

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der  
Ludwig-Maximilians Universität zu München  
Klinikum Innenstadt  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

**Differentielle Genexpression in Monozyten  
polytraumatisierter Patienten:  
Eine Genom-weite Analyse**

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

vorgelegt von

Viktoria Bogner

aus

Dachau

2008

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

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. E. Mutschler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. St. K. Bohlander Prof. Dr. U. Kreimeier
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. P. Biberthaler
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	24.01.2008

*Für meine lieben Eltern*

## **Gliederung**

<b>1. Einleitung und Hintergrund</b>	<b>01</b>
1.1. Induktion und Ausprägung eines posttraumatischen SIRS und MOF	02
1.2. Rolle des unspezifischen und spezifischen Immunsystems nach Trauma	03
1.2.1. Humorale Mechanismen	04
1.2.2. Zelluläre Mechanismen	06
1.3. Methodische Aspekte der Oligonukleotid Microarray Technologie	09
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>10</b>
<b>3. Patienten und Methoden</b>	<b>11</b>
3.1. Studiendesign	11
3.2. Probengewinnung und Zellseparation	12
3.3. RNA Isolierung und Aufreinigung	13
3.4. cRNA-Synthese und Microarray Hybridisierung	13
3.5. Low-Level Statistik	16
3.6. High Level Statistik	17
3.6.1. Unsupervised Analyse und hierarchische Cluster-Analyse	18
3.6.2. Supervised Analyse	19
3.6.3. Statistische Vorhersage-Modelle	21
3.7. Pathway Analyse	26
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
4.1. Patienten und klinische Daten	28
4.2. Probengewinnung und Zellseparation	28
4.3. Low Level Microarray Datenanalysen	28
4.4. High Level Microarray Datenanalysen	30
4.4.1. Unsupervised Analyse	30
4.4.2. Supervised Analysen und Vorhersage-Modelle	33
4.4.2.1. Validierung mittels Geschlechtszugehörigkeit	34
4.4.2.2. Verletzungsschwere	36
4.4.2.3. Bluttransfusion	36
4.4.2.4. Multiples Organversagen	39
4.4.2.5. Outcome	41
4.5. Pathway Analysen	44
4.5.1. Verletzungsschwere	44
4.5.2. Bluttransfusion	47
4.5.3. Multiples Organversagen	49
4.5.4. Outcome	51
<b>5. Diskussion</b>	<b>54</b>
5.1. Studiendesign und klinische Daten	54
5.2. Probengewinnung und Zellseparation	57
5.3. RNA Präparation und Microarray Datenanalyse	58
5.4. Unsupervised Analyse	60
5.5. Supervised Analysen und Vorhersage-Modelle	61
5.6. Pathway Analysen	62
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>73</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>83</b>

## 1. Einleitung und Hintergrund

Unter dem Begriff „Polytrauma“ ist die gleichzeitig entstandene Verletzung mehrerer Körperregionen oder Organsysteme subsumiert, wobei wenigstens eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen lebensbedrohlich ist (115). Für die Bundesrepublik Deutschland gibt das Statistische Bundesamt im Jahr 2002 88.382 schwerverletzte Unfallopfer pro Jahr an (89). Durch kontinuierliche Verbesserung der Sicherheitssysteme und Unfallverhütungsvorschriften nimmt das Risiko, bei einem Unfall eine initial tödliche Verletzung zu erleiden, stetig ab. Damit rückt das Management von Schwerstverletzten immer mehr in den Fokus des klinischen und wissenschaftlichen Interesses der Unfallchirurgie.

Während die frühe Letalität innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem Unfall hauptsächlich durch das schwere Schädel-Hirn-Trauma und ausgedehnte Massenblutungen nach Verletzung von großen Gefäßen oder stark durchbluteten Organen determiniert ist, wird die Spätletalität durch fatale Funktions-Störungen und -Ausfälle lebenswichtiger Organe bestimmt (103). Zahlreiche Untersuchungen haben in diesem Zusammenhang aufgezeigt, dass derartige Funktionsstörungen auch Organe betreffen können, welche durch das ursprüngliche Trauma nicht direkt in Mitleidenschaft gezogen wurden. Aus klinischer Sicht wurden diese Funktionsstörungen als *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS) bis hin zum *Multiple Organ Failure* (MOF) ausführlich in der Literatur beschrieben [Übersichtsarbeiten siehe (2;6;14;27;29;48)]. Für die Ausbildung und Ausprägung der posttraumatischen Folgereaktionen scheint das Immunsystem und vor allem seine Antwort auf das Trauma eine entscheidende Determinante zu sein. Erleidet ein Patient eine isolierte Verletzung, wie beispielsweise eine Fraktur des distalen Radius, kommt es zu einer lokalen Aktivierung des Immunsystems im Bereich des Unterarmes. Diese lokale Reaktion dient der Induktion physiologischer Reparaturmechanismen zur Heilung der Verletzung wie auch zur Abwehr von Fremdorganismen wie beispielsweise Viren und Bakterien. Ziel dabei ist die Begrenzung

des Schadens für den gesamten Organismus. Im Gegensatz dazu wurden die inflammatorischen Phänomene bei polytraumatisierten Patienten als eine Art „Überreaktion“ des Organismus gedeutet, welche die immunologische Aktivierung lokaler Reparaturmechanismen über deren Grenzen hinweg auch in andere, zunächst nicht involvierte Gewebeareale oder Organe tragen kann.

### ***1.1. Induktion und Ausprägung eines posttraumatischen SIRS und MOF***

Eine Vielzahl an Untersuchungen der vergangenen zwei Jahrzehnte lassen folgendes Bild von der Entwicklung des SIRS analog des kürzlich von Mannick et al. zusammenfassend dargestellten Modell entstehen (76):

Polytraumatisierte Patienten entwickeln direkt nach der initialen Stabilisierungsphase eine systemische Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response*; SIR). Bei einem gewissen Prozentsatz von Patienten schließt sich danach der pathophysiologisch relevante Umschlag in ein *systemic inflammatory response syndrome* SIRS bzw. multiple Organfunktionsstörungen an (early MODS/MOF). Überlebt der Patient diese Phase, kann sich eine kompensatorische Immundysfunktion (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*: CARS) mit resultierender verminderter Resistenz gegenüber viralen wie bakteriellen Infektionen entwickeln. Falls in dieser Phase eine solche Infektion mit den begleitenden Entzündungsreaktionen auftritt, können sich erneut multiple Organfunktionsstörungen bis hin zum multiplen Organversagen ausbilden (*late* MODS/MOF).

In diesem Zusammenhang wurde bereits vor mehr als 20 Jahren erkannt, dass die zu frühe Exposition eines solchen polytraumatisierten Patienten gegenüber einem weiteren starken Stressor (wie z.B. zeitlich wie methodisch aufwändige Eingriffe zur definitiven Frakturstabilisierung mittels intramedullärem Kraftträger) zu einer zusätzlichen Freisetzung von immunologisch hoch aktiven Knochenmarksinhalten führt. Das bereits durch das

ursprüngliche schwere Trauma aus dem Gleichgewicht geratene Immunsystem entgleist derart, dass es zu einer unvermeidbaren Ausbildung eines posttraumatischen Organversagens kommt.

Des Weiteren zeigte sich, dass der Gastrointestinaltrakt besonders empfindlich auf Schockexposition reagiert. Persistierende gastrointestinale Perfusionsstörungen auch nach erfolgreicher Schocktherapie sind maßgeblich an den Mukosaschäden des Darmes beteiligt. Daraus folgen klinisch oft kaum nachweisbare Translokationen von Bakterien und Endotoxin zum einen über mesenteriale Lymphknoten und -bahnen in die systemische Zirkulation. Zum anderen erreichen solche Translokationen über das Pfortadersystem die Leber, in der ortsständige Lebermakrophagen -durch die vorangegangene Schockphase aktiviert- bei Endotoxinkontakt erhebliche Mengen an Mediatoren freisetzen. Dadurch werden nicht nur lokale Umstellungen des Leberstoffwechsels auf Akut-Phase Proteine, sondern auch und vor allem systemische Reaktionen wie Alveolarschäden in der Lunge (ARDS) induziert. Die klinische Entität dieser sekundären Schädigungen nach Überwindung der initialen Stabilisierungsphase wurde als „*second hit*“-Phänomen beschrieben (93;108;114). Des weiteren weisen mehrere Arbeiten in der Literatur darauf hin, dass die Applikation von Erythrozytenkonzentraten nicht nur zur Ausbildung eines SIRS und Multiorganversagens beiträgt, sondern sogar einen unabhängigen Risikofaktor für eine höhere Mortalität nach Polytrauma darstellt (23;82;86;109).

### ***1.2. Rolle des unspezifischen und spezifischen Immunsystems nach Polytrauma***

Im Wesentlichen lässt sich das menschliche Immunsystem wie folgt einteilen:

Unter dem unspezifischem System versteht man physiologische Barrieren, wie Schleimhäute, unspezifische humorale Faktoren (z.B. das Komplementsystem) und phagozytierende Zellen wie Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten (PMN). Der Ausdruck

„spezifisches Immunsystem“ subsummiert auf humoraler Ebene die Bildung von spezifischen Antikörpern und auf zellulärer Ebene differenzierte T- und B-Lymphozyten.

Zunächst gab es Hinweise, dass sich das SIRS zeitlich der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems (20;58;116) und das CARS dem des spezifischen Immunsystems (28;71;125) zuordnen ließe. In aktuelleren Arbeiten etablierte sich zunehmend die Theorie, dass beide Abwehrsysteme mit beiden Phänomenen verknüpft sind (19;55;57). Weiter gibt es Daten dafür, dass beide Phänomene gleichzeitig in verschiedenen Lokalisationen auftreten können. So soll das SIRS vermehrt an den Orten der Verletzung zu finden sein, während das CARS eher in den primär nicht betroffenen Arealen seine Ausprägung zu finden scheint (9;14;76;94;105;120).

Obwohl eine endgültige Klärung des genauen zeitlichen und örtlichen Auftretens der immunologischen Phänomene damit noch aussteht, ist die individuelle posttraumatische immunologische Reaktion zweifelsfrei durch zahlreiche humorale und zelluläre Faktoren sowohl des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems charakterisiert, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen:

### 1.2.1. *Humorale Mechanismen*

Die lokale traumatische Gewebeerstörung beinhaltet den Kontakt von Abwehrzellen mit immunologisch aktiver Gewebematrix (68) sowie das Auftreten von Ischämie und konsekutiver Reperfusion (76). Hierdurch wird die Aktivierung des Komplement-Systems über den klassischen (46;123) und den alternativen Weg (34) als integraler Bestandteil des unspezifischen Immunsystems ausgelöst. Die dabei freigesetzten Komplementprotein-Spaltprodukte aktivieren ihrerseits zelluläre Bestandteile des Immunsystems (s.u.), indem sie chemotaktisch wirken und die Opsonierung bzw. Phagozytose von Gewebetrümmern und eingedrungenen Mikroorganismen anregen. Im Falle einer überschießenden Komplement-Aktivierung durch ein ausgeprägtes Trauma, kann es zur Verbrauch der Komplement-



Faktoren und damit zum Zusammenbruch der initialen Abwehrkette des Individuums kommen (21). Weiter haben Untersuchungen an einem Tiermodell eines Komplement-induzierten Lungenschadens erkennen lassen, dass das aktivierte Komplementprotein C5a wichtig für die lokale Bildung von  $\text{TNF}\alpha$  ist (84), sowie in Kombination mit  $\text{INF}\gamma$  die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten/Makrophagen induzieren kann (91).

Als weitere Faktoren, die an der lokalen Aktivierung des unspezifischen Immunsystems beteiligt sind, wurden Radikale wie reaktive Sauerstoffspezies (ROI), Stickstoffmonoxid (NO) und Eikosanoide beschrieben [(99;112;130), Übersichtsarbeit siehe (100)].

Abgesehen von diesen lokal wirksamen humoralen Mechanismen konnte darüber hinaus in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden, dass auch Mediatoren freigesetzt werden, die eine systemische Wirkung entfalten. So geht das posttraumatische SIRS mit einer erhöhten Produktion und Ausschüttung sowohl von pro- als auch antiinflammatorischen Faktoren (z.B. Zytokine, Proteasen, Inhibitoren) einher (27;35;40;56;59;72;87;93;101;107). In diesem Kontext haben insbesondere die Arbeiten von Hoch et al. (47), Rabinovici et al. (96), Svoboda et al. (111), Ertel et al. (26), Neidhardt et al. (88), Nast-Kolb et al. (87), Gebhard et al. (35), Majetschak et al. (74) und Faist et al. (28;30) eindeutig belegt, dass die Konzentrationen sowohl von pro- als auch anti-inflammatorisch wirksamen Zytokinen in der systemischen Zirkulation von polytraumatisierten Patienten gleichsinnig verändert sind. Von den bislang mehr als 30 beschriebenen Zytokinen zählen vor allem  $\text{TNF}\alpha$ , Il-6 und Il-8 zu den primär pro-inflammatorisch wirksamen Faktoren, während den vorrangig anti-inflammatorisch reagierenden Vertretern hauptsächlich Il-10, TGF- $\beta$  und Il-1ra zugeordnet werden. Gemeinsam ist all diesen Mediatoren, dass sie in der initialen posttraumatischen Phase einen von der Traumaschwere abhängigen Konzentrationsanstieg in der systemischen Zirkulation von polytraumatisierten Patienten aufweisen, der dann innerhalb einiger Tage

kontinuierlich fällt. Eine Verschlechterung der klinischen Situation ist meist mit ihrem Wiederanstieg verbunden.

Obwohl bislang nicht endgültig geklärt ist, aus welchen Zellen die oben genannten Mediatoren primär sezerniert werden, ist jedoch unbestritten, dass deren Konzentrationsanstieg eine Veränderung des zellulären Immunsystems bewirken. Die Hauptmerkmale des zellulären Immunsystems seien im Folgenden beschrieben:

### 1.2.2. *Zelluläre Mechanismen*

In der initialen posttraumatischen Phase kommt vor allem der Aktivierung des unspezifischen zellulären Immunsystems (PMN-Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) als Vermittler und Verstärker der immunologischen Antwort eine zentrale Rolle zu [Übersichtsarbeiten siehe (29;76;106)]. Zahlreiche experimentelle Arbeiten der neueren Zeit bestärken die Hypothese, dass dabei vor allem monozytäre Funktionsalterationen das Ausmaß posttraumatischer Inflammation und deren Konsequenzen substantiell beeinflussen. So fand Kampalath et al. (52) nicht nur eine signifikante Änderung der Monozytenmorphologie bei schwer traumatisierten Patienten, sondern auch eine Assoziation mit der posttraumatischen Funktionsstörung des Immunsystems. Diese herausragende Bedeutung von Monozyten für die initiale Steuerung posttraumatischer Immunfunktionsstörungen wurde anhand zahlreicher weiterer Arbeiten bestätigt (13).

Darüber hinaus konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass die unspezifische Entzündungsreaktion auch die mit einer gewissen Latenz auftretende Modifikation des spezifischen Immunsystems (Th1/Th2-Lymphozyten) vermittelt [Übersichtsarbeit siehe (63;127)]. Zentraler Punkt der zellassozierten Immunantwort ist die Interaktion des Monozyten/Makrophagen-Systems mit dem T/B-Zell-System. Die antigenpräsentierenden Zellen (v.a. Makrophagen) verarbeiten das phagozytierte Fremdartigen und bieten es den ruhenden T-Lymphozyten an. Zusammen mit der Expression des *major histocompatibility*

*complex* (MHC) der Klasse II sowie der Produktion und Ausschüttung von Zytokinen durch die antigenpräsentierende Zelle sind damit die Voraussetzungen für eine Aktivierung der T-Lymphozyten geschaffen. Die nunmehr aktivierten T-Lymphozyten synthetisieren ihrerseits spezielle Zytokine, die auch als Lymphokine bezeichnet werden. Hierdurch wird sowohl eine weitere Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten-Population als auch eine erneute Stimulation der antigenpräsentierenden Zellen induziert.

Aufgrund der Tatsache, dass für diesen Aktivierungsmechanismus die Präsentation spezifischer Antigene Voraussetzung ist, wurde die Beteiligung von Bakterien an der Ausbildung des SIRS lange Zeit kontrovers diskutiert. Herausgearbeitet wurde mittlerweile, dass bei polytraumatisierten Patienten das gastrointestinale Versorgungsgebiet häufig von passagerer Ischämie (bedingt durch direktes Trauma, z.B. bei Zerreißung mesenterialer Arterien) oder indirekt als Folge der Zentralisation im hämorrhagischem Schock betroffen ist [Übersichtsarbeit siehe (22;42)]. Dadurch kommt es nach Reperfusion zu den oben erwähnten lokalen IRS-Phänomenen mit Einschwemmung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren und Translokation pathogener Keime aus dem Pool der Darmbakterien. Allerdings findet sich das posttraumatische SIRS auch bei Patienten ohne gastrointestinale Perfusionsstörung, das dann am wahrscheinlichsten durch IRS-Phänomene der Peripherie induziert wurde.

Die prinzipiellen Mechanismen der maßgeblich an der Schadensausprägung beteiligten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (LEI) wurden hauptsächlich unter der Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie näher aufgeklärt [Übersichtsarbeit siehe (67;77)] und insbesondere die Reperusionsphase des ischämischen Gewebes als kritisch für die LEI erkannt. Obwohl die Reperfusion essentiell für das Weiterleben des ischämischen Gewebes wie auch die Initiierung der eingangs erwähnten Reparaturmechanismen bei polytraumatisierten Patienten ist, kann sich der parenchymatöse Schaden nach der Reperfusion erheblich verstärken durch die dabei eingespülten aktivierten Leukozyten, allen

voran durch die PMN-Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, die im sog. „*reflow-paradoxon*“ mit dem Endothel des geschädigten Gewebes interagieren (80). Voraussetzung hierfür ist die Expression von Selektinen auf aktivierten Endothelzellen (P-Selektin, E-Selektin) ebenso wie auf Leukozyten (L-Selektin). Als weitere Interaktionspartner wurden Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1 etc.) und Integrine identifiziert, die das Rollen bzw. die Adhärenz der Leukozyten und deren Migration durch das geschädigte Endothel medieren [Übersichtsarbeit (62)] und somit die Phagozytose von geschädigtem Gewebe durch die primären Abwehrzellen ermöglichen.

Wie oben ausgeführt, ist die Verbindung zum spezifischen Immunsystem in diesem Zusammenhang bislang nur unzureichend charakterisiert. Diskutiert werden alternative Aktivierungswege des T-Zell-Systems [richtungsweisende Übersichtsarbeiten siehe (51;90;95)]. So lässt sich beispielsweise eine Aktivierung von *natural killer cells* (NK-Zellen) durch Faktoren des aktivierten Komplement-Systems oder durch den u.a. auch von Monozyten exprimierten Faktor *linker of activated T-cells* (LAT) ohne Präsentation eines spezifischen Antigens auslösen (51).

Unzureichend charakterisiert sind bisher auch die verantwortlichen intrazellulären Initialmechanismen, welche die Steuerung der posttraumatischen Abwehrfunktion von Monozyten/Makrophagen und Granulozyten induzieren. Neuere Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass die Bildung von immunmodulatorisch wirksamen Effektor-Proteinen (Zytokine/Chemokine, Zell-Oberflächenmoleküle, Proteasen, Inhibitoren etc.) über spezielle intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden gesteuert wird. Dies zeigt sich vornehmlich in einer veränderten Aktivität von Transkriptionsfaktoren [z.B. NF- $\kappa$ B, AP-1, AP-2 etc. (79)], wodurch das mRNA-Expressionsprofil zahlreicher Gene nachhaltig beeinflusst wird (43).

Zudem ist die einer gesteigerten transkriptionalen Aktivität folgende Änderung des intrazellulären mRNA-Expressionsmusters bei polytraumatisierten Patienten ebenfalls unbekannt. Entsprechend dem molekularbiologischen Dogma kann die Information über die

Antwort der Zelle auf einen Reiz von außen nach intrazellulärer Signaltransduktion weitgehend nur über die mRNA vom Zellkern [Übersichtsarbeit (53)], und damit dem zentralen Datenspeicher, zu den peripheren Effektor-Organellen, den Ribosomen und dem Golgi-Apparat, transferiert werden. Damit ist mittels der neu entwickelten Oligonukleotid-Microarrays erstmals an einer strategisch entscheidenden Position eine Genom-umfassende, effektive Suche nach verantwortlichen initialen Mustern posttraumatischer mRNA-Expression auf der Ebene des humanen Transkriptoms möglich. Untersuchungen an neuronalen und endothelialen Zellkulturmodellen sowie tierexperimentelle Arbeiten haben gezeigt, dass spezifische mRNA Expressionsmuster, die mittels differentieller Microarray-Genexpressionsanalyse erhoben wurden, mehr Information enthalten, als die bloße Summation von Einzelergebnissen (70;83). Darüber hinaus haben jüngste Veröffentlichungen an Patienten nachgewiesen, dass anhand von Microarray-Untersuchungen unterschiedliche Leukämie-Subtypen identifiziert werden und damit eine Optimierung deren Therapie erzielt werden konnte (3, 60-61).

### ***1.3. Methodische Aspekte der Oligonukleotid Microarray Technologie***

Die meisten Indikatoren der posttraumatischen Entzündungsreaktion wurden anhand von Veränderungen der Konzentrationen einer limitierten Anzahl von Plasma Proteinen oder einer kleinen Anzahl an Genen ermittelt. Aufgrund der geschilderten komplexen Zusammenhänge der posttraumatischen Entzündungsreaktion lassen sich damit die zugrunde liegenden Mechanismen nur unzureichend aufklären [Übersichtsarbeiten (5;27)]. Die kürzlich entwickelte Microarray Technologie hingegen könnte erstmals die Genom-weite Analyse der RNA Expression in humanen Immunzellen und deren Veränderungen erfassen. Diese Technologie erlaubt es, zahlreiche Faktoren gleichzeitig semiquantitativ zu bestimmen und deren Veränderung über die Zeit zu erfassen (3). Des Weiteren besteht mit der high-throuput Technologie die Möglichkeit, die genom-weite differentielle Genexpression in Abhängigkeit

verschiedener klinischer Einflussgrößen, sowohl was die Therapie als auch den Verlauf des Patienten anbelangt, zu untersuchen.

