifische mRNA (*messenger ribonucleic acid*) - Expressionsprofile gibt, die sich mit der Entwicklung eines Multiorganversagens und dem endgültigen klinischen Verlauf hinsichtlich Überleben oder Versterben des Patienten hochsignifikant korrelieren lassen (20). Anhand dieser Methode kann die mRNA-Expression durch Fluoreszenzmarkierung bestimmt und in mehrstufigen biostatistischen Auswertungsverfahren mit klinischen Einflussfaktoren korreliert werden. Ein biologischer Effekt wird jedoch nicht durch die mRNA-Expression selbst vermittelt, sondern durch die von ihr kodierten Proteine.

In diesem Zusammenhang rückt die Analyse des Serumproteoms mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) immer mehr ins Zentrum des Interesses (6; 16). Analog zum Genom bezeichnet der Begriff Proteom die Gesamtheit aller exprimierten Proteine in einer

beliebigen Zelle, einem Zellkompartiment, Gewebe oder Organismus zu einer bestimmten Zeit (120).

In zahlreichen klinisch-experimentellen Untersuchungen konnten verschiedenen Krankheitsbildern eindeutig korrelierende Proteinexpressionsmuster zugeordnet werden (5; 37). Diagnostischen Charakter haben dabei nicht die einzelnen Proteine, die dieses Muster bilden, sondern das spezifische Proteomprofil selbst (37; 99; 103).

Ziel dieser Arbeit ist es daher,

- i) zu überprüfen, ob sich das Proteinexpressionsmuster im Serum polytraumatisierter Patienten im zeitlichen Verlauf der frühen posttraumatischen Phase verändert,
- ii) daraufhin zu untersuchen, ob sich spezifische Proteinexpressionsprofile nachweisen lassen, die mit klinischen Parametern wie der Verletzungsschwere, dem Transfusionsbedarf, dem Auftreten eines Multiorganversagens und dem endgültigen klinischen Verlauf im Sinne von Versterben oder Überleben des Patienten innerhalb von 90 Tagen nach Aufnahme korrelieren,
- iii) bioinformatische Vorhersagemodelle zu erstellen, die eine Zuordnung der Patienten zu verschiedenen Gruppen ermöglichen, die anhand o.g. klinischer Parameter gebildet wurden. Anhand dieser Modelle die gemessenen Expressionsmuster und die in Punkt ii) nachgewiesenen Profile zu validieren und
- iv) die Proteine zu identifizieren, aus denen sich die nachgewiesenen Proteinexpressionsprofile zusammensetzen, um mögliche bisher unbekannte Marker für die posttraumatische Ganzkörperinflammation aufzudecken.

3. Patienten und Methoden

3.1 Studiendesign

Die vorliegende prospektive Studie wurde nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (AZ: 012/00) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Grundlage bildeten 36 polytraumatisierte Patienten mit einem *Injury Severity Score* (ISS) (14; 15) ≥ 16 Punkte. Diese waren durch die Schwere ihrer Verletzungen, Intubation, Bewußtlosigkeit oder Analgosedierung nicht in der Lage, zum Zeitpunkt ihrer Aufnahme in die Studie einzuwilligen. Daher wurde die Einwilligung nachgeholt, nachdem die Patienten wieder einen sie dazu befähigenden körperlichen und kognitiven Zustand erreicht hatten. Im Falle des Versterbens oder bleibender geistiger Schäden eines Patienten wurde die Einwilligung seitens eines nahen Angehörigen oder gesetzlichen Vertreters eingeholt.

Zu insgesamt sechs definierten Zeitpunkten wurde den 36 Patienten unter standardisierten Bedingungen Blut abgenommen: bei stationärer Aufnahme des Patienten (innerhalb von 90 Minuten nach Trauma) und nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden, wobei von dem im Notarzteinsatzprotokoll vermerkten Unfallzeitpunkt ausgegangen wurde. Es wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen und ausgewertet, die mindestens bis einschließlich der 24h-Blutabnahme überlebten. Ausschlusskriterium war außerdem eine Zuverlegung des Patienten nach Erstversorgung in einer anderen Klinik. Zur Feststellung des definitiven klinischen *Outcomes* wurde das Überleben des Patienten bis 90 Tage nach Unfall als Endpunkt der Beobachtung festgelegt. Die präklinischen und klinischen Daten der Patienten wurden gemäß den Richtlinien der Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten (110) erhoben. Darüber hinaus wurde zu jedem

Abnahmezeitpunkt der *Multiple Organ Failure Score* (MOF-Score) nach *Goris et al.* in der von *Lefering et al.* modifizierten Form berechnet. Ein MOF-Score ≥ 4 Punkte gilt als eingetretenes Multiorganversagen (57; 76).

3.2 Probengewinnung

Bei jeder Blutentnahme wurden 5 ml Blut zur Gewinnung von Serum abgenommen. Nach Zentrifugierung (10 min bei 2500 U/min und 20 °C) wurde der Überstand des Serumröhrchens abpipettiert, jeweils 1 ml in ein 1,5 ml Standard-Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) überführt und die Proben sofort bei -80 °C eingefroren.

3.3 Technische Aspekte der *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

Die Proteomprofilanalyse beruht auf drei Vorgängen:

- i) Die in einer Probe enthaltenen Proteine werden anhand bestimmter Eigenschaften separiert (s. unter 3.3.2 *Vorbehandlung mit magnetischen Mikropartikeln*),
- ii) ihr Massenspektrum gemessen und
- iii) die Ergebnisse mit geeigneten Bioinformatik-Softwareprogrammen ausgewertet [Review: (120)].

Die Separation kann durch ein- oder zweidimensionale Chromatographie, Elektrophorese oder anhand von chemischen und physikalischen Eigenschaften der zu analysierenden Proteine durchgeführt werden [Übersichtsarbeit: (2)].

In der vorliegenden Arbeit wird eine Fraktionierung mittels magnetischer Mikropartikel durchgeführt (s. 3.3.2).

Die Messung des Massenspektrums setzt voraus, dass die Analyten ionisiert vorliegen. Bei der MALDI-TOF MS wird dies mittels eines UV-Lasers erreicht. Die aufgereinigte Probe wird in einer UV-absorbierenden Matrix, meist einer organischen Säure (s. Abschnitt 3.3.3 *Targetpräparation*), gelöst und kristallisiert mit dieser zusammen. Im Vakuum wird die Matrix mit dem UV-Laser beschossen und dadurch in die Gasphase überführt. Dabei findet ein Protonentransfer von der Matrix zum Analyten statt, wodurch letzterer ionisiert wird. Durch ein elektromagnetisches Feld, das Nanosekunden nach dem Laserimpuls generiert wird, werden die Ionen beschleunigt. Sie durchqueren eine feldfreie Strecke im Flugzeitanalysator, an deren Ende sie von einem Detektor registriert werden. Nach ihrer Beschleunigung im elektromagnetischen Feld ist ihre kinetische Energie gleich derjenigen, die zu ihrer Beschleunigung aufgewendet wurde (s. Abb. 1):

$$\frac{1}{2} \times m \times v^2 = z \times e \times U$$

m = Masse des Ions

v = Fluggeschwindigkeit des Ions

z = Ladungszahl des Ions

e = Elementarladung

U = Beschleunigungsspannung

Nach Einsetzen von $\frac{s}{t}$ anstelle von v lässt sich die Formel wie folgt ausdrücken:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \times e \times U \times t^2}{s^2}$$

s = im Flugzeitanalysator zurückgelegte Strecke

t = Flugzeit des Ions

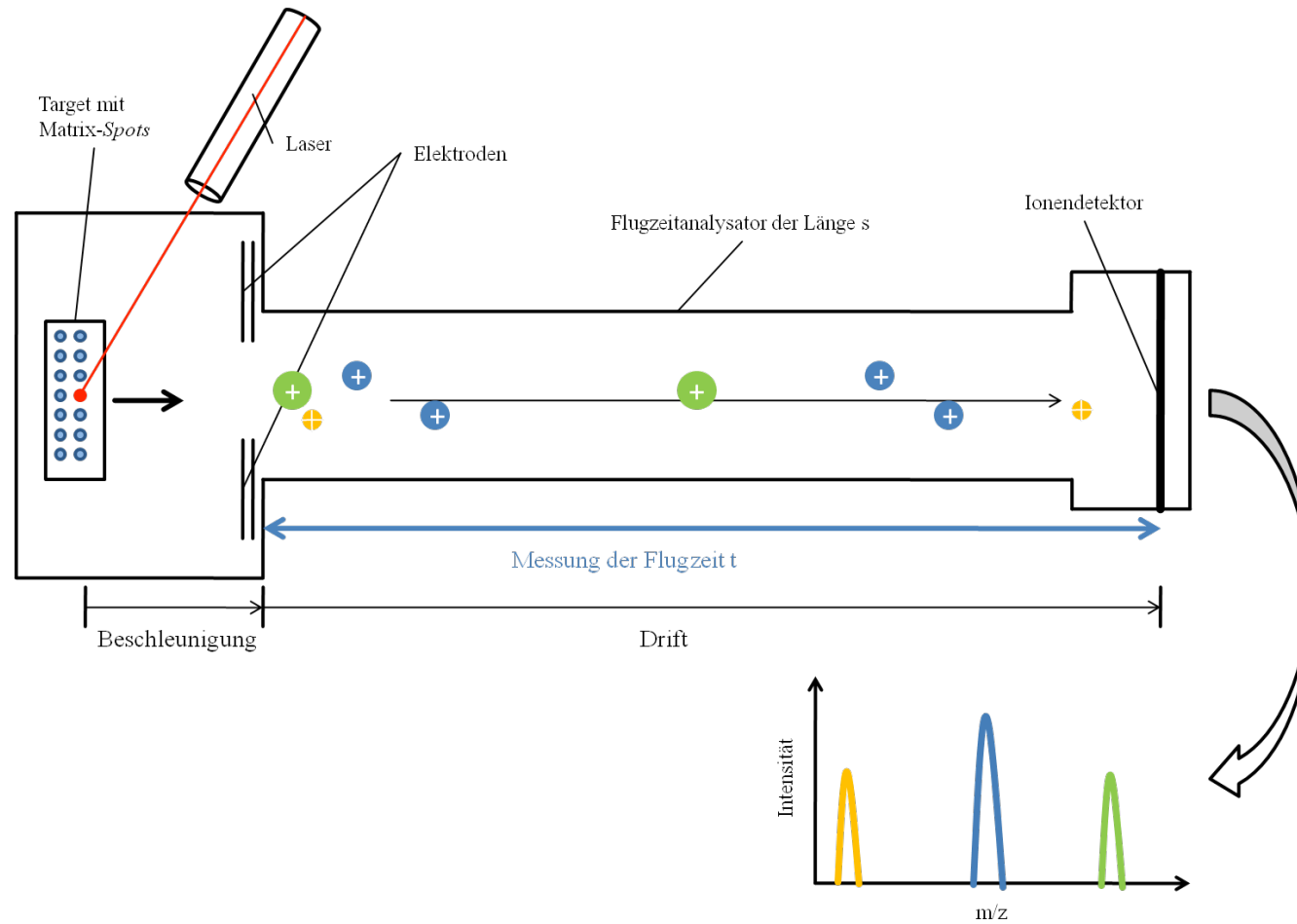


Abbildung 1: Schematische Darstellung der MALDI-TOF MS: Die mit Matrix kokristallisierten Analyten auf dem *Target* werden durch Laserbeschuss ionisiert und in die Gasphase überführt. Durch ein elektrisches Feld beschleunigt, driften die Ionen durch den Flugzeitanalysator und treffen auf einen Detektor. Kleinere Ionen legen diese Strecke schneller zurück. Durch Messung der Flugzeit t lässt sich ihre Größe bestimmen. Unten: Der Wert Masse pro Ladung (m/z) beschreibt die Größe des Ions, die Signalintensität die Häufigkeit. [Abbildung modifiziert nach dem Original in (77)]

Durch Messung der Flugzeit t im Flugzeitanalysator kann also das Verhältnis von Masse m und Ladung z bestimmt werden. Die Einheit m/z beschreibt die Masse bzw. Größe eines Peptids, dessen Häufigkeit wird durch die Signalintensität (in *arbitrary units*) im Verhältnis zur höchsten gemessenen Intensität des Spektrums ausgedrückt. Da beim Ionisierungsvorgang fast nur einfach geladene Ionen entstehen, kann m/z mit der Masse des Analyten in Dalton (Da) gleichgesetzt werden [(103), *Review*: (2)].

3.3.1 Prinzipien der Präanalytik für massenspektrometrische Untersuchungen

Die Fraktionierung der Proteine und Peptide einer Probe erfolgt entsprechend ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften. Hierzu können Mikropartikel (*Microbeads*) eingesetzt werden, die über definierte funktionelle Oberflächeneigenschaften, wie hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen oder schwachen Anionen- bzw. Kationenaustausch, verfügen [(19; 46; 103); *Review*: (120)]. Diese Partikel haben einen Durchmesser $< 1 \mu\text{m}$ und zahlreiche, ca. 40 nm große Poren, die ihre Oberfläche deutlich (spezifische Gesamtfläche von $100 \text{ cm}^2/\text{g}$) vergrößern und so gegenüber anderen Fraktionierungsverfahren zu einer größeren Ausbeute an Peptiden und damit einer höheren Anzahl gemessener *Peaks* führen (19; 51; 135). In Anwesenheit eines geeigneten Bindungspuffers werden Analyten mit ähnlichen Eigenschaften an die Partikel gebunden (46). Die Probe wird anschließend aufgereinigt und danach die Analyten von den Mikropartikeln getrennt und mit der Matrixlösung vermischt. Die Matrix wird dann auf einen metallischen Träger (*Target*) pipettiert.

Für die vorliegende Studie wurde als *Target* der *AnchorChip* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) verwendet. Dieser verfügt über eine bestimmte Anzahl scharf abgegrenzter hydrophiler Punkte (*Anchors*) auf einer ansonsten stark hydrophoben Oberfläche. Es zentrieren sich die Probentropfen auf der kleinen Fläche dieser Punkte. Dadurch werden mehr Daten mit höherer Sensitivität erfasst als bei Tropfen normaler Größe auf einem

Target ohne *Anchors*. Darüber hinaus wird eine automatisierte Messung begünstigt, da nicht nach derjenigen Stelle des Matrixtropfens gesucht werden muss, an der die Analytkonzentration am höchsten ist und die meisten Signale gemessen werden können (113; 144).

3.3.2 Vorbehandlung mit magnetischen Mikropartikeln

Gemäß der Empfehlungen der Bruker Daltonik GmbH wurden jeweils 5 µl Serum mit 10 µl Bindungspuffer verdünnt, zu 5 µl Mikropartikellösung hinzugefügt und gemischt. Diese Mikropartikel besitzen eine Beschichtung für eine hydrophobe Wechselwirkung mit Kohlenstoffketten einer Länge von acht Atomen (*Magnetic Beads Based Hydrophobic Interaction Chromatography C8*, MB-HIC C8). Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute wurden die Mikropartikel durch magnetische Kraft gegen die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen und der Überstand abpipettiert. Daraufhin wurden 100 µl Waschlösung hinzugefügt, die Mikropartikel mehrmals magnetisch durch das Gefäß bewegt und, wie im vorherigen Schritt, die Lösung als Überstand abpipettiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Um die Proteinfraction von den Mikropartikeln zu trennen, wurden 5 µl Acetonitril - mit Wasser im Volumenverhältnis 1:1 verdünnt - der Mikropartikelsuspension zugegeben und gemischt. Der Überstand mit der eluierten Proteinfraction wurde, wie oben beschrieben, von den Mikropartikeln getrennt und in ein anderes Reaktionsgefäß überführt (s. Abb. 2) (19; 135).

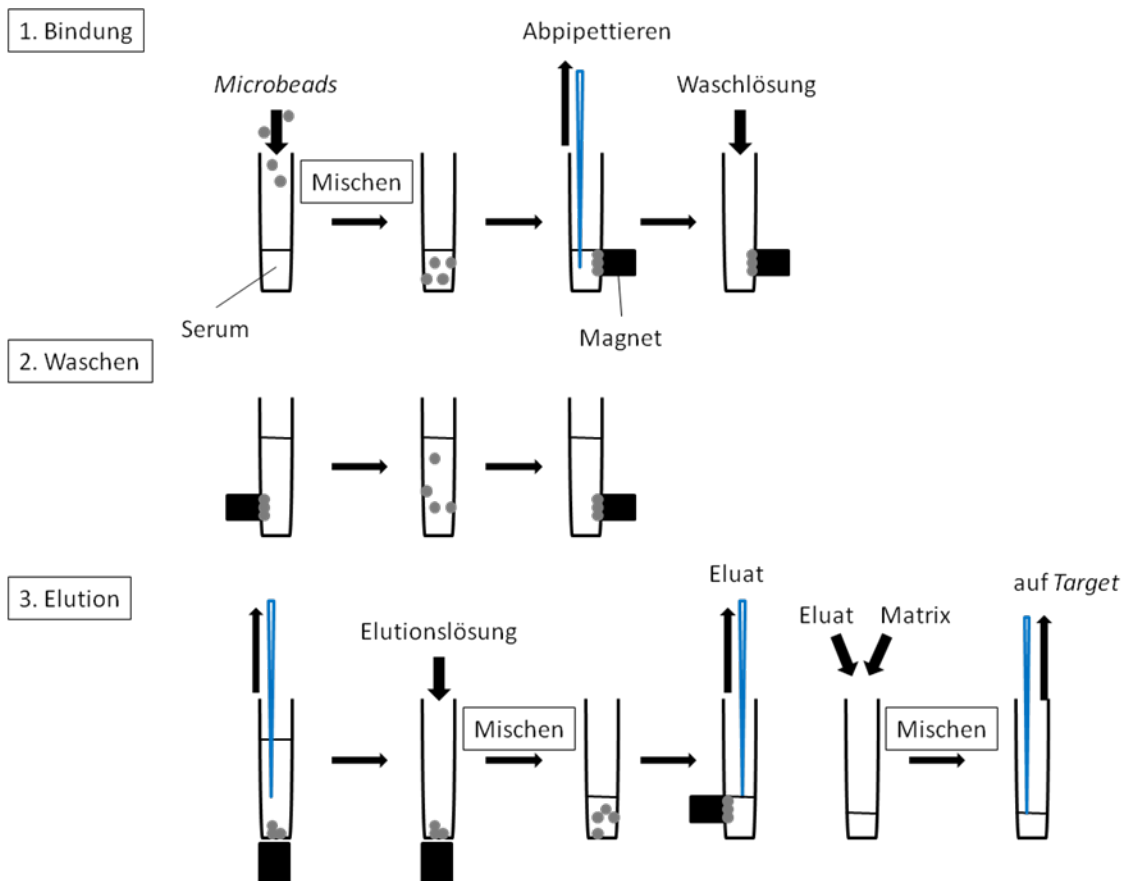


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Fraktionierung mit *Microbeads*: Der Serumprobe werden die magnetischen Mikropartikel hinzugefügt. Nach dem Mischen durch Auf- und Abpipettieren werden die *Microbeads* mitsamt den gebundenen Proteinen mit einem Magneten an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen und das restliche Serum entfernt. Rückstände werden durch den Waschprozess beseitigt. Hierbei werden die Mikropartikel in einer Waschlösung erneut durch einen Magneten mehrmals von einer Wand zur anderen gezogen. Nach Entfernung der Waschlösung wird eine Elutionslösung in das Gefäß pipettiert. Die Lösung wird durch Auf- und Abpipettieren gemischt, wobei sich die Proteine von den *Microbeads* lösen. Daraufhin werden die Partikel erneut an eine Wand des Gefäßes gezogen und das Eluat in ein anderes Gefäß überführt. Dort wird es mit der Matrix gemischt und auf ein *Anchor Chip Target* aufgetragen. Schema modifiziert nach (135)

3.3.3 Targetpräparation

Als Matrix diente eine Lösung von α -Cyano-4-Hydroxymizsäure mit einer Konzentration von 0,3 g/l in einem Ethanol-Aceton-Gemisch im Verhältnis 2:1.

1 μ l des Serumeluates wurde in 10 μ l Matrixlösung verdünnt und je 1 μ l dieser Mischung auf ein *AnchorChip*-Target (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) aufgebracht.

Die Vorbehandlung mit Mikropartikeln und die Targetpräparation erfolgten automatisiert durch einen *ClinProt Robot* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

3.3.4 Durchführung der Massenspektrometrie

Die Ionisierung der Matrix erfolgte durch einen Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Frequenz von 50 Hz. Der Stickstoffdruck betrug $2,5 \times 10^5$ Pa. Die Messung wurde mittels eines *AutoFlex* Linearmassenspektrometers (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig) durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden hierfür gewählt: *ion source 1*: 1,2 kV; *ion source 2*: 18,5 kV; *lens*: 9 kV; *pulsed ion extraction*: 120 ns; *matrix suppression mode*: *gating*; *suppress up to*: 500 Da; *polarity*: *positive* (19).

Die Kalibrierung wurde anhand einer Mischung aus Peptid- und Proteinkalibrierungsstandard-Lösung mit einem Massenbereich von 1000 Da bis 12.000 Da (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) durchgeführt. Überschüssige Matrix wurde durch sogenannte *Bursts* (6 Laserschüsse mit 45% der maximalen Energie) entfernt, bevor die Ionisierung mit 20% der maximalen Energie begann (19; 135; 144). Pro Matrixspot wurden 10 Positionen mit je 30 Schüssen belegt und somit von jedem Spot 300 Spektren aufgezeichnet. Erfasst wurden dabei Signale mit einem Verhältnis von Signalintensität zu Hintergrundrauschen [*signal-to-noise ratio* (S/N)] > 3 in einem Massenbereich von 1000 Da bis 10.000 Da mittels *ClinProTools-Software* (Version 2.0, Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

3.4 Statistische und bioinformatische Auswertung von Proteomprofilanalysen

3.4.1 Supervised Training

Eine klinische Proteomprofilanalyse hat zum Ziel, in den gemessenen Spektren Muster zu erkennen, die für den klinischen Zustand des Patienten spezifisch sind (103). Diese Muster sind die Kombination einer Vielzahl verschiedener Eigenschaften der Spektren,

wie z.B. das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein bestimmter *Peaks* bei definierten m/z -Werten, die Flächen der *Peaks* sowie ihre Intensitäten [für Massenspektrometrie: (37; 99); für Chromatographie: (131)]. Diese Proteomprofile werden in der Literatur auch als „Fingerabdruck“ (1; 9; 59; 144) oder *Barcode* (103) bezeichnet.

Vor der Aufdeckung eines solchen Profils ist jedoch weder bekannt, bei welchen m/z – Werten sich die relevanten *Peaks* befinden, noch, wie viele *Peaks* das gesuchte Muster bilden (103). Aus diesem Grund definiert der Untersucher in einem *Supervised Training* - Verfahren zunächst ein *Training Set* von Spektren, deren Klassenzugehörigkeit (zum Beispiel „gesund“/„krank“) bekannt ist (103). Dieser Datensatz wird mitsamt den vom Untersucher bestimmten Klassen in eine *Software* eingegeben. Diese sucht mit verschiedenen Algorithmen diejenige Kombination aus Eigenschaften der Spektren, die am besten die vorher definierten Klassen unterscheidet. Im Folgenden soll die Vorgehensweise der für die vorliegende Arbeit verwendeten *Software ClinProTools* (Version 2.0, Bruker Daltonik, Bremen) detaillierter beschrieben werden.

3.4.2 Univariate und multivariate Analyse

Zur Auswertung der gemessenen Spektren stehen in *ClinProTools* univariate und multivariate Algorithmen zur Verfügung.

Die univariate Analyse untersucht einzelne *Peaks* anhand ihrer Signalintensität und ihrer Fläche und vergleicht diese *Peaks* in den verschiedenen, vom Untersucher definierten Klassen. Sie ist für die Bewertung einzelner relevanter *Peaks* vorgesehen, die sich eventuell als Marker eignen. Dies ist hilfreich bei der Auswahl derjenigen Signale im Spektrum, deren zugrundeliegende Proteine man identifizieren will.

Die multivariate Analyse dient der Erkennung von spezifischen Mustern im Proteom, die aus einer Kombination verschiedener *Peaks* bestehen. Diese Muster erlauben die Zuordnung eines gemessenen Spektrums zu einer vorher definierten Klasse.

3.4.2.1 Univariate Analyse

Die univariate Analyse ist zur statistischen Bewertung einzelner *Peaks* geeignet. Dazu benutzt *ClinProTools* den sog. *QuickClassifier*-Algorithmus, dessen genaue Funktion im Folgenden dargestellt wird:

Für jeden einzelnen *Peak* wird die durchschnittliche Fläche und Intensität seiner gesamten Klasse berechnet. Mit dem Welch-t-Test (139) wird der p-Wert bestimmt, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass die Unterschiede zwischen den Klassen zufällig sind (71). Somit gibt der p-Wert die Fähigkeit jedes *Peaks* an, zwischen den gewählten Klassen zu unterscheiden. In jedem einzelnen Spektrum wird daraufhin die Differenz aus den Flächen und Intensitäten der einzelnen *Peaks* und dem errechneten Durchschnitt gebildet. Anhand dieser Differenzen lässt sich die Wahrscheinlichkeit angeben, mit der ein Spektrum zu einer bestimmten Klasse gehört (26). Eine Liste der *Peaks* lässt sich nach ansteigenden p-Werten geordnet darstellen.

Die *Peaks* mit den niedrigsten p-Werten sind diejenigen, die am meisten zur Zuordnung des Spektrums zu einer Klasse beigetragen haben. Die Proteine bzw. Peptide, die diese *Peaks* verursachen, eignen sich daher in besonderem Maße als Marker.

3.4.2.2 Multivariate Analyse

Ziel der multivariaten Analyse ist die Erkennung von versteckten Mustern, die als Marker fungieren können. Diese Muster bestehen aus einer spezifischen Kombination einzelner *Peaks*, die charakteristisch für eine Klasse ist. Einen derartigen „Fingerabdruck“ durch einfaches Testen aller möglichen Kombinationen zu finden, ist

nicht praktikabel, weil dieses Verfahren zu aufwändig und zeitintensiv wäre (26). Ein gewünschtes Muster aus nur drei *Peaks* unter insgesamt 1000 führt beispielsweise zu einer sehr großen Zahl an möglichen Kombinationen, die getestet werden müssten ($1000 \times 999 \times 998 = 997.002.000$) (26). Daher ist der Einsatz von sog. Klassifikatoren erforderlich: Algorithmen, die Muster im Proteom erkennen, ohne alle Kombinationen zu testen. Ihr Nachteil besteht allerdings darin, dass sie theoretisch nur die wahrscheinlichste, also „fast optimale“ Lösung („*near optimal solution*“) finden, da sie nicht alle existierenden Möglichkeiten getestet haben (26).

Für diese Aufgabe stehen in *ClinProTools* zwei Algorithmen zur Verfügung, der genetische Algorithmus (GA) und der *Support Vector Machine*-Algorithmus (SVM) (24; 26). In beide ist, für die endgültige Klassifizierung der Daten, ein weiterer Algorithmus (*k-nearest-neighbour*, KNN) integriert.

Der GA basiert auf der Evolutionstheorie und imitiert die natürliche Selektion von Merkmalen (26). Die Population, in der diese Selektion wirkt, ist die Menge der vorhandenen Merkmalskombinationen, wobei ein Merkmal einem Datenpunkt in einem Spektrum entspricht, also einer Signalintensität an einem bestimmten m/z-Wert. Jeweils 5 bis 20 dieser Datenpunkte werden zu „logischen Chromosomen“ verknüpft (103). An diesen finden zufällig Mutationen statt. Dadurch ändert sich in jeder Generation die Eignung der einzelnen Kombinationen (= *Fitness*), zwischen den verschiedenen Klassen zu unterscheiden.

