

Aus der

Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie

(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. C-D. Heidecke, MBA)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

# **Der Einfluss des Nervus vagus auf den Status der Genexpression von Splenozyten in der postoperativen Immunsuppression**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald 2020

vorgelegt von:

Florian Graw

geboren am 28. März 1992

in Darmstadt

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Grabe  
1. Gutachter: Herr PD Dr. Pantelis  
2. Gutachter: Frau PD Dr. Menges  
Ort, Raum: Disputation per Videokonferenz  
Tag der Disputation: 15. Mai 2020

**Meiner Familie**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Traumata und ihre Auswirkungen auf das Immunsystem .....	1
1.2 Einfluss des Nervus vagus auf immunologische Parameter und der cholinerge-anti-inflammatorische Signalweg .....	3
1.2.1 Afferenter Schenkel des anti-inflammatorischen Signalweges .....	4
1.2.2 Efferenter Schenkel des anti-inflammatorischen Signalweges: 2 Modelle .....	6
1.2.2.1 Modell der disynaptischen Verbindung .....	6
1.2.2.2 Nicht-neuronales Modell .....	6
1.3 Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor und sein Einfluss auf die Freisetzung inflammatorischer Zytokine .....	7
1.4 Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor als Verstärker der Signalkaskade .....	10
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1 Laborgeräte .....	12
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	13
3.3 Reagenzien und Chemikalien .....	14
3.4 Kits .....	14
3.5 Lösungen .....	15
3.6 Software .....	15
3.7 Operative Methoden .....	15
3.7.1 Genehmigung .....	15
3.7.2 Labortiere und Haltung .....	15
3.7.3 Anästhesie .....	16
3.7.4 Operation .....	16
3.7.4.1 SID .....	16
3.7.4.2 Vagotomie .....	18
3.7.5 Postoperative Maßnahmen und Scoring .....	19
3.7.6 Tötung der Mäuse .....	19
3.7.7 Organentnahmen .....	19
3.7.8 Aufarbeitung des Blutes .....	19
3.8 Molekularbiologische Methoden .....	20
3.8.1 RNA-Extraktion aus Splenozyten .....	20
3.8.2 Umschreiben von RNA zu cDNA .....	21
3.8.3 Real-Time-PCR .....	21
3.9 Statistische Auswertung .....	23
3.9.1 Auswertung der Microarray-Daten .....	23

3.9.2	Auswertung der RT-PCR .....	24
3.10	IL6-CBA .....	25
3.11	Strukturierung der Arbeit .....	27
3.11.1	Erster Teil: Vorversuch: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von Splenozyten .....	27
3.11.2	Zweiter Teil: Charakterisierung der SID auf Transkriptebene .....	29
3.11.3	Dritter Teil: Hauptversuch: Analyse des Milz-Transkriptoms mittels Microarrays .....	29
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
4.1	Erster Teil: Vorversuch: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von Splenozyten ...	31
4.2	Zweiter Teil: Charakterisierung der SID auf Transkriptebene .....	35
4.3	Dritter Teil: Hauptversuch: Analyse des Milz-Transkriptoms mittels Microarrays ..	37
4.3.1	Veränderungen 3 Stunden nach SID verglichen mit der Kontrollgruppe .....	37
4.3.1.1	DNA-Replikation .....	37
4.3.1.2	ATM-Signalweg .....	38
4.3.1.3	Regulierung des „G2/M-Checkpoint“ .....	39
4.3.1.4	Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr .....	40
4.3.1.5	Gene mit der größten Veränderung der Expression .....	40
4.3.2	Veränderungen 6 Stunden nach SID versus Kontrolle .....	42
4.3.2.1	Gene, die in die Adhäsion und Diapedese von Granulozyten involviert sind .....	43
4.3.2.2	Interleukin 10-Signalweg .....	44
4.3.2.3	Weitere nach SID differentiell exprimierte Gene .....	44
4.3.3	Veränderungen 3 Stunden nach SID in Abhängigkeit vom Nervus vagus .....	45
4.3.4	Einfluss des Nervus vagus auf die Genexpression 6 Stunden nach SID .....	46
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
5.1	Erster Teil: Vorversuch: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von Splenozyten ...	48
5.2	Zweiter Teil: Charakterisierung der SID auf Transkriptebene .....	49
5.3	Dritter Teil: Hauptversuch: Analyse des Milz-Transkriptoms mittels Microarrays ..	50
5.3.1	Veränderungen in der initialen Phase der postoperativen Immunsuppression 3 Stunden nach SID versus Kontrolle .....	51
5.3.1.1	DNA-Replikation nach operativem Trauma .....	51
5.3.1.2	Einfluss des Nervus vagus auf die DNA-Replikation .....	52
5.3.1.3	Beeinflussung von Reparaturmechanismen nach SID: ATM-Signalweg .....	52
5.3.1.4	Beeinflussung des Zellzyklus im Übergang zwischen der G2- und der Mitosephase durch die SID-Operation .....	55
5.3.1.5	Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr .....	57
5.3.1.6	Gene mit der stärksten Veränderung der Expression 3 Stunden nach SID .....	58

5.3.1.7	Verschiebung der immunologischen Prozesse in Richtung der angeborenen Abwehr .....	58
5.3.2	Genexpressionsmuster 6 Stunden nach SID im Vergleich zur Kontrollgruppe ...	60
5.3.2.1	Sensibilisierung vagaler Afferenzen nach SID .....	60
5.3.2.2	Limitation von Entzündungsreaktionen .....	64
5.3.3	Auswirkungen der Vagotomie auf die Genexpression nach Trauma .....	66
5.3.3.1	Veränderungen 3 Stunden nach SID mit Vagotomie im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	66
5.3.3.1.1	Einfluss des Nervus vagus auf die Expression von Histonen und die Myeloperoxidase .....	69
5.3.3.1.2	Einfluss auf die Expression von Lactoferrin .....	70
5.3.4	Postoperative Immunsuppression in Abhängigkeit vom Nervus vagus zum Explantationszeitpunkt 6 Stunden nach SID .....	72
<b>6.</b>	<b>Fazit</b> .....	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>85</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>86</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Traumata und ihre Auswirkungen auf das Immunsystem

Unser Immunsystem ist ein optimal ausgeklügeltes System von spezialisierten Zellen, das den Körper vor verschiedensten äußeren Einflüssen schützt. Das Spektrum reicht dabei von Mikroorganismen und Bakterien bis hin zu Pilzen und Viren. Dabei wirken angeborene/unspezifische und adaptive Abwehrmechanismen zusammen.

Doch der Körper ist neben dieser ständigen Auseinandersetzung mit pathogenen Keimen auch durch Verletzungen ernsthaft bedroht. Denn Gewebeverletzungen sind durch entsprechende körpereigene Traumaproteine in der Lage, das Immunsystem zu beeinflussen. Traumata, wie sie nach einem chirurgischen Eingriff entstehen, können in Abhängigkeit des Schweregrades zu einer Herabregulation des Immunsystems führen. In diesem Zusammenhang kann beim Menschen ein vermindertes Vorliegen von T-Zellen gezeigt werden aber auch eine verminderte Zytokinproduktion [1–3]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird vielfach die Existenz einer postoperativen Immunsuppression postuliert.

So kann man die Gefährdung von operativ behandelten Patienten unter zwei Gesichtspunkten betrachten. Zum einen existiert eine mikrobiologische Gefährdung durch Keime wie Bakterien, Viren und andere Mikroorganismen. Diese ist bereits Gegenstand von mannigfaltiger Forschung und es existieren bereits gute Therapiemodalitäten wie Desinfektion und Antibiose, um dieser Gefährdung Herr zu werden. Die andere Säule ist die Bedrohung durch die sogenannte postoperative Immunsuppression. Der Gewebeschaden im Rahmen der Operation führt zu einer temporären Herabregulation der Immunzellen und es kommt es zu einer Dysfunktion der Immunabwehr. Bei einem unkomplizierten Verlauf kann sich ein normales Immunsystem nach wenigen Tagen wieder etablieren. Aber auch Komplikationen sind möglich: So kann eine gestörte Immunantwort in Kombination mit einer mikrobiellen Besiedlung in einer Sepsis gipfeln, die nicht selten für den Patienten letal endet [1]. Daher ist die Verhinderung einer postoperativen Immunsuppression klinisch genauso wichtig wie eine gezielte antiinfektiöse Therapie.

Aufgrund dieser wichtigen klinischen Bedeutung soll mit dieser Arbeit eine weitere Erkenntnisebene geschaffen werden. Daher wird die Auswirkungen von operativen Traumata und die Rolle des Nervus vagus in der postoperativen Immunsuppression auf Transkriptebene untersucht.

Als Trauma-Modell wird im Rahmen meiner Arbeit das von Koerner et al. beschriebene Procedere der „surgically induced immune dysfunction“ (SID) [4] verwendet, welches auf dem „intestinal manipulation model“ (IMM) [5] beruht. Dabei stellt die SID eine intensiviertere Form des IMM dar: Nach Eröffnung der Bauchhöhle wird der Dünndarm in antegrader Richtung zwischen 2 Wattestäbchen komprimiert. Dieses Procedere wird daraufhin zweimal wiederholt, um das Ausmaß des chirurgischen Traumas zu vergrößern.

Nach intestinaler Manipulation zeigen sich im Mausmodell signifikant erhöhte Spiegel der beiden Traumaproteine Interleukin 6 (IL6) und high mobility group box 1 protein (HMGB1). Die darauf folgende postoperative Immunsuppression lässt sich beim Menschen anhand verschiedener Parameter qualifizieren. Zum einen sinkt die Expression des Oberflächenmoleküls „human leukocyte antigen“, Isotyp DR (HLA-DR) auf Monozyten ab, was eine verminderte Proliferation von stimulierten T-Lymphozyten und damit eine geringere IL2 bzw. Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) Sekretion zur Folge hat. Außerdem steigen die Corticosteronspiegel im Serum [4, 1] und die Aktivität von natürlichen Killerzellen sinkt [6]. Zudem ändert sich das Verhältnis zwischen immunsuppressiv wirkenden regulatorischen T-Zellen und proinflammatorischen T-Zellen hin zu den regulatorischen Zellen [7].

Dabei existiert eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß des traumatischen Geschehens und dem Grad der Immunsuppression [1].

Das durch eine OP gesetzte Trauma, welches die gesamte Leistung des Immunsystems verändert, ist zunächst ein aseptisches Geschehen. Auf dem Boden dieser Suppression kann die Einwanderung von Erregern als „second Hit“ [6] zu einem Zusammenbruch der physiologischen Abwehrmechanismen führen, was in der Ausbildung einer Sepsis gipfeln kann. Aus diesem Grunde hat sich eine Nomenklatur für septische Geschehen entwickelt, die die unterschiedlichen Ätiologien berücksichtigt. Typ-A-Sepsis beschreibt eine spontan erworbene Sepsis im Kontext eines intakten Immunsystems. Die Typ-B-Sepsis entsteht auf Basis supprimierter Abwehrkräfte nach einem chirurgischen Eingriff bzw. sonstigen Traumata [8, 1].

## 1.2 Einfluss des Nervus vagus auf immunologische Parameter und der cholinerge-anti-inflammatorische Signalweg

Seit dem Jahre 2000 steht mit der Arbeit von Borovikova et al. ein Modell zur Verfügung, das den immunsupprimierten Status auf die cholinergen Eigenschaften des Nervus vagus zurückführt [9]. In mit LPS infizierten und vagotomierten Ratten kann eine elektrische Stimulation des distalen Endes des N. vagus die TNF-Konzentration in Serum und in der Leber reduzieren und die Ausbildung einer septisch bedingten Hypotension verhindern.

Diese Forschungsarbeit sowie die folgenden Untersuchungen am cholinergen antiinflammatorischen Signalweg (CAIP) wurden hauptsächlich an Sepsis-Modellen etabliert und nicht im Rahmen traumatischer Ereignisse.

Die Arbeiten im chirurgischen Forschungslabor der Universität Greifswald beschäftigen sich mit der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse aus dem Sepsis-Modell auf die Immunsuppression nach aseptischem Traumaschehen.

Im Folgenden wird der aktuelle Stand der Forschung auf dem Gebiet des CAIP im Rahmen der Sepsis resümiert und in Kontext zur Rolle des Nervus vagus im Bereich der aseptischen, postoperativen Immunsuppression gesetzt.

Aufgabe des cholinergen, antiinflammatorischen Signalweges ist es, Gewebeschädigungen zu detektieren und der systemischen Entzündungsreaktion entgegenzuwirken, um eine Homöostase herzustellen. Eine gut kontrollierte Entzündung hilft, eindringende Keime zu bekämpfen. Ein verschobenes Gleichgewicht hin zu überschießender Entzündung oder Immunparalyse führt jedoch zu Organschäden. Daher ist es von großer Bedeutung, die Rolle des Nervus vagus in der postoperativen Immunsuppression aufzuklären.

Der cholinerge antiinflammatorische Signalweg wird auch als antiinflammatorischer Reflex bezeichnet, da er die drei Merkmale eines solchen aufweist:

1. eine afferente Bahn, die Zeichen der Gewebeschädigung in der Peripherie detektiert und diese dem zentralen Nervensystem zuführt;
2. einen zentralen Ort der Verrechnung ankommender Signale und
3. einen efferenten Weg, der die Immunantwort modulierenden Signale in die Peripherie leitet [10].

### 1.2.1 Afferenter Schenkel des anti-inflammatorischen Signalweges

Endogene Signale, die Zellschädigung durch z. B. Traumata, Ischämie oder mikrobiologischen Befall anzeigen, werden als „Alarmine“ bezeichnet. Ein prominenter Vertreter im Bereich der sterilen Gewebeschädigung durch traumatische Einflüsse, wie sie im Rahmen einer Operation vorkommen, ist HMGB1 [11]. Dieses Protein befindet sich physiologischerweise im Nukleus der Zelle. Es bindet und modifiziert die Struktur der DNA. Durch diese Wirkung als „Chaperon“ erleichtert HMGB1 die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre zugehörige DNA-Bindungsstelle und ermöglicht das Remodeling von Nukleosomen. Kommt es zur Apoptose, bindet das Protein irreversibel an das hypoacetylierte Chromatin und wird daraufhin nicht in den Extrazellularraum freigesetzt [12]. Gelangt HMGB1 jedoch nach extrazellulär, kann es mit dem „receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE) und den „toll like receptors“ 2/4 (TLR2/4) auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z. B. Makrophagen, interagieren und inflammatorische Reaktionen auslösen, die vergleichbar sind mit denen von Lipopolysaccharid (LPS) [13]. Dieser Mechanismus wird in Abbildung 1 verdeutlicht.

HMGB1 kann auf zwei Arten die Zelle verlassen. Zum einen durch Nekrose nach traumatischen Einflüssen und zum anderen können aktivierte Immunzellen HMGB1 freisetzen als Reaktion auf exogene/endogene Signale der Zellschädigung. Dies geschieht über die Inflammasomen, also intrazelluläre Proteinkomplexe, die „double stranded RNA dependent kinase“ (PKR)-abhängig das Traumaprotein sekretieren [14–16].

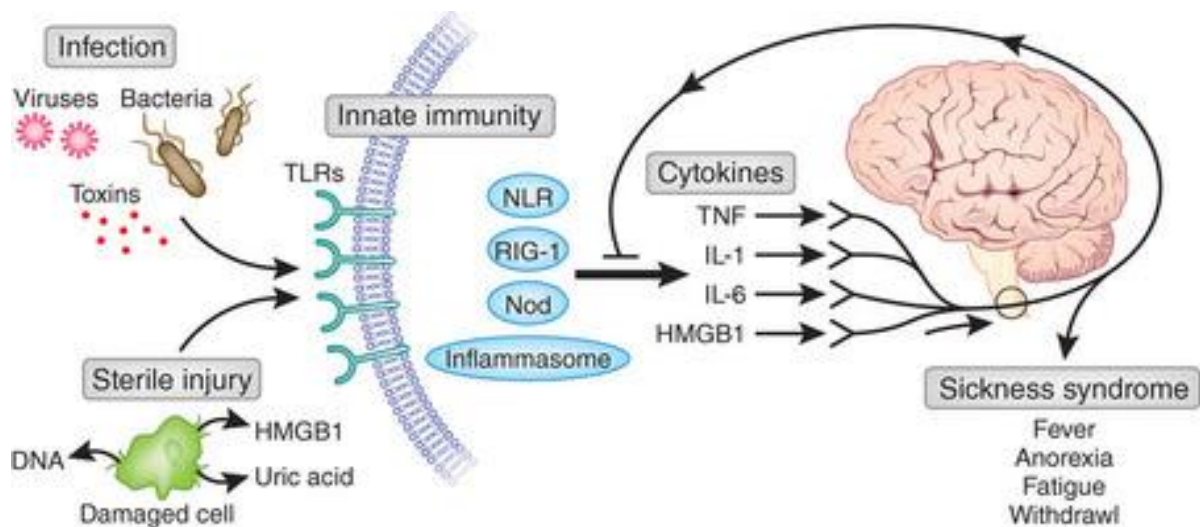
Die Tatsache, dass Agonisten des TLR-Systems eine große Bedeutung in der postoperativen Immunsuppression haben, zeigt die Arbeit von Novotny et al. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Konzentration von Agonisten der TLR2 und TLR4 - wie HMGB1 – zu einer schweren Sepsis durch eine dominierende antiinflammatorische Immunreaktion führt [17].

Sowohl sterile Gewebeerletzungen über beispielsweise HMGB1 als auch Endotoxine nach bakteriellen Infektionen können Makrophagen dahingehend stimulieren, TNF $\alpha$  oder IL1 $\beta$  zu produzieren, um so eine inflammatorische Reaktion hervorzurufen [18].

Diese Botenstoffe können nun vom afferenten Schenkel des vagalen Reflexes detektiert werden.

Der Zusammenhang zwischen Immunsystem und Nervus vagus wurde bisher im Sepsismodell untersucht. Hier hat sich das Zytokin IL1 $\beta$  als wichtiger Vermittler herausgestellt. Makrophagen, Dendritische Zellen und andere Immunzellen erkennen mikrobielle Bedrohung und reagieren, indem sie Botenstoffe wie das IL1 $\beta$  sezernieren. Diese werden von Sensoren erkannt, die in räumlich enger Beziehung zum 10. Hirnnerv stehen - sogenannte Paraganglien.

Glomus-Zellen machen den größten Bestandteil solcher Paraganglien aus. Sie exprimieren Bindungsstellen für Liganden wie IL1. Da sie entweder mit dem Nervus vagus über Nervenfasern verbunden sind oder direkt in den Nerv selber eingebettet sind, können sie auf ideale Weise die lokalen Veränderungen der IL1 $\beta$ -Spiegel messen und diese als Zeichen einer Konfrontation mit Pathogenen an den Nervus vagus weiterleiten. Auf diese Weise etablieren Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen einen Signalweg, der auf die eindringenden Pathogene wesentlich schneller reagiert, als z. B. die T-Zell-Aktivierung [19–21]. Die Afferenzen gelangen zum Nucleus tractus solitarii, worauf lokale, immunsupprimierende Effekte über den cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg ausgelöst werden [22].



**Abbildung 1:** Der inflammatorische Reflex [10]

Bedrohungen wie Infektionen oder Gewebeverletzungen werden über die angeborene Immunabwehr erkannt und an den Nervus vagus weitergeleitet, welcher in seiner Efferenz die Immunantwort **supprimiert** (reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Immunology,

Understanding immunity requires more than immunology, Kevin J Tracey, © 2010)

Zentraler Bestandteil des efferenten Signalweges ist die Milz. Huston et al. konnten zeigen, dass es nach Splenektomie zu keiner Reduktion von inflammatorisch wirksamem TNF

während Endotoxämie kommt, da der antiinflammatorische Signalweg auf Höhe der Milz unterbunden wurde [23].

### **1.2.2 Efferenter Schenkel des anti-inflammatorischen Signalweges: 2 Modelle**

Über den genauen Verlauf der vagalen Efferenzen existieren unterschiedliche Modelle. Der gemeinsame Konsens besteht darin, dass der Nervus vagus die Milz nicht direkt innerviert.

#### **1.2.2.1 Modell der disynaptischen Verbindung**

Zum einen wird eine disynaptische Verbindung zwischen Nervus vagus und dem Plexus splenicus postuliert. Die Umschaltung des efferenten Aktionspotentials erfolgt in diesem Modell im Ganglion coeliacum mittels „nikotinischen alpha7 Acetylcholin-Rezeptoren“ ( $\alpha 7$  nACh-R.) im Bereich der postsynaptischen Membran. Dies ist eine besondere Schnittstelle, denn sie verbindet das parasymphatische mit dem sympathischen Nervensystem [24–26].

Der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) wird in der Milz schnell hydrolysiert. Daher sind konstante ACh-Spiegel notwendig, um vor Ort konstitutive Effektorfunktionen auszuführen. Diese permanente Quelle an ACh wird von einer spezifischen T-Zell-Subpopulation bereitgestellt. Diese hat einen T-Gedächtniszellen-Phänotyp und besitzt das Enzym „choline acetyltransferase“ (ChAT), welches den entsprechenden Neurotransmitter synthetisiert. ChAT-positive T-Zellen besitzen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren und sind in der Nähe von katecholaminergen Fasern des Plexus splenicus lokalisiert. Damit sind sie in der Lage, auf Aktionspotentiale zu reagieren, die über den Plexus splenicus die Milz erreichen. Das von dem Plexus an der Präsynapse exozytierte Noradrenalin aktiviert die T-Zell-Subpopulation [27].

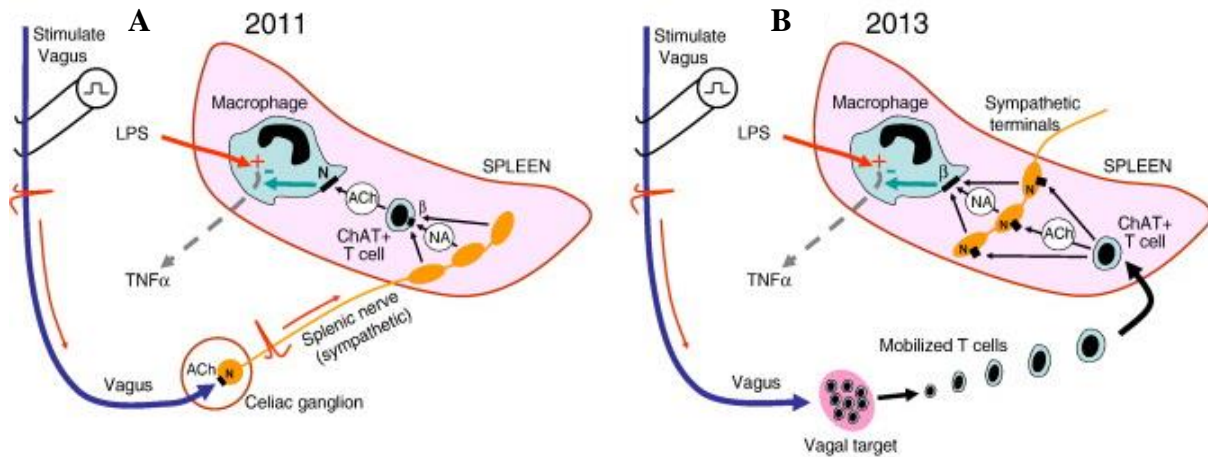
Dieses Modell wird in Abbildung 2 A abgebildet.

#### **1.2.2.2 Nicht-neuronales Modell**

Ein anderes Modell verwirft die Idee der disynaptischen Verbindung zwischen Nervus vagus und Plexus splenicus. Bratton et al. stellten fest, dass nach vagaler Stimulation keine Aktionspotentiale in den Nerven der Milz zu detektieren waren [28]. Nach Martelli et al. mobilisiert die vagale Aktivität Acetylcholin-synthetisierende T-Lymphozyten, welche von der Milz aufgenommen werden und dort den CAIP vorantreiben. Diese Verbindung ist nicht-neuronal und bedingt die Anwesenheit von katecholaminergen Nervenfasern in der Milz [29].

Makrophagen exprimieren neben nikotinergen Rezeptoren auch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, die ebenso die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung supprimieren können [30].

Dieses Modell wird in Abbildung 2 B demonstriert.



**Abbildung 2:** Zwei Modelle zur Beteiligung der Milz am CAIP [29]

Abbildung A beschreibt das Modell der disynaptischen Verbindung zwischen Nervus vagus und dem Plexus splenicus.

Abbildung B beschreibt das nicht-neuronale Modell, bei dem die vagale Aktivität ACh-synthetisierende T-Zellen mobilisiert.

(reprinted from Autonomic Neuroscience, Vol 182, D. Martelli, M.J. McKinley, R.M. McAllen, The cholinergic anti-inflammatory pathway: A critical review, page 65-69, ©2014 with permission from Elsevier)

### 1.3 Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor und sein Einfluss auf die Freisetzung inflammatorischer Zytokine

Das letzte Glied im efferenten Schenkel des Signalwegs stellt der  $\alpha 7$ nACh-Rezeptor auf Makrophagen dar. Auf diesen wirkt das nach Vagus-Aktivierung in der Milz synthetisierte ACh. Hierbei stehen mehrere subzelluläre Signalkaskaden im Vordergrund:

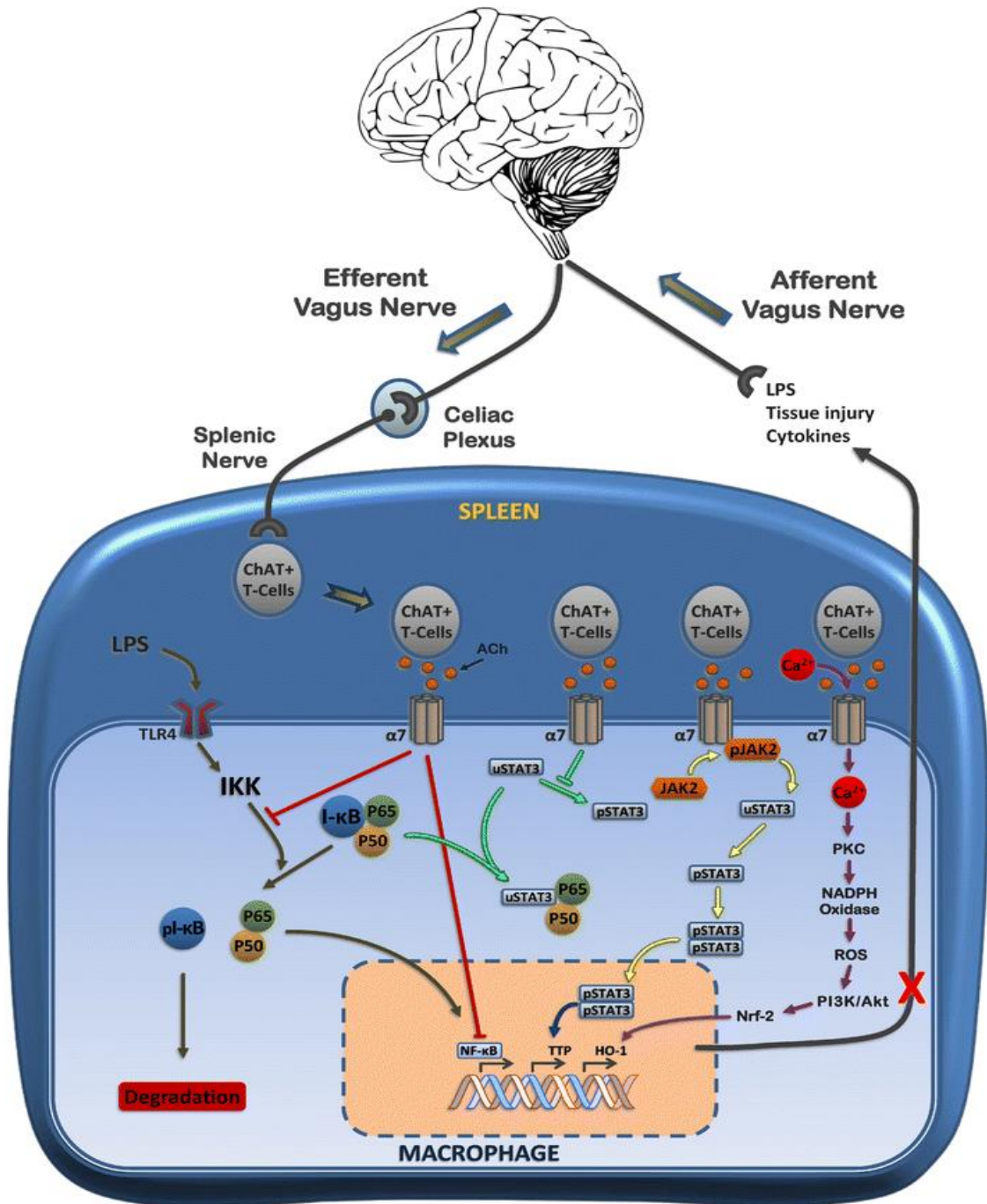
Zum einen der „nuclear factor  $\kappa$ B“ (NF $\kappa$ B)-Weg, über den eine proinflammatorische Reaktion auf Pathogene hin ausgelöst wird und zum anderen der „Janus Kinase 2/Signal transducer and activator of transcription 3“ (JAK2/STAT3)-Signalweg, über den der  $\alpha 7$ nACh-Rezeptor seine antiinflammatorischen Wirkungen entfaltet.

