



Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München
Kommissarischer Leiter:
Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff

ANALYSE VON GEN- UND PROTEINEXPRESSIONSPROFILIEN AN ZELLEN
DES UNTERHAUTFETTGEWEBES IN ASSOZIATION MIT POSTOPERATIVEN
WUNDHEILUNGSSTÖRUNGEN

Laura Isabelle Paul

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. J. H. Kleeff
2. Univ.-Prof. Dr. H. Friess

Die Dissertation wurde am 18.09.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.04.2015 angenommen.

Meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 5 |
| II. EINLEITUNG..... | 7 |
| 2.1 DEFINITION EINER WUNDE..... | 7 |
| 2.2 WUNDHEILUNG | 7 |
| 2.3 DEFINITION EINER WUNDINFEKTION | 9 |
| 2.4 EPIDEMIOLOGIE UND FOLGEN VON WUNDINFEKTIONEN | 11 |
| 2.5 RISIKOFAKTOREN FÜR WUNDINFEKTIONEN..... | 12 |
| 2.6 ROLLE VON FETTGEWEBE | 15 |
| 2.7 FETTGEWEBE UND WUNDHEILUNG..... | 18 |
| 2.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 18 |
| III. MATERIAL UND METHODEN..... | 20 |
| 3.1 MATERIALIEN | 20 |
| 3.1.1. <i>Gentechnik und Molekularbiologie</i> | 20 |
| 3.1.2. <i>Geräte</i> | 21 |
| 3.1.3. <i>Software</i> | 21 |
| 3.1.4. <i>Laboraausstattung</i> | 22 |
| 3.1.5. <i>Primer und Oligonukleotide</i> | 22 |
| 3.2 METHODEN..... | 23 |
| 3.2.1. <i>Patientendaten</i> | 23 |
| 3.2.2. <i>RNA Präparation</i> | 26 |
| 3.2.3. <i>Mikroarray Experiment</i> | 27 |
| 3.2.4. <i>Quantitative real time PCR</i> | 28 |
| 3.2.5. <i>Immunohistochemie</i> | 31 |
| 3.2.6. <i>Bioinformatische Analyse der Microarraydaten</i> | 32 |
| 3.2.7. <i>Statistische und bio-informatische Auswertung</i> | 35 |
| IV. ERGEBNISSE | 36 |
| 4.1. PATIENTENDATEN..... | 36 |
| 4.2. RNA ISOLATION..... | 39 |
| 4.3. MICROARRAY ANALYSE | 39 |
| 4.4. QRT PCR..... | 50 |
| 4.5. IMMUNOHISTOCHEMIE..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| IV. DISKUSSION | 54 |
| 5.1 ANALYSE DER PATIENTENDATEN..... | 55 |
| 5.2 ANALYSE UNSERER ERGEBNISSE IN BEZUG AUF DEN WUNDHEILUNGSPROZESS | 56 |
| 5.2.1. <i>Funktionsbeeinträchtigung von Stammzellen.....</i> | <i>57</i> |
| 5.2.2. <i>Mikrobiozide Eigenschaft von Präadipozyten und Wirkung von ROS</i> | <i>57</i> |
| 5.2.3. <i>Schlüsselrolle von Adipokinen im Wundheilungsprozess</i> | <i>58</i> |
| 5.3 AUSWIRKUNGEN GENETISCHER EXPRESSIONSÄNDERUNGEN AUF DAS FETTGEWEBE | 59 |
| 5.3.1. <i>ALDH1A3-Hochregulierung verändert metabolische Eigenschaften von subkutanem Fettgewebe</i> | <i>60</i> |
| 5.3.2. <i>AZGP1 beeinflusst als Adipokin den Lipidstoffwechsel in subkutanem Fettgewebe</i> | <i>63</i> |
| 5.3.3. <i>PCK1 steuert als entscheidendes Enzym die Glyceroneogenese in Adipozyten.....</i> | <i>64</i> |
| 5.4 KRITISCHE ANALYSE DER ARBEIT..... | 66 |
| V. ZUSAMMENFASSUNG | 67 |
| VI. LITERATURVERZEICHNIS..... | 69 |
| VII. DANKSAGUNG | 78 |

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------|---|
| ACAT1 | - Acetyl-CoA Acetyltransferase 1 |
| ALDH1A3 | - Aldehyddehydrogenase Familie 1 Typ A3 |
| AZGP1 | - Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding |
| BMI | - Body Mass Index |
| C/EBP α/β | - CCAAT/enhancer binding protein alpha |
| CDC | - Center for Disease Control and Prevention |
| DEPC | - Diethylpyrocarbonat |
| FG | - Fettgewebe |
| GI-Trakt | - Gastrointestinaltrakt |
| GO | - Gene Ontology |
| GPD1L | - Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase 1-like |
| KGF | - Keratinocyte growth factor |
| HPRT | - Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase |
| IDDM | - Insulinpflichtiger Diabetes mellitus |
| IFN γ | - Interferon γ |
| MET | - Mesenchymal to epithelial Transition |
| MOPS | - 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| MTHFD1 | - Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 1 |
| MW | - Mittelwert |
| NADPH | - Nicotinamidadenindinukletidphosphat |
| NIDDM | - Nicht-insulinpflichtiger Diabetes mellitus |
| NNIS | - National Nosocomial Infection Surveillance System |
| PCK1 | - Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1 |
| PLA2G16 | - Phospholipase A2, Gruppe XVI |
| PPAR γ | - Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma |
| RA | - Retinsäure |
| RAR | - Retinoic acid receptor |
| RNA | - Ribonukleinsäure |

| | |
|-----------|--|
| ROS | - Reaktive Sauerstoffspezies |
| SA | - Standardabweichung |
| SEM | - Standard error of the mean/ Standardfehler |
| TBE | - TRIS-Borat-EDTA |
| TBS - BSA | - Tris Buffered Saline with Bovine Serum Albumin |
| THY1 | - Thy-1 cell surface antigen |
| TLR | - Toll-like receptor |
| VEGF | - Vascular endothelial growth factor |
| WI | - Wundinfektion |

II. EINLEITUNG

2.1 *Definition einer Wunde*

Die primäre Funktion der Haut besteht darin, als sichere Barriere den Körper vor Umwelteinflüssen und Noxen zu schützen. Der Verlust ihrer Integrität kann zu Funktionsverlust und hiermit durch Kolonisation mit Mikroorganismen zu chronischen Wunden, schwerwiegenden Beeinträchtigungen, Infektionen bis zu Sepsis führen (Reuler and Cooney 1981, Dow, Browne et al. 1999, Edwards and Harding 2004). Eine Wunde wird definiert als Gewebsdefekt mit Trennung des Gewebzusammenhangs an äußeren (Haut, Schleimhaut, Subkutis) oder inneren Körperoberflächen (Organe), der mit oder ohne Gewebsverlust einhergeht. Ihrer Entstehung liegt entweder die Anwendung äußerer Gewalt (exogen) oder eine Erkrankung (endogen z.B. bei Diabetes mellitus, chronisch venöse/arterielle Insuffizienz) zugrunde. Erstere lassen sich wiederum je nach Entstehungshergang in Gelegenheitswunden (entstehen unter kontaminierten Bedingungen, z.B. im Rahmen eines Unfalls) oder in Operationswunden (entstehen unter sterilen Bedingungen) unterteilen; oder aber je nach Ursache der Gewebeläsion in mechanische (scharfe oder stumpfe Gewalt), thermische (Verbrennungen, Erfrierungen), chemische (Verätzungen durch Säuren/Basen) oder Strahlen-Wunden (ionisierende Strahlen) unterteilen (Kujath and Michelsen 2008).

Ziel der Wundbehandlung ist es somit, einen raschen, funktionellen und ästhetisch zufriedenstellenden Wundverschluss zu erreichen (Singer and Clark 1999). Operationsbedingt entstandene Wunden heilen bei gut adaptierten und nicht-infizierten Wundrändern üblicherweise primär ab. Ist ein unkomplizierter Heilungsprozess auf Grund von Infektionen, Spannung, großen Gewebsdefekten oder Mangeldurchblutung nicht möglich, entsteht eine sekundäre Wundheilung.

2.2 *Wundheilung*

Die Wundheilung der Haut kann in drei unterschiedliche, wenn auch überlappende Phasen eingeteilt werden. Diese bestehen aus der ersten Phase der Inflammation, gefolgt von einer Regenerationsphase und zuletzt dem Gewebsumbau („remodeling“) (*Abbildung 1*). Jede dieser Phasen wird durch die Migration und Proliferation unterschiedlicher Zellen bestimmt. Hierbei spielen besonders Leukozyten, Keratinozyten, Fibroblasten sowie Endothelzellen

eine wichtige Rolle. Ganzheitlich gesehen wird die Regenerationsphase als ausschlaggebend für den Verschluss operativer Wundinzisionen angesehen (Gurtner, Werner et al. 2008, Stappenbeck and Miyoshi 2009).

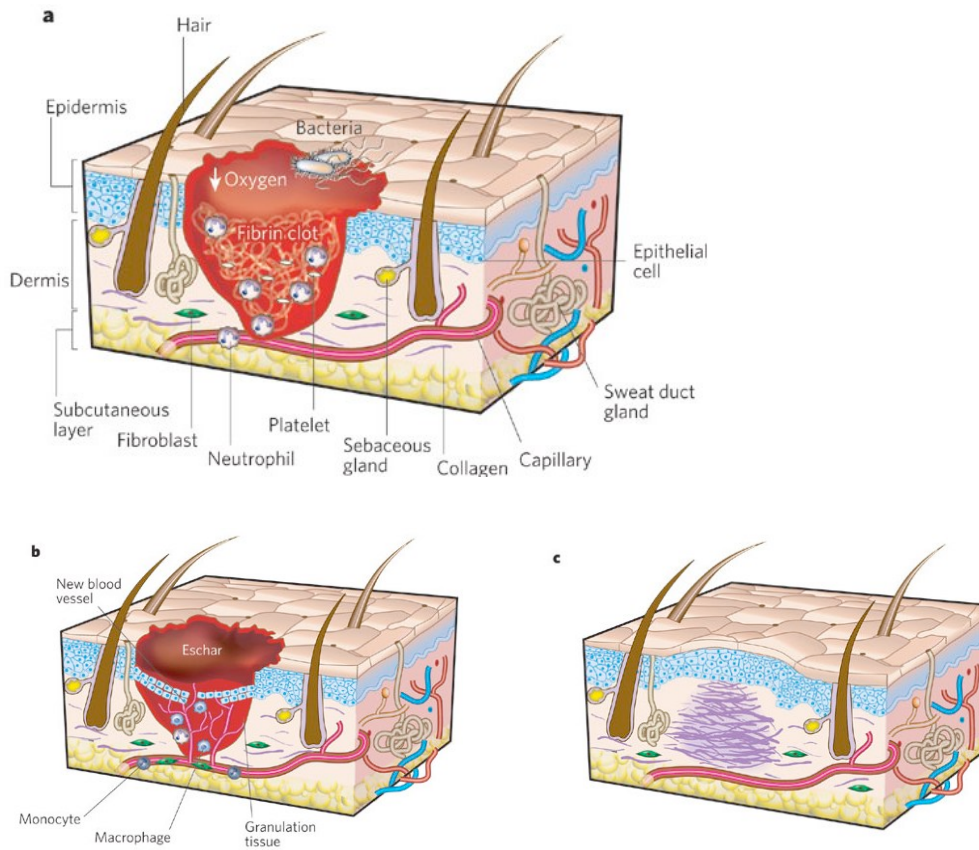


Abbildung 1: Stadien der Wundheilung (Gurtner, Werner et al. 2008)
a) akute inflammatorische Phase
b) Gewebsregeneration
c) Gewebsumbau („remodeling“)

Ziel der Wundheilung ist die Beseitigung sowie der Ersatz beschädigter oder verlorengegangener spezialisierter Zellen, und eine Wiederherstellung der Gewebefunktion. Genauer betrachtet ist hierfür ein komplexes Zusammenspiel von Mediatoren, Wachstumshormonen, Zytokinen, Chemokinen, Immunabwehr und Gewebszellen nötig (Barrientos, Stojadinovic et al. 2008). In der akuten exsudativen Phase nach Verletzung, werden zunächst lösliche Mediatoren freigesetzt, die auf folgende Prozesse Einfluss nehmen: 1. im lokalen vaskulären System kommt es zur Vasodilatation und Permeabilitätserhöhung, 2. Leukozyten, besonders neutrophile Granulozyten, werden durch Chemotaxis in den Bereich der Wunde gelockt, 3. Thrombozyten aggregieren und bilden einen fibrinreichen Thrombus, 4. durch Opsonierung werden anwesende Bakterien zur Eliminierung durch Makrophagen markiert 5. Fibronektin stabilisiert die Wunde durch Querverbindungen zwischen Fibrin und Kollagen. Diese initiale Phase ist wichtig, um die Wunde zu stabilisieren und eine Grundlage für die anstehende

regenerative Phase zu bilden. Sie ist charakterisiert durch die Anwesenheit von Fibroblasten, durch über Angiogenese neu-entstehende Blutgefäße, sowie durch Zellen der Immunabwehr, größtenteils Makrophagen (Martin 1997, Schafer and Werner 2007). Oben genannte gebildete Exsudate werden durch neutrophile Granulozyten sowie Monozyten/Makrophagen abgebaut. Hierauf folgt eine ausgeprägte Kollagensynthese durch Fibroblasten (Typ-III-Kollagen wird mit Reifung der Narbe durch Typ-I-Kollagen ersetzt), welche für die Stabilität der Wundnarbe verantwortlich ist. Zuletzt folgt durch die Migration und Proliferation basaler Epithelzellen die Regeneration der Epidermis. Es bildet sich ein mehrschichtiges Epithel, das sich zu normalem Epithel ausdifferenziert, Hautanhangsgebilde sowie Melanozyten fehlen meist jedoch (Böcker, Denk et al. 2008).

2.3 Definition einer Wundinfektion

Für die Untersuchung und Beurteilung von Wundinfektionen (WI) ist es wichtig, standardisierte Kriterien für deren Diagnose zu haben. Eine wichtige und gängige Klassifikation wurde 1970 durch das Center for Disease Control and Prevention (CDC) festgelegt. Hierbei wurde eine Manifestation von Wundinfektionen innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage im Bereich der Hautinzision oder tieferliegender Strukturen (Faszie, Muskel, intraabdominell) definiert. Die Einteilung ist in *Abbildung 2* dargestellt. Je nach Lokalisation wird unterschieden zwischen einer Ausdehnung, die alleinig auf die Haut oder auf das subkutane Fettgewebe im Bereich der Inzision begrenzt ist, und einer Ausdehnung auf andere Organe oder Organräume, und somit tieferliegende Gewebe, mit Ausschluss der Inzision (Mangram, Horan et al. 1999). Postoperative Infektionen können hiermit in oberflächlich, tief oder intraabdominell eingeteilt werden.

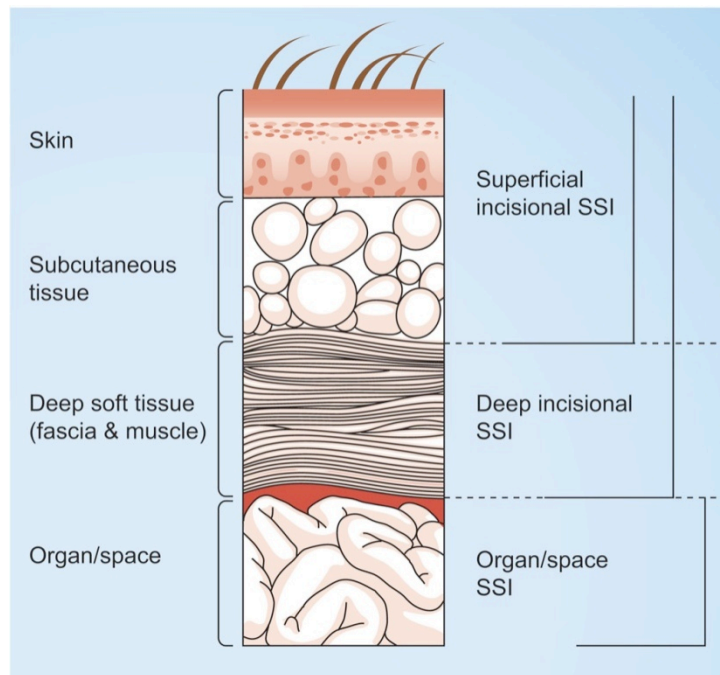


Abbildung 2: Einteilung der Wundinfektionen nach Tiefenausdehnung und Organbeteiligung (Horan, Gaynes et al. 1992, Chopra, Zhao et al. 2010).

Als Infektionskriterien für oberflächliche WI gelten, in Anlehnung an die 1999 festgelegten Kriterien des CDC, sowohl die klassischen Entzündungszeichen (Rötung, Erwärmung, Schmerzen, Schwellung) als auch eitrige Sekretion, positive Bakterienkultur eines Wundabstrichs oder die Diagnosestellung durch den behandelnden Arzt (Horan, Gaynes et al. 1992). Wie bereits erwähnt, müssen oberflächliche WI im Zeitraum von 30 Tagen postoperativ auftreten und auf oben genannte Schichten begrenzt sein. Minimale Abszesse im Bereich der Einstichstellen der Naht sowie Infektionen nach Verbrennungen oder Stichwunden sind hiervon ausgenommen (Mangram, Horan et al. 1999, Horan, Andrus et al. 2008).

Generell sind bei Infektionen zwei unterschiedliche Erregerquellen zu unterscheiden: einerseits endogene Quellen, bei denen die Erregerursprünge Haut, Mund, Nase oder den gastrointestinalen Trakt darstellen, welche physiologisch von Mikroorganismen besiedelt sind; andererseits exogene Quellen, bei denen die Erreger nicht vom Patienten selbst stammen, sondern durch Externe übertragen werden, wie dem Pflegepersonal, Besuchern, medizinischen Geräten oder sonstigen Umweltfaktoren in der Klinik (Horan, Andrus et al. 2008). Mikrobiologisch betrachtet hat sich das Erregerspektrum in den letzten Jahrzehnten jedoch nur wenig gewandelt. Die häufigsten Ursachen für WI sind Besiedlungen mit *Staphylococcus aureus* (30-40%), *Escherichia coli* (9-15%), koagulase-negativen Staphylokokken (6-11%), Enterokokken Spezies (12%), *Pseudomonas aeruginosa* (7-10%) sowie andere Anaerobier (NNIS System Report 1999, Lewis 2002, Leaper, van Goor et al. 2004). Proportional steigt

jedoch die Infektionsrate mit antimikrobiell-resistenten Pathogenen, wie dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), oder Pilzen wie *Candida albicans* (Schaberg 1994, Jarvis 1995). Die zunehmende Entwicklung dieser Infektionen durch antimikrobiell-resistente Keime wird mit Sorge beobachtet und wird auch in Zukunft zusätzliche klinische und epidemiologische Herausforderungen darstellen (Martone and Nichols 2001). Nicht zuletzt entsteht somit ein zusätzlicher Grund für die Entwicklung einer effektiven Prophylaxe und Therapie von WI.

2.4 Epidemiologie und Folgen von Wundinfektionen

Trotz der Fortschritte in der Umsetzung von Maßnahmen zur Infektionsprävention, wie Verbesserungen der Ventilation von Operationssälen, Sterilisationsmethoden, Operationsverfahren sowie antibiotische Prophylaxen, sind WI weiterhin eine wesentliche Ursache für postoperative Morbidität und Mortalität. Wundinfektionen sind mit 14-20% die dritthäufigste nosokomiale Infektion, bezogen auf alle hospitalisierten Patienten (Smyth and Emmerson 2000, Leaper, van Goor et al. 2004). Betrachtet man nur die chirurgisch behandelten Patienten, sind WI mit einem Anteil von 38% aller Infektionen in diesem Kollektiv sogar die häufigste nosokomiale Infektion (Mangram, Horan et al. 1999). Bisherige Studien weisen große Diskrepanzen bezüglich der WI-Rate (2-30%) bei operierten Patienten auf, lassen jedoch die Bestimmung eines ungefähren Durchschnittswerts von ca. 10% zu (Weiss, Statz et al. 1999, Tang, Chen et al. 2001, Smith, Bohl et al. 2004, Nakamura, Mitomi et al. 2008, Mu, Edwards et al. 2011). Ein Grund für die breite Spanne dieser Ergebnisse könnten Änderungen chirurgischer Interventionen sein, wie die Zunahme an laparoskopischen sowie ambulanten Eingriffen, und die hiermit verbundenen verkürzten postoperativen Krankenhausaufenthalte (Gaynes, Culver et al. 2001). Durch frühere Krankenhausentlassungen ist die Möglichkeit postoperativer Wundüberwachung und folglich deren Entdeckung begrenzt, wodurch es zu unvollständigen und meist unterschätzten WI-Raten kommt.

Die Identifikation einer solchen Infektion ist jedoch ein ganz entscheidender Schritt für eine frühzeitige und adäquate Behandlung. Denn Wundinfektionen führen bei chirurgischen Patienten zu einer Verdoppelung der Mortalität (3%), einer um 60% erhöhten Wahrscheinlichkeit postoperativ auf eine Intensivstation verlegt zu werden sowie einer 5-fach erhöhten Re-Hospitalisierungsrate (Kirkland, Briggs et al. 1999, Awad 2012). Aus diesen Gründen haben WI auch deutliche ökonomische Konsequenzen. Durch die erhöhte postoperative Morbidität folgen häufig verlängerte Krankenhausaufenthalte. Die Liegezeit verlängert sich dabei um durchschnittlich 6 bis 10 Tage, kann sich aber sogar im Schnitt auf mehr als 12 Tage aus-

dehnen, wenn WI-assoziierte Re-Hospitalisierungen mit eingerechnet werden (Kirkland, Briggs et al. 1999, Mangram, Horan et al. 1999, Nakamura, Mitomi et al. 2008). Ein weiterer Faktor sind ausgedehnte Wundbehandlungen mit hohem personellen und materiellen Mehraufwand (z.B. Wundsanierung, Antibiotika-Einnahme, ambulante Nachkontrollen), aus denen erhöhte Kosten resultieren (Ennigrou, Mokhtar et al. 2000, Smith, Bohl et al. 2004). Studien zufolge belaufen sich diese Zusatzkosten allein in den USA, auf mindestens 1 – 3 Milliarden Dollar pro Jahr (Kirkland, Briggs et al. 1999, Martone and Nichols 2001). Europaweit lassen sich ebenfalls enorme Kosten errechnen. Bei geschätzten 30 Millionen chirurgischen Eingriffen im Jahr mit einem Spektrum von circa 450.000 – 6.000.000 Wundinfektionen, einer Verlängerung des stationären Aufenthaltes um ca. 10 Tage bei durchschnittlichen Tageskosten von € 325, entstehen in europäischen Gesundheitssystemen jährlich zwischen 1,47 – 19,1 Milliarden Euro an Zusatzausgaben (Leaper, van Goor et al. 2004).

Durch signifikante Folgen in Morbidität, Mortalität sowie erhöhten Kosten im Gesundheitssystem stellt die Suche nach Risikofaktoren für die Entwicklung postoperativer WI seit vielen Dekaden einen wichtigen Fokus dar (DiPiro, Martindale et al. 1998, Leaper, van Goor et al. 2004).

2.5 *Risikofaktoren für Wundinfektionen*

Eine präoperative Identifikation von Risikofaktoren und die Durchführung präventiver Maßnahmen könnten theoretisch das Auftreten von WI reduzieren. Hierfür ist es jedoch notwendig zu wissen, welche Faktoren tatsächlich die Wundheilung beeinflussen können.

Bevor allgemeine Risikofaktoren für die Entstehung von WI gesucht werden, ist es wichtig sich vor Augen zu führen, dass Infektionen eine Invasion und Kolonisation eines Wirts durch einen Mikroorganismus darstellen. Die lange Zeit einzigen bekannten, wichtigen Risikofaktoren waren sowohl die geschätzte mikrobielle Kontamination der Wunde, als auch die Anfälligkeit des Wirtes. Meist sind Infektionen ein Resultat eines gestörten Gleichgewichts dieser Risikofaktoren. Theobald Smith entwickelte deshalb 1934 folgende Gleichung:

Erkrankung = (Dosis der bakteriellen Kontamination x Virulenz)/ Immunabwehrkraft des Wirts

Diese Gleichung beinhaltet, dass das Risiko für Infektionen invers proportional zur Abwehrkraft des Wirts ist (Soper, Bump et al. 1995). Ein Ungleichgewicht dieser Faktoren erhöht folglich das Risiko für Infektionen.