Bei Punktmutationen wird ein zufällig gewähltes Merkmal in zufälliger Weise verändert. Dadurch wird die Variabilität innerhalb der Population über die Generationen hinweg gesichert und verhindert, dass sich die einzelnen Kombinationen zu früh einem lokalen Optimum angleichen (26).

Zusätzlich findet analog zum *Crossing-Over* in der Genetik ein Austausch ganzer Abschnitte zwischen zwei Kombinationen statt. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass zwei „Elternkombinationen“ mit guter *Fitness* in der nächsten Generation Kombinationen hervorbringen, die eine noch bessere Eignung aufweisen (26).

Die *Fitness* wird mit einer Kostenfunktion gemessen, deren Ziel eine optimale Klassentrennung mit hoher Varianz zwischen den Klassen ist (26). Modelle, deren Eignung durch Mutationen in der folgenden Generation abgenommen hat, werden verworfen und nur diejenigen, bei denen sie zunimmt, werden einem weiteren Generationenwechsel mit entsprechenden zufälligen Mutationen unterworfen (26; 103). Somit steigt theoretisch mit jeder neuen Generation sowohl die durchschnittliche als auch die maximal erreichte *Fitness* an. Dieser Prozess endet, je nach den vom Benutzer gewählten Einstellungen, entweder nach einer festgelegten Generationenzahl, oder, wenn über eine bestimmte Zahl von Generationen keine bessere *Peak*-Kombination gefunden wird, die *Fitness* also stabil bleibt (24; 26).

Der genetische Algorithmus selektiert zusammenfassend diejenige *Peak*-Kombination, die die zuvor bestimmten Klassen am besten unterscheidet. Für eine ausführlichere Beschreibung der Funktionsweise des GA siehe *Holland* (63).

Der *Support-Vector-Machine*-Algorithmus dient der Minimierung des zu erwartenden Risikos bei der Lösung eines Problems. In diesem Falle handelt es sich um ein Klassifikationsproblem, bei dessen Lösung das Risiko einer Fehlklassifikation besteht. Ziel ist daher, die bestmögliche Klassifikation bei einem so geringen Risiko wie möglich zu erreichen (26).

Der SVM sucht eine mehrdimensionale Hyperebene (= die Übertragung einer Ebene im dreidimensionalen Raum auf mehrdimensionale Räume), die zwei oder mehrere Datenwolken am besten voneinander trennt. Für den optimalen Verlauf dieser Ebene

sind bestimmte Datenpunkte besonders wichtig. Eine nach ihrer Wichtigkeit geordnete Darstellung der Daten ist möglich. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem in der kurzen Rechendauer, wie beim GA lässt sich jedoch nur ein „fast optimales“ Ergebnis erzielen (s. oben), weil aus Praktikabilitätsgründen nicht alle Möglichkeiten getestet werden (26).

Analog zum GA ist auch das Ergebnis des SVM diejenige *Peak*-Kombination, die am besten zwischen verschiedenen Klassen unterscheidet (25). Für eine ausführlichere Beschreibung der Funktionsweise des SVM siehe *Vapnik et al.* (134).

Der *k-nearest-neighbour*-Algorithmus ist sowohl in den GA als auch den SVM integriert und dient der endgültigen Klassifikation der Daten. Er misst die Distanz zwischen Punkten im n-dimensionalen Raum (mit $n \in \mathbb{R}$). Auswahl dieser Punkte ist zuvor durch den GA bzw. den SVM erfolgt. Beim GA handelt es sich also um eine Generation von *Peak*-Kombinationen, der SVM hat die Spektren ausgewählt, deren *Peaks* am meisten zur Auffindung der trennenden Hyperebene beigetragen haben (26).

Die Klassifizierung erfolgt in folgenden Schritten:

- i) Die Distanzen zwischen allen Punkten werden berechnet.
- ii) Für jeden Punkt werden die k nächsten Nachbarn bestimmt. Der Wert, den k einnimmt, wird vom Untersucher gewählt.
- iii) Jeder Punkt wird der Klasse zugeordnet, der die meisten der k Nachbarn angehören. Aus diesem Grund ist eine ungerade Zahl für k sinnvoll, um eine eindeutige Zuordnung zu erhalten.

Das Ergebnis des KNN ist eine Klassifizierung der einzelnen Spektren anhand des im GA oder SVM gewählten Modells (25). Für eine ausführlichere Beschreibung der Funktionsweise des KNN siehe *Vapnik et al.* (134).

3.4.3 Cross-Validierung und externe Validierung

Die *Cross-Validierung* dient der Evaluation eines im *Supervised Training* gewählten „Fingerabdrucks“ und erlaubt eine Aussage über die Klassifikationsfähigkeit dieses Modells. Für die *Cross-Validierung* wird der gesamte vom Untersucher gemessene Datensatz automatisch in ein *Training Set* und ein *Test Set* geteilt. Im *Training Set* wird, wie unter 3.4.1 beschrieben, ein Modell zur Klassifizierung der Daten gesucht, das *Test Set* dient der Validierung dieses Modells (26).

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Cross-Validierung* mit dem sogenannten *Leave-One-Out-Verfahren* durchgeführt. Ein zufällig gewählter Anteil des Datensatzes wurde im Modellbildungsprozess nicht berücksichtigt und nur die übrigen Daten herangezogen. Danach wurden die vorher separierten Daten mit Hilfe des Modells klassifiziert. Der prozentuale Anteil der Daten, die für die *Cross-Validierung* vorbehalten werden, kann vom Untersucher gewählt werden (26). Für die Auswertung des für diese Studie erhobenen Datensatzes wurden pro berechnetem Vorhersagemodell 10% des *Training Sets* zur Bildung eines *Test Sets* vorbehalten. Die Klassifizierung dieser 10% der Daten wurde 50 Mal wiederholt.

Eine externe Validierung mit einem unabhängigen, nicht im *Training Set* enthaltenen Datensatz, ist ebenfalls möglich (24). Hierfür kommen beispielsweise neue Messungen in Frage, die nach dem *Supervised Training* vorgenommen wurden (26).

Wie unter 3.5 näher beschrieben, wurden in dieser Arbeit die Datensätze von früheren oder späteren Abnahmezeitpunkten für die externe Validierung herangezogen.

Während die Prozentwerte der richtig klassifizierten Spektren im *Supervised Training* eine Aussage darüber erlauben, wie gut das Modell die Daten des *Training Set* klassifiziert (*Recognition Capability*, RC), liefern *Cross-* und externe Validierung dessen Sensitivität und Spezifität (144). Der externen Validierung kommt hierbei

besondere Bedeutung zu, weil die hierbei klassifizierten Daten nicht in die Errechnung des Klassifikationsmodells eingegangen sind.

Das Ergebnis der statistischen Auswertung ist ein Vorhersagemodell mit einer durch externe oder *Cross-Validierung* ermittelten Sensitivität und Spezifität. Unbekannte Proben können mit diesem Modell ihrer wahrscheinlichen Klasse zugeordnet werden (s. Abb. 3 für die Phasen der statistischen Auswertung und Abb. 4 für eine Übersicht des experimentellen Vorgehens) (24; 26).

3.5 Identifizierung der relevanten Proteine

Das *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) bietet auf dem *ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server* (54; 126) das *TagIdent Tool* (127) zur Identifizierung von Proteinen und Peptiden anhand ihres massenspektrometrisch gemessenen Molekulargewichtes an. Als Suchbegriff wurde die Masse gewählt, an dem der *Peak* seine höchste Signalintensität hat. Alle von *TagIdent* vorgeschlagenen Proteine, deren Massen im Massenbereich des *Peaks* lagen, wurden in eine Liste möglicher Markerproteine aufgenommen.

3.6 Gruppeneinteilung

Um die zeitliche Entwicklung des Serumproteinexpressionsprofils zu untersuchen, wurden alle in die Studie eingeschlossenen Patienten (n = 36) zunächst anhand der jeweiligen Blutabnahmezeitpunkte in eine Gruppe „Früh“ (0-12h) und eine Gruppe „Spät“ (24-72h) eingeteilt. In einer weiteren Differenzierung dieser Einteilung wurden die gemessenen Spektren gemäß der Blutabnahmezeit in eine Gruppe pro 24h-Intervall zugeordnet, also 0h, 24h, 48h und 72h.

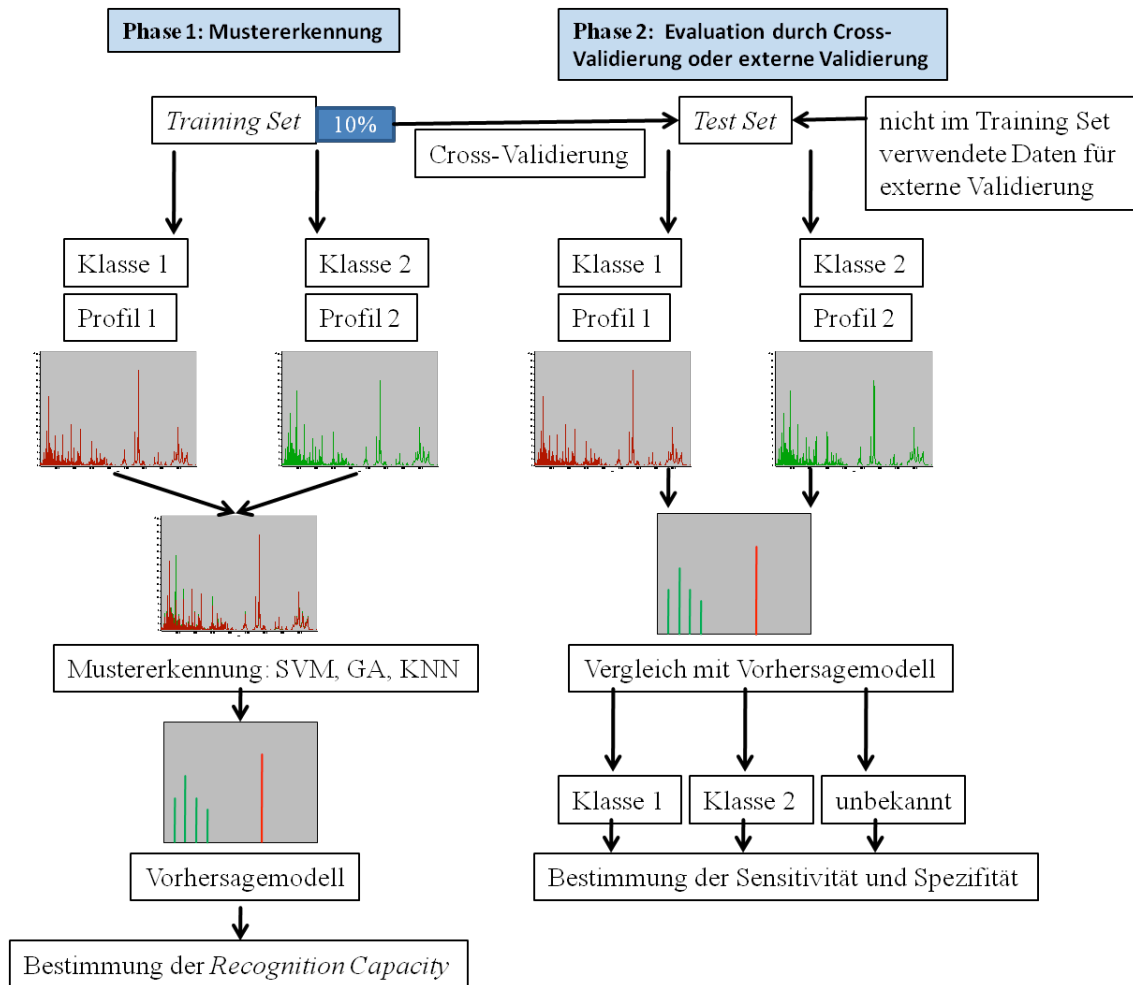


Abbildung 3: Phasen der Erstellung und Validierung eines Vorhersagemodells: **Phase 1:** Der Untersucher definiert in einem *Supervised Training* Ansatz die Klassen, in die sich das Patientenkollektiv unterteilt. Die Klassifikationsalgorithmen erkennen diejenigen *Peaks*, die für die jeweilige Klasse charakteristisch sind, und erstellen daraus ein Vorhersagemodell. Die *Recognition Capability* beschreibt, welcher prozentuale Anteil der Daten sich mit diesem Model beschreiben lässt. **Phase 2:** Für die Evaluation des Vorhersagemodells wird entweder ein zufällig gewählter Teil des *Training Set* vorbehalten (in der vorliegenden Arbeit 10% des Datensatzes), oder Daten verwendet, die nicht Teil des *Training Set* waren. Das Programm klassifiziert diese Daten anhand des gefundenen Modells. Aus der Rate der richtigen und falschen Klassifikationen lassen sich Sensitivität und Spezifität ableiten. [Abbildung modifiziert nach dem Original aus (103)]

Eine weitere Einteilung erfolgte anhand verschiedener klinischer Parameter:

Gruppe 1 - Verletzungsschwere: quantifiziert durch den ISS (14; 15). Die Grenze zwischen den Gruppen war der mediane ISS unseres Kollektivs von 40 Punkten, Patienten der Gruppe 1a hatten einen ISS > 40, weniger schwer verletzte Patienten wurden der Gruppe 1b zugeteilt.

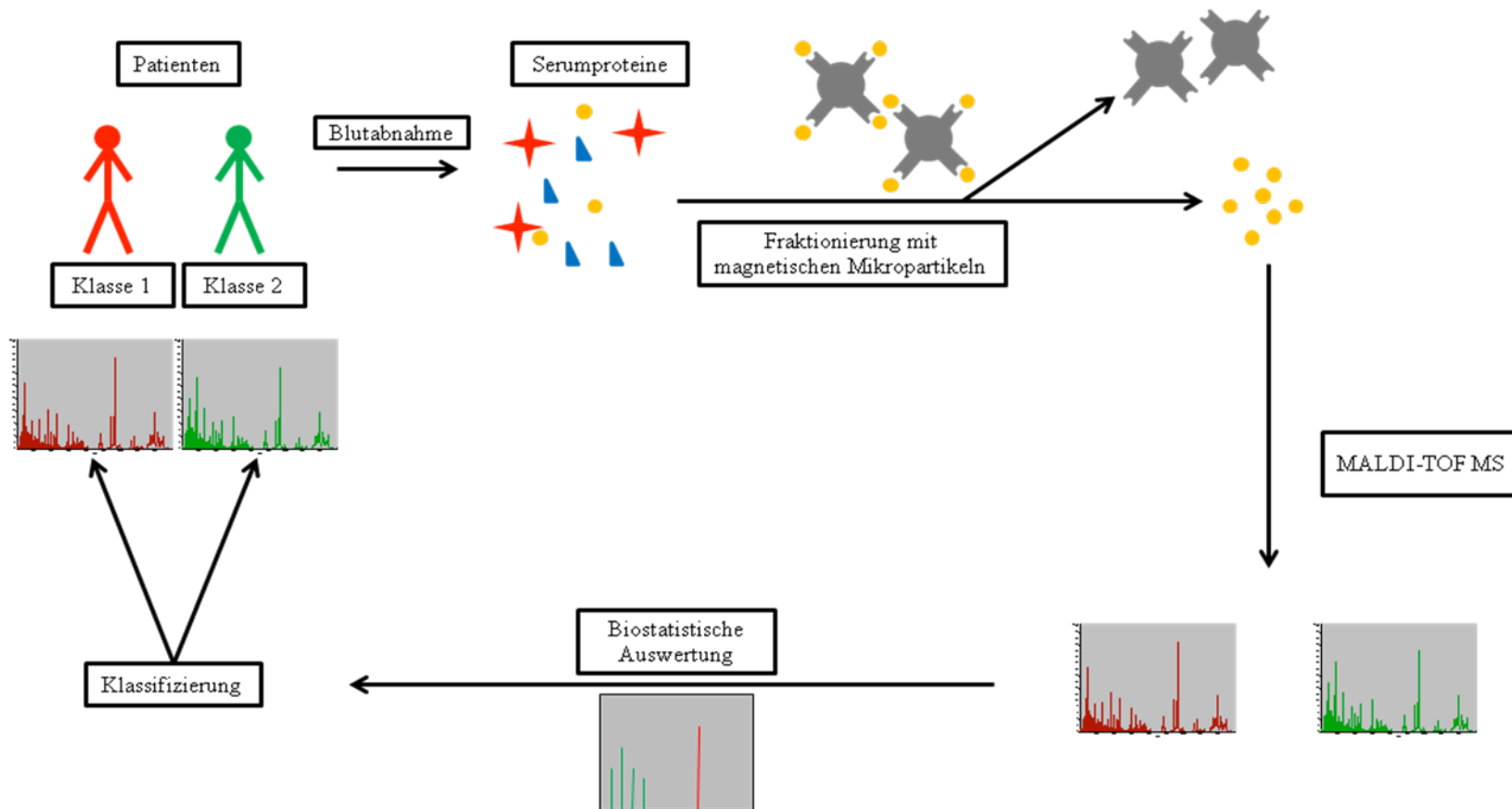


Abbildung 4: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise: Aus Patientenblut wird Serum gewonnen. Die darin enthaltenen Proteine werden mittels magnetischen Mikropartikeln anhand ihrer chemischen Bindungseigenschaften fraktioniert. Daraufhin werden die nicht gebundenen Proteine entfernt und die Analyten wieder von den Mikropartikeln separiert. Mittels MALDI-TOF MS wird das Massenspektrum der aufgereinigten Proben gemessen. Eine biostatistische Auswertung deckt diskriminierende Muster in den Spektren auf. Diese dienen der Zuordnung der Proben zu ihren jeweiligen vom Untersucher definierten Klassen.

[Schema modifiziert nach (103)]

Gruppe 2 - Transfusionsbedarf: Patienten, die innerhalb der ersten 24h nach ihrer Verletzung mehr als 10 EK (Erythrozytenkonzentrat, 1 EK enthält ca. 300 ml konzentrierte, leukozytendepletierte Erythrozytenlösung) erhielten, bilden Gruppe 2a, Patienten mit einem geringeren Transfusionsbedarf Gruppe 2b.

Gruppe 3 - Multiorganversagen: Das Vorliegen eines Multiorganversagens wurde nach *Goris et al.* bei einem MOF-Score ≥ 4 angenommen (57; 76). Patienten mit manifestem MOF wurden der Gruppe 3a zugewiesen, die übrigen der Gruppe 3b.

Gruppe 4 - Versterben (Gruppe 4a) oder **Überleben** (Gruppe 4b) des Patienten innerhalb von 90 Tagen nach Aufnahme.

Im *Supervised Training* erfolgte eine weitere Unterteilung aller o.g. Untergruppen um verschiedene Aussagen zu ermöglichen:

Zunächst wurden innerhalb einer Gruppe alle zu den verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Proben gemeinsam für die Erstellung eines Modells herangezogen. Dies sollte eine Aussage darüber erlauben, ob sich die verschiedenen Gruppen unter Ausschluss des zeitlichen Verlaufs anhand ihrer klinischen Parameter durch das berechnete Vorhersagemodell unterscheiden lassen (s. Abb.5).

In einem weiteren Schritt spezifizierten wir die Gruppen jeweils in eine frühe (0h - 12h) und eine späte (24h - 72h) weitere Untergruppe. Die mit diesen Untergruppen erstellten Modelle erlauben Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf der Proteinexpression und besitzen darüber hinaus eine pseudoprospektive Aussagekraft. Außerdem fand eine weitere Unterteilung in sechs einzelne Untergruppen für jede der sechs Blutabnahmen statt, also 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h (s. Abb.6).

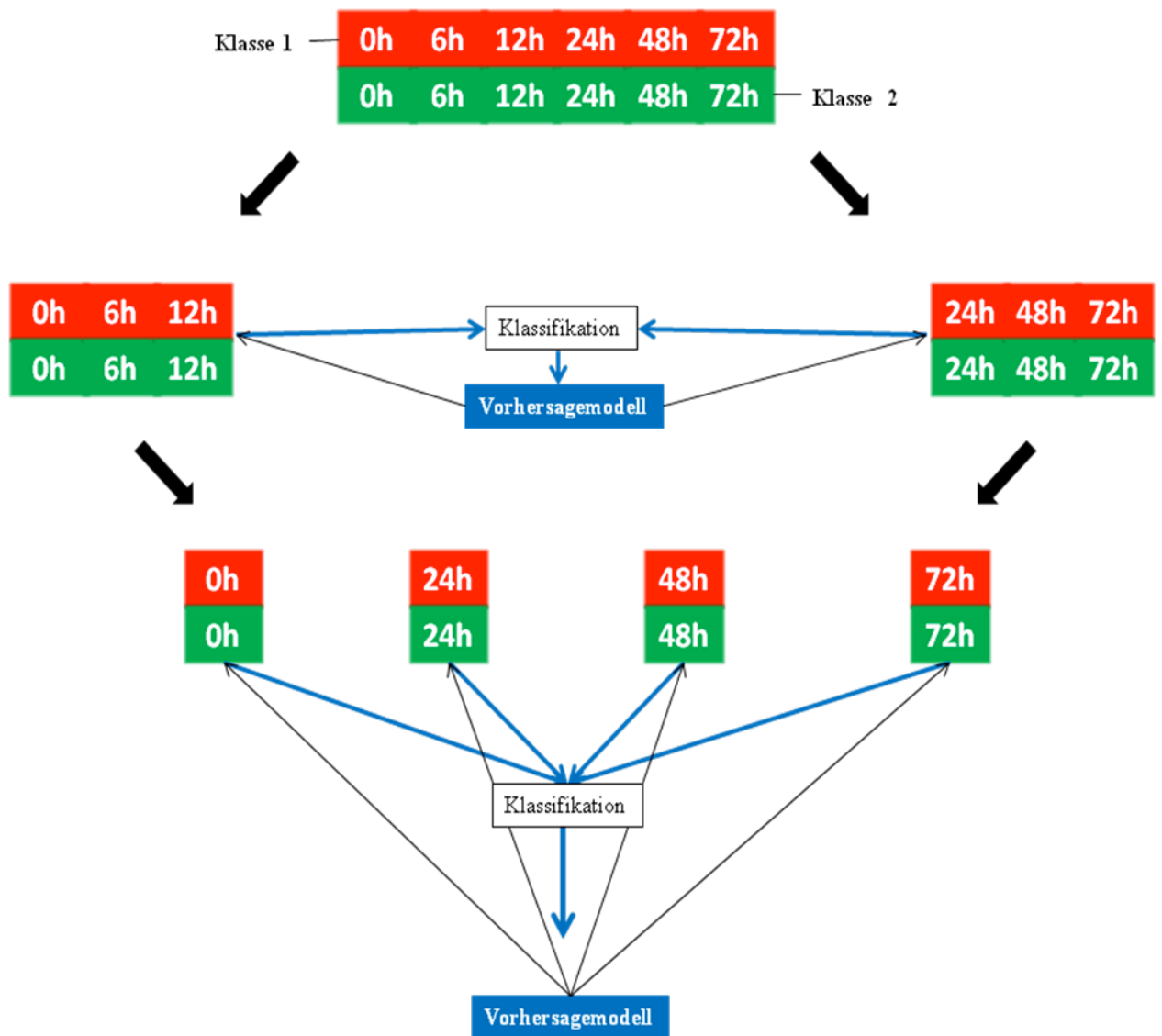


Abbildung 5: Schema der Vorgehensweise bei der Gruppeneinteilung anhand des Zeitverlaufes. Unabhängig von ihrem klinischen Verlauf werden die Patienten ausschließlich anhand der Blutabnahmezeitpunkte in verschiedene Gruppen eingeteilt. Zunächst erfolgte die Einteilung in eine frühe und eine späte Untergruppe. Das für die Klassifikation errechnete Modell wurde anschließend mit 10% der Daten *cross*-validiert. Eine weitere Unterteilung führte zu vier Untergruppen gemäß Blutabnahmen im 24-stündigen Intervall. Auch hier fand nach der Klassifikation eine *Cross*-Validierung statt.

Dicke schwarze Pfeile: Abfolge der Gruppierungsschritte. Blaue Pfeile: Klassifikation und Modellbildung. Dünne schwarze Pfeile: *Cross*-Validierung. Rot: Untergruppe (Klasse) 1. Grün: Untergruppe (Klasse) 2.

Somit diente die Gruppeneinteilung mehreren Zielen:

- i) der weiteren, unabhängigen statistischen Kontrolle der erhobenen Daten durch die Gruppen „Verletzungsschwere“ und „Transfusionsbedarf“, in denen keine pseudoprospektive Aussagemöglichkeit besteht.

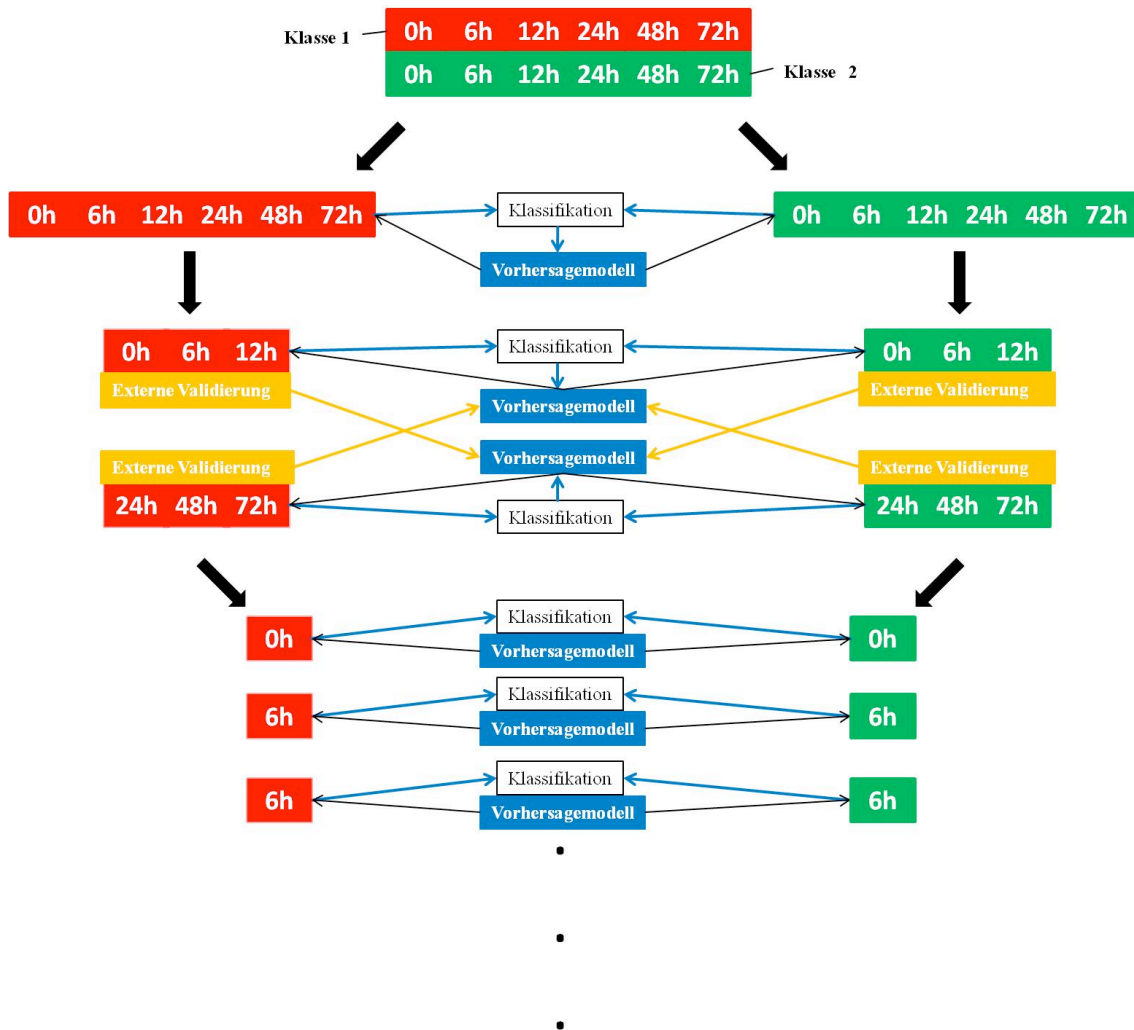


Abbildung 6: Schema der Vorgehensweise bei der Gruppeneinteilung anhand verschiedener Kriterien.
 Zunächst werden die beiden Patientengruppen nur anhand des unterscheidenden Kriteriums, ohne Berücksichtigung des Abnahmezeitpunktes, klassifiziert. Das resultierende Vorhersagemodell wird mit 10% der Messdaten *cross*-validiert. Nach einer Unterteilung in frühe und späte Abnahmezeitpunkte werden jeweils die frühe und die späte Untergruppe klassifiziert. Die so errechneten Vorhersagemodelle werden wie vorher *cross*-validiert. Zusätzlich findet eine externe Validierung mit Daten statt, die nicht in die Berechnung des Modells eingeflossen sind. Ein Modell für frühe Zeitpunkte wird also mit den Daten der späten Zeitpunkte extern validiert und umgekehrt. Eine weitere Unterteilung erlaubt die Klassifikation einzelner Zeitpunkte.
 Dicke schwarze Pfeile: Abfolge der Gruppierungsschritte. Blaue Pfeile: Klassifikation und Modellbildung.
 Dünne schwarze Pfeile: *Cross*-Validierung. Orange Pfeile: Externe Validierung. Rot: Untergruppe (Klasse) 1. Grün: Untergruppe (Klasse) 2

Gleichzeitig bietet eine Identifizierung der relevanten Proteine in diesen Gruppen Einblicke in die Pathophysiologie der posttraumatischen Immunreaktion.