## **2. Zielsetzung**

Intensive Forschungen der vergangenen Jahre über die Ausbildung einer generalisierten Entzündungsreaktion haben aufgezeigt, dass eine Fehlfunktion von Monozyten mit dem klinischen Bild des posttraumatischen Multi-Organ-Versagens verknüpft ist. In diesem Kontext sind intrazelluläre initiale Steuerungsmechanismen verstärkt in den Blickpunkt des Interesses gerückt, da Veränderungen dieser Schlüsselreaktionen zeitlich erheblich vor dem klinisch manifesten Multi-Organ-Versagen auftreten und damit die potentielle Möglichkeit beinhalten, sowohl das klinische Management der Patienten (Zeitpunkt der Operationen, Beatmungseinstellungen, Lagerungstherapie etc.) besser anzupassen als auch effektivere pharmakologisch-therapeutische Interventionen zu entwickeln. Dennoch sind gerade diese Initialmechanismen in humanen Immunzellen polytraumatisierter Patienten bislang nur unzureichend charakterisiert (1;127). So besteht z.B. noch weitgehend Unklarheit darüber, ob es tatsächlich ein spezifisches Trauma-sensitives mRNA-Expressionsmuster in Monozyten gibt und ob es klinische Einflussfaktoren gibt, wie zum Beispiel die Gabe von Blutprodukten, die Verletzungsschwere, das Auftreten eines MOF-Syndroms, die unterschiedlichen monozytären mRNA-Expressionsmuster im posttraumatischen Verlauf polytraumatisierter Patienten hervorrufen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher,

- i) zu überprüfen, ob es überhaupt spezifische, Trauma-responsive mRNA-Expressionsmuster in Monozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase gibt,

- ii) in einem zweiten Schritt zu untersuchen, ob es darüber hinaus Genexpressionsprofile gibt, die in Abhängigkeit von klinischen Parametern einer signifikant unterschiedlichen Expression unterliegen
- iii) und schließlich diese identifizierten Faktoren auf ihre biologisch funktionelle Rolle im Organismus zu untersuchen

### **3. Patienten und Methoden**

#### *3.1. Studiendesign*

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (AZ: 012/00) wurde die prospektive Studie in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Insgesamt wurden 13 polytraumatisierte Patienten mit einem ISS über 16 Punkten eingeschlossen. Von diesen Patienten, die innerhalb von 90 Minuten nach dem Unfall unseren Schockraum erreichten, wurde eine schriftliche Einverständniserklärung auf folgende Weise eingeholt. Da die eingeschlossenen Patienten aufgrund der klinischen Situation (Bewusstlosigkeit, Intubation, zentral wirksame Analgesie etc.) diese Einverständniserklärung initial nicht abgeben konnten, wurde in enger Absprache mit der Ethikkommission das Einverständnis erst nach Wiedererlangung der kognitiven Fähigkeiten des Patienten erteilt. Hatte der Patient diese Fähigkeit nicht in ausreichendem Maße erreicht, so wurde das Einverständnis zur Studienteilnahme von einem gesetzlichen Vertreter oder einem nahen Angehörigen eingeholt. Ausgeschlossen wurden Patienten, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma verstorben waren. Nach der initialen Stabilisierungsphase im Schockraum und den entsprechend dem Verletzungsmuster notwendigen Operationen wurden die Patienten auf unserer Intensivstation aufgenommen. Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten

polytraumatisierter Patienten (102), wobei zur Feststellung des definitiven klinischen Outcomes das 90-Tage-Überleben als Endpunkt definiert wurde. Zur objektiven Erfassung der Verletzungsschwere wurde der Injury Severity Score (16) berechnet. Darüber hinaus wurde die Anzahl der transfundierten Erythrozytenkonzentrate (EK, 1 EK enthält ca. 300ml allogene, leukozytendepletierte, konzentrierte Erythrozyten) dokumentiert. Patienten, denen innerhalb der ersten 24h nach Trauma mehr als 10 Erythrozytenkonzentrate verabreicht werden mussten, wurden analog der Arbeit von Como et al. (17) als massentransfundiert eingestuft. Um das posttraumatische Organversagen quantitativ erfassen zu können, wurden des weiteren zu jedem Blutabnahmezeitpunkt die Parameter zur Berechnung des MOF-Scores nach Goris in der Modifikation nach Lefering et al. (39;65) notiert, als Grenzwert für das Vorliegen eines multiplen Organversagens wurden analog der o.g. Publikation 4 Punkte angenommen.

### *3.2. Probengewinnung und Zellseparation*

Die Blutentnahmen (30ml EDTA-Blut, 5ml Citrat-Blut, 5ml Serum) erfolgten direkt bei Klinikaufnahme (ca. 60-90 Minuten nach Unfall) und dann jeweils auf den Zeitpunkt des Traumas bezogen nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden.

Aus dem EDTA-Blut wurden Monozyten mittels Microbeads isoliert, die mit Antikörpern gegen CD14 (Miltenyi-Biotec) beschichtet waren. Hierfür wurden zunächst zur Lyse der Erythrozyten jeweils 30ml EDTA-Blut mit 42,5ml Lyse-Puffer (155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1mM EDTA, pH 7.2) versetzt und nach einer Lyse-Phase von 10 Minuten die Proben bei 450xg und 20°C weitere 10 Minuten zentrifugiert. Um eine komplette Lyse der Erythrozyten zu gewährleisten, wurde der Vorgang zweimal wiederholt. Danach wurde das Zell-Pellet in 500 $\mu\text{l}$  PBS/EDTA-Puffer resuspendiert und bis zu einer Endkonzentration von  $1,25 \times 10^8$  Zellen/ml verdünnt. Die Zellen ( $1 \times 10^7$  in 80 $\mu\text{l}$ ) wurden mit 200 $\mu\text{l}$  CD14 Antikörperbeschichteten Microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) für 15 Minuten bei 4°C



inkubiert. Hierauf wurden das Volumen mittels PBS/EDTA-Puffer auf 15ml aufgefüllt und die Zellen über einen weiteren Zentrifugationsschritt (450xg, 10 Minuten, 20°C) sedimentiert. Das Zell-Pellet wurde in 500µl PBS/EDTA-Puffer resuspendiert und auf eine Hochgradienten-Magnet-Zellseparationssäule aufgetragen (Miltenyi Biotech). Die Säule wurde dreimal mittels PBS/EDTA-Puffer gespült und dann aus dem Magnetfeld entfernt. Die Zelleluierung erfolgte mit 1ml PBS/EDTA-Puffer. Anschließend wurde die Zell-Suspension in 2ml RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 0,1% β-Mercaptoethanol lysiert und bei -80°C tiefgefroren.

Die Reinheit der Separation wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) von isolierten Zellen eines Normalprobanden-Kollektives (n=3) kontrolliert.

### *3.3. RNA Isolation und Aufreinigung*

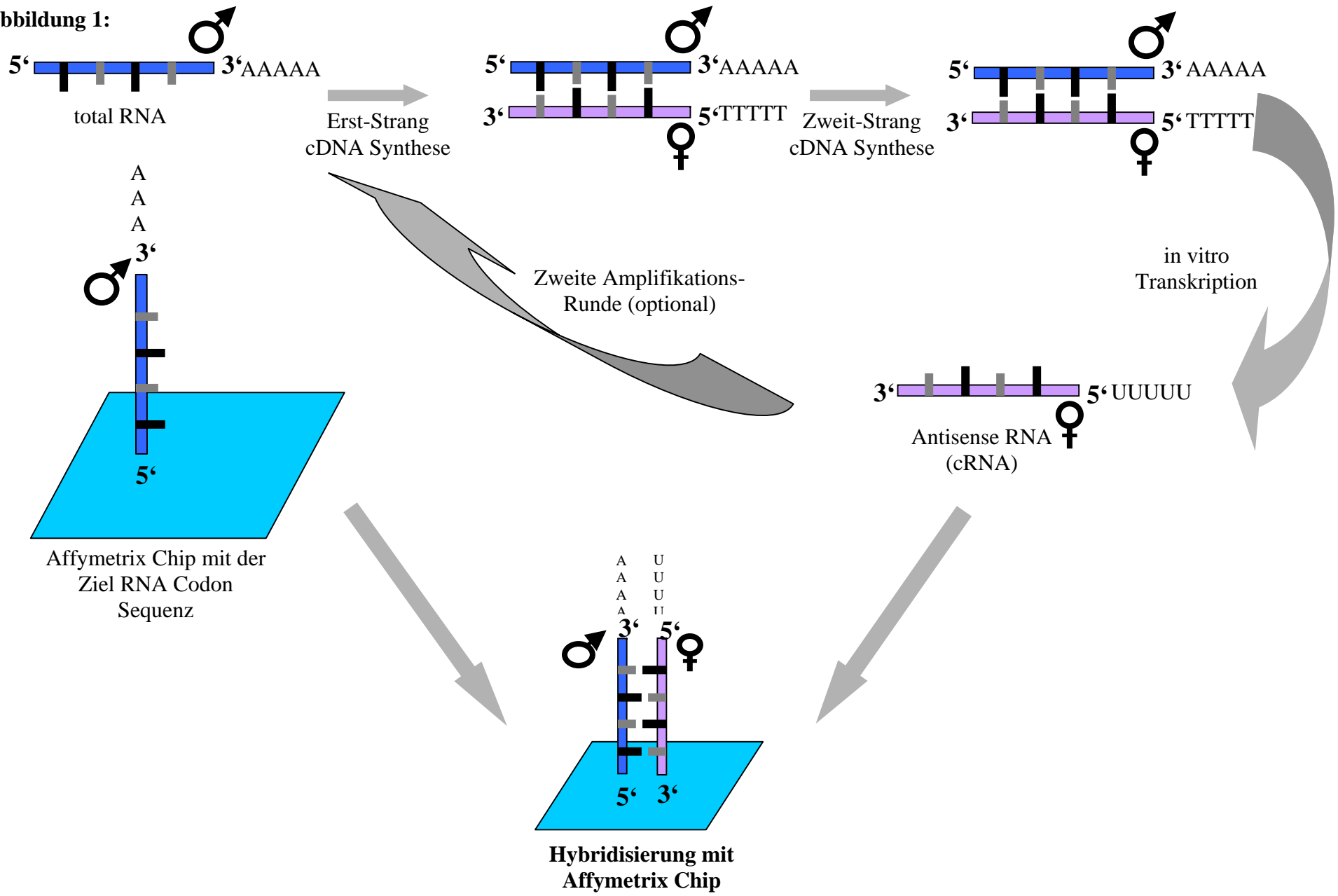
Nach Separation der Monozyten erfolgte die Präparation der total-RNA unter Verwendung des RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden). Zur Entfernung eventueller DNA Verunreinigungen wurde die isolierte RNA einer zusätzlichen Aufreinigung mit DNA-se Verdau unterzogen (RNA Clean Up Kit, Qiagen, Hilden). Im Anschluss erfolgte eine Reinheits- und Qualitätskontrolle jeder Probe mittels Kapillarelektrophorese (Agilent Bioanalyzer 2001, Agilent, Palo Alto).

### *3.4. cRNA-Synthese und Microarray Hybridisierung*

Um eine ausreichende Hybridisierung des Arrays zu erreichen, ist eine Mindest-Menge an RNA unerlässlich. Für das in der vorliegenden Untersuchung herangezogene Affymetrix-System sind mindestens 15µg total-RNA als Ausgangsmaterial erforderlich. Aus der Menge an Monozyten, die in der oben beschriebenen Technik aus dem peripheren Blut von polytraumatisierten Patienten gewonnen wurde, ließ sich zwischen 2µg und 5µg Gesamt-RNA isolieren. Eine Steigerung der Menge an Blut ist aus klinischen Gründen nicht möglich.

Daher war es unumgänglich, die Menge an isolierter RNA mittels Zwei-Schritt Amplifikation entsprechend den Angaben des Herstellers Affymetrix zu vermehren. Die Technologie der Hybridisierung und Fluoreszenz Markierung ist für den Affymetrix Chip eine gut etablierte und validierte Methode (31;33). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die cRNA während der zweiten Amplifikationsrunde mittels Biotin markiert wurde (ENZO Bio Array High Yield Transcript Labeling Kit T7 Enzo Life Science Inc., Farmingdale, NY, USA). Im Anschluss daran wurden die Proben der Patienten auf die Chips aufgetragen und mit diesen für 16 Stunden bei 45°C hybridisiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde dann Streptavidin auf die Arrays gegeben, welches an den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin gekoppelt ist. Dieses Streptavidin bindet an die Biotin-markierte cRNA, die Menge an hybridisierter Patienten cRNA ist damit direkt proportional zur Stärke des Fluoreszenzsignals. Abbildung 1 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der Amplifikation.

Abbildung 1:



**Abbildung 1: Schema der RNA-Amplifikation und Microarray Hybridisierung:** Die schematische Graphik demonstriert die wichtigsten Schritte der Verarbeitung von RNA nach Isolation aus Monozyten polytraumatisierter Patienten. In blau dargestellt sind RNA-Stränge, in rot synthetisierte cDNA-Stränge. Ausgehend von der isolierten Patienten RNA (sense) wird zunächst mittels Erstrangsynthese anti-sense cDNA gebildet. Danach werden die Stränge getrennt, die RNA verworfen und im Rahmen der Zweitstrangsynthese mit sense-cDNA aufgefüllt. Diese Doppelstränge werden erneut aufgetrennt und mit antisense cRNA aufgefüllt. Um die Menge an cRNA zu erhöhen, wird diese erneut in den Kreislauf der cDNA Synthese eingeschleust und wiederum mittels cRNA aufgefüllt. Weiter wird die anti-sense cRNA Fluoreszenz-markiert und auf den Array inkubiert. Die markierten Sequenzen hybridisieren nun mit den charakteristischen komplementären Gegenstücken, welche auf der Membran aufgebracht sind. Die Menge an cRNA (und damit das fluoreszierende Signal) ist dabei direkt proportional der Menge an vorhandener RNA in der Patientenprobe. Durch Vergleich zweier Arrays miteinander kann nun anhand der Stärke des Signals eine Herauf- oder Herunterregulierung des jeweiligen Gens ermittelt werden.

### 3.5. Low Level Statistik

Die biostatistische Auswertung der Microarrays erfordert aufgrund der großen Anzahl an untersuchten Faktoren (22.283 *Probe Sets*) ein Mehrschritt-Verfahren, welches bereits in einigen Studien ähnlich der hier vorgestellten zur Anwendung gekommen ist.

(31;33). Zentraler Hintergrund dieses Verfahrens ist, dass bei Genom-weiten Expressionsuntersuchungen an menschlichen Individuen eine so erhebliche inter-individuelle Variabilität vorliegt, dass eine sinnvolle „Normal“ Kontrolle nicht etabliert werden kann. Daher zielt die Auswertungsstrategie von solchen Untersuchungen darauf ab, die individuelle Expression über die Zeit anhand mehrerer sequentieller Proben zu beobachten (in unserem Fall von der Aufnahme des Patienten bis 72 Stunden nach der Verletzung).

Dieses Mehrschritt-Modell sieht dabei zunächst eine *low-level* Analyse der Rohdaten vor, in der die Normalisierung sowie die Identifikation und Eliminierung von Ausreißern erfolgt. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale generiert Daten als *chromophore equivalents/ $\mu\text{m}^2$  in counts per second per molecule* oder kurz [CPSM]. Diese Daten werden im Rahmen der *low-level* Analyse anhand des dChip Algorithmus auf die mittlere Intensität aller untersuchten Arrays normalisiert [Überblick der dChip Normalisierungsalgorithmen: (104)]. Die CPSM wurde mittels Microarray Suite Software (MAS 5.0, Affymetrix) detektiert. Anhand dieser Signale erfolgte zunächst die Normalisierung der Daten auf die mittlere Intensität aller untersuchten Arrays mit dem Softwareprogramm dChip (Wong Lab., Dep. of Biostatistics, Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA). Ziel dieser Normalisierung war es, die technische Qualität der Hybridisierung zu bemessen und diejenigen Chips als Ausreißer zu identifizieren, welche aufgrund technischer Abweichung ihrer Signale (ungleichmäßige Hybridisierung etc.) keine sinnvolle Auswertung zulassen. Diese Technik der „*low-level*“ Daten Analyse ist gut etabliert und Standard in der Auswertung von Affymetrix Chips (31;33).

### 3.6. High Level Statistik

Die so aufbereiteten Daten werden dann einer *high-level* Analyse unterzogen. Diese unterteilt sich in eine „*unsupervised*“ und eine „*supervised*“ Analyse zur Beschreibung der Verteilung unterschiedlicher Expressionsmuster von Patienten. Danach wurde mittels unterschiedlicher mathematischer Vorhersage-Modelle überprüft, ob anhand der identifizierten Muster die Klassifizierung von Patienten in relevante klinische Gruppen möglich ist. Dieses Klassifikationsexperiment dient zweierlei: Zum einen ist es als weiteres, unabhängiges statistisches Kontrollelement zu verstehen, zum anderen dient es im Falle der Analyse: Überleben/Versterben als klassisches, pseudo-prospektives Vorhersagemodell. Zusätzlich wurde mittels eines stochastischen Algorithmus berechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit

die berechneten Ergebnisse allein durch Zufall gewonnen worden wären [Monte Carlo Simulationen; Übersicht siehe (113)]. Die biostatistischen Berechnungen werden im Folgenden im Detail dargestellt.

### 3.6.1. Unsupervised Analyse und hierarchische Cluster-Analyse

Diese Art der biostatistischen Auswertung wurde so benannt, da die Daten der Arrays ohne Kenntnis der klinischen Herkunft auf Ko-expression bzw. Ko-Varianz der Expression einzelner Proben untersucht werden (*unsupervised*). Zielparameter ist dabei der Variationskoeffizient VK (Standardabweichung geteilt durch Mittelwert) der Expression jedes einzelnen Faktors, berechnet anhand aller zur Auswertung anstehender Arrays. Findet sich dabei ein  $VK > 0,5$ , wird die Expression des Faktors als überzufällig gewertet. Die dabei detektierten Gene werden anhand einer hierarchischen Cluster-Analyse – erstmals beschrieben von Eisen et al. (25) – so angeordnet, dass ähnliche Veränderungen nebeneinander gestellt werden. Die hierfür charakteristische Darstellungsform als Cluster-Dendrogramm ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Dabei wird der relativen Änderung der Genexpression jedes einzelnen Faktors eine Farbe zugeteilt. Rot steht für vermehrte Expression und grün für verminderte bezogen auf die mittlere Intensität aller *Probe Sets*. In der hierarchischen Cluster-Analyse werden diejenigen Arrays mit ähnlicher Veränderung ihrer Expression nebeneinander angeordnet mit dem Ziel, deskriptiv die Ähnlichkeit der RNA Expression unterschiedlicher Proben darzustellen. Grundlage dieser graphischen Zusammenfassung von ähnlicher Genexpression als „Verwandtschaft“ ist die Berechnung des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten zwischen der Expression jedes individuellen *Probe Sets*. Zusammengefasst wird diese Ähnlichkeit in „Stammbäumen“ der Expression oberhalb des Graphs mittels eckiger Klammern. Je kleiner die eckige Klammer ist, und damit der räumliche Abstand zwischen zwei definierten Arrays im Graphen, umso größer ist deren Übereinstimmung. In größer werdenden eckigen Klammern werden ähnliche Arrays so zu

Gruppen zusammengefasst, dass je größer die Klammer umso größer der Unterschied zwischen den Arrays, so dass verschiedene Gruppierungen von ähnlich exprimierten Arrays übersichtlich erkennbar sind. Diese Methode ist ein gut etabliertes biostatistisches Verfahren (25). Die *unsupervised* Analyse dient damit als erster Überblick und kann deskriptiv folgende Fragen beantworten:

- i) welche Gene sind über ein zufälliges Maß hinaus verändert und
- ii) welche Probanden- oder Patienten-Proben, aus denen diese RNA gewonnen wurden, verhalten sich ähnlich.

### 3.6.2. *Supervised Analyse*

Im Rahmen der eingangs beschriebenen Mehrschritt-Auswertungsstrategie folgt die *supervised* Analyse. Ausgangspunkt dieser biostatistischen Auswertungsstrategie ist es, die Arrays in 2 Gruppen einzuteilen. Grundlage dieser Gruppierung ist dabei eine eindeutige klinische, dichotome Variable, welche die Herkunft des Probenmaterials von Probanden oder Patienten determiniert, beispielsweise gesunde und kranke Probanden und Patienten oder weibliche und männliche. Nachdem dem System diese Einteilung von Arrays zugeteilt wurde, vergleicht die Software die RNA Expression beider Gruppen mittels einer Analysis of variance (ANOVA) miteinander. Die *supervised* Analyse detektiert *Probe Sets*, die in diesen beiden Gruppen so unterschiedlich exprimiert sind, dass deren Signifikanzniveau  $p < 0,001$  beträgt. Die dabei ermittelten *Probe Sets* werden erneut nach oben genanntem Schema einer Cluster-Analyse zugeführt, ähnlich exprimierte Arrays nebeneinander dargestellt und das Ausmaß der Expressionsähnlichkeit anhand eines „Stammbaums“ oberhalb der Graphik visualisiert.

Die *supervised* Analyse versucht damit folgende Fragen zu beantworten:

Welche Faktoren sind in zwei Gruppen von Arrays signifikant unterschiedlich exprimiert?

Sind diese *Probe Sets* und damit auch deren Gene innerhalb einer Gruppe homogen verteilt und weisen damit darauf hin, dass die Ursache der RNA-Expression in der gemeinsamen klinischen Determinante liegen könnte?

In der vorliegenden Arbeit erfolgte anhand folgender klinischer Kriterien die Einteilung der Patienten in jeweils zwei, einander gegenübergestellte klinische Gruppen: Zur erneuten Validierung des Systems generell teilten wir unser Patientenkollektiv zunächst anhand des Geschlechts in zwei Gruppen ein und identifizierten damit *Probe Sets*, anhand derer Expression sich eine eindeutige Zuordnung des Geschlechts des Patienten durchführen ließ. Nachdem dieses „*Proof of Principle*“ erbracht war, wurden weitere klinische Gruppen gebildet. Anhand der Verletzungsschwere nach ISS wurden die Patienten in die klinische Gruppe 1 eingeteilt, wobei schwerer verletzte Patienten (ISS>40 Punkte) der Gruppe 1a, weniger schwer verletzte Patienten der Gruppe 1b zugeordnet wurden. Massentransfundierte Patienten, die innerhalb der ersten 24h nach Trauma mehr als 10 Erythrozytenkonzentrate erhalten hatten, wurden in Gruppe 2a eingeteilt, solche mit geringerem Transfusionsbedarf in Gruppe 2b. Bei Patienten in Gruppe 3a wurde der MOF Score mit mehr oder exakt 4 Punkten beziffert, Patienten mit einem MOF-Score unter 4 Punkten wurden in Gruppe 3b eingeteilt. Schließlich bildeten wir eine vierte Gruppe, wobei Patienten in Gruppe 4a das Trauma innerhalb 90 Tage verstorben waren, Gruppe 4b subsumiert die überlebenden Patienten.

Die *supervised Cluster-Analyse* ist damit ebenfalls eine rein deskriptive Methode, deren Ergebnisse erlaubt keine prospektive Einteilung in die entsprechende klinische Gruppe. Um diese deskriptive Statistik in eine quantitative Einteilung der Patienten in Gruppen in einem Zeitfenster vom Zeitpunkt der Probengewinnung bis 72 Stunden nach Unfall vornehmen zu können, ist die Berechnung von mathematischen Vorhersage-Modellen anhand der Genexpression erforderlich.



### 3.6.3. Statistische Vorhersage-Modelle

Für die vorliegende Untersuchung wurden 6 verschiedene Algorithmen zur Berechnung der Daten der RNA Expressionen der Arrays herangezogen, welche sich für derartige Auswertungen als am geeignetsten erwiesen haben [*Compound Covariate Model, Diagonal Linear Discriminant Model, 1-nearest Neighbour Model, 3-nearest Neighbour Model, Nearest Centroid Model, Support Vector Machine Model*, Übersicht über die detaillierten biostatistischen Algorithmen siehe BRB Array tools (110)]. Zielparameter dieser Berechnung ist die Sensitivität und Spezifität der Klassifizierung von Patienten anhand ihrer individuellen RNA Expression in die oben genannten, verschiedenen klinischen Gruppen. Als interne Kontrolle dieses methodischen Vorgehens wurden die 6 Vorhersagemodelle zunächst mit den *Probe Sets*, die als potentielle Klassifikatoren des Geschlechts identifiziert worden waren, durchgeführt. Im Anschluss wurden die Trefferquoten bestimmt, welche die korrekte Klassifizierung der Patienten in diese beiden Gruppen aufgrund ihrer individuellen Genexpression erlauben. Dies ist eine sehr elegante biostatistische Methode zur Überprüfung der Qualität der Auswertungsstrategien, da diese Verteilung ebenfalls eine dichotome Variable mit eindeutiger Klassifizierung in 2 Gruppen erlaubt. Darüber hinaus ist es für die Qualität der Aussage förderlich, wenn die numerische Verteilung der klinischen Gruppen ähnlich ist, wie in unserem Fall: überleben/versterben: 10 zu 3 und männlich zu weiblich 11 zu 2. Im Anschluss wurden diese pseudo-prospektiven Vorhersagen mittel der 6 Vorhersagemodelle mit allen hinsichtlich der jeweiligen klinischen Parametern identifizierten *Probe Sets* berechnet. Zum Ausschluss der Möglichkeit, dass die Ergebnisse solcher Prädiktions-Berechnungen anhand von zufällig vorliegenden Daten ermittelt werden können, werden zur mathematischen Gegenprobe des Verfahrens identische Rechenoperationen anhand von zufällig erstellten Array Ergebnissen angefertigt. Diese als Monte-Carlo Simulation beschriebene Technik ist ein etabliertes Verfahren der Biostatistik und wird als Qualitätssicherung von Vorhersage-modellen durchgeführt. Dabei werden mehr als 2000

Simulationen angefertigt, um anhand einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  die Möglichkeit weitgehend ausschließen zu können, dass unsere Schlußfolgerungen anhand von zufällig entstandenen Daten durchgeführt wurden.