Es lassen sich unterschiedliche Gruppen identifizieren, die durch ihre Charakteristika zu einem erhöhten Risiko beitragen können: die Operation, das Personal, das Klinikumfeld (z.B. Operationssaal) und nicht zuletzt individuelle Patienteneigenschaften. Die Einführung einer standardisierten präoperativen Hautdesinfektion im Bereich des Operationsfeldes konnte die Zahl an WI deutlich reduzieren (Mangram, Horan et al. 1999). Jedoch sind alle chirurgischen Wunden bis zu einem bestimmten Grad durch Mikroorganismen kontaminiert (Robson 1997). Viele der Operationsabläufe, sowie allgemeine Hygienemaßnahmen sind mittlerweile streng reglementiert. Im Gegensatz zu früheren Vorgehensweisen im Bereich der präoperativen Desinfektion und intraoperativen antibiotischen Prophylaxe, lässt sich durch weiterhin hohe WI-Raten folgern, dass heutzutage vielmehr die Prädisposition des Patienten, die individuell sehr unterschiedlich ausgeprägt ist, der entscheidende Ansatzpunkt zur Prävention von WI sein sollte. Im Folgenden sollen potentielle in der Literatur bereits beschriebene Risikofaktoren erläutert werden.

In den letzten 15 Jahren wurde das Thema der Risikofaktoren umfangreich untersucht, jedoch ist die aktuelle Studienlage in vielen Punkten noch unklar. Nur wenige Studien sind in der Lage, Risikofaktoren oder Präventionsmaßnahmen zu validieren, da diese oft an begrenzten Patientenkollektiven oder in Bezug auf spezielle Eingriffe durchgeführt wurden, wodurch die Ergebnisse nicht verallgemeinert werden können. Immer wieder wurden potentielle Risikofaktoren für die Entwicklung von WI identifiziert, welche dann teilweise von anderen Arbeitsgruppen widerlegt werden konnten.

Um Patienten mit erhöhtem Risiko zu identifizieren, führte das CDC (Center for Disease Control and Prevention) 1970 das „National Nosocomial Infection Surveillance System“ (NNIS) ein. Hierbei wurden WI, je nach betroffenem Gewebe, in „Inzision“ d.h. Haut und/oder subkutanes Gewebe, oder in Organ/Space (jedes übriges Gewebe) eingeteilt (NNIS System Report 1999). Zudem wurde ein operations-spezifischer Risikoindex (RIC = risk index category) entwickelt, in den sowohl der ASA-Score (American Society of Anaesthesiologists), als auch die Wundklassifikation (sauber, sauber-kontaminiert, kontaminiert) und die Operationsdauer als Faktoren einfließen und bei dem ein hoher Score mit der Ausbildung von WI assoziiert ist (Culver, Horan et al. 1991, Pastor, Baek et al. 2010). Der Einfluss dieser drei Faktoren wurde in Studien immer wieder bestätigt (Smith, Bohl et al. 2004).

Auf der Suche nach individuellen Faktoren konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem Diabetes mellitus ein circa 1,5 bis 2-fach erhöhtes Risiko für WI haben (Karim, Chafik et al. 2000, Latham, Lancaster et al. 2001, Malone, Genuit et al. 2002). Zusätzlich gelten die Klassifikation der Wundkontamination (dreifache WI-Rate in kontaminierter Klasse verglichen mit sauber-kontaminiert) (Olson and Lee 1990, Tang, Chen et al. 2001, Sorensen,

Hemmingsen et al. 2005), die Operationsdauer (3-fach erhöhtes Risiko bei Operationsdauer >4h, verglichen mit <2h) und die Art der Inzision (Karim, Chafik et al. 2000) als Risikofaktoren (Dierssen, Vicente et al. 1996). In anderen Studien wurden jedoch auch die Anlage eine Anus praeters, ein erhöhter Body Mass Index (BMI >30kg/m²) beziehungsweise ein erhöhter Körperfett-Prozentsatz (>25% Körperfett), sowie eine positive Raucheranamnese als Risikofaktoren für WI identifiziert (Tang, Chen et al. 2001, Smith, Bohl et al. 2004, Watanabe, Kohnoe et al. 2008, Waisbren, Rosen et al. 2010). Adipositas allein führt demnach zu einem 5-fach erhöhtem Risiko für WI (Waisbren, Rosen et al. 2010). Weitere nachgewiesene Risikofaktoren sind Aszites, postoperative Anämie sowie Malnutrition (definiert als Gewichtsverlust >10% über die letzten 6 Monate)(Malone, Genuit et al. 2002). Im Gegensatz zu früheren Studien, konnte kein Zusammenhang zwischen WI und Alter, Gender oder Steroid-Einnahme gefunden werden (Malone, Genuit et al. 2002, Smith, Bohl et al. 2004).

Die früheste und bestandskräftigste aller chirurgischen Beobachtungen besteht jedoch darin, dass ischämische Wunden schlecht heilen. Durch die reparativen Vorgänge während des Heilungsprozess besteht ein erhöhter Sauerstoffbedarf, der in schlecht vaskularisiertem Gewebe nicht gedeckt werden kann (Schreml, Szeimies et al. 2010). Wunden mit großem „Totraum“ bleiben somit hypoxisch. Ein solches ischämisches Gewebe kann die Folge unterschiedlicher Erkrankungen sein. Ein Beispiel hierfür ist ein Diabetes mellitus, welcher mit vielen vaskulären Veränderungen (Endotheldysfunktion, Permeabilitätsstörungen) einhergeht. Diese Kreislaufinsuffizienz führt durch eine gestörte Mikrozirkulation zu Hypoxie, lokaler Azidose, sowie Ansammlungen von Stoffwechselprodukten; hierauf folgen Gewebsschädigungen, Inflammationszustände, verminderte Erythrozyten Verformbarkeit, erhöhte Blutviskosität und Aggregationstendenz, Vasokonstriktion und somit auch eine verminderte Sauerstoffversorgung (Cicco, Giorgino et al. 2011). Auch Adipositas ist ein solcher Risikofaktor. Einerseits durch eine erhöhte Menge an Fettgewebe, das an sich schlecht durchblutet und wenig tolerant gegenüber Ischämie und Hypoxie ist; andererseits durch eine meist mechanisch eingeschränkte Brustkorbentfaltung, die durch eine Abnahme der Vitalkapazität zu einer reduzierten Blutoxygenierung führt (Wilson and Clark 2004). Die Inzision in dicke Schichten an Unterhautfettgewebe könnte zu einer unterversorgten Umgebung führen. Bei großen Wunden kommt es zudem zu einer Ansammlung größerer Mengen an Wundflüssigkeit, ein optimales Kulturmedium für kontaminierende Mikroorganismen (Kivisaari and Niinikoski 1975). Tatsächlich besteht eine Assoziation zwischen einer allgemeinen Adipositas sowie breiten Unterhautfettsschichten (hohes Risiko bei Fettgewebe mit >3cm Tiefe) und postoperativen WI (Soper, Bump et al. 1995, House, Fong et al. 2008).

2.6 Rolle von Fettgewebe

Fettgewebe ist ein sehr komplexes Gewebe; einerseits im Hinblick auf seine zelluläre Zusammensetzung, denn es besteht aus reifen Adipozyten und diversen anderen Zellen (Kollagenmatrix, Stammzellen, Präadipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Blutzellen inkl. Makrophagen, Nervenendigungen und vaskuläres Gewebe), die die stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) bilden; andererseits in Bezug auf seine biochemischen, morphologischen und funktionellen Eigenschaften, die je nach anatomischer Lokalisation variieren (Zuk, Zhu et al. 2001, Frayn, Karpe et al. 2003).

Sowohl Überschuss als auch Mangel an Fettgewebe haben bedeutende Auswirkungen auf den Metabolismus und sind mit Hypertonie, Insulinresistenz, Hyperglykämie und proinflammatorischen Zuständen assoziiert. Diese wiederum sind Teil des sogenannten „metabolischen Syndroms“, einem wichtigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Grundy, Brewer et al. 2004). Somit wird die Tragweite des Einflusses von Fettgewebe auf den Gesundheitszustand deutlich. Wir können also annehmen, dass dieses hochaktive, von Hautinzisionen stark betroffene Gewebe, auch maßgeblichen Einfluss auf die Wundheilung hat.

Adipozyten

Adipozyten bilden neben der SVF den Hauptteil des Fettgewebes, welches sich hauptsächlich in subkutanen oder viszeralen Depots finden lässt. So ähnlich sich diese Gewebe sein mögen, so unterschiedlich verhalten sie sich jedoch. Im Gegensatz zu subkutanem Fettgewebe ist zum Beispiel die Ansammlung von intraabdominalem Fett stark mit Adipositas-verbundenen Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus Typ 2 oder koronare Herzerkrankungen assoziiert (Hamdy, Porramatikul et al. 2006). Diese Unterschiede werden Anatomie-abhängigen Funktionsvariationen im Fettgewebe zugeordnet. Interessanterweise konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Proteinexpression von Adipozyten aus viszeralen und subkutanen Fettdepots sehr ähnlich ist. Gene mit stark differentieller Expression in beiden Depots werden größtenteils durch den nicht-adipozytären Teil des Gewebes exprimiert (Peinado, Jimenez-Gomez et al. 2010).

Jüngste Studien lassen allerdings schlussfolgern, dass viele Aspekte des Wundheilungsprozesses durch Adipozyten reguliert werden (Plikus, Mayer et al. 2008, Festa, Fretz et al. 2011). Durch die adipozytäre Lokalisation im Fettgewebe, welches eine große Zellvielfalt vorweist, sowie durch ihre ausgeprägten metabolischen und endokrinen Aktivität, ist nicht

von einer alleinigen Beteiligung, sondern vielmehr von einer starken Interaktion zwischen Adipozyten und anderen Zellarten auszugehen.

Adipokine

Fettgewebe ist ein metabolisch sehr aktives Gewebe und ein wichtiges endokrines Organ, das abgesehen von seiner Rolle in der Energiespeicherung vielfältige Signalmoleküle produziert (Adipokine), die ihrerseits an der Regulation von Metabolismus, Energiehomöostase, Zelldifferenzierung, Immunantwort und Inflammation beteiligt sind (Kershaw and Flier 2004). Die Entdeckung und Charakterisierung von Leptin 1994 etablierte die neue Rolle von Fettgewebe als endokrines Organ (Zhang, Proenca et al. 1994). Es produziert eine Vielzahl von Peptiden (Adipokine), die sowohl lokal als auch systemisch wirken, und übernimmt damit eine wichtige Position in der Koordination von Energiestoffwechsel, neuroendokriner Funktionen sowie Immunreaktion. Wichtige Adipokine wie Leptin und Adiponektin werden von Adipozyten sezerniert. Neuere Erkenntnisse ergaben auch, dass die stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) für einen beträchtlichen Teil der Adipokinproduktion verantwortlich ist, wenn auch in Art und Menge unterschiedlich zu Adipozyten (Fain, Madan et al. 2004).

Stammzellen in Haarfollikeln

Der ursprüngliche Hinweis auf die Beteiligung von Adipozyten an der Wundregeneration ergab sich aus einer Studie, in der festgestellt werden konnte, dass sich Stammzellen aus Haarfollikeln an der epidermalen Regeneration nach Hautverletzung beteiligen (Plikus, Gay et al. 2012). Hierbei konnte zudem beobachtet werden, dass sich Stammzellen aus unterschiedlichen Teilen des Haarfollikels jeweils anders verhielten. Stammzellen aus dem Haarwulst beteiligten sich vorübergehend, sozusagen als „Notfallstrategie“, vor allem in der frühen Reepithelisierungsphase. Stammzellen im Bereich des Haarfollikels (vor allem in Isthmus- und Junktionszone) hingegen unterstützen die Wundepithelisierung nachhaltig durch eine Umwandlung in langlebige epidermale Stammzellen. Ein genetisches Ausschalten dieser Zellen führte zu einer signifikanten Verzögerung der Wundheilung (Blanpain, Lowry et al. 2004, Ito, Liu et al. 2005, Levy, Lindon et al. 2007, Nowak, Polak et al. 2008). Es bleibt jedoch unklar, wie Stammzellen (SZ) aus Haarfollikeln aktiviert und durch die Wunde rekrutiert werden. Eine neue Studie aus den USA liefert neue Parallelen zwischen der Aktivierung von Haarfollikel-SZ und dynamischen Prozessen in der Adipogenese. Demnach sind Vorläuferzellen sowie unreife Adipozyten nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend zur Förderung der Aktivität epithelialer Stammzellen (Festa, Fretz et al. 2011). Obwohl die Auswirkungen dieser Erkenntnisse im Hinblick auf Erkrankungen des Menschen noch nicht bekannt sind, suggerieren diese Ergebnisse einen Einfluss des metabolischen und proliferativen Sta-

tus von Adipozyten auf die Heilungsfähigkeit einer Wunde, gesteuert durch die Funktion von Haarfollikelstammzellen.

Adipozytäre Stammzellen

Auch Stammzellen innerhalb des Fettgewebes (adipose-derived stem cells ADSC) scheinen einen Einfluss auf unterschiedliche Schritte der Wundheilung zu haben. Diese Stammzellen befinden sich in der SVF des Fettgewebes und ähneln den mesenchymalen Stammzellen, wie sie unter anderem in Knochenmark zu finden sind (Planat-Benard, Silvestre et al. 2004). Tatsächlich besitzen diese Zellen eine hohe Proliferationsfähigkeit und multipotente Eigenschaften, die ihnen u.a. eine Differenzierung zu Zellen mesodermalen und nicht-mesodermalen Ursprungs ermöglichen: hieraus entstehen endotheliale sowie epitheliale Zellen (zum Beispiel Keratinozyten), sowie deren Fähigkeit, große Mengen proangiogener Wachstumsfaktoren zu sezernieren (Zuk, Zhu et al. 2001, Kern, Eichler et al. 2006, Ebrahimiyan, Pouzoulet et al. 2009). Die Proliferation endothelialer Zellen sowie die Sekretion von VEGF (vascular endothelial growth factor) fördern die Angiogenese, die Bildung epithelialer Zellen und Produktion von KGF (keratinocyte growth factor) unterstützen die Regeneration beschädigter Gewebe durch verstärkte Bildung von Granulationsgewebe und Epithelisierung. Hierdurch kommt es zu einer starken Regulierung von Heilungsprozessen und einer verbesserten Wundheilung, insbesondere tiefer Wunden (Zuk, Zhu et al. 2001, Rehman, Traktuev et al. 2004, Altman, Chiu et al. 2008, Ebrahimiyan, Pouzoulet et al. 2009, Nie, Yang et al. 2011).

Die Bildung von Keratinozyten (durch Stammzellen im Fettgewebe, in Haarfollikelwurzeln, aber auch in der interfollikularen Epidermis) unterstützt zudem die Bildung der epidermalen Schutzschicht (Ito, Liu et al. 2005). ADSC sezernieren auch diverse Wachstumsfaktoren und haben damit Einfluss auf ihre Umgebung. Diese aktivieren, unter anderem, lokale Zellfunktionen und rekrutieren neue Zellen in die Wundgegend. Ihnen werden auch immunsuppressive, anti-apoptotische sowie anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben: eine Erkenntnis, die ihre Rolle im Wundheilungsprozess nochmals unterstreicht (Nasef, Mathieu et al. 2007, Tanaka, Tominaga et al. 2008, De Siena, Balducci et al. 2010, Blasi, Martino et al. 2011, Cianfarani, Toietta et al. 2013).

Präadipozyten

Die SVF bildet einen Großteil des heterogenen Fettgewebes. Darin lassen sich unter anderem auch Präadipozyten finden, Vorläuferzellen der Adipozyten. Jüngst konnte festgestellt werden, dass auch diese Zellen sich an der lokalen Immunantwort beteiligen (Cousin, Munoz et al. 1999). Tatsächlich werden ihnen effektive phagozytische und mikrobiozide Eigenschaften

ten zugeschrieben. Präadipozyten haben somit Einfluss auf die Beseitigung pathogener Mikroorganismen, besonders in exponierten Wundmilieus, die nach chirurgischen Eingriffen entstehen, und wirken somit auch präventiv gegen Infektionen. Ihre Aktivität lässt sich demnach als entscheidend für eine regelrechte Wundheilung einstufen (Cousin, Andre et al. 2001, Villena, Cousin et al. 2001, Charriere, Cousin et al. 2003). Sie stellen hiermit ein Verbindungsglied zwischen dem Fettgewebe und der angeborenen Infektabwehr dar.

2.7 Fettgewebe und Wundheilung

Zusammenfassend implizieren all diese Erkenntnisse, dass sowohl die Wundheilungsfähigkeit, als auch die Immunabwehr durch Zellen im Fettgewebe beeinflusst werden. Hieraus resultiert die Vermutung, dass Fettgewebe eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie und somit in der Entstehung von Wundinfekten spielt. Wie bereits erwähnt, konnte festgestellt werden, dass die Masse und individuelle Verteilung von Körperfett sowie die Dicke von subkutanem Fettgewebe einen Einfluss auf die Entwicklung von Wundheilungsstörungen haben (Soper, Bump et al. 1995, House, Fong et al. 2008). Durch das schon beschriebene unterschiedliche Verhalten von Fettgewebe, abhängig von seiner Lokalisation, lässt sich schließen, dass auch genetische und epigenetische Profile in Fettzellen eine entscheidende Rolle in der individuellen Anfälligkeit für WI spielen können (Hamdy, Porramatikul et al. 2006, House, Fong et al. 2008).

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den bisher belegten und oben beschriebenen Zusammenhängen und der sich daraus ergebenden Argumentation stellten wir die Hypothese auf, dass im Fettgewebe ein „genetischer Code“ für WI eingepreßt ist. Gemeint sind hiermit bestimmte Gen- oder Proteinexpressionsmuster, die sich schon vor Entwicklung von WI in diesem Gewebe identifizieren lassen und spezifisch für postoperative WI „kodieren“. Der Nachweis eines solchen Musters könnte somit einen zusätzlichen Risikofaktor für Störungen der Wundheilung darstellen und eine prädiktive Funktion übernehmen.

Hieraus ergäben sich neue Möglichkeiten in der Prävention und Therapie von WI: einerseits durch die Identifikation eines neuen Risikofaktors, und damit einhergehend, der Möglichkeit einer individuell angepassten Wundbehandlung; andererseits durch das Aufdecken von eventuell neuen pharmazeutischen Ansatzpunkten.

Zur Überprüfung dieser Hypothese, führten wir eine prospektive Fall-Kontroll-Studie durch, in der wir Genexpressionsmuster in subkutanem Fettgewebe von chirurgischen Patienten, bei denen ein offener abdomineller Eingriff durchgeführt wurde, ermittelten.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

Steriles Wasser wurde mit Hilfe der MilliQ-Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherbombe hergestellt.

3.1.1. *Gentechnik und Molekularbiologie*

RNA Präparation

| | |
|------------------------------|------------------------|
| RNeasy Lipid Tissue Mini Kit | QIAGEN, Hilden |
| QIAzol Lysis Reagenz | QIAGEN, Hilden |
| Chloroform | Sigma-Aldrich, München |

Reverse Transkription

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | QIAGEN, Hilden |
| Quantiscript® Reverse Transcriptase | QIAGEN, Hilden |

Quantitative Real Time – PCR

| | |
|---|----------------------------------|
| LightCycler® 480 SYBR Green I Master | Roche, Mannheim |
| LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 | Roche, Mannheim |
| LightCycler® 480 Multiwell Sealing Foil | Roche, Mannheim |
| Heraeus Multifuge 3SR Plus | Thermo Scientific, Langenselbold |

Microarray- Experiment

| | |
|---|-----------------------------|
| GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array | Affymetrix, Santa Clara USA |
| GeneChip® WT Sense Target Labeling and Control Reagents | Affymetrix, Santa Clara USA |

Immunohistochemie

DAB visualization staining system DAKO, Aachen

Primäre Antikörper

Anti-ALDH1A3 (rabbit) Sigma-Aldrich , Taufkirchen

Anti- AZGP1 (rabbit) BioVendor, Heidelberg

Anti-MTHFD1 (rabbit) Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.2. Geräte

Lyser II QIAGEN, Hilden

Zentrifuge 5415 R Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Vortex MS 3 basic IKA, Staufen

NanoPhotometer™ Implen, München

LightCycler® 480 Roche, Mannheim

3.1.3. Software

LightCycler® 480 Software, Version 1.5 Roche Diagnostics, Mannheim

GraphPad Prism 4 Software GraphPad, San Diego, USA

IBM SPSS 19 Software Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corp., Armon, NY, USA

IPA (Ingenuity Pathway Analysis) Ingenuity Systems QIAGEN, Redwood City, USA

Bioconductor Paket R R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

3.1.4. Laborausstattung

| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| Reaktionsgefäße safe lock | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Pipetten | PeQLab, Erlangen |
| Pipettenspitzen | Starlab, Ahrensburg |

3.1.5. Primer und Oligonukleotide

Die Synthese aller Primer erfolgte durch die Firma Metabion (Martinsried, Deutschland).

| Gen | Primer (sense) | Primer (antisense) | Amplikonlänge |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------|
| <i>ACAT1</i> | 5'-AGCCTTTCCTTGCTGCCAGCC-3' | 5'-TGCTCTCCATCCCACCTGCCA-3' | 295 |
| <i>ALDH1A3</i> | 5'-GTGCCAGGATTCGGGCCAC-3' | 5'-AGTCAGCGTCCGCACACACG-3' | 187 |
| <i>ALDH6A1</i> | 5'-TTGGAGCTGCTGGTCAGCGC-3' | 5'-TCGCTCTTTGGCCTGGGGAGT-3' | 170 |
| <i>AZGP1</i> | 5'-CTTGGCTCACTCAATGACCT-3' | 5'-CTCCGCTGCTTCTGTTATTC-3' | 250 |
| <i>GPD1L</i> | 5'-GGGGGTGCAAGGGGCTACTG-3' | 5'-TCAGCTGCAGGAAGCCCTCC-3' | 212 |
| <i>HPRT1</i> | 5'-GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTATAAT-3' | 5'-AAGGGCATATCCTACAACAAACTTG-3' | 142 |
| <i>MTHFD1</i> | 5'-CTCAAGATGCACGGGGGCGG-3' | 5'-ACGGCCTGAGCCAGGGCTAA-3' | 296 |
| <i>PCK1</i> | 5'-CTGCCAGCCAGTGCCCCATC-3' | 5'-TGATCTCATGGCCGCCCCCA-3' | 161 |
| <i>PLA2G16</i> | 5'-GGTCGCAGGAGCTGGTGCAG-3' | 5'-CGGGCGACTCCATAGCGCAG-3' | 255 |
| <i>THY1</i> | 5'-GGGGCCTGAGGCAAGCCATG-3' | 5'-GCAGGCACTGCTGGAGGAGC-3' | 230 |

Tabelle 1: Primerpaare für quantitative real time PCR. Amplikonlängenangabe in Basenpaaren (bp)

3.2 Methoden

Ethikantrag

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München unter der Projektnummer 1926/07 gebilligt. Von den Patienten wurde nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung eine Einwilligungserklärung in die Probenentnahme und anonyme Datenerfassung unterschrieben.

Probengewinnung

Unter sterilen Bedingungen wurde nach dem Hautschnitt eine keilförmige Exzision des Unterhautfettgewebes mit dem Skalpell durchgeführt und das somit gewonnene Gewebe in ein steriles Gefäß gegeben. Alle Proben wurden unmittelbar nach Ihrer Gewinnung als Frischgewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1. Patientendaten

Es wurden nur chirurgische Patienten ausgewählt, bei denen ein abdominaler Eingriff durch Laparotomie durchgeführt wurde.

Die Datenakquisition erfolgte prospektiv anhand von Akteneinträgen, klinischen Verläufen, sowie regelmäßigen postoperativen Wundkontrollen.

Bei der Datensammlung wurde ein besonderes Augenmerk auf Vorerkrankungen und Risikofaktoren gelegt. Zur Stratifizierung und Erfassung dieser Risikofaktoren wurde die CDC (Center for Disease Control and Prevention) Klassifikation der NNIS von 1970 zugrunde gelegt. In Anlehnung an diese Klassifikation und bereits bekannten Risikofaktoren (siehe Einleitung 2.5 Risikofaktoren für Wundinfektionen) wurden die folgenden Patientendaten gesammelt: Geschlecht, Alter, medizinische Vorgeschichte, Operationsart und -dauer, Sauberkeit und Wundinfektentwicklung. Diese wurden anschließend analysiert und in Gruppen gegliedert.