- ii) der Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der Proteinexpression.

- iii) der pseudoprospektiven Zuordnung der Patienten hinsichtlich der Entwicklung eines MOF bzw. ihres 90-Tage-*Outcomes* als diagnostisches Instrument.

4. Ergebnisse

4.1 Patienten und klinische Daten

36 Patienten (24 männliche, 12 weibliche) wurden gemäß den beschriebenen Studienkriterien in die Untersuchung eingeschlossen. Die Patienten waren zwischen 18 und 94 Jahre alt (mittleres Alter: 46,25 Jahre), ihr *Injury Severity Score* variierte zwischen 20 und 75 Punkten, mit einem Mittel von 40,14 (\pm 13,8) Punkten. 22 Patienten (74,3%) entwickelten ein manifestes Multiorganversagen, vorliegend bei einem MOF-Score \geq 4. Eine Massentransfusion im Sinne von mehr als 10 EK innerhalb der ersten 24h nach Aufnahme war bei 16 Patienten (45,7%) notwendig. Bei zwei Patienten wurde nach einer Verlegung die Datenerhebung im weiterbehandelnden Krankenhaus nicht fortgesetzt. Die Daten waren daher hinsichtlich der Entwicklung eines MOF bzw. des Transfusionsbedarfs unvollständig. Diese Patienten wurden folglich nicht in die Berechnung der Vorhersagemodelle für die Gruppen 2 und 3 eingeschlossen. 10 Patienten (27,8%) verstarben innerhalb von 90 Tagen nach ihrer Aufnahme, 26 (72,2%) überlebten diesen Zeitraum. Eine Übersicht über das Verletzungsmuster, den ISS und den Transfusionsbedarf ist Tabelle 4 zu entnehmen.

4.2 Probengewinnung

Rechnerisch ergibt sich bei 36 eingeschlossenen Patienten und 6 Blutentnahmen pro Patient eine Anzahl von 216 einzelnen Proben. Da von den 10 verstorbenen Patienten 5 innerhalb der ersten 72h nach Trauma verstarben, konnten insgesamt 209 Einzelproben gewonnen und ausgewertet werden.

4.3 Durchführung der Massenspektrometrie

Wie bereits unter 3.3.4 beschrieben, werden auf jedem Matrixspot 10 Positionen jeweils 30 Mal beschossen und somit von jedem *Spot* 300 Spektren aufgezeichnet. Da jede der 209 Proben auf vier *Spots* verteilt wurde, ergibt sich eine Gesamtzahl von 250.800 gemessenen Spektren. Die multiplen Messungen dienen der Eliminierung von Messungenauigkeiten, die durch Schwankungen der Analytkonzentration in der Matrix und durch unterschiedliche Verteilung der Matrix auf dem jeweiligen Spot zustande kommen können. Aus den 300 Spektren eines *Spots* wird ein Mittel errechnet, ebenso werden die 4 zu einer Probe gehörigen *Spots* gemittelt. In die Auswertung ging daher ein Massenspektrum pro Probe, insgesamt 209 Spektren, ein.

4.4 Supervised Training

Für die bioinformatische Auswertung der Daten stehen zwei Algorithmen unterschiedlicher Funktionsweise zur Verfügung (s. 3.4.2.1). Die Daten der vorliegenden Studie wurden sowohl mit dem *Support Vector Machine* als auch mit dem genetischen Algorithmus untersucht. Im Folgenden werden immer die Ergebnisse des jeweiligen Algorithmus dargestellt, der die Daten besser beschreiben konnte und eine höhere Sensitivität und Spezifität erreichte. Die anhand einer externen Validierung der erstellten Modelle ermittelte Sensitivität und Spezifität werden gesondert unter 4.5 dargestellt.

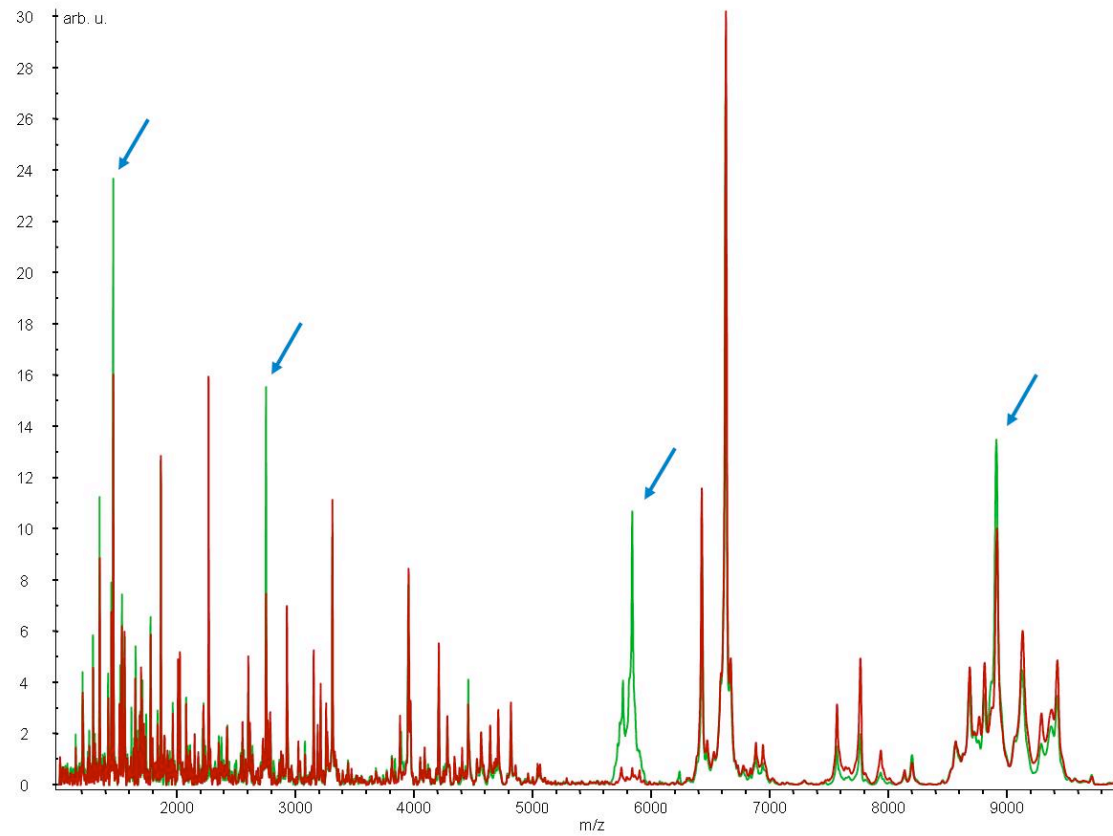


Abbildung 7: Überinandergelegte durchschnittliche Spektren der Gruppen „Früh“ (rot) und „Spät“ (grün): Deutlich zu sehen sind *Peaks* unterschiedlicher Signalintensität an verschiedenen Stellen im Massenspektrum, z.B. bei m/z 1500, m/z 2800, m/z 5900 und m/z 8900 (siehe blaue Pfeile).
x-Achse: m/z-Wert. y-Achse: Signalintensität (in *arbitrary units*)

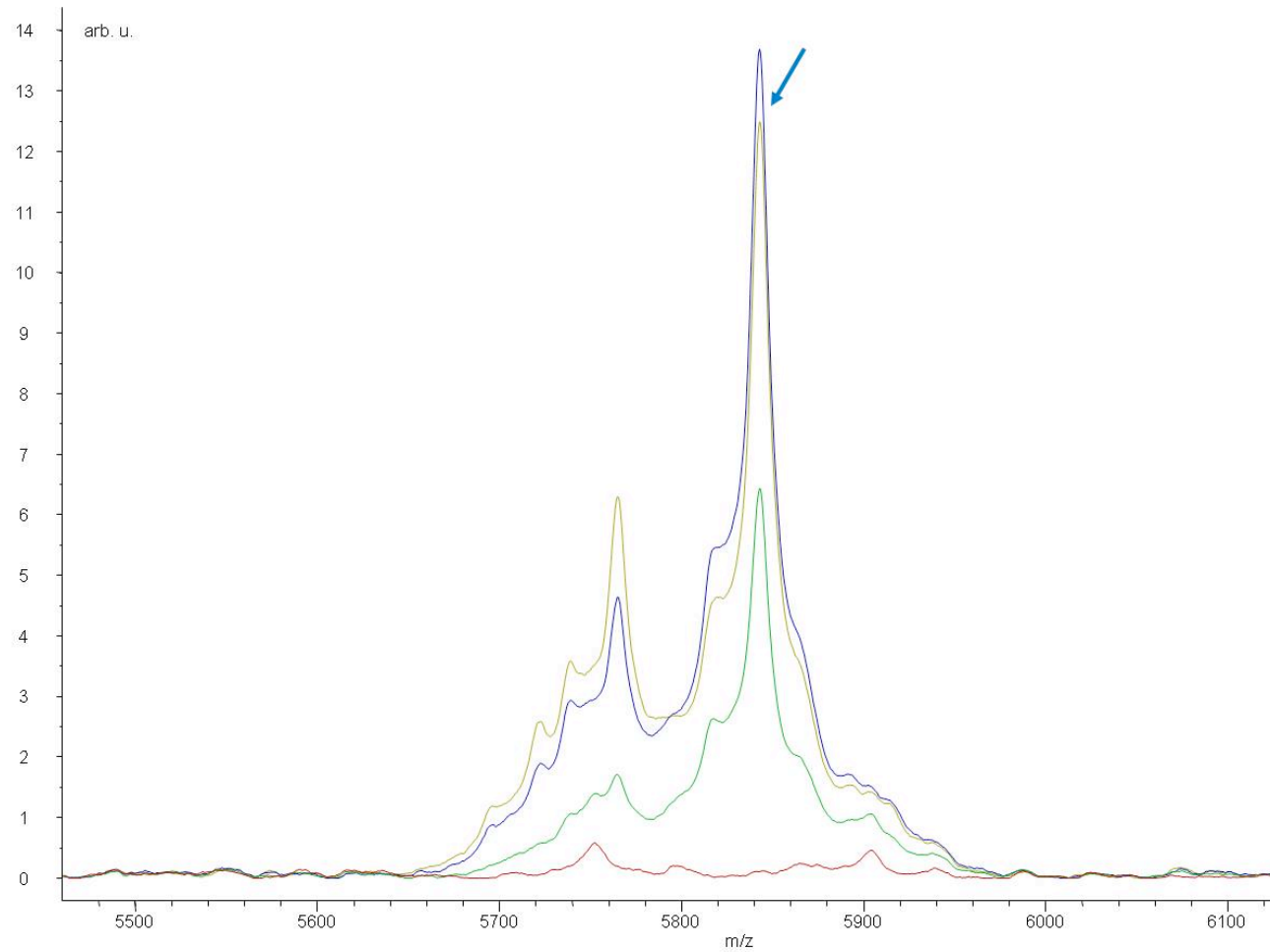


Abbildung 8: Vergrößerte Darstellung des Peaks zwischen m/z 5700 und m/z 6000 mit 24-stündigen Messintervallen: Die Abschnitte des Peaks verändern sich unterschiedlich stark im Zeitverlauf. Von Interesse ist auch die Intensitätsabnahme des Abschnitts bei m/z 5850 zwischen 48h und 72h (siehe blauer Pfeil). Rot: 0h, grün: 24h, blau: 48h und gelb 72h. x-Achse: m/z -Wert. y-Achse: Signalintensität in *arbitrary units*

4.4.1 Veränderungen der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf

Anhand von 20 *Peaks*, die sich im zeitlichen Verlauf signifikant verändern, konnte der SVM die untersuchten Massenspektren in 96,5% der Fälle korrekt der Gruppe „Früh“ bzw. „Spät“ zuordnen. Die *Leave-One-Out-Cross-Validierung* ergab eine Rate von 95,5% für die Gruppe „Früh“ und von 85,6% für die Gruppe „Spät“ (s. Abb. 8 u. Tab. 1).

Für die Klassifikation der Daten in den 24h-Intervallen waren 25 *Peaks* relevant. Der SVM erreichte eine *Recognition Capability* (RC) von 81,7%. Die Rate richtiger Zuordnungen in der *Cross-Validierung* nahm von anfangs hohen Werten kontinuierlich im Laufe der Zeit ab. Bei 0h konnten 83,98% und bei 24h 67,17% der Daten dem richtigen Zeitpunkt zugeordnet werden, bei 48h noch 41,97% und bei 72h 29,78% (s. Abb. 9 u. Tab. 1).

Gruppe	Untergruppen	RC	Cross-Val. Klasse 1	Cross-Val. Klasse 2	Cross-Val. Klasse 3	Cross-Val. Klasse 4	Algorithmus
Alle Patienten	Früh (0-12h) vs. Spät (24-72h)	96,5%	95,5%	85,6%	-	-	SVM
Alle Patienten	0h vs. 24h vs. 48h vs. 72h	81,7%	84%	67,2%	42%	29,8%	SVM

Tabelle 1: Übersicht über die Klassifikationen anhand des Abnahmezeitpunktes.

RC: *Recognition Capability*. Beschreibt die Fähigkeit des Vorhersagemodells, die Daten zu beschreiben, auf denen es basiert.

Cross-Val.: Ergebnis der *Leave-One-Out-Cross-Validierung* mit 10% der Daten

Klasse: bezeichnet in der Auswertung die jeweilige Untergruppe

SVM: *Support Vector Machine*

4.4.2 Verletzungsschwere

Im Vergleich aller Patienten der Gruppen 1a (ISS \geq 40 Punkte) und 1b (ISS \leq 40 Punkte) wählte der SVM 23 relevante *Peaks*, deren Intensitäten sich zwischen diesen

Gruppen signifikant unterscheiden. Das anhand dieser *Peaks* erstellte Modell verfügt über eine RC von 83%. Das Modell ist also in der Lage, 83% der im *Training Set* vorliegenden Daten korrekt zu beschreiben. In der *Cross-Validierung* konnten insgesamt 62,6% der im *Test Set* enthaltenen Daten richtig zugeordnet werden, 52% der Gruppe 1a und 73,3% der Gruppe 1b. Das Modell erreicht somit in der *Cross-Validierung* eine Sensitivität von 52% und eine Spezifität von 73,3%. (s. Abb. 10).

Im Vergleich der beiden frühen Untergruppen von 0h bis 12h wurde ein Modell aus 6 *Peaks* erstellt, das eine Sensitivität von 49,75% und eine Spezifität von 67,68% in der *Cross-Validierung* erreicht. Insgesamt wurden 58,72% der Daten des *Test Sets* richtig erkannt. Die RC liegt bei 87,31%.

Ein analoger Vergleich der beiden späten Untergruppen (24h – 72h) führte zu einem Muster aus 23 unterschiedlichen *Peaks*, das der SVM mit einer RC von 88,9% und insgesamt 63,3% richtig klassifizierten Daten in der *Cross-Validierung* zusammenstellte. Die Sensitivität beträgt 54,5%, die Spezifität 72,1% (s. Tab. 2).

Eine Zuordnung der Daten zu einzelnen Blutabnahmezeitpunkten war nur mit einer hohen Rate an Falschklassifikationen durchführbar. Die RC lag bei allen Zeitpunkten über 80%. In der *Cross-Validierung* ließ sich nur für die Zeitpunkte 0h, 48h und 72h eine Spezifität von jeweils über 60% erreichen. Die Sensitivität lag für diese Zeitpunkte bei 22,2% (0h), 31% (48h) und 16% (72h).

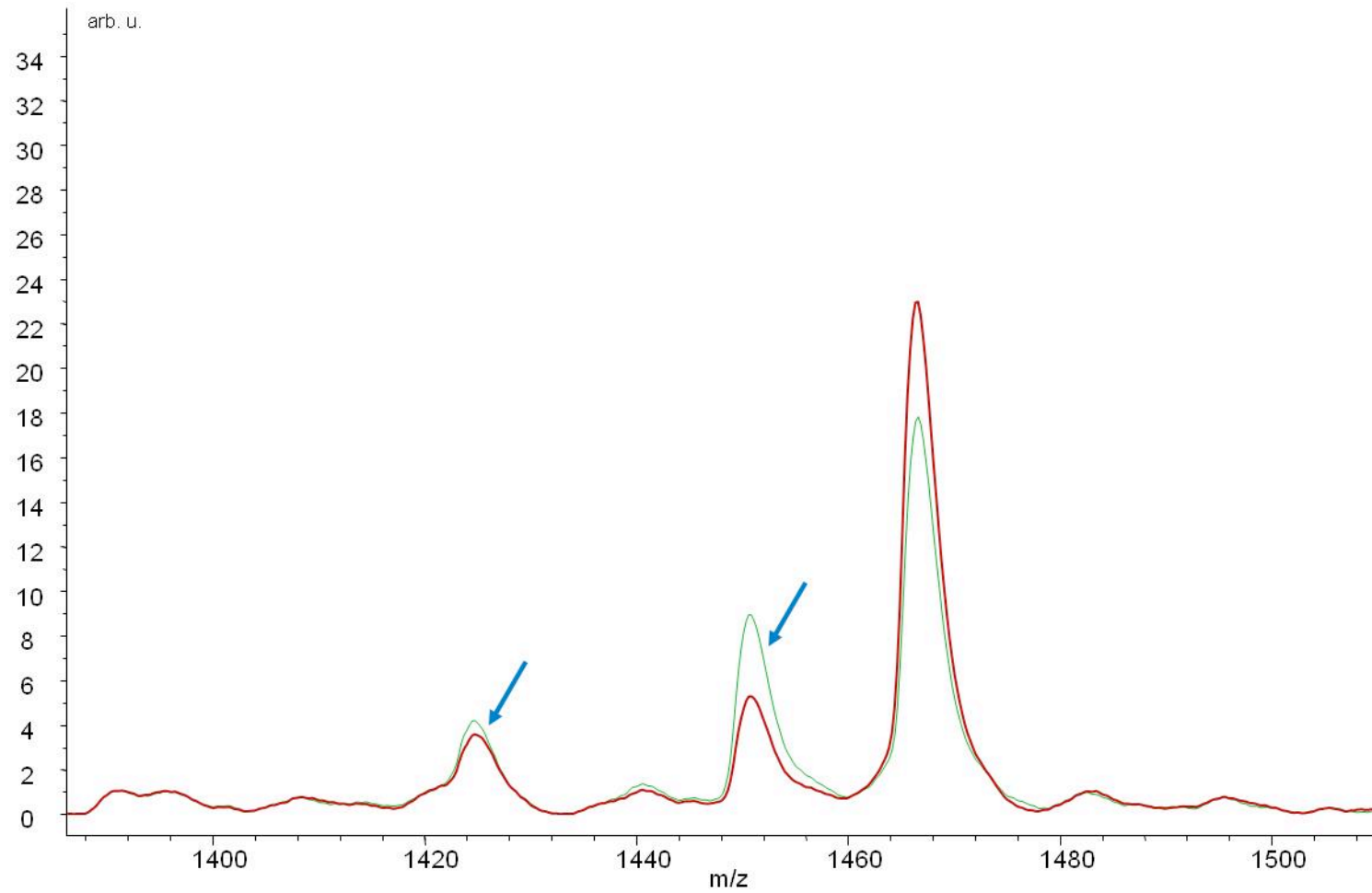


Abbildung 9: Relevante Peaks im niedrigen Massenbereich der Gruppen 1a (rot) und 1b (grün) („Verletzungsschwere“): Die Gruppe 1a zeichnet sich in diesem Bereich bei zwei der drei Peaks durch eine Intensitätsabnahme aus, d.h. die Konzentration der Proteine, die für diese Peaks ursächlich sind, ist bei schwerer Verletzten geringer (siehe blaue Pfeile).
x-Achse: m/z-Wert. y-Achse: Signalintensität in *arbitrary units*

4.4.3 Massentransfusion

Das SVM-Modell, das aus einer Gegenüberstellung aller Patienten der Gruppen 2a (massentransfundiert) und 2b (nicht massentransfundiert) resultiert, setzt sich aus 20 in den beiden Gruppen charakteristisch ausgeprägten *Peaks* zusammen. Es erreicht eine RC von 95% und klassifiziert 80% der *Test Set*-Daten korrekt. Die Sensitivität liegt in der *Cross*-Validierung bei 80,2%, die Spezifität bei 79,9% (s. Abb. 10).

In der Auswertung der beiden frühen und späten Untergruppen erreichte jeweils der GA eine bessere Klassifikation. In der *Cross*-Validierung weist sein Modell zur Unterscheidung der beiden frühen Untergruppen eine Sensitivität von 76,3% und eine Spezifität von 71,5% auf (73,9% des *Test Set* korrekt klassifiziert). Es basiert auf 20 *Peaks* mit unterschiedlichen Merkmalen. Die RC beträgt 94,9%.

18 *Peaks* unterschieden sich relevant in den beiden späten Untergruppen. Das daraus resultierende GA-Modell hat eine RC von 95% sowie eine Sensitivität von 75,8% und eine Spezifität von 74,6% in der *Cross*-Validierung. Somit wurden 75,2% der Daten des *Test Set* richtig zugeordnet (s. Tab.2).

Eine Zuordnung der Daten zu einzelnen Abnahmezeitpunkten war in dieser Gruppe mit folgenden Klassifikationsraten möglich: Für 0h lag die RC bei 97,1%, die Sensitivität in der *Cross*-Validierung bei 72,1% und die Spezifität bei 68,5%. Für 6h ergab die Auswertung eine RC von 89% und in der *Cross*-Validierung 69,8% Sensitivität und 64% Spezifität. Korrekt dem Abnahmezeitpunkt 12h zuzuordnen waren 94,7% der Daten.

Durch die *Cross*-Validierung wurden eine Sensitivität von 69,8% und eine Spezifität von 43,9% ermittelt. Dem Zeitpunkt 24h ordnete der SVM 97,2% der Daten korrekt zu, eine Sensitivität von 74,2% und eine Spezifität von 69,3% wurden erreicht.

Gruppe	Untergruppen	RC	Cross-Val. Klasse 1	Cross-Val. Klasse 2	Algorithmus
ISS	ISS > 40 vs. ISS < 40	83,0%	52,0%	73,3%	SVM
ISS	ISS > 40 (0-12h) vs. ISS < 40 (0-12h)	87,3%	49,8%	67,7%	SVM
ISS	ISS > 40 (24-72h) vs. ISS < 40 (24-72h)	88,9%	54,5%	72,1%	SVM
Gruppe	Untergruppen	RC	Cross-Val. Klasse 1	Cross-Val. Klasse 2	Algorithmus
Transfusion	EK > 10 vs. EK < 10	95,0%	80,2%	79,9%	SVM
Transfusion	EK > 10 (0-12h) vs. EK < 10 (0-12h)	94,9%	76,3%	71,5%	GA
Transfusion	EK > 10 (24-72h) vs. EK < 10 (24-72h)	95,0%	75,8%	74,6%	GA

Tabelle 2: Übersicht über die Klassifikationen anhand der Verletzungsschwere und des Transfusionsbedarfs.

RC: *Recognition Capability*. Beschreibt die Fähigkeit des Vorhersagemodells, die Daten zu beschreiben, auf denen es basiert.

Cross-Val.: Ergebnis der *Leave-One-Out-Cross-Validierung* mit 10% der Daten

Klasse: bezeichnet in der Auswertung die jeweilige Untergruppe

SVM: *Support Vector Machine*

GA: Genetischer Algorithmus

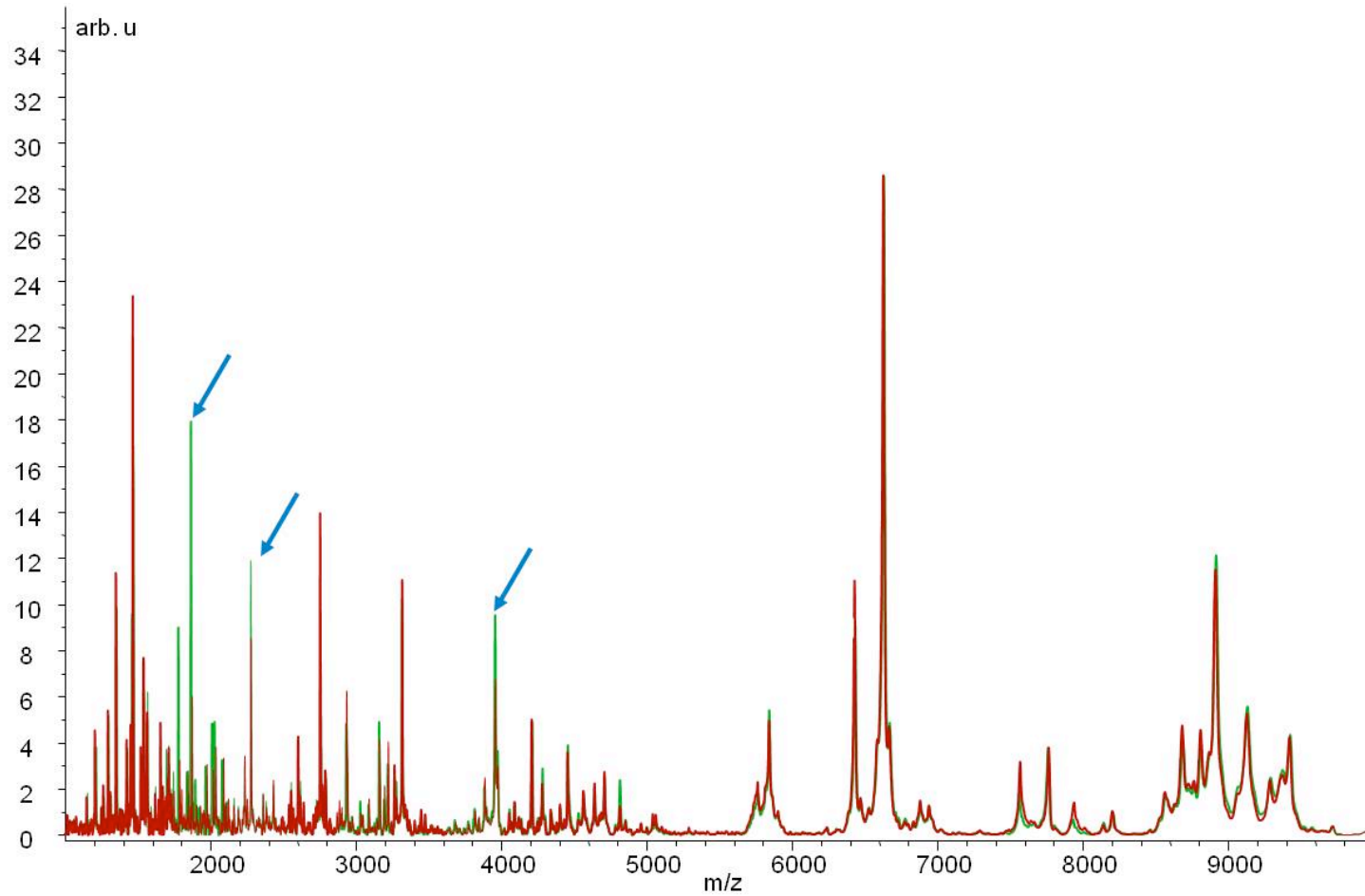


Abbildung 10: Übereinandergelegte Durchschnittsspektren der Gruppen 2a (rot) und 2b (grün) („Massentransfusion“): Die deutlichsten Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Spektren der beiden Gruppen finden sich hier vor allem im niedrigen Massenbereich (siehe blaue Pfeile).
x-Achse: m/z-Wert, y-Achse: Signalintensität in *arbitrary units*

Für 48h ergab sich eine RC von 85,7%, die *Cross-Validierung* lieferte 58,2% Sensitivität und 52,6% Spezifität. Dem letzten Abnahmezeitpunkt 72h konnten 94,1% der Daten richtig zugeordnet werden. 48,1% Sensitivität und 60,4% Spezifität wurden durch *Cross-Validierung* ermittelt.