Der NF $\kappa$ B-Signalweg wird als Reaktion auf ein breites Spektrum an Stimuli aktiviert. So können „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) oder auch endogene Moleküle

wie das HMGB1 über den „toll-like receptor 4“ (TLR4) wirken. Stress assoziierte Signale und Zytokine wie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) agieren über den TNF-Rezeptor oder Antigene über den „T-cell-receptor“ (TCR). Als Reaktion auf diese Liganden-Rezeptor-Interaktion kommt es nachfolgend zur Phosphorylierung von „inhibitors of NF $\kappa$ B“ (I $\kappa$ B) durch „I $\kappa$ B-kinases“ (IKK), wodurch I $\kappa$ B ubiquitinyliert und abgebaut wird. Dadurch kann NF $\kappa$ B in den Zellkern translozieren. Dort wirkt es als Transkriptionsfaktor und ist involviert in die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [31]. Diese Kaskade ist in Abbildung 3 dargestellt.

Der  $\alpha$ 7nACh-Rezeptor wirkt über den JAK2/STAT3-Signalweg [32]. Nach Autophosphorylierung von JAK2 und anschließender Aktivierung wird STAT3 aktiv und formt Dimere, die sich in den Nukleus bewegen. In der Studie von de Jonge et al. mit Nikotin als Agonist fungieren phosphorylierte STAT3-Dimere als negative Regulatoren [33], wohingegen bei Peña et al. 2010 Cholin als Agonist verwendet wird. Hier führt die  $\alpha$ 7nACh-Rezeptor-Aktivierung zur Hemmung der STAT3-Tyrosin-Phosphorylierung, unphosphoryliertes STAT3 bildet einen Komplex mit NF $\kappa$ B und wirkt auf diese Weise antiinflammatorisch [34]. Dieser Ansatz erklärt die Wirkung des  $\alpha$ 7nACh-Rezeptors auf den NF $\kappa$ B-Signalweg. In Abbildung 3 sind die beiden Modelle der negativen Regulation durch den  $\alpha$ 7nACh-Rezeptor und den JAK2/STAT3-Signalweg erläutert.

Auch Wang et al. konnten zeigen, dass über die Aktivierung des  $\alpha$ 7nACh-Rezeptors die NF $\kappa$ B-Translokation verhindert wird und so die Produktion von inflammatorisch wirksamen HMGB1 nicht stattfindet [18].



**Abbildung 3:**

Rezeptoren und ihre subzellulären Signalkaskaden im CAIP [32]

PAMPS wie LPS können die Produktion proinflammatorischer Zytokine bewirken, indem sie über TLR den NFκB-Signalweg aktivieren.

Der α7nACh-Rezeptor wirkt über den JAK2/STAT3-Signalweg und greift in den NFκB-Signalweg ein.

(reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Journal of NeuroImmune Pharmacology, Activation of the Macrophage α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation, Carlos A. Báez-Pagán et al, © 2015)

#### 1.4 Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor als Verstärker der Signalkaskade

Downs et. al detektierten den  $\alpha 7$ nACh-Rezeptor außerdem auf sympathischen Nervenfasern in der Milz. Aufgrund seiner präsynaptischen Lokalisierung schlagen sie ein positives Feedback-System vor. Das Acetylcholin der ChAT-positiven T-Lymphozyten aktiviert nicht nur den „downstream“ gelegenen  $\alpha 7$ nACh-Rezeptor, sondern kann die sympathischen Nervenfasern selber dazu anregen, vermehrt Noradrenalin zu synthetisieren, was in einer erheblich gesteigerten ACh-Synthese resultiert [25].

Außerdem hat dieser Rezeptor Auswirkungen auf Milz-Makrophagen. Sie stellen das letzte Glied des CAIP dar und sind die wichtigste Quelle für TNF aus der Milz [26]. Über die  $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren inhibiert Acetylcholin die TNF-Produktion von Roter-Pulpa-Makrophagen und Marginalzonen-Makrophagen [27].

So hat der CAIP durch den Nervus vagus einen immunmodulatorischen Effekt und interagiert an verschiedenen Stellen mit dem Immunsystem. Er unterdrückt aber nicht nur die Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen, sondern hat auch Auswirkungen auf Dendritische Zellen oder T-Zellen. So reguliert die  $\alpha 7$ nACh-Rezeptor-Aktivierung die Expression von CD14/TLR4 auf Immunzellen herab [35].

Huston et al. zeigten, dass nach „vagus nerve stimulation“ (VNS) die durch LPS induzierte Expression des Oberflächenmarkers CD11b auf Neutrophilen Granulozyten zurückgeht und dies die Auswanderung von Zellen aus der Milz Richtung Entzündungsquelle inhibiert [36].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der cholinerge anti-inflammatorische Signalweg nicht nur den Immunstatus nach pathogener Invasion beeinflusst, sondern auch in die Immunregulation nach einem Trauma mit anschließender HMGB1-Freisetzung eingebunden ist. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse beschreiben den Einfluss des Nervus vagus auf die Genexpression von Splenozyten nach postoperativem Trauma.

### 2. Fragestellung

Viele Studien zeigen, dass eine traumatische Schädigung sowohl im Mausmodell als auch bei Patienten zu einer postoperativen Immunsuppression führt. Diese lässt sich unter anderem in einer verminderten T-Zell-Proliferation, einer verminderten MHC-II-Expression und anderen funktionellen Parametern sichtbar machen. Damit ist diese Suppression ein großes Problem – denn während einer solchen Immunsuppression ist der Körper wesentlich anfälliger für systemische Infektionen, die in einer Sepsis gipfeln können und nicht selten letal für den Patienten enden.

Obwohl bisher viel auf diesem Gebiet geforscht wurde, ist weiterhin unklar, wie das Phänomen der postoperativen Immunsuppression auf Transkriptionsebene reguliert wird. Zu welchem Zeitpunkt beginnen die molekularen Mechanismen und welchen zeitlichen Verlauf nimmt diese Suppression? Welche Gentranskripte werden induziert oder reprimiert und führen dadurch zu einer Immunparalyse? Und welche Rolle spielt der Nervus vagus in diesem komplex regulierten System?

Diese Fragen sollen mit der hier vorliegenden Arbeit geklärt werden und auf diese Weise eine weitere Erkenntnisebene im Themenkomplex der postoperativen Immunsuppression geschaffen werden. Mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erhofft sich die Forschungsgruppe einen detaillierten Blick auf den Pathomechanismus der postoperativen Immunsuppression. Damit soll die noch vorhandene Lücke geschlossen werden zwischen den beobachteten klinischen Effekten dieser Suppression und den bereits vorliegenden Forschungsergebnissen auf zellulärer Ebene. Mit diesem vertieften Wissen können dann klinische Ansätze entwickelt werden, die vagalen Funktionen so zu modifizieren, dass eine Immunparalyse verhindert oder abgeschwächt werden kann.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Laborgeräte

7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Homogenisator precellys 24	bertin technologies
Kaltlichtquelle KL1500	Leica Microsystems, Wetzlar
Leber-und Wundhaken inkl. Zubehör	Braintree Scientific, Braintree
Mikroskop M651	Leica Microsystems, Wetzlar
Nadelhalter, Aesculap	Braun, Melsungen
Pinzette	Asanus, Neuhausen ob Eck
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Schere	Asanus, Neuhausen ob Eck
Spectrophotometer, NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Thermocycler, Tpersonal	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin, Berlin
Wärmeplatte ThermoLux	Witte+Sutor GmbH Murrhardt
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Scientific
Zentrifuge, Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 1:** Laborgeräte

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

1ml Sub-Q, 26G x ½"	Becton Dickinson France S.A.S., Le Pont de Claix
Cryovial 1,2ml	Simport, Beloeil, Canada
EDTA Röhrchen; 1,3ml	Sarstedt, Nümbrecht
End-to-End Kapillare 20 µl K2E	Sarstedt, Nümbrecht
Homogenisatorröhrchen, Precellys Ceramic Kit 1.4/2,8mm	peqlab, Erlangen
Injekt 5ml	Braun, Melsungen
Injekt-F Tuberkulin	Braun, Melsungen
Leukoplast	BSN Medical GmbH, Hamburg
Li-Heparin Röhrchen; 1,3ml	Sarstedt, Nümbrecht
MicroAmp, Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Warrington; England
Microlance 3, 20G x 1,5 " Nr. 1	Becton Dickinson S.A., Fraga
Mullkompressen, 5x5 cm	Fuhrmann GmbH, Much
PCR Soft Tubes 0,5 ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Petrischalen groß	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes
Petrischalen klein, Falcon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes
Polyester Faden weiß, 4/0USP	Catgut GmbH, Markneukirche
SafeSeal-Tips, verschiedene Größen	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Sealing Tape	Sigma-Aldrich, München
Vicryl Faden 5-0, resorbierbar	Johnson&Johnson, Diegem
Wattestäbchen, steril	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien

### 3.3 Reagenzien und Chemikalien

Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GAPDH, IL-6, HMGB1 Gene Expression Assay, mouse, 20 fach konzentriert	Applied Biosystems
Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Berlin-Chemie AG, Berlin
Ketamin 100mg/ml	selectavet, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn/Holzolling
Mercaptoethanol, 98%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase-free water	Qiagen, Hilden
RNaseZAP	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2 fach konzentriert	applied biosystems, Warrington, England
Tramadolhydrochlorid 100mg/ml	Grünenthal GmbH, Aachen
Xylasel 20mg/ml	selectavet, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn/Holzolling

**Tabelle 3:** Reagenzien und Chemikalien

### 3.4 Kits

RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
HMGB1- ELISA	IBL international, Hamburg
mouse IL-6 CBA	BD Bioscience
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
IL-6 CBA	BD Bioscience

**Tabelle 4:** Kits

### 3.5 Lösungen

Narkose:      0,5ml 2% Xylazin  
                  1ml 10% Ketamin  
                  8,5ml 0,9% NaCl

### 3.6 Software

ingenuity pathway analysis	Qiagen
ABI Prism 7000 SDS Software	Applied Biosystems
7300 System SDS Software	Applied Biosystems

**Tabelle 5:** Software

### 3.7 Operative Methoden

Sämtliche Experimente wurden im chirurgischen Forschungslabor der Universitätsmedizin Greifswald sowie im Tier-OP des Biotechnikums Greifswald durchgeführt. Dort erfolgte auch die Tierhaltung. Die biologische Sicherheitsstufe betrug jeweils S1.

#### 3.7.1 Genehmigung

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Das Aktenzeichen des Vor- und Hauptversuchs lautete 7221.3-1-046/15.

Alle Versuche und der Umgang mit den Labortieren erfolgten in Einklang mit dem Tierschutzgesetz (TierSchG) und unter Beachtung der aktuellen Richtlinien der “Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA).

#### 3.7.2 Labortiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden 10 bis 12 Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6 der Firma Charles River Laboratories International, Inc. verwendet. Die Mäuse wurden in einem entsprechenden Zeitraum vor den Versuchen bestellt, sodass sie sich zwei Wochen in den neuen Räumlichkeiten und Käfigen akklimatisieren konnten. Das Einstreu bestand aus Naturholzfasern; Futter und Wasser standen den Tieren in unbegrenzter Menge zur Verfügung.

### 3.7.3 Anästhesie

Die Narkose bestand aus Xylasol, Ketamin und isotoner Natriumchlorid-Lösung und wurde mit einer Dosierung von 10 µl pro g Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Bis zum vollständigen Einsetzen der Narkose nach ca. 5 Minuten wurde das betroffene Tier in einem separaten Käfig gehalten. Die Tiefe der Narkose wurde anhand fehlender motorischer Aktivität wie dem Zucken der Barthaare, der Abwesenheit von Reflexen wie dem Umdrehreflex und fehlender Reaktion auf einen Schmerzreiz überprüft.

### 3.7.4 Operation

Zur Charakterisierung der Rolle des Nervus vagus in der postoperativen Immunsuppression auf Ebene des Genoms wurden zwei operative Tiermodelle eingesetzt. In einem ersten Versuch wurden zwei relevante Zeitpunkte ermittelt, zu denen die Expression von mRNA in der SID-Gruppe eine signifikante Steigerung gegenüber Kontrollmäusen (SHAM-SID) erfuhr. In einem anschließenden Versuch wurde zu diesen Zeitpunkten die Explantation der Milzen bei Mäusen vorgenommen, die vorher Vagotomien bzw. SHAM-Vagotomien und einer SID bzw. SHAM-SID unterzogen wurden. Anschließend wurden aus den entnommenen Milzen Splenozyten isoliert und daraus mRNA gewonnen. Damit wurden die Genexpressionschips beladen.

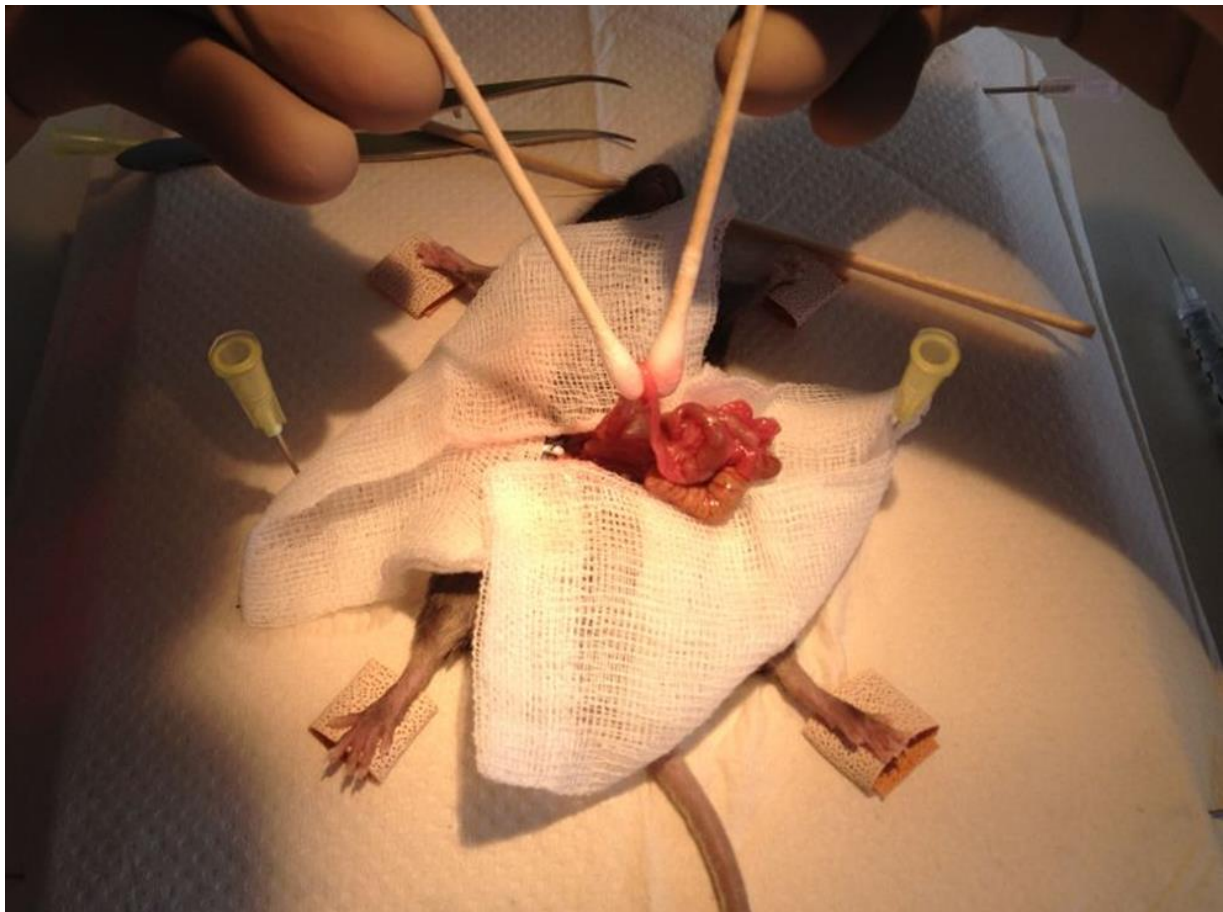
Sämtliche Operationen wurden auf einer Wärmeplatte durchgeführt, um während der Operation einen Wärmeverlust der Tiere zu verhindern. Die Tiere wurden an den Pfoten mittels Leukoplast auf der Platte fixiert.

#### 3.7.4.1 SID

Wie in der Einleitung erwähnt, basiert die Operation der SID auf den Arbeiten von Kalff et al. [5]. Zu Beginn eines jeden chirurgischen Eingriffs wurde das zu operierende Gebiet mit 70-prozentiger Ethanollösung desinfiziert. Danach erfolgte eine Laparotomie. Hierbei wurde zunächst die Haut mit einer Schere eröffnet, um anschließend das Peritoneum entlang der Linea Alba zu durchtrennen. Dadurch wurden keine größeren Gefäße verletzt, was den intraoperativen Blutverlust minimierte. Die Höhe der Inzision richtete sich nach der jeweiligen Operationsmethode. So erfolgte der Hautschnitt bei der Vagotomie weiter kranial (vom kaudalen Ende des Sternum abwärts), bei der SID weiter kaudal.

Bei der SHAM-SID erfolgte nach der Laparotomie keine weitere Manipulation am OP-Situs.

Zur Vorbereitung des weiteren Vorgehens bei der SID wurden nicht betroffene Bereiche des Abdomen und Thorax der Maus mit Mullkompressen abgedeckt, die mit isotoner Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) befeuchtet wurden. Damit wurde das Operationsgebiet in der Art eines Lochtuchs von der Umgebung abgeschirmt. Zu Beginn der SID wurde das Caecum aufgesucht, mobilisiert und aus dem Abdomen hinaus auf die Mullkompressen verlagert. Im Anschluss erfolgte dies mit Ileum und Jejunum. Die nun extraabdominal liegenden Darmabschnitte wurden dann von oral nach aboral bis zum Caecum zwischen zwei Wattestäbchen ausgestrichen. Diese Prozedur erfolgte insgesamt drei Mal. Abschließend wurde der Darm in umgekehrter Reihenfolge des Mobilisierens zurück in die Bauchhöhle verlagert und 0,5 ml isotone Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) als Substitution von Flüssigkeitsverlusten intraperitoneal appliziert.



**Abbildung 4:** SID-Operation

Der Dünndarm wurde von oral nach aboral bis zum Caecum zwischen zwei Wattestäbchen ausgestrichen.

### 3.7.4.2 Vagotomie

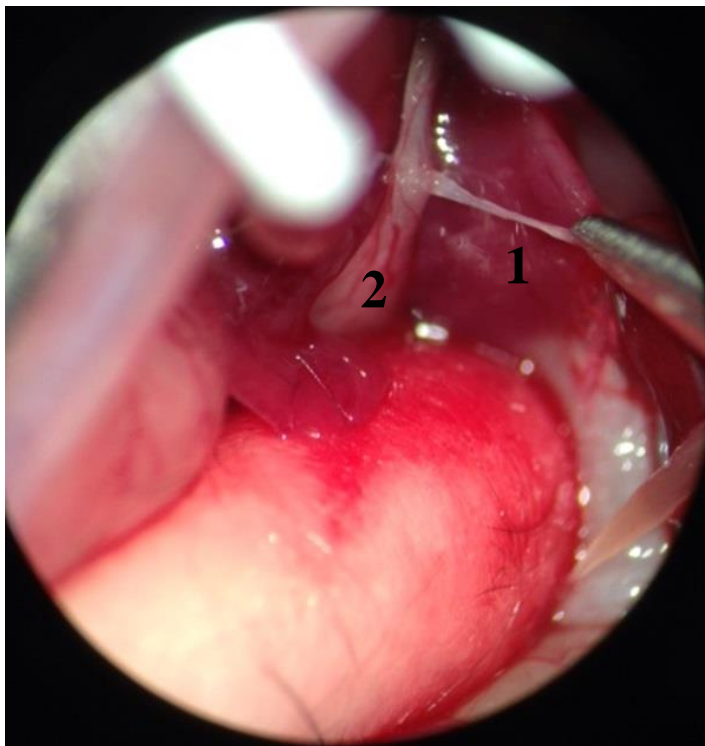
Diese OP-Technik orientiert sich an den Arbeiten von Keßler et al. [37].

Die Vagotomie wurde unter einem Mikroskop durchgeführt. Nach Laparotomie und Freilegen der Leber wurden die kaudalen Leberlappenanteile aus dem Situs nach oben mobilisiert und mit einem Leberhaken fixiert. Die Wundränder wurden mit Wundhaken aufgespannt.

Dadurch wurden die darunter liegenden Strukturen sichtbar, wie z. B. der Ösophagus mit darauf verlaufendem Nervus vagus. Der subdiaphragmale, anteriore Anteil des Vagus wurde mit einer Pinzette stumpf durchtrennt. Danach wurde der Ösophagus mobilisiert und durch leichten Zug am Magen gespannt. Dies ermöglichte den Zugang zum posterioren Teil des N. vagus, welcher ebenfalls mit einer Pinzette stumpf durchtrennt wurde. Abschließend wurden 0,5 ml isotonische Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) intraperitoneal appliziert.

Bei der SHAM-Vagotomie wurde analog zur Vagotomie vorgegangen, bis der Ösophagus freigelegt war. Danach wurde dieselbe Menge Flüssigkeit substituiert.

Zum Abschluss einer jeden Operation wurde das Abdomen schichtweise verschlossen. Zunächst wurden das Peritoneum und die Muskulatur mit einem resorbierbaren Vicryl-Faden 5-0 mittels einer fortlaufenden Naht verschlossen, danach die Haut mit einem nicht-resorbierbaren Polyester-Faden, 4/0 USP ebenfalls mittels fortlaufender Naht. Die Hautnaht wurde mit 70-prozentiger Ethanol-Lösung desinfiziert.



**Abbildung 5:** Subdiaphragmale Vagotomie

Der Nervus vagus (1) wurde mit einer Pinzette vom Ösophagus (2) mobilisiert und stumpf durchtrennt.

### **3.7.5 Postoperative Maßnahmen und Scoring**

Nach Abschluss der Operation wurden die Mäuse in einen frischen Käfig transferiert. Dort wurden sie unter einer Rotlichtlampe bei konstanten 34 Grad bis zu ihrem Erwachen gehalten. Als Schmerzmedikation wurde dem Trinkwasser 2,5 mg Tramadol pro 100 ml beigefügt.

Ab dem ersten postoperativen Tag erhielten die Mäuse ein Scoring bezüglich der Parameter Erscheinungsbild, Atmung, Gewichtsverlust, Spontanverhalten, provoziertes Verhalten, Palpation des Abdomens und Kotbeschaffenheit. Jeder dieser Parameter wurde mit einem Wert zwischen 0 und 3 bewertet und die Punkte addiert. Eine Summe von 7 Punkten oder höher wurde als eine zu hohe Belastung für die Mäuse eingestuft. Dieser Fall trat nie ein.

### **3.7.6 Tötung der Mäuse**

Die Mäuse wurden narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

### **3.7.7 Organentnahmen**

Das Abdomen wurde im linken oberen Quadranten eröffnet, die Milz aufgesucht und diese nach Durchtrennung der versorgenden Gefäße explantiert. In Kryo-Röhrchen wurden die Milzen unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren, um sie für die spätere molekularbiologische Aufarbeitung zu konservieren.

Außerdem wurde mithilfe der retroorbitalen Entnahmetechnik Blut entnommen. Um für die spätere labortechnische Verwendung ein möglichst breites Spektrum an Blutprodukten zur Verfügung zu haben, wurde das Blut sowohl in Heparin, als auch in EDTA-Röhrchen abgenommen.

### **3.7.8 Aufarbeitung des Blutes**

Das EDTA-Blut wurde bei 13.000 G und 4 °C für die Dauer von 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und nach den gleichen Kriterien ein zweites Mal zentrifugiert.

Mit dem Heparin-Blut wurde zunächst ein Blutbild bestimmt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach obigem Schema.

### 3.8 Molekularbiologische Methoden

#### 3.8.1 RNA-Extraktion aus Splenozyten

Zu Beginn wurde der Arbeitsplatz mit RNase-ZAP von RNasen befreit. Für die gesamte Arbeit mit RNA wurden spezielle RNase-freie Pipettenspitzen (SafeSealTips) verwendet, um Verunreinigungen vorzubeugen.

Die RNA-Gewinnung wurde mit dem RNeasy-Midi-Kit von Qiagen durchgeführt und es wurde jeweils eine halbe Milz verwendet. Die Isolierung fand bis zum Waschen der Zellsuspension auf Eis statt. Die Milz wurde zunächst mit 1500 µl RLT-Puffer und 15 µl Mercaptoethanol in ein Reaktionsgefäß mit Keramik-Kügelchen gegeben. In einem Homogenisator erfolgte bei 1500 U/min für 30 Sekunden der Aufschluss der Zellen. Danach wurde die Flüssigkeit in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde in der Eppendorf-Zentrifuge bei 5 rcf und 22 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der zentrifugierten Reaktionsgefäße wurde abgenommen und in sterile und RNase-freie 15 ml Röhrchen gegeben und anschließend die gleiche Menge an 70-prozentigem Ethanol dazu pipettiert. Nun musste der Inhalt der Röhrchen sehr gut gemischt werden, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Das Lysat wurde danach auf Säulen aufgebracht und in der Zentrifuge von Thermo Scientific 10 Minuten lang bei 4000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Es schlossen sich mehrere Waschschritte an: Zunächst mit 4 ml RW1 mit darauf folgendem Zentrifugieren, 5 Minuten lang bei 3000 bis 5000 g und Raumtemperatur, dann mit 2,5 ml RPE-Puffer mit darauf folgendem Zentrifugieren, 2 Minuten lang bei 3000 bis 5000 g und abschließend mit 2,5 ml RPE-Puffer mit darauf folgendem Zentrifugieren, 5 Minuten lang bei 3000 bis 5000 g. Die gewaschene Zellsuspension auf der Säule wurde auf ein neues 15 ml Reaktionsgefäß transferiert. 150 µl RNase-freies Wasser wurde auf die Säule gegeben, leicht geschüttelt und nach einer Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur und 4000 U/min 3 Minuten lang zentrifugiert. Auf diese Weise wurde die RNA von der Säule gelöst und sammelte sich am Boden des Röhrchens. Die Lösung mit isolierter RNA wurde auf Eis gestellt.

Um für die weiteren Arbeitsschritte mit einer definierten Menge RNA arbeiten zu können, wurde die Konzentration der Nukleinsäure im Spektrophotometer gemessen. Für die Leerwertmessung wurden 2 µl Wasser verwendet. Als Einheit wurde „µg/µl“ eingestellt. Um die Reinheit der RNA zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass der Quotient 260 nm/280 nm größer als 1,9 war. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.8.2 Umschreiben von RNA zu cDNA

Diese Methode wurde mit dem QuantiTect-Reverse-Transcription-Kit von Qiagen durchgeführt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Für jede Probe wurde bestimmt, wie viele  $\mu\text{l}$  einem  $\mu\text{g}$  RNA entsprachen. Dieses eine  $\mu\text{g}$  RNA wurde dann mit 2  $\mu\text{l}$  „Wipeout-Buffer“ in ein „PCR-soft-tube“ gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf insgesamt 14  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Die Reaktionsgefäße wurden in einem Thermo-Cycler für zwei Minuten auf 42 °C erhitzt. Danach wurde das Programm gestoppt, die Proben aus dem Cycler genommen und weitere Substanzen dazugegeben: 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase, 1  $\mu\text{l}$  Primer-Mix und 4  $\mu\text{l}$  Pufferlösung. Im anschließenden Transkriptionsschritt wurde die Lösung für 15 Minuten auf 42 °C erhitzt, um die RNA zu cDNA umzuschreiben. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase bei 95 °C für drei Minuten inaktiviert. Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis gestellt.

### 3.8.3 Real-Time-PCR

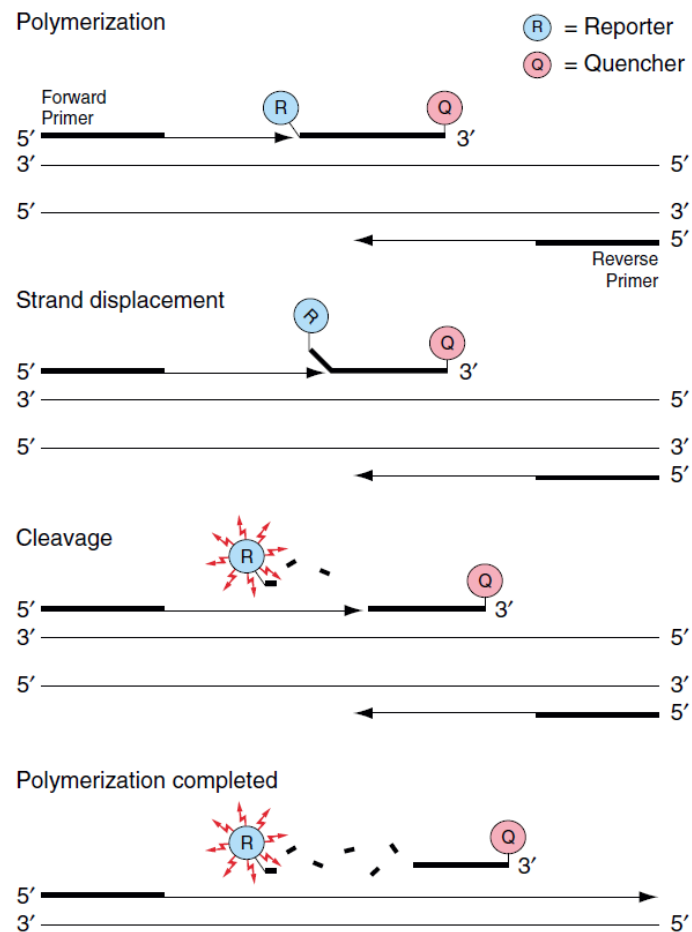
Die Belegung der 96-Well-Platte erfolgte auf Eis. Es wurden Sonden gegen die Zielgene *Il6* und *Hmgb1* sowie *Gapdh* als endogene Kontrolle verwendet. Die Sonden gegen *Il6* und *Hmgb1* waren mit dem Fluoreszenz-Farbstoff „6-Carboxyfluorescein“ (FAM) versehen, die gegen *Gapdh* mit „VIC“. Jedes Reaktionsgefäß wurde mit 25  $\mu\text{l}$  befüllt. Dieser 25  $\mu\text{l}$  Ansatz bestand aus 12,5  $\mu\text{l}$  Master-Mix der zweifach konzentrierten Lösung, 4  $\mu\text{l}$  cDNA wenn der *Hmgb1*-Assay und 7  $\mu\text{l}$  cDNA wenn der *Il6*-Assay verwendet wurde und 1,25  $\mu\text{l}$  Primer der 20-fach konzentrierten Lösung. Eine entsprechende Menge RNase-freies Wasser wurde hinzu pipettiert, bis 25  $\mu\text{l}$  erreicht waren.