Die Berechnung von Vorhersagemodellen versucht damit die Frage zu beantworten:

i) in welchem Prozentsatz werden Patienten anhand ihrer individuellen RNA Expression korrekt in eine von zwei vorgegebenen klinischen Gruppen eingeteilt.

Damit geht die Auswertung über ein rein deskriptives Beschreiben ähnlicher RNA Expressionsverteilungen, wie in den *unsupervised/supervised* oder Cluster-Analysen hinaus und versucht die Daten hinsichtlich eines mechanistischen Ansatzes zu bearbeiten. Hierbei ist zu bemerken, dass die Berechnung der Vorhersagemodelle nicht nur einer pseudo-prospektiven Klassifizierung der Patienten anhand ihres klinischen Verlaufs, wie zum Beispiel bei der Entwicklung eines multiplen Organversagens oder des Versterbens dient. Vielmehr besteht die Option, diese Modelle als unabhängiges und zusätzliches Kontrollorgan der vorangegangenen Statistik zu verwenden, dies gilt vor allem für die Analysen hinsichtlich Verletzungsschwere und Bluttransfusion. Abbildung 2 fasst die statistische Auswertestrategie der *high* und *low level* Analyse zusammen. Der biologische Kontext der identifizierten Faktoren lässt sich im Anschluss anhand von *Pathway*-Analysen verfolgen.

Abbildung 2:

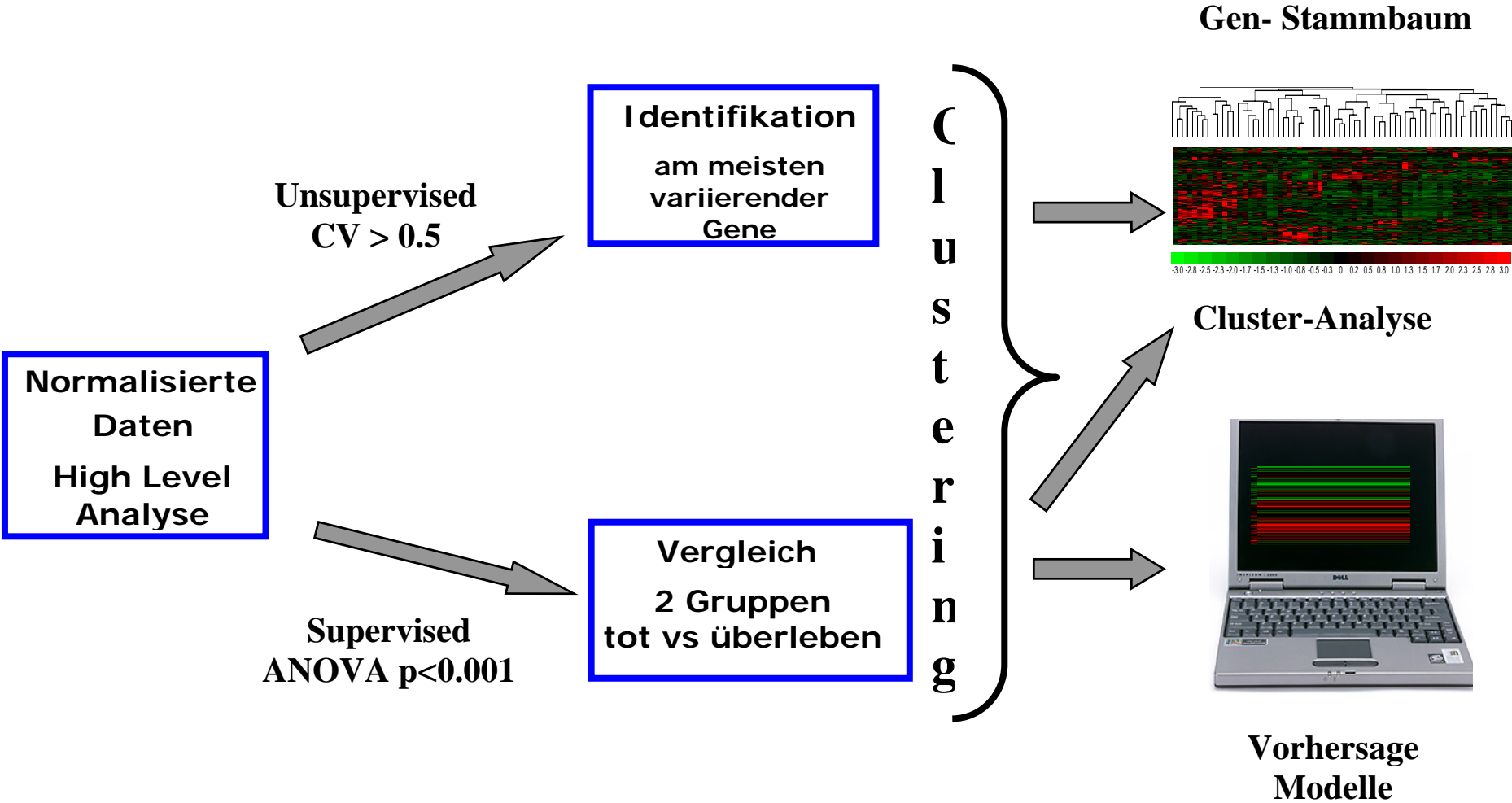
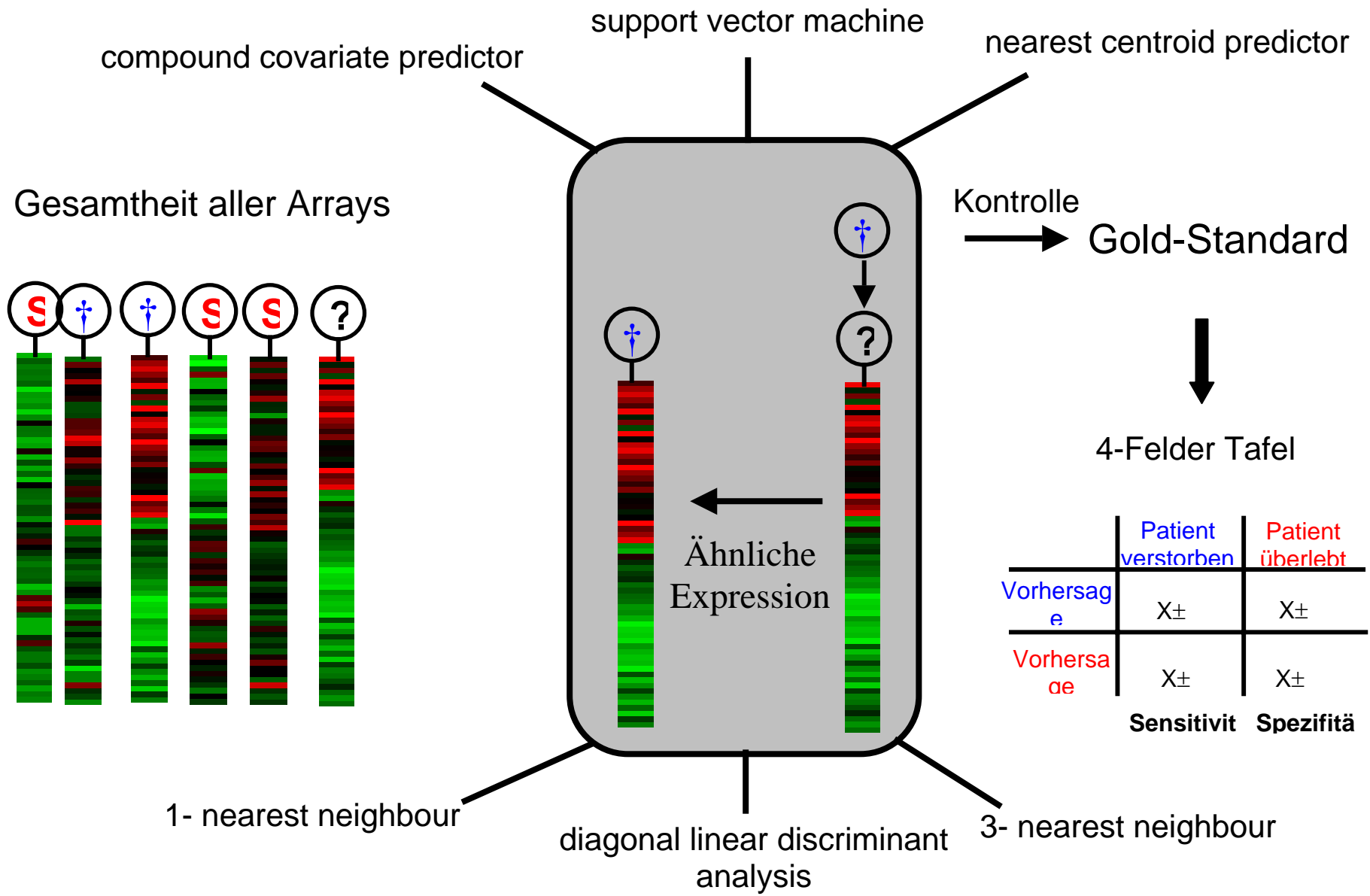


Abbildung 3:



**Abbildung 2: Überblick über die mehrstufige biostatistische Auswertestrategie:** Dieses Schema stellt die einzelnen Schritte der biostatistischen Auswertung dar. An erster Stelle steht dabei die Normalisierung der Daten in der low Level Analyse. Im Anschluss werden die Daten einer unsupervised Analyse unterzogen, bei der - ohne dem System eine klinische Information einzuspielen, die Probe Sets herausgefiltert werden, die einen größeren Variationskoeffizienten als 0,5 aufweisen. Bei der supervised Analyse werden die Arrays anhand der klinischen Zugehörigkeit der Patienten dichotom aufgeteilt und eine ANOVA zwischen beiden Gruppen berechnet. Probe Sets, deren Expression auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0.001$  zwischen den konträren Gruppen differiert, werden identifiziert. Nachdem die Probe Sets mittels unsupervised oder supervised Methode herausgefiltert worden sind, können sie einer hierarchischen Clusteranalyse zur Visualisierung der Expressionsmuster zugeführt werden.

**Abbildung 3: Prinzip der Vorhersagemodelle mittels Leave-One-Out-Cross Validation:**

Zur Quantifizierung der lediglich deskriptiven Ergebnisse der Cluster-Analyse wurden die in der Abbildung genannten 6 verschiedenen Vorhersagemodelle berechnet. Dabei wird nach und nach ein einzelnes Array aus der Gesamtheit entnommen und deren klinische Herkunft – beispielsweise ob es von einem verstorbenen oder überlebenden Patienten stammt – verblindet. Im Anschluss wird dasjenige Array aus der Gesamtheit der übriggebliebenen herausgesucht, dessen Expressionsmuster mit dem „unbekannten Array“ am ähnlichsten ist. Je nachdem, ob es sich bei dem ähnlichsten Array um das eines verstorbenen oder überlebt habenden Patienten handelt, wird das „unbekannte Array“ in eine der beiden Gruppen eingeordnet. Dieses Prinzip wird bei allen Arrays angewandt und zuletzt mit der tatsächlichen klinischen Situation verglichen. Die Sensitivität und Spezifität der Klassifikation wird schließlich in einer 4-Felder Tafel als Mittel  $\pm$  SD aller 6 Modelle angegeben. Bei der mathematischen Feststellung der Expressionsähnlichkeit liegt dabei jedem Vorhersagemodell ein anderer biostatistischer Berechnungsalgorithmus zugrunde.

### 3.7. Pathway Analysen

Um die biologische Bedeutung der in den oben beschriebenen biostatistischen Auswertungsstrategien erfassten Faktoren in den biologischen Kontext aktueller Konzepte der posttraumatischen Entzündungsreaktion stellen zu können, wurden die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Ergebnisse anhand einer speziellen Software auf ihren biologischen Zusammenhang untersucht. Wie eine Straßenkarte die Verbindung zwischen verschiedenen Orten darstellt, visualisiert dieser *Pathway* die Verbindungen zwischen verschiedenen Faktoren und erzielt damit eine erheblich übersichtlichere Darstellung der großen Anzahl an untersuchten Faktoren. Hierfür steht ein kommerziell erhältliches Programm mit dem Namen *Ingenuity* (*Ingenuity Systems*®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) zur Verfügung, welches bislang weitgehend von Forschungsgruppen der pharmazeutischen Industrie zur Bestimmung potentieller therapeutischer Ziele anhand von Array Daten genutzt wird. Grundlage des Programms ist eine umfangreiche Datenbank, welche auf dem aktuellen Kenntnisstand der wissenschaftlichen Literatur (U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA) basiert und die biologische Verbindung zwischen einzelnen Faktoren in einer zweidimensionalen Graphik visualisiert. Anhand unterschiedlicher Symbole zwischen den Faktoren wird die Qualität der Verbindung charakterisiert (Aktivierung, Deaktivierung, Phosphorylierung etc.). Ziel dieser Art der Analyse und Darstellung ist es, die große Anzahl an Ergebnissen, welche aus Array Experimenten entsteht, in eine übersichtliche Matrix umzuwandeln. Zudem besteht mit diesem Programm die Möglichkeit, spezielle biologische Signalkaden, die mit der jeweiligen Analyse signifikant assoziiert sind, zum Beispiel die des Ephrin Pathways, mit der klinischen Zugehörigkeit des Patienten zu korrelieren.

Die Pathway Analyse versucht damit folgende Frage zu beantworten:

- i) gibt es unter denjenigen *Probe Sets* bzw. deren korrespondierenden Genen, welche eine klinische Klassifikation von Patienten erlauben, solche Faktoren, die in einem sinnvollen biologischen Zusammenhang stehen und
- ii) lassen sich dabei gefundene *Pathways* in den Kontext aktueller Hypothesen zur Entwicklung und Ausprägung der posttraumatischen Immunreaktion, wie in Abschnitt 1 dargelegt, stellen.
- iii) zeichnen sich unter der Gesamtheit der identifizierten Faktoren hinsichtlich eines bestimmten klinischen Parameters Gene ab, die mit spezifischen, biologisch-funktionellen Pathways assoziiert sind.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Patienten und klinische Daten

13 Patienten (11 männliche, 2 weibliche) wurden gemäß der Einschlusskriterien in die Studie eingeschlossen. Die epidemiologischen Daten der eingeschlossenen Patienten wie Alter und Geschlecht sowie klinische Angaben wie Verletzungsmuster und Verletzungsschwere berechnet nach ISS oder der Bedarf an Blutprodukten (Erythrozytenkonzentrate und *Fresh Frozen Plasma*; je 300ml pro Einheit) innerhalb der ersten 72h nach dem Trauma sind in Tabelle 1 aufgelistet. Das Alter der Patienten variierte zwischen 19 und 65 Jahren, die Verletzungsschwere zwischen 19 und 75 Punkten mit einem Mittel ( $\pm$  SD=Standardabweichung) von 40 ( $\pm$ SD). Vier Patienten mussten aufgrund des hohen Blutverlustes innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma einer massiven Substitution an Sauerstoffträgern unterzogen werden, wobei im Mittel ( $\pm$ SD) in dieser Gruppe (2a) 25,5 ( $\pm$  6.1) Einheiten Erythrozytenkonzentrate transfundiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden Patienten aus Gruppe 2a mit durchschnittlich 4.1 ( $\pm$ 3.6) Einheiten substituiert. Neun der 13

Patienten entwickelten im posttraumatischen Verlauf bis 72h Zeichen eines Multiorganversagens, objektiviert mittels MOF-Score  $\geq 4$  Punkten. 3 Patienten waren im späteren posttraumatischen Verlauf (90-Tage) verstorben.

#### 4.2. Probengewinnung und Zellseparation

Zunächst wurden Kontrollexperimente an 3 gesunden Probanden zur Sicherung der Monozyten-Präparation durchgeführt. Dabei wurden die Zellisolate mittels FACS gegen das Monozyten-spezifische Oberflächen-Antigen CD14 gemessen und eine Reinheit von  $87\pm 3\%$  ermittelt. Das Epitop CD14 kann auch auf der Oberfläche von aktivierten neutrophilen Granulozyten exprimiert werden (4). Eine derartige Kontamination in unseren Proben konnte jedoch mittels *side scatter*-Analyse im FACS ausgeschlossen werden. Von einem entsprechenden Reinheitsgrad ist auch bei der Isolation von Monozyten aus Patientenblut auszugehen. Aufgrund des limitierten Patientenmaterials musste allerdings auf eine tatsächliche Überprüfung verzichtet werden.

#### 4.3. Low Level Microarray Datenanalysen

Das Studienprotokoll sah 6 Blutabnahmen an 13 Patienten vor, so dass sich eine theoretische Anzahl von 78 Arrays errechnet. Zu 5 verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlicher Patienten konnten keine Proben gewonnen werden, da die Patienten als zu instabil eingeschätzt wurden, um die Belastung einer zusätzlichen Blutentnahme zu tolerieren. Von den verbleibenden 73 untersuchten Arrays wurden 5 Chips von der dChip Software als Ausreißer identifiziert und von weiteren Analysen ausgeschlossen. Von den untersuchten 22.283 *Probe Sets* der verbleibenden 68 Arrays überstieg die Signalintensität von 14 725 die basale Fluoreszenzintensität (Normalisierung) und wurden somit als Signal-gebend in die Berechnungen einbezogen. Im Gegensatz dazu fand sich bei 7558 Proben kein ausreichendes Hybridisierungssignal, diese wurden nicht in die weitere Datenanalyse eingeschlossen.



**Tabelle 1:**

<b>Patienten ID</b>	<b>Verletzungsmuster</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>ISS</b>	<b>MOF</b>	<b>EK</b>	<b>FFP</b>
1	Lungenkontusionen beidseits, komplette Amputation untere Extremität beidseits	53	w	32	nein	8	17
2	Schweres SHT, komplexe Mittelgesichtsfrakturen	19	m	29	ja	2	6
3	Lungenkontusionen beidseits, Wirbelfraktur, komplexe Frakturen untere Extremität	48	m	34	nein	10	6
4	Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Multiple Frakturen obere/untere Extremität	53	m	19	nein	1	0
5	Leichtes SHT, Lungenkontusionen beidseits, subtotale Amputation untere Extremität	38	m	33	ja	25	22
6	Lungenkontusionen beidseits mit Hämato-pneumothorax, Myokardkontusion, , Rippenserienfraktur beidseits, Zwerchfellruptur mit Herniation, Milzruptur; Mesenterialwurzeleinriß, Mesosigmaeinriß, Symphysensprengung, multiple Frakturen obere und untere Extremität	60	m	50	ja	31	38
7	Mittleres SHT, Mittelgesichtsfraktur, Lungenkontusionen beidseits mit Pneumothorax, Rippenserienfraktur, Wirbelfraktur, Fraktur untere Extremität	36	m	29	ja	0	0
8	Schweres SHT, Lungenkontusionen beidseits, Rippenserienfraktur, Wirbelkörperfrakturen mit inkomplettem Querschnittssyndrom, Amputation rechte obere Extremität, Femurfraktur	44	m	57	ja	17	20
9	Le Fort II, Lungenkontusionen beidseits mit Hämato-pneumothorax, Rippenserienfraktur, multiple, komplexe Frakturen obere Extremität mit Ruptur der A. axillaris, Wirbelfrakturen.	46	m	34	ja	29	21
10	Thorakale Aortenruptur, "Open-book"-Beckenfraktur, Wirbelfrakturen, Leber,- und Milzruptur, Nierenkontusion, multiple Frakturen untere Extremität	36	m	54	ja	8	10
11	Rippenfrakturen, Leber,- und Milzruptur, Nierenruptur, multiple Frakturen untere Extremität	54	m	41	ja	3	5
12	Schweres SHT, multiple, komplexe Mittelgesichtsfrakturen, multiple Frakturen obere Extremität	28	f	75	ja	4	0
13	Rippenserienfraktur, Lungenkontusionen beidseits mit Pneumothorax, Amputation untere Extremität	65	w	29	nein	1	0

***Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der eingeschlossenen Patienten:***

*ISS=Injury Severity Score; EK=Erythrozytenkonzentrate, eine Einheit entspricht ca. 300ml;*

*FFP= Fresh Frozen Plasma, eine Einheit entspricht ca. 300ml, Vorliegen einer Multi-Organ-*

*Dysfunktion anhand des MOF  $\geq 4$  Punkte.*

*4.4. High Level Microarray Datenanalyse*

Nach Bearbeitung der Rohdaten durch Normalisierung und anschließender Identifikation und Elimination von Ausreißern kann der verbliebene Datensatz der eigentlichen biostatistischen Auswertung zugeführt werden. Dabei wird nach einem Stufenschema vorgegangen, das zunächst eine überblickserschaffende *unsupervised* Analyse mittels Variationskoeffizienten (VK) vorsieht, im Anschluss daran eine *supervised* Analyse zur Identifikation von unterschiedlich Exprimierten Genen hinsichtlich konträrer klinischer Entitäten mittels ANOVA. Die durch VK und ANOVA Berechnung identifizierten Gene werden im Anschluss einer hierarchischen Cluster-Analyse zur Visualisierung des Expressionsunterschieds zugeführt. Schließlich wurden zur Untersuchung der biologisch-funktionellen Bedeutung der identifizierten Faktoren von jedem Expressionsprofil Pathway Analysen durchgeführt.