4.4.4 Auftreten eines Multiorganversagens

16 in den Gruppen 3a (MOF aufgetreten) und 3b (MOF nicht aufgetreten) spezifisch ausgeprägte *Peaks* bilden die Grundlage für ein SVM-Modell mit einer RC von 84%. In der *Cross-Validierung* konnten 69,5% der Daten korrekt klassifiziert werden (Sensitivität 91,7%, Spezifität 47,3%) (s. Abb.11 u. Abb. 12).

Im Vergleich der frühen Untergruppen erreichte der GA eine RC von 92% unter Hinzuziehung von 18 *Peaks*. In der *Cross-Validierung* ließen sich 76,9% der Daten richtig zuordnen, das Modell hatte somit eine interne Sensitivität von 87,9% und eine interne Spezifität von 65,9%.

Der SVM erstellte für die beiden späten Untergruppen aus 11 *Peaks* ein Modell mit einer RC von 83,3%. Bezogen auf die Daten aus dem *Training Set*, die im Rahmen der *Cross-Validierung* einer Klassifizierung unterzogen wurden, hat das Modell eine Sensitivität von 94,5% und eine Spezifität von 42,1%. Insgesamt wurden 68,3% dieser Daten korrekt zugeordnet (s. Tab.3).

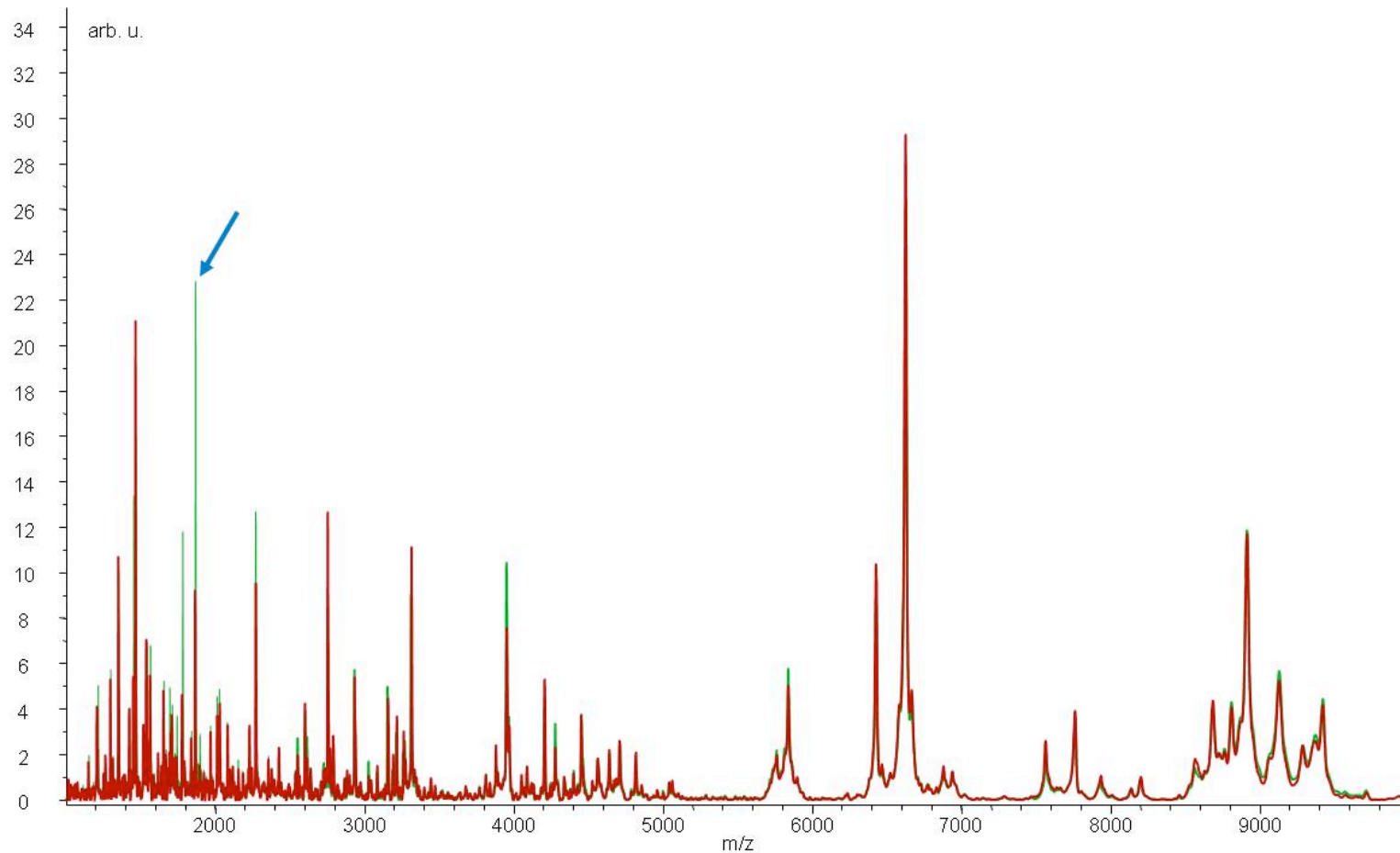


Abbildung 11: Überlappende Durchschnittsspektren der Gruppen 3a (rot) und 3b (grün) („Multiorganversagen“): Wie in Abbildung 7 zeigen sich die deutlichsten Unterschiede im niedrigen Massenbereich des Spektrums. Eindrücklich ist hier vor allem die deutlich erhöhte Signalintensität in der Gruppe 3b („kein manifestes MOF“) zwischen m/z 1600 und m/z 2000 (siehe blauer Pfeil und Abb. 12).

x-Achse: m/z -Wert. y-Achse: Signalintensität in *arbitrary units*

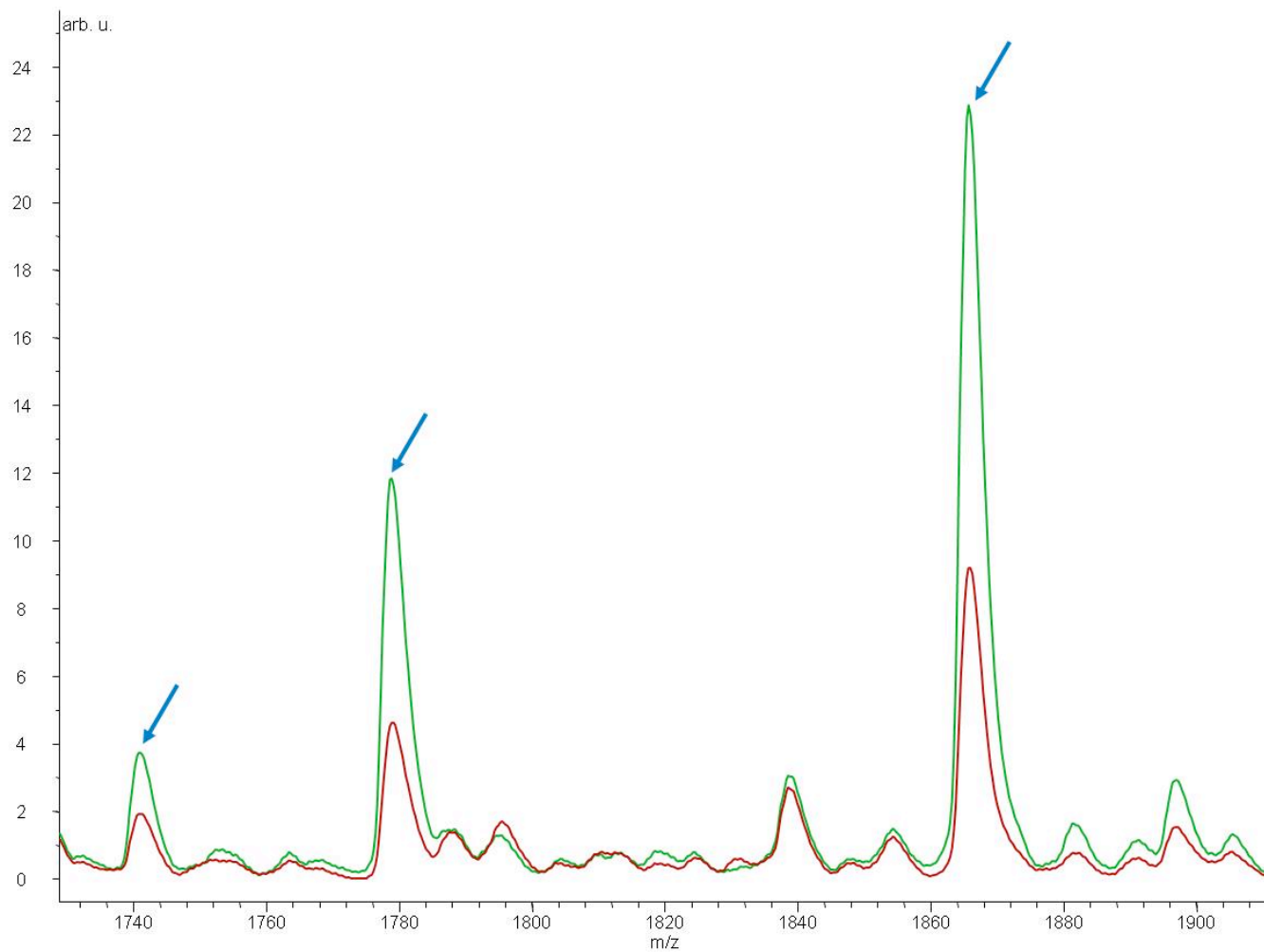


Abbildung 12: Relevante Peaks der Gruppen 3a (rot) und 3b (grün) („Multiorganversagen“): Vergrößerter Ausschnitt des markierten Bereiches in Abb.12. Hier zeigt sich eine deutlich erhöhte Signalintensität in Gruppe 3b („kein manifestes MOF“; siehe blaue Pfeile).
x-Achse: m/z-Wert. y-Achse: Signalintensität in *arbitrary units*

Bei Betrachtung der Klassifikationen anhand der verschiedenen Zeitpunkte fällt eine starke Diskrepanz zwischen den Werten der Sensitivität und Spezifität auf. Bei einer RC von 100% konnten in der *Cross-Validierung* 96,3% Sensitivität und 58,5% Spezifität erreicht werden. Für 6h waren es eine RC von 81,73, eine Sensitivität von 82,73% und eine Spezifität von 15%. Für 12h wurden eine RC von 94,2% und eine Sensitivität von 90,9% ermittelt, die Spezifität lag bei 32,5%. Die Sensitivität wurde für 24h mit 90% angegeben, die Spezifität mit 7,5% bei einer RC von 64,9%. Die Sensitivität sinkt im weiteren Verlauf über 73% bei 48h auf 63% bei 72h. Die Spezifität für die beiden letzten Zeitpunkte liegt unter 30%.

4.4.5 Outcome

Hinsichtlich des Versterbens (Gruppe 4a) oder Überlebens (Gruppe 4b) innerhalb von 90 Tagen nach Aufnahme ließ sich über den gesamten Zeitverlauf anhand des GA ein Muster aus 19 spezifischen *Peaks* identifizieren. Mit Hilfe dieses Musters lassen sich 95,1% der Daten im *Training Set* (Sensitivität 91,8%, Spezifität 98,3%) und 73,4% im *Test Set* (Sensitivität 51%, Spezifität 95,7%) in ihre jeweilige Klasse einordnen.

Bei gesonderter Betrachtung jeweils der frühen und späten Zeitpunkte erstellte der GA für die beiden frühen Gruppen ein Modell aus 19 *Peaks* mit trennenden Eigenschaften. Dieses Modell erreichte im Validationsdatensatz 69,7% Sensitivität und 90,4% Spezifität (insgesamt 80% korrekte Zuordnung). Die RC liegt bei 93,5% (s. Abb. 13 u. Abb. 14).

Gruppe	Untergruppen	RC	Cross-Val. Klasse 1	Cross-Val. Klasse 2	Algorithmus
Multiorgan- versagen	MOF > 4 vs. MOF < 4	84,0%	91,7%	47,3%	SVM
Multiorgan- versagen	MOF > 4 (0-12h) vs. MOF < 4 (0-12h)	92,0%	87,9%	65,9%	GA
Multiorgan- versagen	MOF > 4 (24-72h) vs. MOF < 4 (24-72h)	83,3%	94,5%	42,1%	SVM
Gruppe	Untergruppen	RC	Cross-Val. Klasse 1	Cross-Val. Klasse 2	Algorithmus
Outcome	versterben vs. überleben	95,1%	51,0%	95,7%	GA
Outcome	versterben (0-12h) vs. überleben (0-12h)	93,5%	69,7%	90,4%	GA
Outcome	versterben (24-72h) vs. überleben (24-72h)	83,6%	38,6%	95,7%	GA

Tabelle 3: Übersicht über die Klassifikationen nach Auftreten eines Multiorganversagens und des Versterbens oder Überlebens innerhalb von 90 Tagen.

RC: *Recognition Capability*. Beschreibt die Fähigkeit des Vorhersagemodells, die Daten zu beschreiben, auf denen es basiert.

Cross-Val.: Ergebnis der *Leave-One-Out-Cross-Validierung* mit 10% der Daten

Klasse: bezeichnet in der Auswertung die jeweilige Untergruppe

SVM: *Support Vector Machine*

GA: Genetischer Algorithmus

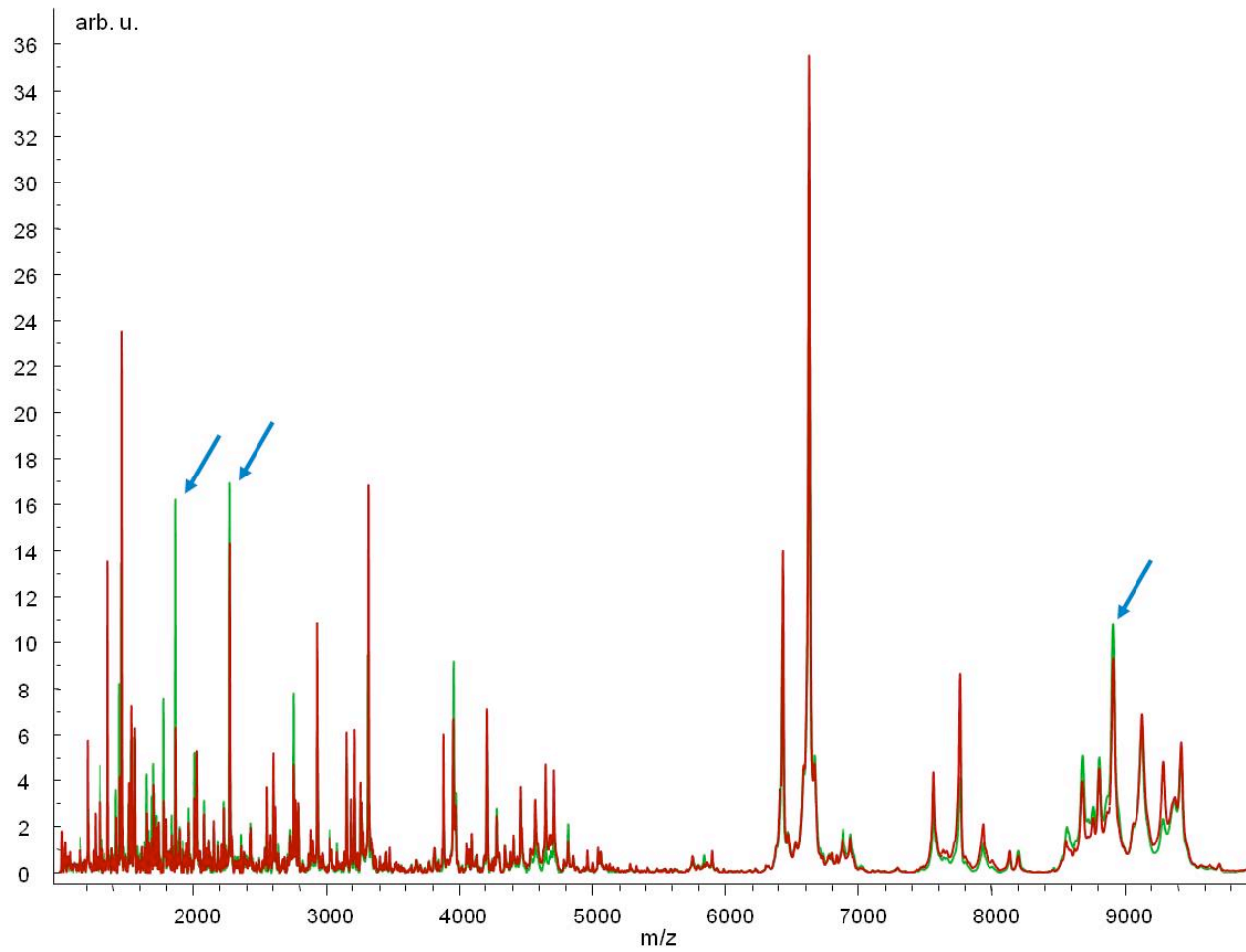


Abbildung 13: Überlagerte Durchschnittsspektren der frühen Untergruppen von 4a (rot) und 4b (grün) („Outcome“): Deutliche Veränderungen sind vor allem im unteren Drittel des Massenbereiches zu sehen, aber auch ab ca. m/z 7000 (siehe blaue Pfeile). x-Achse: m/z-Wert. y-Achse: Signalintensität in *arbitrary units*.

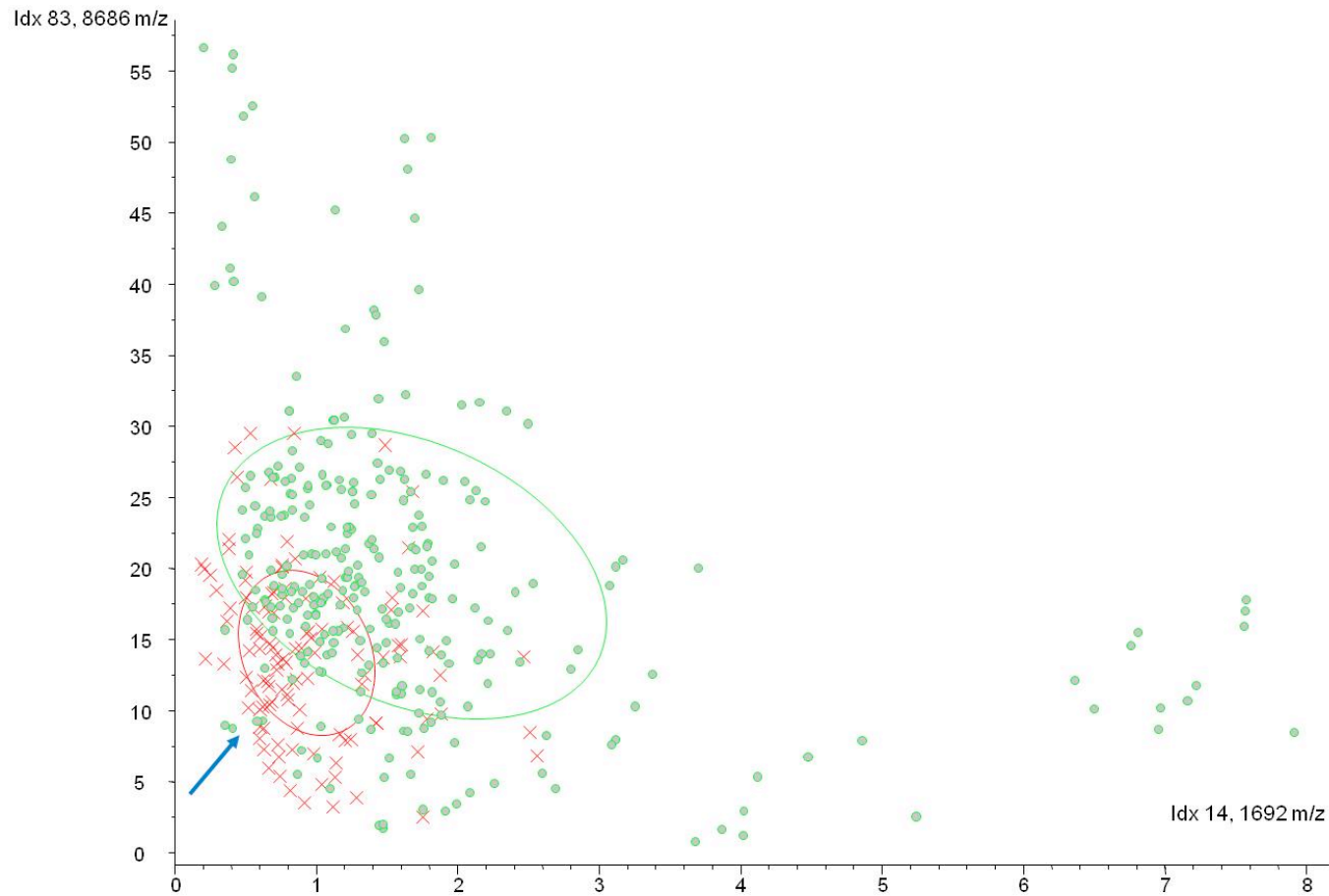


Abbildung 14: Scatter-Plot der frühen Untergruppen von 4a (rot) und 4b (grün) („Outcome“): Graphische Darstellung anhand der beiden *Peaks*, die sich am signifikantesten zwischen den Gruppen unterscheiden: *Peak* Nr. 14 mit m/z 1692 und *Peak* Nr. 83 mit m/z 8686. Wie in den Scatter-Plots zuvor steht eine deutliche Kompaktheit der Messpunkte in Gruppe 4a (siehe blauer Pfeil) der starken Streuung in Gruppe 4b gegenüber. Unter den Ausreißern der Gruppe 4b besteht eine negative Korrelation der Intensitäten dieser beiden relevanten *Peaks*: Hohe Intensität des einen schließt eine vergleichbare Intensität des anderen hier aus. Dies spricht für die Heterogenität der Gruppe der Überlebenden.

x-Achse: Signalintensität des *Peaks* Nr. 21, y-Achse: Signalintensität des *Peaks* Nr. 17, beide in *arbitrary units*.

Die Ellipsen stellen die Standardabweichung der Massen der jeweiligen Gruppe dar.

Analog wurde in der Gruppe der späten Zeitpunkte von 24h – 72h mit einer Sensitivität von 38,6% und einer Spezifität von 95,7% klassifiziert. Das Klassifizierungsmodell beruhte auf 17 *Peaks*, die in den beiden verglichenen Gruppen charakteristisch ausgeprägt auftraten. Es verfügt über eine RC von 83,6% (s. Tab.3).

Bei einer auf den einzelnen Blutabnahmezeitpunkt bezogenen Auswertung zeigen sich, wie bereits in der Gruppe 3 („Multiorganversagen“), erneut starke Unterschiede zwischen den ermittelten Werten der Sensitivität und Spezifität. Die vom GA erreichten Spezifitätswerte sind über den gesamten Zeitverlauf hoch (bei 0h 88,3%, bei 6h 73,4%, bei 12h 77%, bei 24h 81,8%, bei 48h 88,7%, bei 72h 91,4%). Auffallend sind hier vor allem die höheren Werte zu Beginn und am Ende der Beobachtung. Die Sensitivität sinkt jedoch von 46,2% bei 0h über 20-30% im weiteren Verlauf auf unter 5% bei 72h.

4.5 Externe Validierung

In der externen Validierung wird ein erstelltes Vorhersagemodell auf einen Datensatz angewandt, der nicht an der Erstellung des Modells beteiligt war. Mit Hilfe der Klassifizierungsraten lassen sich die Sensitivität und Spezifität des Modells angeben.

Im vorliegenden Fall wurden innerhalb der frühen Zeitpunkte Muster gesucht, die sich für die Bildung eines Vorhersagemodells eignen. Das resultierende Modell wurde anschließend mit den Daten der späten Zeitpunkte extern validiert. In analoger Weise wurden für die späten Zeitpunkte erstellte Modelle mit den Daten der frühen Zeitpunkte extern validiert.

4.5.1 Verletzungsschwere

Auf die Zeitpunkte von 24h -72h angewandt, besitzt das Vorhersagemodell der frühen Zeitpunkte eine Sensitivität von 27,5% und eine Spezifität von 51,7%. Bei der

Betrachtung jedes dieser Zeitpunkte einzeln fällt eine Tendenz zu einer abnehmenden Rate richtiger Klassifikationen auf: So liegt die Sensitivität für 24h bei 40%, für 48h bei 25% und für 72h bei 13,6%. Die Spezifität für 24h bei 56,3%, für 48h bei 50% und für 72h bei 47,2%.

Diese Tendenz wird dagegen nicht erkennbar bei externer Validierung des Modells für späte Zeitpunkte. Wenn für diese Validierung alle Daten der Zeitpunkte 0h, 6h und 12h herangezogen werden, besitzt das Modell eine Sensitivität von 37,4% und eine Spezifität von 74,2%. Werden die Daten nach einzelnen Zeitpunkten klassifiziert, ergeben sich eine Sensitivität von 34,6% und eine Spezifität von 77,6% für 0h, von jeweils 32,1% und 68,4% für 6h und von 44,4% und 76,9% für 12h.