Postoperativ erfolgte die stetige Wundbeurteilung alle 2 Tage bis zur Entlassung. Die Wundbegutachtung erfolgte durch das Studienteam.

Es erfolgte die Kategorisierung der Daten in Untergruppen:

Bei den Patienten wurde zunächst das Alter kategorisiert in „jünger als 50 Jahre“, „ Im Bereich 50-70 Jahre“ und „älter als 70 Jahre“. Den Body Mass Index (BMI) teilten wir in Anlehnung an die internationale Klassifikation der World Health Organisation (WHO) in <20 kg/m², 20-25 kg/m² (Normbereich), 25-30 kg/m² (Prä-Adipositas) und >30 kg/m² (Adipositas) ein.

Operationseingriffe wurden ebenfalls entsprechend der Klassifikation des National Research Council klassifiziert in „sauber“ (Klasse 1), „sauber-kontaminiert“ (Klasse 2: Darm wurde eröffnet ohne Austritt des Darminhalts), „kontaminiert“ (Klasse 3: Austritt von Darminhalt oder Inflammation). Zudem erfolgte eine Einteilung in Eingriffe des oberen, bzw. unteren gastrointestinal Trakts (GI), hepatopankreatikobiliären (HPB) Trakts und Eingriffe anderer Art.

Wundsituationen wurden eingeteilt in 0- keine, 1- Rötung, 2- Serom, 3- Infektion. Infektionen der Haut und des Subkutangewebes, von dem CDC als oberflächliche Infekte definiert (Horan, Gaynes et al. 1992), gingen in die Studie ein. Aufgenommen wurden hierbei nur Infektionen im Bereich der Inzision mit Beteiligung der Haut und des subkutanen Gewebes, welche innerhalb von 30 Tagen postoperativ auftraten. Mit eingeschlossen wurden oberflächliche Infektionen, die sich durch klassische Entzündungszeichen der Haut, Eitersekretion oder positive Bakterienkulturen äußerten, oder durch den behandelnden Arzt als solche diagnostiziert wurden (siehe Einleitung 1.3 Definition einer Wundinfektion).

Die Operationszeit, definiert als Zeit zwischen Hautschnitt und Hautnaht, wurde für die Untergruppenanalyse klassifiziert in „<180 Minuten“ oder „>180 Minuten“. Ein vorhandener Diabetes mellitus wurde in nicht-insulinpflichtig (NIDDM) und insulinpflichtig (IDDM) eingeteilt. Nikotinkonsum sowie die intraoperative Anus praeter (AP) -Anlage wurden in vorhanden oder nicht vorhanden eingeteilt. Ein Zustand nach Chemo- oder Strahlentherapie (CTx/RTx) wurde ebenso nach Vorhandensein eingeteilt, wobei die Chemotherapie falls vorhanden, zusätzlich zeitlich eingeteilt wurde in mehr oder weniger als 6 Wochen präoperativ.

| Gruppen | I | II | III | IV |
|--------------------------|-----------|------------|------------|-----------|
| Alter (Jahre) | <50 | 50-70 | >70 | - |
| BMI (kg/m ²) | <20 | 20-25 | 25-30 | >30 |
| Indikation | Neoplasie | Infektion | - | - |
| Operation | Oberer GI | Unterer GI | HPB | Andere |

| | | | | |
|-------------------|----------|-------------------------|------------------|-----------|
| Sauberkeit | Sauber | Sauber- kontaminiert | kontaminiert | - |
| Wundinfektion | Keine | Rötung | Serom | Infektion |
| Operationsdauer | <180 min | >180 min | - | - |
| Diabetes mellitus | Kein | NIDDM | IDDM | - |
| Nikotinkonsum | Kein | Ja | Ex-Raucher | - |
| AP-Anlage | Nein | Ja | - | - |
| Präop. (R)CTx | Nein | Ja, <6 Wo prä-op | Ja, >6 Wo prä-op | Radiatio |

Table 2: Patientendaten - Einteilung und Gruppen

Patienten-Matching

Für die folgende Analyse wurden Patienten mit Wundinfekten mit Patienten ohne WI gepaart, die in oben genannte Katalogisierung möglichst gut miteinander übereinstimmten („matching“). Um möglichst wenig Störvariablen einfließen zu lassen, wurden für die Analyse den Patienten mit Wundinfekten daher jeweils 2 Patienten ohne Wundinfekt zugeordnet, die in Bezug auf Vorgeschichte, Kriterien und Risikofaktoren ähnlich sind, sowie möglichst viele übereinstimmende Gruppierungen (siehe oben) aufweisen. Die Risikofaktoren untereinander wurden in eine von uns definierte Rangfolge gesetzt, um wichtigen WI-Faktoren möglichst eine Priorität bei der Abgleichung der Patienten zu geben. Am Wichtigsten hierbei war die Übereinstimmung der Kontamination (sauber/sauber-kontaminiert/kontaminiert) und der OP-Indikation (Neoplasie vs. Infektion). Als nächstes wurden der BMI, das Alter und die OP-Dauer abgeglichen. Zuletzt wurde auch die medizinische Vorgeschichte der Patienten aufeinander abgestimmt, um möglichst ähnliche Partner zu identifizieren, wobei Faktoren wie ein bestehender Diabetes mellitus, Nikotinabusus sowie vorangegangene Kortison- oder Chemotherapien abgeglichen wurden.

3.2.2. RNA Präparation

RNA Isolierung

RNA ist eine instabile einzelsträngige Nukleinsäure und wird sehr schnell von endo- und exogenen RNasen abgebaut, weshalb besondere Vorsicht und Sorgfalt bei der Verarbeitung des Gewebes sowie bei Transport und Lagerung aufgebracht werden muss.

Die Isolierung von RNA erfolgte unter Verwendung des RNEasy Lipid Tissue Mini Kit von Qiagen, und QIAzol Lysis Reagent, einer einphasigen Mischung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol.

Dabei wurden je Gewebeprobe 300mg gefrorenes Fettgewebe entnommen und in ein steriles Eppendorf-Gefäß gegeben. Um die Zellen aufzubrechen und das Gewebe zu homogenisieren, wurden die Proben nach Zugabe von 1ml QIAzol Lysis Reagenz zweimal 3 Minuten lang bei 20Hz im TissueLyser gemischt und anschließend 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform und 15 Sekunden Schütteln wurde erneut 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 15 Minuten bei 12000x g und 4°C zentrifugiert. Dabei entstehen drei Phasen: eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, eine weiße Interphase mit DNA und eine untere rötliche Phenolphase mit Proteinen. Um nun die Probe von DNA-Verunreinigungen zu befreien, wurde nur die obere Phase (ca. 600µl) in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen und mit 1 Volumen (ca. 600µl) 70% Ethanol aufgefüllt. Die restlichen Schritte wurden nach Protokoll (RNeasy Lipid Tissue Kit, Qiagen) durchgeführt und die extrahierte RNA anschließend bei -80°C gelagert.

RNA Quantifizierung/Qualifizierung

Die Ermittlung der RNA-Konzentration und RNA-Qualität wurde durch Messung der optischen Dichte mittels Photospektrometrie durchgeführt. Hierfür wurde der Photometer mit RNase freiem Wasser bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäure, kalibriert. Die Werte A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} stehen dabei jeweils für den Nukleinsäure-Protein und den Nukleinsäure-Phenol Quotienten, die beide ein Maß für den Reinheitsgrad der Präparation darstellen. Jede RNA-Probe sollte dabei die folgenden Werte aufweisen, um eine erfolgreiche Verarbeitung in weiteren Folgeexperimenten gewährleisten zu können.

- Konzentration > 100 ng/µl
- $A_{260}/A_{280} > 1,8$
- $A_{260}/A_{230} > 1,8$

RNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld unter konstanter Gleichstromspannung. Dabei wandern die elektrisch geladenen Teilchen im Gel je nach Größe und Ladung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit von der Kathode zur Anode.

Für dieses Verfahren wurden zunächst die Gelkammer und der Kamm mit 3% H₂O₂ gereinigt und mit autoklaviertem Wasser abgespült. Für die Kontrolle der RNA-Isolate wurde ein 1%iges Agarosegel angefertigt. Dazu wurde die abgewogene Agarose in DEPC-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Beimengung von 2,5ml 38% Formaldehyd und 5ml 10x MOPS-Puffer (pH 7,0) konnte das Gel gegossen werden.

Zur Vorbereitung der Proben wurden zunächst 2µg RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 10µl aufgefüllt. Anschließend wurde die RNA mit 10µl RNA-Auftragspuffer versetzt und 5 Minuten bei 75°C aufgekocht. Nach Abkühlen wurde jeder Probe 1µl 1% Ethidiumbromid hinzugefügt und der fertige Ansatz in die Geltaschen gegeben. Als RNA-Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet. Die Gelelektrophorese lief ca. zwei Stunden bei 60V. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte anschließend photographisch unter UV-Licht.

3.2.3. Mikroarray Experiment

Die Mikroarraytechnologie ermöglicht Analysen vieler tausend Transkripte und kann somit Aufschluss über die Expression von Genen in den verwendeten Gewebeproben geben.

Hierbei wird zunächst RNA aus den zu untersuchenden Proben isoliert und anschließend mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese wird nun zuerst in cRNA und dann erneut in einzelsträngige DNA umgeschrieben, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, und anschließend auf Trägerplatten gegeben. Die Platten enthalten zehntausende verschiedener DNA-Sonden aus Komplementärsträngen der entsprechenden gesuchten Sequenzen, an welche die cRNA hybridisieren kann. Findet eine sequenzspezifische Hybridisierung statt, kann diese durch Anregung mit UV-Licht detektiert und mittels Fluoreszenz-Scanner sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden die Human Gene 1.0 ST Arrays von Affymetrix verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Protokoll des GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay, welche von der Expression Core Facility im Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München durchgeführt wurden.

3.2.4. Quantitative real time PCR

Zur Bestätigung unserer Microarray-Ergebnisse führten wir nun eine PCR-Analyse mit ausgewählten Primern an den Proben unserer zwei Patientengruppen durch.

Synthese von cDNA

Ziel der reversen Transkription ist die Umschreibung von RNA in cDNA. Die Grundlage dieses Schrittes bildet das Enzym reverse Transkriptase, welches ausgehend von einem Oligo-d(T)-Primer, der an den Poly-(A)-Schwanz der RNA bindet, einen komplementären cDNA Strang synthetisiert. Diese Reaktion erfolgte mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen.

Zur weiteren Analyse mittels PCR müssen nun unsere ausgewählten RNA-Proben in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurden die Proben zuerst abhängig von ihrer RNA-Konzentration mit RNase freiem Wasser verdünnt, um bei einer Gesamtmenge von 12µl einen RNA-Gehalt von 800ng pro Probe zu erreichen.

Zur Eliminierung von genomischer DNA wurde jeder Probe 2µl gDNA Wipeout Buffer hinzugefügt und daraufhin 2 Minuten bei 42°C inkubiert.

Es wurde ein Mastermix des folgenden Ansatzes angefertigt:

| MasterMix reverse Transkription | Volumen pro Gefäß |
|--|--------------------------|
| Quantiscript Reverse Transkriptase | 1µl |
| Quantiscript RT Buffer, 5x | 4µl |
| RT Primer Mix | 1µl |
| MasterMix | 6µl |
| RNA | 12µl |
| gDNA Wipeout Buffer | 2µl |

Tabelle 3: Pipettierschema reverse Transkription

Die Proben wurden mit je 6µl des zuvor angesetzten Mastermixes versetzt und für 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase folgte noch eine Inkubation von 3 Minuten bei 95°C. Im Anschluss wurde jeder Probe 80µl PCR-Grade Wasser hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die somit hergestellte cDNA unserer Proben konnte nun im nächsten Schritt für die Durchführung einer qrt-PCR genutzt werden.

Quantitative real time PCR

Durch den Einsatz spezifischer Primer ermöglicht die qrt-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction) eine exponentielle Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Die Anzahl neugebildeter Moleküle wird durch anlagernden fluoreszierenden Farbstoff Zyklus für Zyklus erfasst und somit ihre Menge bestimmt. Der Zyklus besteht dabei aus drei Teilschritten, der mehrmals hintereinander wiederholt wird.

Beim ersten Schritt der Denaturierung wird die Ziel-DNA zunächst erhitzt, um beide DNA-Stränge voneinander zu trennen. Den zweiten Schritt bildet das Annealing, bei dem sich der hinzugefügte Primer an die entstandenen Einzelstränge anlagert. Beim letzten Schritt, der Elongation, beginnt die hitzestabile DNA-Polymerase am 3'-Ende des Primers die Synthese des komplementären DNA-Strangs, unter Verbrauch von Nukleotiden.

Die qRT-PCR wurde mittels dem LightCycler 480 SYBR Green I Master System von Roche durchgeführt.

Während den Elongationsphasen binden immer mehr SYBR Green I Moleküle an die neu synthetisierte DNA, was zur Anregung der Farbmoleküle führt und einen Anstieg der Fluoreszenz bewirkt. Da diese Reaktion kontinuierlich beobachtet wird, kann dieser Anstieg der Fluoreszenz in Echtzeit (real-time) dargestellt werden.

Hierbei verwendeten wir die Proben der im vorherigen Schritt bereits synthetisierten cDNA. Alle folgenden Schritte erfolgten unter ständiger Kühlung auf Eis. Folgender weiterer Mastermix wurde angesetzt:

| MasterMix PCR | Volumen pro Gefäß |
|----------------------|--------------------------|
| Mastermix SYBR Green | 10µl |
| PCR-Grade Wasser | 3µl |

| | |
|------------------|-------------|
| Primer | 2µl |
| MasterMix | 15µl |
| cDNA | 5µl |

Tabelle 4: Pipettierschema qRT-PCR

Es wurde je Probe 5µl cDNA entnommen, in eine 96-Loch Platte pipettiert und 15µl des Supermixes hinzugefügt. Die Platte wurde daraufhin mit einer Folie verschlossen und 3 Minuten lang bei 300xg zentrifugiert. Als Negativ-Kontrolle diente reines PCR-grade Wasser. Zur Primer-Kontrolle wurde das Haushaltsgen HPRT benutzt. Die PCR erfolgte mittels LightCycler 480 mit folgenden Einstellungen:

| Analysis Mode | Cycles | Segment | Target Temperature | Hold Time | Acquisition Mode |
|----------------------|---------------|----------------|---------------------------|------------------|-------------------------|
| Preincubation | | | | | |
| None | 1 | | 95°C | 5min | none |
| Amplification | | | | | |
| Quantification | 45 | Denaturation | 95°C | 10 s | none |
| | | Annealing | 60°C | 10 s | none |
| | | Extension | 72°C | 30 s | single |
| Melting Curve | | | | | |
| Melting Curve | 1 | | 95°C | 5 s | none |
| | | | 65°C | 59 s | none |
| | | | 97°C | 0 s | continuous |
| Cooling | | | | | |
| None | 1 | | 40°C | 10 s | none |

Tabelle 5: Protokoll qRT-PCR

Für alle Primer (

Tabelle 1) wurde eine Zyklenzahl von 45 verwendet.

Agarose Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der verschiedenen PCR Amplifikationsprodukten wurden die durch PCR vervielfachten DNA Fragmente durch eine Agarose Gelelektrophorese geprüft. Hierbei wurden die Proben auf ein 1,5 prozentiges Agarosegel gegeben, welches mit 3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt worden war. Je 12 µl jeder Probe wurden in die Geltaschen gegeben. Zur Bestimmung der Fragmentlänge der amplifizierten DNA wurde zudem eine DNA-Leiter als Molekulargewichtsmarker auf dem Gel mitgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TBE Puffer. Die Elektrophorese erfolgte für 40 Minuten bei 120 Volt.

Die über Fluoreszenz unter UV-Licht nachgewiesenen Banden der amplifizierten DNA wurden mit einem Geldokumentations-System photographisch dokumentiert.

Primer-Design

Die Primerpaare (

Tabelle 1), die für die quantitative real time PCR verwendet wurden, wurden über NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) erstellt. Die Primer befinden sich in codierenden Regionen.

3.2.5. Immunohistochemie

Immunhistochemische Nachweisverfahren beruhen auf dem Prinzip der spezifischen Bindung von Antikörpern an Antigenen bestimmter Gewebestrukturen, durch welche diese sichtbar gemacht werden können.

Hierfür wurden die bei -80°C gefrorenen Fettgewebeproben mit 4% PFA fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Konsekutiv wurden Abschnitte dieser paraffinbeschichteten Gewebeproben mit einer Dicke von 3-5mm abgewaschen und mit üblichen Methoden rehydriert.

Zur Antigenentfernung wurden die Objektträger mittels Zitratbuffer (pH 6.0) und durch anschließende 10-minütiger Erhitzung vorbehandelt.

Zur Unterbindung der endogenen Peroxidase-Aktivität folgte eine 10 minütige Inkubation in 3% H₂O₂ (Wasserstoffperoxid)-haltigem deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur. Die Bildung unspezifischer Bindungen wurde mit 3% TBS-BSA blockiert.

Die Schnitte wurden anschließend über Nacht mit entsprechenden Antikörpern bei 4°C inkubiert, gefolgt durch eine Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper. Zuletzt erfolgte die Färbung mit Diaminobenzidin sowie die Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Als primäre Antikörper wurden die oben angeführten Antikörper verwendet.

Die immunhistochemische Reaktion wurde im Immunfluoreszenzmikroskop (Fa.Dako) nachgewiesen und analysiert.

3.2.6. Bioinformatische Analyse der Microarraydaten

Zuerst führten wir eine Analyse mittels dem IPA (Ingenuity Pathway Analysis)-System von QIAGEN am kompletten Mikroarray-Gensatz durch. Dieses System ermöglicht die Analyse, die Integration und damit ein besseres Verständnis der Daten aus Genexpressions-Mikroarrays. Es liefert Informationen über Gene, Proteine, Chemikalien, Medikamente und den Aufbau interaktiver Modelle und hilft somit beim Verständnis der Signifikanz der Daten im Kontext breiter biologischer und chemischer Systeme. Hiermit ist unter anderem die Identifikation von molekularen Stoffwechselwege und biologischen Funktionsnetzen möglich, sowie eine Darstellung der am stärksten exprimierten Gene.

Zur weiteren Analyse nutzten wir jedoch das System der GO-Terminologie.

Die Gene Ontology ist eine internationale, frei zugängliche Ontologie, in der einzelnen Genen und Proteinen Annotationen (GO-Termini) zugeordnet werden können. Hierdurch können zelluläre Komponenten, molekulare Funktionen sowie biologische Prozesse in dieser Datenbank abgeglichen werden (<http://www.geneontology.org/>).

Wir führten eine Normalisierung mittels der im R-Paket von Bioconductor enthaltenen Robust Multichip Average (rma) Methode durch. Diese Software ermöglicht die Verarbeitung der Daten, die durch die Affymetrix-Microarrays ermittelt werden konnten. Hierdurch lassen sich viele Daten extrahieren, u.a. die log-fold Differenz zwischen beiden experimentellen Gruppen, durchschnittliche Expressionen bezogen auf alle Proben, t-Statistiken (differentielle Expression), Signifikanzen sowie log-Odds Ratios.

In unserer Arbeit wurden nun Gene, die in allen Proben sehr schwach exprimiert waren, über die Filtermethode „nsFilter“ ausgefiltert und nur Gene mit einer differentiellen Expression mit p-Werten <0.05 ausgewählt. Für diese Gengruppe wurde anschließend die funktionelle Analyse durchgeführt. Dabei wurden alle GO-Termini (Gene Ontology) innerhalb des Gensets ausgewählt und eine hypergeometrische Testmethode durchgeführt, um im Set überrepräsentierte Termini zu identifizieren. Termini mit einer signifikanten Überrepräsentation ($p < 0.0001$, minimal category size $N=100$) wurden selektiert. Zur Visualisierung der Expressionsprofile aller differentiell exprimierten Gene im normalisiertem Datensatz, welche durch mindestens einen überrepräsentierten GO-Termini annotiert sind, wurde eine sogenannte Heatmap erstellt. Ähnliches wurde für die Untersuchung der KEGG Pathways durchgeführt. Hierbei wurden die häufigsten „Pfade“ innerhalb des oben genannten Gensets ausgewählt und wiederum durch ein Clustering als Heatmap visualisiert. Eine Heatmap ist dabei eine graphische Darstellung einer Datenmatrix in der zweidimensionale Werte farblich repräsentiert werden. Dies wird in der Molekularbiologie genutzt, um Expressionslevel großer Mengen an Genen zu visualisieren, diese gleichzeitig in vielen Proben zu vergleichen und somit schnell ein prägnantes Bild der Daten zu gewinnen.

Über die Funktion „hclust“, welche im Software Paket „R-Paket“ (Bioconductor) enthalten ist, wurden die Proben, abgebildet in unserer Heatmap, durch die „complete-linkage“ Abstandsfunktion in einem uninformierten Cluster neu angeordnet. Hierdurch werden neue Gruppen in den Daten identifiziert, deren Objekte große Ähnlichkeitsstrukturen aufweisen.

Identifikation von Expressionsmustern

Zur Identifikation einer Kombination weniger differentiell exprimierter Gene, die beide Gruppen (WI und Kontrolle) mit hoher Präzision charakterisiert, wurde das Konzept eines Expressionsmusters durch die folgende Methode beschrieben.

Ein sog. Expressionsmuster $f(g_1, \dots, g_n)$ ist eine Boolesche Funktion welche nur NICHT (Negation) und UND (Konjunktion) Operatoren beinhaltet. Jedes Symbol repräsentiert hierbei ein Gen, z.B.

$$f(A, B, C) = A \wedge \neg B \wedge C$$

und bedeutet die Korrelation der Anwesenheit/Abwesenheit ausgewählter Gene in der Probe. Ein Expressionsmuster gilt für einen vorgegebenen Satz an Variablen (Gene) g_1, \dots, g_n als erfüllt wenn $f(g_1, \dots, g_n) = 1$

Die Expressionswerte aller Gene wurden für alle Proben diskretisiert und wie folgt zugewiesen:

$$b_{i,s} = \begin{cases} 1 & \text{if } g_{i,s} \geq \mu(g_i) \\ 0 & \text{else} \end{cases}$$

Die diskretisierten Expressionswerte wurden nun darauf hin untersucht, ob für gewisse Proben ein Expressionsmuster f erfüllt war. Hierfür wurde $f(b_{f_1,s}, \dots, b_{f_n,s}) = 1$ evaluiert, in dem f_1, \dots, f_n Kennzahlen für Gene sind, die als Eingangsvariablen fungieren.

Um nun Expressionsmuster zu identifizieren, die hoch spezifisch und sensitiv für beide Gruppen (WI, Kontrolle) sind, wurden alle möglichen Muster die bis zu 6 Variablen beinhalten in Betracht gezogen, wobei jede Variable Teil der Top-50 differentiell exprimierter Gene sein musste.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Nutzung von mehr als 2 Eingangsvariablen die Genauigkeit des Expressionsmuster nicht verbesserte, weshalb folglich nur Muster mit 2 Variablen gewählt wurden, das heißt paarweise Korrelationen untersucht wurden. Für ein vorgegebenes Expressionsmuster wurde die Wahrscheinlichkeit, $P(SSI|f=1)$, eine WI-Probe SSI zu beobachten, unter der Bedingung, dass die Regel $f=1$ erfüllt ist, wie folgt berechnet (Baysian Statistik):

$$P(SSI | f = 1) = \frac{P(f=1 | SSI) P(SSI)}{P(f=1)}$$

Hier sind $P(f=1 | SSI)$ die Wahrscheinlichkeit, dass $f=1$ wenn eine WI-Probe SSI beobachtet wird und $P(f=1)$ und $P(SSI)$ die jeweiligen Einzelwahrscheinlichkeiten. Regeln wurden nur selektiert, wenn die Wahrscheinlichkeit 1 war, was bedeutet, dass die Spezifität der Regel 1 ist. Anschließend wurde die Sensitivität als Verhältnis der WI Proben, welche die Regel erfüllen, zur Gesamtzahl aller WI Proben errechnet. Mit dieser Methode konnten Regeln mit einer Sensitivität von 80% sowie einer Spezifität von 100% ermittelt werden.