*4.4.1. Unsupervised Analyse*

Um aus der großen Anzahl von 14.725 Signal-gebenden *Probe Sets* diejenigen zu detektieren, die über den Beobachtungszeitraum von 72 Stunden eine Änderung ihrer Expression über ein zufälliges Maß hinaus aufwiesen, wurde die Expression jedes einzelnen *Probe Sets* über die Zeit gemittelt. Aus den daraus resultierendem Mittelwert und der korrespondierenden Standardabweichung wurde der Variationskoeffizient des *Probe Sets* ermittelt. Überstieg dieser den Wert 0,5 wurde das *Probe Set* als überzufällig verändert registriert. Dabei fanden sich 318 *Probe Sets* (280 Gene), deren Expressionsniveau den VK von 0,5 überschritt. Aufgrund der oben beschriebenen Besonderheiten eines Oligonucleotid Arrays wurden für

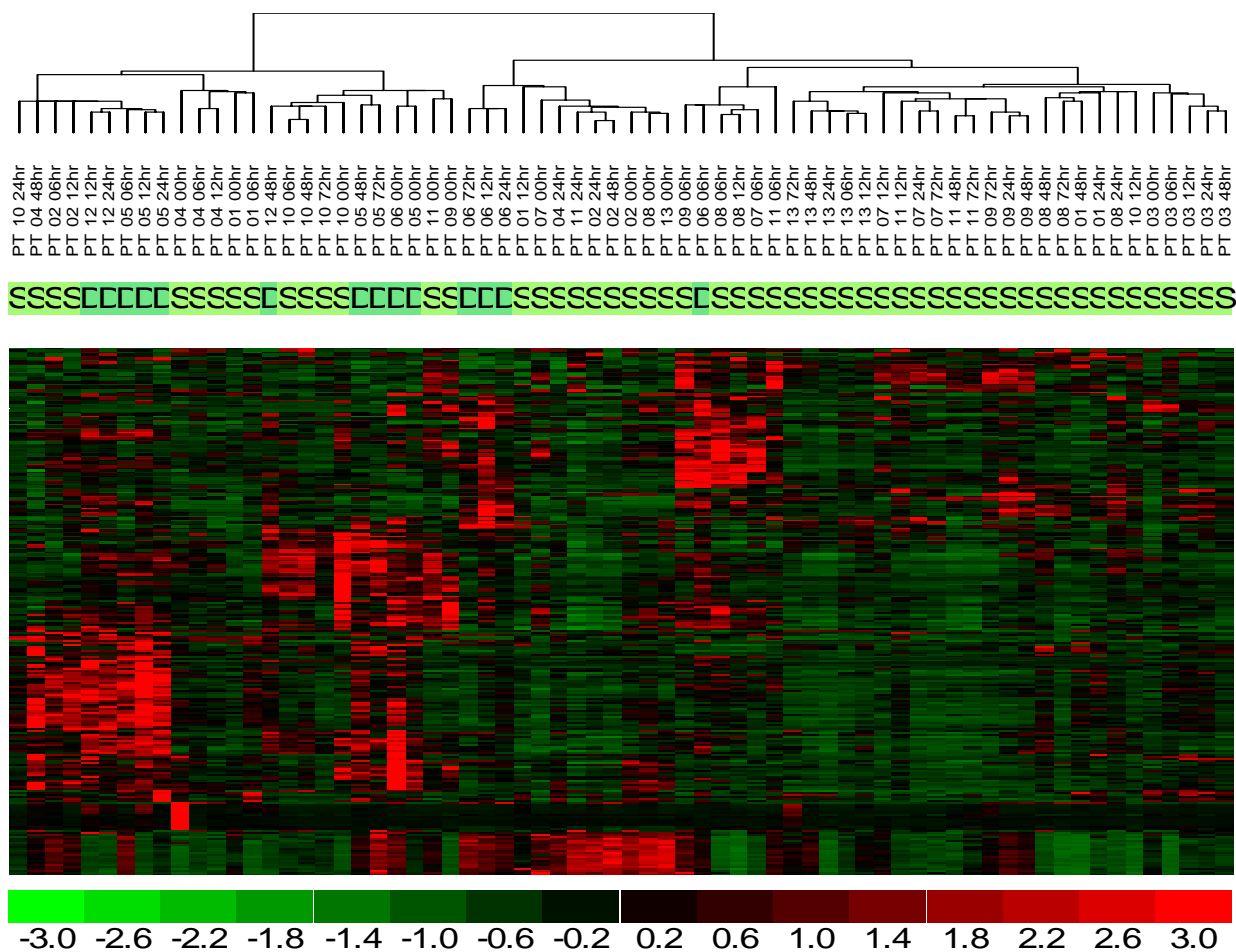
verschiedene Gene mit verschiedenen *Splice* Varianten mehrerer *Probe Sets* abgefragt. Daher repräsentieren dies 318 *Probe Sets* 280 Gene. Da die Beurteilung der Ergebnisse aber auch von diesen *Splice* Variablen beeinflusst werden kann, beziehen sich die Angaben im Folgenden auf *Probe Sets*. Diese 318 *Probe Sets* wurden von allen Patientenproben und Zeitpunkten in einer Cluster-Analyse zusammengefasst, welche in Abbildung 4 wiedergegeben ist. Bereits in dieser Untersuchung fällt auf, dass das Expressionsmuster dieser beiden Gruppen sich ähnlich verhält. Dies wird deutlich anhand der gemeinsamen Anordnung dieser Arrays nebeneinander. Darüber hinaus wird die Ähnlichkeit der Expression - quantitativ berechnet anhand von Pearsons Korrelationskoeffizienten - graphisch mittels eines Stammbaumes oberhalb der Graphik visualisiert. Dies ist bemerkenswert, da in diesem Schritt der Auswertungsstrategie dem Programm keine klinischen Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

Abbildung 4:

Array Dendrogramm

Patienten mit  
Abnahmezeitpunkt

Outcome



**Abbildung 4: Unsupervised Cluster-Analyse der Genexpression:** In diesem Graphen ist das Cluster der 318 Probe Sets aufgetragen, deren Variabilität über den Beobachtungszeitraum den VK von 0,5 überschritt. Arrays mit ähnlichem Expressionsmuster werden nebeneinander gruppiert. Zur besseren Übersichtlichkeit vergleichbarer Expressionsmuster wird ein „Stammbaum“ dieser gleichförmigen Veränderung oberhalb des Graphen aufgetragen. Die Ähnlichkeit der Expression zweier Arrays wird anhand einer kleinen eckigen Klammer dargestellt. Je größer die Klammer, umso divergierender ist die Expression (siehe Methoden). Bereits in dieser unsupervised Analyse fällt das ähnliche Expressionsmuster der Arrays von verstorbenen Patienten („D“, Deceased) gegenüber den Überlebenden („S“, survived) auf. Die Intensität der Farbe zeigt die Änderung der jeweiligen Genexpression gegenüber dem normalisierten Fluoreszenzsignal an; grün steht für weniger Expression als der Mittelwert, rot für mehr Expression und schwarz entspricht der mittleren Expression. Die Zahlen in der Farblegende geben den Faktor dieser Veränderung an.

#### 4.4.2. Supervised Analysen und Vorhersage-Modelle

Wie eingangs beschrieben liegt der supervised-Analyse die Klassifikation von Patienten in zwei Gruppen unterschiedlichen klinischen Verlaufes zugrunde. Hierzu wird der Software zu jedem individuellen Array die Information, in welche der beiden Gruppen der Patient eingeteilt wurde, übermittelt. Im Anschluss werden mittels ANOVA die Probe Sets herausgefiltert, die bei Patienten der einen klinischen Gruppe auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0.001$  unterschiedlich exprimiert sind als bei solchen, die der gegenübergestellten Gruppe angehören.

#### 4.4.2.1. Validierung mittels Geschlechtszugehörigkeit

Zur internen Validierung dieser statistischen Vorgehensweise teilten wir zunächst das Kollektiv anhand ihres Geschlechts in 2 klinische Gruppen ein. Mittels ANOVA konnten 63 *Probe Sets* identifiziert werden, deren Expression sich zwischen Männern und Frauen hochsignifikant unterschied ( $p < 0.001$ ). Diese Differenzierung ist auch auf der Cluster-Abbildung (Abbildung 5) sehr deutlich zu sehen. Die Möglichkeit, anhand der Expression dieser 63 *Probe Sets* das Geschlecht des jeweiligen Patienten pseudo-prospektiv anhand der 6 oben genannten statistischen Vorhersage-Modelle vorherzusagen, gelang mit einer Sensitivität von  $96\% \pm 6$  und einer Spezifität von  $99\% \pm 1\%$  (Mittel  $\pm$  SD). Besonders interessant ist, dass fast alle dieser 63 *Probe Sets* auf dem Y-Chromosom lokalisiert sind und zudem bei männlichen Patienten hochreguliert sind.

Abbildung 5:

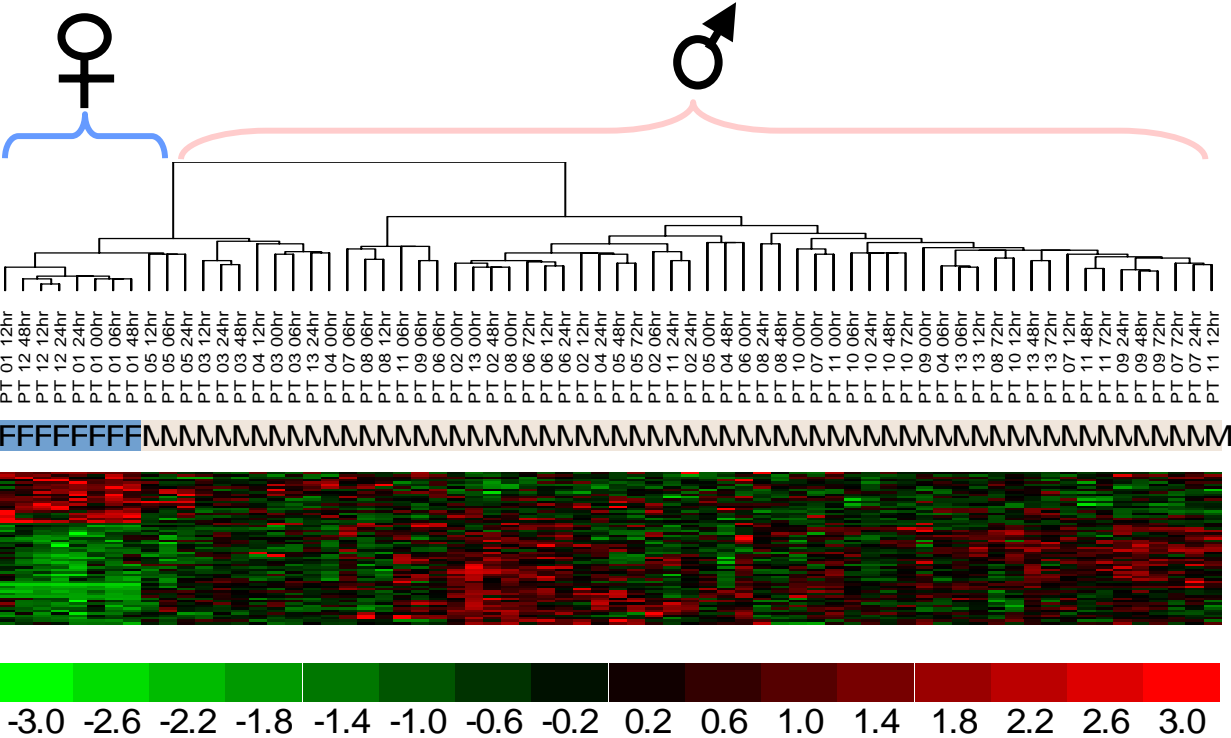


Abbildung 5: Supervised Cluster der Geschlechtszugehörigkeit – Validierung: Zu sehen ist die Cluster Analyse der 63 identifizierten Gene, die im Rahmen der Validierung als Klassifikatoren für das Geschlecht der Patienten dienen. Auf der rechten Seite befindet sich ein Cluster mit Arrays, die ausschließlich zu männlichen Patienten gehören (siehe beige Klammer), auf der linken Seite hingegen ein reines Cluster mit Arrays von weiblichen Patienten (blaue Klammer).

#### 4.4.2.2. *Verletzungsschwere*

295 *Probe Sets* (273 Gene) sind auf dem Signifikanzniveau von  $p < 0.001$  bei schwerer verletzten Patienten ( $ISS > 40$ ) hochsignifikant unterschiedlich exprimiert als bei weniger schwer polytraumatisierten Patienten ( $ISS < 40$ ). Unterzieht man diese differentiell exprimierten Gene einer hierarchischen Cluster-Analyse, so sieht man deutlich, dass Arrays von schwerer verletzten Patienten ein Sub-cluster auf der linken Seite bilden, während solche von weniger schwer Verletzten auf der rechten Seite gruppiert sind (Abbildung 6). Mit einer Sensitivität von  $75\% \pm 10\%$  und einer Spezifität von  $86\% \pm 9\%$  (Mittel  $\pm$  SD) lässt sich durch Berechnung der 6 verschiedenen Vorhersagemodelle die Verletzungsschwere anhand der Expression dieser 295 Gene pseudoprospektiv klassifizieren.

#### 4.4.2.3. *Bluttransfusion*

Hinsichtlich des Kriteriums „Massentransfusion“ konnten mittels ANOVA 224 *Probe Sets* (205 Gene) detektiert werden, die bei Patienten, die mit mehr als 10 Erythrozytenkonzentraten innerhalb der ersten 24h nach Trauma substituiert werden mussten, hochsignifikant unterschiedlich exprimiert sind im Vergleich zu Patienten mit geringerem Transfusionsbedarf ( $< 10$  EKs/24h). Betrachtet man die hierarchische Cluster-Analyse dieser Gene, so fällt auf, dass Arrays von Patienten nach Massentransfusion auf der rechten Seite clustern, im Gegensatz dazu sind die Arrays von nicht-massentransfunden Patienten in einem Sub-cluster auf der linken Seite der Abbildung gruppiert (Abbildung 7). Die Berechnung der Vorhersagemodelle ergab für dieses Gen-Set eine Klassifikationssensitivität  $86\% \pm 6\%$  von und eine Spezifität  $88\% \pm 10\%$  von (Mittel  $\pm$  SD).



Abbildung 6:

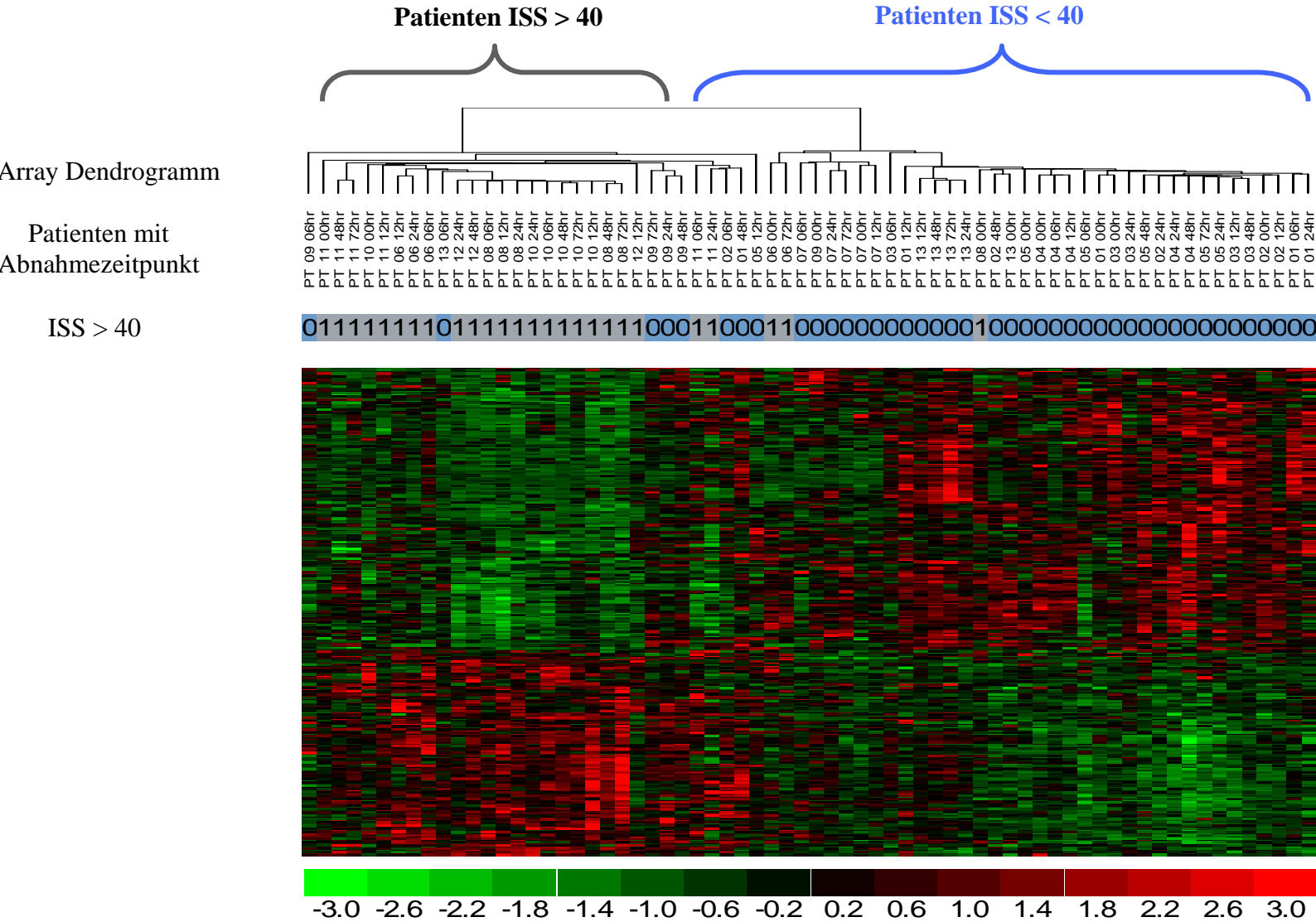
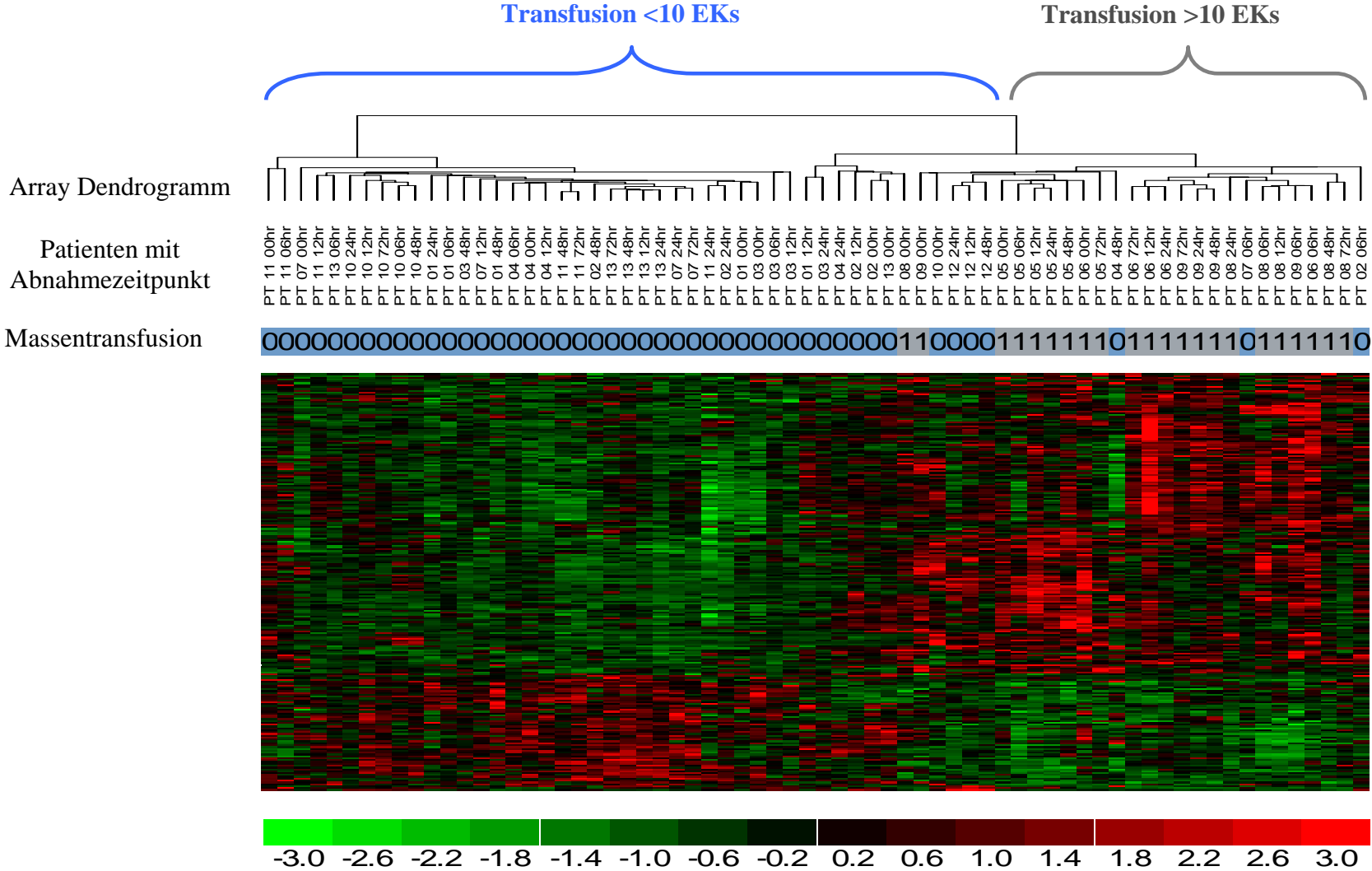


Abbildung 7:



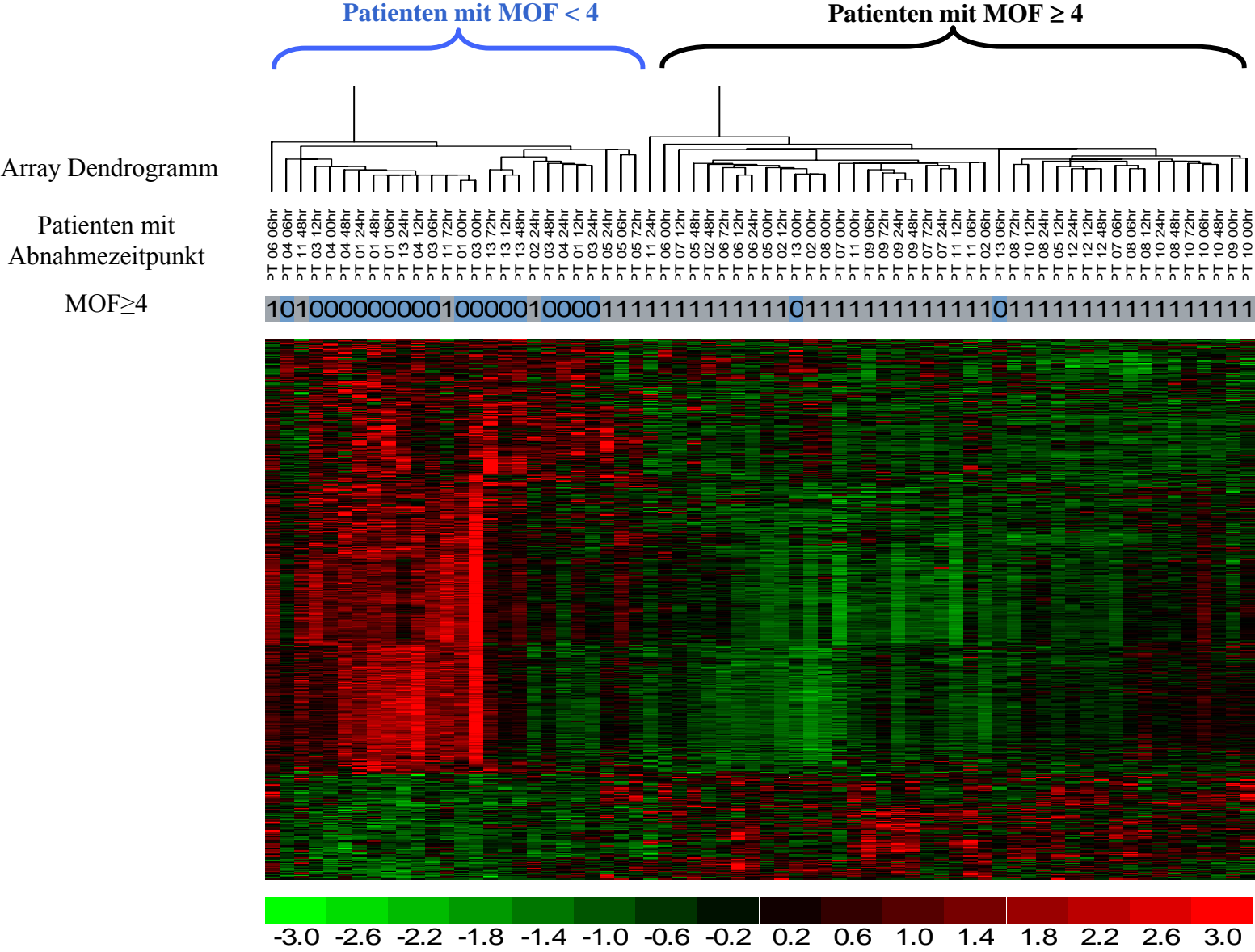
**Abbildung 6: Supervised Clusteranalyse der Verletzungsschwere:** Diese Abbildung zeigt die Cluster-Analyse der 295 Probe Sets, sich in Abhängigkeit des ISS des Patienten als differentiell exprimiert zeigten. Das Cluster auf der linken Seite gruppiert ausschließlich Patienten mit einem ISS über 40 (graue Klammer), wobei im Cluster auf der linken Seite hauptsächlich Arrays von weniger schwer polytraumatisierten Patienten zusammengefasst sind (blaue Klammer).