Die RT-PCR wurde als Singleplex-PCR durchgeführt. Das bedeutet, dass das Zielgen einer jeden Probe in einem separaten Reaktionsgefäß vervielfältigt wurde. Außerdem wurde jede Probe in drei gleichen Ansätzen parallel repliziert (3-fach-Bestimmung). Die endogene Kontrolle wurde sowohl für *Il6* als auch für *Hmgb1* separat mitgeführt, da diese beiden Sonden eine unterschiedliche Menge an cDNA benötigten, wie oben beschrieben. Das Ausgangsmaterial für die endogene Kontrolle wurde entsprechend angepasst.

Des Weiteren wurde die Platte mit einer Negativkontrolle versehen, um eventuelle Verunreinigungen zu detektieren bzw. ausschließen zu können. Dafür wurde der oben beschriebene Ansatz verwendet, jedoch ohne Probe. Stattdessen enthielt das Reaktionsgemisch eine entsprechend größere Menge von RNase-freiem Wasser.

Die fertig befüllte Platte wurde verschlossen und bei 2800 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Als RT-PCR Gerät wurde das 7300 Real-Time-PCR-System von Applied Biosystems verwendet.

Die Taqman-Sonden, die mit der cDNA hybridisieren, sind am 5'-Ende mit einem sogenannten „reporter“-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem sogenannten „quencher“-Farbstoff ausgestattet. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt der „quencher“ durch seine räumliche Nähe zum „reporter“ dessen Fluoreszenz. Durch die Aktivität der DNA-Polymerase, die die Sonde vom 5'-Ende her abbaut, werden „reporter“ und „quencher“ getrennt und die Fluoreszenz steigt an (siehe hierzu Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schema der RT-PCR [38]

Die PCR wurde in drei Schritten durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine zweiminütige Inkubation der „Uracil N-Glycosylase“ bei 50 °C. Danach wurde die DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95 °C aktiviert. Im darauf folgenden, dritten Schritt erfolgte die eigentliche Replikation des Amplicons. Dazu wechselte sich ein Denaturierungsschritt für 15 Sekunden bei 95 °C mit einem Syntheseschritt für eine Minute bei 60 °C ab. Diese letzten Schritte wurden in 40 Zyklen wiederholt.

### 3.9 Statistische Auswertung

#### 3.9.1 Auswertung der Microarray-Daten

Nachdem die Array-Prozessierung durch Janine Golchert vom Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung durchgeführt wurde, konnte mit der Auswertung der Array-Daten begonnen werden. Die mathematische Auswertung umfasste drei Analyseschritte. Zum einen wurde die Konsistenz der Intensitäten der einzelnen Proben jeweils für ein Gen analysiert. Zum anderen wurde eine nach Benjamini-Hochberg korrigierte ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Scheffé durchgeführt. Anschließend wurde ein Verhältnis berechnet, das die Genexpressionsunterschiede der einzelnen Gene in den zu vergleichenden Gruppen beschreibt. Hierbei bedeutete ein positiver Wert eine Steigerung der Genexpression in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein negativer Wert eine schwächere Expression. Nur Gene mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  in den beiden statistischen Tests und einem „fold-change“  $\geq 1,5$  wurden in die anschließende Pathway-Analyse einbezogen.

Diese wurde mit der „ingenuity-pathway-analysis“ (IPA) Software durchgeführt. Dabei wurden die Gene mit der jeweils signifikant veränderten Genexpression den zugehörigen Signalkaskaden zugeordnet. Mithilfe des exakten Tests nach Fischer wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die Gene der eigenen Daten mit dem entsprechenden Signalweg assoziiert sind. Bei der anschließenden Auswertung wurde Augenmerk auf diejenigen Signalwege gelegt, die die signifikantesten Übereinstimmungen mit den eigenen Daten besaßen.

### 3.9.2 Auswertung der RT-PCR

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Schmittgen et al. [39]. Bei der Auswertung einer Real-Time-PCR wurden sogenannte „threshold cycles“ (Ct) ausgewertet. Diese beschreiben denjenigen Replikationszyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe über das Grundrauschen ansteigt. An diesem Punkt befindet sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase. Damit ist der Ct-Wert ein Maß für die Menge an vorhandener cDNA. Je höher die Ct-Werte, desto weniger Nukleinsäure ist in der Probe enthalten.

Abbildung 7 illustriert das im Folgenden beschriebene Vorgehen bei der Auswertung der Daten mittels Excel: Zunächst wurde aus den dreifach bestimmten Ct-Werten einer jeden Probe der Mittelwert gebildet. Abweichungen einiger weniger Werte der dreifachen Bestimmung, die sich im Ct-Wert um 1,4 oder mehr von den anderen beiden unterschieden und in der graphischen Ansicht einen deutlich veränderten Kurvenverlauf zeigten, wurden als Pipettierfehler gewertet, eliminiert und nicht in die Auswertung mit einbezogen. Durch Subtraktion der Mittelwerte der endogenen Kontrolle von dem zu untersuchenden Gen erhielt man den  $\Delta Ct$ -Wert. Damit wurde das Zielgen auf den aktuellen metabolischen Zustand der Maus normiert und dadurch der interindividuelle Vergleich der Expression der Zielgene ermöglicht. Durch Anwendung der Rechenoperation „ $2^{(-\Delta Ct)}$ “ erhielt man Werte, die untereinander statistisch verglichen werden konnten. Aus den „ $2^{(-\Delta Ct)}$ “-Werten wurde nun pro Versuchsgruppe ein Mittelwert gebildet. Anschließend wurde der Quotient aus dem Mittelwert der Versuchsgruppe und dem Mittelwert der Kontrollgruppe gebildet. Werte größer als eins bedeuteten einen entsprechenden Anstieg der Genexpression, Werte kleiner als eins eine Verringerung der Genexpression der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Rohdaten			Mittelwerte		$\Delta Ct$	$2^{-(\Delta Ct)}$	MW $2^{-(\Delta Ct)}$	Versuch/Kontrolle
Hmgb1	Gapdh		Hmgb1	Gapdh				
25,2544	20,9982	P13 Versuchsgruppe	25,3702	21,0226667	4,34753333	0,049120419	0,053129254	
25,6314	20,7186							
25,2248	21,3512							
25,4321	21,0898	P14 Versuchsgruppe	25,4168333	21,1827667	4,23406667	0,053139679		
25,4782	21,1414							
25,3402	21,3171							
26,4433	22,275	P15 Versuchsgruppe	26,4865667	22,3569	4,12966667	0,057127663		
26,5018	22,4764							
26,5146	22,3193							
								2,085802372
Hmgb1	Gapdh							
26,5492	21,8831	P16 Kontrollgruppe	26,8197667	21,9229333	4,89683333	0,033566517	0,025471854	
27	21,8857							
26,9101	22							
27,3514	22,3623	P17 Kontrollgruppe	28,3118333	22,3980667	5,91376667	0,01658742		
28,9106	22,376							
28,6735	22,4559							

**Abbildung 7:** Auszug aus einem Excel-Dokument mit der Auswertung der RT-PCR

Aus den drei Messwerten für eine jede Probe wird zunächst ein Mittelwert gebildet. Durch Subtraktion der Mittelwerte der endogenen Kontrolle von den Werten des zu untersuchenden Gens erfolgt die Normierung auf den aktuellen metabolischen Zustand der Maus. Abschließend wird ein Quotient aus der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe gebildet, welcher die Veränderung der Genexpression anzeigt.

### 3.10 IL6-CBA

Das Prinzip des „cytometric-bead-array“ (CBA) beruht auf mikroskopisch kleinen Partikeln, den sogenannten „beads“, welche jeweils eine spezifische Fluoreszenz besitzen. Diese Partikel sind an Antikörper gebunden und können somit bestimmte Antigene detektieren, in diesem Fall IL6. Vergleicht man nun die Proben mit einem Standard, kann man auf die Konzentration von IL6 in der Probe schließen.

Die Durchführung des CBA erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben und wurde mit „ethylenediaminetetraacetic acid“ (EDTA)-Plasma durchgeführt. Die Proben wurden anschließend an einem „fluorescence-activated cell-sorting“ (FACS) Gerät ausgelesen.

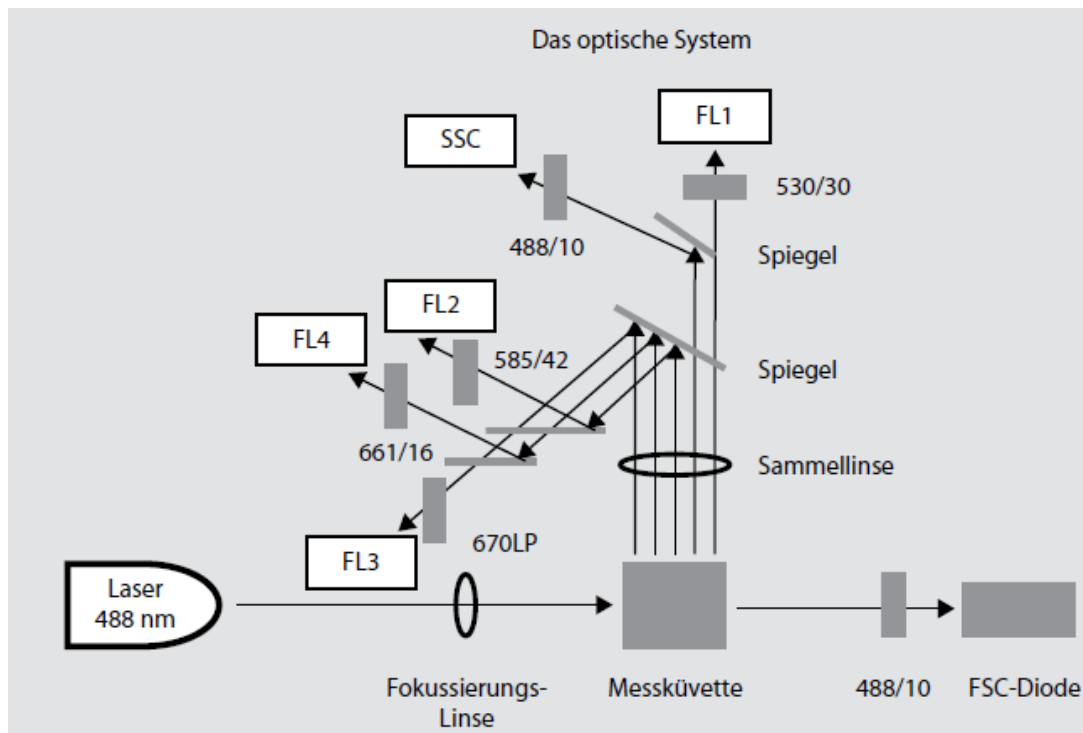
Alle notwendigen Lösungen wurden von der Firma BD in einem entsprechenden Kit bereit gestellt.

Als erster Schritt wurde eine Standardreihe hergestellt. Der Standard, welcher als Pulver vorlag, wurde in 4 ml „Assay-Diluent“ resuspendiert. Mit dieser Lösung wurden 9 FACS-Röhrchen befüllt. Das erste mit unverdünntem Standard; danach wurde eine Verdünnungsreihe mit 8 Schritten von 1:2 bis 1:256 hergestellt. Ein weiteres Röhrchen mit reinem „Assay-Diluent“ fungierte als Negativkontrolle.

In einem zweiten Schritt wurden 25 µl des Capture-Bead-Mix mit jeweils 25 µl Probenmaterial bzw. 50 µl der jeweiligen Standard-Proben vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 25 µl PE-Detection-Reagenz zu diesem Ansatz gegeben. Dies inkubierte ebenfalls eine weitere Stunde. Abschließend wurde 1 ml Waschpuffer dazu gegeben und der Ansatz 5 Minuten bei 4 °C und 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 150 µl Waschpuffer resuspendiert.

Zum Auslesen dieser fluoreszierenden Proben wurde ein FACS-Gerät eingesetzt.

Dieses besteht aus einem Laser, welcher Licht mit einer definierten Wellenlänge aussendet. In einer Messküvette mit einem laminaren Probenstrom trifft das Licht auf die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben. Diese emittieren wiederum Licht entsprechend ihrer Fluoreszenz. Dieses kann von Sensoren detektiert werden und einen Aufschluss darüber geben, welche Sorte von fluoreszenzmarkierter Probe sich gerade in der Küvette befindet. Außerdem wird das Licht des Lasers an der Probe gestreut. Die Streustrahlung, welche im geraden Strahlengang auf Sensoren trifft, wird „forwardscatter“ (FCS) genannt und ist ein Maß für die Größe der Zelle. Das Licht welches nach lateral gestreut wird, ist der sogenannte „sidescatter“ (SSC) und steht für die Granularität [40]. Mit diesen Parametern lassen sich die beads des CBA messen und mithilfe des CBA-Software-Systems von BD kann die Konzentration von IL6 in der Probe anhand einer Standardkurve bestimmt werden.



**Abbildung 8:** Aufbau eines FACS nach [40].

Über einen Laser wird eine Probe in einer Küvette bestrahlt. Die Probe streut das Licht und es können ein FSC und ein SSC gemessen werden. Ist die Probe fluoreszenzmarkiert, emittiert die Probe eine spezielle Wellenlänge, welche ebenfalls detektiert werden kann.

(republished with permission of Springer Berlin Heidelberg from *Der Experimentator: Immunologie*, Myrtek, Daniel, Küpper, Michael, Bratke, Kai, Luttmann, Werner, 4. Auflage, © 2014; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.)

### 3.11 Strukturierung der Arbeit

Die Untersuchungen zur Rolle des Nervus vagus in der postoperativen Immunsuppression wurden in einen Vor- und einen Hauptversuch unterteilt.

#### 3.11.1 Erster Teil: Vorversuch: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von Splenozyten

Um für den Hauptversuch Zeitpunkte festzulegen, zu denen die Explantation der Milz erfolgen sollte, musste der zeitliche Verlauf der Genexpression der Splenozyten charakterisiert werden. So konnte herausgearbeitet werden, nach wie vielen Stunden ein operatives Trauma zu einem Anstieg der Genexpression von Zytokinen in der Milz führt. Dies erfolgte im Vorversuch mittels Real-Time-PCR. Dafür wurden zwei Markergene ausgewählt, die als wichtige inflammatorische Zytokine „pars pro toto“ für alle inflammatorischen und in reparative Prozesse eingreifende Mediatoren stehen, die später per Microarray-Analyse untersucht werden sollten: Zum einen wurde *Hmgb1* als Markergen benutzt, da es einen spät ansteigenden Mediator darstellt (nach „Cecal Ligation and Puncture“ [CLP] ist HMGB1 erst

nach 18 Stunden signifikant im Serum nachweisbar) [41]. Zum anderen besitzt es eine wichtige Rolle im anti-inflammatorischen Signalweg. *Il6* wurde als zweiter Marker verwendet, um die Expression eines frühen Zytokins darstellen zu können (Anstieg der Serum-Level 6 Stunden nach SID) [4].

Durch die Genexpressionsanalyse dieser Markergene in der Milz konnte genau determiniert werden, zu welchem Zeitpunkt die Splenozyten auf ein Trauma reagieren.

Um den zeitlichen Verlauf der Expression der Markergene darstellen zu können, wurde diese zu 3 Stunden, 6 Stunden, 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen untersucht (jeweils n=3). Dabei wurde immer eine SHAM-SID-Gruppe (Kontrollgruppe) mit der SID-Gruppe verglichen (Versuchsgruppe). Die Explantation der Milz erfolgte dabei zum oben beschriebenen Zeitpunkt nach Beendigung der letzten OP-Maßnahme.

Nach Auswertung des Vorversuchs zeigte sich, dass der 3 Stunden- und 6 Stunden-Zeitpunkt eine stark gesteigerte Expression von *Il6* bzw. *Hmgb1* aufwiesen (siehe Kapitel 4.1). Daher wurden diese beiden Zeitpunkte für den Hauptversuch ausgewählt.

<b>SID</b> (3h, 6h, 24h, 3d, 7d Zeitpunkte)	3 Tiere je Zeitpunkt
<b>SHAM-SID</b> (3h, 6h, 24h, 3d, 7d Zeitpunkte)	3 Tiere je Zeitpunkt

**Tabelle 6:** Versuchsgruppen des Vorversuchs

SID beschreibt die Versuchsgruppe und SHAM-SID die Kontrollgruppe. Es wurden Operationen über einen breit gefächerten Zeitraum durchgeführt, um den Zeitpunkt zu finden, an dem die Splenozyten auf das Trauma reagieren.

Des Weiteren wurden in allen Gruppen des Vorversuchs und in der SID- und SHAM-SID-Gruppe des Hauptversuchs die Plasma-Spiegel des Zytokins IL6 bestimmt, um die Auswirkung der Genexpression auf die systemische Zirkulation darzustellen. Dadurch sollten die Daten der Arbeit von Menges et al. aus dem Jahre 2011 reproduziert werden und eine Validierung der eigenen OP-Methodik und des Versuchsaufbaus erfolgen. In die Blutuntersuchung wurden auch die Proben des Hauptversuchs einbezogen, daher bestanden die Gruppen des 3 Stunden- sowie 6 Stunden-Zeitpunktes aus 8 Mäusen, während die restlichen Gruppen nur aus den jeweils 3 Mäusen des Vorversuches zusammengesetzt waren. Durch Ausfall von Proben waren es im 3 Stunden-SID- und 6 Stunden-SHAM-SID-Zeitpunkt nur 7 Mäuse pro Versuchsgruppe.

### 3.11.2 Zweiter Teil: Charakterisierung der SID auf Transkriptebene

Da die Daten des Vorversuchs einen starken Anstieg der Genexpression von *Hmgb1* und *Il6* zeigten, wurde beschlossen, diese beiden Gene in einer größeren Maus-Population durch eine RT-PCR näher zu analysieren. Dies erfolgte durch die Hinzunahme der Versuchsgruppen SID und SHAM-SID (jeweils n=5) des Hauptversuchs. Dadurch konnte die Gruppengröße des 3 Stunden- und 6 Stunden-Zeitpunktes von n=3 (Vorversuch) auf insgesamt n=8 gesteigert werden, was eine statistische Auswertung der Gruppen ermöglichte.

Da die RT-PCR sensitiver hinsichtlich der Detektion der Genexpressionsstärke als eine Microarray-Analyse ist, konnte durch diese Methode eine präzisere Charakterisierung der Genexpression während der SID erfolgen, was zu einer neuen Erkenntnisebene führte.

Im darauf folgenden Hauptversuch wurden die Daten der Microarray-Analysen dazu verwendet, einen deutlich umfassenderen Blick auf die Veränderung des Transkriptoms nach SID zu werfen.

### 3.11.3 Dritter Teil: Hauptversuch: Analyse des Milz-Transkriptoms mittels Microarrays

Die Analyse des Milz-Transkriptoms erfolgte im Hauptversuch mithilfe von Microarrays. Diese Methode ermöglicht die umfassende Analyse der Expression tausender Gene, wie sie mittels RT-PCR in dieser Menge nicht möglich gewesen wäre. Die Explantation der Milz erfolgte analog zum Vorversuch zum entsprechenden Zeitpunkt nach Beendigung der letzten OP-Maßnahme. Die Vagotomie wurde in den entsprechenden Versuchsgruppen 6 Tage vor der SID oder SHAM-SID durchgeführt.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die insgesamt durchgeführten Operationen.

<b>SHAM VGX+ SHAM SID</b> (2 Zeitpunkte)	5 Tiere je Zeitpunkt
<b>VGX+SHAM SID</b> (2 Zeitpunkte)	5 Tiere je Zeitpunkt
<b>VGX+SID</b> (2 Zeitpunkte)	5 Tiere je Zeitpunkt
<b>SHAM VGX+SID</b> (2 Zeitpunkte)	5 Tiere je Zeitpunkt
<b>SID</b> (2 Zeitpunkte)	5 Tiere je Zeitpunkt
<b>Kontrolle ohne OP</b>	5 Tiere

**Tabelle 7:** Versuchsgruppen des Hauptversuchs

Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden hier 5 Mäuse pro Gruppe aufgenommen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden nur die Gruppen SID, VGX mit SID und SHAM VGX mit SID und eine Kontrollgruppe zum 3- und 6 Stunden-Zeitpunkt der Transkriptomanalyse unterzogen. Dabei wurden die Gruppen immer paarweise miteinander verglichen, um Genexpressionsunterschiede zu untersuchen. So wurde die SID-Gruppe mit der Kontrolle verglichen und die VGX + SID-Gruppe mit der SHAM-VGX + SID-Gruppe. Der erste Vergleich vermittelte dabei Informationen über den Status der Genexpression nach SID und der zweite Vergleich über den Einfluss des N. vagus.

Die Aufarbeitung der Milzen und Durchführung der Microarray-Analysen erfolgten in Kooperation mit dem Institut für Funktionelle Genomforschung, Greifswald. Die Aufarbeitung und Beratungen erfolgten durch Herrn Dr. Homuth und Frau Golchert.

Die Graphiken wurden mit dem Programm „GraphPad PRISM 5“ erstellt.

## 4. Ergebnisse

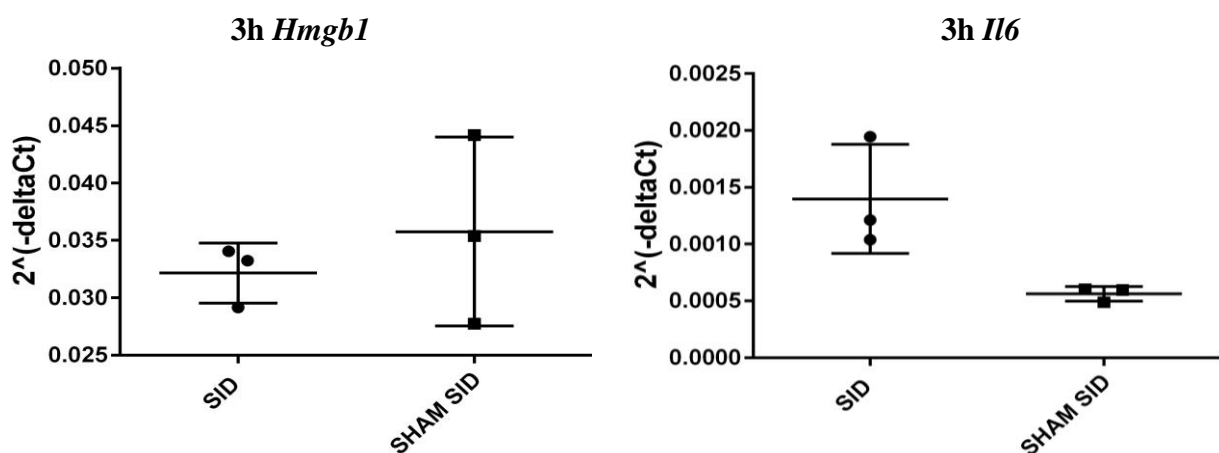
### 4.1 Erster Teil: Vorversuch: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von Splenozyten

Die Ergebnisse des 3-Stunden-Zeitpunktes werden hier gegenüber gestellt. Es wurde eine SID mit einer SHAM-SID als Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund der Gruppengröße von nur 3 Mäusen pro Zeitpunkt, konnten die Resultate nicht statistisch ausgewertet werden. Die sich abzeichnenden Veränderungen sind allenfalls als Tendenzen zu begreifen, die einen ersten Überblick über die Regulationsmechanismen auf Transkriptebene nach SID geben sollen.

Es zeigte sich, dass zum 3-Stunden-Zeitpunkt das Gentranskript, welches für das Zytokin IL6 codiert, in der SID-Gruppe höhere  $2^{-(\Delta Ct)}$ -Werte aufwies als in der Kontrollgruppe. Dies bedeutet ein vermehrtes Vorliegen von Gentranskripten in der Probe, da sich die Fluoreszenz der Sonden schneller vom Grundrauschen abhebt.

Für *Hmgb1* konnte zum selben Zeitpunkt ein solcher Anstieg nicht beobachtet werden.

Aufgrund der Induktion von *Il6* 3 Stunden nach SID, wurde dieser Zeitpunkt für den Hauptversuch ausgewählt.

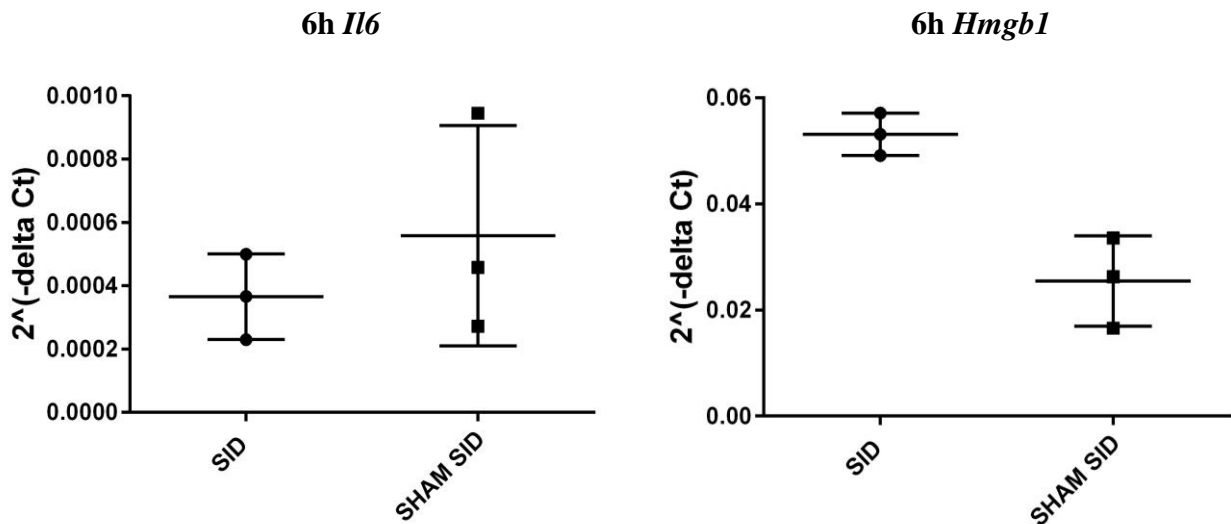


**Abbildung 9:**  $2^{-(\Delta Ct)}$ -Werte 3 Stunden nach Operation für *Hmgb1* und *Il6*.

SID stellt die Versuchsgruppe dar, SHAM-SID die Kontrollgruppe.  $2^{-(\Delta Ct)}$  ist ein relatives Maß für die Menge an vorliegender RNA,  $n=3$ . Es zeigte sich eine deutliche Induktion von *Il6* 3 Stunden nach SID.

Zum 6-Stunden-Zeitpunkt zeigte sich, dass *Hmgb1* in der SID-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine vermehrte Anzahl von mRNA-Kopien aufwies. Für *Il6* ergaben sich dagegen in Versuchs- und Kontrollgruppe Werte der gleichen Größenordnung.

Aufgrund dieser abermals modifizierten Genexpression 6 Stunden nach SID für *Hmgb1*, wurde beschlossen, im Hauptversuch ebenfalls Daten zu diesem Zeitpunkt zu erheben.