Um nun die Signifikanz der Ergebnisse zu belegen, wurde die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der ein Gen-Muster $f(A,B,C)$ mit solchen Eigenschaften durch Zufall beobachtet werden kann. Hierfür wurde aus dem Chip, welcher 32,321 Gene enthält, eine zufällige Auswahl von 1,000,000 Genpaaren (entsprechend 2 verwendeten Eingangsvariablen) getroffen, aus denen ein *Null Modell* erstellt wurde. Für jedes Paar wurde nun die Sensitivität aller möglichen Expressionsmuster beurteilt, während die Spezifität auf 100% festgelegt wurde. Die resultierende Verteilung der Sensitivitätsraten zeigte, dass bei allen untersuchten Zufallspaaren nur 5 Expressionsmuster eine Sensitivität von 80% erreichten. Daraus kann geschlossen wer-

den, dass die Wahrscheinlich, ein Muster mit 80% Sensitivität durch Zufall zu entdecken, bei $5 \cdot 10^{-6}$ liegt. Im Identifikationsprozess wurden nun alle möglichen Paare innerhalb der Top-50 der differentiell exprimierten Gene geprüft.

Da sich bei 2 Genen 22 mögliche Muster ergeben, lässt sich errechnen, dass $5 \cdot 10^{-6} \cdot \binom{50}{2} \cdot 2^2 = 0.0245$ Muster durch Zufall beobachtet werden können. Die Einzelwahrscheinlichkeit beträgt $5 \cdot 10^{-6}$, die Zahl der Paare ist durch den Binomialkoeffizienten gegeben und die Anzahl der möglichen Funktionen $f(A,B)$ pro Paar ist 2^2 . Hieraus ergibt sich, dass die identifizierten Muster als signifikant angesehen werden können.

3.2.7. Statistische und bio-informatische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurden die GraphPad Prism 4 Software und IBM SPSS 19 Software verwendet. Zum Vergleich der Verteilung unterschiedlicher Faktoren unter der WI- und der Kontrollgruppe wurden der χ^2 -Test (chi-square) sowie der Fisher's Exact Test verwendet. Zum Vergleich von Gruppen wurden die Ergebnisse mit dem ungepaarten t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Die Grenze statistischer Signifikanz wurde bei einem p -Wert von $p < 0.05$ festgelegt. Alle angegebenen statistischen Werte sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

IV. ERGEBNISSE

4.1. Patientendaten

Insgesamt wurden 92 Patienten die im Zeitraum vom 09/2009 bis 05/2010 in der chirurgischen Abteilung des Klinikum Rechts der Isar operiert wurden in diese Studie aufgenommen. Das Durchschnittsalter lag bei $61 \pm 14,6$ Jahren, zehn der 92 Patienten entwickelten eine Wundheilungsstörung. Die demographischen Daten aller Patienten sind in *Tabelle 6* aufgelistet.

| Variablen | n oder Werte | % |
|---|----------------|-----|
| Patienten Gesamtzahl | 92 | |
| Alter (Jahren, MW \pm SD) | $61 \pm 14,6$ | - |
| BMI (kg/m^2 , MW \pm SD) | $26 \pm 3,6$ | - |
| Operationsdauer (min, MW \pm SD) | $213 \pm 97,8$ | - |
| Geschlecht | | |
| • Männlich | 56 | 61% |
| • Weiblich | 36 | 39% |
| Operationsindikation | | |
| • Neoplasie | 77 | 84% |
| • Infektion | 11 | 12% |
| • Andere | 4 | 4% |
| Ort des Eingriffs | | |
| • Oberer GI -Trakt | 17 | 18% |
| • Unterer GI-Trakt | 19 | 21% |
| • HPB | 45 | 50% |
| • Andere | 10 | 11% |
| Laparotomie | | |
| • Median | 76 | 83% |
| • Transverse | 6 | 6% |
| • Andere | 10 | 11% |
| OP Sauberkeit | | |
| • Sauber | 29 | 32% |
| • Sauber-kontaminiert | 62 | 67% |
| • Kontaminiert | 1 | 1% |
| Anus praeter Anlage | | |
| • Ja | 12 | 13% |
| • Nein | 80 | 87% |

| | | |
|-------------------------------------|----|-----|
| Diabetes Mellitus | | |
| • Kein | 69 | 75% |
| • NIDDM | 15 | 16% |
| • IDDM | 8 | 9% |
| Kortisoneinnahme | | |
| • Ja | 1 | 1% |
| • Nein | 91 | 99% |
| Raucheranamnese | | |
| • Nichtraucher | 55 | 65% |
| • Ex-raucher | 10 | 12% |
| • Raucher | 19 | 23% |
| Zustand nach Chemotherapie/Radiatio | | |
| • Ja | 25 | 27% |
| • Nein | 67 | 73% |
| WI | | |
| • Ja | 10 | 11% |
| • Nein | 82 | 89% |

Tabelle 6: Demographische Daten der Patientenkohorte – MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, BMI: body mass index, Oberer GI-Trakt: oberer gastrointestinal Trakt, unterer GI-Trakt: unterer gastrointestinal Trakt, HPB: hepato-pancreato-biliär, NIDDM: nicht insulinpflichtiger Diabetes mellitus, 2-IDDM: insulinpflichtiger Diabetes mellitus, WI: Wundinfektion.

Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden zwei Gruppen gebildet: eine WI-Gruppe und eine Kontroll-Gruppe, die sich jedoch in ihren sonstigen Eigenschaften nicht unterscheiden sollen, um einen optimalen Vergleich zu ermöglichen. Hierfür wurden jedem einzelnen WI-Patienten zwei Kontrollfälle (matched pairs) aus der gleichen Kohorte zugeordnet, basierend auf dem Risikoprofil der Patienten. Bei der Auswahl der Vergleichseigenschaften wurden folgende Variablen priorisiert: Alter, Geschlecht, Wundklassifikation, Operationsdauer, Operationsindikation, Art der OP sowie BMI und bestehender Diabetes mellitus. Hierbei wurde darauf geachtet, dass so viele Eigenschaften wie möglich zwischen diesen Paaren übereinstimmen. Durch die Auswahl von 2 Kontrollpatienten pro WI-Patient wurde ein adäquates Matching ermöglicht, sodass nach statistischer Analyse beider Gruppen schließlich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von Risikofaktoren und anderer Störfaktoren zwischen beiden Patientengruppen entdeckt werden konnten (*Tabelle 7*).

| Variablen | WI (n=10) | Keine WI (n=20) | p-Wert |
|-------------------------------------|--------------|--------------------|--------|
| Alter (Jahre, MW ± SEM) | 62 ± 5.0 | 62 ± 3.4 | 0.90 |
| Operationsdauer (min, MW ± SEM) | 278 ± 37.3 | 249 ± 23.2 | 0.50 |
| BMI (kg/m ²) | | | 0.14 |
| • BMI > 30 | 4 | 2 | |
| • BMI < 30 | 6 | 18 | |
| Geschlecht | | | 0.06 |
| • Männlich | 8 | 8 | |
| • Weiblich | 2 | 12 | |
| Operationsindikation | | | 1.00 |
| • Neoplasie | 7 | 14 | |
| • Infektion | 3 | 6 | |
| Ort des Eingriffs | | | 0.55 |
| • Oberer GI-Trakt | 1 | 2 | |
| • Unterer GI-Trakt | 6 | 8 | |
| • HPB | 3 | 10 | |
| Anus praeter Anlage | | | 0.46 |
| • Ja | 5 | 13 | |
| • Nein | 5 | 7 | |
| Laparotomie | | | 0.33 |
| • Median | 9 | 20 | |
| • Transverse | 1 | 0 | |
| OP Sauberkeit | | | - |
| • Sauber | 0 | 0 | |
| • Sauber-kontaminiert | 10 | 20 | |
| • Kontaminiert | 0 | 0 | |
| Diabetes mellitus | | | 1.00 |
| • Ja | 1 | 2 | |
| • Nein | 9 | 18 | |
| Kortisoneinnahme | | | 1.00 |
| • Ja | 0 | 1 | |
| • Nein | 10 | 19 | |
| Raucheranamnese | | | 0.31 |
| • Nichtraucher | 5 | 14 | |
| • Ex-Raucher | 1 | 3 | |
| • Raucher | 4 | 3 | |
| Zustand nach Chemotherapie/Radiatio | | | 1.00 |
| • Ja | 2 | 4 | |
| • Nein | 8 | 16 | |

Tabelle 7: Vergleich klinischer Charakteristika zwischen der WI-Gruppe und der Kontrollgruppe. Bei keinem der untersuchten Faktoren besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. MW: Mittelwert, SEM: Standardfehler.

4.2. RNA Isolation

Es wurde bei allen 92 in die Studie aufgenommenen Patienten eine RNA-Isolation aus den gesammelten Fettgewebeproben durchgeführt. Quantität und Qualität der isolierten RNA wurden photospektrometrisch evaluiert. Die Werte aller in weiteren Untersuchungen verwendeten RNA-Proben lagen bei Konzentrationswerten von über 100 ng/µl und einer Ratio von $A_{260}/A_{280} > 1,8$ sowie $A_{260}/A_{230} > 1,8$. Alle benutzten RNA-Proben wiesen eine adäquate Qualität und Quantität vor.

4.3. Microarray Analyse

Zur Identifikation eines möglichen spezifischen Genexpressionsprofils an Unterhautfettgewebe von Patienten, die im Verlauf einen WI entwickelten, wurde die aus dem Fettgewebe isolierte RNA der WI-Patienten sowie die ihrer zugewiesenen Kontrollfälle einer Mikroarray Analyse unterzogen.

Unter Verwendung einer Grenze statistischer Relevanz bei einem p-Wert von $<0,05$, stellten sich nach Auswertung der Mikroarraydaten 1025 Gene als signifikant differentiell exprimiert, zwischen der WI- und der Kontrollgruppe, dar. Dies repräsentiert 3,17% aller auf dem Array vorhandenen Gene.

Diesen Gensatz unterzogen wir einer ersten Analyse mittels des IPA (ingenuity pathway analysis) Verfahrens (siehe Material und Methoden 3.2.6 Bioinformatische Analyse der Mikroarraydaten), um einen ersten Überblick über die Daten zu erhalten und erste Rückschlüsse ziehen zu können. Diese Analyse ermöglicht unter anderem die Identifikation von stark ausgeprägten Netzwerken und Stoffwechselwegen sowie die Aufzählung der zehn am stärksten und schwächsten in ihrer Expression veränderten Gene. Folgende molekulare Netzwerke waren besonders präsent: Kohlenhydratmetabolismus, Lipidmetabolismus, Haar- und Haut-Entwicklung, Zellzyklus und -morphologie, Immunzelltransport, Energieerzeugung sowie Zellinteraktionsprozesse. Die 20 Gene mit der höchsten Log Ratio, das heißt der stärksten differentiellen Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe, sind mit ihren Expressionswerten in Tabelle 8 zusammengefasst.

| Gen Symbol | Expressionswert | Gen Symbol | Expressionswert |
|------------|-----------------|------------|-----------------|
| RPS4Y1 | ↑ 1,556 | AZGP1 | ↓ -1,385 |
| DDX3Y | ↑ 1,547 | PCK1 | ↓ -1,278 |
| EIF1AY | ↑ 1,323 | LGALS12 | ↓ -0,861 |
| UTY | ↑ 1,226 | APOB | ↓ -0,774 |
| KDM5D | ↑ 1,224 | SLC27A2 | ↓ -0,727 |
| AQP9 | ↑ 1,172 | GYG2 | ↓ -0,706 |
| NR4A2 | ↑ 1,085 | GPD1L | ↓ -0,656 |
| NR4A1 | ↑ 1,059 | CALCRL | ↓ -0,644 |
| THY1 | ↑ 0,965 | ACSL1 | ↓ -0,642 |
| SFRP4 | ↑ 0,961 | ALDH1L1 | ↓ -0,633 |

Tabelle 8: Liste der jeweils 10 am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene nach IPA-Systemanalyse des kompletten Mikroarray-Gensatzes. Die Pfeile deuten auf die Hochregulierung (↑) oder Herunterregulierung (↓) des Gens.

Wegen der hohen Komplexität, die eine genauere Analyse all dieser 1025 Gene darstellen würde, wurden nur die top-50 Gene mit dem niedrigsten p-Wert für weitere Analysen ausgewählt.

Wie in *Tabelle 9* dargestellt, beobachteten wir die stärkste Expressions-Hochregulierung bei dem Gen ALDH1A3 (fold change=1,59) und die stärkste Herunterregulierung bei AZGP1 (fold change=-2,66). Der niedrigste p-Wert ($p=0,000082$) und gleichzeitig die zweitstärkste Herunterregulierung fand sich bei PCK1.

Ergebnisse

| Gen Symbol | Genname | RefSeq Id | P-Wert | Fold Change |
|------------|--|--------------|----------|-------------|
| PCK1 | phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) | NM_002591 | 0.000082 | -2.45 |
| ACSM5 | acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5 | NM_017888 | 0.000146 | -1.52 |
| B3GNT8 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8 | NM_198540 | 0.000162 | 1.26 |
| LOC150622 | hypothetical LOC150622 | NR_026832 | 0.000163 | 1.17 |
| AZGP1 | alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding | NM_001185 | 0.000197 | -2.66 |
| PDP2 | pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2 | NM_020786 | 0.000210 | -1.4 |
| MTHFD1 | methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase | NM_005956 | 0.000259 | -1.43 |
| ANGPT2 | angiopoietin 2 | NM_001118887 | 0.000290 | 1.5 |
| SHMT1 | serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble) | NM_004169 | 0.000353 | -1.43 |
| SRP68 | signal recognition particle 68kDa | NM_014230 | 0.000361 | -1.24 |
| PAK3 | p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3 | NM_001128166 | 0.000418 | 1.26 |
| SLC16A3 | solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4) | NM_001042422 | 0.000470 | 1.23 |
| CLEC4A | C-type lectin domain family 4, member A | NM_016184 | 0.000512 | 1.33 |
| OR5M9 | olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 9 | NM_001004743 | 0.000637 | 1.13 |
| IL4R | interleukin 4 receptor | NM_000418 | 0.000683 | 1.36 |
| TXLNG | taxilin gamma | NM_001168683 | 0.000800 | -1.38 |

Ergebnisse

| | | | | |
|-----------|---|--------------|----------|-------|
| MAOB | monoamine oxidase B | NM_000898 | 0.000830 | -1.42 |
| ETFA | electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide | NM_000126 | 0.000914 | -1.34 |
| ALDH6A1 | aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1 | NM_005589 | 0.000942 | -1.57 |
| IMMP2L | IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like (<i>S. cerevisiae</i>) | NM_032549 | 0.000985 | -1.27 |
| IRGQ | immunity-related GTPase family, Q | NM_001007561 | 0.001137 | 1.25 |
| STK39 | serine threonine kinase 39 | NM_013233 | 0.001211 | -1.32 |
| PDPK1 | 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 | NM_002613 | 0.001259 | 1.27 |
| GYG2 | glycogenin 2 | NM_001079855 | 0.001270 | -1.64 |
| TMEM120A | transmembrane protein 120A | NM_031925 | 0.001272 | -1.46 |
| THBS3 | thrombospondin 3 | NM_007112 | 0.001336 | 1.36 |
| HOXD8 | homeobox D8 | NM_001199746 | 0.001380 | -1.25 |
| SBNO2 | strawberry notch homolog 2 (<i>Drosophila</i>) | NM_001100122 | 0.001396 | 1.21 |
| CDK6 | cyclin-dependent kinase 6 | NM_001145306 | 0.001398 | 1.32 |
| PLA2G16 | phospholipase A2, group XVI | NM_001128203 | 0.001485 | -1.41 |
| DECR1 | 2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial | NM_001359 | 0.001490 | -1.41 |
| IKBKE | inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon | NM_001193321 | 0.001613 | 1.24 |
| OR51E1 | olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 1 | NM_152430 | 0.001667 | -1.45 |
| TNFRSF10B | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b | NM_003842 | 0.001747 | 1.4 |

Ergebnisse

| | | | | |
|---------|---|--------------|----------|-------|
| PLXDC1 | plexin domain containing 1 | NM_020405 | 0.001747 | 1.34 |
| GPT2 | glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2 | NM_001142466 | 0.001822 | -1.49 |
| ALDH1A3 | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 | NM_000693 | 0.001873 | 1.59 |
| TBX15 | T-box 15 | NM_152380 | 0.001958 | -1.44 |
| NR2E1 | nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1 | NM_003269 | 0.001964 | 1.12 |
| LPAL2 | lipoprotein, Lp(a)-like 2, pseudogene | NR_028092 | 0.001980 | 1.26 |
| GGCT | gamma-glutamylcyclotransferase | NM_001199815 | 0.002157 | -1.46 |
| BCAT2 | branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial | NM_001164773 | 0.002236 | -1.37 |
| ALDH1L1 | aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 | NM_012190 | 0.002288 | -1.56 |
| MCCC1 | methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 (alpha) | NM_020166 | 0.002339 | -1.47 |
| MDH1 | malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) | NM_001199111 | 0.002534 | -1.45 |
| VDR | vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor | NM_000376 | 0.002628 | 1.16 |
| THRAP3 | thyroid hormone receptor associated protein 3 | NM_005119 | 0.002630 | -1.18 |

Tabelle 9: Top 50 differentiell exprimierte Gene mit dem niedrigsten p-Wert

Hiernach führten wir ein hierarchisches Clustering durch (siehe Material und Methoden 3.2.6 Bioinformatische Analyse der Microarraydaten) um die Proben mit ihren top-50 Genen in einer Heatmap anzuordnen (*Abbildung 3*). Dies ermöglicht die Visualisierung von Daten mit zweidimensionaler Definition, in unserem Fall die Hoch- (rot) oder Herunterregulation (blau) von Genen, welche farbkodiert in einem Diagramm dargestellt werden. Aus der Heatmap ist ersichtlich, dass alle WI-Proben mit einer Ausnahme, gruppiert auftreten, was die Existenz von Ähnlichkeiten zwischen den Probengruppen nahelegt.

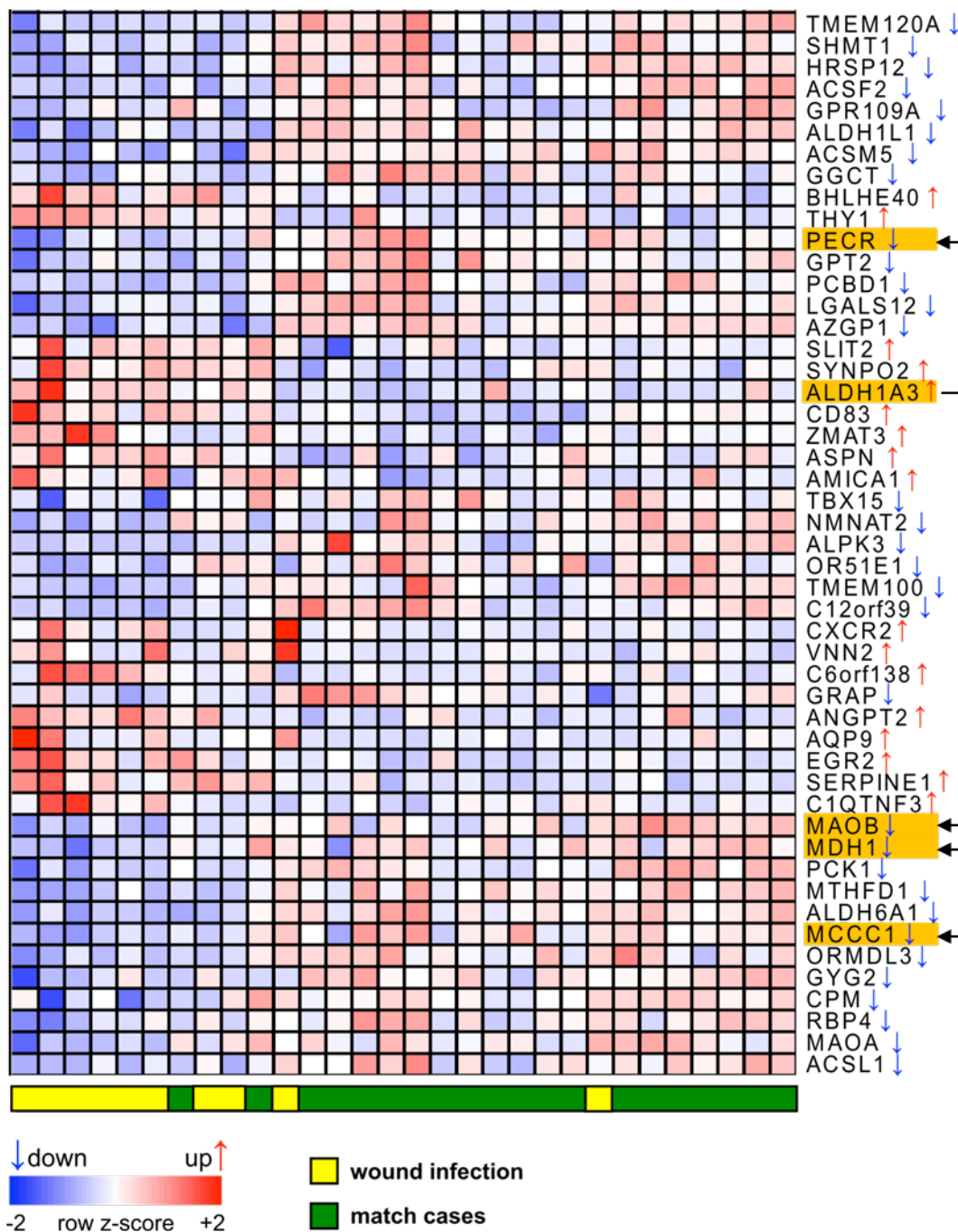


Abbildung 3: Heatmap der "top-50" Gene. Es wurde ein hierarchisches Clustering mit „complete linkage function“ zur Darstellung einer Heatmap, unter Nutzung der top 50 differentiell exprimierten Gene mit den niedrigsten p-Werten, generiert. Jede Reihe entspricht einem Gen, welches auf der rechten Seite der Heatmap benannt ist. Ein blaue Färbung innerhalb der Heatmap steht hierbei für eine Runterregulation, während rot für eine Hochregulation steht. Mit Ausnahme einer Probe zeigte sich ein Clustering der Wundinfektproben (gelb) auf der linken Seite, während sich die Kontrollproben (grün) eher gesondert links gruppierten. Die gelb markierten Gene stellen die identifizierten Expressionsmuster dar, wobei jeweils „ALDH1A3 hochreguliert“ in Kombination mit einer der restlichen markierten Gene als Muster mit 80% Sensitivität der WI-Proben übereinstimmen.

Aufgrund der ausgeprägten „Zwei-Gruppen“-Verteilung im Clustering beschlossen wir nach spezifischen und für WI-Proben charakteristischen Expressionsmustern zu suchen. Hierfür wurden die Expressionswerte der „top-50“ differentiell exprimierten Gene in „erhöht“ oder „erniedrigt“ eingeteilt, wobei der durchschnittliche Expressionswert jedes einzelnen Gens als Schwellenwert festgelegt wurde. Daraufhin wurden durch Screening aller möglichen Kombinationen zweier Gene Boole'sche Expressionsmuster identifiziert. Durch Anwendung dieser Methode war es möglich, Muster zu entdecken, die hochspezifisch für WI-Proben waren und auf 80% dieser zutrafen, jedoch auf keine Probe der Kontrollgruppe. Die daraus resultierenden Muster wurden nach ihrer Spezifität zur WI-Gruppe geordnet (*Tabelle 10*).

| Expressionsmuster | WI-Proben (%) | Kontroll-Proben (%) |
|--------------------|---------------|---------------------|
| ALDH1A3 ↑ MAOB ↓ | 80% | 0 |
| ALDH1A3 ↑ MDH1 ↓ | 80% | 0 |
| ALDH1A3 ↑ PECR ↓ | 80% | 0 |
| ALDH1A3 ↑ MCCC1 ↓ | 80% | 0 |
| ANGPT2 ↑ THY1 ↑ | 70% | 0 |
| AMICA1 ↑ DDT ↓ | 70% | 0 |
| AMICA1 ↑ MDH1 ↓ | 70% | 0 |
| ALDH1A3 ↑ ANGPT2 ↑ | 70% | 0 |
| C6ORF138 ↑ TBX15 ↓ | 60% | 0 |
| ZMAT3 ↑ SHMT1 ↓ | 60% | 0 |

Tabelle 10: „top 10“ der für WI-Proben charakteristischen Expressionsmuster. ↑ steht hier für hochregulierte Gene, ↓ für herunterregulierte Gene. Ein Expressionsmuster wurde immer als eine Kombination zweier Gene angesehen. Die Spezifität der Genmuster für WI-Proben reicht von 80-60%, während keine der oben angezeigten Paare in Proben der gematchten Kontrollpaare nachgewiesen werden konnte.