**Abbildung 7: Supervised Clusteranalyse des Transfusionsbedarfs:** Patienten, die innerhalb von 24h nach Trauma mit mehr als 10 Erythrozytenkonzentraten versorgt werden mussten, gelten als massentransfundiert. Deren Arrays sind in der Cluster-Analyse klar von solchen Arrays von Patienten mit geringerem Transfusionsbedarf (siehe linke Seite, blaue Klammer) getrennt und clustern auf der rechten Seite des Graphen (graue Klammer).

#### 4.4.2.4. Multiples Organversagen

Zur Identifikation von Genen, die je nach Ausprägung eines multiplen Organversagens – bestimmt mittels MOF-Score – eine unterschiedliche Regulation aufweisen, teilten wir das Patientenkollektiv erneut in 2 Gruppen. Die ANOVA ergab in diesem Fall 660 differentiell exprimierte *Probe Sets* (642 Gene). Deren unterschiedliche Expression ist ebenfalls eindeutig in der Cluster-Analyse (Abbildung 8) zu sehen, auf der rechten Seite findet sich ein Cluster mit Arrays von Patienten, die einen MOF Score über 4 Punkten aufwiesen, auf der linken Seite sind fast ausschließlich Arrays von Patienten ohne Anzeichen für ein manifestes Multiorganversagen zu finden. Quantitativ lässt sich dieser Unterschied durch die Vorhersagekalkulation mit einer Sensitivität  $78\% \pm 3\%$  von und einer Spezifität von  $78\% \pm 7\%$  (Mittel $\pm$ SD) ausdrücken.

Abbildung 8:



**Abbildung 8: Supervised Cluster-Analyse multiples Organversagen:** Dieser Graph zeigt die supervised Cluster-Analyse der 660 Probe Sets, die je nach Ausprägung des Multiorganversagens einer differentiellen Genexpression unterliegen. Die graue Klammer auf der rechten Seite subsummiert Arrays, die von Patienten mit manifestem MOF präpariert wurden. Im Kontrast dazu clustern auf der rechten Seite fast ausschließlich Arrays, die von Patienten mit keinem oder nur geringen Anzeichen eines MOF stammen (blaue Klammer).

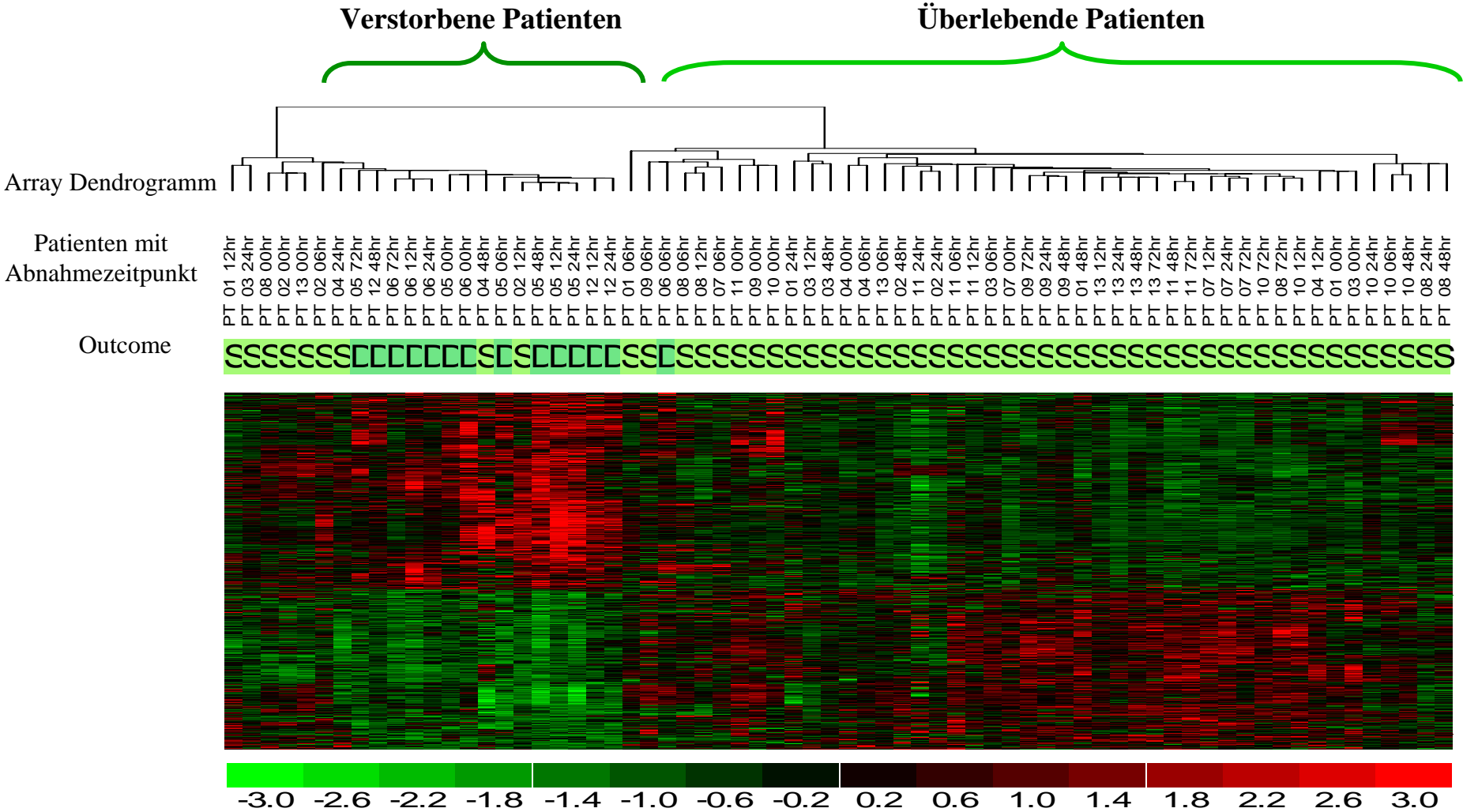
#### 4.4.2.5. Outcome

Berechnet man eine ANOVA zur Detektion von *Probe Sets*, die bei verstorbenen Patienten im Vergleich zu überlebenden Patienten differentiell exprimiert sind, so lassen sich auf dem üblichen Signifikanzniveau von  $p < 0.001$  763 *Probe Sets* (696 Gene) identifizieren. Betrachtet man die von diesen Genen erstellte Cluster-Analyse, so bestätigt sich der Trend der Unsupervised Analyse. Arrays von verstorbenen Patienten clustern vorwiegend auf der linken Seite, im Gegensatz dazu sind die Arrays von überlebenden Patienten auf der rechten Seite zusammengefasst (Abbildung 9). Eine pseudo-prospektive Vorhersage des Überlebens anhand der mathematischen Vorhersagemodelle lässt sich mit einer Sensitivität von  $81\% \pm 8\%$  und einer Spezifität bei  $94\% \pm 5\%$  (Mittel  $\pm$  SD) treffen.

Die anhand Monte Carlo Simulationen (2000 Random Permutationen) errechneten Vorhersagequoten, die ohne tatsächliche statistische Korrelation rein durch Zufall aufgetreten wären, waren für jedes der oben genannten klinischen oder epidemiologischen Kriterien signifikant niedriger als die tatsächlich von uns berechneten.

Eine Zusammenstellung der jeweils für die verschiedenen klinischen Entitäten erzielten Klassifikationsquoten der Vorhersage-Modelle findet sich in Tabelle 2.

Abbildung 9:



**Abbildung 9: Supervised Cluster-Analyse des Outcome (Überleben/Versterben):** Die supervised Cluster-Analyse des Kriteriums Überleben/Versterben bestätigt bereits den Trend, der sich bereits in der unsupervised Analyse (siehe Abbildung 4) abzeichnete. Es zeigt sich eine klare Trennung „Genexpressionsverwandschaft“: Arrays von verstorbenen Patienten clustern auf der linken Seite (dunkelgrüne Klammer), während Arrays von überlebten Patienten auf der rechten Seite gruppiert sind (hellgrüne Klammer)

**Tabelle 2:**

<b>Analyse</b>	<b>Sensitivität (Mittel ± SD)</b>	<b>Spezifität (Mittel ± SD)</b>
Geschlecht	96%±6%	99%±1%
Verletzungsschwere	75%±10%	86%±9%
Bluttransfusionen	86%±6%	88%±10%
Multiorganversagen	78%±3%	78%±7%
Outcome	81%±8%	94%±5%

**Tabelle 2 Vorhersagemodelle:** Anbei sind die Spezifitäten und Sensitivitäten (Mittel±SD) der 6 verschiedenen biostatistischen Vorhersagemodelle für jede durchgeführte Analyse aufgelistet. Auffallend ist, dass die Durchschnittswerte der jeweiligen Vorhersagen für Kriterien, die keine dichotome Einteilung anhand Score-Systeme erforderten, deutlich besser sind, als solche, bei denen anhand von ISS oder MOF-Scores eine artifizielle Grenze zwischen den beiden Gruppen definiert wurde.

#### 4.5. Pathway Analysen

Zur weiteren Untersuchung der biologischen Funktion und regulativen Bedeutung der im Vorangegangenen identifizierten, verschiedenen Genexpressionsprofile wurde jedes Expressionsmuster einer Pathway-Analyse mittels automatisierter Software der Firma Ingenuity Systems (Ingenuity Systems ®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) unterzogen. Dieses System bietet erstens die Möglichkeit, anhand verschiedener Netzwerke die funktionellen Interaktionen der identifizierten Faktoren zu visualisieren, wobei jedes Netzwerk zum Zwecke der Übersichtlichkeit lediglich 35 Faktoren enthält. Zweitens können die biologisch funktionellen Hauptgruppen im für die jeweilige klinische Fragestellung charakteristischen Genexpressionsprofil herausgestellt werden. Drittens besteht die Option, spezielle Signalkaskaden zu identifizieren, die mit der differentiellen Expression bestimmter Faktoren, wie zum Beispiel dem Ubiquitin C, unmittelbar zusammenhängen. Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der Pathway Analyse der spezifischen Genexpressionsmuster, die für die klinischen Fragestellungen „Verletzungsschwere“, „Bluttransfusionen“, „Multiorganversagen“ und „Überleben/Versterben“ hochsignifikant differentiell exprimiert sind, dargestellt werden:

##### 4.5.1. Verletzungsschwere

Von den 295 differentiell exprimierten Genen hinsichtlich der Verletzungsschwere wurden 177 *Probe Sets* in die Pathway Analyse miteinbezogen. Abbildung 10 zeigt ein Netzwerk von miteinander regulatorisch verbundenen Faktoren, die in der Zelle vor allem für die Steuerung der Genexpression generell und für den programmierten Zelltod zuständig sind. Das Netzwerk zeigt beispielsweise die Regulation des Retinoid Rezeptors RXRA, die zu einer Überexpression des Sterol-responsivem Elements SREBF1 und gleichzeitig zu einer Suppression des transkriptionalen Ko-aktivators EP300 führt. Ein anderer Abschnitt des Graphen visualisiert die differentielle Regulation des Rezeptor Typs C der Protein Tyrosin Phosphatase, PTPCR, die unter anderem an der Chemokin und Zytokin vermittelten



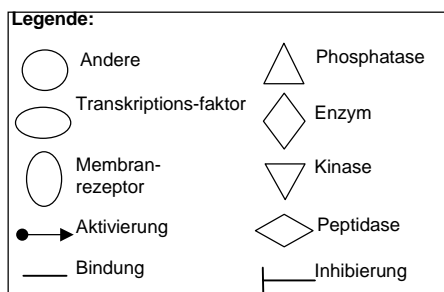
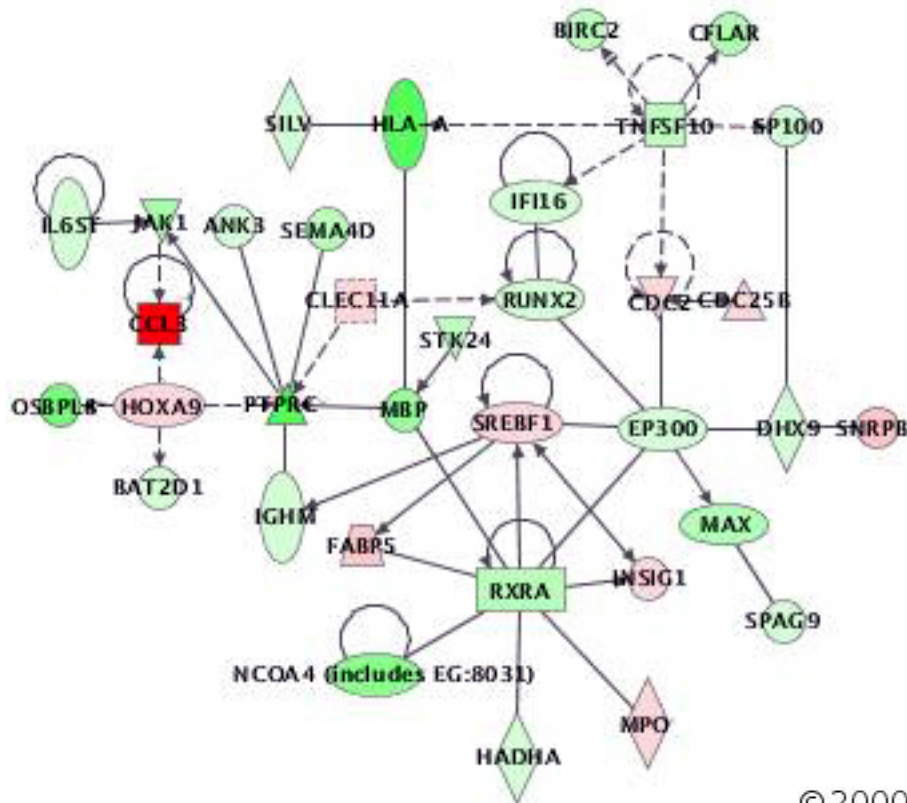
Immunantwort beteiligt ist. Des Weiteren beeinflusst diese Phosphatase die Expression von HOXA9 und über die Janus-Kinase JAK-1 auch den Interleukin-6 Signal Transducer IL6ST.

Die hauptsächlich vertretenen funktionellen Gengruppen im gesamten Datensatz der die Verletzungsschwere klassifizierende Gene sind Faktoren, die den Zellzyklus steuern, und solche, die mit entzündlichen Erkrankungen sowie Verletzungen des Nervensystems assoziiert sind.

#### Signalkaskade Oxidative Phosphorylierung:

Untersucht man das Genexpressionsmuster auf spezielle Signalkaskaden, so findet man eine Reihe an Faktoren, die bei oxidativen Phosphorylierungen eine maßgebliche Rolle spielen. Die ATP Synthasen ATP5G3 und ATP5H, die beiden Ubiquinol Cytochrome Synthasen UQCR und UOCRQ, die Pyrophosphatase PPA2 und die NAD Dehydrogenase NDUFV2 sind allesamt in Monozyten schwerer polytraumatisierter Patienten hochreguliert im Vergleich zu solchen mit weniger gravierenden Verletzungsmustern. Lediglich die ATP-ase ATP6V0E weist eine gegensinnige Expressionsänderung auf.

Abbildung 10:



**Abbildung 10: Pathway Analyse Verletzungsschwere:** Diese Abbildung zeigt den Ingenuity Pathway von 35 Probe Sets, die sich hinsichtlich der Verletzungsschwere als differentiell exprimiert zeigten. Rot markierte Probe Sets sind hochreguliert bei schwerer verletzten Patienten (ISS > 40 Punkte), grün markierte Probe Sets sind runterreguliert in diesem Kollektiv. Wie in den folgenden Analysen ist die Farbtintensität direkt proportional zum Unterschied der Expression für den jeweiligen Faktor in beiden Gruppen.

#### 4.5.2. Bluttransfusion

156 *Probe Sets* von 224, die bei massentransfunden Patienten hochsignifikant anders exprimiert waren als bei solchen mit geringerem Transfusionsbedarf wurden von Ingenuity in die Pathway Analyse miteinbezogen. Maßgeblich handelt es sich hierbei um Gene, deren biologische Aufgabe der Immunantwort dient, wie beispielsweise Gene aus dem Interleukin-6 und Interleukin-10 Pathway. Zum anderen handelt es sich um Faktoren wie die Chemokine CXCL2 und CXCL3, der Oberflächenrezeptor CD86 und der *Platelet Activating Factor Acetylhydrolase* PAFAH1B1. Genprodukte dieser Transkripte beeinflussen die Zellmotilität, Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems, besonders was die Rekrutierung, Chemotaxis, Migration und Akkumulation immunkompetenter Zellen wie neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten oder myeloisch dendritischer Zellen anbelangt.

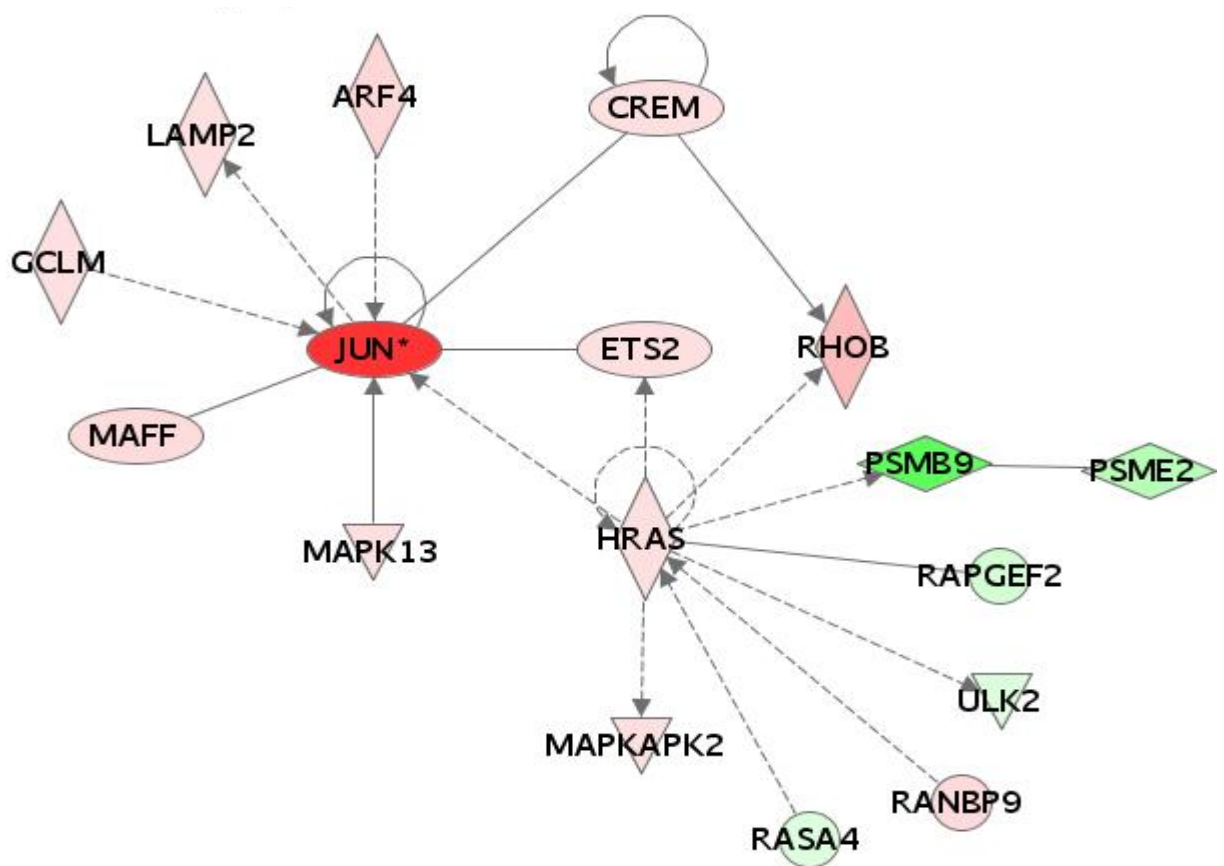
Abbildung 11 zeigt ein Netzwerk von 17 Faktoren und derer funktioneller Regularien um den Transkriptionsfaktor c-Jun und die damit verbundenen Aktivierungen des Transkriptionsrepressors CREM (cAMP responsive element modulator), dem Interleukin-1 $\beta$  regulierten MAF-F (v-MAF musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene) und dem immunmodulierenden Enzym HRAS (Harvey rat sarcome viral oncogene homolog). Des weiteren stellt die Pathway Software einen Zusammenhang zwischen HRAS und dem Thrombin aktivierenden Gen MAPKAPK2 (mitogen activated protein-actiated protein kinase 2) her. Zusätzlich bedingt eine c-Jun Hochregulation die Überexpression von LAMP2 (lysosomal associated membrane protein 2), dessen Genprodukt mit pathologischer Blutplättchenaktivierung assoziiert ist. C-Jun in Kombination mit MAPKAPK2, ETS2 und HRAS stellen darüber hinaus wichtige Vertreter des MAP-Kinase Pathway dar.

#### Signalkaskade des Ubiquitin-C Pathways:

Eine Massentransfusion von Erythrozytenkonzentraten führt zu einer generellen Überexpression des Ubiquitin C-Pathways. Dabei handelt es sich im Detail um Ubiquitin C

selbst, sowie eine Reihe damit verbundener Faktoren wie zum Beispiel TCEB1 (*transcription elongation factor*), die beiden Peptidasen PMSE2 (*proteasome activator subunit 2*), PSMB9 (*proteasome subunit beta type 9*), die im Rahmen abwehrbedingter Proteolyse eine Rolle spielen, sowie die Protein-Ligase UBE2D2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*). All jene Faktoren sind Teil des Protein Ubiquitinierungsprozesses, einem maßgeblichen Regulationsmechanismus der Proteindegradation und Qualitätskontrolle.

**Abbildung 11:**



© 2000–2005, Ingenuity Systems

**Abbildung 11: Pathway Analyse Massentransfusion:** Zu sehen ist ein Netzwerk aus 17 Genen, die bei Patienten nach Massentransfusion (>10 EKs/24h) hochsignifikant anders exprimiert sind als bei solchen mit geringerem Transfusionsbedarf. Rot markierte Gene sind dabei bei massentransfundierten Patienten hochreguliert, grün gefärbte Gene supprimiert.