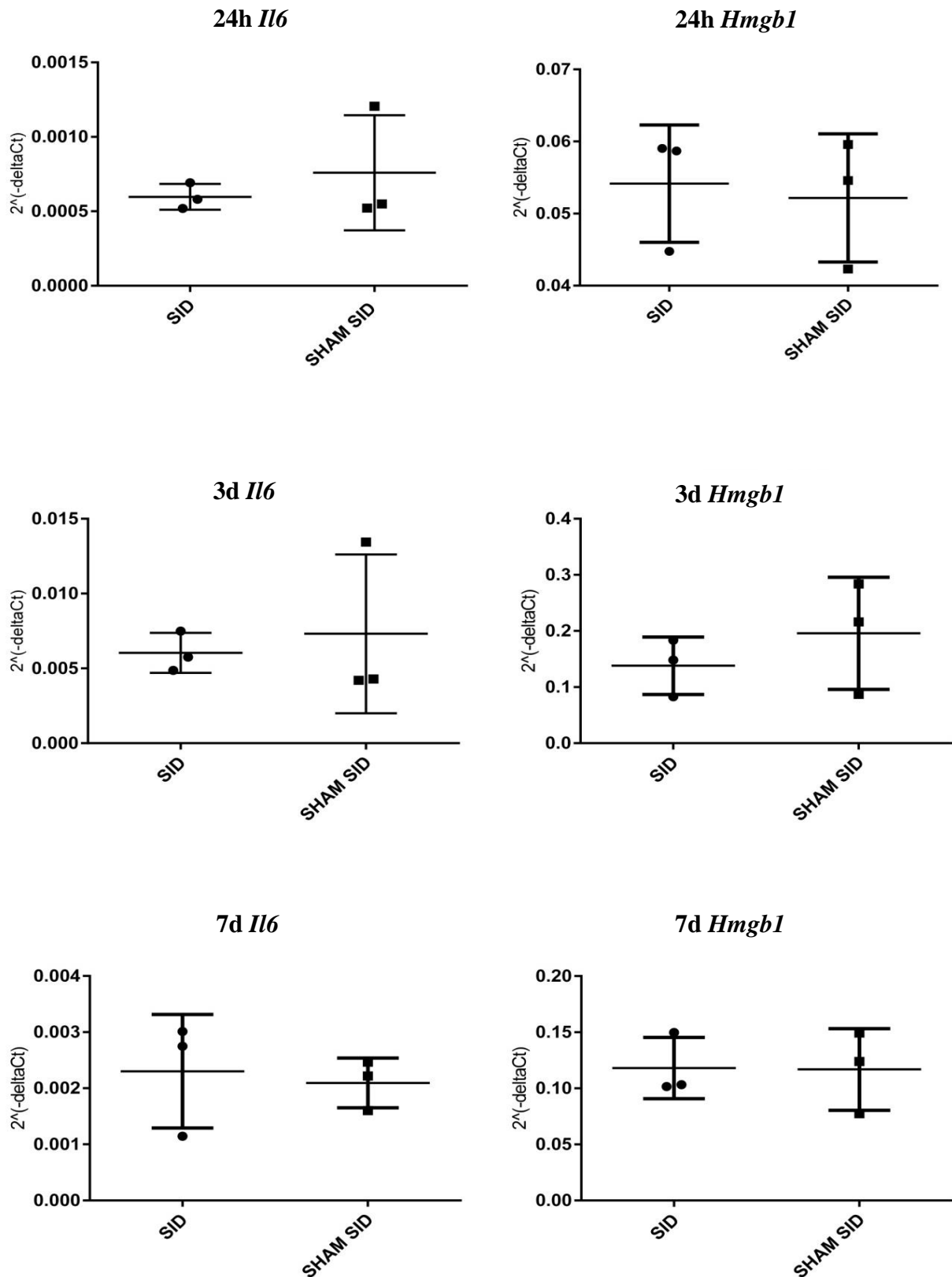


**Abbildung 10:** 2<sup>-delta Ct</sup>-Werte von *Il6* und *Hmgb1* 6 Stunden nach Operation

In dieser Abbildung wird die SID mit einer Kontrolle (SHAM-SID) verglichen.

2<sup>-delta Ct</sup> ist das hier verwendete Maß für die Menge an vorliegender RNA, n=3.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zu den anderen untersuchten Zeitpunkten lieferten keinen Hinweis auf eine erhöhte Genexpression nach SID. Die SID und SHAM-SID-Gruppe wiesen ähnliche 2<sup>-delta Ct</sup>-Werte auf.

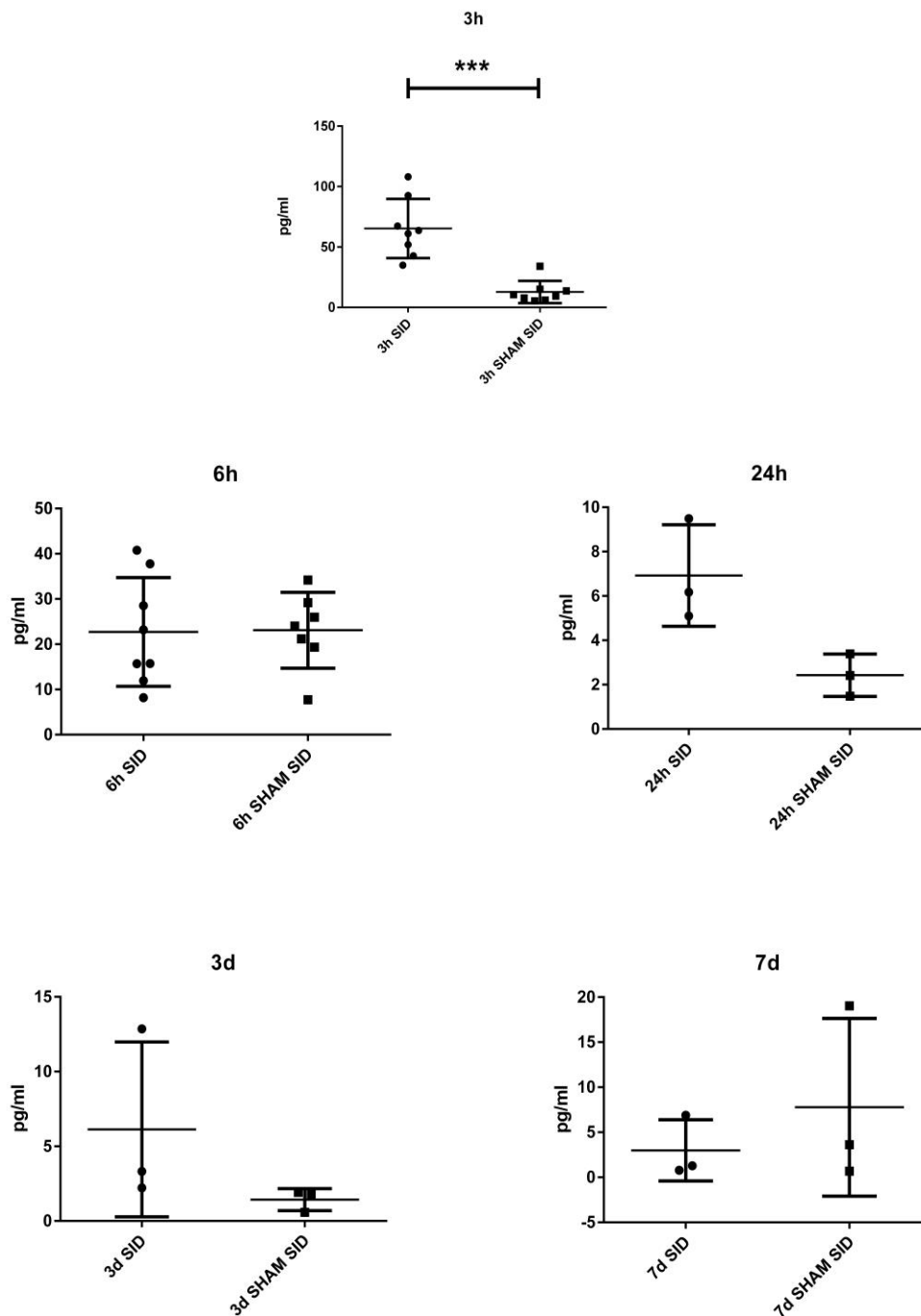


**Abbildung 11:**

$2^{(-\Delta Ct)}$ -Werte von *Il6* und *Hmgb1* 24 Stunden, 3 Tage und 7 Tage nach Operation.

Die SID wird zu den hier dargestellten Zeitpunkten mit einer SHAM-SID verglichen.  $2^{(-\Delta Ct)}$  steht für die Menge an vorliegender RNA, n=3.

Anschließend wurde die Konzentration des Zytokins IL6 im Blut bestimmt. Diese wurde dabei in der Einheit Pikogramm pro Milliliter angegeben.



**Abbildung 12:** IL6-Werte im Blutplasma

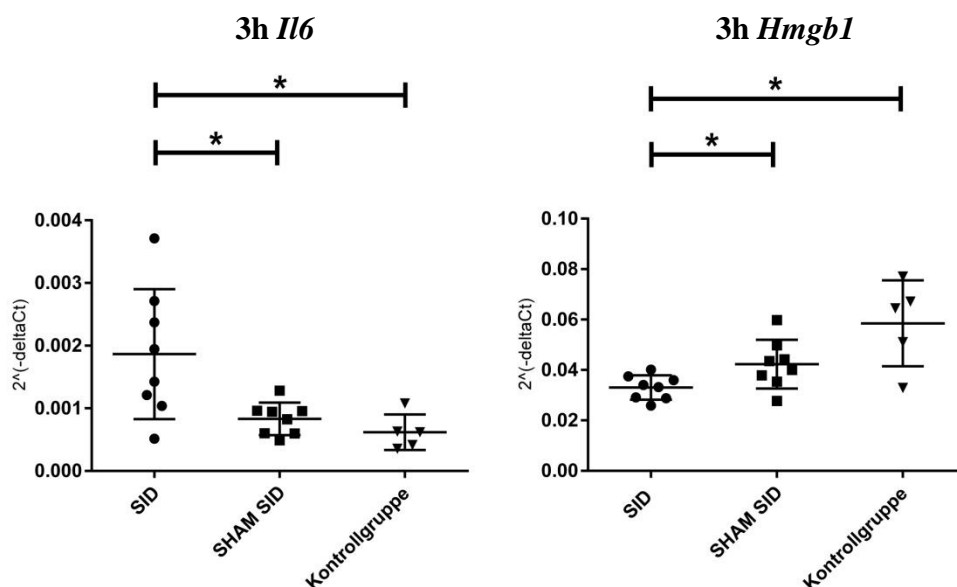
SID stellt die Versuchsgruppe dar, SHAM-SID die Kontrollgruppe. 3 Stunden nach SID zeigte sich ein signifikanter Anstieg, zu den anderen Zeitpunkten konnte keine IL6-Elevation nachgewiesen werden. 3- und 6 Stunden-Zeitpunkt: n=8 (Mäuse des Vor- und Hauptversuchs) bzw. n=7 in der Gruppe 6 Stunden SHAM-SID durch Probenausfall.

n=3 zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 3 Tage und 7 Tage (Mäuse des Vorversuchs).

Die Analyse von IL6 im Plasma mittels des Mann-Whitney-U-Tests ergab einen hochsignifikanten Anstieg 3 Stunden nach SID verglichen mit der Kontrollgruppe. Weitere statistische Untersuchungen des 6-Stunden-Zeitpunktes zeigten keine weiteren Unterschiede. Die restlichen Zeitpunkte wurden wie geplant aufgrund der geringen Gruppengröße nicht statistisch ausgewertet und sind daher ebenfalls nur als Tendenz aufzufassen.

#### 4.2 Zweiter Teil: Charakterisierung der SID auf Transkriptebene

Für die Charakterisierung der SID wurde neben der SHAM-SID eine weitere Kontrollgruppe hinzugenommen. Diese bestand aus unbehandelten Mäusen und sollte die basale Genexpression ohne traumatischen Einfluss darstellen.



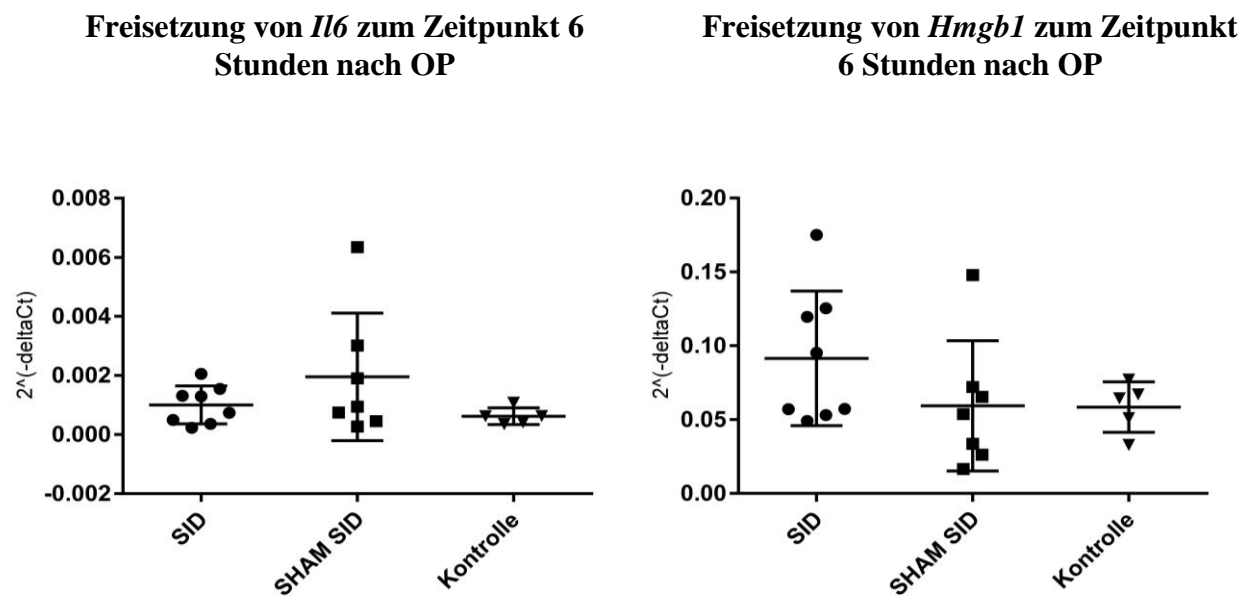
**Abbildung 13:** Vergleich der Genexpression von *Il6* und *Hmgb1* zum Entnahmezeitpunkt 3 Stunden nach SID

Abgebildet sind in der SID und SHAM-SID Gruppe jeweils n=8 (Tiere des Vor- und Hauptversuchs gepoolt) und eine Kontrollgruppe mit n=5. Zum 3-Stunden-Zeitpunkt war die *Il6*-Expression zur SHAM-SID-Gruppe und zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. *Hmgb1* zeigte signifikant erniedrigte Werte im Vergleich zur SHAM-SID-Gruppe und zur Kontrollgruppe.

Zum 3-Stunden-Zeitpunkt zeigten sich sowohl für *Hmgb1* als auch für *Il6* signifikante Unterschiede zwischen der SID und der SHAM-SID-Gruppe, sowie zwischen der SID und der Kontrolle. Durchgeführt wurden diese Analysen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Während *Il6* eine signifikant gesteigerte Genexpression im Vergleich zu den Kontrollgruppen aufwies, imponierte *Hmgb1* mit signifikant erniedrigten Werten. Bildet man aus den

Mittelwerten der  $2^{-(\text{delta Ct})}$  Werte einen „fold change“, so lässt sich eine Aussage darüber treffen, um wie viel sich die Versuchsgruppe als Ganzes von der Kontrollgruppe unterscheidet. Zum 3-Stunden-Zeitpunkt war für *Il6* die Expression nach SID um das 2,24-fache im Vergleich zur SHAM-SID-Gruppe und um das 3,02-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. In der SID-Gruppe wies *Hmgb1* eine 0,78-fache Expression der SHAM-SID-Gruppe und eine 0,57-fache Expression der Kontrolle auf.

Auch zum 6-Stunden-Zeitpunkt wurde die Genexpression der oben genannten Zytokine mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf Unterschiede überprüft, allerdings konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. Die Expression von *Hmgb1* war in der Versuchsgruppe um das 1,35-fache im Bezug auf die SHAM-SID-Gruppe und um das 1,56-fache im Bezug auf die Kontrolle erhöht. Da diese Veränderungen nicht statistisch signifikant sind, ist dies nur als eine Tendenz zu werten.



**Abbildung 14:** Vergleich der Genexpression von *Il6* und *Hmgb1* zum Entnahmezeitpunkt 6 Stunden nach SID

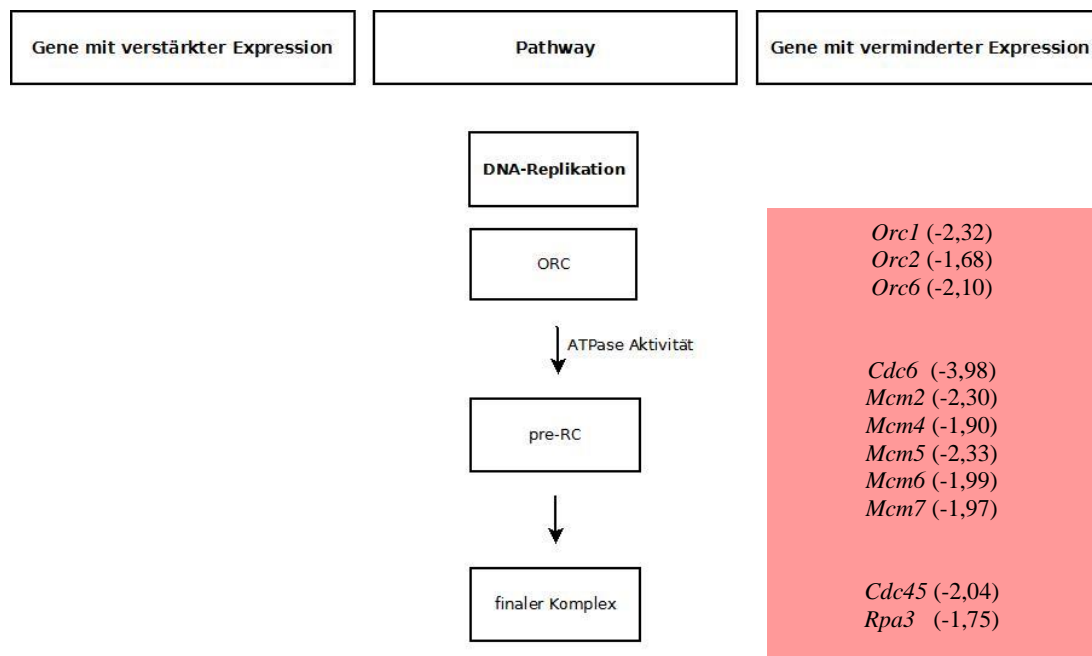
Abgebildet sind in der SID (n=8) und SHAM-SID-Gruppe (n=7, Tiere des Vor- und Hauptversuchs jeweils gepoolt) und eine Kontrollgruppe mit n=5. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

### 4.3 Dritter Teil: Hauptversuch: Analyse des Milz-Transkriptoms mittels Microarrays

#### 4.3.1 Veränderungen 3 Stunden nach SID verglichen mit der Kontrollgruppe

Im Folgenden werden die Versuchsgruppen SID - mit explantierten Milzen nach 3 Stunden - und eine Kontrollgruppe gegenüber gestellt. Diejenigen Gene, welche sich in der SID-Gruppe signifikant verändert haben, sind nachfolgend aufgelistet. Dabei werden die einzelnen Gene nach funktionellen Gesichtspunkten sortiert und in die Untergruppen „DNA-Replikation“, „ATM-Signalweg“, „Regulierung des G2/M-Checkpoint“, „Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr“ und „Gene mit der größten Veränderung der Expression“ eingeteilt.

##### 4.3.1.1 DNA-Replikation



**Abbildung 15:** Veränderung der Expression von Genen im Signalweg der „DNA-Replikation“

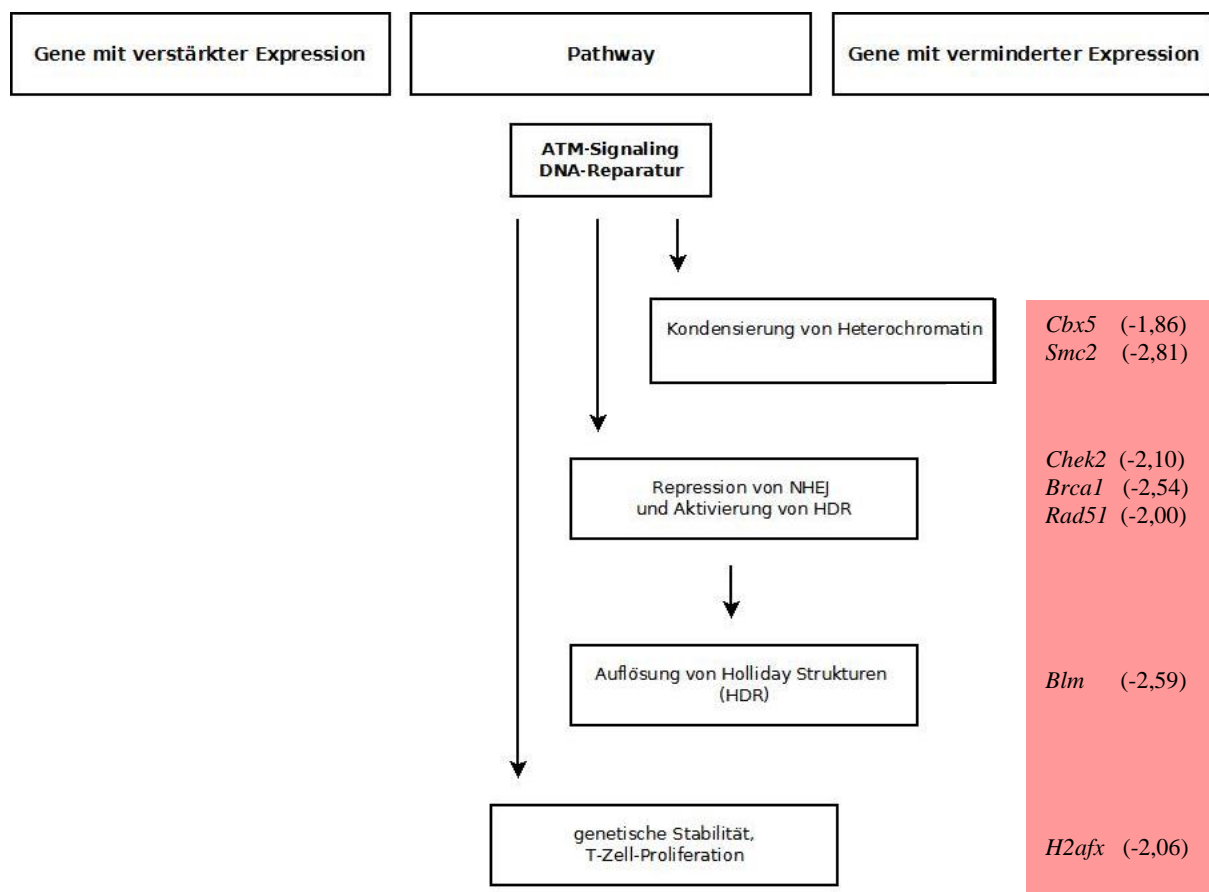
Abgebildet sind diejenigen Gene, die nach SID vermindert exprimiert wurden und deren Genprodukte Einfluss auf die Formierung des Replikationskomplexes haben. "Origin recognition complex" (ORC) beschreibt den initialen Komplex, der über den „pre-RC“ zum finalen Komplex wird. In Klammern hinter den jeweiligen Genen steht das Ausmaß der relativen Änderung (Versuchsgruppe/Kontrollgruppe).

Mit einem p-Wert von  $5,67E-12$  war zum 3-Stunden-Zeitpunkt der Signalweg der "DNA-Replikation" derjenige pathway mit der besten Übereinstimmung. Die Expression von 46,2 % (12 von 26) der Gene dieses Signalweges veränderte sich signifikant nach SID.

Diese Gentranskripte lagen im Vergleich zur Kontrollgruppe alle in verminderter Menge vor. So wurden einige Bestandteile des "origin recognition complex" (ORC) modifiziert. Dieser Komplex besteht aus 6 Untereinheiten (ORC1-6), von denen in den vorliegenden Daten die Gentranskripte, welche für ORC1, 2 und 6 codieren, in ihrer Expression halbiert wurden.

Ebenfalls an der Regulation der Replikation beteiligt sind die Produkte der Gene "cell division cycle" (*Cdc6*, *Cdc45*), "minichromosome maintenance complex components" (*Mcm2*, *Mcm4-7*) und das „replication protein“ A3 (*Rpa3*). Bis auf *Cdc6*, welches um das 4-fache reprimiert wurde, wiesen alle anderen Gene ungefähr eine halbierte Expression auf.

#### 4.3.1.2 ATM-Signalweg

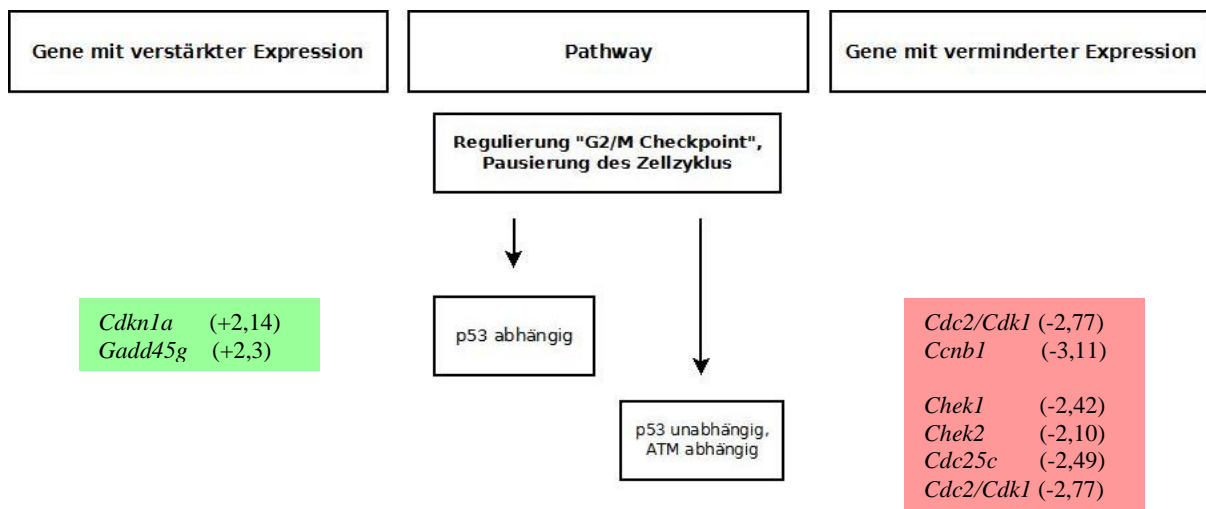


**Abbildung 16:** Veränderung der Expression von Genen im ATM-Signalweg

Abgebildet sind diejenigen Gene, welche nach SID vermindert exprimiert wurden und die Einfluss auf Prozesse der DNA-Reparatur mit Bezug zu dem Enzym ATM haben. In Klammern hinter den jeweiligen Genen steht das Ausmaß der relativen Änderung (Versuchsgruppe/Kontrollgruppe).

Alle folgenden Gene der DNA-Reparatur, deren Produkte in der Signalkaskade dem Enzym „Ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) nachgeschaltet sind, wurden nach SID annäherungsweise um das 2 bis 3-fache vermindert exprimiert. Dazu gehörten „Checkpoint Kinase 2“ (*Chek2*), „Heterochromatin protein“ (*Cbx5*), „structural maintenance of chromosome 2“ (*Smc2*), „breast cancer“ Gen (*Brcal*), Rekombinase RAD51 (*Rad51*) sowie „Bloom syndrome, RecQ helicase-like“ (*Blm*) und „histone 2A family member X“ (*H2afx*).

#### 4.3.1.3 Regulierung des „G2/M-Checkpoint“



**Abbildung 17:** Veränderung der Expression von Genen in Signalwegen der Zellzyklus-Regulierung

Abgebildet sind diejenigen Gene, die nach SID modifiziert exprimiert wurden und die Einfluss auf Prozesse der Zellzyklus-Kontrolle besitzen. In Klammern hinter den jeweiligen Genen steht das Ausmaß der relativen Änderung (Versuchsgruppe/Kontrollgruppe).

Die Regulierung des Übergangs von der G2 in die Mitose-Phase kann p53-abhängig und unabhängig erfolgen. Im p53-abhängigen Weg wurde nach SID eine ca. 3-fach geringere Expression der „cyclin-dependent kinase 1“ (*Cdk1*) und des Cyclin B1 (*Ccnb1*) detektiert. Gleichzeitig verdoppelte sich die Expression von p21 (*Cdkn1a*) und „growth arrest and DNA damage inducible gamma“ (*Gadd45g*).