Die Muster mit der höchsten Spezifität waren „ALDH1A3 erhöht, MAOB erniedrigt“, „ALDH1A3 erhöht, MDH1 erniedrigt“, „ALDH1A3 erhöht, PECR erniedrigt“ und „ALDH1A3

erhöht, MCCC1 erniedrigt“. Über Anwendung statistischer Methoden (siehe Material und Methoden 3.2.7 Statistische und bio-informatische Auswertung) konnte quantitativ ausgeschlossen werden, dass die Beobachtung charakteristischer Muster für die WI-Proben zufällig ist, und diese daher als biologisch relevant angesehen werden können. Es wurde anschließend versucht, Muster mit mehr als 2 Genen (bis zu 6 Genen) zu identifizieren, jedoch ergab keines dieser Muster eine höhere Spezifität.

Weiterhin zeigte sich, dass die maximale Spezifität von 80% gut zu unseren Beobachtungen von 2 Ausreißern im Clustering passt.

Um die nun identifizierten Gen-Korrelationen ganzheitlich zu nutzen, wurde das ganze Set der differentiell exprimierten Gene ($p < 0,05$) durch funktionelle Annotationen charakterisiert. Hierfür wurden zunächst die vorhandenen GO-Termini innerhalb des Gensets über Datenbankvergleiche (siehe Material und Methoden 3.2.6 Bioinformatische Analyse der Microarraydaten) bestimmt und die in den 1025 Genen überrepräsentierten, GO-Termini über einen hypergeometrischen Test identifiziert. Alle statistisch überrepräsentierten Termini ($p < 0,0001$, Mindestgröße der Kategorie $N=100$) wurden selektiert und die Expressionsprofile aller Gene, die durch diese GO-Termini annotiert waren, über ein Clustering visualisiert (*Abbildung 5*). Diese Analyse enthüllte, dass die Mehrheit der überrepräsentierten GO-Termini mit metabolischen Prozessen assoziiert ist. Um mögliche Artefakte durch die Auswahl der Datenbank zu vermeiden, wurden neben funktionellen Annotationen auch die KEGG „pathways“ berücksichtigt. Hierzu wurde erneut nach den, im Datenset der differentiell exprimierten Gene ($p < 0,01$) am häufigsten vorkommenden Pfaden gesucht ($p < 0,0001$, Mindestgröße $N=100$) (*Abbildung 4*). Hierbei zeigte sich ebenfalls eine Überrepräsentation der metabolischen Stoffwechselwege, sowie ein Pfad der Parkinson Erkrankung. Über ein Clustering der Daten wurden die Profile der, den Pfaden zugehörigen Gene dargestellt.

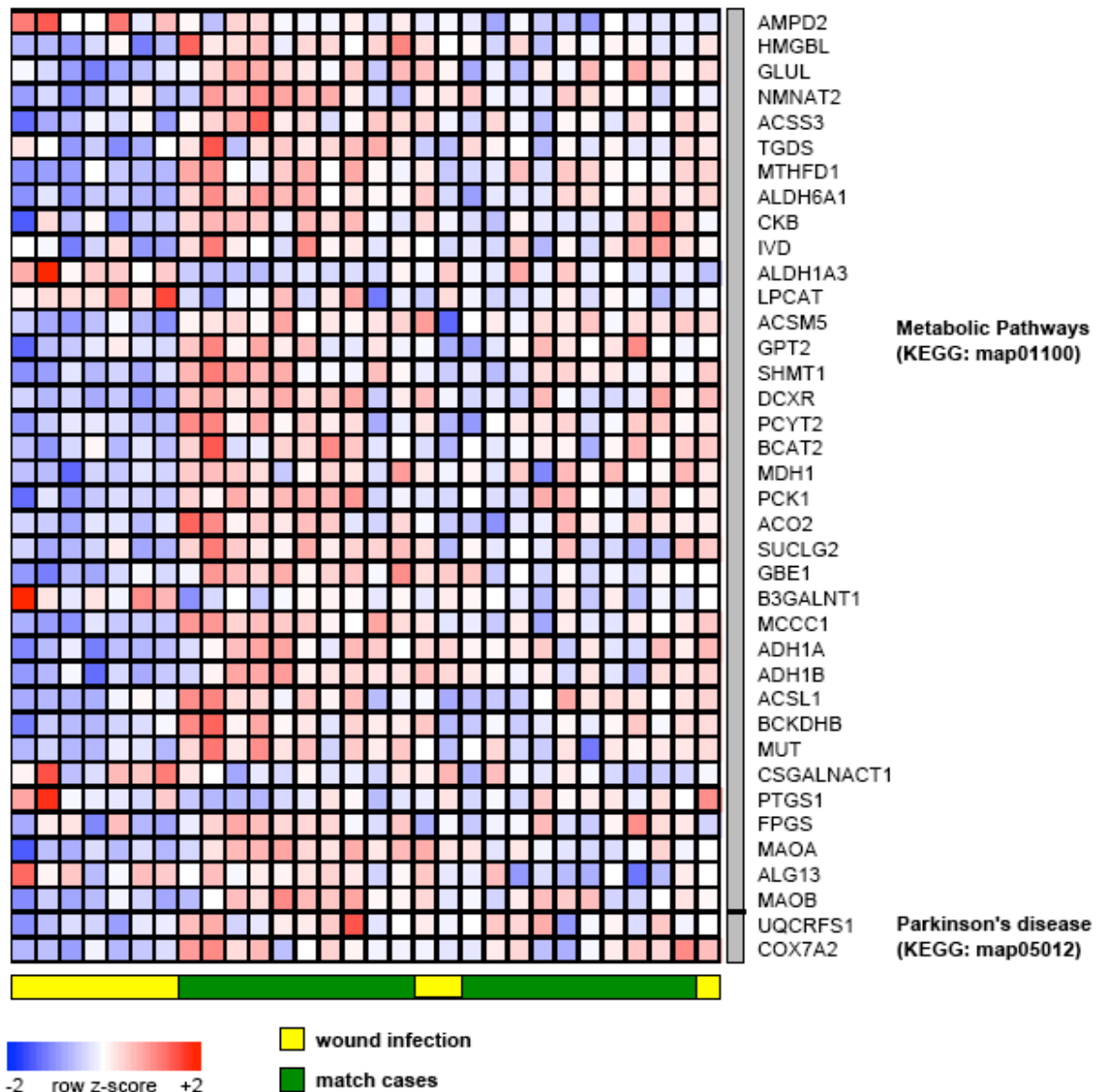


Abbildung 4: Heatmap der überrepräsentierten KEGG pathways, innerhalb des Gensets der differentiell exprimierten Gene mit $p < 0,01$; dargestellt sind Gene, die in Zellprozessen metabolischer Stoffwechselwege sowie der Parkinsonerkrankung involviert sind.

Die Heatmap (Abbildung 4) die aus den Daten der GO-Annotationen erstellt wurde, beinhaltet 127 Gene, die mit Termini in der Kategorie metabolischer Prozesse annotiert sind. Es wurde erneut ein hierarchisches Clustering durchgeführt, wobei wiederum beobachtet wurde, dass zwei der WI-Proben sich von den anderen WI-Proben absetzten. Dies stimmt wiederum mit den vorherigen Analysen überein, in denen die höchstmögliche Spezifität der unterschiedlichen Expressionsmuster aus differentiell exprimierten Genen im Wundinfekt den Wert 80% aufweisen konnte.

In folgenden Stoffwechselwegen zeigten sich Regulationsveränderungen:

- Glukosestoffwechsel (4 Gene, GO:006006)
- Erzeugung von Metabolitenvorstufen und Energie (6 Gene, GO:0006091)
- Aminosäurenstoffwechsel und seine Derivate (1 Gen, GO:0006519)
- Fettsäurenstoffwechsel (16 Gene, GO:0006631)
- Kohlenhydratbiosynthese (2 Gene, GO: 0016051)
- Elektronentransport (17 Gene, GO:0022900)
- zellulärer Kohlenhydratmetabolismus (2 Gene, GO: 0044262)
- Reduktions-Oxidations-Reaktion (55 Gene, GO:0055114).

Wir stellten fest, dass alle Gene, die an oben genannten metabolischen Prozessen beteiligt sind, im Fettgewebe von WI-Patienten im Vergleich zu der gematchten Kontrollgruppe kollektiv herunterreguliert waren. Dies ist auf der Heatmap (**Abbildung 5**) durch den Vergleich der linken (WI-Proben) mit der rechten Seite (matched cases) deutlich zu erkennen. Insbesondere Gene, die an „Reduktions-Oxidations-Reaktionen“, „Elektronentransport“ sowie der „Erzeugung von Metabolitenvorstufen und Energie“ beteiligt sind, also Prozesse die unter anderem der Energieerzeugung dienen, wiesen im Fettgewebe von WI-Patienten eine Expressionsminderung um jeweils 17%, 25% und 20% auf, verglichen mit dem Kontrollkollektiv. Diese Beobachtungen suggerieren einen reduzierten mitochondrialen Metabolismus sowie eine allgemein erniedrigte metabolische Aktivität des Fettgewebes. Gene, die Teil des Kohlenhydratmetabolismus (einschließlich Glukosestoffwechsel) oder Fettsäurenstoffwechsels sind, zeigten im Fettgewebe von WI-Patienten sogar jeweils eine Expressionsminderung um 24% bzw. 27%. Gene, die in die Biosynthese von Kohlenhydraten involviert sind (CHST11, GFPT2), zeichneten sich durch einen Expressionsanstieg von 43% aus, was ebenfalls auf eine veränderte metabolische Aktivität dieser Fettgewebe hinweist.

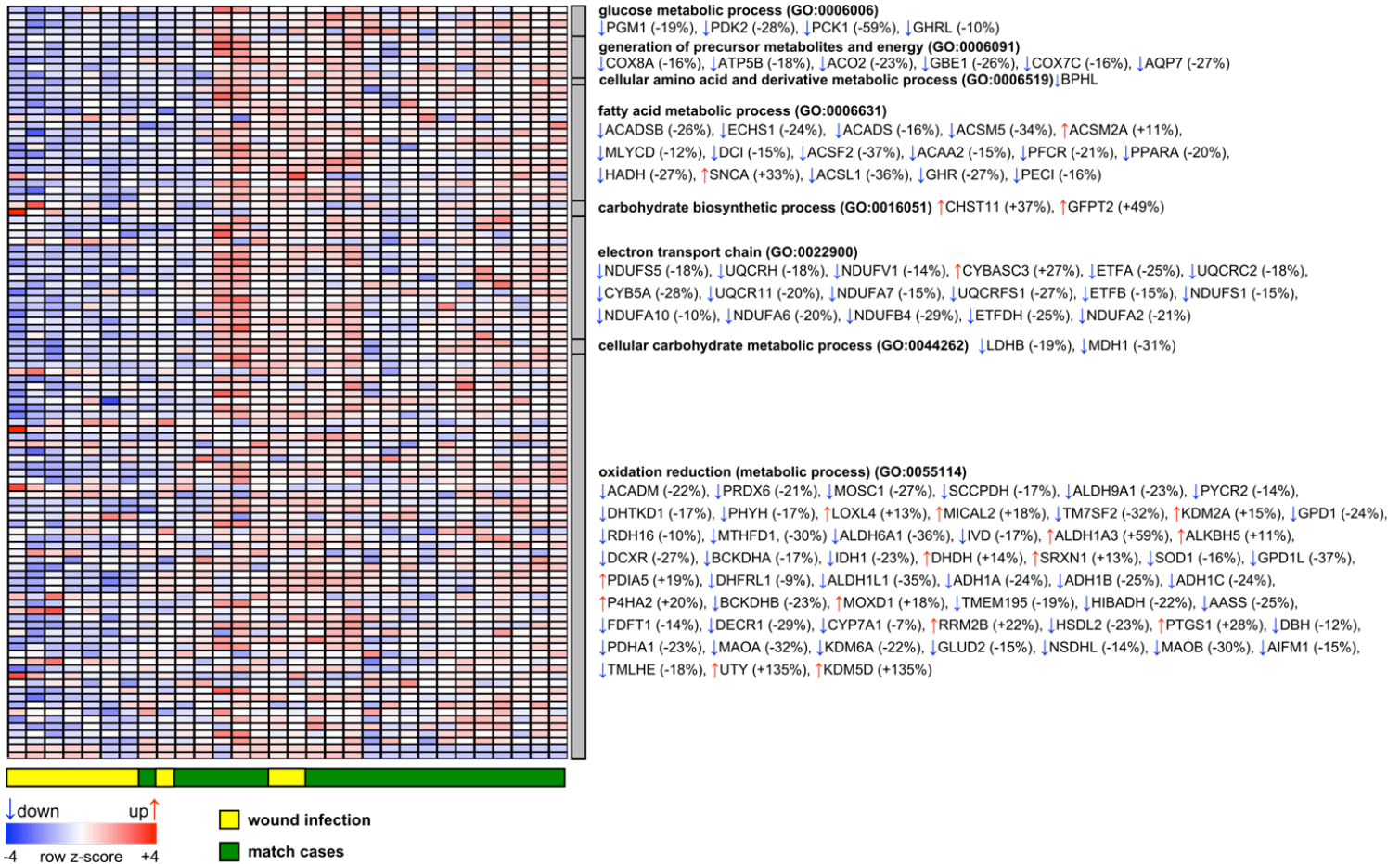


Abbildung 5: Heatmap mit Genen aus überrepräsentierten GO-Termini (Gene Ontology). Das Clustering zeigt, mit der Ausnahme zweier Proben, die Häufung der WI-Proben (wound infection, gelb) auf der linken Seite der Heatmap, während die Kontrollgruppe (matched cases, grün) sich auf der rechten Seite sammeln. Das komplette Set der differentiell exprimierten Gene (1025) wurde mittels hypergeometrischen Tests auf überrepräsentierte GO-Termini hin analysiert. Diese Analyse ergab, dass sich 127 Gene auf unterschiedliche metabolische Prozesse beziehen. Diese sind, wie oben dargestellt: Glukosestoffwechsel (4 Gene, GO:006006), Erzeugung von Metabolitenvorstufen und Energie (6 Gene, GO:0006091), Aminosäurenstoffwechsel und seine Derivate (1 Gen, GO:0006519), Fettsäurenstoffwechsel (16 Gene, GO:0006631), Kohlenhydratbiosynthese (2 Gene, GO: 0016051), Elektronentransport (17 Gene, GO:0022900, zellulärer Kohlenhydratmetabolismus (2 Gene, GO: 0044262), Reduktions-Oxidations-Reaktion (55 Gene, GO:0055114). Die Expressionsunterschiede zwischen WI- und Kontrollgruppe sind neben jedem einzelnen Gen in Prozent angezeigt.

4.4. qRT PCR

Um die Expressionslevel aus den Microarraydaten nach ihrer Auswertung und Analyse nochmals unabhängig zu bestätigen, wurden neun der signifikant-veränderten Gene einer quantitativen real-time PCR mit spezifischen Primern (siehe Material und Methoden 3.2.4 Quantitative real time PCR) unterzogen. Wegen fehlerhaften Ergebnissen bei einer Probe aus dem Wundinfektionskollektiv, die womöglich durch eine Defekte cDNA zu begründen sind, wurden diese sowie die dazu gematchten Proben aus der finalen Auswertung genommen. Somit beruhen folgende Daten auf n=9 für die Wundinfektionsgruppe, sowie n=18 für die Kontrollgruppe.

Die Amplifikationsprodukte wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese bei 60°C untersucht und so die Amplikonlänge und hiermit die Richtigkeit unserer amplifizierten DNA-Fragmente bestätigt (Abbildung 6).

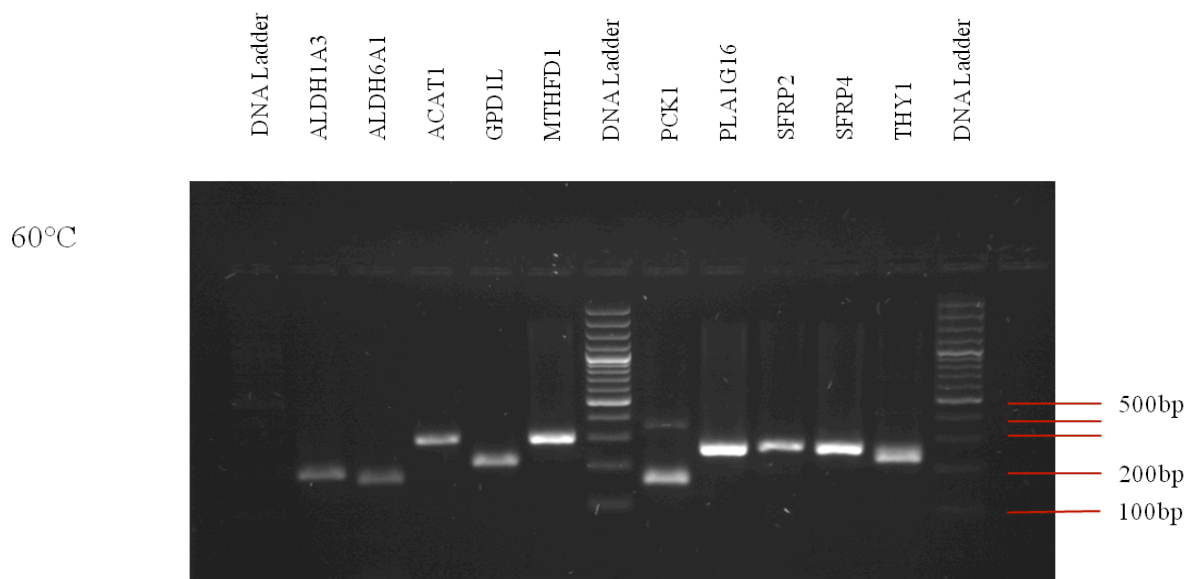


Abbildung 6: Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR Amplifikationsprodukte zur Kontrolle der hergestellten Primer. Die hier ablesbare Amplikonlänge der untersuchten Proteine entspricht der angegebenen Länge beim Primerdesign (siehe Material und Methoden

Tabelle 1).

Folgende Gene wurden auf ihr Expressionslevel hin kontrolliert: ALDH1A3, ACAT1, ALDH6A1, AZGP1, GPD1L, MTHFD1, PCK1, PLA2G16, THY1. Zur Normalisierung der Daten wurde HPRT als housekeeping Gen verwendet.

Die Ergebnisse sind in *Abbildung 7* dargestellt und in *Tabelle 11* zusammengefasst.

| Gen | Expressionslevel WI-Gruppe (Mean±SEM) | Expressionslevel Kontrollgruppe (Mean±SEM) | p-Wert | Expressionsvergleich von WI-Gruppe zu Kontrollgruppe |
|------------|--|---|---------------|---|
| ALDH1A3 | 3,565± 1,811 | 1,552± 0,4291 | 0,085 | <i>erhöht</i> |
| ACAT1 | 0,7558± 0,1614 | 1,035± 0,1194 | 0,0912 | <i>erniedrigt</i> |
| ALDH1A6 | 0,7801± 0,2121 | 1,422± 0,2134 | 0,0346* | <i>erniedrigt</i> |
| AZGP1 | 0,6646± 0,1944 | 1,754± 0,3791 | 0,0311* | <i>erniedrigt</i> |
| GPD1L | 0,4808± 0,1017 | 1,5464± 0,4310 | 0,0463* | <i>erniedrigt</i> |
| MTHFD1 | 0,5965± 0,08416 | 0,9783± 0,09084 | 0,0072* | <i>erniedrigt</i> |
| PCK1 | 0,3105± 0,05906 | 1,042± 0,1610 | 0,0022* | <i>erniedrigt</i> |
| PLA2G16 | 0,7613± 0,1573 | 1,038± 0,08961 | 0,0559 | <i>erniedrigt</i> |
| THY1 | 2,736± 0,5836 | 1,320± 0,2220 | 0,0054* | <i>erhöht</i> |

Tabelle 11: Ergebnisse der qRT-PCR Analyse. Die angegebenen Werte der Expressionslevel der WI-Gruppe sowie der Kontrollgruppe wurden mit dem Durchschnittswert (mean value) der respektiven Gruppe normalisiert. Mit (*) markierte Werte weisen einen statistisch signifikanten p-Wert ($p < 0,05$) auf. ALDH1A3 und THY1 sind in der Wundinfektionsgruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe hochreguliert, während die restlichen Gene herunterreguliert sind.

Die Ergebnisse der qRT-PCR stimmen in Hinblick auf Hoch- beziehungsweise Herunterregulierung der Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen Fällen mit den Ergebnissen der Microarrays überein.

Zu bemerken ist jedoch, dass nicht bei allen Genen ein statistisch-signifikanter Unterschied in der Expression zwischen beiden Gruppen (unpaired t-test, one-tailed) festgestellt werden

konnte: während bei ALDH6A1 ($p=0,0346$), AZGP1 ($p=0,0311$), GPD1L ($p=0,0463$), MTHFD1 ($p=0,0072$), PCK1 ($p=0,0022$), THY1 ($p=0,0054$) eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ ermittelt werden konnte, war diese bei ALDH1A3 ($p=0,085$), ACAT1 ($p=0,0912$) und PLA2G16 ($p=0,0559$) nicht gegeben. Die relative Verteilung spiegelte jedoch die Ergebnisse der Microarrays wieder.

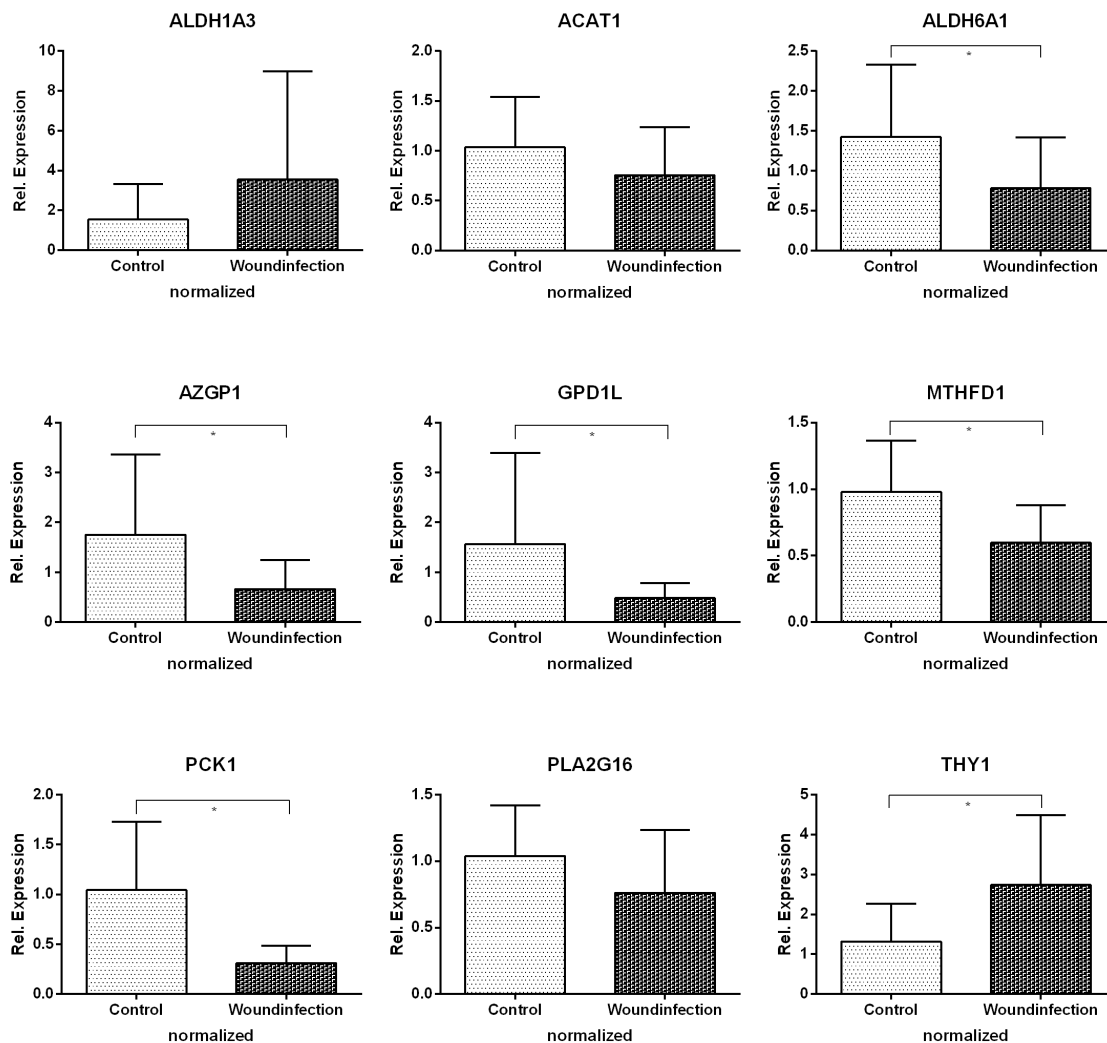


Abbildung 7: qRT-PCR Ergebnis der relativen Expressionslevel einzelner Gene nach Normalisierung der Werte mit der medianen Expression in den jeweiligen Kontrollgruppen. Verglichen wird die Genexpression in Kontrollgruppe (Control) und Wundinfektionsgruppe (Woundinfection). (*) markiert statistisch signifikante p-Werte ($p < 0,05$). ALDH1A3 und THY1 waren im WI-Kollektiv hochreguliert. ACAT1, ALDH6A1, AZGP1, GPD1L, MTHFD1, PCK1, PLA2G16 hingegen waren im WI-Kollektiv herunterreguliert. Die Varianz der Werte für die Expressionslevel ist durch vertikale Striche mit Querstrichen dargestellt.