#### 4.5.3. *Multiples Organversagen*

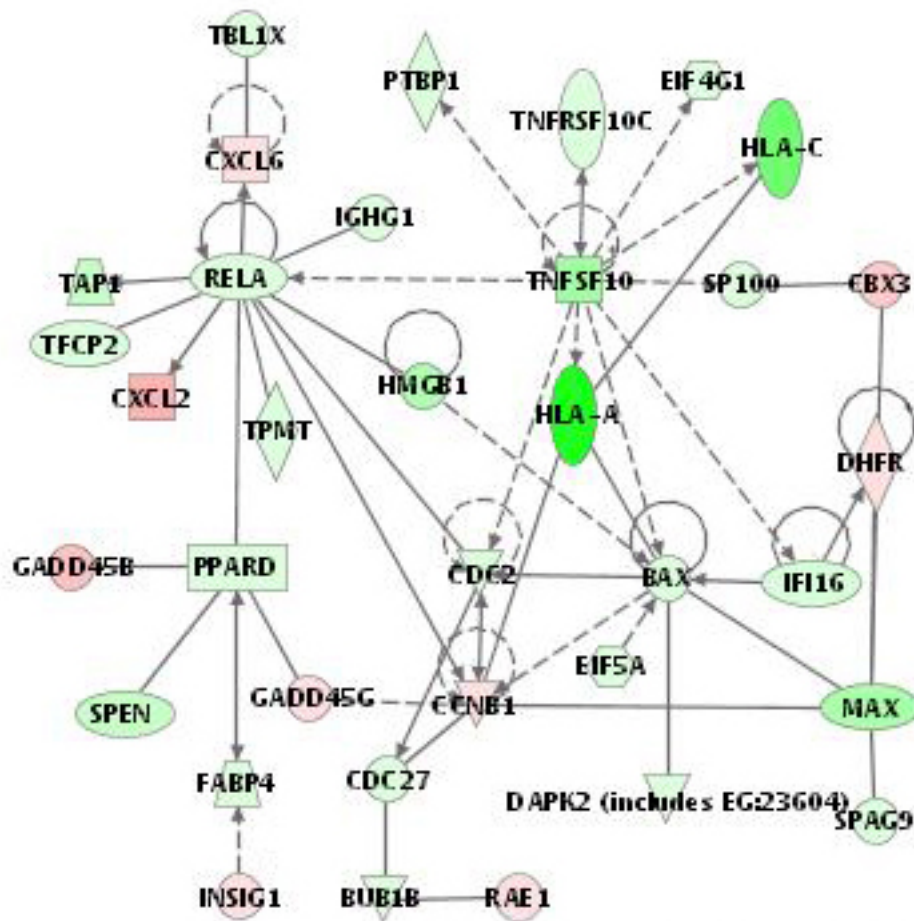
410 der 660 *Probe Sets*, die sich bei Patienten mit ausgeprägtem Multiorganversagen hochsignifikant unterschiedlich exprimiert zeigten als bei Patienten ohne MOF-Syndrom, wurden von dem Pathway Analyse Programm in die Berechnung miteinbezogen. Abbildung 12 zeigt ein Netzwerk mit 35 Faktoren, die vor allem bei der Apoptoseinduktion und in der Steuerung des Zellzyklus beteiligt sind. Der Tumor Nekrose Faktor TNFSF10 und sein zugehöriger Rezeptor, TNFRSF10 regulieren über die Oberflächenrezeptoren HLA-A und HLA-C die Aktivität von NFκB. Über diesen Mechanismus werden indirekt andere Zellzyklus-kontrollierende Faktoren wie zum Beispiel CDC2 oder CCNB1 gesteuert. Außerdem kontrolliert TNFSF10 auch die Aktivitäten des MYC-assoziierten Faktors X, MAX und des BCL-2 assoziierten Faktors X, BAX.

Zieht man die Gesamtheit aller mit MOF-assoziierten Gene unserer Studie in Betracht, so handelt es sich vor allem um Faktoren, deren zelluläre Aufgaben im Bereich der Zellentwicklung, des Zelltodes und der Malignomentstehung liegen.

#### Signalkaskade des Ephrin Rezeptors:

12 der MOF klassifizierenden Gene lassen sich der Ephrin Rezeptor Signalkaskade um den Ephrin Rezeptor A7 zuordnen. Zudem beteiligt an dieser Kaskade sind verschiedene Phosphatasen wie zum Beispiel die PTPN11 und die Pyrophosphatase PPA2, Wachstumsfaktoren wie FGF und EGF, das CDC42 Effektor Protein, Interselektin 1 ITSN1 und verschiedene Kinasen, wie zum Beispiel die *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2*, ROCK.

Abbildung 12:



© 2000–2005, Ingenuity Systems

*Abbildung 12: Pathway Analyse der Multiorganversagen-klassifizierenden Gene: Dieser Graph zeigt 35 Probe Sets, die sich hinsichtlich des Kriteriums Multiorganversagen als differentiell exprimiert herausstellten. Rot gefärbte Probe Sets sind bei Patienten mit deutlichen Anzeichen eines Multiorganversagens (MOF Score  $\geq 4$  Punkte) überexprimiert, mit grün gefärbten Genen verhält es sich umgekehrt.*

#### 4.5.4. Outcome:

Anhand der Software *Ingenuity* ließ sich aus den 763 potentiell Trauma-sensitiven *Probe Sets* ein Pathway mit 35 Faktoren detektieren, der sehr gut in das aktuelle Konzept der posttraumatischen Immunantwort passt. Abbildung 13 verdeutlicht die biologisch-funktionellen Zusammenhänge zwischen diesen 35 Faktoren.

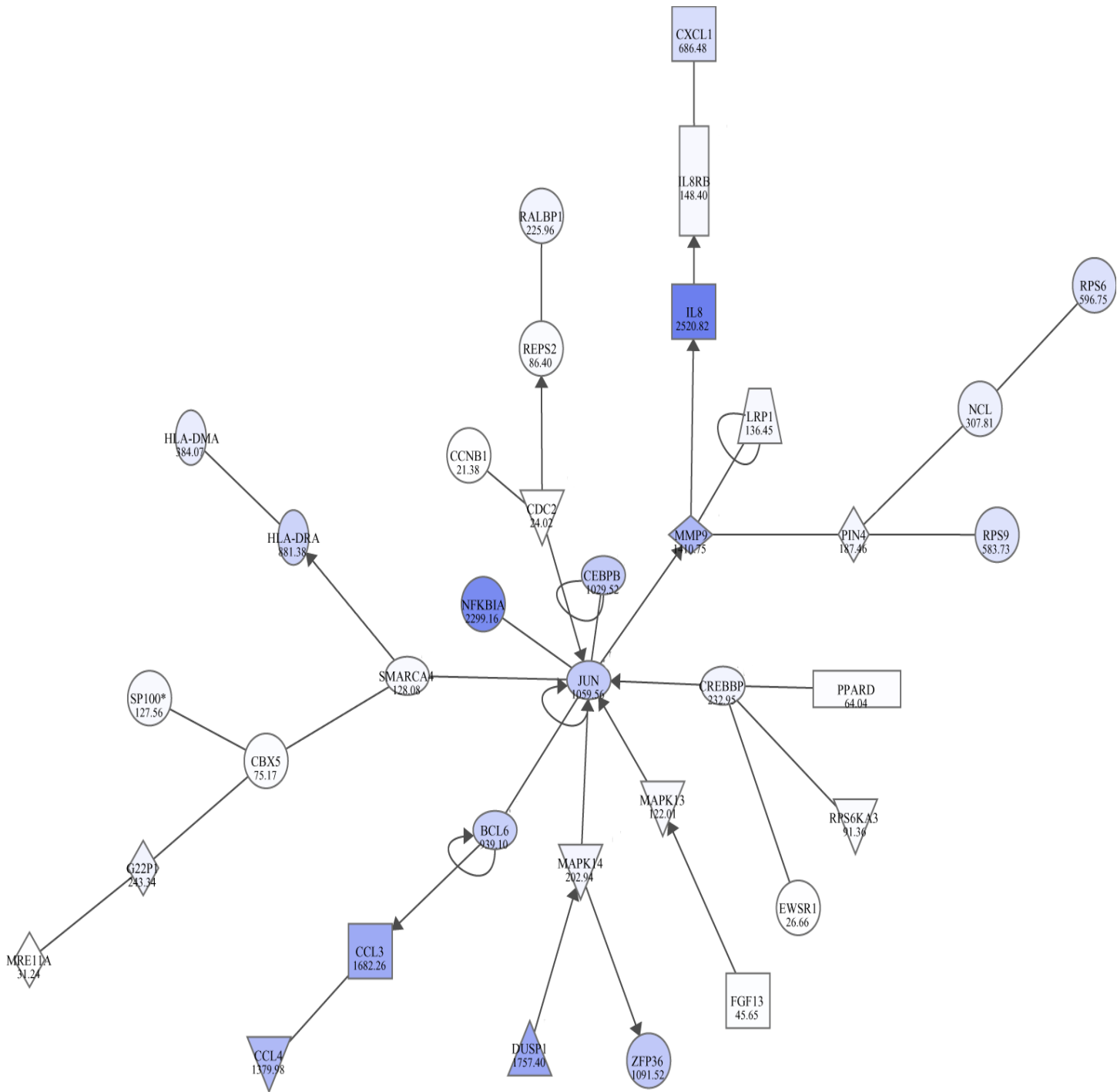
Im hierbei ermittelten Pathway fanden sich alle beteiligten Faktoren in unserer Array Analyse als signifikant durch das Merkmal Überleben/Versterben beeinflusst und gliedern sich um den Transkriptionsfaktor c-jun, der sich auch in der Bluttransfusionsanalyse als differentiellreguliert erwies. In dessen biologischem Kontext gruppieren sich die Faktoren NF- $\kappa$ B Inhibitor und C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*=Transkriptionsfaktor) mit einer gleichsinnigen Erhöhung ihrer Expression sowie IL-8. Weiter lässt sich eine Verbindung zu einigen Chemokinen, wie CCL3 (*macrophage inflammatory protein 1- $\alpha$* ) und CCL4 (*macrophage inflammatory protein 1- $\beta$* ) nachweisen. Darüber hinaus zeichnet sich eine Verbindung zwischen der Expression von MAP-Kinasen sowie die damit assoziierten Proteine C/EBP und PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*) ab, die eine erhöhte Aktivität von c-jun bewirkt. Als ebenso differentiell exprimiert haben sich die Faktoren HLA-DR und HLA-DM erwiesen, die allerdings im verstorbenen Kollektiv hochsignifikant niedriger exprimiert sind als bei Patienten mit gutem klinischen Outcome. Neben diesem Pathway zeichnen sich als funktionelle Hauptgruppen des Outcome-klassifizierenden Genexpressionsprofils vor allem die Proteinsynthese, Immunantwort und Zellmotilität ab.

#### Signalkaskade des PPAR:

12 der Gene, die bei verstorbenen Patienten eine hochsignifikant andere Expression zeigen als bei überlebten Patienten sind spezifisch mit der PPAR Signalkaskade assoziiert, beispielsweise TNF $\alpha$  und dessen Rezeptoren wie TNFRSF1A und B, die wiederum mit dem Interleukin-1 Rezeptor IL-1R interagieren. Über den PPARD Rezeptor werden verschiedene

nukleäre Rezeptor Co-Aktivatoren wie NCOA1 und die Transkriptionsfaktoren c-Jun und STAT co-reguliert.

**Abbildung 13:**



© 2000–2005, Ingenuity Systems



**Abbildung 13: Pathway Analyse der Outcome klassifizierenden Gene:** Dieser Graph zeigt die Pathway Analyse von 35 Faktoren, die bei verstorbenen Patienten hochsignifikant anders exprimiert sind als bei solchen, die das Trauma überlebt haben. Die Einfärbung der Faktoren ist im Kontrast zu den vorangegangenen Analysen leicht modifiziert. Je dunkler die Farbe des jeweiligen Probe Sets, desto größer ist der Unterschied der Expression zwischen den beiden klinischen Gruppen Überlebende/Verstorbene. So lassen sich leicht die Faktoren identifizieren, deren Signalintensitätsunterschied in Abhängigkeit des klinischen Outcomes besonders groß ist. Um diesen Unterschied zu quantifizieren, ist der genaue Wert unter dem Gensymbol in [CPSM] aufgeführt.

## **5. Diskussion**

Die vorliegende Untersuchung demonstriert die Ergebnisse einer erstmaligen Analyse initialer intrazellulärer Aktivierungsmechanismen in humanen Immunzellen polytraumatisierter Patienten mittels eines Genom-weiten Screening-Verfahrens (Array-Technologie).

Dabei konnten wir zeigen, dass es Genexpressionsprofile gibt, die sich hochsignifikant mit verschiedenen klinischen Entitäten korrelieren lassen. Anhand statistischer Vorhersagemodelle ist eine Zuordnung der untersuchten Patienten in dichotome, klinische Gruppen mit hoher Sensitivität und Spezifität möglich. Die biologischen Funktionen und spezifischen Signalkaskaden, die von den veränderten Genexpressionen angezeigt werden, weisen auf ein aktuelles Modell pathophysiologischer Mechanismen der posttraumatischen Immunreaktion hin. Im Folgenden sollen unsere Untersuchungen und Ergebnisse einzeln detailliert diskutiert werden.

### **5.1 Studiendesign und klinische Daten**

In unsere prospektive Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die von einem stumpfen Polytrauma betroffen waren und in unseren Schockraum spätestens 90min nach Trauma eingeliefert wurden. Der initiale ISS lag bei 16 oder mehr Punkten. Die Verteilung von epidemiologischen Daten wie Alter, Verletzungsmechanismus etc. (vgl. Tab. 1) entspricht dabei dem bekannten Kollektiv von Traumapatienten in Mitteleuropa. Im Vergleich dazu weisen Kollektive aus dem nordamerikanischen Raum wesentlich mehr penetrierende Verletzungen auf (27;103). Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten (102). Das Studiendesign der möglichst frühen Gewinnung von Proben ergibt sich aus den Erkenntnissen vorangegangener Studien zur posttraumatischen Dysfunktion humaner Immunzellen des unspezifischen Immunsystems

[siehe (9;29)]. Diese Arbeiten haben klar aufgezeigt, dass der initialen posttraumatischen Phase größte Bedeutung für die Ausbildung und Ausprägung von Organfunktionsstörungen zukommt. Da diese immunologische Antwort auf Trauma zeitsensitiv ist, wurden die Untersuchungen an seriellen, in regelmäßigen Intervallen gewonnenen Proben durchgeführt (76). Hierzu wurden in unserer Studie Proben bei Aufnahme der Patienten sowie 6h, 12h, 24h, 48h und 72h standardisiert nach dem Unfallereignis gewonnen. Damit sind die komplexen Phasen der immunologischen Antwort auf Trauma nicht komplett abzubilden. Jedoch erfordert die Durchführung einer klinischen Studie an Patienten die Berücksichtigung der primären Verpflichtung den Patienten keinen zusätzlichen Schaden zuzufügen. Da der Verlust von Blut gerade in diesem Patientenkollektiv eine der zentralen Bedrohungen für den weiteren Verlauf der Patienten darstellt, muss jedes Studiendesign dieser Tatsache Rechnung tragen und so wenig Blutproben als möglich vorsehen. Das Intervall von 6h in der Initialphase stellt somit einen Kompromiss dar, der von einer Reihe anderer Autoren, die sich mit der frühen posttraumatischen Immunfolgereaktion auf Trauma beschäftigen, geteilt wird (10;26;30;106).

Aufgrund der limitierten Anzahl an untersuchten Patienten sind wir auf die Auswertung unserer Daten mittels dichotomer Variablen und Gruppenbildung angewiesen. Der Großteil von klinischen Parametern, welche alternativ als Endpunkt einer klinischen Klassifikation herangezogen werden könnte, hat kontinuierliche Datenqualität (quantitative Ergebnisse von Messungen physiologischer Parameter, wie z.B. Blutdruck, arterielle Sauerstoffspannung etc.). Um eine Unterteilung in klinisch relevante Gruppen vorzunehmen, werden diese quantitativen kontinuierlichen Daten unter anderem anhand von *Score-Systemen* gruppiert, wie beispielsweise dem MOF Score. Überschreitet die Summe der Punkte dabei einen bestimmten Wert, erfolgt die entsprechende Einteilung in eine klinische Gruppe (z.B. MOF<4 Punkte: es liegt kein relevantes Multiorganversagen vor, MOF≥4 Punkte: relevantes Multiorganversagen liegt vor). Schwieriger ist die Definition einer Grenze

bei der dichotomen Gruppenbildung der Verletzungsschwere. Hier gibt es unserer Kenntnis nach keine definitive, etablierte Grenze des Injury Severity Scores, die sich für eine Einteilung anhand eines dichotomen Kriteriums eignet. In der vorliegenden Studie haben wir einen ISS Score von 40 Punkten als Grenze gewählt, weil dieser Wert dem Median des ISS unserer untersuchten Patienten entspricht und wir damit eine Teilung des Kollektivs in schwerer und weniger schwer polytraumatisierte Patienten vornehmen konnten. Hinsichtlich der Auswertung nach applizierten Bluttransfusionen und der damit einhergehenden Definition einer „Massentransfusion“ haben wir uns in Anlehnung an der Literatur an die dort mehrfach publizierte Grenze von mehr als 10 Erythrozytenkonzentraten in den ersten 24h nach Trauma gehalten (17).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Transformation von zunächst kontinuierlichen in dichotome Daten zudem ein erhebliches Potential an zufälligen Fehlerquellen birgt. So unterliegen physiologische Parameter häufig einer erheblichen Schwankung, wie der arterielle Blutdruck unter Katecholamintherapie. Der Zeitpunkt der Dokumentation wird damit zu einem wesentlichen Faktor und erhöht den möglichen systematischen Fehler weiter. Auch die Analyse mittels Vorhersagemodelle zeigt, dass eine Klassifizierung nach sehr eindeutigen Kriterien wie der des klinischen Outcomes oder des Geschlechtes anhand des Genexpressionsprofils bessere pseudoprospektive Vorhersagequoten liefert als eine aus Scores basierende Klassifizierung wie im Falle der Verletzungsschwere oder des MOF. Dennoch ist die Verwendung dieser anatomischen oder physiologischen Scoresysteme zur Objektivierung des Schweregrades eines komplexen Sachverhaltes unumgänglich (121).

Ein kritischer Punkt der vorliegenden Untersuchung stellt die Applikation von Blutprodukten dar. Im Anschluss an diese therapeutisch notwendigen Maßnahme wäre es theoretisch denkbar, dass die aus der systemischen Zirkulation des Patienten isolierten Monozyten teilweise aus dem Immunzellenpool der Blutspendern stammen könnten. Unsere Standard

Erythrozyten Konzentrate sind Leukozyten filtriert, aber aus logistischen Gründen nicht bestrahlt und enthalten damit eine Rest Population von Leukozyten zwischen 0,5 und  $0,7 \times 10^6$ /Konzentrat (98). Dies entspricht bei einem mittleren Volumen von 300ml pro Konserve einer Konzentration von ca. 1,6 Zellen pro  $\mu\text{l}$ . Davon stellen Monozyten ca. 10% ( $0,16/\mu\text{l}$ ). Bei einer normalen Leukozytenverteilung im menschlichen Blut des Opfers von 5.000/ $\mu\text{l}$  finden sich bei ebenfalls 10% Monozyten im Differentialblutbild dann ca. 500/ $\mu\text{l}$ . Die theoretische zugeführte Menge an fremden Zellen liegt damit bei ca. 1,6 ‰ der zirkulierenden Monozyten. Daher kann diese Fehlerquelle weitgehend vernachlässigt werden.

## **5.2. Probengewinnung und Zellseparation**

Zur Isolation der Monozyten verwendeten wir die positive immunomagnetische Technik (*magnetic cell sorting*; MACS), bei der mit monoklonalen Antikörpern gegen das CD14 Oberflächen-Antigen beschichtete Metallkügelchen eingesetzt werden. Andere Autoren bedienen sich der Dichtegradienten-Zentrifugation [Übersichtsarbeit (2)] mittels Ficoll oder Percoll. Es ist bekannt, dass diese Methode durch den mechanischen Stress der Zentrifugation und den Kontakt mit hochmolekularen Zuckerverbindungen eine Aktivierung der Immunzellen hervorruft (126). Alternativ wird daher von einigen Autoren die negative immunomagnetische Zellseparation propagiert (18). Diese Technik kombiniert den Vorteil der hochselektiven Zellseparation mit einer relativ geringen Aktivierung der isolierten Zellpopulationen. Allerdings ist die Menge an separierten Zellen pro entnommenem Patientenblut mit diesem System wesentlich geringer im Vergleich zur Ausbeute mit der positiven MACS. Dies bedeutet, dass ein wesentlich größeres Blutvolumen notwendig gewesen wäre, um eine vergleichbare Menge an Immunzellen zu separieren. Dies ist mit der kritischen klinischen Situation der Patienten nicht vereinbar. Wir haben uns in der vorliegenden Studie für das positive MACS entschieden, da sie für unsere spezifische Situation und Fragestellung die optimale Kombination aus Vorteilen (hoch selektive Isolation,

geringer ausgeprägte immunologische Aktivierung) und Nachteilen (verbleibende Restaktivierung, hohe Kosten) geboten hat.

### **5.3. RNA Präparation und Microarray Datenanalyse**

Teile der vorliegenden Untersuchung wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes im *Laboratory of Inflammation Biology and Surgical Science, Department of Surgery, University of Florida, Shands Hospital, 1600 SW Archer Road, Gainesville, FL 32610-0286, USA, unter der Aufsicht von Prof. Dr. Linc L. Moldawer (Vice-Chairman)* durchgeführt. Die biostatistischen Auswertungen wurden im *Department of Molecular Genetics and Microbiology*, ebenfalls University of Florida, USA von Herrn Prof. Dr. Henry Baker (*Chairman*) koordiniert und überwacht. Dieses Labor ist Teil des nordamerikanischen Forschungsverbundes „*Inflammation and Host Response to Injury*“ (ausführliche Informationen siehe <http://www.gluegrant.org/>) in dessen Auftrag die Affymetrix Technologie und deren biostatistische Auswertungsstrategien umfangreich etabliert und validiert wurde (32;45;92;119), so dass die vorgestellten Messungen auf einer gut etablierten technologischen Plattform angefertigt wurden. Im Rahmen dieses Projektes ergab sich für unsere Arbeitsgruppe die Möglichkeit, *Consortium Member* dieses Verbundforschungsprojektes zu werden. Die steht unter der Direktion von Dr. Ronald G. Tompkins, Massachusetts General Hospital, Boston USA (National Institutes of General Medical Sciences NIGMS U54-GM-62119-02) und verfolgt das Ziel, unter Ausnützung von Synergie-Effekten die Forschungstätigkeit der meisten nordamerikanischen Traumazentren zu bündeln, um die komplexen Fragestellungen der posttraumatischen Inflammation gezielt beantworten zu können. Im Rahmen dieses Verbundforschungsprojektes wurden standardisierte Protokolle zur RNA Präparation, cDNA-Synthese etc. erarbeitet und umfangreich validiert, so dass die vorliegende Arbeit auf diese Expertise zurückgreifen konnte (32;92).

Die Amplifikation von RNA in unserem vorgestellten Protokoll ist dabei sicherlich kritisch zu diskutieren. Jede Amplifikation birgt das potentielle Risiko eines Bias in den Ergebnissen, da die hierfür herangezogenen *primer* unterschiedliche Affinitäten zu unterschiedlich langen RNA-Transkripten aufweisen. So werden kürzere Transkripte mit einer Länge zwischen 50 und 100 Basenpaaren etwas mehr amplifiziert als längere Transkripte. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Menge an RNA, welche aus den humanen Immunzellen gewonnen werden kann, limitiert ist durch die Menge an risikofrei gewonnenem Blut und damit für die Applikation unserer Technologie eine Amplifikation unerlässlich war. Wir sind diesen Kompromiss eingegangen unter der Vorgabe, dass i) nur so die erstmalige Screening Untersuchung von direkt posttraumatischen RNA Expressionsmustern in humanen Monozyten möglich war und ii) der potentielle Bias einen systematischen Fehler erzeugen würde, den wir mittels Strukturgleichheit der RNA Präparation sowie geeigneter Analysemethoden (Normalisierung auf die mittlere Intensität aller Arrays) reduzieren konnten. Die Array Technologie unterliegt derzeit einem rasanten Wandel, so dass die notwendigen Mengen an RNA in Zukunft vermutlich immer weiter reduziert werden können. In Zukunft mag eine Anwendung der Technologie daher auch ohne Amplifikation der RNA möglich sein (129).