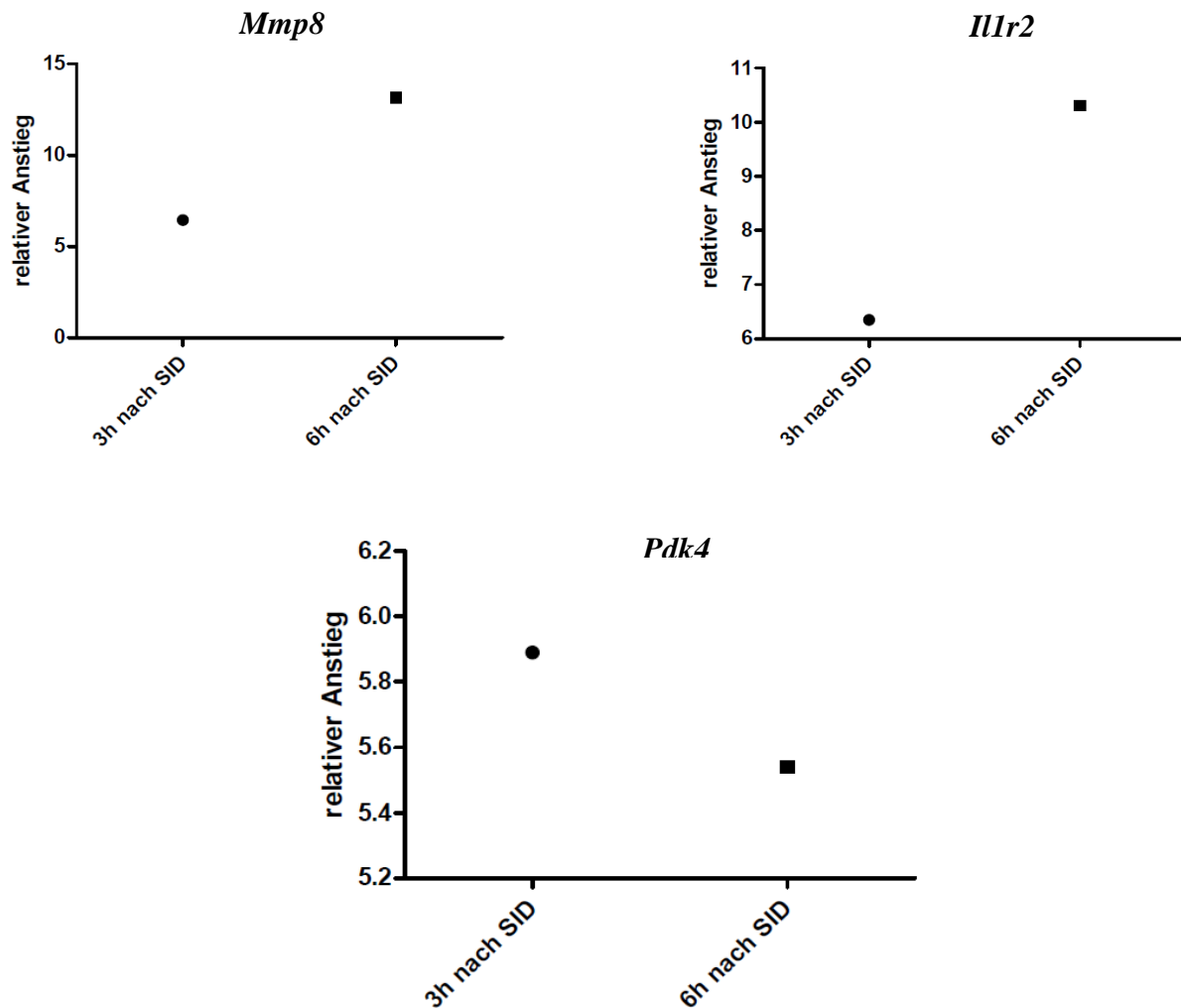
Im p53-unabhängigen Weg wurde *Chek1* und der „cell division cycle 25 C“ (*Cdc25c*) im Vergleich zur Kontrollgruppe ungefähr 2,5-fach vermindert exprimiert.

#### 4.3.1.4 Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr

Eine starke Regulation erfuhren einige C-Typ-Leptin-Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr. Auch zum 6-Stunden-Zeitpunkt war deren Expression noch erhöht. So lag die mRNA von „C-type lectin domain family 4, member e“ (*Clec4e* [*Mincl*]) und „C-type lectin domain family 4, member d“ (*Clec4d* [*Mcl*]) vermehrt vor. Die *Mincl*-Expression erhöhte sich 3 Stunden nach SID um das 4,38-fache, nach 6 Stunden um das 5,19-fache. *Mcl* wurde zum frühen Zeitpunkt 3,59-fach und zum späten Zeitpunkt 4,08-fach erhöht exprimiert.

#### 4.3.1.5 Gene mit der größten Veränderung der Expression

Die 3 am stärksten exprimierten Gene 3 Stunden nach SID wiesen auch die stärkste Genexpression 6 Stunden nach SID auf, wobei diese nach 6 Stunden zum Teil ein noch wesentlich höheres Ausmaß aufwies. So wurde die „Matrix-Metallopeptidase 8“ (*Mmp8*) am stärksten exprimiert. 3 Stunden nach SID wies *Mmp8* eine 6,44-fach erhöhte mRNA-Menge auf, zum 6-Stunden-Zeitpunkt bereits eine 13,15-fache Menge. Das Gen mit der zweitstärksten Veränderung war „interleukin 1 receptor, type II“ (*Il1r2*). 3 Stunden nach SID war die Expression 6,35-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe gestiegen, 6 Stunden nach SID um das 10,31-fache. Als drittes Gen ist die „pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4“ (*Pdk4*) zu nennen. Nach 3 Stunden kam es zu einer 5,89-fach, nach 6 Stunden zu einer 5,54-fach verstärkten Expression.



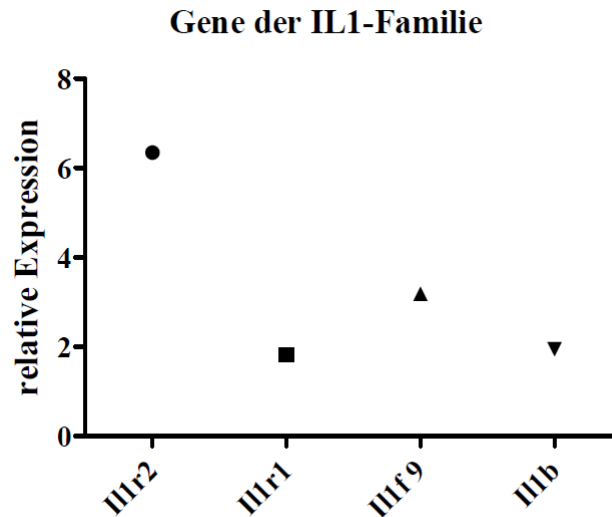
**Abbildung 18:** Die zum Entnahmezeitpunkt 3- und 6 Stunden nach SID am stärksten induzierten Gene *Mmp8*, *Pdk4* und *Il1r2*

Im Gegensatz dazu stellt die microRNA 144 (*Mir144*) dasjenige Gentranskript dar, dessen Expression 3 Stunden nach SID am stärksten reprimiert wurde (-9,51-fach).

Ebenfalls stark vermindert exprimiert wurde der „transferrin receptor“ (*Tfrc*) (-5,38-fach).

5-fach vermindert exprimiert wurde „polycystic kidney and hepatic disease 1-like 1“ (*Pkhd1l1*).

Zusätzlich zu *Il1r2* wurden 3 Stunden nach SID noch weitere Gene der IL1-Zytokin-Familie differentiell exprimiert. Die folgende Graphik gibt Auskunft darüber.

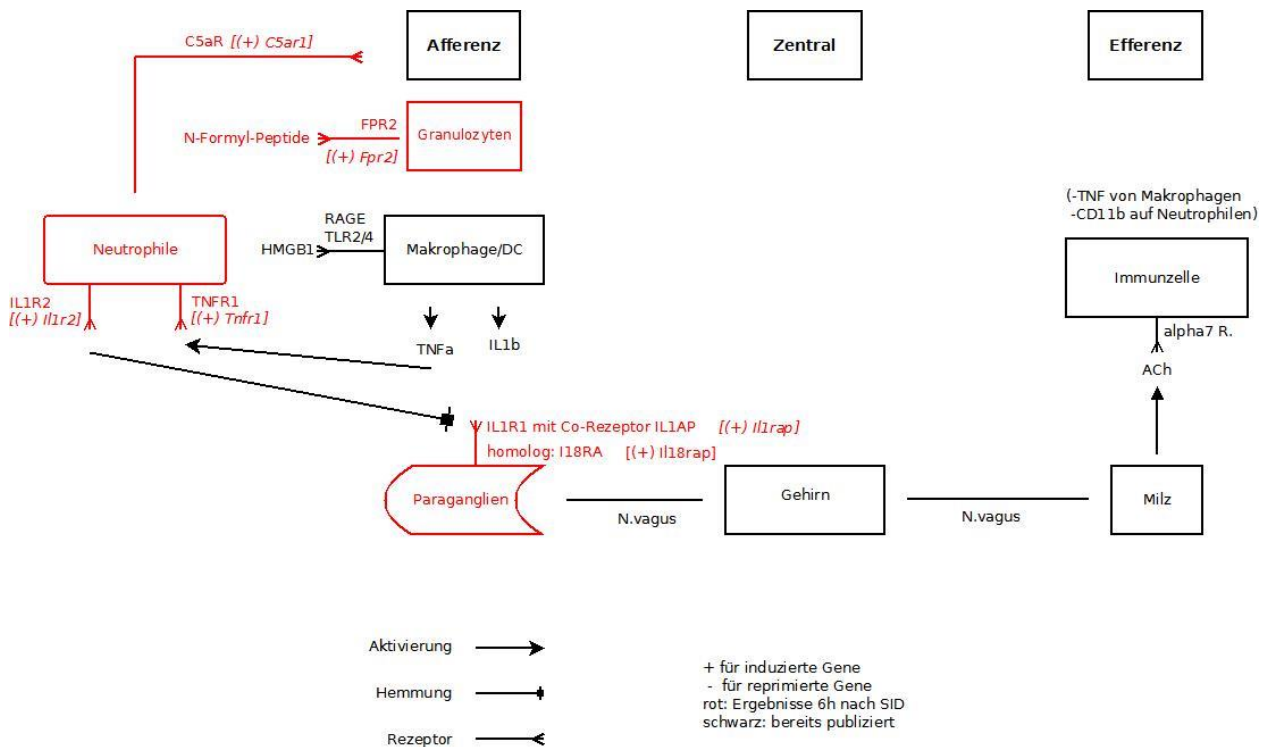


**Abbildung 19:** 3 Stunden nach SID induzierte Gene der IL1-Familie

#### 4.3.2 Veränderungen 6 Stunden nach SID versus Kontrolle

Der anti-inflammatorische Reflex, in den der Nervus vagus eingebunden ist, besteht aus einer Afferenz, einer zentralen Verrechnung und einer Efferenz. Afferente Signale werden über die zellulären Bestandteile der angeborenen Immunantwort und weiterhin über die Paraganglien dem Nervus vagus zugänglich gemacht. Nach der zentralen Verarbeitung im Gehirn nehmen die efferenten Signale ihren Weg über cholinerge Verschaltungen in der Milz hin zu den Effektor-Immunzellen.

Viele Gene, deren Expression sich 6 Stunden nach Durchführung der SID veränderten, besitzen einen Bezug zu diesem cholinergen Reflex. In der folgenden Graphik wird zur Veranschaulichung der folgenden Ergebnisse erläutert, welche Teile des CAIP von der signifikant veränderten Genexpression betroffen waren.



**Abbildung 20:** CAIP (schwarz) mit veränderter Expression von Genen nach SID (rot). Vor allem im Bereich der Afferenzen des CAIP war die Expression einiger Gene induziert.

#### 4.3.2.1 Gene, die in die Adhäsion und Diapedese von Granulozyten involviert sind

Die größten Veränderungen zum 6-Stunden-Zeitpunkt nach SID waren in der Signalkaskade der Granulozyten-Adhäsion und Diapedese zu erkennen.

- Die Genexpression des „formyl peptide receptor 2“ (*Fpr2*) war 6 Stunden nach SID im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 1,92-fache gesteigert.
- Ein weiterer Rezeptor, dessen Gen nach SID verstärkt exprimiert wurde, ist der „complement component 5a receptor 1“ (*C5ar1*) (1,98-fach). Er kommt unter anderem auf Neutrophilen vor und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Afferenzen des CAIP.
- Ebenfalls positiv beeinflusst wurden zwei Gene der IL1-Rezeptor-Subfamilie, „interleukin 1 receptor accessory protein“ (*Il1rap*) und „interleukin 18 receptor accessory protein“ (*Il18rap*). Hier verstärkte sich die Expression um das 1,76 bzw. 2,15-fache.

- Außerdem veränderte sich die Expression von „colony stimulating factor 3 receptor“ (*Csf3r*) (+2,06-fach, 3 Stunden nach SID war es +1,94-fach), „chemokine (C-X-C motif) receptor 2“ (*Cxcr2*) (+3,76-fach), „tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a“ (*Tnfrsf1a/Tnfr1*) (+1,56-fach) und „chemokine (C-C motif) ligand 9“ (*Ccl9*) (+1,90-fach).

- Die stärkste Veränderung betraf, wie schon zum Analysezeitpunkt 3 Stunden nach SID, das Gen *Mmp8*. Hier konnte ein Anstieg der mRNA um das 13,15-fache registriert werden. Aber auch einige andere Gene aus der Gruppe der Matrix-Metallopeptidasen veränderten sich. So wurde die Genexpression von *Mmp9* um das 1,83- und die von *Mmp19* um das 1,99-fache induziert.

- Die zweitstärkste positive Modifikation erfuhr der „interleukin 1 receptor, type 2“ (*Il1r2*). Dessen mRNA lag nach SID um das 10,31-fache vermehrt vor.

- Am stärksten reprimiert wurde „chemokine (C-X-C motif) ligand 10“ (*Cxcl10*) (-2,56-fach).

#### 4.3.2.2 Interleukin 10-Signalweg

Auch im Signalweg des Interleukin 10 befinden sich einige Gene, die nach SID signifikant differentiell exprimiert wurden.

Der „suppressor of cytokine signaling 3“ (*Socs3*) wurde 6 Stunden nach SID 2,35-fach verstärkt exprimiert, 3 Stunden nach SID sogar 4-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem wurde die Genexpression von „Fc receptor, IgG, low affinity III“ (*Fcgr3*) (+1,51-fach), „Fc receptor, IgG, low affinity IV“ (*Fcgr4*) (+1,89-fach), „chemokine (C-C motif) receptor 1“ (*Ccr1*) (+3,24-fach) und „arginase type II“ (*Arg2*) (+2,80-fach) induziert.

#### 4.3.2.3 Weitere nach SID differentiell exprimierte Gene

Neben der veränderten Genexpression, die die beiden oben genannten Signalwege betrifft, ergaben sich 6 Stunden nach SID noch weitere Veränderungen, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

Dazu gehören „lymphocyte antigen 6 complex, locus G“ (*Ly6g*) (+5,41-fach), „platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide“ (*Pdgfra*) (+3,87-fach), „resistin like gamma“ (*Retnlg*) (+3,78-fach), „macrophage scavenger receptor 1“ (*Msr1*) (+2,72-fach) und das „S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)“ (*S100a8*) (+2,29-fach).

#### 4.3.3 Veränderungen 3 Stunden nach SID in Abhängigkeit vom Nervus vagus

Um den Einfluss des Nervus vagus auf die Genexpression nach SID zu untersuchen, wurde die Vagotomie mit anschließender SID mit einer SID nach SHAM-Vagotomie (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) verglichen. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Auswirkungen einer Vagotomie ziehen.

Der Signalweg der Entstehung von Multipler Sklerose beinhaltet dabei die meisten Gene mit veränderter Genexpression zum Explantationszeitpunkt 3 Stunden nach SID. Es wurden sowohl der „chemokine (C-C motif) receptor 5“ (*Ccr5*) als auch das Gen, welches für seinen Liganden „chemokine (C-C motif) ligand 5“ (*Ccl5*) codiert, ca. 1,7-fach vermindert exprimiert, verglichen mit der SHAM-Vagotomie-Gruppe.

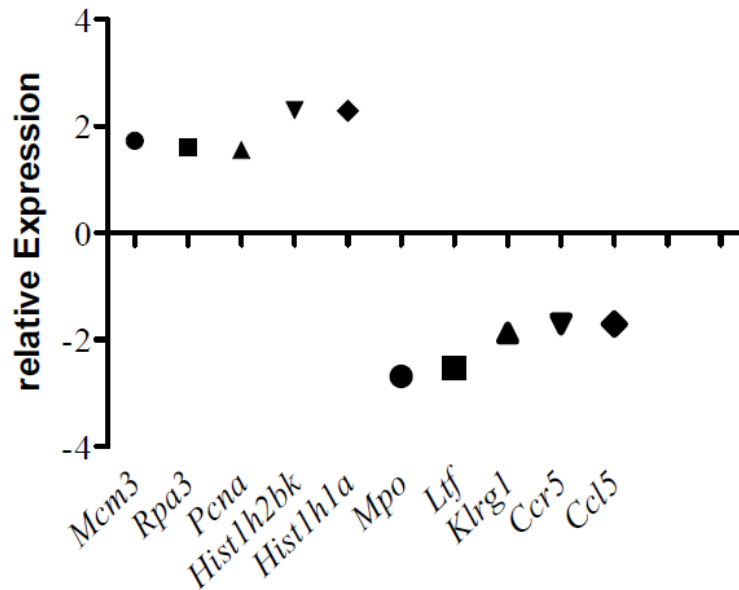
Nach Vagotomie mit anschließender SID wurden ebenfalls Teile der chromosomalen Replikation beeinflusst. Im Gegensatz zur 3-Stunden-SID-Gruppe wurden nach Vagotomie die Gene *Mcm3*, *Rpa3* und „proliferating cell nuclear antigen“ (*Pcna*) um das 1,73, 1,62 bzw. 1,56-fache verstärkt exprimiert.

Die Gene, die am stärksten induziert wurden, codieren für 2 Histone. „Histone cluster 1, H2bk“ (*Hist1h2bk*) codiert für das Histon 2 B vom Typ 1 K. Es wurde 2,3-fach verstärkt exprimiert. „Histone cluster 1, H1a“ (*Hist1h1a*) codiert für das Histon H1.1 und wurde um das 2,29-fache induziert.

Mit verminderter mRNA-Menge wurde die „Myeloperoxidase“ (*Mpo*) identifiziert. Zum 3-Stunden-Zeitpunkt verringerte sich die Genexpression um das 2,68-fache, 6 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie sogar um das 2,95-fache.

Ebenfalls vermindert exprimiert wurde das Gen, welches für „Lactotransferrin“ (*Ltf*) codiert (-2,54-fach), sowie „killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1“ (*Klrg1*) (-1,87-fach).

### Einfluss des N. vagus auf die Genexpression 3 Stunden nach SID



**Abbildung 21:** Veränderung der Genexpression 3 Stunden nach SID mit VGX im Vergleich mit einer SID nach SHAM-VGX

Die Graphik beschreibt die relativen Veränderungen in der Genexpression der dargestellten Versuchsgruppe.

#### 4.3.4 Einfluss des Nervus vagus auf die Genexpression 6 Stunden nach SID

In der Versuchsgruppe „6 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie“ (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) konnten generell nur wenig signifikante Veränderungen beobachtet werden. Diejenigen Gene, welche dennoch eine differentielle Expression aufwiesen, zeigten größtenteils verringerte mRNA-Mengen.

- Am stärksten veränderte sich die Expression von *Ctsg* (-3,49-fach). Es codiert für das Enzym Kathepsin G.

- Ebenfalls mit verminderter Expression (-2,90-fach) wurde *Prtn3* identifiziert. Dieses Gen codiert für die Proteinase 3.

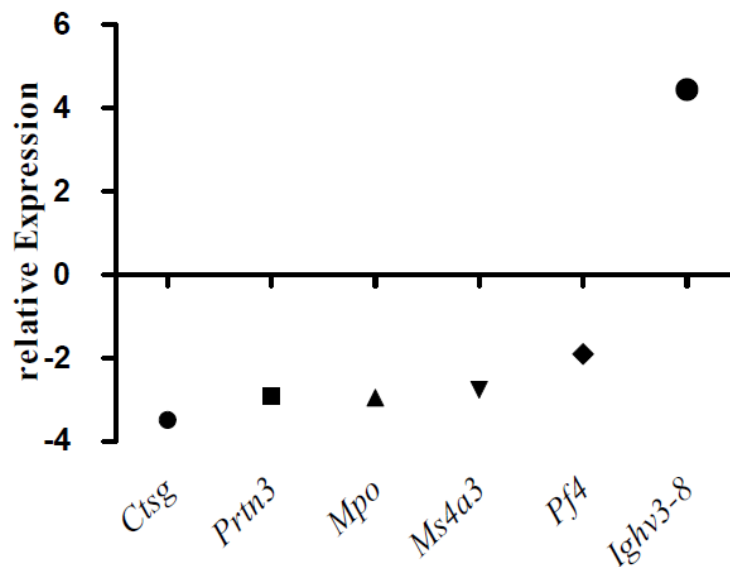
- Wie schon 3 Stunden nach Vagotomie und SID wurde auch nach 6 Stunden die Genexpression von *Mpo* reprimiert. Diese zeigte nach 6 Stunden eine 2,95-fache Verringerung und war damit noch etwas stärker reprimiert als zum 3-Stunden-Zeitpunkt.

- „Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3“ (*Ms4a3*) ist mit seinem Produkt in die Regulierung des Zellzyklus involviert. Nach SID war dessen Genexpression auch reprimiert (-2,76-fach).

- Auch das Gen, welches für den „platelet factor 4“ (*Pf4*) codiert, wurde differentiell exprimiert. In der Versuchsgruppe war die mRNA-Menge um das 1,90-fache verringert.

- Das einzige positiv veränderte Gen war *Ighv3-8* und codiert für die schwere Kette eines Immunglobulins. Es wurde um das 4,44-fache verstärkt exprimiert.

### Einfluss des N. vagus auf die Genexpression 6 Stunden nach SID



**Abbildung 22:** Veränderte Genexpression 6 Stunden nach SID mit Vagotomie im Vergleich zu einer SID nach SHAM-VGX

Die Genexpression der meisten hier dargestellten Gene wurde nach 6 Stunden reprimiert. Nur die Expression des Gens, welches für die schwere Kette eines Immunglobulins codiert, war verstärkt.

## 5. Diskussion

Das Problem der postoperativen Immunsuppression ist im klinischen Alltag allgegenwärtig. Jede Operation ist in mehr oder weniger starkem Ausmaß mit den Folgen dieser Veränderung des Immunsystems konfrontiert. Mit den hier vorliegenden Daten konnte eine neue, wichtige Erkenntnisebene gewonnen werden, indem dieses Phänomen auf Transkriptebene untersucht wurde. In den Versuchen zeigt sich, dass eine Vielzahl der Gene in ihrer Expression reprimiert wird. Dennoch wird auch die Expression einiger Gene induziert.

Im Folgenden sollen die gewonnenen Erkenntnisse interpretiert und im Hinblick auf ihre Auswirkungen auf den postoperativen Patienten und die klinische Relevanz sortiert werden. Außerdem soll aufgezeigt werden, inwieweit die mit dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse mit dem biphasischen Modell der postoperativen Immunsuppression einhergehen.

### 5.1 Erster Teil: Vorversuch: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von Splenozyten

Die Auswertung der IL6-Plasma-Werte zeigt eine Spitzenkonzentration 3 Stunden nach SID an. Damit wird hier ein deutlich früheres Ansteigen von IL6 nach SID gezeigt als im Referenz-Paper von Koerner et al. aus dem Jahre 2011. Dort wurden unter anderem der 6- und 12-Stunden-Zeitpunkt nach SID analysiert und für 6 Stunden ein signifikanter Anstieg der Blutserum-Werte beschrieben. Somit können die Ergebnisse dieser Arbeit die Veröffentlichung von 2011 um einen 3-Stunden-Zeitpunkt ergänzen. Damit kann hier gezeigt werden, dass die IL6-Zytokin-Werte nicht erst 6 Stunden nach SID ansteigen, sondern bereits nach 3 Stunden. Ursächlich für den Anstieg der Serum-IL6-Werte ist die Aktivität der Splenozyten, da die Genexpression dieses Interleukins zum 3-Stunden-Zeitpunkt bereits signifikant verstärkt ist (siehe dazu auch die Ergebnisse des zweiten Teils der Experimente). Dies unterstreicht die wichtige Funktion dieses Zytokins für die frühe Phase der postoperativen Inflammation. Durch das gleichzeitige Auftreten von massiver Induktion der IL6-Genexpression und dem konsekutiven Ansteigen der Proteinmenge im Blut können mit hoher Wahrscheinlichkeit die Splenozyten als Ursache für das „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) gesehen werden. Diese Erkenntnis ist wichtig, da so die Milz als dasjenige Organ in den Fokus rückt, welches die SIRS initial unterhält.

Mit dem Zytokin IL6 steht ein guter Marker für die Intensität einer Immunreaktion zur Verfügung. Da dieser in der initialen Phase verstärkt vorliegt, spricht dies für eine stark

ablaufende Immunreaktion und validiert so die OP-Methodik der SID. Das hier verwendete Mausmodell ist daher in der Lage, eine postoperative Immuntgleisung beim Menschen zu simulieren.

Auf dieser Basis konnten die Operationen des Hauptversuchs aufgebaut werden.

## 5.2 Zweiter Teil: Charakterisierung der SID auf Transkriptebene

IL6 gilt als ein Entzündungsmarker, der sich in einem septischen Geschehen vergleichsweise früh verändert. Dies kann durch die eigenen Daten bestätigt werden. Nach 3 Stunden ist nicht nur die Genexpression signifikant verstärkt, sondern auch das Protein im Blut in erhöhtem Maße nachweisbar. Somit führt ein Trauma wie die SID zu einem sehr frühen und drastischen Anstieg von inflammatorischen Zytokinen.

Vergleicht man die Ergebnisse der PCR mit denen der Microarray-Analysen zum 3-Stunden-Zeitpunkt, so wird man feststellen, dass die Ergebnisse letzterer nicht auf eine signifikant erhöhte mRNA-Menge von *Il6* oder *Hmgb1* schließen lassen. Diese Diskrepanz zwischen den beiden Methoden lässt sich erklären, bedenkt man die unterschiedlichen Prinzipien der beiden Methoden: Eine RT-PCR ist sensitiver als eine Microarray-Analyse per Genchip. Da der mit der PCR ermittelte „fold change“ signifikant, aber vergleichsweise gering ausfällt, könnte der beobachtete Effekt mit einer weniger sensitiveren Methode nicht zu detektieren sein. Für die RT-PCR wurden mehr Replikate verwendet, wodurch die statistische Analyse robuster wird. Möglicherweise war die Anzahl der Replikate zu gering, um nach SID bei *Il6* oder *Hmgb1* mit der Microarray-Analyse eine statistische Signifikanz zu erzielen.

Zum 3-Stunden-Zeitpunkt verändert sich in der PCR ebenfalls die Genexpression von *Hmgb1* signifikant. Hier liegt aber in der Versuchsgruppe weniger mRNA vor als in den beiden Kontrollgruppen. Da HMGB1 vor allem nach traumatischer Schädigung freigesetzt wird, wäre nach SID ebenfalls ein starker Anstieg zu erwarten gewesen. Dies ist in Bezug auf die Genexpression nicht der Fall. Möglicherweise ist der zu beobachtende Effekt bereits Teil einer Gegenregulation des Organismus. Da nach einem Trauma HMGB1 in massiv erhöhten Konzentrationen vorliegt, könnten kompensatorische Mechanismen einsetzen, die ein aktives „shredding“ von *Hmgb1*-mRNA betreiben. Eventuell erfolgt dieser Prozess derart stark, dass sich die Zelle nach 3 Stunden in einer Hyperkompensation befindet und in der Versuchsgruppe weniger mRNA vorliegt als in den Kontrollgruppen.

Ebenfalls zu erklären wäre das signifikante Abfallen von *Hmgb1* mit Zellmigration aus der Milz. Wenn HMGB1-synthetisierende Zellen aus der Milz auswandern, um zum Ort der traumatischen Schädigung wie dem Darm zu gelangen, ginge dies mit weniger *Hmgb1*-mRNA in der Milz einher.

### **5.3 Dritter Teil: Hauptversuch: Analyse des Milz-Transkriptoms mittels Microarrays**

Im Folgenden werden die Veränderungen der Genexpression in den einzelnen Versuchsgruppen verglichen und daraus Rückschlüsse auf ihren möglichen Einfluss auf den Status des Immunsystems in der postoperativen Phase gezogen.

In der Literatur wurde sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell eine Immunsuppression nach operativem Trauma nachgewiesen [42, 1]. Außerdem wurde in diesem Zusammenhang der Nervus vagus als supprimierende Komponente beschrieben [9]. Diese Forschungsergebnisse, die sich alle auf der Proteinebene bewegen, sollen in der folgenden Diskussion mit den Daten aus der Genexpressionsanalyse korreliert und verglichen werden. Damit können diese Daten zur postoperativen Immunsuppression von einer völlig neuen Seite beleuchtet werden. Dabei stellen sich einige entscheidende Fragen in Bezug auf die Art und Weise der Regulation des Immunsystems auf Transkriptebene: Zum einen wird die Frage untersucht, inwieweit man in den einzelnen Versuchsgruppen von einer Suppression des postoperativen Immunsystems sprechen kann oder ob die Regulationsmechanismen ein eher ambivalentes Bild zeichnen. Zum anderen wird diskutiert, ob das Immunsystem als Ganzes von den Veränderungen betroffen ist oder ob nur einzelne Komponenten wie die angeborene oder die adaptive Immunantwort auf die Regulationen nach SID bzw. Vagotomie reagieren.

### 5.3.1 Veränderungen in der initialen Phase der postoperativen Immunsuppression 3 Stunden nach SID versus Kontrolle

#### 5.3.1.1 DNA-Replikation nach operativem Trauma

Ein operativer Eingriff wie eine SID unterdrückt Teile der DNA-Replikation: Zunächst bildet sich in der G1-Phase des Zellzyklus ein „origin recognition complex“, welcher die DNA an spezifischen Stellen erkennt, um dort die Replikation zu initiieren. Dieser Komplex besteht aus sechs Untereinheiten (ORC1-6), von denen in den vorliegenden Daten *Orc1*, 2 und 6 eine verminderte Genexpression aufweisen. An den ORC binden weitere Faktoren, wie CDC6, MCM2 und MCM4-7. Diese Faktoren weisen alle ebenfalls eine verminderte Genexpression auf. Durch diesen Schritt, für den eine ATPase-Aktivität gebraucht wird, entwickelt sich der ORC-Komplex zum „pre-replication complex“ (pre-RC). Untersuchungen an *S.cerevisiae* [43, 44] haben gezeigt, dass ORC1 und ORC5 ATP-Bindungsstellen besitzen, aber nur ORC1 ATP hydrolysiert, um so die weiteren Schritte einzuleiten. Takeda et al. [45] haben an humanen Zellen ebenfalls gezeigt, dass die Funktion von ORC1 und CDC6 als ATPasen wichtig für die DNA-Replikation ist. Im Übergang von der G1 zur S-Phase des Zellzyklus werden CDC45 und „replication protein“ A3 an den ORC-Komplex gebunden. Indem diese Faktoren nach SID in ihrer Genexpression reprimiert sind, tritt möglicherweise an diesem Punkt eine empfindliche Herabregulation des Signalwegs der DNA-Replikation ein. Durch die fehlenden katalytischen Eigenschaften der ORC-Bestandteile könnte die Assoziation der MCM-Faktoren gestört sein [46].