4.5.2 Massentransfusion

Das mit den Daten der frühen Zeitpunkte errechnete GA-Modell hat bei externer Validierung mit den Daten von 24h bis 72h eine Sensitivität von 32,5% und eine Spezifität von 36%. Werden zur Validierung die Daten der drei Zeitpunkte einzeln verwendet, zeigt sich erneut eine Tendenz zu einer im Lauf der Zeit abnehmenden Rate richtiger Klassifikationen. So betragen Sensitivität und Spezifität für 24h 43,3% und 53,8%, für 48h 30,4% und 32,9% und für 72h 20,5% und 19,4%.

Ebenfalls analog zur Gruppe „Verletzungsschwere“ zeigt sich diese Tendenz nicht bei Klassifizierung der Daten der drei frühen Zeitpunkte durch das Vorhersagemodell der späten Zeitpunkte 24 - 72 Stunden. Angewandt auf alle Daten der Zeitpunkte 0h, 6h und 12h weist das Modell eine Sensitivität von 33,3% und eine Spezifität von 73,4% auf. Für die jeweils einzelnen Zeitpunkte ergeben sich bei 0h 17,3% Sensitivität und 86,8% Spezifität, bei 6h 44,6% und 60,8% und für 12h 36,5% Sensitivität und 73,1% Spezifität.

4.5.3 Auftreten eines Multiorganversagens

Das GA-Modell, das mittels der Daten der ersten 12h nach Aufnahme erstellt wurde, besitzt, auf die Zeitpunkte 24h bis 72h angewandt, eine Sensitivität von 76,3% und eine Spezifität von 66,7%. Werden diese Zeitpunkte jeweils einzeln untersucht, ergeben sich Werte für Sensitivität und Spezifität von 91,3% und 46,9% für 24h, von 71,1% Sensitivität und 68,8% Spezifität für 48h und von 62,5% Sensitivität und 84,4% Spezifität für 72h.

Für die frühen Zeitpunkte werden eine Sensitivität von 85,8% und eine Spezifität von 51% erreicht. Betrachtet man die Daten von 0h, 6h und 12h getrennt, sind die Ergebnisse folgendermaßen verteilt:

0h: 75% Sensitivität und 59,4% Spezifität. 6h: 97,1% Sensitivität und 40,6% Spezifität.

12h: 84,3% Sensitivität sowie 52,8% Spezifität.

4.5.4 Outcome

Bei Klassifizierung der Daten von 24h-72h zeigt das Modell der frühen Zeitpunkte eine Sensitivität von 43,2% und eine Spezifität von 64,9%. In der Zuordnung der einzelnen Datensätze sind dies für 24h eine Sensitivität von 63,9% und eine Spezifität von 87%, für 48h 36,4% Sensitivität und 54,8% Spezifität und für 72h 0% Sensitivität und 52,6% Spezifität.

In der Zusammenschau der frühen Untergruppe ergeben sich Werte von 50,9% Sensitivität und 97,6% Spezifität. Im Einzelnen erreicht das Modell 44,4% Sensitivität und 95,4% Spezifität bei 0h, eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 97,5% bei 6h und 42,5% Sensitivität und 95,1% Spezifität bei 12h.

4.6 Proteinidentifizierung mittels *TagIdent*

Anhand des Datenbankabgleiches mit *TagIdent* konnten insgesamt 387 verschiedene Proteine identifiziert werden, die den relevanten *Peaks* zugrundeliegen können. Einige dieser *Peaks* wurden mehrmals zur Klassifikation verschiedener Untergruppen herangezogen, weshalb sich für alle Gruppen zusammen eine höhere Anzahl an Proteinen ergibt.

In Gruppe 1 („Verletzungsschwere“) konnten wir 138, in Gruppe 2 („Massentransfusion“) 190, in Gruppe 3 („Auftreten eines Multiorganversagens“) 173 und in Gruppe 4 („*Outcome*“) 276 Proteine bestimmen, deren Massen mit den separierenden *Peaks* übereinstimmen.

Bei Betrachtung des Proteoms im zeitlichen Verlauf lassen sich mit *TagIdent* 211 Kandidatenproteine identifizieren.

Eine umfassende Liste aller identifizierten Proteine ist Abschnitt 8.1 zu entnehmen.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit präsentiert erstmals die Ergebnisse einer Analyse des Serumproteoms polytraumatisierter Patienten in der initialen posttraumatischen Phase mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Dabei wurden Unterschiede der Proteinexpressionsprofile im zeitlichen Verlauf und in Relation zu verschiedenen klinischen Parametern gleichermaßen untersucht.

Wir konnten zeigen, dass sich die Proteinzusammensetzung im Serum schwerstverletzter Patienten im zeitlichen Verlauf der ersten 72 Stunden nach Trauma verändert. Darüber hinaus ließ sich eine Abhängigkeit der Proteinexpression von der Verletzungsschwere, vom Transfusionsbedarf, der Entwicklung von Komplikationen im

Sinne eines MOF sowie vom Überleben/Versterben des Patienten nachweisen. Anhand von bioinformatischen Analysemethoden konnten wir Vorhersagemodelle berechnen, die - sowohl in bezug auf die verschiedenen klinischen Parameter als auch auf den zeitlichen Verlauf - eine solide Spezifität aufweisen, allerdings bei geringer Sensitivität. Aufgrund des experimentellen Charakters dieser Studie sind die dargestellten Ergebnisse differenziert zu diskutieren. Im Folgenden werden daher die einzelnen Aspekte detailliert betrachtet.

5.1 Studiendesign

5.1.1 Vergleichbarkeit des Kollektivs

Unser Patientenkollektiv ist in Bezug auf das Durchschnittsalter (46,25 Jahre) und die Geschlechterverteilung von 2:1 (Männer:Frauen) mit den bekannten europäischen und amerikanischen Kollektiven von Traumapatienten vergleichbar (39; 47). Hinsichtlich des Verletzungsmechanismus und Verletzungsmusters ist unser Kollektiv übereinstimmend repräsentativ für Mitteleuropa (106). In den USA ist dagegen, wie unter *1.1.* beschrieben, häufiger ein penetrierender Verletzungsmechanismus ursächlich (35; 39; 112).

Es ist bekannt, dass gerade in der frühen posttraumatischen Phase die Weichen für die spätere Entwicklung eines Multiorganversagens gestellt werden (21; 50).

Darüber hinaus zeigen sich im zeitlichen Verlauf verschiedene Phasen in der komplexen Immunreaktion, die in ein SIRS und MOF mündet, was eine serielle Untersuchung für die Analyse dieser Reaktion unumgänglich macht (32; 81). Die von uns gewählten Intervalle der Blutprobengewinnung stellen in dieser Hinsicht einen Kompromiss dar zwischen der größtmöglichen zeitlichen Auflösung der immunologischen Ereignisse

und der ärztlichen Verpflichtung, dem Patienten keinen zusätzlichen Schaden zuzufügen (75).

Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte gemäß den Vorgaben des Traumaregisters der *Arbeitsgemeinschaft Polytrauma der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie* und den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* (110). Zur objektiven Klassifizierung der Verletzungsschwere benutzten wir den *Injury Severity Score* (ISS) nach *Baker et al.* (14; 15), wissend, dass sich das individuelle Verletzungsmuster nur schwer objektiv-statistisch abbilden lässt. Zur Objektivierung der quantitativen physiologischen Messparameter im klinischen Verlauf, wie z.B. des arteriellen Blutdrucks, wurden diese im *MOF-Score* nach *Goris* in der von *Lefering* modifizierten Form zusammengefasst (57; 76). Ein manifestes MOF lag definitionsgemäß bei einem *MOF-Score* ≥ 4 Punkten vor.

Durch diese Umwandlung kontinuierlicher Daten in ein binäres Kriterium war es möglich, die Patienten hinsichtlich ihrer Organfunktion in eine Gruppe mit manifestem Multiorganversagen (*MOF-Score* ≥ 4) und eine Gruppe ohne eingetretenes MOF einzuteilen. Der *MOF-Score* besitzt prädiktive Aussagekraft für spätere Komplikationen, wie *Holzheimer et al.* feststellten, und ist geeignet für die Einteilung von Gruppen mit unterschiedlichen Komplikationsrisiken (64; 137). Allerdings unterliegt ein Großteil der hierfür verwendeten physiologischen Parameter erheblichen Schwankungen im zeitlichen Verlauf, was den Abnahmezeitpunkt zu einem beeinflussenden Faktor macht, der einen systematischen Messfehler ermöglicht (110; 137). Hierauf ist bei der Interpretation kritisch zu achten.

Während der dichotome *MOF-Score* die Einteilung des Patientengutes in zwei Gruppen ermöglicht, besitzt der ISS unseres Wissens nach keinen etablierten Grenzwert, der für

eine derartige Einteilung geeignet wäre. Somit wählten wir als Grenze den medianen ISS unseres Patientenkollektivs von 40,1 Punkten, um eine Einteilung in schwer und weniger schwer verletzte Patienten vornehmen zu können.

Das gruppenbildende Kriterium der Massentransfusion, definiert als Transfusionsbedarf von mehr als 10 EK innerhalb der ersten 24h, stützt sich auf die Arbeit von *Como et al* (34). Die Gabe einer derartigen Menge an EK ist ein unabhängiger Risikofaktor für Komplikationen wie ARDS (118) und erhöhte Mortalität (80). Auch konnte eine Korrelation zwischen der Transfusionsmenge während viszeralchirurgischen Eingriffen und der Rate infektiöser Komplikationen nachgewiesen werden (69). Allerdings korreliert therapiebedingt die Zahl transfundierter EK mit der Menge des infundierten *fresh frozen plasma* (FFP). Durch die darin enthaltenen Proteine könnten die gemessenen Veränderungen im Serumproteom der Patienten mit hohem Transfusionsbedarf ggf. beeinflusst worden sein.

Andererseits ist ein Beitrag der transfundierten Proteine zur Entwicklung der systemischen Inflammation in den massentransfundierten Patienten denkbar, sowohl in ihrer physiologischen Funktion als auch als immunogener Stimulus (3).

Die Einteilung der Patienten nach ihrem klinischen *Outcome* im Sinne von Versterben oder Überleben hat den Sinn, anhand eines eindeutigen Kriteriums, das nicht artifiziell definiert werden muss, eine exponierte Risikogruppe zu identifizieren. Der Nachteil liegt in der mangelnden Berücksichtigung verschiedener möglicher Todesursachen in der Gruppe der Verstorbenen und außerdem im Auftreten unterschiedlicher möglicher Komplikationen verschiedenster Schweregrade in der Gruppe „Überleben“. Somit handelt es sich um eine Einteilung mit scharf definierter Gruppentrennung bei allerdings verbleibender Inhomogenität innerhalb der Gruppen.

5.2 Probengewinnung

In dieser Studie wurde Serum aus Patientenvollblutproben gewonnen, indem das Serum von Gerinnungsfaktoren und zellulären Bestandteilen durch Zentrifugieren in einem *Vacutainer*-Sammelgefäß (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) getrennt wurde. Diese Methodik entspricht dem internationalen labormedizinischen Standard (58).

Drake et al. berichten von einer Verfälschung der Signalintensität im Massenbereich zwischen 1000 und 3000 Da, die sie auf Kunststoffverunreinigungen aus den Probenröhrchen zurückführen (44). *Baumann et al.* beobachteten keinen derartigen Einfluss der Labormaterialien. Sie sehen die Ursache für etwaige Störeinflüsse in der Verschiedenheit der Probengefäße unterschiedlicher Hersteller (19). Die Bruker Daltonik GmbH, Bremen, gibt einige Hersteller an, deren Probenbehältnisse kompatibel mit anschließenden massenspektrometrischen Untersuchungen sind (25). Die für diese Studie benutzten Reaktionsgefäße der Eppendorf AG, Hamburg, zählen dazu (s. Abschnitt 3.2).

5.2.1 Serum als Probe für massenspektrometrische Untersuchungen

Der Proteingehalt in menschlichem Serum wird mit 60-80 g/l (27) angegeben, wovon den größten Anteil die Albuminfraktion ausmacht (27; 43). Nach Ursprung und funktionellen Eigenschaften haben *Anderson et al.* die Proteine des menschlichen Plasmas in verschiedene Gruppen eingeteilt (9) und damit die Einteilung von *Putnam* modifiziert (104). Sie unterscheiden:

- i) Proteine, die vom Gewebe sezerniert werden und im Kreislauf ihre Funktion ausüben,
- ii) Immunglobuline,

- iii) Langstrecken-Rezeptorliganden (wie z.B. Peptidhormone),
- iv) lokale Rezeptorliganden (wie z.B. Zytokine),
- v) das Plasma auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort kurzzeitig passierende Proteine,
- vi) durch Leckagen der Zellmembran ausgetretene intrazelluläre Proteine,
- vii) Fremdproteine sowie
- viii) atypische Produkte von Tumoren und krankhaften Geweben, die physiologischerweise nicht produziert oder sezerniert werden.

Auf letztere konzentrierten sich die bisherigen Bemühungen der klinischen Proteomprofilanalyse [(68), Übersichtsarbeiten (5; 37; 68; 94; 99)]. Da sich Serum und Plasma bis auf ihren Gehalt an Gerinnungsfaktoren nicht unterscheiden (43), lässt sich die Einteilung von *Anderson et al.* für beide anwenden (9).

Serum liefert in massenspektrometrischen Untersuchungen mittels MALDI-TOF mehr Signale als Plasma oder Urin. Auch haben die im Serum gemessenen Signale eine höhere Intensität (19; 51).

Baumann et al. haben ein standardisiertes Verfahren zur Proteomanalyse in humanem Serum etabliert (19). Sie beschrieben die Auswirkung von Probenentnahme- und Lagerungsbedingungen, Vorbehandlung mit Mikropartikeln sowie Frier- und Auftauzyklen auf die Anzahl, Intensität und Reproduzierbarkeit der Signale. Für Serum konnte gezeigt werden, dass eine zu lange Lagerungsdauer bei Raumtemperatur die relative Signalintensität vor allem im niedrigen Massenbereich um 1000 Da vermindert. Ab einer Lagerung von mehr als 120 Minuten Dauer stieg in diesem Massenbereich das Hintergrundrauschen deutlich an. Auch *Marshall et al.* beschrieben eine signifikante Änderung der Spektren nach 4 h bis 8 h Lagerung und schrieben diesen Störeinfluß der

ex vivo-Tätigkeit proteolytischer Enzyme zu (82). Dieser Effekt war von der Außentemperatur abhängig: Bei 4° C konnte eine Lagerung auch länger als 120 Minuten bedenkenlos erfolgen, während bei 30° C bereits nach 30 Minuten ein Intensitätsverlust über das gesamte Spektrum zu beobachten war.

Dementsprechend war bei -80° C eine Lagerungszeit von 6 Monaten ohne Auswirkungen auf das gemessene Spektrum möglich. Für Zeiträume von mehr als 6 Monaten Lagerung sind uns keine Daten bekannt.

Während ungefrorenes Serum eine hohe Variabilität und geringe Reproduzierbarkeit aller Signalintensitäten zeigte, führte einmaliges Einfrieren und Auftauen zu einer besseren Reproduzierbarkeit. Allerdings nahmen bei gefrorenen und wieder aufgetauten Proben die Signalintensitäten vor allem ab einer Masse von 1500 Da ab, während niedrigere Massenbereiche sich nicht veränderten und Signale ab 8900 Da sogar im Vergleich an Intensität zunahmen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen verstärkte diesen Effekt (19). Eine Erklärung für diese Beobachtung ist unseres Wissens bislang nicht publiziert worden.

Petricoin et al. verglichen ebenfalls Serummassenspektren nach ein- oder mehrmaligem Einfrieren. Sofern die untersuchten Serumproben nicht häufiger als zweimal aufgetaut wurden und man sie nach dem Auftauen bei 4 °C lagerte, wiesen die darin gemessenen Spektren eine hohe Reproduzierbarkeit auf (99). *Baumann et al.* erreichten bei der Standardisierung der für unsere Untersuchungen verwendeten Vorgehensweise (automatisierte Proteinfractionierung mit *Microbeads*, gerätetechnische Einstellungen des Massenspektrometers, Auswertung mit *ClinProTools*, s. 3.3.1 – 3.3.4 sowie 3.4) eine ähnlich hohe Reproduzierbarkeit wie *Petricoin*.

In unserer Studie waren einige der verwendeten Proben zum Zeitpunkt der Messung älter als 6 Monate. Für den Transport ins Institut für Laboratoriumsmedizin und

molekulare Diagnostik der Universität Leipzig wurden alle Proben aufgetaut, eine für die massenspektrometrische Messung bestimmte definierte Menge entnommen und erneut tiefgefroren. Dieses Verfahren beeinflusst nach dem derzeitigen Kenntnisstand jedoch nicht die Anzahl, sondern allenfalls die Signalintensitäten der gemessenen *Peaks*. Darüber hinaus verändern sich die *Peaks* in den verschiedenen Massenbereichen gleichsinnig, im niedrigeren Massenbereich nehmen ihre Signalintensitäten ab und im hohen Massenbereich zu (19).

Dies lässt den Schluss zu, dass unseren Klassifikationsalgorithmen zur Berechnung der Vorhersagemodelle dieselbe Anzahl an *Peaks* in mehrmals aufgetauten Proben zur Verfügung stand, wie in frischen Proben. Eine Beeinflussung der Peakzusammensetzung der Vorhersagemodelle durch wiederholtes Auftauen ist daher unwahrscheinlich. Die oben beschriebenen Schwankungen der Signalintensität von relevanten, in die Klassifikationsmodelle einbezogenen *Peaks* könnten jedoch die korrekte Erkennung von analogen Mustern in anderen Spektren erschweren und so die *Recognition Capability* und die interne und externe Sensitivität und Spezifität negativ beeinflusst haben.

5.3 Präanalytik

In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, die Fraktionierung der Proben durchzuführen, z.B. durch die Beschichtung von Proteinchips (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, SELDI-TOF MS) oder durch chromatographische Methoden (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, LC/MS) (6; 59).

Für die von uns angewandte Fraktionierung durch Mikropartikel stehen darüber hinaus unterschiedliche Sorten von *Microbeads* zur Verfügung, die eine Fraktionierung anhand verschiedener chemischer Eigenschaften ermöglichen (120). *Villanueva et al.* erzielten

mit den auch für die vorliegende Studie eingesetzten MB-HIC C8 – Partikeln (s. 3.3.2) die meisten Signale (135). Andere Autoren bestätigen die Eignung dieses Mikropartikeltyps für die klinische Proteomprofilanalyse (46; 144). Eine Mischung verschiedener Mikropartikeltypen erhöhte die Signalausbeute nicht (135).

Bei *Baumann et al.*, *Fiedler et al.* und *Zhang et al.* ermöglichte eine Kombination aus Mikropartikelseparation, MALDI-TOF MS mit *AnchorChip-Target* und statistischer Auswertung mit *ClinProTools-Software* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) die schnelle Erhebung von Daten bei hoher Sensitivität und guter Reproduzierbarkeit (19; 51; 144). Daher haben wir uns für diese Methode entschieden.

5.4 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight

Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS kam in mehr als 200 Studien im Bereich der klinischen Proteomprofilanalysen zum Einsatz, um verschiedene krankheitsbedingte Proteinexpressionsprofile zu charakterisieren (5; 37). Besonderes Augenmerk wurde auf die Diagnose und Stadieneinteilung maligner Entartungen gerichtet, aber auch bei Patienten mit neurologischen, hämatologischen und internistischen Erkrankungen, wie z.B. Leberzirrhose oder Kardiomyopathie, konnten spezifische Expressionsprofile gefunden werden (5; 37; 68; 99; 120).

Verschiedene Autoren haben in systematischen *Reviews* jedoch auch Kritikpunkte an dieser Methode vorgebracht, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

Wie in Abschnitt 5.2.1 dargestellt, enthält menschliches Serum eine Vielzahl verschiedener Proteine und Peptide, die nicht nur unterschiedliche Größen, sondern auch sehr unterschiedliche Konzentrationen im Serum aufweisen. Die Serumkonzentrationen der zahlreich vorhandenen Proteine wie Albumin und der

seltener vorkommenden Proteine und Peptide unterscheiden sich um das 10^6 - bis 10^9 -fache (9; 116). Da die Fraktionierung mit magnetischen *Microbeads* auf der unterschiedlichen Affinität dieser Partikel zu verschiedenen Proteinen und Peptiden beruht, kommt es zwangsläufig zu einer Konkurrenz der Proteine um die Bindungsstellen. Die häufiger vorkommenden Proteine sind durch ihre höhere Konzentration begünstigt, verdrängen die selteneren aus dieser Bindung und sind deshalb im gemessenen Massenspektrum überrepräsentiert (37; 41). Somit hängt die Ausbeute an informativen Proteinen und ihren Fragmenten nicht nur von der Konzentration dieser Proteine ab, sondern auch von den Konzentrationen anderer Proteine im Serum, die mit ihnen um Bindungsstellen konkurrieren und keinen Informationsgehalt besitzen. In zwei Proben mit gleicher Konzentration des gesuchten Proteins können daher zwei unterschiedliche relative Signalintensitäten gemessen werden, sofern sich die übrigen Konzentrationen unterscheiden. Die Methode ist somit nur als semiquantitativ einzuschätzen (41).

Darüber hinaus existieren weitere Einflussfaktoren, die sich verschieden stark auf die Messergebnisse auswirken können. *Anderson* und Kollegen fassen sie zusammen unter genetische bzw. nicht genetische, nicht behandlungsbedingte Einflüsse, behandlungsbedingte Auswirkungen, wie z.B. Medikamente, sowie Einflüsse durch Unterschiede in der Probengewinnung (9).

Ein Problem der Methode stellt die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, vor allem in verschiedenen Laboratorien, dar (41). In einer Übersichtsarbeit über MALDI- und SELDI-TOF MS-Untersuchungen berichten *Dekker et al.* von hohen Variationskoeffizienten (*Coefficient of Variation, CV*) von 15-30% (37). *Solassol* und Kollegen sehen den Grund für die geringe Reproduzierbarkeit jedoch eher in Faktoren wie der unterschiedlichen Probengewinnung und -aufbewahrung, als in einem

technischen Mangel der Massenspektrometrie per se (120). Um diese Variationen zu reduzieren, empfehlen *Colantonio et al.* die Automatisierung der Präanalytik sowie die Kalibrierung des Messinstruments mit einer Kalibrierungslösung, die verschiedene Peptide enthält (33). Andere Autoren bestätigen diese Notwendigkeit (19; 135).

Um die bestmögliche Reproduzierbarkeit herzustellen, wurden daher für die vorliegende Arbeit alle präanalytischen Schritte - außer der Probengewinnung und der Herstellung der Matrix - automatisiert durchgeführt. Vor der Messung fand eine Kalibrierung mit einer standardisierten Peptidlösung statt.

Bisher ist nur in wenigen Fällen eine Identifizierung der Proteine gelungen, die den relevanten *Peaks* zugrundeliegen. *Solassol* und Mitarbeiter zeigten in einem Übersichtsartikel auf, dass dabei nicht, wie erwartet, neue Proteine gefunden wurden, die sich besser als Biomarker eignen würden als die vorherigen. Vielmehr waren alle identifizierten Proteine bereits bekannt (120). Allerdings widerspricht diese Tatsache nicht dem Prinzip der klinischen Proteomprofilanalyse. Grundlage dieses Ansatzes ist die These, dass auch bisher als nicht relevant eingestufte Proteine, in Kombination mit anderen und in einem spezifischen Muster vorliegend, Informationsgehalt und auch diagnostischen Charakter aufweisen können. Demnach ist das Muster selbst der diagnostische Marker (37; 99; 103).

5.5 Statistische und bioinformatische Auswertung

5.5.1 Supervised Training

Für die Auswertung unserer Messungen wurden in einem *Supervised Training*-Ansatz die gemessenen Daten der bioinformatischen *Software ClinProTools 2.0* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) zur Verfügung gestellt. Die Information, aus welcher Gruppe der jeweilige Datensatz stammt, wurde ebenfalls in die *Software* eingegeben. Diese

entwickelte daraufhin anhand der Gemeinsamkeiten innerhalb dieses Datensatzes ein Klassifizierungsmodell, wofür ein genetischer Algorithmus, ein *Support Vector Machine*- und ein *k-nearest-neighbour*-Algorithmus zum Einsatz kamen. Diese Vorgehensweise ist für die klinische Proteomprofilanalyse validiert und in zahlreichen publizierten Arbeiten dokumentiert (37; 59; 99; 103; 120; 122; 144).

Die Einteilung der Gruppen erfolgte außer nach den o.g. klinischen Kriterien auch nach dem Kriterium des Blutabnahmezeitpunktes. Ziel war es, Veränderungen des Serumproteoms im zeitlichen Verlauf untersuchen zu können. Es fällt auf, dass die Klassifikationsraten mit zunehmender zeitlicher Auflösung abnehmen. Ein möglicher Grund ist, dass sich das Serumproteom im Lauf der Zeit eventuell nicht in einem Ausmaß verändert, dass eine sichere Klassifikation zulässt. Dagegen spräche allerdings, dass die Klassifikation zu einigen Zeitpunkten sehr gut möglich war, die Rate korrekter Klassifikationen war jedoch sehr variabel im Zeitverlauf. Ein weiterer möglicher Grund ist, dass mit zunehmender zeitlicher Auflösung (und damit auch kleinerer Gruppengröße) die Messdaten für die Erstellung eines Vorhersagemodells mit ausreichender Sensitivität und Spezifität nicht ausreichen. In diesem Falle würde eine kontinuierliche Verbesserung der Modelle durch neue Messdaten auch eine durchgehend hohe Rate korrekter Klassifikationen zu einzelnen Zeitpunkten erlauben (99).

Die in dieser Studie beobachteten Unterschiede der Sensitivität und Spezifität in der internen Validierung mittels *Leave-One-Out-Cross-Validierung* und denen der externen Validierung wurden ebenfalls bereits von anderen Autoren beschrieben: Sensitivität und Spezifität sind in der internen Validierung, zusammengefasst als *Recognition Capability*, deutlich höher als in der externen Validierung (37). Es scheint sich daher

um eine Eigenart der Methodik zu handeln und nicht um einen Fehler unserer Auswertung.

Eine systematische Eigenschaft des genetischen Algorithmus mag hier ebenfalls eine Rolle spielen. Durch sein generationsweises Vorgehen besteht die Gefahr, dass er sich auf lokale Maxima im Datensatz konzentriert. So können diese *Peaks* im Vorhersagemodell übermäßig gewichtet werden. Dadurch sinkt die Reproduzierbarkeit dieses Modells, es ist auf das *Training Set* optimiert und beschreibt das *Test Set* möglicherweise nur unzureichend in der externen Validierung (103).

5.5.2 Externe Validierung

Mit den Daten der frühen Zeitpunkte von 0 Stunden bis 12 Stunden wurde ein Vorhersagemodell erstellt, das daraufhin mit den Daten der späten Zeitpunkte 24 Stunden bis 72 Stunden gemeinsam und jeweils einzeln extern validiert wurde. In gleicher Weise wurde ein Modell aus den späten Zeitpunkten 24 Stunden bis 48 Stunden berechnet und mit den frühen Zeitpunkten 0 Stunden bis 12 Stunden gemeinsam und einzeln extern validiert. Diese Berechnungen wurden für alle Gruppen durchgeführt. Ziel war es, zu prüfen, ob die errechneten Modelle zu einer korrekten Zuordnung von unbekanntem Daten in der Lage und somit valide sind.

Dies ist in den Gruppen 1 (Verletzungsschwere), 2 (Transfusionsbedarf) und 4 (90-Tage-Überleben) mit guter Spezifität, allerdings niedriger Sensitivität gelungen. In Gruppe 3 (Multiorganversagen) fällt eine anfangs hohe Sensitivität und ab dem Zeitpunkt 48 Stunden eine hohe Spezifität auf.