Aus diesen Vorüberlegungen wird die herausragende Rolle deutlich, welche die Analyse Kriterien der erhaltenen Daten nach einer Array Untersuchung beinhalten. Die Filter-Kriterien, welche ein Gen initial als „Signal-gebend“ (= *low-level* Analyse) und weiterführend als „signifikant verändert“ (= *high-level* Analyse) identifizieren, stellen die kritischen Punkte einer jeden Array Analyse dar und wurden in unserer Untersuchung entsprechen der internationalen Konsensuskonferenz über die Präsentation von Microarray Daten gleichgehalten und präsentiert (11). Wir verwendeten in unserer Untersuchung für die *low-level* Analyse zur Identifikation von „Signal-gebenden“ Genen den vom Hersteller empfohlenen Algorithmus des Affymetrix-Programms Microarray Suite (MAS 5). Dieser

berücksichtigt alle *Probe Sets*, deren Signalintensität über dem der Hintergrund-Fluoreszenz-Intensität (*background*) liegen.

In der von uns vorgestellten Untersuchung wurden 14.725 *Probe Sets* von 22.283 aufgetragenen als Signal-gebend identifiziert, dies entspricht einem Prozentsatz von 66%. Andere Autoren, welche das identische System aber unter anderen Umständen verwenden, beschreiben diese Anzahl nicht (31;61). Dennoch lässt sich aufgrund der Herstellerangaben schlussfolgern, dass die von uns ermittelte Anzahl der *present calls*, also der Teil an Genen, die überhaupt auf dem Array eine Signalaktivität aufwiesen, im oberen Durchschnitt der mit diesem System üblicherweise erzielten Trefferquote liegt ([www.Affymetrix.com](http://www.Affymetrix.com)).

#### **5.4. Unsupervised Analyse**

In der von uns dargestellten Untersuchung fanden sich 318 *Probe Sets* mit einem VK von größer 0,5. In anderen Worten, von 22.283 *Probe Sets* waren in unserem Ansatz von insgesamt 68 in die Auswertung einbezogenen Arrays 318 signifikant verändert. Die graphische Darstellung in Abbildung 4 zeigt, dass Arrays von verstorbenen Patienten eine ähnliche Ko-expression aufweisen im Gegensatz zu denen von Patienten, welche überlebt haben. Dieses Ergebnis verdient besondere Beachtung, da für die *unsupervised* Analyse dem System keine klinische Gruppierung vorgegeben wird und die Anordnung ähnlich exprimierter Arrays nur aufgrund einer ähnlich veränderten Genexpression der untersuchten Zellen beruht. Dieser Ansatz wurde von Mitarbeitern des nordamerikanischen *gluegrants* ebenfalls erfolgreich zur Bestimmung von Genen angewandt, welche beispielsweise durch Ischämie/Reperfusion nach transabdomineller Aortenoperation verändert reguliert waren (31). Aufgrund der Tatsache, dass die epidemiologischen Daten der eingeschlossenen Patienten erheblich differierten, lässt die Ähnlichkeit der Expression dieser 318 *Probe Sets* die Interpretation zu, dass die Ursache dieser Ähnlichkeit in der klinische Gemeinsamkeit, nämlich dem Trauma, liegen könnte. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals anhand



einer Genom-weiten Analyse ein Muster potentiell Trauma-sensitiver RNA-Faktoren detektiert. Die potentielle klinische Bedeutung deutet sich an in der gleichsinnigen Änderung der Expression in Patienten mit schlechtem klinischen Ergebnis (verstorben) im Vergleich zu solchen mit gutem *Outcome* (überlebt).

### **5.5. Supervised Analysen und Vorhersage-Modelle**

Die *supervised* Analyse wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Array Technologie eine Klassifizierung von Patienten in klinisch relevante Gruppen anhand ihres Genexpressionsmusters erlaubt. In den von uns demonstrierten Daten ist diese Klassifikation deutlich zu sehen. Da jedoch die Cluster-Analyse aufgrund ihres primär deskriptiven Charakters nicht als Methode der Wahl zur quantitativen Klassifikation in verschiedenen Gruppen zu erachten ist, berechneten wir anhand mathematischer Algorithmen (statistische Vorhersage-Modelle) das Potential zur Prädiktion der Klassenzugehörigkeit anhand des Expressionsprofils unserer *Probe Sets*. Diese Modelle sind in der Literatur gut etabliert (7) und gelten als valide Methode (64). Deutlich wird dies nicht zuletzt anhand der Ergebnisse unserer internen Kontrolle, in der die klinische Variable „Geschlecht des Patienten“ mittels identischer Methoden mit einer Sensitivität von 99% vorhergesagt werden konnte. Wie weiter oben bereits erwähnt, ist dennoch zu bemerken, dass die Sensitivität und Spezifität der Vorhersagemodelle für die Klassifizierung der Geschlechtszugehörigkeit und des Überlebens/Versterbens besser sind diejenigen, die Werte zur Klassifikation der Verletzungsschwere, der Gabe von Blutprodukten oder des Multiorganversagens. Dies mag daran liegen, dass es sich bei ersteren Kriterien um sehr eindeutige klinische Begebenheiten handelt und man – zur Objektivierung der anderen Kriterien wie Verletzungsschwere und Multiorganversagen auf die Berechnung klinischer Scores und die Festlegung artifizieller Grenzen angewiesen ist.

Die Gegenprobe für die von uns angewendeten biostatistischen Techniken wird mittels Monte-Carlo Simulationen durchgeführt. Dabei erstellt eine Software zufällige Kombinationen von virtuellen Array-Daten und überprüft, inwiefern eine Verteilung per Zufall erreicht wird. Die Ergebnisse legen klar dar, dass die von uns identifizierte Verteilung auch in mehr als 2000 Permutationen nicht reproduziert werden konnte.

In der Literatur ist die von uns angewandte Technologie und Auswertungsstrategie beispielsweise von Ben-Dor et al. (7) beschrieben. Er klassifizierte menschliche Kolon-, Ovar-, und Lymph-Tumore anhand deren Genexpression mit einer Treffsicherheit von 90%. Kohlmann et al. (60) beschreibt eine Untersuchung von Patienten mit unterschiedlichen Leukämien, in der die korrekte Subtypen Klassifikation anhand der Microarray-Technologie mit einer Spezifität von 100% erreicht wird. Die von uns demonstrierten Ergebnisse können daher als valide und reliabel angesehen werden.

## **5.6. Pathway Analysen**

Um die Frage der biologischen Relevanz der von uns detektierten Genexpressionsmuster zu klären, wurden die Faktoren, welche eine Klassifikation zwischen den untersuchten klinischen Entitäten erlauben, anhand einer kommerziellen Software (*Ingenuity*) bezüglich ihrer biologischen Verknüpfung untersucht. Diese Software ist ein System, welches anhand der aktuellen internationalen Literatur RNA Faktoren und deren kodierte Proteine in ihrem biologischen Kontext zwei-dimensional abbildet. Sie wird von führenden Labors der differentiellen Genexpressionsanalyse, wie beispielsweise dem Labor für Leukämie Diagnostik der LMU-München, Klinikum Großhadern, verwendet. Weiter findet die Technologie Anwendung in der Pharmaindustrie (Aventis Pharma, GlaxoSmithKline, Wyeth Pharma etc.) zur Identifikation potentieller neuer Ziele für neue Medikamententargets und Präparate.

### Verletzungsschwere

*Probe Sets*, anhand deren Expression sich die Verletzungsschwere klassifizieren lässt, zeigten bei der funktionellen Pathway Analyse vor allem ein Netzwerk, das rund um den Retinoid Rezeptor RXRA, der wiederum die Hochregulation von SREBF1 (sterol regulatory element binding transcription factor 1) bewirkt, gestrickt ist. Gierens et al. stellte einen Zusammenhang zwischen der SREB-protein Familie, dem pro-inflammatorischen Interleukin-6 und der LDL- Rezeptor Aktivierung in der Leber her, eine regulative Interaktion, die einen höheren LDL Katabolismus bewirkt. Dieser Mechanismus erklärt teilweise die auftretende Hypcholesterinämie bei Patienten nach größeren Operationen, Myokardinfarkt oder generalisierten Infektionen (37). Die von uns erhobenen Daten geben erstmals einen Hinweis darauf, dass diese Mechanismen auch bei Patienten nach Polytrauma eine Rolle spielen – und – noch interessanter, durch die Verletzungsschwere offensichtlich beeinflusst werden. Eine weitere Verbindung zum Interleukin-6 ist über den IL-6 *signal transducer*, IL6ST gegeben, der seinerseits die Janus Kinase JAK-1 bindet. Diese Faktoren sind bekannte Repräsentanten der Akute Phase Proteine, vor allem im Rahmen von posttraumatischer Akutreaktion (44).

### *Signalkaskade der Oxydativen Phosphorylierung*

Als ein hinsichtlich der Verletzungsschwere signifikanter Pathway hat sich der der oxidativen Phosphorylierung – vor allem repräsentiert durch ATP und Ubiquinol-Synthasen - herausgestellt. Die meisten dieser Faktoren sind eindeutig hochreguliert bei schwerer verletzten Patienten. Möglicherweise ist dabei mitursächlich, dass schwerer Polytraumatisierte eine größere Fläche an verletztem Organ- und Oberflächengewebe bieten und damit an größerem oxidativem Stress leiden als weniger schwer verletzte Patienten.

### Bluttransfusionen

Als Ausdruck einer generellen inflammatorischen Reaktion nach Bluttransfusionen finden sich Elemente der pro-inflammatorischen Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-10 Pathways vermehrt aktiviert bei Patienten nach Massentransfusion von Erythrozytenkonzentraten. Dies deckt sich mit anderen Ergebnissen aus der Literatur, in denen auch unter experimentellen Bedingungen erwiesen werden konnte, dass die Applikation von EKs zu einer Ausschüttung der oben genannter Faktoren in den systemischen Kreislauf führt [siehe Übersichtsarbeiten (50;81)] und damit sogar zu einem höheren Auftreten von posttraumatischen oder postoperativen MOF-Syndromen (81;86) sowie einer höheren Infektionsanfälligkeit führt (50). Des Weiteren fanden sich Elemente des MAP-Kinase Pathways bei massentransfundierten Patienten hochreguliert, bzw. differentiell reguliert. Dabei zeigt sich ein biologisches Netzwerk aus Faktoren die interessanterweise auch – genau wie in der Analyse zum Überleben/Versterben - direkt oder indirekt von dem Transkriptionsfaktor c-Jun reguliert werden. Dazu gehören zu Beispiel das MAF-F, das eine entscheidende Rolle in der Regulation von IL1- $\beta$  über die Rezeptoren IL-1R1 und IL-1R2 spielt (78) oder auch LAMP-2, dessen Genprodukt für die pathologische Plättchenaktivierung mitverantwortlich ist (54). Zusätzlich besteht über c-Jun eine direkte positive Aktivierung von HRAS, einem wichtigen Modulator der Immunantwort (122) und der Mitogen Aktivated Kinase 2 MAPKAPK2, einer Thrombin-aktivierenden Kinase (12).

### *Signalkaskade des Ubiquitin-C-Pathways*

Ubiquitin-C (UBC) und der dazugehörige Protein-Ubiquitin Signal Pathway sind signifikant hochreguliert bei Patienten, die mehr als 10 EKs in den ersten 24h nach Trauma erhalten hatten. Das ist vor allem deshalb interessant, weil extrazelluläres UBC und Elemente des regulativen Netzwerks (15) nicht nur bei polytraumatisierten Patienten generell vermehrt exprimiert ist, sondern (75) – bei therapeutischer Gabe in einem experimentellen Mausmodell

den Volumenbedarf signifikant senken konnte (73). Darüber hinaus werden dem UBC nicht nur anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, sondern es scheint auch insbesondere an immunsuppressiven Mechanismen bei schwer erkrankten oder verletzten Patienten beteiligt zu sein (75). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Blutungsschock und konsekutive Bluttransfusionen die endogene UBC Produktion in peripheren Monozyten fördern. Als mögliche Ursache hierfür könnte die Induktion einer anti-inflammatorischen Antwort auf das Angebot an Fremdartigen sein. Diese Immunsuppression könnte im Gegenzug allerdings die in der Literatur beschriebene höhere Infektionsanfälligkeit bei polytraumatisierten Patienten nach Massenbluttransfusionen (50) mitbedingen.

### Multipler Organversagen

*Probe Sets*, die bei Patienten mit ausgeprägterem Multiorganversagen hochdifferenziell anders exprimiert sind als bei solchen mit milderem Anzeichen eines solchen (MOF Score <4) sind in ein biologisch funktionelles Netzwerk um TNF $\alpha$  assoziierte Gene verwickelt, die unter anderem MHC-II Klasse Oberflächenantigene wie HLA-A und HLA-C regulieren. Über die tragende Rolle der MHC-II Klasse Rezeptoren im Zusammenhang mit der Entwicklung von SIRS, MOF und Sepsis Syndromen ist in den letzten Jahren in der Literatur häufig berichtet worden (36). In einer experimentellen Tierversuchsstudie an septischen Hunden konnte gezeigt werden, dass das Auftreten eines multiplen Organversagens mit der Herunterregulierung von HLA-Oberflächenrezeptoren einhergeht (66). Dies wiederum stützt die Hypothese der posttraumatischen Immunparalyse, die zudem die Infektionsanfälligkeit weiter begünstigt (124). Diese Ergebnisse decken sich in diesem Punkt perfekt mit unseren Daten, die MHC-II Oberflächenrezeptoren fanden sich bei Patienten mit manifestem Multiorganversagen deutlich herunterreguliert. Ein weiterer Faktor, der differentieller Regulation unterliegt, ist der Apoptose regulierende Faktor BCL-2 und das damit assoziierte BAX. Harter et al. stellte Untersuchungen über die Rolle der BCL-Familie im Rahmen der

Sepsis-Entwicklung an und verglich dabei unter anderem die Konzentrationen von BCL-2 und BAX (mittels RNA-Bestimmung und Western-Blot) von septischen Patienten mit denen gesunder Probanden. Harter et al. fanden keine Korrelation zwischen den beiden Faktoren mit dem Auftreten der Sepsis (41). Eine Erklärung für die in unserer Studie aufgetretene Korrelation mag darin begründet sein, dass unsere Patienten zwar ein MOF aufwiesen, aber keine manifeste Sepsis. Möglicherweise spielen die beiden Genprodukte in Monozyten keine Rolle im Rahmen einer Infektions- bzw. Sepsisgenese, dennoch aber in Bezug auf die Entwicklung eines SIRS und MOF.

#### *Signalkaskade des Ephrin-Rezeptors*

Ein funktioneller Pathway, der sich im Genexpressionsmuster der bei Multiorganversagen differentiell exprimierten Faktoren findet, ist der der Ephrin Signalkaskade, hauptsächlich bestehend aus Wachstumsfaktoren und verschiedenen Phosphatasen. Allgemein werden Ephrine und deren Rezeptoren mit Zellmigration und Wachstum und Sprießung von Nervenzellen assoziiert. Diese Genprodukte haben aber auch nach Rückenmarksverletzungen eine besondere Bedeutung (38). Nach unserer Kenntnis gibt es nun erstmals auch Hinweise darauf, dass Ephrin assoziierte Genprodukte in Monozyten mit der Entwicklung von multiplem Organversagen in polytraumatisierten Patienten in Zusammenhang gebracht werden können.

#### Outcome

In unseren Untersuchungen an den Outcome-klassifizierenden Genexpressionsprofilen fand sich ein biologisches Netzwerk von Faktoren, welches sich hauptsächlich um den Faktor c-jun (Synonyme: v-jun avian sarcoma virus 17 onkogene homolog; swissprot P05412) herum gruppiert. C-jun ist ein integraler Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (24). Die Expression von c-jun war signifikant vermehrt in verstorbenen Patienten. C-jun spielt eine

bedeutende Rolle während der Monozyten-Reifung und wird rasch von proliferativen Stimuli aktiviert (97). Darüber hinaus ist beschrieben, dass c-jun durch TNF $\alpha$  aktiviert wird, welches integraler Bestandteil der menschlichen Immunantwort nach Trauma ist (6;63;76). Innerhalb unserer biologischen *Pathway* Analyse fanden sich *down-stream* mehrere andere Faktoren, welchen eine bedeutende Rolle in der menschlichen Immunantwort zugeschrieben werden, beispielsweise das MMP9 (85), IL-8, CCL3 (117), HLA-DR und HLA-DM. Interessanterweise sind diese beiden Oberflächenrezeptoren bei verstorbenen Patienten stark supprimiert. Dieses Phänomen deckt sich mit ähnlichen Untersuchungen in der Literatur (49;118). Die IL-8 Expression war signifikant vermehrt exprimiert in verstorbenen Patienten. Dies unterstützt die Daten vorangegangener Untersuchungen aus unserem Hause, in denen die Plasma Konzentrationen von IL-8 in Polytrauma-Patienten zu identischen Zeitpunkten analysiert wurden und ein signifikanter Anstieg innerhalb der ersten 48 Stunden gezeigt wurde (87). Interessanterweise scheint das BCL-6 ein Faktor zu sein, der auch in Patienten mit B-Zell Lymphom eine klinische Klassifikation in Überleben oder Versterben erlaubt (69).

#### *Signalkaskade des PPAR*

Der *PPAR signalling pathway* stellt ein funktionelles Netzwerk rund um den *peroxisome proliferated activated receptor delta* – PPARD dar, das bei polytraumatisierten Patienten je nach klinischem Outcome einer hochsignifikant unterschiedlichen Regulation unterliegt. PPARs sind mitunter für die Veränderung des intrazellulären Genexpressionsmusters nach extrazellulären Stimuli verantwortlich. Während dman weiß, dass der PPAR $\gamma$  Ligand ein wichtiger Regulationsfaktor der Immunantwort ist und sogar für ein potentiell neues medikamentöses Target in der Sepsis und Entzündungstherapie gehalten wird, sind die Funktionen des PPARD bislang nur unzureichend untersucht (128). Unsere Ergebnisse geben nun erstmals Hinweise darauf, dass eine differentielle PPARD expression eine Rolle hinsichtlich des klinischen Outcome polytraumatisierter Patienten spielen könnte.

Fraglos müssen unsere Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da die Anzahl der untersuchten Patienten noch gering ist. Dennoch liefert die vorliegende Untersuchung erstmals Hinweise dafür, dass über die Detektion von Netzwerken mehr Information über den wahrscheinlichen klinischen Verlauf eines Patienten zu gewinnen ist, als über die Messung von mehreren Einzelfaktoren.



## 6. Zusammenfassung

Polytraumatisierte Patienten entwickeln eine systemische Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrome, SIRS*), die entscheidend den klinischen Verlauf der Patienten determiniert. Zahlreiche Untersuchungen weisen dem Immunsystem dabei eine zentrale steuernde Funktion zu, wobei die initialen Triggermechanismen der traumabedingten Immunantwort bisher unbekannt ist. Obwohl den Monozyten dabei eine führende Rolle zugesprochen wird, sind die hierfür verantwortlichen intrazellulären Steuerungsmechanismen, insbesondere die Signaltransduktion, die Transkription sowie die Modulation der Translation von inflammatorisch wirksamen Proteinen bislang nur ansatzweise aufgeklärt. Ziele der vorliegenden Untersuchungen waren daher:

- i) zu überprüfen, ob es überhaupt spezifische, Trauma-responsive mRNA Expressionsmuster in Monozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase gibt,
- ii) in einem zweiten Schritt zu untersuchen, ob es darüber hinaus Genexpressionsprofile gibt, die in Abhängigkeit von klinischen Parametern einer signifikant unterschiedlichen Expression unterliegen
- iii) und schließlich diese identifizierten Faktoren auf ihre biologisch funktionelle Rolle im Organismus zu untersuchen

Mittels Affymetrix Oligonukleotid Microarray (22.000 *Probe Sets*, 14.500 Gene) wurde eine Genom-weite mRNA Expressionsanalyse in Monozyten polytraumatisierter Patienten in der unmittelbar posttraumatischen Phase (0h-72h) durchgeführt und in einem mehrstufigen biostatistischen Verfahren mit klinischen Einflussfaktoren korreliert. Zur Überprüfung der biologischen Funktion der identifizierter Genexpressionsprofile wurden biologisch-funktionelle Pathway Analysen mittels *Ingenuity Pathway Systems* durchgeführt.

Um das erste Teilziel zu erreichen wurde eine *unsupervised*-Analyse anhand der ermittelten Microarray Daten durchgeführt.

Im Rahmen von Microarray-Untersuchungen entstehen bei Verwendung der Genomweiten Analyse von 22.000 *Probe Sets* pro Array multipliziert mit 6 sequentiellen Blutabnahmezeitpunkten und 13 Patienten über 1,700 000 Datensätze. Dabei ist zu bemerken, dass auf einem Oligonukleotid Microarray ein Gen durch zum Teil mehrere Oligonukleotidsequenzen auf dem Array repräsentiert ist. Eine solche Gen-repräsentierende Sequenz heißt *Probe Set*. Daher erklärt sich, dass eine gewisse Anzahl an Genen in einem Datenset immer mit einer höheren Anzahl an *Probe Sets* einhergeht. Zentrales Kriterium der *unsupervised* Analyse ist nun der Variationskoeffizient eines einzelnen Faktors/Genes. Somit lassen sich diejenigen genetischen Expressionsprofile identifizieren, die durch das gemeinsame klinische Ereignis „Trauma“ zu einer gemeinsamen Expressionsänderung angeregt wurden. Dabei fanden sich 318 *Probe Sets* (280 Gene) signifikant durch das klinische Ereignis „Trauma“ verändert. Somit lässt sich anhand der vorliegenden Studie die Fragestellung i) klar dahingehend beantworten, dass Trauma-sensitive Gene Zeichen der gleichsinnigen Aktivierung bzw. Deaktivierung zeigen können.

Um die Teilfragestellung ii) zu beantworten, wurden die Patienten im Anschluss in klinisch relevante Gruppen unterteilt. Führende Zielparameter waren dabei zunächst die Quantifizierung der anatomischen Verletzungsschwere quantifiziert mittels Injury Severity Score (ISS). In den so gruppierten Datensätzen fanden sich interessanterweise 295 *Probe Sets* (273 Gene), hochsignifikant verschieden exprimiert in Patienten mit einem ISS > 40 im Vergleich zu weniger schwer verletzten Patienten (ISS < 40 Punkte). Eine ähnliche *supervised*-Analyse wurde anhand des Kriteriums „Massive Substitution von Erythrozytenkonzentraten“ (>10 EKs/24h) berechnet. Dabei fanden sich 224 *Probe Sets* (205 Gene) differentiell exprimiert. Besonders interessant zeigten sich die Ergebnisse der *supervised*-Analyse nach Einteilung der Patienten anhand der Ausprägung eines Multiorganversagens. 660 *Probe Sets* (642 Gene) waren bei Patienten mit Anzeichen eines solchen (MOF Score  $\geq 4$  Punkte) hochsignifikant differentiell exprimiert im Vergleich zu Patienten ohne klinische Hinweise

auf ein manifestes Multiorganversagen (MOF-Score < 4 Punkte). Schließlich konnten in einer weiteren *supervised*-Analyse 763 *Probe Sets* (696 Gene) identifiziert werden, deren Expression je nach dem, ob der Patient das Trauma überlebt hatte, oder im späteren posttraumatischen Verlauf verstorben war, erneut ein hochdifferenziell unterschiedliches Expressionsprofil aufweisen.