4.5. Immunohistochemie

Um die zelluläre Lokalisation einiger expressionell veränderter Proteine zu ermitteln, führten wir nun eine immunohistochemische Untersuchung durch. Hierbei zeigten sich sehr unterschiedliche Färbungsmuster (*Abbildung 8*). Bei der Herstellung von Fettgewebspräparaten entsteht meist ein ungefärbter Hohlraum in der Zelle (Fettvakuole), das Zytoplasma bildet einen schmalen Saum mit abgeflachtem Kern. Ihre Oberfläche wird von retikulären Fasern umhüllt.

Es konnte eine AZGP1-Färbung in der Mehrheit der Adipozyten beobachtet werden, was konsistent mit der dokumentierten Rolle dieses Proteins als Adipokin ist (Kong, Michalski et al. 2010, Russell and Tisdale 2010). Im Gegensatz dazu konnte nur in der Minderheit der Adipozyten eine Immunaktivität von MTHFD1 festgestellt werden. ALDH1A3-Antikörper hingegen reichernten sich vor allem im Bereich vaskulärer Strukturen an.

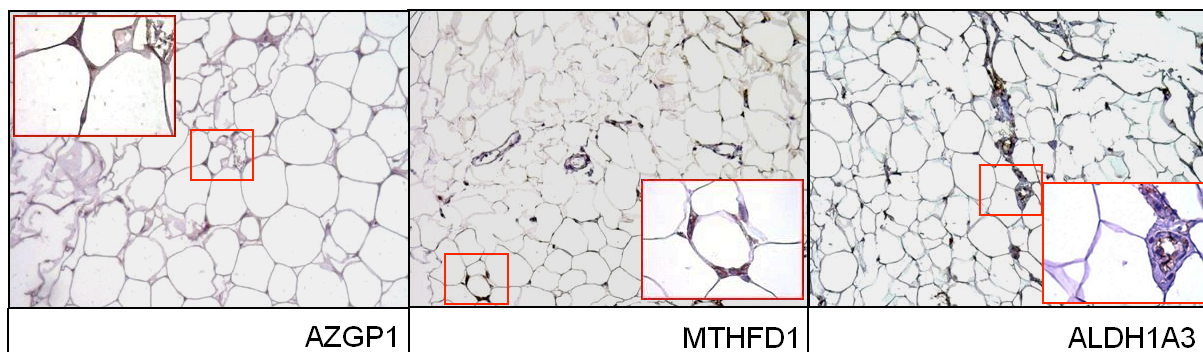


Abbildung 8: Expression von AZGP1, MTHFD1 und ALDH1A3 in subkutanem Fettgewebe. AZGP1: Die Mehrheit der Adipozyten stellten sich bei AZGP1 immunopositiv dar (Ausschnitt Vergrößerung 100x). MTHFD1: MTHFD1 Antikörper markieren eine Minderheit der Adipozyten (Ausschnitt Vergrößerung 100x). ALDH1A3: Zellen im Bereich vaskulärer Strukturen wurden spezifisch durch ALDH1A3 angefärbt (Ausschnitt Vergrößerung 100x).

Die Inhomogenität der untersuchten Moleküle weist darauf hin, dass die Veränderungen der Genexpression, die im Microarray entdeckt wurden (siehe Ergebnisse 4.3 Microarray Analyse), nicht einer bestimmten Zellart oder Struktur zuzuordnen sind, sondern vielmehr das Ergebnis einer Beteiligung unterschiedlichster Zellen im Verbund des Fettgewebes ist.

IV. DISKUSSION

Fettgewebe (FG) ist im Körper fast allgegenwärtig und macht unter physiologischen Umständen etwa 10-25% des Körpergewichts aus (Uhlig 2005). Obwohl kein morphologischer Unterschied besteht, differenziert man zwischen Baufett, welches schwer mobilisierbar ist und für Formgebung und Belastungen zuständig ist, und Speicherfett, welches leicht mobilisierbar ist und quantitativ vom Ernährungszustand abhängt (Uhlig 2005). Des Weiteren lässt sich FG je nach Lokalisation in subkutan oder viszeral einteilen. Fettgewebe ist ein sehr heterogenes Gewebe und besteht aus reifen univakuolären Adipozyten und der stromal-vaskulären Fraktion, die ihrerseits unter anderem Präadipozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Kollagen, Endothel- sowie Stammzellen beinhaltet (siehe Abbildung 9).

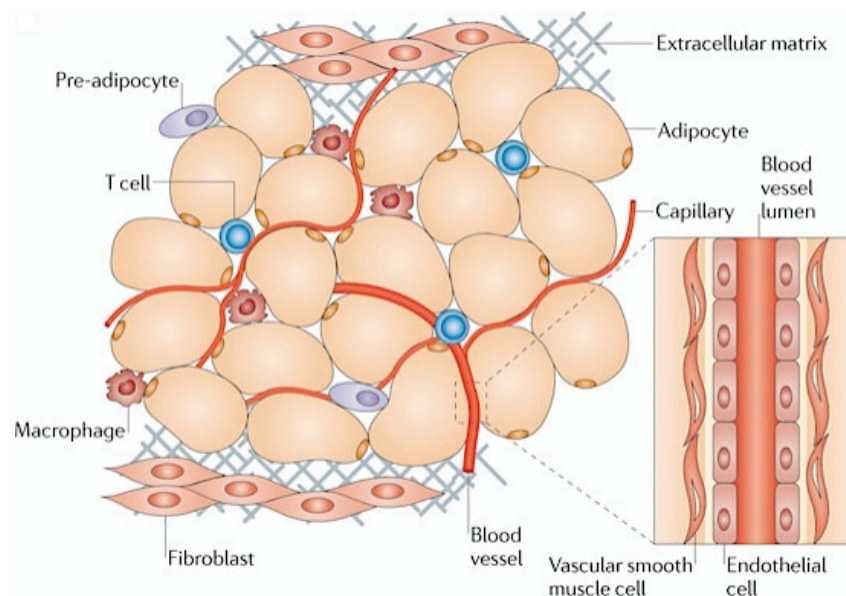


Abbildung 9: Fettgewebesaufbau (Ouchi, Parker et al. 2011). Den Hauptbestandteil bilden Adipozyten. Umgeben werden sie von anderen Zelltypen, wie Präadipozyten (Vorläuferzellen), Fibroblasten und Kollagen, Endothel- und glatte Muskelzellen aus Gefäßen sowie diverse Immunzellen (Makrophagen, T-Zellen). Diese bilden ihrerseits die stromal-vaskuläre Fraktion.

Im Gegensatz zu großen Unterschieden in der Lipidspeichermenge humaner Adipozyten steht die Gesamtzahl der Adipozyten stets unter strenger Kontrolle und ändert sich nach Festlegung während der Kindheit/Adoleszenz im Erwachsenenalter kaum noch. Auch der Zellumsatz erfolgt mit konstanter Frequenz (Erneuerung von ca. 10% der Fettzellen pro Jahr), unabhängig von Alter oder BMI. Entscheidend bei Adipozyten ist die metabolische Aktivität, die durch Energieangebot und -bedarf beeinflusst werden kann (Spalding, Arner et al. 2008). Ein andauerndes Überangebot bzw. verminderter Bedarf an Energie führt vor al-

lem durch Hypertrophie dieser Fettzellen zu Adipositas. Nach der WHO-Definition liegt eine Präadipositas ab einem Körpermassenindex ($BMI = \text{Körpergewicht}/\text{Körpergröße}^2$) von 25 kg/m^2 vor, eine Adipositas ab 30 kg/m^2 vor, wobei hier drei Schweregrade (Grad I $30\text{-}35 \text{ kg/m}^2$, Grad II $35\text{-}40 \text{ kg/m}^2$, Grad III $\geq 40 \text{ kg/m}^2$) unterschieden werden. Im Weiteren soll auf die molekularen Vorgänge im Fettgewebe eingegangen werden.

Hauptfunktion des Fettgewebes ist die Speicherung und Bereitstellung von Fettsäuren, welche abhängig von der Energienachfrage des Organismus in Adipozyten in Form von Triglyzeriden gespeichert werden. Die Körperfettmasse wird beeinflusst durch das Gleichgewicht zwischen der Einlagerung und der Bereitstellung von Triglyzeriden, die entweder durch enzymatische Hydrolyse (Lipolyse) in die Fettsäure-Oxidation eingehen, oder ektop in andere Gewebe abgelagert werden (Arner, Bernard et al. 2011). Adipositas ist mit Veränderungen der basalen Lipolyse, eingeschränkter antilipolytischer Wirkung von Insulin und reduzierter Aktivität der Lipoproteinlipase assoziiert (Hauner, Skurk et al. 2001).

Dem entgegen spielt das Fettgewebe selbst durch die Sekretion von Adipokinen eine wichtige Rolle im Energiehaushalt und Metabolismus (Trayhurn, Bing et al. 2006). Es ist ein endokrin hochaktives Gewebe, das über die Ausschüttung von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Enzymen und Zytokinen Einfluss auf die Differenzierung von Adipozyten, vaskuläre Eigenschaften, Lipid- und Cholesterinstoffwechsel sowie auf das Immunsystem hat (Poulos, Hausman et al. 2010).

In dieser Arbeit konnten wir nachweisen, dass sich subkutanes Fettgewebe von Patienten, die Wundinfekte (WI) entwickelten, von dem von Patienten ohne WI epigenetisch stark unterscheidet. Anhand von Mikroarray-Analysen des gewonnenen Fettgewebes konnten wir: 1. differentiell exprimierte Gene im Wundinfekt identifizieren, 2. Diese Gene durch Clustering und Erstellen von Heatmaps überrepräsentierten Stoffwechselwegen zuordnen und Expressionsmuster erkennen, 3. Innerhalb des gleichen Kollektivs Genpaare identifizieren, die kombiniert spezifisch für Wundinfekte kodieren und somit ein typisches Muster hierfür darstellen.

5.1 Analyse der Patientendaten

In dieser Arbeit untersuchten wir ein Kollektiv von 92 Patienten, von denen 10 Patienten postoperativ eine Wundinfektion entwickelten. Dies entspricht einer WI-Rate von ca. 10% und stimmt somit mit Beobachtungen aus der Literatur überein (siehe Einleitung 1.4. Epidemiologie und Folgen von Wundinfektionen). Postoperative Wundinfektionen sind von der CDC definiert als Infektionen der oberflächlichen Gewebsstrukturen im Bereich der Hautinzi-

sion, die innerhalb von 30 Tage postoperativ auftreten und durch klassische Entzündungszeichen (Schwellung, Rötung, Überwärmung, Schmerzen), eitrige Sekretion, positive Bakterienkultur oder durch Diagnosestellung durch den behandelnden Arzt charakterisiert sind (Horan, Gaynes et al. 1992).

Durch Matching der Patientenkollektive (WI-Gruppe vs. Kontrollgruppe) konnten signifikante Auswirkungen durch individuelle Patienteneigenschaften ausgeschlossen werden. Nach genetischer Expressionsanalysen konnten wir feststellen, dass das WI-Kollektiv im Gesamtergebnis eine Herunterregulierung der meisten differentiell-exprimierten Gene aufweist. Dies gibt einen starken Hinweis darauf, dass eine allgemein reduzierte Expression dieser Metabolismus-bezogenen Gene im Fettgewebe von WI-Patienten die Existenz einer „metabolischen Trägheit“ (besonders ein reduzierter mitochondrialer Oxidationsmetabolismus) bewirkt und somit einen potentiell wichtigen Risikofaktor für postoperative WI darstellt.

Im Folgenden wollen wir nun den Prozess der Wundheilung und die damit verbundenen Auswirkungen dieses Risikofaktors bei den betroffenen Patienten beleuchten.

5.2 Analyse unserer Ergebnisse in Bezug auf den Wundheilungsprozess

Anstatt der Betrachtung einzelner Genexpressionen, soll nun zuerst das Gesamtergebnis in den Kontext des Wundheilungsprozesses gestellt werden. Grundlage hierfür bildet die genaue Betrachtung dieses Vorgangs.

Die Wundheilung erfolgt üblicherweise in 3 Phasen. In den ersten 48h wird zuerst die inflammatorische Phase durchlaufen, die durch Koagulation und der Bildung eines Fibrinthrombus gekennzeichnet ist. Durch das Komplementsystem aktiviert, migrieren Leukozyten in die Wunde und eliminieren Bakterien und Zellschutt. Hierauf folgt die Proliferationsphase, in der die Fibrinmatrix durch Granulationsgewebe ersetzt wird, Schorf entsteht, die Angiogenese zur Revaskularisation angestoßen wird, und epitheliale Zellen wie Keratinozyten in die Wunde wandern. Zuletzt erfolgt das Gewebs-Remodelling. Hierbei kommt es durch das Einwandern von Fibroblasten in die Wunde zur Produktion von unorganisiertem Kollagen, was im Zusammenspiel mit den kontraktile Kräften von Myofibroblasten, zur Bildung einer Narbe führt (Werner and Grose 2003, Gurtner, Werner et al. 2008).

Dennoch ist es weitgehend unbekannt, wie eine reduzierte metabolische Aktivität des Fettgewebes mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von WI zusammenhängt.

Folgende Aspekte des Wundheilungsprozesses könnten in dieser Fragestellung impliziert sein.

5.2.1. Funktionsbeeinträchtigung von Stammzellen

Es wurde nachgewiesen, dass hämatopoetische Stammzellen sehr empfindlich gegenüber Veränderungen im Energiestoffwechsel reagieren (Gan, Hu et al. 2010, Nakada, Saunders et al. 2010). Es ist somit möglich, dass Stammzellen innerhalb des Fettgewebes (z.B. adipocyte-derived stem cells (ADSC)), sowie solche, die in den dynamischen Prozess der Adipogenese involviert sind (z.B. Haarfollikel Stammzellen), durch die veränderte metabolische Aktivität des Fettgewebes beeinflusst werden. Tatsächlich sind zum Beispiel ADSC multipotente Stammzellen, die fähig sind, zu epithelialen Zellen zu differenzieren und die Angiogenese zu fördern (Altman, Chiu et al. 2008). Stammzellen in Haarfollikeln stellen ihrerseits ein Reservoir für diverse Progenitorzellpopulationen dar, die Schlüsselrollen in der Wundheilung der Haut übernehmen.

Im Fall einer modifizierten Aktivität der Umgebung könnten die Differenzierung sowie die heilenden Eigenschaften dieser Stammzellen beeinträchtigt sein, was wiederum zu Störungen in der Wundheilung führen würde (Lau, Paus et al. 2009).

5.2.2. Mikrobiozide Eigenschaft von Präadipozyten und Wirkung von ROS

Zudem hat man erkannt, dass Präadipozyten, welche Teil der stromal-vaskulären Fraktion (SVF) des Fettgewebes sind, bestimmte Makrophagen-ähnliche Charakteristika besitzen. Ihnen konnten effektive phagozytische Eigenschaften, sowie mikrobiozide Aktivitäten nachgewiesen werden. Hierdurch ist es ihnen möglich, eindringende pathogene Mikroorganismen zu beseitigen und somit als natürliche Schranke gegen Infektionen zu fungieren (Cousin, Andre et al. 2001, Villena, Cousin et al. 2001, Charriere, Cousin et al. 2003). Alle Aktivitäten, die sich gegen Mikroorganismen richten, basieren größtenteils auf der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Sie werden u.a. während dem sogenannten „oxidativen Burst“ freigesetzt, ein durch NADPH-Oxidase katalysierter Prozess, der durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen nach der Phagozytose eingeleitet wird. ROS entstehen jedoch auch physiologisch im Rahmen der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) in Mitochondrien (Arsenijevic, Onuma et al. 2000, Lambeth 2004, West, Shadel et al. 2011). Unter bestimmten metabolischen Situationen sowie bei zellulärem Stress können jedoch auch mehr ROS als üblich produziert werden. Beispielsweise kann die mROS-Produktion (mitochondriale ROS) über den IFN γ -Signalweg angestoßen oder nach Phagozytose von Bakterien über eine Signalkaskade ausgehend von TLRs (Toll-like receptors) erhöht werden. Dies kann

wiederum zusätzlich eine erhöhte Produktion an pro-inflammatorischen Zytokinen nach sich ziehen. Es wurde somit nachgewiesen, dass mROS einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems darstellen, und an der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien beteiligt sind (Arsenijevic, Onuma et al. 2000, Sonoda, Laganieri et al. 2007, West, Brodsky et al. 2011, West, Shadel et al. 2011)

Die Funktion von Mitochondrien wird jedoch auch durch die allgemeine metabolische Aktivität beeinflusst. Somit ist es wahrscheinlich, dass ein reduzierter metabolischer Grundumsatz in Fettgewebe, wie wir ihn in dieser Arbeit nachweisen konnten, zu einer unzureichenden Produktion von ROS führt, die jedoch bei einer Begegnung mit pathogenen Mikroorganismen nötig wäre. Dies könnte zu einer beeinträchtigten Beseitigung von Keimen im Gewebe führen und somit das Risiko für die Entwicklung von Wundinfektionen deutlich erhöhen.

5.2.3. Schlüsselrolle von Adipokinen im Wundheilungsprozess

Zuletzt ist die wichtige Rolle, die Adipokine in dem Prozess der Wundheilung einnehmen, zu nennen. Tatsächlich wurde festgestellt, dass Wechselwirkungen zwischen Adipokinen und dem Stoffwechsel des Fettgewebes für eine Vielfalt an Krankheitsbildern relevant sind, Adipokine jedoch auch an der Wundheilung selbst beteiligt sind (Antuna-Puente, Fève et al. 2008, Pandzic Jaksic 2010).

Anzuführen ist z.B. Leptin, ein Adipokin, das fast ausschließlich in weißem Fett produziert wird, ca. 80% davon allein im subkutanem Fettgewebe (Ahima and Flier 2000, Dusserre, Moulin et al. 2000). Tatsächlich korreliert die Expression von Leptin mit der Ganzkörperfettmasse (Vidal, Auboeuf et al. 1996). Leptin ist bekannt als Regulator der Energiehomöostase, fördert jedoch auch inflammatorische Prozesse innerhalb des Fettgewebes (Loffreda, Yang et al. 1998). Interessanterweise besitzt Leptin aber auch einen starken angiogenen und mitogenen Effekt. Es unterstützt die Neovaskularisation und stimuliert die Proliferation von Keratinozyten, und fördert damit die Reepithelisierung und Wundheilung (Bouloumie, Drexler et al. 1998, Frank, Stallmeyer et al. 2000).

Adiponektin ist ebenfalls ein wichtiges Adipokin, das auch größtenteils im subkutanem Teil des Fettgewebe produziert wird und in seiner Expression negativ mit der totalen Fettmasse korreliert (Lihn, Bruun et al. 2004). Im Gegensatz zu Leptin wirkt Adiponektin jedoch anti-inflammatorisch und anti-atherogen. Es stellt sich heraus, dass Adiponektin auch im Wundheilungsprozess eine wichtige Rolle übernimmt und mit seiner Wirkung in allen 3 Phasen involviert ist. Erstens fördert es die Migration neutrophiler Granulozyten, ein wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Phase. Des Weiteren wurde für Adiponektin eine Wirkung auf die Proliferation von dermalen Fibroblasten nachgewiesen, welche an der Bildung von

Granulationsgewebe beteiligt sind, und die Kollagenproduktion fördert (Fu, Luo et al. 2005, Ezure and Amano 2007). Zuletzt stimuliert es die Angiogenese und übt proliferative und migratorische Effekte auf Keratinozyten aus, welche im Rahmen der Reepithelisierung die letzte Phase der Wundheilung darstellen (Ouchi, Kobayashi et al. 2004, Shibata, Tada et al. 2012). Der Einfluss von Adipokinen auf die Wundheilung wird hierdurch deutlich.

Betrachtet man alle oben genannten Aspekte, so wird ersichtlich, dass sich ein metabolisch träges Fettgewebe sowohl auf den Heilungsprozess der Haut als auch auf die körpereigene Immunabwehr auswirken, und somit das Risiko für die Entwicklung von postoperativen Wundheilungsstörungen erhöhen kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen die Hypothese auf, dass durch die starke Herunterregulierung diverser Gene im Wundinfekt ein inaktives Milieu geschaffen wird, in dem sowohl lokale Stammzellen, Vorläuferzellen, Entzündungszellen als auch Adipokine in Ihrer Aktivität eingeschränkt sind und folglich auch physiologische Wundheilungsprozesse, in die sie involviert sind. Hieraus würde ein erhöhtes Risiko für Wundinfekte entstehen.

5.3 Auswirkungen genetischer Expressionsänderungen auf das Fettgewebe

Mittels genomweiter Microarray Analysen konnten wir ein Set an Genen identifizieren, welche unterschiedliche Aspekte des Zellmetabolismus beeinflussen. Fast alle dieser Gene wiesen eine herunterregulierte Expression im Wundinfekt auf. Hieraus lässt sich folgern, dass Patienten mit metabolisch-trägen subkutanen Fettgewebe zur Entwicklung von WI neigen könnten. Beispielhaft werden im Folgenden die Auswirkungen der, aus unserer Sicht entscheidenden Veränderungen der Genexpression und deren vermutete Auswirkungen auf die Entstehen von Wundinfekten dargestellt.

Eines der wichtigen identifizierten Gene ist ALDH1A3, welches das Enzym Aldehyd Dehydrogenase 1A3 kodiert und in verschiedenen Stoffwechselprozessen eine entscheidende Rolle spielt, wie zum Beispiel der Adipogenese und Zelldifferenzierung. Wir vermuten, dass die abnormale Expression von ALDH1A3, ein Gen welches unter physiologischen Umständen in viszeralem Fettgewebe stark exprimiert wird (Reichert, Yasmeen et al. 2011), einen Grund für den wenig aktiven metabolischen Zustand im Wundinfekt darstellt.

Weiterhin soll die Auswirkung des herabregulierten AZGP1 näher beleuchtet werden. AZGP1 kodiert für das Zinc-alpha-2-glykoprotein, ein Adipokin, das in den Prozess der Lipolyse eingreift und somit eine wichtige Rolle in der Entstehung von Adipositas und Diabetes spielt.

Weitere wichtige Genexpressionsänderungen finden sich bei PCK1, einem Gen, das für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodiert. Diese ist in Adipozyten für die Glyceroneogenese verantwortlich, ein Stoffwechselweg, der die Bildung von Triglyceriden in Adipozyten ermöglicht und hiermit auch maßgeblich am Lipidstoffwechsel beteiligt ist.

5.3.1. ALDH1A3-Hochregulierung verändert metabolische Eigenschaften von subkutanem Fettgewebe

In dieser Arbeit konnten wir nachweisen, dass ALDH1A3 in der WI-Gruppe vergleichsweise stark hochreguliert ist (fold change=1,59) und es in Kombination mit MAOB, MDH1, PECCR oder MCCC1 spezifische Expressionsmuster für die Entstehung von Wundinfektionen bildet. Die Bedeutung von ALDH1A3 wird durch seine Anwesenheit in den „top 4“ der spezifischsten Muster, charakteristisch für WI-Proben, unterstrichen. Zur Interpretation dieser Expressionsänderung ist es jedoch notwendig dieses Protein und seine Funktionen näher zu betrachten.