Das dichotome Kriterium des 90-Tage-Überlebens lässt sich deutlich besser klassifizieren als die Kriterien, die auf berechneten *Scores* beruhen (s. Tabellen 2 und 3). Ein möglicher Grund ist die Berechnung der *Scores* selbst, die, wie unter 5.1

erwähnt, eine Fehlerquelle darstellt. Darüber hinaus sind die artifiziellen Unterscheidungskriterien anhand von *Scores* aus o.g. Gründen weniger eindeutig als das nicht vom Untersucher zu definierende und faktische Kriterium des Überlebens oder Versterbens, was eine eindeutige Zuordnung der Daten begünstigt.

Eine weitere interessante Beobachtung zeigt sich bei Betrachtung der Ergebnisse der externen Validierung des Vorhersagemodells, das anhand der späten Zeitpunkte (24h-72h) berechnet wurde.

In den Gruppen 1 (Verletzungsschwere) und 2 (Transfusionsbedarf) ist eine geringfügige Abnahme der Spezifität zum Zeitpunkt 6h erkennbar. Die Modelle der Gruppen 3 (Multiorganversagen) und 4 (90-Tage-Überleben) verhalten sich im Vergleich dazu gegensätzlich. Interessanterweise steigen die Sensitivität und Spezifität gerade derjenigen Modelle, die Spätfolgen wie MOF oder negatives Langzeitoutcome vorhersagen sollen, an. Das Vorhersagemodell der Gruppe 3 erreicht seine höchste Sensitivität von 97,1% zum Zeitpunkt 6h. Diese Beobachtung spricht für einen pathophysiologischen Vorgang um den Zeitpunkt 6h nach Trauma, der eine Weichenfunktion für den weiteren klinischen Verlauf des Patienten ausübt. Damit können wir die Bedeutung dieses frühen Zeitfensters für die posttraumatische Immunreaktion belegen, die von anderen Autoren ebenfalls beobachtet wurde (8; 10; 22).

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse für die externe Validierung des Modells der drei frühen Zeitpunkte anhand der Zeitpunkte 24h, 48h und 72h zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme von Sensitivität und Spezifität im Laufe der Zeit. Eine mögliche Erklärung liegt in der Tatsache, dass 50% der verstorbenen Patienten zwischen 24 und 48 Stunden nach ihrer Aufnahme in die Klinik starben, die übrigen Verstorbenen erst mehrere Tage später. Dadurch standen für die bioinformatische

Klassifizierung der Patienten zu diesen späteren Zeitpunkten weniger Daten zur Verfügung, was die Genauigkeit der berechneten Vorhersagemodelle beeinträchtigt.

Zum anderen ist eine interindividuelle Variation des Proteinexpressionsmusters ab späteren Zeitpunkten zu diskutieren, die auch von äußeren Faktoren wie z.B. der Medikation oder wiederholten operativen Eingriffen abhängig sein kann und zu dieser verminderten Klassifizierbarkeit beiträgt, die sich im Vergleich mit der externen Validierung der Vorhersagemodelle zeigt, die aus den frühen Zeitpunkten 0h-12h errechnet wurden.

Gruppe 3 (Multiorganversagen) stellt in dieser Hinsicht einen Sonderfall dar. Auch hier zeigt sich ein kontinuierlicher Abfall der Sensitivität zwischen 24 und 72 Stunden nach Aufnahme. Allerdings geht dieser Abfall mit einem Anstieg der Spezifität ab dem Zeitpunkt 48h einher.

Auch hier kann eine interindividuelle Variabilität eventuell als Erklärungsansatz dienen. Der Verlauf und die Ausprägung eines eingetretenen Multiorganversagens sind keineswegs homogen (21). Eine Abnahme der anfangs hohen Sensitivität im klinischen Verlauf nach 24h könnte aus den unterschiedlichen Ausprägungen resultieren, in denen das MOF auftreten kann (31). Dafür spricht, dass das Vorhersagemodell auf den Daten der ersten 12 Stunden beruht. Eine heterogene Ausprägung des Multiorganversagens, die erst nach 12 Stunden und später manifest wird, könnte von diesem Modell somit nicht mit ausreichender Genauigkeit klassifiziert werden.

Daraus ergibt sich ein Grund für die steigende Spezifität, denn im direkten Vergleich zur inhomogenen Gruppe der Patienten, die ein Multiorganversagen in verschiedenen Ausprägungen entwickeln, wäre die Gruppe, die kein MOF aufweist, homogener und für das Vorhersagemodell eindeutiger klassifizierbar.

Generell zeigt sich, dass Vorhersagemodelle, die auf den Daten der späteren Zeitpunkte 24h, 48h und 72h beruhen, gut in der Lage sind, die Daten der ersten 12h nach dem Unfallereignis korrekt zu klassifizieren. Dies ist bei den Modellen aller vier Gruppen der Fall. Hinsichtlich einer möglichen klinischen Anwendung von MALDI-TOF MS zur frühzeitigen Identifizierung von Patienten, die besonders gefährdet sind, im späteren Verlauf ein Multiorganversagen zu entwickeln oder zu versterben, ist dieser frühe Zeitraum entscheidend. Innerhalb dieser frühen Phase bis 12 Stunden nach Trauma erreichen die Vorhersagemodelle eine Zuordnung der Patienten mit guter Spezifität und - im Falle von Gruppe 3 (Multiorganversagen) - hoher Sensitivität. Sie sind daher für die weitere klinische Erprobung im Rahmen zukünftiger Untersuchungen geeignet.

Prinzipiell ist für eine Prüfung der Vorhersagefähigkeit das Modell, das aus den Daten aller Patienten über die gesamte Zeitspanne von 72 Stunden nach Trauma gebildet wurde, wahrscheinlich besser geeignet. Aufgrund der begrenzten Patientenzahl ($n = 36$) in unserem Kollektiv wurden jedoch alle Proben für die Bildung dieses Modells benötigt, da kleinere Stichproben zu einer Qualitätsabnahme der Vorhersagemodelle führen. Dies hatte jedoch auch zur Folge, dass sich diese Modelle nicht mehr mit externen, dem Programm unbekanntem Daten validieren lassen, da alle verfügbaren Daten für die Berechnung des Vorhersagemodells herangezogen wurden. Dieses Modell ist jedoch weniger geeignet, in der Klinik relevante Aussagen zur Prognose zu erlauben, da nach 72h bereits wesentliche Mechanismen der Ganzkörperinflammation abgelaufen sind.

Wir entschieden uns daher für die externe Validierung der zeitabhängigen Vorhersagemodelle (jeweils gebildet aus den Zeitpunkten 0-12h bzw. 24-72h), denn hierfür stand jeweils ungefähr die Hälfte der Daten als externer, unbekannter Datensatz zur Verfügung.

Die Aussagekraft der zeitunabhängigen Vorhersagemodelle ist in zukünftigen Untersuchungen durch eine externe Validierung mit neu erhobenen Daten zu bestätigen.

5.6 Datenbankabgleich zur Identifizierung relevanter Proteine

Um diejenigen Proteine zu identifizieren, die den beschriebenen Proteinexpressionsprofilen zugrundeliegen, wurden die gemessenen m/z-Werte, an denen sich *Peaks* mit klassifizierenden Eigenschaften befinden, in das *TagIdent Tool* des *ExPASy Proteomics Servers* eingegeben. Die Datenbank liefert daraufhin alle bekannten Proteine, die in diesem Massenbereich zu finden sind. Daraus resultiert eine große Menge an möglichen Markerproteinen. Die Datenbankrecherche ergab ohne Abzug mehrfach genannter Proteine 989 Treffer.

Es gibt allerdings keine Möglichkeit, zu eruieren, ob ein *Peak* aus einem Protein derselben Masse besteht oder sich aus mehreren Proteinen zusammensetzt, die andere m/z-Werte haben (103). In letzterem Fall ist eine Ermittlung dieser Proteine mit einer Datenbankrecherche nicht möglich. Hinzu kommt, dass alle *Peaks* in dieser Auswertung eine Ausdehnung über einen gewissen m/z-Bereich aufweisen und alle Proteinkandidaten, deren Massen in diesem Bereich liegen, in Frage kommen.

5.6.1 Im Zusammenhang mit SIRS und MOF bekannte Inflammationsproteine

Von insgesamt 387 verschiedenen Proteinen, die wir identifizieren konnten, spielen 108 eine Rolle in entzündlichen Prozessen. Darunter finden sich Zytokine, wie CCL3, 4, 5, 7, 8, 13, 14, 15, 18, 19, 23 und CXCL10 [Für ihre jeweiligen Funktionen in der Immunantwort siehe (146)] sowie IL-8 (12). Diese Signalmoleküle, deren Bedeutung für Entzündungsgeschehen gut belegt ist, sind mögliche Marker in fast allen Gruppenvergleichen. Auch Proteine der Komplement- und Gerinnungskaskade wurden identifiziert.

Ein derartig gehäuftes Vorkommen von Entzündungsmediatoren und inflammatorischen Proteinen ist aufgrund der Fragestellung dieser Studie zu erwarten. Der tatsächlich gemessene hohe Anteil an der Gesamtheit der identifizierten Proteine spricht somit für die Validität unserer Messungen.

5.6.2 Für klinische Klassen spezifische Markerproteine

5.6.2.1 Gruppe „Verletzungsschwere“

5.6.2.1.1 Apelin-36

In der Gruppe der Patienten mit niedrigem ISS hatte ein *Peak* eine signifikant höhere Signalintensität, in dessen Massenbereich sich Apelin-36 befindet. Apelin wird unter anderem durch Gewebhypoxie induziert und hat einen regulierenden Einfluß auf Endothelzellproliferation und regenerative Angiogenese (48). Es konnte in Adipozyten, Magenschleimhaut, Kupfferschen Sternzellen und dem Gefäßendothel kleiner Arterien nachgewiesen werden. Die Gabe von Apelin wirkt blutdrucksenkend (128).

Die Assoziation eines potentiellen Markers mit Gewebischämie und –hypoxie wird von der Literatur gestützt (55). Es bleibt jedoch zu klären, weshalb Apelin gerade für niedrigen ISS charakteristisch war. Denkbar wäre eine vermehrte Expression in allen anderen Gruppen, wodurch nur die geringe, aber dennoch erhöhte Expression in dieser Gruppe von den Klassifikationsalgorithmen als relevant eingestuft wurde.

5.6.2.1.2 Heparanase 8kDa Subunit

Dieses in Neutrophilen-Granula exprimierte Enzym trennt Heparansulfat vom Proteoglycangerüst in der extrazellulären Matrix. Es wird mit der Extravasation immunkompetenter Zellen sowie mit Tumorinvasion und Metastasierung in Verbindung

gebracht (67; 136). Eine signifikant höhere Signalintensität dieses *Peaks* war in der Gruppe mit niedriger Verletzungsschwere zu verzeichnen.

Wie unter 5.6.2.1.1 angeführt, passt dieses Protein hinsichtlich seiner Funktion in aktuelle Konzepte zu Entstehung und Ablauf der posttraumatischen Ganzkörperinflammation [Reviews: (38; 55; 62; 81)]. Seine vermehrte Expression gerade bei Patienten mit niedrigem ISS bleibt jedoch zu klären.

5.6.2.1.3 Heat Shock Factor Binding Protein 1

Dieses Protein bindet aktivierten *Heat Shock Factor 1* und inhibiert dadurch die Transkription Hitzeschock-responsiver Gene (111). Patienten mit hohem ISS zeigten eine vermehrte Expression dieses Proteinpeaks.

Dies könnte Zeichen einer Dysregulation auf Genexpressionsebene sein, da die Inhibition der Hitzeschockantwort unter Stressbedingungen als abträglich zu werten ist.

5.6.2.2 Gruppe „Multiorganversagen“

5.6.2.2.1 Hecidin-25

Ein *Peak* bei m/z 2790, in dessen Massenbereich Hecidin-25 enthalten ist, war in der Patientengruppe mit manifestem MOF signifikant erhöht. Hecidin-25 ist ein in Hepatozyten produziertes Akutphaseprotein mit antifungalen und antibakteriellen Eigenschaften, dessen Expression durch IL-6 getriggert wird (89).

Eine Messung dieses Akutphaseproteins in der Diagnostik und Verlaufskontrolle polytraumatisierter Patienten ist unseres Wissens in der Literatur bisher nicht erwähnt worden. Ein möglicher Informationsgewinn hinsichtlich der Entwicklung eines Multiorganversagens ist nach unserer Ansicht zu prüfen.

5.6.2.2.2 *Lymphocyte Antigen G6*

Dieses auch Granulocyte Differentiation Antigen 1 genannte Oberflächenantigen ist ein Marker der myeloiden Zellreihe (52; 74). Erhöhte Intensität dieses *Peaks* ist spezifisch für Patienten ohne eingetretenes MOF.

Eine Freisetzung dieses Antigens im Rahmen von Zellzerfall und Apoptose ist denkbar. Inwieweit ein gesteigerter Zellumsatz der myeloiden Reihe bei Patienten ohne Multiorganversagen als charakteristisch zu werten ist, bleibt zu prüfen.

5.6.2.3 Gruppe „*Outcome*“

5.6.2.3.1 *CD59 Glycoprotein*

Mit dem Überleben eines Patienten assoziiert war die vermehrte Expression dieses *Peaks*. CD 59 ist ein membranständiges Glycoprotein, das protektiv gegen Membranschäden durch autologes Komplement wirkt (83). Die Expression dieses Proteins wird durch IL-4 und TNF- α hochreguliert und durch IL-1 β reduziert (85).

Wie bereits erwähnt, sind Zellschäden durch Komplementaktivierung im Verlauf der überschießenden Immunantwort in der Literatur einschlägig beschrieben worden [Übersichtsarbeiten: (55; 81)]. Eine verstärkte Expression protektiver Faktoren unter Überlebenden ist in diesem Zusammenhang schlüssig.

5.6.2.3.2 *Hypoxia-inducible Gene 2 Protein*

Auch dieses Protein korrelierte mit positivem *Outcome*. HIG2 ist Teil des Wnt/ β -Catenin-Pathways und beeinflusst die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten (40). Es kann durch Gewebhypoxie und Glucosedepriuation induziert werden (70).

5.6.2.3.3 *Vitronectin V10 Subunit*

Dieses Glycoprotein ist in Auf- und Abbauprozesse der extrazellulären Matrix involviert. Es kommt in allen Geweben sowie in Blut vor und wirkt auf die Bildung von Thromben sowie die Integrin-vermittelte Zelladhäsion und Extravasation von Immunzellen. Nachweislich beeinflusst es die Zellschädigung durch die Endstrecke der Komplementkaskade (114). Dieses Protein war in der Gruppe mit negativem *Outcome* erhöht exprimiert.

5.6.2.3.4 *Neutrophil Defensin (HNP-1)*

HNP-1 bildet stabile Komplexe mit α -2-Makroglobulin und spielt möglicherweise eine Rolle in der Regulation von Entzündungsprozessen. Es wird von Neutrophilen ausgeschüttet und wirkt stark chemotaktisch auf Monozyten (95; 129). Eine erhöhte Expression korrelierte mit negativem *Outcome*.

5.6.3 *Mehrfach gemessene Inflammationsproteine*

5.6.3.1 *Hemofiltrate Peptide 6478*

Das dem HF 6478 strukturverwandte HF 7665 ist ein Serinproteaseinhibitor, dessen genaue Funktion nicht abschließend geklärt ist. Eine antiinflammatorische und möglicherweise antimikrobielle Rolle auf Schleimhautepithelien wird diskutiert. HF 6478 und HF 7665 werden aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein abgespalten, eine ähnliche Funktion der beiden Peptide ist wahrscheinlich (4). Eine relevante Zunahme der Expression von HF 6478 zeigte sich sowohl in der Gruppe mit höherem ISS als auch der Gruppe der Massentransfusion. Es bleibt zu bedenken, dass diese Assoziation auch darauf beruhen kann, dass schwerer verletzte Patienten häufiger massentransfundiert werden.

5.6.3.2 Protein S100-A12

Dieses auch als *Calcitermin* oder *Neutrophil S100 Protein* bezeichnete Protein wird von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Es weist antifungale und antimikrobielle Aktivität auf (7; 109). Eine hohe Expression des S100-A12 beinhaltenden *Peaks* trat in den Gruppen ohne Massentransfusion sowie ohne später eingetretenes Multiorganversagen auf.

Eine positive immunmodulatorische Wirkung von S100-A12 ist daher denkbar.

5.6.3.3 Secretoglobin Family 1D Member 4

Mit einem hohen ISS sowie einem negativen *Outcome* korrelierte eine verstärkte Signalintensität dieses relevanten *Peaks* bei m/z 6882. Ein regulierender Einfluß dieses Proteins aus der Secretoglobin-Familie auf Chemotaxis, Zellmigration und Gewebeinvasion wird diskutiert (145). Wie unter Abschnitt 5.6.3.1 angeführt, ist eine Assoziation dieser beiden Gruppen möglicherweise auch dadurch gegeben, dass Patienten mit höherem ISS häufig ein negatives *Outcome* zeigen. Allerdings bleibt eine vermehrte Expression dieses Proteins bei negativem *Outcome* aussagekräftig, unabhängig von einem auch beobachteten Anstieg dieses *Peaks* in der Gruppe mit hohem ISS.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei allen o.g. Beispielen um Proteine, die in Entzündungsprozesse involviert sind oder deren Funktion in dieser Hinsicht diskutiert wird. Es ist möglich, dass anderen Proteinen, die wir identifizieren konnten, eine Rolle in der Immunreaktion nach Trauma zukommt, diese jedoch bislang nicht aufgedeckt wurde. Eine abschließende Identifizierung aller involvierten Proteine und ihrer Funktionen bleibt die Aufgabe weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Polytraumatisierte Patienten entwickeln in der initialen Phase nach Trauma eine generalisierte Immunreaktion (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS), die den weiteren klinischen Krankheitsverlauf dieser Patienten entscheidend beeinflusst. Bisherige Untersuchungsergebnisse deuten auf eine Dysbalance der pro- und antiinflammatorischen Immunmediatoren als Ursache hin, der genaue Entstehungsmechanismus ist jedoch nicht abschließend geklärt.

Das Serumproteom-*Profiling* mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) ist bereits auf anderen medizinischen Gebieten klinisch erprobt worden. Es bietet die Möglichkeit, krankheitsspezifische Veränderungen des Proteinexpressionsprofils im Serum polytraumatisierter Patienten zu ermitteln und dabei neue Kandidatenproteine zu identifizieren.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher,

- i) zu überprüfen, ob sich das Proteinexpressionsmuster im Serum polytraumatisierter Patienten im zeitlichen Verlauf der frühen posttraumatischen Phase verändert,
- ii) daraufhin zu untersuchen, ob sich spezifische Proteinexpressionsprofile nachweisen lassen, die mit klinischen Parametern wie der Verletzungsschwere, dem Transfusionsbedarf, dem Auftreten eines Multiorganversagens und dem endgültigen klinischen Verlauf im Sinne von Versterben oder Überleben des Patienten innerhalb von 90 Tagen nach Aufnahme korrelieren,
- iii) bioinformatische Vorhersagemodelle zu erstellen, die eine Zuordnung der Patienten zu verschiedenen Gruppen ermöglichen, die anhand o.g. klinischer

Parameter gebildet wurden. Anhand dieser Modelle die gemessenen Expressionsmuster und die in Punkt ii) nachgewiesenen Profile zu validieren, und

- iv) die Proteine zu identifizieren, aus denen sich die nachgewiesenen Proteinexpressionsprofile zusammensetzen, um mögliche bisher unbekannte Marker für die posttraumatische Ganzkörperinflammation aufzudecken.

36 polytraumatisierten Patienten (24 männlich, 12 weiblich) wurde zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik und 6, 12, 24, 48 und 72h nach Trauma Blut abgenommen und Serum isoliert. Die Proben wurden aufgereinigt, die enthaltenen Proteine isoliert, ihr Massenspektrum aufgezeichnet und mit Hilfe eines bioinformatischen Auswertungsprogrammes charakterisiert.

Zunächst wurden die Massenspektren aller Patienten, unabhängig von ihrem weiteren klinischen Verlauf, gemeinsam im zeitlichen Verlauf untersucht. Die Unterschiede in den erkannten Expressionsprofilen ließen in über 80% der Fälle eine korrekte Zuordnung zu einem der Zeitpunkte zu. Eine Aufteilung des Zeitraumes in einen frühen Abschnitt (0-12h) und einen späten Abschnitt (24-72h) führte zu einer Klassifizierungsrate von über 95%.

Um Teilfragestellung ii) zu beantworten, wurden die Patienten anhand klinischer Kriterien in verschiedene Gruppen eingeteilt. Erstes Kriterium war die Quantifizierung der Verletzungsschwere bei Aufnahme mittels *Injury Severity Score* (ISS). Es ließ sich ein Vorhersagemodell errechnen, das die Unterscheidung zwischen schwerer ($ISS \geq 40$) und weniger schwer ($ISS < 40$) verletzten Patienten in 83% der Fälle ermöglichte.

Eine entsprechende Analyse wurde auch für das Kriterium „Massentransfusion“ durchgeführt. Patienten, die innerhalb der ersten 24h nach Aufnahme $10 \geq$ Einheiten

Erythrozytenkonzentrat erhielten, und solche, bei denen dies nicht der Fall war, ließen sich in 95% der Fälle korrekt zuordnen.

Ein weiteres Kriterium war das Vorliegen eines Multiorganversagens (*multiple organ failure*, MOF), definiert als $\text{MOF-Score} \geq 4$ Punkte. Die Analyse ermöglichte die Unterscheidung von Patienten mit und ohne MOF in über 80% der Fälle.

Es ließ sich eine korrekte Zuordnung von 95% der Patienten erreichen, die gemäß dem letzten Unterscheidungskriterium in eine Gruppe „Verstorben“ und eine Gruppe „Überlebt“ eingeteilt worden waren.

Um diese Ergebnisse mit externen Daten zu validieren, die nicht bereits für die Berechnung der jeweiligen Klassifikationsmodelle herangezogen worden waren, nahmen wir eine weitere Teilung der bestehenden Gruppen in eine frühe (von 0 bis 12 Stunden) und eine späte Untergruppe (von 24 bis 72h) vor. Für diese Untergruppen wurden neue Klassifikationsmodelle berechnet. Die Vorhersagemodelle für die frühen Untergruppen wurden daraufhin mit den Daten der späten Untergruppen extern validiert und vice versa. Ziel war es, die Fragestellung iii) zu beantworten, also zu prüfen, ob sich auch unbekannte Daten anhand ihrer Proteinexpressionsmuster korrekt klassifizieren lassen.

In den frühen Untergruppen ist dies nur in der Gruppe „Multiorganversagen“ mit anfangs hoher Sensitivität, ab 48h mit hoher Spezifität und ausreichender Sensitivität gelungen. In der Gruppe „Outcome“ zeigt sich nur zum Zeitpunkt 24h eine hohe Spezifität und ausreichende Sensitivität.

In den späten Untergruppen lassen sich in der Gruppe „Multiorganversagen“ eine hohe Sensitivität und in allen anderen Gruppen eine hohe Spezifität feststellen.

Für die Beantwortung der Teilfragestellung iv) wurden die Massenbereiche aller *Peaks*, die klassifizierende Eigenschaften hatten, mit dem *TagIdent Tool* des *ExPaSy*-

Proteomics Servers ausgewertet. Unter den 387 so identifizierten Kandidaten spielen 96 Proteine eine Rolle in Inflammations- und Gerinnungsprozessen.

Die vorliegende Arbeit kann somit erstmals zeigen, dass es zu einer Veränderung der Serumproteinexpression polytraumatisierter Patienten in der initialen posttraumatischen Phase kommt. Es lassen sich darüber hinaus spezifische Expressionsmuster nachweisen, die mit der Verletzungsschwere und dem weiteren klinischen Verlauf korrelierbar sind. Eine prospektive Klassifizierung unbekannter Daten anhand dieser Muster ist möglich, allerdings bisher nicht mit ausreichender Sensitivität und Spezifität für die klinische Anwendung.

Diese Ergebnisse lassen einige Ausblicke zu. Die kontinuierliche Verbesserung der Vorhersagemodelle mit den Messdaten weiterer Patienten ist möglich und lässt Modelle mit höherer Genauigkeit berechnen, die in der klinischen Diagnostik einsetzbar sein könnten. Eine abschließende Identifizierung der Proteine und Proteinfragmente, aus denen die spezifischen Muster bestehen, ließe nicht nur wichtige Aufschlüsse über die humoralen Mechanismen der posttraumatischen Ganzkörperinflammation zu. Zusätzlich ist eine unmittelbare diagnostische Nutzung dieser Proteine mit bereits gut etablierten labormedizinischen Methoden wie dem ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) zu erwägen.

7. Beantwortung der Fragestellung

Die vorliegende Arbeit konnte die Fragestellung somit wie folgt beantworten:

- i) Die Proteinexpression im Serum polytraumatisierter Patienten zeigt in der initialen posttraumatischen Phase Veränderungen im zeitlichen Verlauf.
- ii) Gruppen, die je nach klinischem Verlauf der Patienten gebildet wurden, weisen gemeinsame spezifische Expressionsprofile auf. Diese Profile lassen sich sowohl

unter Berücksichtigung des Zeitverlaufes als auch unabhängig davon nachweisen.

- iii) Die anhand dieser spezifischen Expressionsmuster gebildeten Vorhersagemodelle sind in der Lage, unbekannte Daten korrekt zu klassifizieren.
- iv) Eine Identifizierung mittels Datenbankabgleich liefert einen erwartungsgemäß hohen Anteil an Inflammationsproteinen an der Gesamtheit der Proteine. Dies spricht für die Validität der Untersuchung.

Des Weiteren konnten Markerkandidaten identifiziert werden, die in der aktuellen Literatur zwar mit einem Inflammationsgeschehen assoziiert sind, deren Rolle im Rahmen von SIRS und MOF jedoch bisher nicht beschrieben wurde.