Zusätzlich liegen noch weitere Gene des „origin recognition complex“ und „pre-replication complex“ in ihrer Expression vermindert vor, sodass 3 Stunden nach SID eine verminderte DNA-Replikation von Splenozyten vorherrscht, was wahrscheinlich in einer reduzierten Zellvermehrung resultiert. Sollten diese Effekte auch phänotypisch zu einer Zytopenie führen, ist dadurch möglicherweise die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems eingeschränkt. Dies bestätigt die nach einem chirurgischen Trauma postulierte Immunsuppression des Organismus.

### 5.3.1.2 Einfluss des Nervus vagus auf die DNA-Replikation

In der Versuchsgruppe „3 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie“ ist dieser das Immunsystem unterdrückende Effekt nicht mehr zu beobachten. Der Effekt kehrt sich sogar um, sodass einige dieser Faktoren nach einer Vagotomie verstärkt exprimiert werden (siehe Gliederungspunkt 4.3.3). Möglicherweise sind daher diese supprimierenden Auswirkungen durch den cholinergen antiinflammatorischen Signalweg vermittelt, denn eine Vagotomie hebt den supprimierten Status auf. Diese Erkenntnis aus der Genexpressionsanalyse bestätigt ebenfalls die Aussagen bereits veröffentlichter Ergebnisse, wie der von Borovikova et al. Diese besagen, dass der Nervus vagus inhibierende Effekte auf das Immunsystem besitzt und eine Vagotomie diese aufhebt. Borovikova et al. stellten die Hypothese auf, dass die supprimierenden Eigenschaften des N. vagus durch antiinflammatorische Zytokine wie Corticosteroide hervorgerufen werden. So konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Organismus mit intaktem Nerv nach LPS-Stimulation höhere Corticosteroid-Spiegel aufwies als nach einer Vagotomie. Die Genexpressionsanalyse kommt jedoch zu einem gegenteiligen Ergebnis. So kann zum Explantationszeitpunkt 3 Stunden nach SID vs. Kontrolle, also in der Versuchsgruppe mit intaktem Nervus vagus, eine 1,88-fach verminderte Expression des Gens „steroidogenic acute regulatory protein“ (*Star*) beobachtet werden. Dieses codiert für ein Enzym, welches geschwindigkeitsbestimmend für die Steroid-Biosynthese ist [47]. Die verringerte Genexpression spricht gegen die oben geäußerte Hypothese, da sie die Biosynthese bremst und daher möglicherweise zu niedrigeren Spiegeln führt. Dieser Widerspruch lässt sich dahingehend auflösen, dass die 1,88-fache Reduktion zwar statistisch signifikant aber biologisch dennoch so gering ist, dass sie keine Auswirkung auf die Steroid-Biosynthese hat.

### 5.3.1.3 Beeinflussung von Reparaturmechanismen nach SID: Der ATM-Signalweg

Die SID hat allerdings nicht nur Auswirkung auf die DNA-Replikation, sondern auch auf die Reparaturprozesse nach Schädigung dieser.

Am Beginn der Signalkaskade zur Reparatur von DNA-Schäden, in diesem Falle von „double-strand breaks“ (DSB), steht das Enzym „Ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) [48]. ATM ist ein zentrales Enzym, welches in viele DNA-Reparaturprozesse eingebunden ist. Als übergeordnetes „Zentrum“ reguliert es eine Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen, von denen auch einige nach SID eine veränderte Genexpression aufweisen. Um das Signal der DNA-Schädigung an untergeordnete second messenger weiterzuleiten, existiert die

„Checkpoint Kinase 2“ [49]. Diese wird per Phosphorylierung durch ATM aktiviert und spielt damit eine wichtige Rolle in der Weiterleitung der Signale von DNA-Schädigungen. Außerdem ist CHK2 involviert in Prozesse der Mitose, Meiose und Aufrechterhaltung von Stammzellenstabilität.

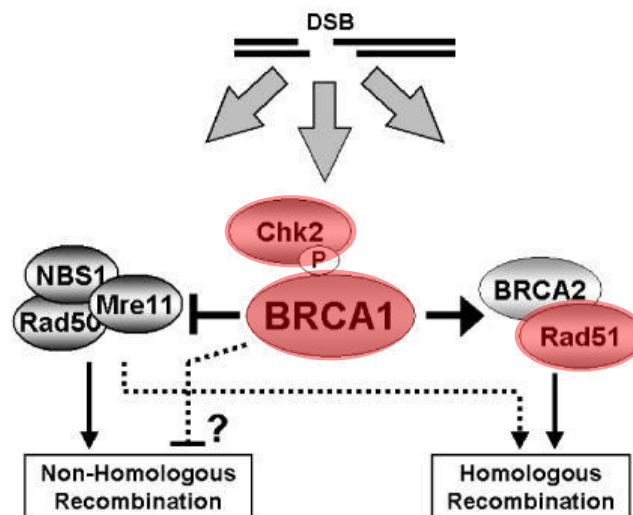
ATM besitzt auch Auswirkungen auf den Kondensierungsgrad von Chromatin. DNA-Reparatur kann nur stattfinden, wenn die Erbinformation als Euchromatin vorliegt und Reparaturenzyme Zugang zu den geschädigten Arealen haben. Da Doppelstrangbrüche im Heterochromatin aufgrund seiner Kompaktheit schwer zu reparieren sind, muss das Chromatin erst aufgelockert werden, um Reparaturprozesse initiieren zu können. Kondensiert wird das Chromatin unter anderem durch „transcriptional silencing complexes“, wie z. B. „KRAB-associated protein“ (KAP1) mit HP1. ATM kann durch die Phosphorylierung von KAP1 die Auflockerung der DNA bewirken, was nachfolgende Reparaturprozesse ermöglicht [50]. Wenn HP1 als Faktor für die Verpackung von DNA nach SID vermindert exprimiert wird, könnte eine Tendenz in Richtung Euchromatin vorliegen. Damit würde die ATM-induzierte Auflockerung von Nukleinsäure weniger oft notwendig und Reparaturprozesse könnten effizienter ablaufen. Interessanterweise interagiert murines HP1 auch mit ORC1, 2 und 6 also den Proteinen der DNA-Replikation, deren Gene auch nach SID vermindert exprimiert werden. Im murinen Modell führt eine Verringerung von HP1 $\alpha$  zu einer langsameren Zellvermehrung und fehlerhaften Zellzyklen [51]. Dieses Studienergebnis unterstützt die oben beschriebene Vermutung einer erschwerten Replikation durch das Fehlen von Bestandteilen des ORC und pre-RC-Komplexes bei möglicherweise verbesserten Reparaturprozessen.

Auch SMC2 dient der Verpackung von Chromatin. Als Bestandteil sogenannter „condensing complexes“ dient es als zentraler Bestandteil zur Kondensierung von Chromosomen [52, 53]. Da auch *Smc2* vermindert exprimiert wird, wird das Vorliegen von Euchromatin eventuell auch noch aus diesem Zusammenhang heraus unterstützt.

Die verminderte Genexpression von *Chk2* zum Zeitpunkt 3 Stunden nach SID beeinflusst ebenfalls einige Signalwege, z. B. die Wiederherstellung von beschädigten Arealen. Als prominente Substrate von CHK2 gelten die Genprodukte der „breast cancer“ Gene *Brcal* und 2 [54]. Dies sind Tumorsuppressorgene mit wichtigen Funktionen im DNA-Reparaturprozess. BRCA1 wird durch CHK2 phosphoryliert, wodurch die Rekombinase „RAD51“ rekrutiert

wird. Dies führt zu einer Repression von „non-homologous end joining“ (NHEJ) Reparatur-Funktionen und einer Aktivierung von „homology directed repair“ (HDR) [55]. Nach SID sind einige Gene, die zum HDR-Reparaturmechanismus führen wie *Brca1*, *Chk2* und *Rad51*, in ihrer Expression vermindert. RAD51 ist ein Schlüsselenzym des HDR-Reparaturprozesses. Durch diese verminderte Genexpression scheint es zu einer Verschiebung der Reparaturmechanismen zukommen, durch den der Prozess NHEJ die Oberhand über HDR gewinnt. HDR läuft mit weniger Fehlern ab als NHEJ, benötigt aber eine Matrize [49]. NHEJ kommt daher mit widrigeren Zuständen zurecht. Damit könnte diese Verschiebung einen Anpassungsmechanismus des Körpers darstellen, schwere Traumata besser zu bewältigen.

### Zwei Mechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen



**Abbildung 23:** Gegenüberstellung der beiden Reparaturmechanismen NHEJ bzw. HDR mit ihren jeweiligen vorgeschalteten Signalwegen, die zur Aktivierung führen. [55]

In Rot sind diejenigen Gene markiert, die nach SID vermindert exprimiert werden. Betroffen von dieser verringerten Genexpression ist der Signalweg des HDR-Reparaturmechanismus.

*Blm* codiert für ein Enzym, welches Teil des HDR-Prozesses ist. Dieses ist ebenfalls an der Wiederherstellung von DNA-Schäden beteiligt. Indem es das 5'-Ende der DNA beschneidet und sogenannte „Holliday-Strukturen“ entwindet, trägt es zur HDR bei [56]. Diese Struktur trägt den Namen des Forschers Robin Holliday und bildet sich beim sogenannten „crossing-over“. In Abwesenheit dieses Faktors ist die DNA-Stabilität herabgesetzt [57]. Die verminderte Expression von *Blm*, scheint ein weiteres Indiz für die Verlagerung der DNA-Reparatur hin zur NHEJ zu sein.

ATM interagiert auch mit Bestandteilen von Histonen, um genetische Integrität zu gewährleisten. Es hat Einfluss auf das Histon H2AX, welches von *H2afx* codiert wird. Dieses ist ein weiteres wichtiges Gen, dessen Produkt in die DNA-Reparatur involviert ist. Eine normale Funktion von ATM und H2AX in T-Zellen der Milz wird benötigt, um eine funktionierende Rekombination des T-Zell-Rezeptors (TCR) und eine konstitutive Zellproliferation zu gewährleisten und genetische Stabilität aufrecht zu erhalten [58]. *H2afx*-defiziente, embryonale Mausstammzellen zeigen eine erhöhte Prädisposition für spontane genetische Instabilität und solche, die durch ionisierende Strahlen hervorgerufen wird [59]. Des Weiteren initiiert H2AX nach Doppelstrangbrüchen am Ort der Schädigung die Anlagerung weiterer Proteine der DNA-Reparatur [60]. *H2afx* wird nach SID weniger stark exprimiert als in der Kontrollgruppe. Somit unterstützt auch diese Veränderung nach SID die These der Immunsuppression nach einem Trauma. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass sich nach einer SID möglicherweise nicht nur die Art des Reparaturmechanismus ändert, sondern dass dieser an sich auch weniger effizient ablaufen könnte.

#### **5.3.1.4 Beeinflussung des Zellzyklus im Übergang zwischen der G2- und der Mitosephase durch die SID-Operation**

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, um den Körper vor Schäden zu bewahren, ist die Pausierung des Zellzyklus. Damit soll verhindert werden, dass Zellen mit schadhafter DNA einen nachfolgenden Schritt im Zellzyklus erreichen und sich so Fehler im Genom fortpflanzen. Dieser Arrest kann zu den unterschiedlichsten Zeitpunkten geschehen.

ATM reguliert den Zellzyklus in Gestalt des Übergangs zwischen der G2- und der Mitosephase. So beeinflusst dieses Enzym die Aktivität von p53 und nimmt damit Einfluss auf die Hemmung dieses Übergangs. Im Folgenden wird der Blick auf die Auswirkung des p53-Proteins auf den G2/M-Übergang gerichtet.

Um am G2-Checkpoint in die Mitose eintreten zu können, wird die Bindung von CDC2 an Cyclin B1 benötigt. p53 kann diese Assoziation über „second Messenger“ unterbinden: Entweder erfolgt über p21 eine direkte Hemmung von CDC2 oder GADD45 führt zu einer Dissoziation von CDC2 von Cyclin B1. In beiden Fällen hemmt p53 den Eintritt in die Mitose [61].

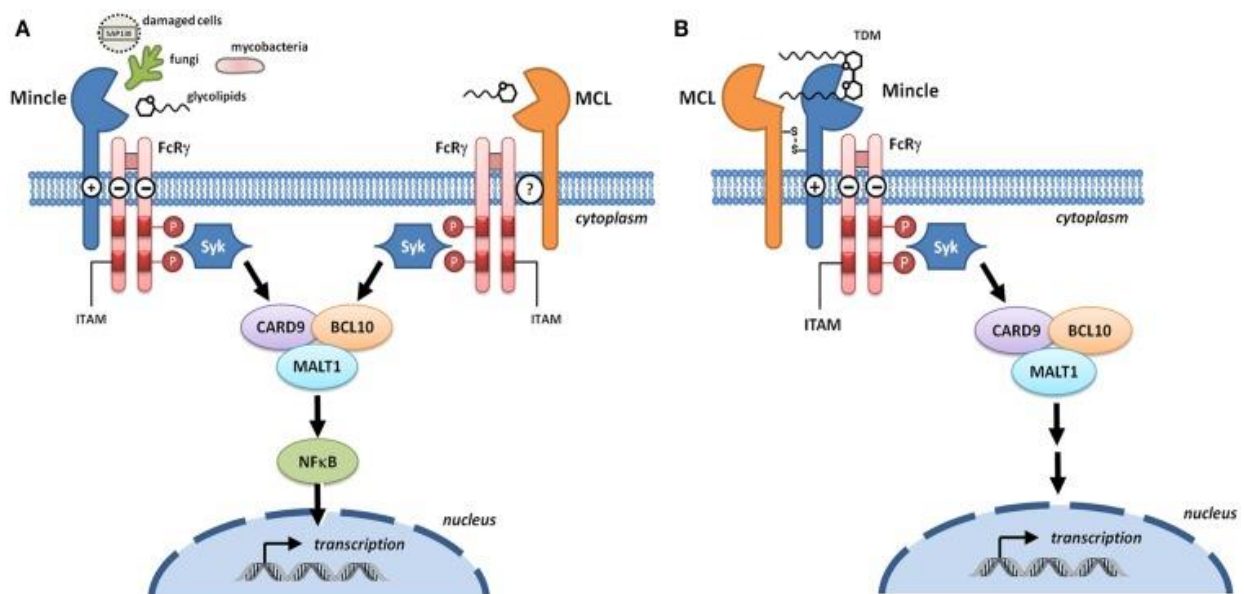
Die Mechanismen, die 3 Stunden nach SID auf Transkriptebene ablaufen, scheinen denselben Effekt zu besitzen wie sie p53 auf den Organismus hat. Denn die Genprodukte von *Cdkn1a* und *Gadd45*, die den G2/M-Übergang supprimieren, werden vermehrt exprimiert. Hingegen werden die Gene *Cdk1* und *Ccnb1*, deren Produkte einen förderlichen Effekt besitzen, vermindert exprimiert. Ein chirurgisches Trauma scheint den Zellzyklus zu verlangsamen, um den anlaufenden Reparaturmechanismen Zeit zu geben, bevor die Zellen in die Mitose eintreten. Ein weiterer Vorteil eines langsameren Zellzyklus könnte darin bestehen, eine überschießende, inflammatorische Reaktion des Organismus zu dämpfen.

Auch ein p53-unabhängiger, ATM-abhängiger Signalweg hat Auswirkungen auf den Übergang zwischen der G2- und der Mitosephase des Zellzyklus. So können CHK1 und 2 MPIP3 phosphorylieren, was eine negative Regulierung darstellt, da MPIP3 an 14-3-3-Proteine gebunden wird und damit im Zytoplasma verbleibt. 14-3-3-Proteine sind multifunktionelle, regulatorische Proteine in eukaryotischen Zellen. In der Folge kann MPIP3 CDC2 nicht mehr aktivieren, wodurch es zum Stillstand im Zellzyklus zwischen der G2- und der Mitosephase kommt, da CDC2 essentiell für den Eintritt in die Mitose ist [62]. 3 Stunden nach SID ist die Expression jener Gene, die für CHK1/2, MPIP3 und CDC2 codieren, verringert.

Da im p53-unabhängigen Signalweg Gene vermindert exprimiert werden, deren Produkte förderliche als auch inhibierende Auswirkungen auf den Übergang im Zellzyklus besitzen, bleibt der resultierende Effekt unklar. Es kann nicht klar abgegrenzt werden, ob die förderliche Seite oder eher die inhibierende Seite überwiegt. Da aber mit den Enzymen MPIP3 und CDC2 die Endstrecke dieses Signalwegs betroffen ist und die codierenden Gene vermindert exprimiert werden, scheint es möglich, dass der p53-unabhängige Signalweg gehemmt wird. In jedem Falle zeigt sich, dass auch in diesem Signalweg ein operatives Trauma eine Veränderung induziert, die Auswirkung auf den Eintritt der Zelle in die Mitose hat.

### 5.3.1.5 Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr

Die beiden C-Typ-Leptin-Rezeptoren CLC4E (Minc1) und CLC4D (MCL) kommen beim Menschen und z. T. bei Nagern auf Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und Dendritischen Zellen vor [63]. Sie dienen als „pattern recognition receptor“ (PRR) und erkennen nicht vitale Zellen als DAMPS, woraufhin inflammatorische Zytokine freigesetzt werden, die Neutrophile aktivieren [64]. Durch das nach SID verstärkte Vorliegen von mRNA jener Gene, die für diese Rezeptor-Typen codieren, kommt es möglicherweise zu einer verbesserten Erkennbarkeit von Erregern und beschädigten, körpereigenen Zellen, was die unspezifische Immunantwort stärkt.



**Abbildung 24:** Signalwege der beiden Leptin-Rezeptoren Minc1 und MCL [63]

Sie kommen unter anderem auf Zellen der unspezifischen Immunabwehr vor und besitzen die Funktion eines PRR. Die *Minc1*-Expression erhöht sich 3 Stunden nach SID um das 4,38-fache, nach 6 Stunden um das 5,19-fache. *Mcl* wird zum frühen Zeitpunkt 3,59-fach und zum späten Zeitpunkt 4,08-fach erhöht exprimiert.

### 5.3.1.6 Gene mit der stärksten Veränderung der Expression 3 Stunden nach SID

*Mmp8*, *Il1r2* und *Pdk4* sind die Gene, deren Expression am stärksten induziert ist. Diese stellen 6 Stunden nach SID ebenfalls die Top 3 der positiv veränderten Gene dar, allerdings ist die Genexpression zu diesem späteren Zeitpunkt noch einmal deutlich gesteigert. Die Funktion von MMP8 und IL1R2 wird im dortigen Kapitel besprochen (siehe Gliederungspunkt 5.3.2.1). Die Funktion von PDK4 spielt sich in Mitochondrien ab. So hemmt das Genprodukt von *Pdk4* dort den Glucose-Metabolismus, indem es den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex hemmt [65, 66]. Nach Kultivierung in Anwesenheit von LPS wird von HEP-G2-Zellen vermehrt *Pdk4*-mRNA exprimiert [67]. Auch 3 und 6 Stunden nach SID ist dies der Fall.

Das Gen mit der stärksten Repression codiert für die microRNA 144. Es kontrolliert den Cholesterol-Metabolismus in Makrophagen [68] und wird in T-Zellen unter anderem als Antwort auf das Mycobakterium Tuberculosis vermehrt exprimiert [69].

### 5.3.1.7 Verschiebung der immunologischen Prozesse in Richtung der angeborenen Abwehr

Eine wichtige Funktion in der adaptiven Immunantwort besitzt TFR1. Neben der bekannten Funktion dieses Transferrin-Rezeptors für die Eisen-Homöostase benötigen T-Zellen zur Reifung diesen Rezeptor. Knockout-Mäuse ohne Transferrin-Rezeptor besitzen diese Lymphozyten nicht [70]. Genauso wie der oben genannte H2AX ist auch der TFR1 ein wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Durch die Repression der entsprechenden Gene und der Stärkung von Rezeptoren der unspezifischen Immunantwort wie MCL und Mincl, kann eine Verschiebung der immunologischen Prozesse hin zur angeborenen Abwehr beobachtet werden. Erklärbar sind diese Effekte zum einen mit einer funktionellen Schwächung der adaptiven Immunantwort. Zum anderen könnte hier auch die Zellmigration eine Repression vortäuschen. In bisher unpublizierten Studien der Arbeitsgruppe kann gezeigt werden, dass 24 Stunden nach Laparotomie und SID einige Zelltypen der adaptiven Immunantwort wie CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen aus der Milz auswandern, um in die nach dem OP-Trauma geschädigten Gebiete des Darms einzuwandern. 3 Stunden nach SID könnte diese Migration auch schon in signifikantem Umfang stattfinden. Dies könnte erklären, warum auch schon 3 Stunden nach SID einige Gene, die charakteristisch für das adaptive Immunsystem sind, in geringerer Menge vorkommen als in der Kontrollgruppe.

Einen weiteren Erklärungsansatz bietet der cholinerge antiinflammatorische Signalweg. Möglicherweise ist die hier beobachtete, spezifische Repression von Bestandteilen der adaptiven Immunantwort bereits die ausgeführte Effektorfunktion des Nervus vagus. Gleichzeitig bleiben die Komponenten der angeborenen Antwort stark exprimiert, weil sie für die Afferenzen des antiinflammatorischen Signalwegs von wichtiger Bedeutung sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 3 Stunden nach SID vor allem die DNA-Reparatur und der Zellzyklus in ihren Abläufen modifiziert werden. So wird die DNA-Replikation erschwert und das Voranschreiten des Zellzyklus verlangsamt. Auch ein Shift der Reparaturmechanismen erfolgt. Außerdem liegt das Chromatin dekondensiert vor, was möglicherweise zu effizienteren Reparaturmechanismen führt.

Diese Expressionsmuster, die zu einer Immunparalyse nach SID passen, bestätigen die in der Literatur vielfältig postulierte Immunsuppression nach Traumata. So können beim Menschen postoperativ verringerte HLA-DR-Spiegel beobachtet werden, die eine Immunsuppression gut beschreiben [42]. Damit repräsentiert das hier verwendete Mausmodell über Spezies-Grenzen hinweg auch solche Traumata beim Menschen, die im Zuge kurativer Prozesse in Operationen zugefügt werden.

Menges et al. konnten zeigen, dass ein verringerter HLA-DR-Status auf Monozyten mit einem besonders schweren klinischen Verlauf nach OP-Trauma einhergeht. Dabei wurde auch die Genexpression von T-Zellen beobachtet und es konnte, ebenso wie in den hier vorliegenden Genexpressionsdaten des Maus-Modells, eine verringerte Expression dokumentiert werden [71]. Die hier dargestellten Daten sind damit in der Lage, die Arbeiten von Menges et al. zu bestätigen und auszubauen, da in der vorliegenden Arbeit sämtliche Entitäten der Splenozyten in ihrer Gesamtheit analysiert wurden.

### 5.3.2 Genexpressionsmuster 6 Stunden nach SID im Vergleich zur Kontrollgruppe

#### 5.3.2.1 Sensibilisierung vagaler Afferenzen nach SID

Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach SID werden einige Gene induziert, die mehrheitlich in Neutrophilen Granulozyten zu finden sind bzw. auf diese Einfluss nehmen. Daraus resultieren phänotypisch möglicherweise eine Funktionssteigerung sowie eine Zunahme der Zellzahl. Da diese Bestandteile des Immunsystems maßgeblich an afferenten Funktionen des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs beteiligt sind, resultiert aus einer Induktion entsprechender Gene möglicherweise eine deutliche Sensibilisierung vagaler Afferenzen. Im folgenden sind einige dieser Gene beispielhaft aufgelistet.

An erster Stelle der Granulozyten-Aktivierung steht die Erkennung eines Traumas. Dies geschieht unter anderem durch Rezeptoren, die die sogenannten DAMPS erkennen. Der „formyl peptide receptor 2“ (FPR2) ist auf Granulozyten lokalisiert und in der Lage, N-Formyl-Peptide zu erkennen. Diese Peptide gelten als DAMPS, da sie ausschließlich von bakteriellen oder mitochondrialen Genen codiert werden. Kommt es durch ein Trauma zur Nekrose, wird mitochondriales Material freigesetzt und Granulozyten werden über diese Chemokine aktiviert [72, 73]. Die gesteigerte Expression von *Fpr2* kann zu einer verstärkten Erkennbarkeit von DAMPS durch Neutrophile führen. Analog zu der Funktion von RAGE/TLR2/4 auf Makrophagen und Dendritischen Zellen im afferenten Schenkel des CAIP, könnte der FPR2 auf Granulozyten ebenfalls Zellschädigungen detektieren. Durch dieses veränderte Expressionsmuster wären die vagalen Afferenzen des N. vagus sensibler für etwaige Zellschädigungen.

Ein weiterer Rezeptor, dessen codierendes Gen nach SID verstärkt exprimiert wird, ist der C5AR1. Er kommt unter anderem auf Leukozyten vor und seine Funktion besteht darin, den Komplementfaktor C5a zu binden. Nach dieser Liganden-Rezeptorbindung kommt es unter anderem zur gesteigerten Expression von CD11b auf der Zelloberfläche, was ein Schlüsselereignis für Neutrophile Granulozyten darstellt, effizient Phagozytose betreiben zu können [74]. Durch die 1,98-fach gestiegene Expression von *C5ar1* und die damit verbundene Beeinflussung der CD11b-Expression auf der Zelloberfläche könnten die Phagozytosefähigkeit und Aktivierbarkeit durch Komplement potenziert werden. Im Gegensatz dazu wird im Zuge einer experimentellen Stimulierung des Nervus vagus die Herabregulation von CD11b auf Neutrophilen nach LPS-Stimulation beobachtet [36]. So

zeigt sich, dass im Kontext eines intakten Nervus vagus ein steriles Trauma wie die SID die Phagozytosefähigkeit scheinbar unterstützt, während die Konfrontation mit bakteriellen Bestandteilen wie LPS diese Fähigkeit schwächt. Ebenso wie zum 3-Stunden-Zeitpunkt nach SID sind mit *Fpr2* und *C5ar1* einige Bestandteile der unspezifischen Immunantwort gesteigert. Wie in Abbildung 20 (Seite 41) zu sehen, haben beide Rezeptortypen eine wichtige Stellung in der Afferenz des CAIP. Indem die Expression dieser Bestandteile induziert ist, wird die angeborene Immunantwort gestärkt und vagale Afferenzen sensibilisiert.

Darüberhinaus sind weitere proinflammatorischen Moleküle nach SID verstärkt exprimiert. Hier verdoppelt sich die Expression ungefähr. Betroffen sind hiervon zwei Gene, die für weitere Rezeptoren der IL1-Rezeptor-Subfamilie, *Il1rap* und *Il18rap*, codieren. IL1AP stellt, wie oben erwähnt, die biologische Funktion des Zytokins IL1 sicher, indem es am IL1R wirkt. IL18RA wirkt homolog zu IL1AP, da es auch homolog aufgebaut ist [75]. IL1 $\beta$  fungiert als Signal für traumatische Zellschädigungen. Paraganglien besitzen IL1R1-Rezeptoren, wodurch sie in der Lage sind, diese Signale zu detektieren und an den N. vagus weiter zu leiten [76]. Diese Rezeptortypen besitzen daher wichtige Funktionen im afferenten Schenkel des cholinergen antiinflammatorischen Signalweges.

Ebenso GCSFR. Dies ist ein weiterer Zytokin-Rezeptor, dessen Gen sich nach SID in seiner Expression verändert. Dessen Ligand, der „Granulocyte colony-stimulating factor“ (GCSF) ist essentiell für die Reifung und Funktion von Granulozyten. Dekkers et al. konnten zeigen, dass nach Stimulation mit LPS oder gram-negativen Bakterien humane Granulozyten den GCSFR auf ihrer Oberfläche herab regulierten [77]. Nach SID kann auf Ebene der Genexpression der gegenteilige Effekt beobachtet werden: Im Vergleich zur Kontrollgruppe verdoppelt sich die Expression des für den GCSFR kodierenden Gens. Dies könnte zu einer Zunahme der Zellzahl führen. Damit könnte ein Trauma wie die SID zu einer Aktivitätssteigerung und Hyperplasie von Immunzellen der unspezifischen Abwehr führen. Genauso wie bei C5AR1 scheint eine ambivalente Regulierung der Expression vorzuliegen, je nachdem ob ein bakterieller Kontext oder ob eine sterile Stimulation im Rahmen einer SID vorliegt.