Das Gen kodiert für ALDH1A3, auch als RADLH3 bezeichnet, ein Enzym, das zur Klasse 1 der Familie der Aldehyd Dehydrogenasen gehört. Aldehyd Dehydrogenasen katalysieren die NAD(P)+ abhängige Oxidation von diversen Aldehyden zu ihrer Säureform (Bhat, Poissant et al. 1988), was der Detoxifikation u.a. von Produkten der Lipidperoxidation sowie des Ethanolmetabolismus dient. Außerdem wurde beobachtet, dass diverse ALDH-Isoenzyme in normalen sowie Krebs-Stammzellen eine erhöhte Aktivität aufweisen, weshalb davon ausgegangen wird, dass sie eine wichtige Rolle in Selbstschutz, Differenzierung sowie Expansion von Stammzellpopulationen spielen (Muzio, Maggiora et al. 2012).

Enzyme der Klasse 1- ALDH Familie (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3) zeichnen sich besonders durch ihre Rolle in der Oxidation von Retinaldehyd zu Retinsäure (RA) aus (Abbildung 10), eine Eigenschaft die bei anderen ALDH-Klassen bisher nicht entdeckt werden konnte (Montplaisir, Lan et al. 2002). Sie kontrollieren somit im Fettgewebe die Konzentrationen dieser zwei Metaboliten, denen eine essentielle Rolle als Regulatoren der Adipogenese nachgewiesen wurde (Duester 2008). Dies soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

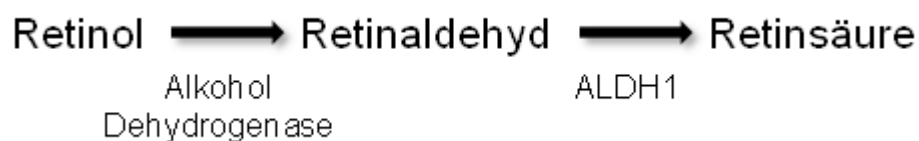


Abbildung 10: Retinol wird durch die Alkoholdehydrogenase zu Retinaldehyd reduziert, welches dann als Substrat für die Aldehyddehydrogenasen Familie 1 zu Retinsäure oxidiert wird.

Es konnten hohe Expressionslevel von ALDH1A3 in differenzierenden Keratinozyten humaner Haarfollikeln nachgewiesen werden, während sich in der interfollikulärer Epidermis niedrige bis negative Expressionslevel fanden (Everts, King et al. 2004, Everts, Sundberg et al. 2007). Zudem provoziert eine kurzzeitige Retinsäureexposition, über einen positiven Feedbackmechanismus, eine Hochregulierung von ALDH1A3 in Keratinozyten, während es zu einer Herunterregulierung nach Langzeitexposition kommt. Dies geschieht vermutlich durch progressive Zelldifferenzierung sowie durch Aktivierung von negativen Feedbackmechanismen (Koenig, Amatschek et al. 2010).

Vitamin A (Retinol) und seine Metaboliten (Retinaldehyd, RA) regulieren die Differenzierung unterschiedlicher Zelllinien beim Menschen. Besonders die Metaboliten fungieren als Liganden für nukleare Rezeptoren, unter anderem retinoic acid Rezeptoren (RAR) und retinoid X Rezeptoren (RXR). Sie haben damit Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene, welche wiederum Teil von Differenzierungskaskaden sein können (Germain, Chambon et al. 2006).

In der frühen Phase der Adipogenese bewirkt die Stimulation mit RA, durch Unterdrückung des Transkriptionsfaktors C/EBP α/β (CCAAT/enhancer-binding protein α/β) und einer damit folgenden reduzierten Expression von PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), eine Hemmung der Adipozytendifferenzierung und demnach der Adipogenese (*Abbildung 11*). Bei dieser Interaktion handelt es sich jedoch um eine biphasische Wirkung von RA auf die Adipogenese, da es innerhalb der ersten 48h inhibitorisch wirkt, danach jedoch stimulierend auf die Differenzierung von Adipozyten (Schwarz, Reginato et al. 1997).

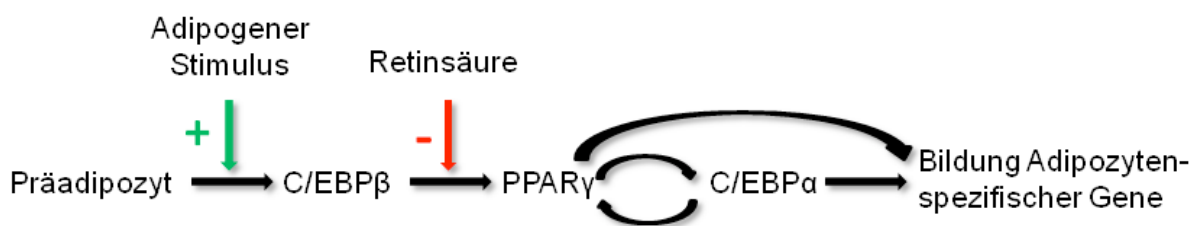


Abbildung 11: Kaskadensystem der Adipozytendifferenzierung. Über einen adipogenen Stimulus wird über die C/EBP β -Expression die PPAR γ -Expression induziert. Auf dieser Stufe der Differenzierung kann Retinsäure inhibitorisch wirken. PPAR γ und C/EBP α induzieren anschließend beide die Bildung Adipozytenspezifischer Gene.

Retinaldehyd, dem lange Zeit nur eine Rolle in den Stäbchen der Netzhaut als Vorstufe von RS zugeschrieben wurde, ist ebenfalls in Adipozyten zu finden und supprimiert dort womöglich als wichtiger Mediator die Expression adipogener Gene und senkt die Adiponektinsekretion, mit Auswirkung auf die Adipogenese und Fettgewebsformation. Es wirkt in jeder

Phase der Differenzierung inhibitorisch auf die Adipogenese (Ziouzenkova, Orasanu et al. 2007).

Viszerales und subkutanes Fettgewebe sind nun in Bezug auf den Metabolismus (u.a. Glukose- und Lipidmetabolismus), sowie ihrer Adipokin- und Zytokinproduktion grundlegend unterschiedlich (Dusserre, Moulin et al. 2000, Shahparaki, Grunder et al. 2002, Hamdy, Porramatikul et al. 2006, Roca-Rivada, Alonso et al. 2011). Wichtig ist die Erkenntnis, dass die ALDH1-Enzymexpression in humanem Fettgewebe depot-spezifisch ist. Es wurde beobachtet, dass ALDH1A1 sowohl in subkutanem wie auch viszeralem Fettgewebe das prädominante Enzym der ALDH1-Familie ist. ALDH1A1 und ALDH1A3 sind jedoch beide deutlich stärker in viszeralem als subkutanem Fettgewebe vertreten (Peinado, Jimenez-Gomez et al. 2010). Auch wenn geringer exprimiert, ist ALDH1A3 von beiden Enzymen das effektivere (Reichert, Yasmeen et al. 2011). Dies unterstützt die Ansicht, dass Präadipozyten in viszeralen Fettgewebsdepots höhere Spiegel an Retinaldehyd produzieren, als in subkutanen Depots. In Anbetracht der bekannten Effekte von RA auf die Adipogenese könnte man vermuten, dass der depot-spezifischen RA-Produktion unterschiedliche Differenzierungsfähigkeiten von viszeralen und subkutanen Präadipozyten zu Grunde liegen (Adams, Montague et al. 1997, Tchkonja, Giorgadze et al. 2006, Yang and Smith 2007).

Präadipozyten aus subkutanen Fettdepots exprimieren höhere Spiegel an PPAR γ , C/EBP α und RXR, und haben damit eine höhere Bereitschaft zu proliferieren und sich zu differenzieren als Zellen aus viszeralen Depots (Sewter, Blows et al. 2002, Shahparaki, Grunder et al. 2002, Van Harmelen, Rohrig et al. 2004, Tchkonja, Giorgadze et al. 2006).

Die Hochregulierung von ALDH1A3, einem Schlüsselenzym der Adipogenese in subkutanem Fettgewebe, könnte somit auf metabolischer Ebene viszerales und subkutanes Fettgewebe annähern, und spezifische Eigenschaften von viszeralem FG auf das subkutane FG übertragen. Daraus könnten Konsequenzen für den Metabolismus von Vorläuferzellen in subkutanem Fettgewebe entstehen, und unter Umständen z.B. die Bereitschaft der Zellen zu Differenzierung und Proliferation herunterfahren. Hierzu würden auch die Ergebnisse der Analysen passen, nach denen Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel im Wundinfekt ebenfalls stark verändert waren und sich in subkutanem Gewebe vom viszeralen unterscheiden. Tchkonja et al. konnten jedoch auch feststellen, dass subkutane und viszerale Adipozyten ihren Ursprung in unterschiedlichen Zelllinien finden und deshalb, auch nach Isolation aus dem Gewebe, unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Somit wäre die adipozytäre Funktion nicht direkt an den Ursprungsort gebunden. Eine solche funktionelle Disparität könnte die Neigung dieser Patienten zur Entwicklung von WI erklären (Perusse, Rice et al. 2001, Hamdy, Porramatikul et al. 2006, Yang and Smith 2007). Die erhöhte Expression von

ALDH1A3 könnte der Modifizierung metabolischer Eigenschaften des subkutanen Fettgewebes dienen (s.o.). Die vorliegende Arbeit liefert den Anhaltspunkt, dass eine solche metabolische Aktivität des subkutanen FG einen signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung von WI darstellt.

5.3.2. AZGP1 beeinflusst als Adipokin den Lipidstoffwechsel in subkutanem Fettgewebe

Auch AZGP1, ein ebenfalls am Lipidmetabolismus beteiligtes Protein, konnte innerhalb der untersuchten Gruppen als differentiell exprimiertes Gen identifiziert werden. In unseren Untersuchungen stellte AZGP1 das am stärksten herunterregulierte Gen (fold change=-2,66) in der WI-Gruppe dar. Zum Verständnis dieser Ergebnisse ist erneut eine nähere Betrachtung der Funktionen dieses Proteins nötig.

AZGP1, auch als Zinc- α 2-glycoprotein bekannt, ist ein sezerniertes lösliches Protein, das ursprünglich aus humanem Plasma isoliert (Burgi and Schmid 1961) und anschließend in verschiedenen Geweben gefunden wurde (Tada, Ohkubo et al. 1991). Zinc- α 2-glykoprotein wird bei verschiedenen malignen Tumoren überexprimiert, z.B. bei Mamma-, Prostata- und Lungenkrebs (Diez-Itza, Sanchez et al. 1993, Hale, Price et al. 2001, Albertus, Seder et al. 2008) und wurde als Krebs-Biomarker vorgeschlagen. Die exakten physiologischen Funktionen von ZAG müssen erst noch etabliert werden. Das Protein spielt jedoch eine Rolle in der Hemmung von Zellproliferation (He, Brysk et al. 2001, Schmitt, Marlier et al. 2008), in der Modulation der Melaninsynthese (Hale 2002), sowie in der Zelladhäsion, Immunoregulation und RNase-Aktivität (Hassan, Waheed et al. 2008).

Die am besten untersuchte Eigenschaft von AZGP1 ist jedoch seine Beteiligung am Lipidmetabolismus (Bing and Trayhurn 2009). Sein fettreduzierender Effekt sowie die Kenntnis über sekretorische Funktionen von Fettgewebe, führten zur Hypothese, AZGP1 könnte durch Fettgewebe produziert werden und hierdurch den Adipozytenmetabolismus beeinflussen (Bing, Bao et al. 2004). Tatsächlich wurde gezeigt, dass AZGP1 beim Menschen in reifen Adipozyten exprimiert und das Protein als wichtiges Adipokin sogar in ähnlichen Mengen wie Adiponektin, einem der häufigsten Proteinen im Fettgewebe, sezerniert wird (Bing, Bao et al. 2004, Mracek, Ding et al. 2010, Mracek, Stephens et al. 2011). Daher wurde eine autokrine/parakrine Rolle im Fettgewebe angenommen (Bao, Bing et al. 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression als auch mRNA von AZGP1 negativ mit Adipositas/BMI assoziiert sind und bei adipösen Menschen herunterreguliert ist. Umge-

kehrt korreliert AZGP1 wiederum positiv mit einer Gewichtsabnahme (Bing, Bao et al. 2004, Marrades, Martinez et al. 2008, Ceperuelo-Mallafre, Naf et al. 2009, Gong, Zhang et al. 2009, Selva, Lecube et al. 2009, Mracek, Gao et al. 2010).

AZGP1 erhöht die Glycerin-Sekretion, fördert die Oxidation von Fettsäuren und stimuliert die Lipolyse in differenzierten humanen Adipozyten. Damit bewirkt es eine Abnahme der Fettgewebsmasse, was auf einen Zusammenhang zwischen dem Protein und einer erhöhten Energieaufwendung deuten könnte (Hirai, Hussey et al. 1998, Russell and Tisdale 2010, Mracek, Stephens et al. 2011).

AZGP1 weist außerdem hohe Ähnlichkeit mit dem lipid-mobilising factor (LMF) auf, beide Proteine sind an der Aktivierung der Adenylatzyklase in der Plasmamembran von Adipozyten assoziiert (Todorov, McDevitt et al. 1998, Bing, Bao et al. 2004). Des Weiteren korreliert die ZAG-Expression in subkutanem Fettgewebe mit den Genexpressionen von Adiponektin und PPAR γ , sowie dem Plasma-Triglyzeridlevel.(Ceperuelo-Mallafre, Naf et al. 2009)

Zusammengefasst ist AZGP1 ein gut erforschtes Adipokin, das mit Adipositas assoziiert ist und anti-diabetische sowie Energieverbrauch-fördernde Funktionen im Fettgewebe aufweist (Ceperuelo-Mallafre, Naf et al. 2009, Russell and Tisdale 2010). Eine Herunterregulierung des Adipokins, wie wir sie im Fettgewebe von WI-Patienten feststellen konnten, stimmt somit mit einer niedrigen metabolischen Aktivität überein. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass AZGP1 die mesenchymal-to-epithelial Transition (MET) induziert und die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen fördert (Kong, Michalski et al. 2010). Beide Funktionen sind relevant, da sowohl die Zellproliferation als auch die MET bzw. epithelial-to-mesenchymal Transition (EMT) wichtige Ereignisse im Wundheilungsprozess darstellen. Eine Herabregulierung dieses Gens könnte somit das postoperative Heilungsvermögen der betroffenen Patienten beeinträchtigen.

5.3.3. PCK1 steuert als entscheidendes Enzym die Glyceroneogenese in Adipozyten

Des Weiteren konnten wir PCK1 als Gen mit dem niedrigsten p-Wert ($p=0,000082$) und starker Herabregulierung (fold change=-2,45) in unseren Analysen der WI-Gruppe identifizieren.

Das PCK1-Gen, auch als PEPCCK-C bekannt, kodiert für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, ein Enzym der Lyase-Gruppe, das maßgeblich für die Glukoneogenese bzw. Glyceroneogenese verantwortlich ist. Es katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Umwandelungsschritt von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat unter GTP-Verbrauch. Man

unterscheidet beim PCK-Gen je nach Lokalisation zwei Isoformen, mitochondrial (PCK2) und zytosolisch (PCK1), die vor allem in Leber, Niere und Adipozyten gefunden werden können. Durch seine Beteiligung im Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel wurde bisher eine Rolle in der Entstehung eines Typ 2 Diabetes mellitus diskutiert (Gomez-Valades, Mendez-Lucas et al. 2008). Anzuführen ist hier, dass das PEPCK-C Enzym im Fettgewebe für die Glyceroneogenese zuständig ist, da die Glukoneogenese durch Fehlen bestimmter Enzyme in diesem Gewebe nicht möglich ist. In diesem Stoffwechselweg entstehen in Fastenzeiten Glycerin-3-Phosphat (G3P) und folglich auch Triglyzeride aus Molekülen des Zitratzyklus, anstatt aus Glukose. Es ist somit eine Hauptquelle für Lipide in Karenzzeiten und beeinflusst durch Veresterung von Fettsäuren (FS) die Bildung von Triglyzeriden und die Fettsäurenkonzentration im Zytosol (Nye, Hanson et al. 2008). Eine Dysregulation dieses Stoffwechselwegs könnte durch ein gestörtes Lipidgleichgewicht schwerwiegende pathophysiologische Auswirkungen haben. Es wird nun diskutiert, wie die PCK1-Expression mit der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 oder einer Adipositas zusammenhängt. Laut Beale et al. führt eine verminderte Expression der PEPCK-C in Adipozyten durch eine reduzierte Glyceroneogenese zu einer verminderten neu-Veresterung von Fettsäuren, wodurch diese vermehrt als unveresterte FS im Fettgewebe und im Blut sezerniert werden und es zu einer Abnahme der Triglyzeridspeicher kommt (Beale, Forest et al. 2003). Als Konsequenz könnte dies sowohl eine Lipodystrophie als auch eine erhöhte Insulinresistenz nach sich ziehen und folglich die Entstehung eines Typ 2-Diabetes mellitus sowie eines metabolischen Syndroms fördern (Beale, Hammer et al. 2004).

Durch die Annahme einer reduzierten Fettgewebssmasse (durch leere TG-Speicher) könnte eine Herunterregulierung auch Auswirkungen auf die Aktivität von Adipozyten beziehungsweise deren Menge an sezernierten Adipokinen nach sich ziehen, deren Rolle im vorherigen Text bereits beschrieben wurde. Diese Erkenntnisse bringen uns einer möglichen Verbindung zwischen einer reduzierten PCK1-Expression und einer gestörten Wundheilung näher.

Nach einer Untersuchung der Folgen einer Expressionsänderung des PCK1-Gens ist es jedoch auch interessant, kurz auf mögliche Ursachen dieser Herunterregulierung einzugehen. Beispielsweise ist bekannt, dass Kortikosteroide die PPAR γ -induzierte PCK1-Expression in Adipozyten hemmen. Auch Insulin wirkt auf die PCK1 hemmend (Beale, Hammer et al. 2004). Zudem scheint das PEPCK-C Enzym erst in reifen Adipozyten aktiv zu sein, während seine Expression während der Adipogenese in Präadipozyten gehemmt zu sein scheint (Beale, Forest et al. 2003). Dies lässt die Hypothese zu, dass es sich beim Fettgewebe von WI-Patienten beispielsweise durch eine gestörte Adipogenese und unzureichender Gewebsaktivität zum großen Teil um Adipozyten-Vorläuferzellen handeln könnte,

die ihrerseits im Gegensatz zu reifen Adipozyten keine regelrechte Aktivität aufweisen können und folglich Gleichgewichtsveränderung im Fettgewebsumilieu nach sich ziehen. Eine genaue Erklärung für die hier angetroffenen Expressionsänderungen lässt sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht herausarbeiten.

5.4 Kritische Analyse der Arbeit

Nichtsdestotrotz ist anzuführen, dass die hier erarbeiteten Ergebnisse in ihrer Interpretation durch einige Störfaktoren limitiert sind: A) Durch die beschränkte Größe des Patientenkollektivs konnte kein einwandfreier Patientenmatch durchgeführt werden, weshalb Störfaktoren nicht komplett auszuschließen sind. B) Einige unserer Patienten weisen Risikofaktoren für WI auf. Einige dieser Faktoren, u.a. Diabetes mellitus und BMI, gehen jedoch mit Veränderungen des metabolischen Zustands von Fettzellen einher (Hasegawa, Usui et al. 2011). Bisher ist unbekannt, ob die von uns beobachteten Unterschiede im Metabolismus durch oben genannte Faktoren beeinflusst worden sein könnten, sei es durch eine limitierte Patientenfallzahl oder einem, durch Risikofaktoren, veränderten Stoffwechsel in subkutanem Fettgewebe. C) Eine metabolische Aktivität ist nicht direkt messbar, sondern wird stellvertretend durch Expressionslevel von Genen und Enzymen dargestellt. Störungen dieser Ergebnisse durch genetische Variationen oder variable Stabilität enzymatischer Aktivitäten von Proteinen, können nicht beurteilt werden. D) Es müssen Unterschiede in der klinischen und chirurgischen Vorgehensweise zwischen den einzelnen Patienten berücksichtigt werden. Ein Beispiel ist die Operationsdurchführung durch unterschiedliche Operateure. E) Zwar wurden Wundklassifikationen strikt eingeteilt, es ist jedoch nicht bekannt und auch kaum messbar, welcher Bakterienlast jeder Patient tatsächlich ausgesetzt war. Letztlich wurden von betroffenen Patienten keine Bakterienkulturen angefertigt, weshalb nicht auszuschließen ist, dass es sich bei den Keimen um Bakterien handelt, die nicht im Wirkspektrum des routinemäßig perioperativ-angewandten Antibiotikums liegen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Wundinfektionen ziehen als dritthäufigste Ursache für nosokomiale Infektionen erhebliche sozioökonomische Konsequenzen nach sich. Prädiktoren für die Entwicklung postoperativer Wundheilungsstörungen könnten demnach maßgeblich aktuelle perioperative Antibiotikaprophylaxen sowie postoperative Wundbehandlungen verändern. Für diese Arbeit wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass Genexpressionsprofile in subkutanem Fettgewebe Aufschluss über die Fähigkeit lokaler Abwehrmechanismen gegenüber bakteriellen Wundinfektionen (WI) geben könnten.

Hierfür wurden Proben an subkutanem Fettgewebe intraoperativ im Rahmen offener abdominaler Eingriffen entnommen und die Patienten prospektiv klinisch auf die Entwicklung von WI geprüft. Anschließend wurden Patienten mit postoperativen WI in einem 1:2 Verhältnis mit Patienten aus der Kohorte ohne WI gepaart.

Aus dem Kollektiv von 92 Patienten entwickelten 10 (11%) eine WI. Präoperative Risikofaktoren dieser Patienten waren nicht signifikant unterschiedlich zu denen von nicht-WI Patienten. Über Microarray sowie PCR-Analysen von, aus Fettgewebe isolierter RNA, konnten 1025 differenziell exprimierte Gene identifiziert werden. Hierbei stellten AZGP1 und ALDH1A3 jeweilig die am stärksten herunter- und hochregulierten Gene dar. Aus dem Genkollektiv der top-50 differentiell exprimierten Gene konnten dann mittels einer Booleschen Musteranalyse Genpaare ermittelt werden, die in ihrer Konstellation eine spezifische Signatur für Patienten mit WI darstellen. ALDH1A3 ist hierbei als wichtiger Marker maßgeblich an der Ausbildung dieser spezifischen Signaturen beteiligt. Bei vier Genpaar-Kombinationen konnte hierbei eine Spezifität von 80% für WI erreicht werden. Zudem wurde in einer funktionellen Klassifikation der Gene ersichtlich, dass Gene, die den Zellmetabolismus kontrollieren, größtenteils eine Herunterregulierung der Genexpression aufwiesen.

Durch diese Ergebnisse wird ersichtlich, dass es sich bei dem untersuchten Gewebe um ein metabolisch verändertes Gewebe handelt, das folglich nicht nur die Adipozyten selbst und somit ihre sekretorische Aktivität beeinflusst, sondern auch das Milieu im kompletten Fettgewebe. Dies hat Auswirkungen auf die Produktion von Adipokinen, die Funktion von Präadipozyten sowie anderer Vorläuferzellen in der stromal-vaskulären Fraktion (SVF) des Fettgewebes. Nachgewiesene mikrobiozide sowie regenerative Eigenschaften könnten somit nur unzureichend ausgeübt werden und die Entwicklung von postoperativen Wundheilungsstörungen begünstigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse zeigen konnten, dass eine Veränderung metabolisch aktiver Gene in subkutanem Fettgewebe ein Risikofaktor für die Ausbildung postoperativer WI darstellt. In dieser Arbeit konnten zudem WI-spezifische Expressionsmuster im Fettgewebe identifizieren werden, die klinisch das WI-Risiko von Individuen vorhersagen könnten. Die Erkenntnis, dass der Stoffwechsel des Fettgewebes bedeutende Auswirkungen auf die Entwicklung von WI aufweist, könnte ganz neue therapeutische Ansätze für Risikopatienten darstellen. Die Applikation von Wirkstoffen, mit direkten modulatorischen Effekten auf den Energiemetabolismus von Fettgewebe (z.B. PPAR γ Agonisten), oder die Verabreichung von Arzneimitteln, die in der Zyklooxygenase-2 (Cox-2)/Prostaglandin (PG)- Achse eingreifen (Vegiopoulos, Muller-Decker et al. 2010), könnten somit ein Ansatzpunkt für die Prophylaxe von Wundinfektionen darstellen, und deren Auftreten folglich reduzieren.