8. Anhang

8.1 Aufstellung der identifizierten Proteine

40S ribosomal protein S21
40S ribosomal protein S28
40S ribosomal protein S30
6.8 kDa mitochondrial proteolipid
60S ribosomal protein L41
Adipose most abundant gene transcript 2 protein
Amyloid protein A
Apelin-36 (By similarity)
Apolipoprotein A-II
Apolipoprotein A-II(1-76)
Apolipoprotein C-I
Apolipoprotein C-II
Apolipoprotein C-III
ATP synthase subunit e, mitochondrial
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial
Atrial natriuretic factor

B melanoma antigen 4
Basic peptide P-F
Basic proline-rich peptide IB-8c
Beta-catenin-interacting protein 1
Betacellulin
Beta-defensin 1
Beta-defensin 105
Beta-defensin 106
Beta-defensin 108A
Beta-defensin 108B-like
Beta-defensin 118
Beta-defensin 121
Beta-defensin 127
Beta-defensin 133
Beta-thromboglobulin
Big endothelin-1
Big SAAS (By similarity)
BNP(1-28)
BNP(1-29)
BNP(3-32)

BNP(4-30)
BNP(5-29)
BNP(5-31)
BNP(5-32)
C17orf89
C3a anaphylatoxin
C4a anaphylatoxin
C83
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2
CAMPATH-1 antigen
cAMP-dependent protein kinase inhibitor alpha
Cathepsin H light chain
CATR tumorigenic conversion 1 protein
CCB peptide
CCL 13
CCL 13, short chain
CCL 14
CCL 18
CCL 19
CCL 2
CCL 3
CCL 4
CCL 4-like
CCL 5
CCL 7
CCL 8
CCL14 (9-74)
CCL15 (22-92)
CCL15 (29-92)
CCL18 (1-68)
CCL22 (5-69)
CCL23 (19-99)
CCL23 (22-99)
CCL3L1
CD59 glycoprotein
CDC42 small effector protein 1
Cholecystokinin-25 (By similarity)
Cholecystokinin-58
Chromosome 1-amplified sequence 3
Chymotrypsin B chain A

Chymotrypsin B2 chain A
Coiled-coil domain-containing protein 23
Colipase-like protein C6orf126
Complement C4-B
Connective tissue-activating peptide III
Connective tissue-activating peptide III (1-81)
Cortexin-2
Cortexin-3
CT-BRI3
CXCL10
CXCL10 (1-73)
Cysteine-rich C-terminal protein 1
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial
Cytochrome c oxidase copper chaperone
Cytochrome c oxidase polypeptide 7B2, mitochondrial
Cytochrome c oxidase subunit 6C
Cytochrome c oxidase subunit 7A3, mitochondrial
Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial
Dermcidin
Dolichol phosphate-mannose biosynthesis regulatory protein
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 4
Down syndrome critical region protein 10
DPH3 homolog
EA-92
Early placenta insulin-like peptide A chain
Embryonic stem cell-related gene protein
ENA-78 (8-78)
ENA-78 (9-78)
Endothelin-2
Epidermal growth factor
Exocrine differentiation and proliferation factor-like protein

Fibrinopeptide B
FXVD domain-containing ion transport regulator 6
FXVD domain-containing ion transport regulator 7
Galanin message-associated peptide
Galanin-like peptide
Gamma-secretase C-terminal fragment 50 (By similarity)
Gamma-secretase C-terminal fragment 57
GAWK peptide
Ghrelin-27
Glucagon-like peptide 1(7-37)
Glycophorin-B
Glycophorin-E
GnRH-associated peptide 2
GR-44
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-10
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-11
Guanylate cyclase C-activating peptide 2
Guanylin
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3
Heat shock factor-binding protein 1
Hemofiltrate peptide HF6478
Heparanase 8 kDa subunit
Heparin-binding EGF-like growth factor
Hepatocyte growth factor activator short chain
Hepcidin-25
HERV-K_1q22 provirus Np9 protein.
HERV-K_22q11.21 provirus Np9 protein
HERV-K_3q12.3 provirus Np9 protein
HERV-K_5q33.3 provirus Np9 protein
High affinity IgE-receptor subunit gamma
Histatin-1

Histatin-2
Histatin-3 1/13
Histatin-3 1/24
Histatin-3 1/25
Histatin-3 12/25
Histatin-3 13/24
Histatin-3 5/13
Homeodomain-only protein
Hypoxia-inducible gene 2 protein
IL-8
IL-8(5-77)
IL-8(8-77)
IL-8a
Immediate early response 3-interacting protein 1
Insulin-like 3 A chain
Insulin-like peptide INSL6 A chain (Potential)
Insulin-like peptide INSL6 B chain (Potential)
Intermedin-short (Potential)
Islet amyloid polypeptide
Kaliocin-1
Keratin-associated protein 12-1
Keratin-associated protein 19-3
Keratin-associated protein 19-4
Keratin-associated protein 19-7
Keratin-associated protein 19-8
Keratin-associated protein 20-2
Keratin-associated protein 21-2
Keratin-associated protein 22-1
Keratin-associated protein 23-1
Keratin-associated protein 6-2
Keratin-associated protein 7-1
Keratinocyte differentiation-associated protein
Kidney-associated antigen 1
Kisspeptin-14
Kunitz-type protease inhibitor 4
Late cornified envelope protein 3A
Late cornified envelope protein 3C
Lens epithelial cell protein LEP503
Leucine zipper protein 6

Leukemia-associated protein 1
Leukemia-associated protein 2
Leumorphin
Ly6/PLAUR domain-containing protein 2
Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6c
Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6d
Melanotropin gamma
Metallothionein-3
Metallothionein-4
Mitochondrial import receptor subunit TOM7 homolog
Molybdenum cofactor synthesis protein 2 small subunit
MORN repeat-containing protein 2
Mucin-like protein 1
Musculoskeletal embryonic nuclear protein 1
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2, mitochondrial
NEDD8
Neuregulin-4
Neurokinin-B
Neuromedin-U-25
Neuronatin
Neuropeptide 2 (Probable)
Neuropeptide B-29
Neuropeptide G-E (Potential)
Neuropeptide NPSF (Potential)
Neuropeptide Y
Neuropeptide-glutamic acid-isoleucine
Neurotensin
Neutrophil defensin 1
Neutrophil-activating peptide 2 (1-63)
Neutrophil-activating peptide 2 (74)

Non-histone chromosomal protein HMG-17
Obestatin (By similarity)
Orexin-B
Osteostatin
Oxyntomodulin (By similarity)
P3(42)
Pancreatic hormone
Pancreatic icosapeptide
Pancreatic secretory trypsin inhibitor
PATE-like protein DJ
P-beta
Peptide P-D
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38
Placenta-specific protein 9
Plasminogen Activation peptide.
Plasminogen-related protein A
Plasminogen-related protein B
Platelet factor 4
Platelet factor 4 variant
Platelet factor 4 variant (4-74)
Platelet factor 4 variant (5-74)
Probable protein BRICK1
Prolactin-releasing peptide PrRP20
Pro-MCH-like protein 1
Prostate stem cell antigen
Prostate-specific and androgen-regulated protein 1
Protein ADMP
Protein CASC2, isoforms 1/2
Protein FAM135A
Protein FAM138A/B/C/F
Protein FAM138D
Protein FAM24A
Protein FAM25
Protein FAM27L
Protein FAM41C-like
Protein p8 MTCP-1
Protein transport protein Sec61 subunit gamma
PTHrP[1-36]=Parathyroid hormone-related protein
Pulmonary surfactant-associated protein

B
Purkinje cell protein 4
Putative BMS1-like protein
Putative CNGA1-overlapping antisense gene protein
Putative cystatin-13
Putative DAP-2 like protein C8orf68
Putative double homeobox protein 2
Putative gastric cancer-related gene 224 protein
Putative makorin-5
Putative metallothionein MT1P3
Putative phosphoserine phosphatase-like protein
Putative protein FAM92A3
Putative protein RNF216-like
Putative psoriasis susceptibility 1 candidate gene 3 protein
Putative Rho GTPase-activating protein 27-like protein
Putative serine protease inhibitor Kazal-type 5-like 2
Putative testis-specific prion protein
Putative transcript Y 1 protein
Putative transcript Y 10 protein
Putative transcript Y 13 protein
Putative transcript Y 14 protein
Putative transcript Y 8 protein
Putative transmembrane protein ENSP00000369095
Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2-like protein
Putative uncharacterized protein C10orf136
Putative uncharacterized protein C14orf33
Putative uncharacterized protein C17orf91
Putative uncharacterized protein C1orf134
Putative uncharacterized protein C20orf187
Putative uncharacterized protein C20orf51
Putative uncharacterized protein C21orf49
Putative uncharacterized protein

C2orf12
Putative uncharacterized protein C8orf51
Putative uncharacterized protein C9orf56
Putative uncharacterized protein CS0DJ013YG01
Putative uncharacterized protein DKFZp434I1916
Putative uncharacterized protein ENSP00000253375
Putative uncharacterized protein ENSP00000362624
Putative uncharacterized protein HCG2042090
Putative uncharacterized protein KIAA1654
Putative uncharacterized protein LOC401522
Putative uncharacterized protein LOC644613
Putative uncharacterized protein LOC645739
Putative uncharacterized protein MGC15705
Putative uncharacterized protein PRO0255
Putative uncharacterized protein PRO0461
Putative uncharacterized protein PRO1617
Putative uncharacterized protein PRO2289
Putative uncharacterized protein PRO2829
Putative uncharacterized protein SNHG12
Putative uncharacterized protein UNQ5830/PRO19650/PRO19816
Putative UPF0601 protein FAM165A
QRF-amide
Reactive oxygen species modulator 1
Relaxin A chain (By similarity).
Relaxin B chain (By similarity)
Relaxin-3 B chain (By similarity)
Rimorphin

S100-A12
S100-G
Salusin-alpha
Saposin A-like (By similarity)
Saposin C-like (By similarity)
Saposin-A
Saposin-B-Val
Saposin-B-Val-like
Saposin-C
Scrapie-responsive protein 1
Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1
Secretin
Secretoglobin family 1D member 4
Secretoglobin-like protein LOC284402
Selenoprotein W
Serine protease inhibitor Kazal-type 2
Serine protease inhibitor Kazal-type 4
Serine protease inhibitor Kazal-type 8
Serine protease inhibitor Kazal-type 9
Small EDRK-rich factor 2
Small muscular protein
Small nuclear ribonucleoprotein G-like protein
Small proline-rich protein 2E
Small proline-rich protein 2F
Small proline-rich protein 4
Somatoliberin
Sperm histone HP4
Sperm protamine-P1
Sperm-associated antigen 11B
Spermatid nuclear transition protein 1
Spexin
SS18-like protein 2
STAG3-like protein
Stimulated by retinoic acid gene 13 protein homolog
Substance P
Syntenkephalin
TC-2
Thrombin light chain
TP53-regulated inhibitor of apoptosis 1
Transmembrane protein 167B
Transmembrane protein 216
Trefoil factor 1

Trypstatin (By similarity)
Tryptase gamma light chain
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6
Ubiquitin
Ubiquitin-fold modifier 1
Ubiquitin-like protein 5
Ubiquitin-like protein FUBI
Uncharacterized protein C11orf83
Uncharacterized protein C12orf62
Uncharacterized protein C16orf74
Uncharacterized protein C17orf67
Uncharacterized protein C17orf89
Uncharacterized protein C21orf122
Uncharacterized protein C21orf74
Uncharacterized protein C21orf99
Uncharacterized protein C21orf99-like
Uncharacterized protein C2orf66
Uncharacterized protein C9orf27
Uncharacterized protein LOC388588
UPF0197 transmembrane protein C11orf10
UPF0327 protein C1orf151
UPF0466 protein C22orf32, mitochondrial
UPF0542 protein C5orf43
UPF0601 protein FAM165B
UPF0608 protein C19orf42
UPF0640 protein
UPF0729 protein C18orf32
Urocortin
Urocortin-2
Urocortin-3
Urokinase-type plasminogen activator short chain A
Vasostatin-1
Very putative protein from MEG3 locus
Vitronectin V10 subunit
V-type proton ATPase subunit e 1
WAP four-disulfide core domain protein 12

8.2 Übersicht der identifizierten Inflammationsproteine

(Unter 5.6 diskutierte Proteine hervorgehoben)

Amyloid protein A	CCL 5
Apelin-36 (By Similarity)	CCL 7
	CCL 8
Beta-defensin 1	CCL3L1
Beta-defensin 105	CCL4L1
Beta-defensin 106	CD59 glycoprotein
Beta-defensin 108A	CDC42 small effector protein 2
Beta-defensin 108B-like	Complement C4-B
Beta-defensin 113	Connective tissue-activating peptide III
Beta-defensin 118	Connective tissue-activating peptide III(1-81)
Beta-defensin 124	CXCL 10
Beta-defensin 126	CXCL 10 (1-73)
Beta-defensin 127	CXCL 2
Beta-defensin 128	
Beta-defensin 131	Dermcidin
Beta-defensin 133	
Beta-thromboglobulin	Early placenta insulin-like peptide A chain
Big endothelin-1	ENA-78 (8-78)
	ENA-78 (9-78)
C3a anaphylatoxin	Endothelin-2
C4a anaphylatoxin	
CCL 13, medium chain	Fibrinopeptide B
CCL 13, short chain	Follicular dendritic cell secreted peptide
CCL 14	
CCL 14 (9-74)	Galanin-like peptide
CCL 15 (29-92)	Guanylate cyclase C-activating peptide 2.
CCL 17	
CCL 18	Heat shock factor-binding protein 1
CCL 18 (1-68)	Hemofiltrate peptide HF6478
CCL 19	Hemofiltrate peptide HF7665
CCL 2	Heparanase 8 kDa subunit
CCL 20 (2-70)	Heparin-binding EGF-like growth factor
CCL 22	
CCL 22 (3-69)	
CCL 22 (5-69)	
CCL 23 (19-99)	
CCL 23 (22-99)	
CCL 3	
CCL 4	
CCL 4 (3-69)	

Hepcidin-25
High affinity IgE-receptor subunit gamma
HP 1-56
Hypoxia-inducible gene 2 Protein
IL-8
IL-8(5-77)
IL-8(8-77)
IL-8(9-77)
IL-8a
Kaliocin-1
LD78-beta (3-70)
Leukemia-associated protein 1
Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6c
Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6d
Minor histocompatibility protein HB-1
Musculoskeletal embryonic nuclear protein 1
Neuropeptide-glutamic acid-isoleucine
Neutrophil defensin 1
Neutrophil-activating peptide 2
Neutrophil-activating peptide 2 (1-63)
Neutrophil-activating peptide 2 (74)
Plasminogen Activation peptide
Plasminogen-related protein B
Platelet factor 4
Platelet factor 4 variant
Platelet factor 4 variant (4-74)
Platelet factor 4 variant (5-74)
S100 A-12
Salusin-alpha

Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1
Secretoglobin family 1D member 4
Secretoglobin family 3A member 1
Secretoglobin family 3A member 2
Small muscular protein
Small-inducible cytokine B6, N-processed variant 1
Small-inducible cytokine B6, N-processed variant 2
TC-2
Thrombin light chain
Urocortin-2
Urocortin-3
Urokinase-type plasminogen activator short chain A
Vitronectin V10 subunit
WAP four-disulfide core domain protein 12

8.3 Patientendaten

Pat.	♂/♀	†	Verletzungsmuster	ISS	MOF	EK	FFP
1	m	nein	Fraktur HWK 2, 6, 7 und BWK 1, Lungenkontusion beidseits, "Open-Book"- Beckenfraktur, Amputation obere Extremität rechts, Radiusfraktur links, Tibiafraktur und Exartikulation des Knies	48	ja	27	29
2	m	nein	Schweres SHT, Schädelbasisfraktur, Fraktur des Proc. spinosus HWK 7, Fraktur der Mandibula und Maxilla, Lungenkontusion beidseits, Contusio Cordis, Fraktur Costae 1, 7, 8, Leberruptur	57	nein	17	19
3	m	nein	Lungenkontusion beidseits, Fraktur Costa 5, Contusio Cordis, Kompressionsfraktur LWK 2, Fraktur LWK 3 und 4, retroperitoneale Blutung, Nieren- und Milzkontusion, Frakturen der Tibia, des Acetabulum und Sacrum	34	ja	24	60
4	m	ja	Leichtes SHT, Lungenkontusion beidseits, subtotale Amputation untere Extremität	33	ja	25	22
5	m	nein	Intrazerebrale Blutung beidseits, Subarachnoidalblutung, subdurales Hämatom, Nasenbeinfraktur, Rippenserienfraktur, Lungenkontusion	42	nein	0	4
6	m	nein	Fraktur HWK 1 und 2, mehrfache Rippenfrakturen beidseits mit Hämatothorax, Lungenkontusion, Leberruptur, Fraktur des Proc. transversus LWK 2, Scapulafraktur beidseits, Fraktur der Ulna, des Beckens und der Tibia, Vorfußamputation links	29	ja	6	9

Pat.	♂/♀	†	Verletzungsmuster	ISS	MOF	EK	FFP
7	w	nein	HWK 7 -Fraktur, Fraktur Procc. transversi LWK 2-5, Rippenserienfraktur und Hämato-pneumothorax, Trümmerfraktur des Os sacrum, mehrfache Frakturen der unteren Extremität links	36	nein	8	5
8	m	ja	Fraktur Os frontale, Schädelbasisfraktur, bilaterale intrazerebrale Blutung, multiple Frakturen des Gesichtsschädels, mehrere Rippenfrakturen beidseits, Hämato-pneumothorax, multiple Frakturen des Beckenrings	59	ja	11	37
9	w	nein	Lungenkontusion beidseits, Pneumothorax, Perikardtamponade, Milzruptur, Orbita- und Nasenbeinfraktur, Fraktur BWK 5	29	ja	18	28
10	m	nein	Epidurales Hämatom, Fraktur des Os temporale und parietale, Fraktur der Procc. transversi HWK 4-7, LeFort II rechts, LeFort III links, Lungenkontusion beidseits, Frakturen Costae 2 und 3, Pneumothorax, Acetabulum-, Clavicula- und Radiusfraktur	54	ja	8	9
11	w	nein	Fraktur und Dislokation BWK 11 mit komplettem Querschnittssyndrom, multiple Rippenfrakturen beidseits, Pneumothorax, Fraktur LWK 2, retro-peritoneale Blutung	34	ja	9	14
12	w	nein	Lungenkontusion rechts, LWK 3 - Fraktur, multiple Beckenringfrakturen, Femur-fraktur links, dislozierte Trimalleolarfraktur	22	ja	7	16

Pat.	♂/♀	†	Verletzungsmuster	ISS	MOF	EK	FFP
13	m	nein	Leichtes SHT, Rippenserienfraktur C 2-5 links, Lungenkontusion beidseits, Hämato-pneumothorax, Fraktur Os ilium, ischiadicum und Os pubis	24	nein	6	2
14	w	nein	Offene Kalottenfraktur, Subarachnoidalblutung, Mittelgesichtsfrakturen, Fraktur BWK 12 und LWK 1, Schenkelhalsfraktur, Femurschaftfraktur, Patellafraktur	27	ja	16	14
15	m	nein	Subarachnoidalblutung, Rippenfraktur C 3, Lungenkontusion beidseits, Skapulafraktur, offene Fibulafraktur	29	nein	-	2
16	m	nein	Rippenserienfraktur C 6-9 links, Lungenkontusion links, Mesenterialwurzelnriß mit Devaskularisation des Ileum, Humerusfraktur links, offene Tibiafraktur links	34	ja	13	9
17	m	nein	Kalottenfraktur, epidurales Hämatom, Subarachnoidalblutung, Rippenserienfraktur C 3-5 rechts, Lungenkontusion rechts, Fraktur LWK 1 und LWK 4, Skapulafraktur rechts	29	k.A.	9	k.A.
18	m	nein	Schweres offenes SHT, Lungenkontusion beidseits, Rippenserienfraktur beidseits, Pneumothorax, Halswirbelkörperfrakturen mit inkomplettem Querschnittssyndrom, Amputation rechte obere Extremität, offene Femurfraktur	57	ja	17	20

Pat.	♂/♀	†	Verletzungsmuster	ISS	MOF	EK	FFP
19	w	nein	Schädelbasisfraktur, epidurales Hämatom, beidseitige Subarachnoidalblutung, dislozierte HWK-Fraktur mit Kontusion des Rückenmarks, Rippenserienfraktur links, Pneumothorax, Myokardkontusion, Pankreaskontusion, Milzruptur, Frakturen des Ober- und Unterarms links, Os pubis- und Acetabulumfraktur	50	ja	9	20
20	w	ja	Schweres SHT, Subarachnoidalblutung, subdurales Hämatom, generalisiertes Hirnödem, Hämatopneumothorax, dist. Femurfrakturen beidseits	43	ja	15	18
21	m	ja	Rippenserienfraktur, Hämatopneumothorax, Lungenkontusion, Femurfraktur, subtotale Amputation rechts untere Extremität	24	ja	33	35
22	m	ja	Okklusion A.cerebri post., Mittelgesichtsfraktur, Einriß d. Mesenteriums, Aortendissektion, Leberruptur, Ruptur d. Sigmas, Tibia- und Femurfraktur rechts	34	ja	58	85
23	m	nein	"Open-Book"-Beckenfraktur, Milzruptur, Ruptur des Mesenteriums, der Urethra, der V. iliaca, Femurfraktur, Rippenfraktur, Luxation des Radius	42	ja	44	42
24	m	nein	Frakturen Os pubis und Os ischii, Fraktur distale Tibia und OSG, Fraktur HWK 7 Proc. transversus und LWK 1,2, 5 sowie Massa lateralis rechts	29	nein	2	2
25	m	nein	Kalottenfraktur und LeFort II, Rippenserienfraktur C1-12 links, Lungenkontusion beidseits, Hämatopneumothorax, BWK 1 - Fraktur, Ruptur A.brachialis, dislozierte Ellenbogentrümmerfraktur	34	ja	24	23

Pat.	♂/♀	†	Verletzungsmuster	ISS	MOF	EK	FFP
26	m	nein	Ruptur Aorta thoracica, Nieren- und Milzkontusion, "Open-Book"-Beckenfraktur, Tibiafraktur, Radiusfraktur, Fraktur Procc. transversi LWK 4, 5	54	ja	8	10
27	m	nein	Rippenserienfraktur, Pneumothorax, Leber-, Milz- und Nierenkapselruptur, Humerusschaft- und Claviculafraktur	41	ja	5	5
28	m	nein	Schädelbasisfraktur m. Trommelfelleinriß, Kalottenfraktur, Rippenserienfraktur, Pneumothorax, Lungenkontusion beidseits, Fraktur d. Procc. transversi BWK 8-10, Radiusfraktur	29	nein	-	-
29	w	nein	Kalottenfraktur, intrazerebrale Blutung, beidseitige multiple Rippenfrakturen, Hämato-pneumothorax, beidseitige Lungenkontusionen, Milzhämatom	36	nein	3	2
30	m	nein	Rippenfraktur und beidseitige Lungenkontusion, Milzruptur, Mesenterialwurzel-ruptur, Kontusion d. Jejunum, Femurschaftfraktur	27	ja	9	12
31	w	nein	Bilaterales subdurales Hämatom, intrazerebrale Blutung, Nasenbeinfraktur, Rippenserienfraktur, Pneumothorax und Lungenkontusion links, Milzruptur, multiple Frakturen des Beckens, Humerusfraktur	66	ja	6	10
32	w	ja	Subdurales Hämatom, Subarachnoidalblutung, intrazerebrale Blutung, komplexe Impressionsfraktur des Gesichtsschädels, Acetabulumfraktur, Tibiafraktur links	75	ja	5	0

Pat.	♂/♀	†	Verletzungsmuster	ISS	MOF	EK	FFP
33	w	ja	bilaterale subdurale Blutung, Axisfraktur, Lungenkontusion rechts, Zwerchfellruptur, Nierenruptur mit Beteiligung der Gefäße, Leberruptur, Milzruptur, mehrfache Beckenfraktur,	50	ja	32	35
34	w	ja	Beckenfraktur mit retroperitonealer Blutung, Femurschaftfraktur, extensive Skalpierungsverletzung	20	ja	28	-
35	m	ja	Subdurales Hämatom, schweres Hirnödem, Axisfraktur, LeFort I, multiple Rippenfrakturen beidseits, Pneumothorax, Lungenkontusion, Leberruptur, beidseitige Fraktur der Skapula	57	k.A.	-	4
36	m	ja	Schweres SHT mit subduraler und subarachnoidaler Blutung, LeFort II, Rippenserienfraktur, Pneumothorax und Lungenkontusion rechts, Leberruptur, Milzruptur, multiple Frakturen der oberen und unteren Extremität mit subtotaler Amputation der unteren Extremität links	57	ja	12	19

Tabelle 4: Übersicht über das Patientenkollektiv dieser Studie:

Pat.: Patient Nr. (Nummerierung zufällig)

♂/♀: Geschlecht des Patienten

†: Patient verstorben

Verletzungsmuster: bei Aufnahme durch Schockraumdiagnostik erhoben

ISS: *Injury Severity Score* des Patienten, in Punkten

MOF: *Multi Organ Failure Score* des Patienten, in Punkten

EK: Anzahl Erythrozytenkonzentrate, die der Patient innerhalb der initialen posttraumatischen Phase von 72 Stunden erhielt

9. Literatur

- 1 Adam, B. L.; Qu, Y.; Davis, J. W.; Ward, M. D.; Clements, M. A. et al.: Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men, *Cancer Res* 2002, 62(13): 3609–3614
- 2 Aebersold, R.; Mann, M.: Mass spectrometry-based proteomics, *Nature* 2003, 422(6928): 198–207
- 3 Agnese, D. M.; Calvano, J. E.; Hahm, S. J.; Calvano, S. E.; Lowry, S. F.: Insulin-like growth factor binding protein-3 is upregulated in LPS-treated THP-1 cells, *Surg Infect (Larchmt)* 2002, 3(2): 119-125
- 4 Ahmed, A.; Kandola, P.; Ziada, G.; Parenteau, N.: Purification and partial amino acid sequence of proteins from human epidermal keratinocyte conditioned medium, *J Protein Chem* 2001, 20(4): 273–278
- 5 Aldred, S.; Grant, M. M.; Griffiths, H. R.: The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research, *Clin Biochem* 2004, 37(11): 943–952
- 6 Alpantaki, K.; Tsiridis, E.; Pape, H. C.; Giannoudis, P. V.: Application of clinical proteomics in diagnosis and management of trauma patients, *Injury* 2007, 38(3): 263–271
- 7 Cole, A.M.; Kim, Y. H.; Tahk, S.; Hong, T.; Weis, P. et al.: Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions, *FEBS Letters* 2001, 504(1-2): 5–10
- 8 Anderson, B. O.; Harken, A. H.: Multiple organ failure: inflammatory priming and activation sequences promote autologous tissue injury, *J Trauma* 1991, 30(12 Suppl.): 44-49
- 9 Anderson, N. L.; Anderson, N. G.: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects, *Mol Cell Proteomics* 2002, 1(11): 845–867
- 10 Angele, M. K.; Faist, E.: Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection, *Crit Care* 2002, 6(4): 298–305
- 11 Ayala, A.; Lehman, D. L.; Herdon, C. D.; Chaudry, I. H.: Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release, *Arch Surg* 1994, 129(11): 1172–1178
- 12 Baggiolini, M.; Loetscher, P.; Moser, B.: Interleukin-8 and the chemokine family, *Int J Immunopharmacol* 1995, 17(2): 103–108
- 13 Baker, C. C.; Oppenheimer, L.; Stephens, B.; Lewis, F. R.; Trunkey, D. D.: Epidemiology of trauma deaths, *Am J Surg* 1980, 140(1): 144–150
- 14 Baker, S. P.; O'Neill, B.: The injury severity score: an update, *J Trauma* 1977, 16(11): 882–885
- 15 Baker, S. P.; O'Neill, B.; Haddon, W.; Long, W. B.: The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care, *J Trauma* 1974, 14(3): 187–196