Ebenfalls wichtig für die Immunabwehr und verantwortlich für die Mobilität von Neutrophilen ist der Rezeptor CXCR2. Er steuert die Migration dieser Immunzellen zu Entzündungsstellen, wie z. B. in Pankreatitismodellen [78] oder zu Tumoren [79]. Gleichzeitig kann in späten Phasen der Entzündung GCSF als Ligand am CXCR2 wirken und

die Mobilität der Granulozyten hemmen [80]. Dank dieser ambivalenten Eigenschaften ist der Rezeptor in der Lage, die Homöostase einer Entzündungsreaktion aufrecht zu erhalten. Sechs Stunden nach SID wird das Gen dieses Rezeptors stark hoch reguliert. Außer auf Zellen der unspezifischen Abwehr kommt dieser Rezeptor auch auf Zellen der erworbenen Abwehr vor. Dies passt gut zu den bisher unveröffentlichten Daten unserer Forschungsgruppe, die besagen, dass nach abdominellem Trauma Zellen der adaptiven Immunabwehr aus der Milz in die geschädigten Areale des Darms einwandern.

Granulozyten spielen in der angeborenen Immunaabwehr eine wichtige Rolle. Deshalb verändern sich auch viele mit ihnen assoziierten Gene. So auch diejenigen, die für Matrix-Metallopeptidasen codieren. Diese Proteine sind wichtig für Reparaturprozesse und die Angiogenese, aber auch Struktur zerstörend, wenn sie im Übermaß produziert werden. Dazu im Folgenden einige Beispiele:

MMP8 wird von Neutrophilen produziert und ist die dominierende Kollagenase in Wunden [81]. MMP9 wird nach Lungenerkrankungen ebenfalls hauptsächlich von inflammatorischen Zellen, wie z. B. Neutrophilen Granulozyten produziert [82]. MMP19 ist im Stroma von Wunden zu finden und wird von Fibroblasten gebildet. Diese liegen oft in der Nachbarschaft von inflammatorischen Zellen [83]. Sowohl *Mmp8* als auch *Mmp9* und *Mmp19* werden nach SID verstärkt exprimiert. *Mmp8* besitzt eine 13-fach gesteigerte Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe und ist damit das am stärksten veränderte Gen zum 6-Stunden-Zeitpunkt. Auch schon zum 3-Stunden-Zeitpunkt ist dessen Genexpression um das 6,4-fache erhöht und somit dasjenige Gen mit dem stärksten Anstieg. Durch diesen starken Anstieg der Expression und damit vermutlich auch der Proteinsynthese von MMP8 verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Reparatur und Strukturzerstörung hin zu den destruirenden Prozessen. MMP8 ist daher ein guter Parameter, der eine überschießende Reaktion des Immunsystems beschreibt.

Neutrophile Granulozyten können durch Apoptose reguliert werden. In einem humanen Modell konnte gezeigt werden, dass der 55kDa TNFR1A in Neutrophilen proapoptotische Wirkung besitzt [84]. Nach SID wird *Tnfrsf1a* verstärkt exprimiert. Der Ligand des TNF-Rezeptors, TNF $\alpha$ , besitzt ebenfalls eine wichtige Bedeutung im afferenten Schenkel des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs, wie oben beschrieben.

Fc $\gamma$ RIIIa ist beim Menschen ein Rezeptor, wichtig für Entzündungsprozesse, die vor allem von Neutrophilen initiiert werden, wie z. B. Degranulation und Bildung von reaktiven

Sauerstoffspezies. Aber auch in der Aktivierung von B-Zellen und Dendritischen Zellen spielt er eine wichtige Rolle. Dabei stellt dieser Rezeptor eine wichtige Schnittstelle zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort dar, da er freies IgG bindet und dadurch Immunzellen über den humoralen Status informiert [85]. In der Maus werden *Fcgr3* und *Fcgr4* nach SID induziert. Diese Veränderung in der Genexpression könnte damit einen wichtigen Faktor zur Stärkung der afferenten Funktionen im cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg darstellen

Der Chemokin-Rezeptor CCR1 steht ebenfalls unter dem Einfluss von IL10. Li et al. konnten zeigen, dass IL10 die GM-CSF-induzierte CCR1-Protein-Expression in humanen Zellen unterstützt. Die Induktion von *Ccr1* zeigt auch an dieser Stelle eine verbesserte Funktionsfähigkeit der Immunabwehr.

Hauptsächlich auf Makrophagen und Dendritischen Zellen wird der „Macrophage scavenger receptor“ exprimiert. Als sogenannter „pattern recognition receptor“ dient er dazu, konservierte Strukturen von Bakterien zu erkennen und daraufhin die Phagozytose einzuleiten. Damit ist dieser Rezeptor zur Erfüllung der Immunfunktion von Makrophagen wichtig [86]. *Msr1*-mRNA liegt nach SID 2,7-fach verstärkt vor und stärkt somit vermutlich ebenfalls die angeborene Abwehr und die vagalen Afferenzen.

Das S10A8-Protein ist ein Botenstoff, der bei der Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen eine wichtige Rolle spielt [87]. Inflammatorische Signale, wie LPS, IFN $\gamma$  oder TNF können in Makrophagen S10A8 induzieren [88]. Nach SID wurde *S100a8* stark induziert. Auch dieses Resultat unterstreicht einmal mehr die deutlich verstärkte Expression von Genen der angeborenen Abwehr.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dem verstärkten Vorliegen von mRNA von Genen der unspezifischen Immunantwort besondere Bedeutung zukommt. Hier sind einige verschiedene Gene induziert, die für PRR codieren. Damit setzt sich die Tendenz des Untersuchungszeitpunktes drei Stunden nach SID fort, zu dem bereits auch einige Gene der unspezifischen Immunantwort vermehrt exprimiert wurden. Da der Nervus vagus (welcher in der hier untersuchten Versuchsgruppe intakt ist) in seinen Afferenzen auf diese Bestandteile der unspezifischen Immunantwort angewiesen ist, führt diese Steigerung der Expression eventuell auch zu einem besseren Ansprechen der vagalen Effektorfunktionen, nämlich der

Limitation von Entzündungsreaktionen. Gleichzeitig existiert ein verändertes Expressionsmuster von Genen, das der adaptiven Immunabwehr zuzuordnen ist. Hier kann sowohl zum Explantationszeitpunkt drei Stunden als auch sechs Stunden nach SID eine Repression beobachtet werden. Möglicherweise ist diese Repression bereits die Folge der Effektorfunktion des Nervus vagus: Sensibilisiert durch die Induktion von Genen der angeborenen Immunantwort greift der Nervus vagus damit gezielt in den Ablauf der adaptiven Immunabwehr ein und hemmt sie.

Vergleich der Expression von Genen der adaptiven und angeborenen Immunantwort

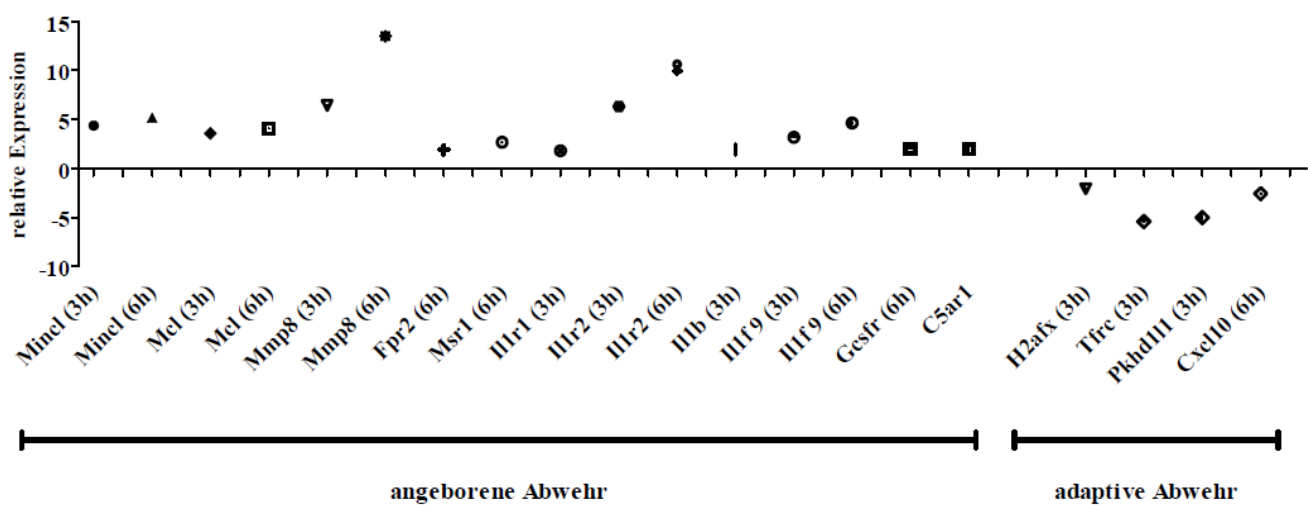


Abbildung 25:

Gegenüberstellung von Genen der adaptiven und angeborenen Immunantwort

Es ist eine Auswahl von Genen dargestellt. In Klammern hinter den Genen steht die Versuchsgruppe. 3h steht für die Gruppe „3h SID vs. Kontrolle“, 6h steht für die Versuchsgruppe „6h SID vs. Kontrolle“. Die Gene, die der adaptiven Abwehr zuzuordnen sind, werden vermindert exprimiert. Viele Gene der angeborenen Abwehr werden verstärkt exprimiert.

### 5.3.2.2 Limitation von Entzündungsreaktionen

Nach 6 Stunden liegt außerdem *Socs3* verändert vor. Dessen Produkt greift in die Regulation vieler unterschiedlicher Botenstoffe ein. So ist es Bestandteil des Signalwegs des IL10-Rezeptors. Dessen Signal wird von der Zelloberfläche in den Nukleus über eine Kaskade geleitet, die JAK1 und STAT3 enthalten. SOCS3 hemmt direkt JAK1 und entfaltet darüber seine Wirkung [89]. Darüber hinaus inhibiert SOCS3 die Signalkaskade von IL6 [90].

Außerdem hemmt SOCS3 die GCSF-Wirkung in Neutrophilen [91]. Somit besitzt auch diese Veränderung in der Genexpression eine immunsupprimierende Komponente.

Ein weiteres Beispiel dafür ist das Genexpressionsmuster von IL1R2. Dies ist ein Rezeptor, der bei Mäusen vor allem auf Neutrophilen Granulozyten vertreten ist und dessen Genexpression nach SID gesteigert ist. Dieser Rezeptor dämmt die inflammatorische Wirkung von IL1 ein, indem er IL1 $\beta$  bindet und diesen Botenstoff somit aus der Zirkulation entfernt oder indem er IL1AP bindet [92]. IL1AP ist ein essentieller Teil der Signalkette des IL1R1 und damit ein inflammatorisches Enzym [93]. IL1R2 hemmt daher sowohl IL1 $\beta$  direkt als auch indirekt über Hemmung von Teilen des IL1 Rezeptors (IL1AP).

Martin et al. konnten zeigen, dass IL1R2 in myeloiden Zellen nach Glucocorticoid-Applikation verstärkt auf der Zellmembran zu finden war. Auch dessen mRNA wurde verstärkt exprimiert. Dies unterstreicht die antiinflammatorische Wirkung von IL1R2. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass Neutrophile, die IL1R2 exprimiert hatten, in Bereiche von experimentell induzierter Peritonitis einwanderten, um dort ihre antiinflammatorische Wirkung zu entfalten [94]. In den vorliegenden Daten zeigt sich, dass nach SID die Genexpression von *Il1r2* extrem stark gestiegen ist (10,3-fach). Während sich die Expression von Genen, deren Produkte im Signalweg der Granulozyten-Adhäsion und Diapedese eine Rolle spielen, nur im niedrigen einstelligen Bereich bewegt, steigt die des *Il1r2* im Vergleich zur Kontrollgruppe um das Zehnfache an. Außerdem verändert sich die Genexpression von *Il1r2* bereits zum 3-Stunden-Zeitpunkt und ist dort mit einem Anstieg um das 6,35-fache das Gen mit der zweitstärksten Induktion.

Ein weiteres Gen, welches sich nach SID verändert, codiert für CXL10. Dieses Chemokin wird konstitutiv im Milz-Stroma exprimiert (mRNA und Protein) [95]. IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  können eine starke Expression von *Cxcl10* in Neutrophilen generieren. Dieses Zytokin besitzt eine wichtige Rolle in der Reifung und Funktion von T-Effektor-Zellen. *Cxcl10*-defiziente Mäuse zeigen eine beeinträchtigte T-Zell-Reaktion [96]. 6 Stunden nach SID ist die Genexpression von *Cxcl10* in Splenozyten um das 2,5-fache verringert. Dies könnte phänotypisch zu einer beeinträchtigten erworbenen Immunantwort führen - eine Tendenz, die sich auch in der Expression einiger zuvor genannter Gene widerspiegelt.

FACS-Daten aus unserer Arbeitsgruppe belegen, dass Immunzellen einen Tag nach SID aus der Milz in den Darm einwandern. Gleichzeitig kann mit den Genexpressionsdaten belegt werden, dass antiinflammatorische Gene zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach SID induziert

werden. Fügt man diese beiden Erkenntnisse in ein Modell zusammen, zeigt sich, dass die Immunzellen initial mit einem antiinflammatorischen Potential ausgestattet werden, um dann einige Stunden später in die vom Trauma geschädigten Areale einzuwandern. Dort können sie dann ein immunsupprimiertes Milieu schaffen. Damit können die Genexpressionsdaten die in der Literatur beschriebene Immunsuppression nach Trauma bestätigen und gleichzeitig einen molekularen Ansatz liefern, welcher die Ursache dieser Suppression darstellt.

Zusammenfassend für den 6-Stunden-Zeitpunkt nach SID (bei intaktem Nervus vagus) unter Berücksichtigung der beiden Unterkapitel 5.3.2.1 und 5.3.2.2 lässt sich sagen, dass sich die Expression einiger Gene verändert, deren codierte Proteine im „cholinergen antiinflammatorischen Signalweg“ eine wichtige Rolle spielen. Dabei werden sowohl proentzündliche sowie anti-inflammatorische Gene induziert. Eine gesteigerte Aktivierbarkeit und Funktion bei gleichzeitig erhöhter Sensibilität für inaktivierende und apoptotische Signale könnte insgesamt zu einer besser steuerbaren Homöostase während einer Entzündung führen. Durch die gesteigerte Sensibilität in der Detektion von Pathogenen im afferenten Schenkel des cholinergen antiinflammatorischen Signalweges ist der Organismus schneller in der Lage, auf Schäden zu reagieren. Durch eine gleichzeitig gesteigerte Expression von proapoptischen und antiinflammatorischen Genen kommt es möglicherweise zu einer gleichzeitigen Limitation der Immunantwort, die den Organismus vor Schäden durch eine zu starke Inflammation schützt.

### **5.3.3 Auswirkungen der Vagotomie auf die Genexpression nach Trauma**

#### **5.3.3.1 Veränderungen 3 Stunden nach SID mit Vagotomie im Vergleich zur Kontrollgruppe**

Im cholinergen Signalweg ist der N. vagus als wichtiger Bestandteil integriert. Ziel der Arbeit ist es, dessen Auswirkungen auf den anti-inflammatorischen Reflex zu untersuchen. Um die Auswirkungen einer Vagotomie auf die Genexpression beurteilen zu können, wurde eine Vagotomie mit anschließender SID verglichen mit einer SHAM-Vagotomie (intakter Vagus) mit anschließender SID (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID). Die Explantation erfolgte hier 3 Stunden nach SID bzw. SHAM-SID.

Ein Signalweg, in dem sich die Expression einiger Gene von beteiligten Proteinen zum hier beschriebenen Zeitpunkt verändert hat, ist der der Entstehung von Multipler Sklerose. Dort werden sowohl das Gen, welches für CCR5 als auch das Gen, welches für seinen Liganden, CCL5, codiert, vermindert exprimiert. CCR5 wird von T-Zellen und Monozyten exprimiert und CCL5 ist in chronischen Entzündungsherden wie Multipler Sklerose zu finden. CCR5-Liganden besitzen chemotaktische Eigenschaften und unterstützen die T-Zell-Migration zu diesen Herden [97]. Die Milz von CCR5-defizienten Mäusen enthält weniger NK-Zellen. Dies zeigt, dass auch Natürliche Killerzellen diesen Rezeptor für die Ausführung ihrer Funktion benötigen [98]. Ubogu et al. konnten an einem in vitro-Modell zeigen, dass nach CCL5-vermittelter T-Zell- und Monozyten-Migration die CCR5-Oberflächendichte herab reguliert wird [99]. 3 Stunden nach SID mit Vagotomie wird von Splenozyten ebenfalls vermindert *Ccl5*- und *Ccr5*-mRNA exprimiert. Eine Vagotomie ist damit möglicherweise in der Lage, eine chronische Entzündung auf Genebene abzuschwächen.

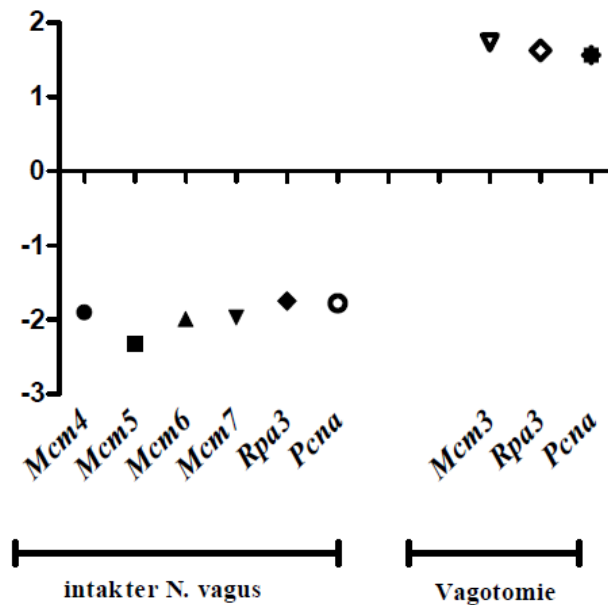
Auch auf die DNA-Replikation hat eine Vagotomie zum hier beschriebenen Zeitpunkt Auswirkungen. Es verändert sich *Mcm3*, ein Gen, dessen Produkt unter anderem zur Formierung des sogenannten „pre-replication complex“, einer Vorstufe des finalen Replikationskomplexes, benötigt wird. Wie in Gliederungspunkt 5.3.1.1 beschrieben, sind aus dieser Gruppe der *Mcm* („minichromosome maintenance complex components“) auch einige Gene in der Versuchsgruppe verändert, die einen intakten N. vagus aufweist (3 Stunden nach „SID vs. Kontrolle“).

Zur Bildung des finalen Replikationskomplexes ist RPA3 erforderlich. Auch *Rpa3* zeigt signifikante Veränderungen sowohl in der hier besprochenen Gruppe (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) als auch in der Gruppe 3 Stunden nach „SID vs. Kontrolle“, also in der Gruppe mit intaktem Nervus vagus.

In diesen beiden Versuchsgruppen ist ebenfalls das „proliferating cell nuclear antigen“ (*Pcna*) verändert, dessen Produkt ein multifunktionales Enzym ist, das Einfluss auf die DNA-Replikation- und Reparatur, den Zellzyklus und den Kondensierungsgrad von Chromatin hat [100]. Es zeigt sich aber ein diametraler Unterschied zwischen der hier besprochenen Gruppe (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) und der Gruppe mit intaktem Nervus vagus „SID vs. Kontrolle“. Obwohl die Explantation der Organe bei beiden Gruppen nach 3 Stunden erfolgte, gibt es einen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen, bestehend in der Art der Expression. In der Gruppe, welche die Vagotomie-Effekte darstellt, werden *Mcm3*, *Rpa3* und *Pcna* induziert, während sie 3 Stunden nach „SID vs. Kontrolle“ reprimiert werden. Die

Gruppe „SID vs. Kontrolle“ zeigt die Veränderungen auf Transkriptebene bei intaktem Nervus vagus. Ein Trauma im Kontext einer vorher durchgeführten Vagotomie scheint demnach auf Ebene der Genexpression die gegenteilige Wirkung zu haben als eine reine SID-OP bei intaktem Vagus. Nach alleiniger SID sind diejenigen Gene reprimiert, welche in der Gruppe nach Vagotomie mit SID verstärkt exprimiert werden. Dies bestätigt zum einen die supprimierende Funktion des Nervus vagus im cholinergen antiinflammatorischen Signalweg, welche zu einer Immunsuppression führt. Zum anderen zeigen diese Ergebnisse, dass eine Unterbindung der vagalen Effektorfunktionen diese Suppression aufheben kann.

**Expression von Gene der DNA-Replikation in Abhängigkeit von der Intaktheit des Nervus vagus**



**Abbildung 26:** Die Gene der DNA-Replikation werden in Abhängigkeit von der Intaktheit des Nervus vagus unterschiedlich exprimiert

Die Versuchsgruppe SID vs. Kontrolle zum Explantationszeitpunkt 3 Stunden zeigt die Genexpression bei intaktem Nervus vagus. Hier werden die Gene der DNA-Replikation reprimiert. Die Versuchsgruppe zum Zeitpunkt 3 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie im Vergleich zur Kontrollgruppe (SHAM-Vagotomie und SID) zeigt eine gegenteilige, induzierte Expression.

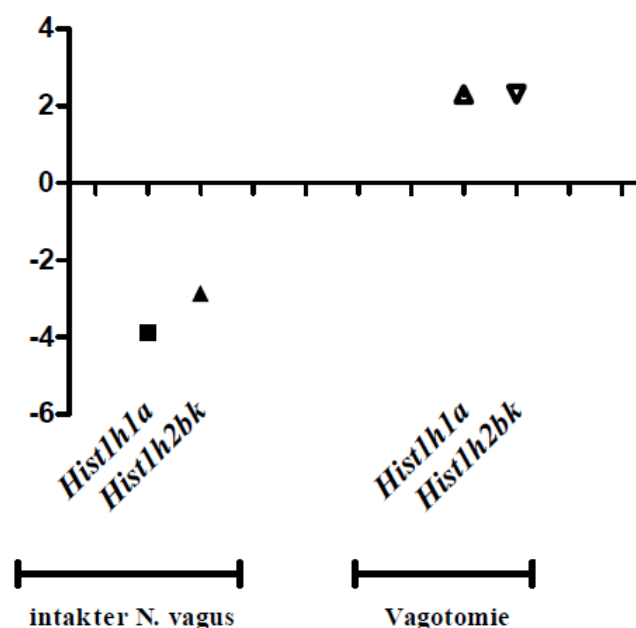
### 5.3.3.1.1 Einfluss des Nervus vagus auf die Expression von Histonen und die Myeloperoxidase

Neben der Expression von Genen, die in die Replikation involviert sind, verändert sich 3 Stunden nach Vagotomie die Expression zweier Gene, die für verschiedene Typen von Histonen codieren.

Histone der 2B-Gruppe haben neben Chromatin-ordnenden Eigenschaften auch wichtige Funktionen in Entzündungsprozessen. Sie stellen Plasminogen-Rezeptoren auf Makrophagen dar, über welche die Zell-Migration gesteuert wird [101].

*Hist1h1a* codiert für das Histon H1.1 und gehört zur Gruppe der Linker-Histone, welche den Histon-Komplex an bestimmte Stellen der DNA binden [102]. Genauso wie bei den Genen der Replikation kann auch bei den Histonen zum Explantationszeitpunkt 3 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) ein gegenteiliges Genexpressionsmuster beobachtet werden als 3 Stunden nach SID vs. Kontrolle. Während sich nach Vagotomie die Genexpression jeweils verdoppelt, wird sie in der Gruppe „SID versus Kontrolle“ um das ca. 3 bis 4-fache reprimiert. Daher scheint auch bei den Histonen eine Vagotomie gegenteilige Auswirkungen auf die Genexpression zu haben als eine reine SID-Operation, bei welcher der Nervus vagus intakt ist. Dies geht einher mit den oben genannten Erkenntnissen im Bereich der DNA-Replikation.

#### Genexpression von Histonen in Abhängigkeit von der Intaktheit des Nervus vagus



**Abbildung 27:** Die Gene zweier Typen von Histonen werden im Kontext eines intakten Vagus und einer Vagotomie gegenteilig exprimiert.

Die Myeloperoxidase produziert in Phagosomen von Neutrophilen Granulozyten reaktive Moleküle, um so den endozytierten Inhalt abzutöten. In der Entstehung zahlreicher Pathologien ist dieses Enzym auch involviert, da seine Produkte außerhalb der Zelle zu Gewebeschädigungen führen können [103]. 3 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie sinkt die Genexpression um das 2,68-fache, 6 Stunden nach SID mit Vagotomie sogar um das 2,95-fache. Damit besitzt eine Vagotomie hier ambivalente Auswirkungen auf den Status des postoperativen Immunsystems. Auf der einen Seite wird durch die reprimierte Genexpression die Potenz der Phagozytose von Neutrophilen möglicherweise verringert. Auf der anderen Seite führt dies konsekutiv zu einer geringeren kumulativen Belastung des Gewebes durch frei werdende Enzyme. So ist der Benefit dieser Art von Regulation schwer zu determinieren.

#### **5.3.3.1.2 Einfluss auf die Expression von Lactoferrin**

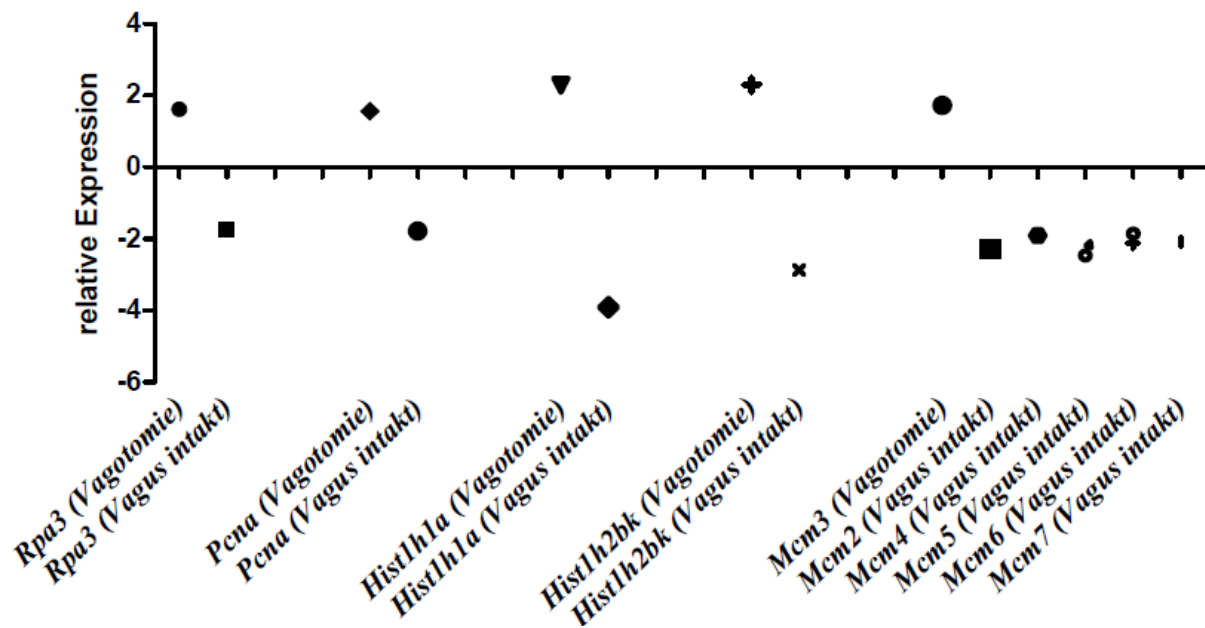
Lactoferrin ist Teil der angeborenen Immunantwort und wird von Neutrophilen produziert. Es erkennt PAMPs von eindringenden Bakterien und kann die Migration von Immunzellen beeinflussen [104]. Das codierende Gen ist zum Explantationszeitpunkt 3 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) reprimiert und ein Zeichen dafür, dass auch nach Vagotomie einige Komponenten des Immunsystems eine Paralyse aufweisen.

Zusammenfassend für die Auswirkungen der Vagotomie zum Explantationszeitpunkt 3 Stunden nach SID lässt sich sagen, dass eine Vagotomie auf Transkriptebene bei bestimmten Genen eine komplett gegenteilige Expression induziert als sie nach alleiniger SID der Fall ist. Alle Gene, die sich sowohl in der Gruppe „VGX+SID vs. SHAM VGX+SID“ als auch in der Versuchsgruppe nach SID (bei intaktem Nervus vagus) signifikant verändern, werden immer gegenteilig exprimiert. Während sie in der Gruppe, welche die Effekte einer Vagotomie darstellt, induziert werden, werden sie nach alleiniger SID vermindert exprimiert. Betrachtet man isoliert nur diese Gene, welche sich in den beiden Versuchsgruppen diametral gegenüberstehen, lässt sich in der Gruppe „SID vs. Kontrolle“ eine Immunparalyse beobachten, die nach SID mit vorangegangener Vagotomie aufgehoben ist: Nach SID werden viele Gene in Splenozyten reprimiert, die in die DNA-Replikation und Reparatur, sowie in die Zellzyklus-Kontrolle eingreifen. Diese Erkenntnis bestätigt die bereits veröffentlichten Daten von Menges et al., die eine Immunsuppression nach SID beschrieben haben [1]. Zum selben Zeitpunkt nach SID mit vorangegangener Vagotomie erfolgt eine deutlich gesteigerte

Expression der entsprechenden Gene. Eine Vagotomie scheint damit ein probates Mittel zu sein, die traumatischen Auswirkungen einer OP auf den Organismus auf Ebene der Genexpression abzuschirmen. Übertragen auf den klinischen Alltag bedeutet dies, dass eine medikamentöse Blockade des Nervus vagus in der postoperativen Phase möglicherweise die Prognose von Patienten verbessern kann. Gegenstand weiterer geplanter Untersuchungen ist die Frage, ob der Vagus auch auf Proteinebene eine “restitutio ad integrum“ bewirken kann.