Somit lässt sich Fragestellung ii) dahingehen beantworten, dass es tatsächlich spezifische Genexpressionsmuster gibt, die durch verschiedene klinische Situationen, wie z.B. die Verletzungsschwere, Massentransfusionen, die Entwicklung eines Multiorganversagens oder das endgültige klinische Outcome induziert werden können.

Zur Beantwortung der Fragestellung iii) wurden Pathway Analysen durchgeführt. Dieses Instrumentarium fasst den derzeitigen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse in einer groß-dimensionierten Software zusammen und zeigt die biologisch-funktionellen Beziehungen der einzelnen Faktoren auf. Dabei fanden sich für die klinische Entität der Verletzungsschwere vor allem Gene, die bei der oxydativen Phosphorylierung von Proteinen eine Rolle spielen, als differentiell exprimiert. Patienten, die einer massiven Bluttransfusion zugeführt werden mussten, zeigen eine signifikant andere Regulation des Ubiquitin-C Pathways als Patienten mit geringerem Transfusionsbedarf. Bei polytraumatisierten Patienten, die im Beobachtungszeitraum Anzeichen eines Multiorganversagens entwickelten, zeigte die Pathway Analyse Software eine unterschiedliche Regulation des Ephrin Rezeptor Pathways. Betrachtet man schließlich das Datenset der Outcome-klassifizierenden Gene, so fällt auf, dass Patienten mit positivem klinischen Outcome eine hochsignifikant andere Expression der PPAR-Signalkaskade aufweisen im Vergleich zu Patienten, die im späteren posttraumatischen Verlauf verstorben waren. Somit lässt sich Fragestellung iii) dahingehend beantworten, dass in der Tat einzelnen, biologisch relevanten, funktionellen Gruppen spezifische, klinische Ereignisse zugeordnet werden können.

Die vorliegende Arbeit zeigt somit erstmals, dass es Trauma-responsive, hochspezifische mRNA Expressionsmuster und Signalkaskaden in Monozyten polytraumatisierter Patienten in der unmittelbaren posttraumatischen Phase gibt, die nicht nur mit dem Ausmaß des Traumas, sondern auch mit dem klinischen Verlauf des Patienten hochsignifikant korrelierbar sind. Diese Ergebnisse sollten allerdings aufgrund der geringen Patientenzahl derzeit noch mit Vorsicht behandelt werden.

Dennoch lassen sich auf diesen Daten basierend nun zahlreiche Ausblicke entwickeln. Detaillierte Einzeluntersuchungen auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene werden singuläre Mechanismen und biologische Bedeutungen der Oligonukleotid Microarray Daten aufzeigen müssen. Langfristiges Ziel ist es dabei, eine individualisierte Anpassung der medizinischen Maßnahmen zu entwickeln, um die Ausbildung und Ausprägung posttraumatischer Entzündungsvorgänge besser zu prognostizieren und schließlich zu reduzieren.

Teile der hier präsentierten Resultate sind bereits von Biberthaler et al in folgender Arbeit „Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome“, Shock 2005, veröffentlicht worden (8).

## 7. Literatur

- (1) Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(5):1877-1883.
- (2) Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6(4):298-305.
- (3) Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; 30(1):41-47.
- (4) Bassoe CF, Smith I, Sornes S, Halstensen A, Lehmann AK. Concurrent measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. *Methods* 2000; 21(3):203-220.
- (5) Baue AE. Multiple organ failure--the discrepancy between our scientific knowledge and understanding and the management of our patients. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385(7):441-453.
- (6) Baue AE, 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.
- (7) Ben Dor A, Bruhn L, Friedman N, Nachman I, Schummer M, Yakhini Z. Tissue classification with gene expression profiles. *J Comput Biol* 2000; 7(3-4):559-583.
- (8) Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, Lopez MC, Neth P, Kanz KG et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock* 2005; 24(1):11-19.
- (9) Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125(8):680-687.
- (10) Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. *Surgery* 1995; 118(2):358-364.
- (11) Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001; 29(4):365-371.
- (12) Brophy CM, Woodrum D, Dickinson M, Beall A. Thrombin activates MAPKAP2 kinase in vascular smooth muscle. *J Vasc Surg* 1998; 27(5):963-969.
- (13) Carrillo EH, Gordon L, Goode E, Davis E, Polk HC, Jr. Early elevation of soluble CD14 may help identify trauma patients at high risk for infection. *J Trauma* 2001; 50(5):810-816.
- (14) Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloez-Tayarani I, Fitting C. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J Endotoxin Res* 2001; 7(2):85-93.
- (15) Ceremuga TE, Yao XL, Alam HB, McCabe JT. Alterations of cullin-5 mRNA levels in the rat central nervous system following hemorrhagic shock. *Neurol Res* 2003; 25(2):211-216.
- (16) Committee on Injury Scaling (1990). Abbreviated Injury Scale 1990 Revision. Des Plaines, Illinois: Association of the Advancement of Automobile Medicine, 2002.
- (17) Como JJ, Dutton RP, Scalea TM, Edelman BB, Hess JR. Blood transfusion rates in the care of acute trauma. *Transfusion* 2004; 44(6):809-813.

- (18) Cotter MJ, Norman KE, Hellewell PG, Ridger VC. A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am J Pathol* 2001; 159(2):473-481.
- (19) Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK et al. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 162(6):3256-3262.
- (20) Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992; 216(2):117-134.
- (21) Deitch EA, Mancini MC. Complement receptors in shock and transplantation. *Arch Surg* 1993; 128(11):1222-1226.
- (22) Deitch EA, Rutan R, Waymack JP. Trauma, shock, and gut translocation. *New Horiz* 1996; 4(2):289-299.
- (23) Dunne JR, Malone DL, Tracy JK, Napolitano LM. Allogenic blood transfusion in the first 24 hours after trauma is associated with increased systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and death. *Surg Infect (Larchmt)* 2004; 5(4):395-404.
- (24) Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11):859-868.
- (25) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(25):14863-14868.
- (26) Ertel W, Keel M, Bonaccio M, Steckholzer U, Gallati H, Kenney JS et al. Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. *J Trauma* 1995; 39(5):879-885.
- (27) Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg* 1998; 101(7):520-526.
- (28) Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE. Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch Surg* 1986; 121(9):1000-1005.
- (29) 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.
- (30) Faist E, Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, von Donnersmarck GH, Schildberg FW. Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling. *J Trauma* 1993; 34(6):846-853.
- (31) Feezor RJ, Baker HV, Xiao W, Lee WA, Huber TS, Mindrinos M et al. Genomic and proteomic determinants of outcome in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Immunol* 2004; 172(11):7103-7109.
- (32) Feezor RJ, Paddock HN, Baker HV, Varela JC, Barreda J, Moldawer LL et al. Temporal patterns of gene expression in murine cutaneous burn wound healing. *Physiol Genomics* 2004; 16(3):341-348.
- (33) Feezor RJ, Paddock HN, Baker HV, Varela JC, Barreda J, Moldawer LL et al. Temporal patterns of gene expression in murine cutaneous burn wound healing. *Physiol Genomics* 2004; 16(3):341-348.
- (34) Fosse E, Mollnes TE, Aasen AO, Trumpy JH, Stokke T. Complement activation following multiple injuries. *Acta Chir Scand* 1987; 153(5-6):325-330.
- (35) Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 2000; 135(3):291-295.

- (36) Giannoudis PV, Hildebrand F, Pape HC. Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. Can they predict outcome? *J Bone Joint Surg Br* 2004; 86(3):313-323.
- (37) Gierens H, Nauck M, Roth M, Schinker R, Schurmann C, Scharnagl H et al. Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(7):1777-1783.
- (38) Goldshmit Y, McLenachan S, Turnley A. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 2006; 52(2):327-345.
- (39) Goris RJ, te Boekhorst TP, Nuytinck JK, Gimbrere JS. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 1985; 120(10):1109-1115.
- (40) Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:136-147.
- (41) Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis. *J Am Coll Surg* 2003; 197(6):964-973.
- (42) Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15(1):1-10.
- (43) Hauser CJ, Lagoo S, Lagoo A, Hale E, Hardy KJ, Barber WH et al. Tumor necrosis factor alpha gene expression in human peritoneal macrophages is suppressed by extra-abdominal trauma. *Arch Surg* 1995; 130(11):1186-1191.
- (44) Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374(Pt 1):1-20.
- (45) Herndon DN, Dasu MR, Wolfe RR, Barrow RE. Gene expression profiles and protein balance in skeletal muscle of burned children after beta-adrenergic blockade. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285(4):E783-E789.
- (46) Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore FD, Jr. Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J Immunol* 1992; 149(5):1723-1728.
- (47) Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med* 1993; 21(6):839-845.
- (48) Huang YS, Yang ZC, Liu XS, Chen FM, He BB, Li A et al. Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns. *Burns* 1998; 24(8):706-716.
- (49) Huschak G, Zur NK, Stuttmann R, Riemann D. Changes in monocytic expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clin Exp Immunol* 2003; 134(3):491-496.
- (50) Ikuta S, Miki C, Hatada T, Inoue Y, Araki T, Tanaka K 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.
- (51) Jordan MS, Singer AL, Koretzky GA. Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* 2003; 4(2):110-116.
- (52) Kampalath B, Cleveland RP, Chang CC, Kass L. Monocytes with altered phenotypes in posttrauma patients. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(12):1580-1585.
- (53) Kanehisa M. Prediction of higher order functional networks from genomic data. *Pharmacogenomics* 2001; 2(4):373-385.

- (54) Kannan K, Divers SG, Lurie AA, Chervenak R, Fukuda M, Holcombe RF. Cell surface expression of lysosome-associated membrane protein-2 (lamp2) and CD63 as markers of in vivo platelet activation in malignancy. *Eur J Haematol* 1995; 55(3):145-151.
- (55) Kavanagh EG, Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Burn injury primes naive CD4+ T cells for an augmented T-helper 1 response. *Surgery* 1998; 124(2):269-276.
- (56) Keel M, Ecknauer E, Stocker R, Ungethum U, Steckholzer U, Kenney J et al. Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J Trauma* 1996; 40(6):907-912.
- (57) Kell MR, Kavanaugh EG, Goebel A, Soberg CC, Lederer JA. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock* 1999; 12(2):139-144.
- (58) Kelly JL, O'Sullivan C, O'Riordain M, O'Riordain D, Lyons A, Doherty J et al. Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? *Ann Surg* 1997; 225(5):530-541.
- (59) Kirsch M, de Groot H. Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1999; 274(35):24664-24670.
- (60) Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W et al. Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37(4):396-405.
- (61) Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia* 2004; 18(1):63-71.
- (62) Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001; 14(6 Pt 2):44S-54S.
- (63) Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11(3):153-159.
- (64) Lee Y, Lee CK. Classification of multiple cancer types by multicategory support vector machines using gene expression data. *Bioinformatics* 2003; 19(9):1132-1139.
- (65) Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch Surg* 2002; 387(1):14-20.
- (66) Lendemans S, Kreuzfelder E, Waydhas C, Nast-Kolb D, Flohe S. [Clinical course and prognostic significance of immunological and functional parameters after severe trauma]. *Unfallchirurg* 2004; 107(3):203-210.
- (67) Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79(4):1431-1568.
- (68) Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood* 1997; 89(1):307-314.
- (69) Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2001; 98(4):945-951.
- (70) Lyn D, Liu X, Bennett NA, Emmett NL. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics* 2000; 2(3):93-100.
- (71) Mack VE, McCarter MD, Naama HA, Calvano SE, Daly JM. Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury. *Arch Surg* 1996; 131(12):1303-1308.



- (72) Majetschak M, Borgermann J, Waydhas C, Obertacke U, Nast-Kolb D, Schade FU. Whole blood tumor necrosis factor-alpha production and its relation to systemic concentrations of interleukin 4, interleukin 10, and transforming growth factor-beta1 in multiply injured blunt trauma victims. *Crit Care Med* 2000; 28(6):1847-1853.
- (73) Majetschak M, Cohn SM, Obertacke U, Proctor KG. Therapeutic potential of exogenous ubiquitin during resuscitation from severe trauma. *J Trauma* 2004; 56(5):991-999.
- (74) Majetschak M, Flohe S, Obertacke U, Schroder J, Staubach K, Nast-Kolb D et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999; 230(2):207-214.
- (75) Majetschak M, Krehmeier U, Bardenheuer M, Denz C, Quintel M, Voggenreiter G et al. Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness. *Blood* 2003; 101(5):1882-1890.
- (76) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193(3):237-244.
- (77) Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30(8):4217-4223.
- (78) Massrieh W, Derjuga A, Doualla-Bell F, Ku CY, Sanborn BM, Blank V. Regulation of the MAFF Transcription Factor by Proinflammatory Cytokines in Myometrial Cells. *Biol Reprod* 2006; 74(4):699-705.
- (79) Matsukawa A, Kaplan MH, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis. *J Exp Med* 2001; 193(6):679-688.
- (80) Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263(6 Pt 2):H1901-H1906.
- (81) Moore EE, Johnson JL, Cheng AM, Masuno T, Banerjee A. Insights from studies of blood substitutes in trauma. *Shock* 2005; 24(3):197-205.
- (82) Moore FA, Moore EE, Sauaia A. Blood transfusion. An independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1997; 132(6):620-624.
- (83) Morrison B, III, Eberwine JH, Meaney DF, McIntosh TK. Traumatic injury induces differential expression of cell death genes in organotypic brain slice cultures determined by complementary DNA array hybridization. *Neuroscience* 2000; 96(1):131-139.
- (84) Mulligan MS, Schmid E, Beck-Schimmer B, Till GO, Friedl HP, Brauer RB et al. Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. *J Clin Invest* 1996; 98(2):503-512.
- (85) Muroso S, Yoshizaki T, Sato H, Takeshita H, Furukawa M, Pagano JS. Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Res* 2000; 60(9):2555-2561.
- (86) Napolitano L. Cumulative risks of early red blood cell transfusion. *J Trauma* 2006; 60(6 Suppl):S26-S34.
- (87) Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, Schneider I, Trupka A, Ruchholtz S et al. Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma* 1997; 42(3):446-454.
- (88) Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuem U, Trentz O et al. Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 1997; 42(5):863-870.
- (89) Nicodemus S. *Unfallgeschehen im Straßenverkehr 2003*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt, 2004.

- (90) Nishibori M, Takahashi HK, Mori S. The regulation of ICAM-1 and LFA-1 interaction by autacoids and statins: a novel strategy for controlling inflammation and immune responses. *J Pharmacol Sci* 2003; 92(1):7-12.
- (91) Okusawa S, Dinarello CA, Yancey KB, Endres S, Lawley TJ, Frank MM et al. C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon-gamma. *J Immunol* 1987; 139(8):2635-2640.
- (92) Paddock HN, Schultz GS, Baker HV, Varela JC, Beierle EA, Moldawer LL et al. Analysis of gene expression patterns in human postburn hypertrophic scars. *J Burn Care Rehabil* 2003; 24(6):371-377.
- (93) Pape HC, van Griensven M, Rice J, Gansslen A, Hildebrand F, Zech S 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.
- (94) Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Puyana JC, Furse RK, Miller-Graziano C. Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma. *J Surg Res* 2000; 88(2):200-206.
- (95) Rabb H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. *Kidney Int* 2002; 61(6):1935-1946.
- (96) Rabinovici R, John R, Esser KM, Vernick J, Feuerstein G. Serum tumor necrosis factor-alpha profile in trauma patients. *J Trauma* 1993; 35(5):698-702.
- (97) Rangatia J, Vangala RK, Treiber N, Zhang P, Radomska H, Tenen DG et al. Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment. *Mol Cell Biol* 2002; 22(24):8681-8694.
- (98) Rebulli P, Porretti L, Bertolini F, Marangoni F, Prati D, Smacchia C et al. White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells. *Transfusion* 1993; 33(2):128-133.
- (99) Rose S, Marzi I. [Pathophysiology of polytrauma]. *Zentralbl Chir* 1996; 121(11):896-913.
- (100) Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(3-4):199-208.
- (101) Roumen RM, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W et al. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit Care Med* 1995; 23(3):474-480.
- (102) Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Lefering R. [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997; 114:1265-1267.
- (103) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J Trauma* 1995; 38(2):185-193.
- (104) Schadt EE, Li C, Ellis B, Wong WH. Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data. *J Cell Biochem Suppl* 2001; Suppl 37:120-125.
- (105) Schinkel C, Licht K, Zedler S, Schinkel S, Fraunberger P, Fuchs D et al. Interferon-gamma modifies cytokine release in vitro by monocytes from surgical patients. *J Trauma* 2001; 50(2):321-327.
- (106) Schinkel C, Sendtner R, Zimmer S, Faist E. Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis. *J Trauma* 1998; 44(5):743-748.
- (107) Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, Martin M, Regel G. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma* 1998; 44(5):874-882.

- (108) Seibel R, LaDuca J, Hassett JM, Babikian G, Mills B, Border DO et al. Blunt multiple trauma (ISS 36), femur traction, and the pulmonary failure-septic state. *Ann Surg* 1985; 202(3):283-295.
- (109) Shander A. Emerging risks and outcomes of blood transfusion in surgery. *Semin Hematol* 2004; 41(1 Suppl 1):117-124.
- (110) Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(1):14-18.
- (111) Svoboda P, Kantorova I, Ochmann J. Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J Trauma* 1994; 36(3):336-340.
- (112) Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996; 6(2):79-88.
- (113) Tsai CA, Chen YJ, Chen JJ. Testing for differentially expressed genes with microarray data. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(9):e52.
- (114) Tscherne H, Oestern HJ, Sturm J. Osteosynthesis of major fractures in polytrauma. *World J Surg* 1983; 7(1):80-87.
- (115) Tscherne H, Trentz O. Mehrfachverletzungen. In: Heberer G, Köle W, Tscherne H, editors. *Lehrbuch der Chirurgie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1978.
- (116) van der PT, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol* 1995; 155(11):5397-5401.
- (117) Vasanwala FH, Kusam S, Toney LM, Dent AL. Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. *J Immunol* 2002; 169(4):1922-1929.
- (118) Volk HD. Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6(4):279-281.
- (119) Walker JR, Su AI, Self DW, Hogenesch JB, Lapp H, Maier R et al. Applications of a rat multiple tissue gene expression data set. *Genome Res* 2004; 14(4):742-749.
- (120) Walsh DS, Siritongtaworn P, Pattanapanyasat K, Thavichaigarn P, Kongcharoen P, Jiarakul N et al. Lymphocyte activation after non-thermal trauma. *Br J Surg* 2000; 87(2):223-230.
- (121) Waydhas C, Nast-Kolb D. Scores in polytrauma--do they help? *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(3-4):209-213.
- (122) Weijzen S, Velders MP, Kast WM. Modulation of the immune response and tumor growth by activated Ras. *Leukemia* 1999; 13(4):502-513.
- (123) Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Jr., Kobzik L, Ma M, Hechtman HB et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J Exp Med* 1996; 183(5):2343-2348.
- (124) Weiss DJ, Welle M, Mortiz A, Walcheck B. Evaluation of leukocyte cell surface markers in dogs with septic and nonseptic inflammatory diseases. *Am J Vet Res* 2004; 65(1):59-63.
- (125) Wood JJ, Rodrick ML, O'Mahony JB, Palder SB, Saporoschetz I, D'Eon P et al. Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. *Ann Surg* 1984; 200(3):311-320.
- (126) Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200(1-2):173-179.

- (127) Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27(1):66-72.
- (128) Zingarelli B, Cook JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 2005; 23(5):393-399.
- (129) Zong Q, Schummer M, Hood L, Morris DR. Messenger RNA translation state: the second dimension of high-throughput expression screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(19):10632-10636.
- (130) Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y, Darby CJ, Dudus L, Halldorson J et al. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation. *Nat Med* 1998; 4(6):698-704.

## 8. Danksagung

An erster Stelle gebührt mein ausdrücklicher Dank dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt des Klinikums der Ludwig Maximilians-Universität München, Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, für seine allzeit wohlwollende und protektive wissenschaftliche wie klinische Unterstützung, sowie für die Überlassung des Themas.

Meinem wissenschaftlichen und klinischen Mentor, Herrn PD Dr. Peter Biberthaler, möchte ich ganz besonders danken. Mit großer Geduld und uneingeschränktem Engagement brachte er mir die Grundsätze des wissenschaftlichen und experimentellen Arbeitens bei. Ich weiß es sehr zu schätzen, von seiner großen Kompetenz, seinem unermüdlichen Einsatz und schließlich seiner Freundschaft profitieren zu dürfen.

Weiter möchte ich mich ganz herzlich bei unseren nordamerikanischen Kooperationspartnern aus der Universität Florida, College of Medicine, Herrn Prof. Linc Lyle Moldawer, *Director of the Laboratory of Inflammation Biology and Surgical Science, Department of Surgery, University of Florida*, und Herrn Prof. Dr. Henry V. Baker, *Director of the Department of Molecular Genetics and Microbiology* bedanken. Durch deren intensive Unterstützung war es unserer Arbeitsgruppe möglich, als *Consortium Member* in das nordamerikanische Verbundforschungsprojekte „*Inflammation and Host Response to Injury*“ (ausführliche Informationen siehe <http://www.gluegrant.org/>) aufgenommen zu werden.

Ohne die uneingeschränkt zur Verfügung gestellte technische Expertise der *Senior Biological Scientists* Cecilia M. Lopez, Cynthia Tannahill und Amer Abouhamze wäre die Durchführung der Amplifikationen und Microarray Experimente niemals gelungen.

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. K.-G. Kanz und Frau OÄ Dr. Theresia Hummel. Ein besonderer Dank gebührt den Co-Doktoranden unserer Arbeitsgruppe Polytrauma, Frau Verena Mayer, Herrn Christian Schütz und Herrn Henning Laven, Helen Vester und Michael Matz.

Abschließend möchte ich meiner Familie, besonders meinen Eltern Sonja und Franz-Xaver Bogner für ihre immer grenzenlose moralische, geistige wie auch materielle Unterstützung all meiner schulischen wie beruflichen Bestrebungen danken. Ohne diesen starken Rückhalt wären weder das Studium noch das Zustandekommen dieser Arbeit jemals möglich gewesen.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Vorname: Bogner  
Nachname: Viktoria Johanna Katharina  
Geburtsdatum: 09.02.1981  
Geburtsort: Dachau  
Nationalität: deutsch  
Stand: ledig  
Eltern: Sonja Bogner (Redakteurin)  
Franz Xaver Bogner (Filmregisseur / Drehbuchautor)

### Schulbildung:

1987-1991 Grundschule Neubiberg  
1991-2000 Edith-Stein-Gymnasium der Dominikanerinnen,  
München  
2000 Abitur, Note: 1,5

### Hochschulstudium:

2000-2006 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-  
Universität München  
2006 Staatsexamen an der LMU München, Note: 1,49

### Beruflicher Werdegang:

2006 Approbation als Ärztin  
seit 2007 Assistenzärztin an der Chirurgischen Klinik und  
Poliklinik der LMU, Innenstadt,  
(Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler)

### Auszeichnungen:

2004 Posterpreis der Vereinigung Bayrischer  
Chirurgen 2004:  
*„mRNA-Expressionsmuster in Monozyten  
polytraumatisierter Patienten. Microarray-Studie  
zur Detektion der zeitlichen Veränderung  
Trauma-induzierter Gene in der frühen  
postoperativen Phase“*

Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für  
Unfallchirurgie 2004  
*„mRNA Expressionsmuster in Monozyten  
polytraumatisierter Patienten: eine Pilot-Studie  
zur Detektion Trauma-induzierter Gene in  
Relation zum klinischen Outcome der Patienten“*

- 2005            Posterpreis der Society for Complexity in Acute  
Illness, 2005  
*„Massive Blood Transfusion induces  
characteristic monocyte mRNA expression  
patterns in patients after multiple major trauma:  
a microarray pilot study“*
- 2005            Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für  
Chirurgie anlässlich des 1. Gemeinsamen  
Kongress Orthopädie-Unfallchirurgie Berlin 2005  
(Fa. Resorba)