- 16 Banks R.E.; Dunn M.J.; Hochstrasser D.F.; Sanchez J.C.; Blackstock W. et al.: Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities, *Lancet* 2000, 356(9243): 1749–1756
- 17 Bardenheuer, M.; Obertacke, U.; Waydhas, C.; Nast Kolb, D.: Epidemiologie des Schwerverletzten. Eine prospektive Erfassung der präklinischen und klinischen Versorgung. AG Polytrauma der DGU, *Unfallchirurg* 2000, 103(5): 355–363
- 18 Baue, A. E.; Durham, R.; Faist, E.: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle?, *Shock* 1998, 10(2): 79–89
- 19 Baumann, S.; Ceglarek, U.; Fiedler, G. M.; Lembcke, J.; Leichtle, A.; Thiery, J.: Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin Chem* 2005, 51(6): 973–980
- 20 Bogner, Viktoria 2008: Differentielle Genexpression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Eine Genom-weite Analyse. Dissertation. München. Ludwig-Maximilians-Universität, Medizinische Fakultät
- 21 Bone R.C.: Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS), *Ann Intern Med* 1996, 125(8): 680–687
- 22 Botha A.J.; Moore F.A.; Moore E.E.; Kim F.J.; Banerjee A.; Peterson V.M.: Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window, *Surgery* 1995, 118(2): 358-364
- 23 Bouillon B; Kanz KG; Lackner, C. K.; Mutschler W; Sturm, J.: Die Bedeutung des Advanced Trauma Life Support (ATLS) im Schockraum, *Unfallchirurg* 2004, 107(10): 844–850
- 24 Bruker Daltonics: ClinProTools 2.0. *Software for Biomarker Detection and Evaluation*, Produktinformation, 2005
- 25 Bruker Daltonics: Manual for standardized ClinProt measurements, Produktinformation, 2005
- 26 Bruker Daltonics 2005: ClinProTools 2.0. *Software for Biomarker Detection and Evaluation: User Manual*
- 27 Burtis, C.A.; Ashwood, E.R.; Bruns, D.E. 2008: Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th ed.: Saunders Elsevier. St. Louis
- 28 Carter, M. B.; Wilson, M. A.; Wead, W. B.; Garrison, R. N.: Pentoxifylline attenuates pulmonary macromolecular leakage after intestinal ischemia-reperfusion, *Arch Surg* 1995, 130(12): 1337–1344
- 29 Champion, H. R.; Copes, W. S.; Sacco, W. J.; Lawnick, M. M.; Keast, S. L. et al.: The Major Trauma Outcome Study: establishing national norms for trauma care, *J Trauma* 1990, 30(11): 1356–1365
- 30 Ciesla, D. J.; Moore, E. E.; Johnson, J. L.; Burch, J. M.; Cothren, C. C.; Sauaia, A.: A 12-year prospective study of postinjury multiple organ failure: has anything changed?, *Arch Surg* 2005, 140(5): 432-438
- 31 Ciesla, D.J.; Moore, E.E.; Johnson, J.L.; Sauaia, A.; Cothren, C.C. et al.: Multiple organ dysfunction during resuscitation is not postinjury multiple organ failure, *Arch Surg* 2004, 139(6): 590-594

- 32 Ciesla D.J.; Moore E.E.; Johnson J.L.; Cothren C.C.; Banerjee A. et al.: Decreased progression of postinjury lung dysfunction to the acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure, *Surgery* 2006, 140(4): 640-647
- 33 Colantonio, D.A.; Chan, D.W.: The clinical application of proteomics, *Clin Chim Acta* 2005, 357(2): 151-158
- 34 Como, J.J.; Dutton, R.P.; Scalea, T.M.; Edelman, B.B.; Hess, J.R.: Blood transfusion rates in the care of acute trauma, *Transfusion* 2004, 44(6): 809-813
- 35 Cothren, C.C.; Moore, E.E.; Hedegaard, H.B.; Meng, K.: Epidemiology of urban trauma deaths: a comprehensive reassessment 10 years later, *World J Surg* 2007, 31(7): 1507-1511
- 36 Deitch, E.A.; Bridges, W.; Berg, R.; Specian, R.D.; Granger, D.N.: Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals, *J Trauma* 1990, 30(8): 942-51
- 37 Dekker, L.J.; Burgers, P.C.; Kros, J.M.; Smitt, P.A.; Luider, T.M.: Peptide profiling of cerebrospinal fluid by mass spectrometry, *Expert Rev Proteomics* 2006, 3(3): 297-309
- 38 DeLong, W.G. Jr.; Born, C.T.: Cytokines in patients with polytrauma, *Clin Orthop Relat Res* 2004, 422: 57-65
- 39 Demetriades, D.; Kimbrell, B.; Salim, A.; Velmahos, G.; Rhee, P. et al.: Trauma deaths in a mature urban trauma system: is "trimodal" distribution a valid concept?, *J Am Coll Surg* 2005, 201(3): 343-348
- 40 Deng, Y.J.; Huang, Z.X.; Zhou, C.J.; Wang, J.W.; You, Y. et al.: Gene profiling involved in immature CD4+ T lymphocyte responsible for systemic lupus erythematosus, *Mol Immunol* 2006, 43(9): 1497-1507
- 41 Diamandis, E.P.: Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations, *Mol Cell Proteomics* 2004, 3(4): 367-378
- 42 DiPiro, J. T.; Howdieshell, T. R.; Goddard, J. K.; Callaway, D. B.; Hamilton, R. G.; Mansberger, A. R., JR: Association of interleukin-4 plasma levels with traumatic injury and clinical course, *Arch Surg* 1995, 130(11): 1159-1162
- 43 Dörner, K.; Battista, H.-J. 2006: *Klinische Chemie und Hämatologie. 69 Tabellen.* 6., aktualisierte Aufl.: Thieme. Stuttgart
- 44 Drake, S. K.; Bowen, R. A.; Remaley, A. T.; Hortin, G. L.: Potential interferences from blood collection tubes in mass spectrometric analyses of serum polypeptides, *Clin Chem* 2004, 50(12): 2398-2401
- 45 Eiseman, B.; Beart, R.; Norton, L.: Multiple organ failure, *Surg Gynecol Obstet* 1977, 144(3): 323-326
- 46 Elssner, T.; Findeisen, P.; Kostrzewa, M.: Probenaufbereitung für MALDI-TOF MS mit Hilfe von magnetischen Mikropartikeln, *BIOspektrum* 2005, (3): 355-356
- 47 Ertel, W.; Keel, M.; Marty, D.; Hoop, R.; Safret, A. et al.: Die Bedeutung der Ganzkörperinflammation bei 1278 Traumapatienten, *Unfallchirurg* 1998, 101(7): 520-526

- 48 Eyries, M.; Siegfried, G.; Ciumas, M.; Montagne, K.; Agrapart, M. et al.: Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis, *Circ Res* 2008, 103(4): 432–440
- 49 Faist, E.; Baue, A. E.; Dittmer, H.; Heberer, G.: Multiple organ failure in polytrauma patients, *J Trauma* 1983, 23(9): 775–787
- 50 Faist, E.; Schinkel, C.; Zimmer, S.: Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation, *World J Surg* 1996, 20(4): 454–459
- 51 Fiedler, G.M.; Baumann, S.; Leichtle, A.; Oltmann, A.; Kase, J. et al.: Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin Chem* 2007, 53(3): 421–428
- 52 Fleming, T.J.; Fleming, M.L.; Malek, T.R.: Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family, *J Immunol* 1993, 151(5): 2399–2408
- 53 Flynn, W.J. Jr.; Pilati, D.; Hoover, E.L.: Xanthine oxidase inhibition prevents mesenteric blood flow deficits after resuscitated hemorrhagic shock by preserving endothelial function, *J Surg Res* 1997, 68(2): 175–180
- 54 Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R.D.; Bairoch, A.: ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res* 2003, 31(13): 3784–3788
- 55 Giannoudis, P.V.: Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update, *Injury* 2003, 34(6):3 97–404
- 56 Giannoudis, P.V.; Smith, R.M.; Bellamy, M.C.; Morrison, J.F.; Dickson, R.A.; Guillou, P.J.: Stimulation of the inflammatory system by reamed and unreamed nailing of femoral fractures. An analysis of the second hit, *J Bone Joint Surg Br* 1999, 81(2): 356–361
- 57 Goris, R.J.; te Boekhorst, T.P.; Nuytinck, J.K.; Gimbere, J.S.: Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation?, *Arch Surg* 1985, 120(10): 1109–1115
- 58 Greiling, H.; Arndt, T. 1995: Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3., neubearb. Aufl.: Schattauer. Stuttgart
- 59 Haoudi, A.; Bensmail, H.: Bioinformatics and data mining in proteomics, *Expert Rev Proteomics* 2006, 3(3): 333–343
- 60 Hensler, T.; Sauerland, S.; Bouillon, B.; Raum, M.; Rixen, D. et al.: Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase, *J Trauma* 2002, 52(5): 962–970
- 61 Hierholzer, C.; Menezes, J. M.; Ungeheuer, A.; Billiar, T. R.; Tweardy, D. J.; Harbrecht, B. G.: A nitric oxide scavenger protects against pulmonary inflammation following hemorrhagic shock, *Shock* 2002, 17(2): 98–103
- 62 Hildebrand, F.; Pape, H.C.; Krettek, C.: Die Bedeutung der Zytokine in der posttraumatischen Entzündungsreaktion, *Unfallchirurg* 2005, 108(10): 796-803
- 63 Holland, J.H. 1975: Adaptation in natural and artificial systems. *An introd. analysis with applications to biology control and artificial intelligence*. Univ. of Mich. Press

- 64 Holzheimer, R.G.; Capel, P.; Cavaillon, J.M.; Cainzos, M.; Frileux, P. et al.: Immunological surrogate parameters in a prognostic model for multi-organ failure and death, *Eur J Med Res* 2000, 5(7): 283–294
- 65 Huber-Wagner, S.; Qvick, M.; Mussack, T.; Euler, E.; Kay, M.V. et al.: Massive blood transfusion and outcome in 1062 polytrauma patients: a prospective study based on the Trauma Registry of the German Trauma Society, *Vox Sang* 2007, 92(1): 69–78
- 66 Huber-Wagner S.; Lefering, R.; Qvick, L. M.; Korner, M.; Kay, M. V. et al.: Effect of whole-body CT during trauma resuscitation on survival: a retrospective, multicentre study, *Lancet* 2009, 373(9673): 1455–1461
- 67 Hulett, M.D.; Freeman, C.; Hamdorf, B.J.; Baker, R.T.; Harris, M.J.; Parish, C.R.: Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis, *Nat Med* 1999, 5(7): 803–809
- 68 Ihalainen, S.; Soliymani, R.; Iivanainen, E.; Mykkanen, K.; Sainio, A. et al.: Proteome analysis of cultivated vascular smooth muscle cells from a CADASIL patient, *Mol Med* 2007, 13(5-6): 305–314
- 69 Ikuta, S.; Miki, C.; Hatada, T.; Inoue, Y.; Araki, T. et al.: Allogenic blood transfusion is an independent risk factor for infective complications after less invasive gastrointestinal surgery, *Am J Surg* 2003, 185(3): 188–193
- 70 Kenny, P.A.; Enver, T.; Ashworth, A.: Receptor and secreted targets of Wnt-1/beta-catenin signalling in mouse mammary epithelial cells, *BMC Cancer* 2005, 5:3
- 71 Ketterlinus, R.; Hsieh, S.Y.; Teng, S.H.; Lee, H.; Pusch, W.: Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software, *Biotechniques* 2005, Suppl.: 37–40
- 72 Kinzl, L.; Gebhard, F.; Arand, M.: Polytrauma und Ökonomie, *Unfallchirurgie* 1996, 22(4): 179–185
- 73 Kox, W.J.; Bone, R.C.; Krausch, D.; Docke, W.D.; Kox, S.N. et al.: Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle, *Arch Intern Med* 1997, 157(4): 389–393
- 74 Lai, L.; Alaverdi, N.; Maltais, L.; Morse, H. 3rdC: Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping, *J Immunol* 1998, 160(8): 3861–3868
- 75 Lederer J.A.; Rodrick M.L.; Mannick J.A.: The effects of injury on the adaptive immune response, *Shock* 1999, 11(3): 153–159
- 76 Lefering, R.; Goris, R.J.; van Nieuwenhoven, E.J.; Neugebauer, E.: Revision of the multiple organ failure score, *Langenbecks Arch Surg* 2002, 387(1): 14–20
- 77 Lottspeich, F. 1998: Bioanalytik: Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg
- 78 Lyn Sue, J.; Siram, S.; Williams, D.; Mezghebe, H.: Epidemiology of trauma deaths in an urban level-1 trauma center predominantly among African Americans-implications for prevention, *J Natl Med Assoc* 2006, 98(12): 1940–1944
- 79 Lyons, A.; Kelly, J.L.; Rodrick, M.L.; Mannick, J.A.; Lederer, J.A.: Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection, *Ann Surg* 1997, 226(4): 450-458; discussion 458-60

- 80 Malone, D.L.; Dunne, J.; Tracy, J.K.; Putnam, A.T.; Scalea, T.M.; Napolitano, L.M.: Blood transfusion, independent of shock severity, is associated with worse outcome in trauma, *J Trauma* 2003, 54(5): 898-905
- 81 Mannick, J.A.; Rodrick, M.L.; Lederer, J.A.: The immunologic response to injury, *J Am Coll Surg* 2001, 193(3): 237-244
- 82 Marshall, J.; Kupchak, P.; Zhu, W.; Yantha, J.; Vrees, T. et al.: Processing of serum proteins underlies the mass spectral fingerprinting of myocardial infarction, *J Proteome Res* 2003, 2(4): 361-372
- 83 Meri, S.; Morgan, B.P.; Davies, A.; Daniels, R.H.; Olavesen, M.G. et al.: Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers, *Immunology* 1990, 71(1): 1-9
- 84 Moore, F.A.; Sauaia, A.; Moore, E.E.; Haenel, J.B.; Burch, J.M.; Lezotte, D.C.: Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon, *J Trauma* 1996, 40(4): 501-10
- 85 Moutabarrik, A.; Nakanishi, I.; Namiki, M.; Hara, T.; Matsumoto, M. et al.: Cytokine-mediated regulation of the surface expression of complement regulatory proteins, CD46(MCP), CD55(DAF), and CD59 on human vascular endothelial cells, *Lymphokine Cytokine Res* 1993, 12(3): 167-172
- 86 Munster, A. M.; Eurenus, K.; Katz, R. M.; Canales, L.; Foley, F. D.; Mortensen, R. F.: Cell-mediated immunity after thermal injury, *Ann Surg* 1973, 177(2): 139-143
- 87 Nast-Kolb, D.; Aufmkolk, M.; Rucholtz, S.; Obertacke, U.; Waydhas, C.: Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma, *J Trauma* 2001, 51(5): 835-841
- 88 Nast-Kolb, D.; Ruchholtz, S.; Waydhas, C.; Schmidt, B.; Taeger, G.: "Damage Control Orthopedics", *Unfallchirurg* 2005, 108(10): 804-811
- 89 Nemeth, E.; Valore, E.V.; Territo, M.; Schiller, G.; Lichtenstein, A.; Ganz, T.: Hecpidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein, *Blood* 2003, 101(7): 2461-2463
- 90 Nguyen, A.; Yaffe, M.B.: Proteomics and systems biology approaches to signal transduction in sepsis, *Crit Care Med* 2003 Jan, 31(1 Suppl): S1-6
- 91 Norton, L. W.: Does drainage of intraabdominal pus reverse multiple organ failure?, *Am J Surg* 1985, 149(3): 347-350
- 92 Nuytinck, H.K.; Offermans, X.J.; Kubat, K.; Goris, J.A.: Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study, *Arch Surg* 1988, 123(12): 1519-1524
- 93 O'Kelly, T.J.; Westaby, S.: Trauma centres and the efficient use of financial resources, *Br J Surg* 1990, 77(10): 1142-1144
- 94 Omenn, G.S.: The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses, *Proteomics* 2004, 4(5): 1235-1240
- 95 Panyutich, A.; Ganz, T.: Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein, *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 5(2): 101-106
- 96 Pape, H.C.; Grotz, M.; Schwermann, T.; Ruchholtz, S.; Lefering, R. et al.: Entwicklung eines Modells zur Berechnung der Kosten der Versorgung schwer

- Verletzter - eine Initiative des Traumaregisters der DGU, *Unfallchirurg* 2003, 106(4): 348–357
- 97 Pape, H.C.; van Griensven, M.; Rice, J.; Gansslen, A.; Hildebrand, F. et al.: Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers, *J Trauma* 2001, 50(6): 989–1000
- 98 Pepe, P.E.; Potkin, R.T.; Reus, D.H.; Hudson, L.D.; Carrico, C.J.: Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome, *Am J Surg* 1982, 144(1): 124–130
- 99 Petricoin, E.F.; Ardekani, A.M.; Hitt, B.A.; Levine, P.J.; Fusaro, V.A. et al.: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer, *Lancet* 2002, 359(9306): 572–577
- 100 Pfeiffer, L.; Ehrhardt, N.; Kretzschmar, M.; Urbaschek, R.; Schubert, K.; Schirrmeyer, W.: Endotoxinämie und Multiorganversagen nach Polytrauma, *Anaesthesiol Reanim* 1996, 21(4): 91–96
- 101 Pierro, A.; Eaton, S.: Intestinal ischemia reperfusion injury and multisystem organ failure, *Semin Pediatr Surg* 2004, 13(1): 11–17
- 102 Potenza, B.M.; Hoyt, D.B.; Coimbra, R.; Fortlage, D.; Holbrook, T.; Hollingsworth-Fridlund, P.: The epidemiology of serious and fatal injury in San Diego County over an 11-year period, *J Trauma* 2004, 56(1): 68–75
- 103 Pusch, W.; Flocco, M.T.; Leung, S.M.; Thiele, H.; Kostrzewa, M.: Mass spectrometry-based clinical proteomics, *Pharmacogenomics* 2003, 4(4): 463–476
- 104 Putnam, F.W. 1975: *The Plasma Proteins. Structure, Function, and Genetic Control*. Academic Press. New York
- 105 Regel, G.; Grotz, M.; Weltner, T.; Sturm, J.A.; Tscherne, H.: Pattern of organ failure following severe trauma, *World J Surg* 1996, 20(4): 422–429
- 106 Regel, G.; Lobenhoffer, P.; Grotz, M.; Pape, H.C.; Lehmann, U.; Tscherne, H.: Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center, *J Trauma* 1995, 38(1): 70–78
- 107 Richter, M.; Lob, G.; Puhlhofer, F.; Siegrist, J.; Becker, C. et al.: Prävention von Verletzungen als ärztliche Aufgabe, *Unfallchirurg* 2007, 110(9): 734–744
- 108 Riddle, P.R.; Berenbaum, M.C.: Postoperative depression of the lymphocyte response to phytohaemagglutinin, *Lancet* 1967, 1(7493): 746–748
- 109 Robinson, M.J.; Hogg, N.: A comparison of human S100A12 with MRP-14 (S100A9), *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 275(3): 865–870
- 110 Ruchholtz, S.; Nast-Kolb, D.; Waydhas, C.; Lefering, R.: Das Traumaregister der AG 'Polytrauma' der D. G. U. als Grundlage des Qualitätsmanagements in der Schwerverletztenversorgung, *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997, 114: 1265–1267
- 111 Satyal, S.H.; Chen, D.; Fox, S.G.; Kramer, J.M.; Morimoto, R.I.: Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1, *Genes Dev* 1998, 12(13): 1962–1974

- 112 Sauaia, A.; Moore, F.A.; Moore, E.E.; Moser, K.S.; Brennan, R. et al.: Epidemiology of trauma deaths: a reassessment, *J Trauma* 1995, 38(2): 185–193
- 113 Schuerenberg, M.: AnchorChip Technology. *Preparation for Ultra-Sensitive Automated MALDI-TOF MS*. Revision 2.3, 2005
- 114 Schwartz, I.; Seger, D.; Shaltiel, S.: Vitronectin, *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31(5): 539–544
- 115 Schwermann, T.; Grotz, M.; Blanke, M.; Ruchholtz, S.; Lefering, R. et al.: Evaluation der Kosten von polytraumatisierten Patienten insbesondere aus der Perspektive des Krankenhauses, *Unfallchirurg* 2004, 107(7): 563–574
- 116 Service, R.F.: Proteomics. Public projects gear up to chart the protein landscape, *Science* 2003, 302(5649): 1316–1318
- 117 Sherry, R.M.; Cue, J.I.; Goddard, J.K.; Parramore, J.B.; DiPiro, J.T.: Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients, *J Trauma* 1996, 40(4): 613–616
- 118 Silverboard, H.; Aisiku, I.; Martin, G.S.; Adams, M.; Rozycki, G.; Moss, M.: The role of acute blood transfusion in the development of acute respiratory distress syndrome in patients with severe trauma, *J Trauma* 2005, 59(3): 717–723
- 119 Skillman, J.J.; Bushnell, L.S.; Goldman, H.; Silen, W.: Respiratory failure, hypotension, sepsis, and jaundice. A clinical syndrome associated with lethal hemorrhage from acute stress ulceration of the stomach, *Am J Surg* 1969, 117(4):523–530
- 120 Solassol, J.; Jacot, W.; Lhermitte, L.; Boulle, N.; Maudelonde, T.; Mange, A.: Clinical proteomics and mass spectrometry profiling for cancer detection, *Expert Rev Proteomics* 2006, 3(3): 311–320
- 121 Soreide, K.; Krüger, A.J.; Vardal, A.L.; Ellingsen, C.L.; Soreide, E.; Lossius, H.M.: Epidemiology and contemporary patterns of trauma deaths: changing place, similar pace, older face, *World J Surg* 2007, 31(11): 2092–2103
- 122 Srinivasan, R.; Daniels, J.; Fusaro, V.; Lundqvist, A.; Killian, J.K. et al.: Accurate diagnosis of acute graft-versus-host disease using serum proteomic pattern analysis, *Exp Hematol* 2006, 34(6): 796–801
- 123 Statistisches Bundesamt (Wiesbaden): Statistik der Todesursachen in Deutschland 2009
- 124 Statistisches Bundesamt (Wiesbaden): Statistik der Verkehrsunfälle in Deutschland 2009
- 125 Sturm, J.A.; Lackner, C.K.; Bouillon B; Seekamp, A.; Mutschler, W.E.: "Advanced Trauma Life Support" (ATLS) und "Systematic Prehospital Life Support" (SPLS), *Unfallchirurg* 2002, 105(11): 1027–1032
- 126 Swiss Institute of Bioinformatics: ExpASY Proteomics Server. Online verfügbar unter www.expasy.org (07.05.2010)
- 127 Swiss Institute of Bioinformatics: TagIdent Tool. Online verfügbar unter www.expasy.org/tools/tagident.html (23.07.2007)
- 128 Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T. et al.: Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 251(2): 471–476

- 129 Territo, M.C.; Ganz, T.; Selsted, M.E.; Lehrer, R.: Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils, *J Clin Invest* 1989, 84(6): 2017–2020
- 130 Tilney, N.L.; Bailey, G.L.; Morgan, A.P.: Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care, *Ann Surg* 1973, 178(2): 117–122
- 131 Tissot, J.D.; Schneider, P.; James, R.W.; Daigneault, R.; Hochstrasser, D.F.: High-resolution two-dimensional protein electrophoresis of pathological plasma/serum, *Appl Theor Electrophor* 1991, 2(1): 7–12
- 132 Trunkey, D.D.: Trauma in modern society: major challenges and solutions, *Surgeon* 2005, 3(3): 165–170
- 133 Tscherne, H.; Regel, G.; Sturm, J.A.; Friedl, H. P.: Schweregrad und Prioritäten bei Mehrfachverletzungen, *Chirurg* 1987, 58(10): 631–640
- 134 Vapnik, V.N.; Hastie, T.; Tibshirani, R. et al. 2007: The Elements of Statistical Learning. *Data Mining, Inference, and Prediction*. 9th ed.: Wiley; Springer. New York
- 135 Villanueva, J.; Philip, J.; Entenberg, D.; Chaparro, C.A.; Tanwar, M.K. et al.: Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal Chem* 2004, 76(6): 1560–1570
- 136 Vlodavsky, I.; Eldor, A.; Haimovitz-Friedman, A.; Matzner, Y.; Ishai-Michaeli, R. et al.: Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation, *Invasion Metastasis* 1992, 12(2): 112–127
- 137 Waydhas, C.; Nast-Kolb, D.: Scores in polytrauma - do they help?, *Langenbecks Arch Surg* 1998, 383(3-4): 209–213
- 138 Waydhas, C.; Nast-Kolb, D.; Jochum, M.; Trupka, A.; Lenk, S. et al.: Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma, *Arch Surg* 1992, 127(4): 460–467
- 139 Welch, B.L.: The Generalization of 'Student's' Problem when Several Different Population Variances are Involved, *Biometrika* 1947, 1/2, S. 28–35
- 140 Wick, M.; Ekkernkamp, A.; Muhr, G.: Epidemiologie des Polytraumas, *Chirurg* 1997, 68(11): 1053–1058
- 141 Wood, J.J.; Rodrick, M.L.; O'Mahony, J.B.; Palder, S.B.; Saporoschetz, I. et al.: Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns, *Ann Surg* 1984, 200(3): 311–320
- 142 Xu, D.; Lu, Q.; Deitch, E.A.: Calcium and phospholipase A2 appear to be involved in the pathogenesis of hemorrhagic shock-induced mucosal injury and bacterial translocation, *Crit Care Med* 1995, 23(1): 125–131
- 143 Zellweger, R.; Ayala, A.; DeMaso, C.M.; Chaudry, I.H.: Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity, *Shock* 1995, 4(2): 149–153
- 144 Zhang, X.; Leung, S.M.; Morris, C.R.; Shigenaga, M.K.: Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma, *J Biomol Tech* 2004, 15(3): 167–175

- 145 Zhang, Z.; Henzel, W. J.: Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites, *Protein Science* 2004, 13(10): 2819–2824
- 146 Zlotnik, A.; Yoshie, O.: Chemokines: a new classification system and their role in immunity, *Immunity* 2000, 12(2): 121–127

11. Danksagung

Dem Leiter der Arbeitsgruppe Polytrauma der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt, Herrn OA PD Dr. med. Peter Biberthaler, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Von seinem Engagement und seiner Begeisterung für die Wissenschaft konnte ich während meiner gesamten Tätigkeit nur profitieren, er war mir freundschaftlich verbunden als Mentor und als Vorbild.

Des Weiteren gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, für seine Unterstützung in allen klinischen und wissenschaftlichen Fragen.

Ohne die Anleitung und Betreuung durch Frau Dr. med. Viktoria Bogner wäre diese Arbeit nicht von Erfolg gekrönt gewesen. Ich möchte ihr herzlich für ihr unablässiges Engagement und ihre Ermutigungen danken, für die sie sich trotz ihrer erheblichen beruflichen Belastung in Klinik und Forschung immer Zeit nahm.

Dieses Projekt war eine Kooperation mit dem Institut für Laboratoriumsmedizin und molekulare Diagnostik der Universität Leipzig. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Daniel Teupser, Oberarzt des Instituts, sowie Herrn Dr. rer. nat. Sven Baumann für ihr zuvorkommendes Engagement. Ohne ihre Expertise und technisches Verständnis hätte unsere Methodik keinen Erfolg gehabt. Darüberhinaus brachten sie mir enormes Vertrauen entgegen, indem sie mir ständigen Zugang zu ihrem Labor und ihren Messinstrumenten ermöglichten.

Den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe Polytrauma, Herrn Leonhard Keil, Herrn Peter Richter und Herrn Veit Stöcklein, bin ich zutiefst dankbar für die hervorragende

Arbeitsatmosphäre im Team, die anregenden fachlichen Diskussionen, die gegenseitige Unterstützung, aber vor allem ihre Freundschaft.

Weiter hervorheben möchte ich die stetige Unterstützung unseres Projektes durch die Kollegen und Mitarbeiter der chirurgischen Notfallaufnahme, des Instituts für Anästhesiologie und der Intensivstation der Chirurgischen Klinik, allen voran Herrn OA PD Dr. med. Karl-Georg Kanz, Herrn OA Dr. Ludwig Ney und Frau OÄ Dr. Theresia Hummel.

Meine Lebensgefährtin, Sarah Reiter, hat mich von Anfang an durch die Höhen und Tiefen meiner wissenschaftlichen Arbeit begleitet. Dass sie mir stets Kraft und Rückhalt gegeben und mich immer ermutigt hat, kann ich ihr nicht genug danken.

Ich möchte meinem Bruder Alexander danken, der mich aus nächster Nähe in meiner Tätigkeit unterstützt hat und mir behilflich war, wo er nur konnte.

Zuletzt kann ich meinen Eltern nicht genug Dank für Ihre aufopferungsvolle Unterstützung und Geduld aussprechen. Ich bin mir stets bewusst, dass ohne sie weder mein Studium noch diese Dissertation jemals möglich gewesen wären.