Borovikova et al. konnten zeigen, dass eine elektrische Stimulation des zuvor durchtrennten N. vagus inhibitorische Effekte auf das Immunsystem hat. So wurde die LPS-induzierte Synthese des Zytokins TNF signifikant vermindert, was einer Immunparalyse gleich kommt [9]. Auch in einer SHAM-Gruppe mit intaktem Nerven war diese verminderte Stimulierbarkeit zu beobachten, im Gegensatz zu der Vagotomie-Gruppe. Nach Vagotomie war die Stimulierbarkeit auf einen LPS-Reiz hin signifikant erhöht. So konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass ein intakter Nervus vagus zu einem verminderten Ansprechen des Immunsystems auf LPS führt und eine Vagotomie diese Immunsuppression löst. In der vorliegenden Analyse der Genexpression kann die Gruppe „SID vs. Kontrolle“ mit der SHAM-Gruppe bzw. der Gruppe „VGX+STIM“ aus der Untersuchung von Borovikova et al. verglichen werden, da hier jeweils der N. vagus intakt ist bzw. die Intaktheit simuliert wird. Auch auf der Ebene der Genexpressionsanalyse wird nun deutlich, dass ein intakter Vagus in der Gruppe „SID vs. Kontrolle“ zu einer verminderten Expression von einigen Genen führt. Die gegenteilige Maßnahme, eine Vagotomie, führt - wie von Borovikova beschrieben - zu gegenteiligen Expressionsmustern, nämlich einem Anstieg von den Zytokinen, die nach SID vermindert exprimiert werden. Damit können mit den hier vorliegenden Daten die Forschungsergebnisse von Borovikova et al. - wenn auch indirekt - bestätigt werden.

### Gegenüberstellung der gegenteilig exprimierten Gene



**Abbildung 28:**

Gegenüberstellung der gegenteilig exprimierten Gene zum Explantationszeitpunkt 3h nach SID.

Verglichen wird jeweils die Expression nach Vagotomie und bei intaktem N. vagus. Es zeigt sich ein gegenteiliges Expressionsmuster.

#### 5.3.4 Postoperative Immunsuppression in Abhängigkeit vom Nervus vagus zum Explantationszeitpunkt 6 Stunden nach SID

6 Stunden nach SID mit vorangegangener Vagotomie (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) erfährt *Ctsg* die stärkste Repression (-3,49-fach). Es codiert für das Enzym Kathepsin G. Diese Serinprotease kommt in den Granula Neutrophiler Granulozyten vor und ist für das intrazelluläre und extrazelluläre Abtöten von Mikroorganismen zuständig. Außerdem degradiert sie Bestandteile der extrazellulären Matrix [105]. Des Weiteren ist sie in die Regulierung der sie enthaltenen Neutrophilen eingebunden, indem sie die Exozytose von Agonisten des FPR beeinflusst [106]. Darüber hinaus ist diese Protease wichtig für die Adhäsion von Leukozyten an Arterienwänden [107].

Auch das Gen der Serinprotease PR3 weist 6 Stunden nach SID und Vagotomie eine verminderte Genexpression auf. PR3 kommt im Zytosol von Neutrophilen vor und ist involviert in die Einleitung der Apoptose in alternden Neutrophilen. Loison et al. stellten fest,

dass Neutrophile Granulozyten, denen PR3 fehlt, einen verlangsamten Zelltod aufwiesen [108]. Unklar bleiben an dieser Stelle die Auswirkungen dieser Anpassung auf das Immunsystem des Individuums. Quantitativ weniger PR3 könnte durch die verlangsamte Apoptose zu einer gesteigerten Zahl zirkulierender Neutrophilen führen. Dabei wird allerdings ein gesteigertes Alter der Zellen in Kauf genommen, was möglicherweise zu einer beeinträchtigten Funktionalität führt.

Es zeigt sich deutlich, dass zum Analysezeitpunkt 6 Stunden die Gene einiger Enzyme der angeborenen Immunabwehr in ihrer Genexpression reprimiert werden. Über die Hälfte derjenigen Gene, welche zu dem hier besprochenen Zeitpunkt vermindert exprimiert werden, spielen in Form ihres Genprodukts eine Rolle im Stoffwechsel von Neutrophilen Granulozyten. Somit ist hiermit ein wichtiges Standbein der angeborenen Immunantwort betroffen. Über diese Repression kann man darauf schließen, dass auch die Funktionalität der betroffenen Zellen massiv eingeschränkt ist.

Neben den für Neutrophile Granulozyten spezifischen Genen werden einige weitere Gene mit anderen Funktionen vermindert exprimiert:

- So besitzt MS4A3 im Menschen Auswirkungen auf CDK2 und den G0/G1-Übergang [109]. *Ms4a3* wird in vielen Zellen der Hämatopoese exprimiert. Im Gegensatz dazu wird dieses Molekül in der Maus nur in wenigen Geweben wie der Milz gefunden und als möglicherweise Monozyten-spezifisch beschrieben [110].

- Platelet factor 4 ist bekannt aus der hämatologischen Forschung. So können spezifische Antikörper gegen PLF4/Heparin-Komplexe eine „Heparin-induzierte Thrombozytopenie“ (HIT) auslösen [111].

Im Gegensatz zu diesen Genen, die reprimiert wurden, existiert zum Explantationszeitpunkt 6 Stunden nur ein Gen, welches induziert wurde. Dieses codiert für die schwere Kette eines Immunglobulins. Immunglobuline sind die klassischen Bestandteile der adaptiven Immunreaktion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man in den Daten zum Explantationszeitpunkt 6 Stunden nach SID im Kontext einer Vagotomie (VGX+SID vs. SHAM VGX+SID) eine differenzierte Genexpression beobachten kann. Gene der angeborenen Immunantwort, wie beispielsweise in Neutrophilen Granulozyten, werden vermindert exprimiert, während das reprimierte Gen zu der Domäne der erworbenen Immunität gehört. Somit zeigt sich auch an dieser Stelle eine gegenteilige Expression in den Gruppen mit Vagotomie und in denen mit intaktem N. vagus. In den Gruppen mit intaktem Nerven und alleiniger SID-Operation konnte eine vermehrte Expression von Genen der angeborenen Abwehr und eine Repression von Genen der adaptiven Abwehr gezeigt werden. In der Gruppe 6 Stunden nach SID mit Vagotomie verhält sich dieses Expressionsmuster genau gegenteilig.

Es kann hiermit auf Transkriptebene bewiesen werden, dass die Vagotomie eine gegenteilige Expression hervorruft als eine Genexpression nach Trauma bei intaktem Nerven. Außerdem kann die These von Borovikova et al. bewiesen werden, dass eine Vagotomie die supprimierenden Effekte eines operativen Traumas aufhebt. Zusätzlich werden auf den verschiedenen Ebenen der Zellphysiologie Anpassungsmechanismen aufgedeckt, die auf ein operatives Trauma hin ausgelöst werden und Effekte benannt, die durch eine Vagotomie hervorgerufen werden.

## 6. Fazit

Die hier vorgestellten Ergebnisse der Transkriptomanalysen sind in der Lage, das Gebiet der postoperativen Immunsuppression auf vielfältige Art und Weise neu zu beleuchten. So konnten auf drei Ebenen neue Erkenntnisse gewonnen werden: Zu Beginn wurden die Auswirkungen der SID-Operation (Modell „Surgically-induced Immune Dysfunction“) auf den Zytokinspiegel im Plasma der Mäuse analysiert und dabei vertiefende Erkenntnisse gewonnen. Danach erfolgte die eigentliche Transkriptomanalyse. Dabei wurde zunächst die SID auf Transkriptomebene näher charakterisiert und anschließend der Einfluss der Vagotomie untersucht.

Die erste Ebene bestand in der Analyse des Zytokins IL6 im Plasma. Diese ist in der Lage, die bisherigen Daten zu ergänzen, indem bereits nach drei Stunden eine massive Zytokinausschüttung gezeigt werden konnte. Durch die simultane Untersuchung dieses Vorgangs auf Transkriptebene wurde eine neue Erkenntnisebene geschaffen, da die Splenozyten als Ursache dieses Zytokin-Anstiegs ausgemacht werden konnten.

Als nächster Schritt erfolgte die Analyse auf Transkriptebene. Hier konnten zunächst die Auswirkungen eines operativen Traumas bei intaktem Nervus vagus auf das murine Transkriptom der Milz gezeigt werden. So wurde die DNA-Replikation der Splenozyten reprimiert und es erfolgte ein „shift“ der Reparaturmechanismen hin zu dem „non-homologous end joining“ Prozess. Darüber hinaus wurde die Progression des Zellzyklus von der G2 zur Mitose-Phase verlangsamt, wodurch diese Reparaturmechanismen mehr Zeit bekommen. Eine weitere Anpassung an das operative Trauma war die Induktion von Genen von Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr. Es zeigte sich, dass im Zuge eines Traumas auf Transkriptebene verstärkt Prozesse ablaufen, die es den betroffenen Geweben ermöglichen, besser auf die erworbenen Schäden zu reagieren, um eine möglichst schnelle „restitutio ad integrum“ zu erreichen. Außerdem konnte mit diesen Ergebnissen eine molekulare Erklärung für die bisherigen Resultate unserer Arbeitsgruppe gefunden werden, die besagen, dass Zellen der adaptiven Immunabwehr aus der Milz in die geschädigten Areale des Darms einwandern. Diese Beobachtungen konnten mit den Daten der Microarray-Analysen untermauert werden.

Die dritte Ebene bestand in der Analyse der Rolle des Nervus vagus in der postoperativen Immunsuppression. Hierzu wurde die Genexpression von operierten Mäusen mit Vagotomie mit einer Gruppe von Mäusen mit intaktem Nervus vagus verglichen. Es zeigte sich, dass viele Gene im Kontext eines intakten Nervus vagus reprimiert wurden, während eben diese Gene nach einer Vagotomie verstärkt exprimiert wurden. Diese Repression beschreibt die Immunsuppression eines Organismus. Die veränderte Genexpression nach Vagotomie unterstützte die bereits postulierte These, dass eine solche Ausschaltung vagaler Funktionen den immunsupprimierten Status nach einer OP aufhebt.

Mit diesen Ergebnissen konnten die Folgen einer postoperativen Immunsuppression auf Transkriptomebene der Maus näher charakterisiert werden. Zusätzlich wurde aufgezeigt, welche bedeutende Rolle der N. vagus im Themengebiet der postoperativen Immunsuppression bei der Beeinflussung der Genexpression einnimmt.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
<i>Arg2</i>	Arginase type II
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
<i>Blm</i>	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
<i>Brca</i>	Breast Cancer
<i>C5ar1</i>	Complement component 5a receptor 1
CAIP	Cholinergic anti-inflammatory pathway
CBA	Cytometric bead array
<i>Cbx5</i>	Chromobox 5
<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5
<i>Ccl9</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 9
<i>Ccr1</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 1
<i>Ccr5</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 5
<i>Cdc</i>	Cell division cycle
<i>Cdk</i>	Cyclin-dependent kinase
ChAT	Choline acetyltransferase
<i>Chek</i>	Checkpoint kinase
<i>Clec4d</i>	C-type lectin domain family 4, member d
<i>Clec4e</i>	C-type lectin domain family 4, member e
CLP	Cecal Ligation and Puncture
<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<i>Cxcr2</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
DSB	Double-strand break
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Forwardscatter
FcγRIIa	Fc fragment of IgG receptor IIa
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
<i>Fpr2</i>	Formyl peptide receptor 2
<i>Gadd45g</i>	Growth arrest and DNA damage inducible gamma
GCSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GCSFR	Colony stimulating factor 3 receptor
<i>H2afx</i>	Histone 2A family member X
HDR	Homology directed repair
<i>Hist1h1a</i>	Histone cluster 1, H1a
<i>Hist1h2bk</i>	Histone cluster 1, H2bk
HLA-DR	Human leucocyte antigen, Isotyp DR
<i>Hmgb1</i>	High mobility group box 1 protein
HP1	Heterochromatin protein 1
IFN	Interferon
IKK	IκB kinases
IL	Interleukin
<i>Il18rap</i>	Interleukin 18 receptor accessory protein
<i>Il1r2</i>	Interleukin 1 receptor, type II
<i>Il1rap</i>	Interleukin 1 receptor accessory protein
IMM	Intestinal manipulation model
IPA	Ingenuity pathway analysis

IκB	Inhibitors of NF-κB
JAK2	Janus Kinase 2
KAP1	KRAB-associated protein 1
<i>Klrg1</i>	Killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1
LPS	Lipopolysaccharid
<i>Ly6g</i>	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
<i>Mcm</i>	Minichromosome maintenance complex components
<i>Mmp</i>	Matrix Metallopeptidasen
MOF	Multiple organ failure
mRNA	Messenger ribonucleic acid
<i>Ms4a3</i>	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3
<i>Msr1</i>	Macrophage scavenger receptor 1
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHEJ	Non-homologous end joining
<i>Orc</i>	Origin recognition complex
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
<i>Pcna</i>	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
<i>Pdgfra</i>	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
<i>Pdk4</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
<i>Pf4</i>	Platelet factor 4
<i>Pkhd11l</i>	Polycystic kidney and hepatic disease 1-like 1
PKR	Double stranded RNA dependent kinase
Pre-RC	Pre- replication complex
PRR	Pattern recognition receptor
<i>Rad51</i>	Rekombinase RAD51
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
<i>Retnlg</i>	Resistin like gamma
<i>Rpa</i>	Replication protein
<i>S100a8</i>	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
SID	Surgically induced immune dysfunction
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
<i>Smc2</i>	Structural maintenance of chromosome 2
<i>Socs3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3
SSC	Sidescatter
<i>Star</i>	Steroidogenic acute regulatory protein
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TCR	T cell receptor
<i>Tfrc</i>	Transferrin receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
USP	United States Pharmacopeia
VGX	Vagotomie
VNS	Vagus nerve stimulation
α7nACh R.	Alpha 7 nikotinerger Acetylcholin Rezeptor

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Menges P, Kessler W, Kloecker C et al. Surgical trauma and postoperative immune dysfunction. *Eur Surg Res* 2012; 48: 180–186
- 2 Albertsmeier M, Prix NJ, Winter H et al. Monocyte-dependent Suppression of T-cell Function in Postoperative Patients and Abdominal Sepsis. *Shock* 2017; Publish Ahead of Print
- 3 Gryglewski A, Szczepanik M. The Effect of Surgical Stress on Postoperative Talpha and Tgamma Cell Distribution. *Immunological investigations* 2017; 46: 481–489
- 4 Koerner P, Busemann A, Traeger T et al. Postoperative immune suppression in visceral surgery: characterisation of an intestinal mouse model. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes* 2011; 47: 260–266
- 5 Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL et al. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Annals of surgery* 1998; 228: 652–663
- 6 Stahel PF, Smith WR, Moore EE. Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma. *Injury* 2007; 38: 1409–1422
- 7 Hogan BV, Peter MB, Shenoy HG et al. Surgery induced immunosuppression. *Surgeon* 2011; 9: 38–43
- 8 Maier S, Traeger T, Westerholt A et al. Special aspects of abdominal sepsis. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2005; 76: 829–836
- 9 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458–462
- 10 Tracey KJ. Understanding immunity requires more than immunology. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 561–564
- 11 Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1–5
- 12 Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 170–178
- 13 Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: 24
- 14 Lu B, Wang H, Andersson U et al. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. *Protein Cell* 2013; 4: 163–167
- 15 Lu B, Antoine DJ, Kwan K et al. JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 3068–3073
- 16 Lu B, Nakamura T, Inouye K et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 2012; 488: 670–674
- 17 Novotny AR, Reim D, Assfalg V et al. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology* 2012; 217: 616–621
- 18 Wang H, Liao H, Ochani M et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 2004; 10: 1216–1221
- 19 Goehler LE, Relton JK, Dripps D et al. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res. Bull.* 1997; 43: 357–364
- 20 Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT et al. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci* 1999; 19: 2799–2806

- 21 *Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK et al.* Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neurosci* 2000; 85: 49–59
- 22 *Tracey KJ.* The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853–859
- 23 *Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M et al.* Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2006; 203: 1623–1628
- 24 *Vida G, Pena G, Deitch EA et al.* alpha7-cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. *J Immunol* 2011; 186: 4340–4346
- 25 *Downs AM, Bond CE, Hoover DB.* Localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mRNA and protein within the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neuroscience* 2014; 266: 178–185
- 26 *Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR et al.* Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11008–11013
- 27 *Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M et al.* Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 2011; 334: 98–101
- 28 *Bratton BO, Martelli D, McKinley MJ et al.* Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. *Experimental physiology* 2012; 97: 1180–1185
- 29 *Martelli D, McKinley MJ, McAllen RM.* The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton Neurosci* 2014; 182: 65–69
- 30 *Izeboud CA, Mocking JA, Monshouwer M et al.* Participation of beta-adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. *Journal of receptor and signal transduction research* 1999; 19: 191–202
- 31 *Li Q, Verma IM.* NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 725–734
- 32 *Baez-Pagan CA, Delgado-Velez M, Lasalde-Dominicci JA.* Activation of the Macrophage alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* 2015
- 33 *Jonge WJ de, van der Zanden, Esmerij P, The FO et al.* Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005; 6: 844–851
- 34 *Peña G, Cai B, Liu J et al.* Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 2580–2589
- 35 *Pavlov VA, Tracey KJ.* The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 743–754
- 36 *Huston JM, Rosas-Ballina M, Xue X et al.* Cholinergic neural signals to the spleen down-regulate leukocyte trafficking via CD11b. *J Immunol* 2009; 183: 552–559
- 37 *Kessler W, Traeger T, Westerholt A et al.* The vagal nerve as a link between the nervous and immune system in the instance of polymicrobial sepsis. *Langenbeck's archives of surgery* 2006; 391: 83–87
- 38 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) 07/2010. TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol (4304449D)
- 39 *Schmittgen TD, Livak KJ.* Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101–1108
- 40 *Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D.* *Der Experimentator: Immunologie.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2014
- 41 *Yang H, Ochani M, Li J et al.* Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 296–301

- 42 Longbottom ER, Torrance HD, Owen HC et al. Features of Postoperative Immune Suppression Are Reversible With Interferon Gamma and Independent of Interleukin-6 Pathways. *Annals of surgery* 2016; 264: 370–377
- 43 Bell SP, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 1992; 357: 128–134
- 44 Sun J, Kong D. DNA replication origins, ORC/DNA interaction, and assembly of pre-replication complex in eukaryotes. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2010; 42: 433–439
- 45 Takeda DY, Shibata Y, Parvin JD et al. Recruitment of ORC or CDC6 to DNA is sufficient to create an artificial origin of replication in mammalian cells. *Genes & development* 2005; 19: 2827–2836
- 46 Bowers JL, Randell JCW, Chen S et al. ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Molecular cell* 2004; 16: 967–978
- 47 Manna PR, Stetson CL, Slominski AT et al. Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine* 2016; 51: 7–21
- 48 Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013; 14: 197–210
- 49 Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology* 2014; 6: 442–457
- 50 Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D et al. ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. *Molecular Cell* 2008; 31: 167–177
- 51 Auth T, Kunkel E, Grummt F. Interaction between HP1alpha and replication proteins in mammalian cells. *Experimental cell research* 2006; 312: 3349–3359
- 52 Losada A, Hirano T. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes & development* 2005; 19: 1269–1287
- 53 Hirota T, Gerlich D, Koch B et al. Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *Journal of cell science* 2004; 117: 6435–6445
- 54 Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenber AL et al. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* 2008; 27: 3977–3985
- 55 Zhang J, Willers H, Feng Z et al. Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 2004; 24: 708–718
- 56 Daley JM, Chiba T, Xue X et al. Multifaceted role of the Topo III $\alpha$ -RMI1-RMI2 complex and DNA2 in the BLM-dependent pathway of DNA break end resection. *Nucleic Acids Research* 2014; 42: 11083–11091
- 57 Cheok CF, Bachrati CZ, Chan KL et al. Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochemical Society Transactions* 2005; 33: 1456–1459
- 58 Yin B, Lee BS, Yang-Iott KS et al. Redundant and nonredundant functions of ATM and H2AX in alphabeta T-lineage lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2012; 189: 1372–1379
- 59 Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 8173–8178
- 60 Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 2007; 447: 951–958
- 61 Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20: 1803–1815
- 62 Chaturvedi. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway 1999; 18

- 63 Richardson MB, Williams SJ. MCL and Mincle: C-Type Lectin Receptors That Sense Damaged Self and Pathogen-Associated Molecular Patterns. *Frontiers in Immunology* 2014; 5
- 64 Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M et al. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nature Immunology* 2008; 9: 1179–1188
- 65 Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I et al. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochemical Journal* 2001; 358: 69–77
- 66 Spriet LL, Tunstall RJ, Watt MJ et al. Pyruvate dehydrogenase activation and kinase expression in human skeletal muscle during fasting. *Journal of Applied Physiology* 2004; 96: 2082–2087
- 67 Thomas GW, Mains CW, Slone DS et al. Potential dysregulation of the pyruvate dehydrogenase complex by bacterial toxins and insulin. *The Journal of trauma* 2009; 67: 628–633
- 68 Ramirez CM, Rotllan N, Vlassov AV et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circulation research* 2013; 112: 1592–1601
- 69 Liu Y, Wang X, Jiang J et al. Modulation of T cell cytokine production by miR-144\* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis. *Molecular immunology* 2011; 48: 1084–1090
- 70 Ned RM, Swat W, Andrews NC. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood* 2003; 102: 3711–3718
- 71 Menges P, van der Linde J, Hegenbart A et al. Characterisation of Postoperative Immune Suppression by Validated Parameters in Visceral Surgery. *Zentralblatt für Chirurgie* 2016; 141: 68–74
- 72 YE RD, BOULAY F, WANG JM et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews* 2009; 61: 119–161
- 73 Wenceslau CF, McCarthy CG, Goulopoulou S et al. Mitochondrial-derived N-formyl peptides: novel links between trauma, vascular collapse and sepsis. *Medical hypotheses* 2013; 81: 532–535
- 74 Sun D, Zhang M, Liu G et al. Real-Time Imaging of Interactions of Neutrophils with *Cryptococcus neoformans* Demonstrates a Crucial Role of Complement C5a-C5aR Signaling. *Infection and Immunity* 2016; 84: 216–229
- 75 Born TL, Thomassen E, Bird TA et al. Cloning of a Novel Receptor Subunit, AcPL, Required for Interleukin-18 Signaling. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 29445–29450
- 76 Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T et al. Activation of Vagal Afferents after Intravenous Injection of Interleukin-1 $\beta$ : Role of Endogenous Prostaglandins. *J. Neurosci.* 1998; 18: 9471–9479
- 77 Dekkers PEP, Juffermans NP, Hove Tt et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptors on Granulocytes Are Down-Regulated after Endotoxin Administration to Healthy Humans. *J Infect Dis.* 2000; 181: 2067–2070
- 78 Steele CW, Karim SA, Foth M et al. CXCR2 inhibition suppresses acute and chronic pancreatic inflammation. *The Journal of Pathology* 2015; 237: 85–97
- 79 Li L, Xu L, Yan J et al. CXCR2–CXCL1 axis is correlated with neutrophil infiltration and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 2015; 34
- 80 Bajrami B, Zhu H, Kwak HJ et al. G-CSF maintains controlled neutrophil mobilization during acute inflammation by negatively regulating CXCR2 signaling. *The Journal of experimental medicine* 2016

- 81 *Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK et al.* MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *The Journal of surgical research* 1999; 81: 189–195
- 82 *D'Ortho MP, Jarreau PH, Delacourt C et al.* Matrix metalloproteinase and elastase activities in LPS-induced acute lung injury in guinea pigs. *The American journal of physiology* 1994; 266: L209-16
- 83 *Hieta N, Impola U, López-Otín C et al.* Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Dermal Wounds and by Fibroblasts in Culture. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 997–1004
- 84 *Gon S, Gatanaga T, Sendo F.* Involvement of two types of TNF receptor in TNF-alpha induced neutrophil apoptosis. *Microbiology and immunology* 1996; 40: 463–465
- 85 *Edberg JC, Moon JJ, Chang DJ et al.* Differential Regulation of Human Neutrophil FcγRIIa (CD32) and FcγRIIIb (CD16)-induced Ca<sup>2+</sup> Transients. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 8071–8079
- 86 *Thomas CA, Li Y, Kodama T et al.* Protection from Lethal Gram-Positive Infection by Macrophage Scavenger Receptor–Dependent Phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 2000; 191: 147–156
- 87 *Lemarchand P, Vaglio M, Mauël J et al.* Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 19379–19382
- 88 *Hu SP, Harrison C, Xu K et al.* Induction of the chemotactic S100 protein, CP-10, in monocyte/macrophages by lipopolysaccharide. *Blood* 1996; 87: 3919–3928
- 89 *Carow B, Rottenberg ME.* SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Frontiers in Immunology* 2014; 5
- 90 *Babon JJ, Varghese LN, Nicola NA.* Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Seminars in immunology* 2014; 26: 13–19
- 91 *Kimura A, Kinjyo I, Matsumura Y et al.* SOCS3 is a physiological negative regulator for granulopoiesis and granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 6905–6910
- 92 *Malinowsky D, Lundkvist J, Layé S et al.* Interleukin - 1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin - 1 receptor. *FEBS Letters* 1998; 429: 299–302
- 93 *Layé S, Liège S, Li K-S et al.* Physiological Significance of the Interleukin 1 Receptor Accessory Protein. *Neuroimmunomodulation* 2002; 9: 225–230
- 94 *Martin P, Palmer G, Vigne S et al.* Mouse neutrophils express the decoy type 2 interleukin-1 receptor (IL-1R2) constitutively and in acute inflammatory conditions. *Journal of leukocyte biology* 2013; 94: 791–802
- 95 *Gattass CR, King LB, Luster AD et al.* Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1373–1378
- 96 *Dufour JH, Dziejman M, Liu MT et al.* IFN-γ-Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *J Immunol* 2002; 168: 3195–3204
- 97 *Stanford MM, Issekutz TB.* The relative activity of CXCR3 and CCR5 ligands in T lymphocyte migration: concordant and disparate activities in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology* 2003; 74: 791–799
- 98 *Weiss ID, Shoham H, Wald O et al.* Ccr5 deficiency regulates the proliferation and trafficking of natural killer cells under physiological conditions. *Cytokine* 2011; 54: 249–257
- 99 *Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH et al.* CCR5 expression on monocytes and T cells: Modulation by transmigration across the blood-brain barrier in vitro. *Cellular immunology* 2006; 243: 19–29

- 100 *Stoimenov I, Helleday T.* PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society Transactions* 2009; 37: 605–613
- 101 *Das R, Burke T, Plow EF.* Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages. *Blood* 2007; 110: 3763–3772
- 102 *Terme JM, Sese B, Millan-Arino L et al.* Histone H1 variants are differentially expressed and incorporated into chromatin during differentiation and reprogramming to pluripotency. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 35347–35357
- 103 *Klebanoff SJ.* Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology* 2005; 77: 598–625
- 104 *Legrand D, Mazurier J.* A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 2010; 23: 365–376
- 105 *Pham CTN.* Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 541–550
- 106 *Woloszynek JC, Hu Y, Pham CTN.* Cathepsin G-regulated Release of Formyl Peptide Receptor Agonists Modulate Neutrophil Effector Functions\*. *The Journal of Biological Chemistry* 2012; 287: 34101–34109
- 107 *Ortega GA, Salvermoser M, Rossaint J et al.* Cathepsin G Controls Arterial But Not Venular Myeloid Cell Recruitment. *Circulation* 2016
- 108 *Loison F, Zhu H, Karatepe K et al.* Proteinase 3–dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 2014; 124: 4445–4458
- 109 *Chinami M, Yano Y, Yang X et al.* Binding of HTm4 to Cyclin-dependent Kinase (Cdk)-associated Phosphatase (KAP)·Cdk2·Cyclin A Complex Enhances the Phosphatase Activity of KAP, Dissociates Cyclin A, and Facilitates KAP Dephosphorylation of Cdk2. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 17235–17242
- 110 *Hulett MD, Pagler E, Hornby, JR.* Cloning and characterization of a mouse homologue of the human haematopoietic cell-specific four-transmembrane gene HTm4. *Immunology and cell biology* 2001; 79: 345–349
- 111 *Padmanabhan A, Jones CG, Bougie DW et al.* Heparin-independent, PF4-dependent binding of HIT antibodies to platelets: implications for HIT pathogenesis. *Blood* 2015; 125: 155–161

## 9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

## 10. Danksagung

**Pia** für die Bereitstellung und Betreuung der Arbeit

**Meiner Familie** für das Korrekturlesen, die Begleitung und Motivation

**Julia N.** für das Korrekturlesen und die Unterstützung beim Beschriften der Eppis

**Christine** dafür, dass sie in unserem Chaos den Überblick bewahrt hat, für uns immer einen wichtigen Tipp parat hatte und immer tatkräftig angepackt hat

**Julia B. und Antje** für die Hilfe beim Operieren und den vielen komplizierten Labormethoden

**Diana** Für die stundenlange Hilfe bei der Erstellung und Überarbeitung der PCR-Ansätze

**Johannes** für die Hilfe beim Operieren, den regen Austausch und die gute Zusammenarbeit

### **Annabel und Bastian**

für die Einarbeitung in die verschiedensten Methoden und für die Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der Daten

### **Janine und dem Institut für Genomforschung**

für die Beratung bei genetischen Fragen und die molekularbiologische Bearbeitung der Microarrays