Durch die Komplexität des Themas sowie einen weiterhin unvollständigen Wissensstand genetischer und molekularer Eigenschaften, werden in Zukunft jedoch weiterführende Experimente und Studien notwendig sein, um die hier aufgeworfenen Hypothesen zu bestätigen. Ein breiteres und aussagekräftigeres Bild könnte sich durch Erweiterung der Studie mit Einbindung eines größeren Patientenkollektivs ergeben. Weitere mögliche Ansätze wären zudem in-vitro Experimente an Adipozyten oder auch in-vivo Untersuchungen an knock-out Mäusen, durch welche genauere Untersuchungen der Funktion und Interaktion der hier herausgearbeiteten Gene, und somit ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge ermöglicht werden könnte.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M., C. T. Montague, J. B. Prins, J. C. Holder, S. A. Smith, L. Sanders, J. E. Digby, C. P. Sewter, M. A. Lazar, V. K. Chatterjee and S. O'Rahilly. "Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation." *J Clin Invest* 100 (1997): 3149-3153.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier. "Leptin." *Annu Rev Physiol* 62 (2000): 413-437.
- Albertus, D. L., C. W. Seder, G. Chen, X. Wang, W. Hartojo, L. Lin, A. Silvers, D. G. Thomas, T. J. Giordano, A. C. Chang, M. B. Orringer, W. L. Bigbee, A. M. Chinnaiyan and D. G. Beer. "AZGP1 autoantibody predicts survival and histone deacetylase inhibitors increase expression in lung adenocarcinoma." *J Thorac Oncol* 3 (2008): 1236-1244.
- Altman, A. M., E. S. Chiu, X. Bai, Y. Yan, Y. H. Song, R. E. Newsome and E. U. Alt. "Human adipose-derived stem cells adhere to acellular dermal matrix." *Aesthetic Plast Surg* 32 (2008): 698-699.
- Antuna-Puente, B., B. Feve, S. Fellahi and J. P. Bastard. "Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity." *Diabetes Metab* 34 (2008): 2-11.
- Arner, P., S. Bernard, M. Salehpour, G. Possnert, J. Liebl, P. Steier, B. A. Buchholz, M. Eriksson, E. Arner, H. Hauner, T. Skurk, M. Ryden, K. N. Frayn and K. L. Spalding. "Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease." *Nature* 478 (2011): 110-113.
- Arsenijevic, D., H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B. S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M. C. Alves-Guerra, M. Gubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins and D. Ricquier. "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production." *Nat Genet* 26 (2000): 435-439.
- Awad, S. S. "Adherence to surgical care improvement project measures and post-operative surgical site infections." *Surg Infect (Larchmt)* 13 (2012): 234-237.
- Bao, Y., C. Bing, L. Hunter, J. R. Jenkins, M. Wabitsch and P. Trayhurn. "Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes." *FEBS Lett* 579 (2005): 41-47.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem and M. Tomic-Canic. "Growth factors and cytokines in wound healing." *Wound Repair Regen* 16 (2008): 585-601.
- Beale, E. G., C. Forest and R. E. Hammer. "Regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes." *Biochimie* 85 (2003): 1207-1211.
- Beale, E. G., R. E. Hammer, B. Antoine and C. Forest. "Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene." *Trends Endocrinol Metab* 15 (2004): 129-135.
- Bhat, P. V., L. Poissant, P. Falardeau and A. Lacroix. "Enzymatic oxidation of all-trans retinal to retinoic acid in rat tissues." *Biochem Cell Biol* 66 (1988): 735-740.
- Bing, C., Y. Bao, J. Jenkins, P. Sanders, M. Manieri, S. Cinti, M. J. Tisdale and P. Trayhurn. "Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004): 2500-2505.
- Bing, C. and P. Trayhurn. "New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia." *Proc Nutr Soc* 68 (2009): 385-392.
- Blanpain, C., W. E. Lowry, A. Geoghegan, L. Polak and E. Fuchs. "Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche." *Cell* 118 (2004): 635-648.

- Blasi, A., C. Martino, L. Balducci, M. Saldarelli, A. Soleti, S. E. Navone, L. Canzi, S. Cristini, G. Invernici, E. A. Parati and G. Alessandri. "Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential." *Vasc Cell* 3 (2011): 5.
- Böcker, W., H. Denk and P. U. Heitz. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München (2008)
- Bouloumie, A., H. C. Drexler, M. Lafontan and R. Busse. "Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis." *Circ Res* 83 (1998): 1059-1066.
- Burgi, W. and K. Schmid. "Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma." *J Biol Chem* 236 (1961): 1066-1074.
- Ceperuelo-Mallafre, V., S. Naf, X. Escote, E. Caubet, J. M. Gomez, M. Miranda, M. R. Chacon, J. M. Gonzalez-Clemente, L. Gallart, C. Gutierrez and J. Vendrell. "Circulating and adipose tissue gene expression of zinc-alpha2-glycoprotein in obesity: its relationship with adipokine and lipolytic gene markers in subcutaneous and visceral fat." *J Clin Endocrinol Metab* 94 (2009): 5062-5069.
- Charriere, G., B. Cousin, E. Arnaud, M. Andre, F. Bacou, L. Penicaud and L. Casteilla. "Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity." *J Biol Chem* 278 (2003): 9850-9855.
- Chopra, T., J. J. Zhao, G. Alangaden, M. H. Wood and K. S. Kaye. "Preventing surgical site infections after bariatric surgery: value of perioperative antibiotic regimens." *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 10 (2010): 317-328.
- Cianfarani, F., G. Toietta, G. Di Rocco, E. Cesareo, G. Zambruno and T. Odorisio. "Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing." *Wound Repair Regen* 21 (2013): 545-553.
- Cicco, G., F. Giorgino and S. Cicco (2011). Wound Healing in Diabetes: Hemorheological and Microcirculatory Aspects. *Oxygen Transport to Tissue XXXII*. J. C. LaManna, M. A. Puchowicz, K. Xu, D. K. Harrison and D. F. Bruley, Springer US. **701**: 263-269.
- Cousin, B., M. Andre, L. Casteilla and L. Penicaud. "Altered macrophage-like functions of preadipocytes in inflammation and genetic obesity." *J Cell Physiol* 186 (2001): 380-386.
- Cousin, B., O. Munoz, M. Andre, A. M. Fontanilles, C. Dani, J. L. Cousin, P. Laharrague, L. Casteilla and L. Penicaud. "A role for preadipocytes as macrophage-like cells." *FASEB J* 13 (1999): 305-312.
- Culver, D. H., T. C. Horan, R. P. Gaynes, W. J. Martone, W. R. Jarvis, T. G. Emori, S. N. Banerjee, J. R. Edwards, J. S. Tolson, T. S. Henderson and et al. "Surgical wound infection rates by wound class, operative procedure, and patient risk index. National Nosocomial Infections Surveillance System." *Am J Med* 91 (1991): 152S-157S.
- De Siena, R., L. Balducci, A. Blasi, M. G. Montanaro, M. Saldarelli, V. Saponaro, C. Martino, G. Logrieco, A. Soleti, S. Fiobellot, P. Madeddu, G. Rossi, D. Ribatti, A. Crovace, S. Cristini, G. Invernici, E. A. Parati and G. Alessandri. "Omentum-derived stromal cells improve myocardial regeneration in pig post-infarcted heart through a potent paracrine mechanism." *Exp Cell Res* 316 (2010): 1804-1815.
- Dierssen, T., P. Vicente, J. L. Seco, I. Rodrigo and M. Delgado-Rodriguez. "[Risk factors associated with the development of surgical wound infection in a general surgery service]." *Enferm Infecc Microbiol Clin* 14 (1996): 240-244.
- Diez-Itza, I., L. M. Sanchez, M. T. Allende, F. Vizoso, A. Ruibal and C. Lopez-Otin. "Zn-alpha 2-glycoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with clinical, histological and biochemical parameters." *Eur J Cancer* 29A (1993): 1256-1260.
- DiPiro, J. T., R. G. Martindale, A. Bakst, P. F. Vacani, P. Watson and M. T. Miller. "Infection in surgical patients: effects on mortality, hospitalization, and postdischarge care." *Am J Health Syst Pharm* 55 (1998): 777-781.
- Dow, G., A. Browne and R. G. Sibbald. "Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment." *Ostomy Wound Manage* 45 (1999): 23-27, 29-40; quiz 41-22.
- Duester, G. "Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis." *Cell* 134 (2008): 921-931.

- Dusserre, E., P. Moulin and H. Vidal. "Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues." *Biochim Biophys Acta* 1500 (2000): 88-96.
- Ebrahimian, T. G., F. Pouzoulet, C. Squiban, V. Buard, M. Andre, B. Cousin, P. Gourmelon, M. Benderitter, L. Casteilla and R. Tamarat. "Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009): 503-510.
- Edwards, R. and K. G. Harding. "Bacteria and wound healing." *Curr Opin Infect Dis* 17 (2004): 91-96.
- Ennigrou, S., L. Mokhtar, N. Ben Alaya, C. Dziri, A. Cherif, N. Najah, S. Ben Redjeb and B. Zouari. "[Study of the incidence and cost of nosocomial infections in general surgery]." *Tunis Med* 78 (2000): 628-633.
- Everts, H. B., L. E. King, Jr., J. P. Sundberg and D. E. Ong. "Hair cycle-specific immunolocalization of retinoic acid synthesizing enzymes Aldh1a2 and Aldh1a3 indicate complex regulation." *J Invest Dermatol* 123 (2004): 258-263.
- Everts, H. B., J. P. Sundberg, L. E. King, Jr. and D. E. Ong. "Immunolocalization of enzymes, binding proteins, and receptors sufficient for retinoic acid synthesis and signaling during the hair cycle." *J Invest Dermatol* 127 (2007): 1593-1604.
- Ezure, T. and S. Amano. "Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts." *Biofactors* 31 (2007): 229-236.
- Fain, J. N., A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema and S. W. Bahouth. "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans." *Endocrinology* 145 (2004): 2273-2282.
- Festa, E., J. Fretz, R. Berry, B. Schmidt, M. Rodeheffer, M. Horowitz and V. Horsley. "Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling." *Cell* 146 (2011): 761-771.
- Frank, S., B. Stallmeyer, H. Kampfer, N. Kolb and J. Pfeilschifter. "Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair." *J Clin Invest* 106 (2000): 501-509.
- Frayn, K. N., F. Karpe, B. A. Fielding, I. A. Macdonald and S. W. Coppack. "Integrative physiology of human adipose tissue." *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 (2003): 875-888.
- Fu, Y., N. Luo, R. L. Klein and W. T. Garvey. "Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation." *J Lipid Res* 46 (2005): 1369-1379.
- Gan, B., J. Hu, S. Jiang, Y. Liu, E. Sahin, L. Zhuang, E. Fletcher-Sananikone, S. Colla, Y. A. Wang, L. Chin and R. A. Depinho. "Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells." *Nature* 468 (2010): 701-704.
- Gaynes, R. P., D. H. Culver, T. C. Horan, J. R. Edwards, C. Richards and J. S. Tolson. "Surgical site infection (SSI) rates in the United States, 1992-1998: the National Nosocomial Infections Surveillance System basic SSI risk index." *Clin Infect Dis* 33 Suppl 2 (2001): S69-77.
- Germain, P., P. Chambon, G. Eichele, R. M. Evans, M. A. Lazar, M. Leid, A. R. De Lera, R. Lotan, D. J. Mangelsdorf and H. Gronemeyer. "International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors." *Pharmacol Rev* 58 (2006): 712-725.
- Gomez-Valades, A. G., A. Mendez-Lucas, A. Vidal-Alabro, F. X. Blasco, M. Chillon, R. Bartrons, J. Bermudez and J. C. Perales. "Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice." *Diabetes* 57 (2008): 2199-2210.
- Gong, F. Y., S. J. Zhang, J. Y. Deng, H. J. Zhu, H. Pan, N. S. Li and Y. F. Shi. "Zinc-alpha2-glycoprotein is involved in regulation of body weight through inhibition of lipogenic enzymes in adipose tissue." *Int J Obes (Lond)* 33 (2009): 1023-1030.
- Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., J. I. Cleeman, S. C. Smith, Jr., C. Lenfant, A. American Heart, L. National Heart and I. Blood. "Definition of metabolic syndrome: Report of the

- National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." Circulation 109 (2004): 433-438.
- Gurtner, G. C., S. Werner, Y. Barrandon and M. T. Longaker. "Wound repair and regeneration." Nature 453 (2008): 314-321.
- Hale, L. P. "Zinc alpha-2-glycoprotein regulates melanin production by normal and malignant melanocytes." J Invest Dermatol 119 (2002): 464-470.
- Hale, L. P., D. T. Price, L. M. Sanchez, W. Demark-Wahnefried and J. F. Madden. "Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer." Clin Cancer Res 7 (2001): 846-853.
- Hamdy, O., S. Porramatikul and E. Al-Ozairi. "Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat." Curr Diabetes Rev 2 (2006): 367-373.
- Hasegawa, A., C. Usui, H. Kawano, S. Sakamoto and M. Higuchi. "Characteristics of body composition and resting energy expenditure in lean young women." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 57 (2011): 74-79.
- Hassan, M. I., A. Waheed, S. Yadav, T. P. Singh and F. Ahmad. "Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein." Mol Cancer Res 6 (2008): 892-906.
- Hauer, H., T. Skurk and M. Wabitsch. "Cultures of human adipose precursor cells." Methods Mol Biol 155 (2001): 239-247.
- He, N., H. Brysk, S. K. Tying, I. Ohkubo and M. M. Brysk. "Zinc-alpha(2)-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces cdc2 expression." J Cell Biochem Suppl 36 (2001): 162-169.
- Hirai, K., H. J. Hussey, M. D. Barber, S. A. Price and M. J. Tisdale. "Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients." Cancer Res 58 (1998): 2359-2365.
- Horan, T. C., M. Andrus and M. A. Dudeck. "CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting." Am J Infect Control 36 (2008): 309-332.
- Horan, T. C., R. P. Gaynes, W. J. Martone, W. R. Jarvis and T. G. Emori. "CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections." Infect Control Hosp Epidemiol 13 (1992): 606-608.
- Horan, T. C., R. P. Gaynes, W. J. Martone, W. R. Jarvis and T. G. Emori. "CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections." Am J Infect Control 20 (1992): 271-274.
- House, M. G., Y. Fong, D. J. Arnaoutakis, R. Sharma, C. B. Winston, M. Protic, M. Gonen, S. H. Olson, R. C. Kurtz, M. F. Brennan and P. J. Allen. "Preoperative predictors for complications after pancreaticoduodenectomy: impact of BMI and body fat distribution." J Gastrointest Surg 12 (2008): 270-278.
- Ito, M., Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, F. Liang, R. J. Morris and G. Cotsarelis. "Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis." Nat Med 11 (2005): 1351-1354.
- Jarvis, W. R. "Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species." Clin Infect Dis 20 (1995): 1526-1530.
- Karim, H., K. Chafik, K. Karim, H. Moez, A. M. Makki, H. Adnen el, A. M. Morched and Z. Abdejellil. "[Risk factors for surgical wound infection in digestive surgery. Retrospective study of 3,000 surgical wounds]." Tunis Med 78 (2000): 634-640.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter and K. Bieback. "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." Stem Cells 24 (2006): 1294-1301.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier. "Adipose tissue as an endocrine organ." J Clin Endocrinol Metab 89 (2004): 2548-2556.
- Kirkland, K. B., J. P. Briggs, S. L. Trivette, W. E. Wilkinson and D. J. Sexton. "The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs." Infect Control Hosp Epidemiol 20 (1999): 725-730.

- Kivisaari, J. and J. Niinikoski. "Effects of hyperbaric oxygenation and prolonged hypoxia on the healing of open wounds." *Acta Chir Scand* 141 (1975): 14-19.
- Koenig, U., S. Amatschek, M. Mildner, L. Eckhart and E. Tschachler. "Aldehyde dehydrogenase 1A3 is transcriptionally activated by all-trans-retinoic acid in human epidermal keratinocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 400 (2010): 207-211.
- Kong, B., C. W. Michalski, X. Hong, N. Valkovskaya, S. Rieder, I. Abiatari, S. Streit, M. Erkan, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff. "AZGP1 is a tumor suppressor in pancreatic cancer inducing mesenchymal-to-epithelial transdifferentiation by inhibiting TGF-beta-mediated ERK signaling." *Oncogene* 29 (2010): 5146-5158.
- Kujath, P. and A. Michelsen. "Wunden – von der Physiologie zum Verband." *Dtsch Arztebl International* 105 (2008): 239-248.
- Lambeth, J. D. "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." *Nat Rev Immunol* 4 (2004): 181-189.
- Latham, R., A. D. Lancaster, J. F. Covington, J. S. Pirollo and C. S. Thomas, Jr. "The association of diabetes and glucose control with surgical-site infections among cardiothoracic surgery patients." *Infect Control Hosp Epidemiol* 22 (2001): 607-612.
- Lau, K., R. Paus, S. Tiede, P. Day and A. Bayat. "Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing." *Exp Dermatol* 18 (2009): 921-933.
- Leaper, D. J., H. van Goor, J. Reilly, N. Petrosillo, H. K. Geiss, A. J. Torres and A. Berger. "Surgical site infection - a European perspective of incidence and economic burden." *Int Wound J* 1 (2004): 247-273.
- Levy, V., C. Lindon, Y. Zheng, B. D. Harfe and B. A. Morgan. "Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding." *FASEB J* 21 (2007): 1358-1366.
- Lewis, R. T. "Oral versus systemic antibiotic prophylaxis in elective colon surgery: a randomized study and meta-analysis send a message from the 1990s." *Can J Surg* 45 (2002): 173-180.
- Lihn, A. S., J. M. Bruun, G. He, S. B. Pedersen, P. F. Jensen and B. Richelsen. "Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects." *Mol Cell Endocrinol* 219 (2004): 9-15.
- Loffreda, S., S. Q. Yang, H. Z. Lin, C. L. Karp, M. L. Brengman, D. J. Wang, A. S. Klein, G. B. Bulkley, C. Bao, P. W. Noble, M. D. Lane and A. M. Diehl. "Leptin regulates proinflammatory immune responses." *FASEB J* 12 (1998): 57-65.
- Malone, D. L., T. Genuit, J. K. Tracy, C. Gannon and L. M. Napolitano. "Surgical site infections: reanalysis of risk factors." *J Surg Res* 103 (2002): 89-95.
- Mangram, A. J., T. C. Horan, M. L. Pearson, L. C. Silver and W. R. Jarvis. "Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee." *Infect Control Hosp Epidemiol* 20 (1999): 250-278; quiz 279-280.
- Marrades, M. P., J. A. Martinez and M. J. Moreno-Aliaga. "ZAG, a lipid mobilizing adipokine, is downregulated in human obesity." *J Physiol Biochem* 64 (2008): 61-66.
- Martin, P. "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." *Science* 276 (1997): 75-81.
- Martone, W. J. and R. L. Nichols. "Recognition, prevention, surveillance, and management of surgical site infections: introduction to the problem and symposium overview." *Clin Infect Dis* 33 Suppl 2 (2001): S67-68.
- Montplaisir, V., N. C. Lan, J. Guimond, C. Savineau, P. V. Bhat and S. Mader. "Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans- or 9-cis-retinal." *J Biol Chem* 277 (2002): 17486-17492.
- Mracek, T., Q. Ding, T. Tzanavari, K. Kos, J. Pinkney, J. Wilding, P. Trayhurn and C. Bing. "The adipokine zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG) is downregulated with fat mass expansion in obesity." *Clin Endocrinol (Oxf)* 72 (2010): 334-341.
- Mracek, T., D. Gao, T. Tzanavari, Y. Bao, X. Xiao, C. Stocker, P. Trayhurn and C. Bing. "Downregulation of zinc-alpha2-glycoprotein in adipose tissue and liver of obese ob/ob mice and by tumour necrosis factor-alpha in adipocytes." *J Endocrinol* 204 (2010): 165-172.

- Mracek, T., N. A. Stephens, D. Gao, Y. Bao, J. A. Ross, M. Ryden, P. Arner, P. Trayhurn, K. C. Fearon and C. Bing. "Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients." *Br J Cancer* 104 (2011): 441-447.
- Mu, Y., J. R. Edwards, T. C. Horan, S. I. Berrios-Torres and S. K. Fridkin. "Improving risk-adjusted measures of surgical site infection for the national healthcare safety network." *Infect Control Hosp Epidemiol* 32 (2011): 970-986.
- Muzio, G., M. Maggiora, E. Paiuzzi, M. Oraldi and R. A. Canuto. "Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation." *Free Radic Biol Med* 52 (2012): 735-746.
- Nakada, D., T. L. Saunders and S. J. Morrison. "Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells." *Nature* 468 (2010): 653-658.
- Nakamura, T., H. Mitomi, A. Ihara, W. Onozato, T. Sato, H. Ozawa, K. Hatade and M. Watanabe. "Risk factors for wound infection after surgery for colorectal cancer." *World J Surg* 32 (2008): 1138-1141.
- Nasef, A., N. Mathieu, A. Chapel, J. Frick, S. Francois, C. Mazurier, A. Boutarfa, S. Bouchet, N. C. Gorin, D. Thierry and L. Fouillard. "Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G." *Transplantation* 84 (2007): 231-237.
- Nie, C., D. Yang, J. Xu, Z. Si, X. Jin and J. Zhang. "Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis." *Cell Transplant* 20 (2011): 205-216.
- NNIS System Report (1999). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. A report from the NNIS System. *Am J Infect Control*. 27: 520-532.
- Nowak, J. A., L. Polak, H. A. Pasolli and E. Fuchs. "Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis." *Cell Stem Cell* 3 (2008): 33-43.
- Nye, C. K., R. W. Hanson and S. C. Kalhan. "Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat." *J Biol Chem* 283 (2008): 27565-27574.
- Olson, M. M. and J. T. Lee, Jr. "Continuous, 10-year wound infection surveillance. Results, advantages, and unanswered questions." *Arch Surg* 125 (1990): 794-803.
- Ouchi, N., H. Kobayashi, S. Kihara, M. Kumada, K. Sato, T. Inoue, T. Funahashi and K. Walsh. "Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells." *J Biol Chem* 279 (2004): 1304-1309.
- Ouchi, N., J. L. Parker, J. J. Lugus and K. Walsh. "Adipokines in inflammation and metabolic disease." *Nat Rev Immunol* 11 (2011): 85-97.
- Pandzic Jaksic, V. "[Adipocytokines as mediators of metabolic role of adipose tissue]." *Acta Med Croatica* 64 (2010): 253-262.
- Pastor, C., J. H. Baek, M. G. Varma, E. Kim, L. A. Indorf and J. Garcia-Aguilar. "Validation of the risk index category as a predictor of surgical site infection in elective colorectal surgery." *Dis Colon Rectum* 53 (2010): 721-727.
- Peinado, J. R., Y. Jimenez-Gomez, M. R. Pulido, M. Ortega-Bellido, C. Diaz-Lopez, F. J. Padillo, J. Lopez-Miranda, R. Vazquez-Martinez and M. M. Malagon. "The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots." *Proteomics* 10 (2010): 3356-3366.
- Perusse, L., T. Rice, Y. C. Chagnon, J. P. Despres, S. Lemieux, S. Roy, M. Lacaille, M. A. Ho-Kim, M. Chagnon, M. A. Province, D. C. Rao and C. Bouchard. "A genome-wide scan for abdominal fat assessed by computed tomography in the Quebec Family Study." *Diabetes* 50 (2001): 614-621.
- Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud and L. Casteilla. "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives." *Circulation* 109 (2004): 656-663.
- Plikus, M. V., D. L. Gay, E. Treffeisen, A. Wang, R. J. Supanachart and G. Cotsarelis. "Epithelial stem cells and implications for wound repair." *Semin Cell Dev Biol* 23 (2012): 946-953.

- Plikus, M. V., J. A. Mayer, D. de la Cruz, R. E. Baker, P. K. Maini, R. Maxson and C. M. Chuong. "Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration." *Nature* 451 (2008): 340-344.
- Poulos, S. P., D. B. Hausman and G. J. Hausman. "The development and endocrine functions of adipose tissue." *Mol Cell Endocrinol* 323 (2010): 20-34.
- Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine and K. L. March. "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells." *Circulation* 109 (2004): 1292-1298.
- Reichert, B., R. Yasmeen, S. M. Jeyakumar, F. Yang, T. Thomou, H. Alder, G. Duester, A. Maiseyeu, G. Mihai, E. H. Harrison, S. Rajagopalan, J. L. Kirkland and O. Ziouzenkova. "Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation." *Mol Endocrinol* 25 (2011): 799-809.
- Reuler, J. B. and T. G. Cooney. "The pressure sore: pathophysiology and principles of management." *Ann Intern Med* 94 (1981): 661-666.
- Robson, M. C. "Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria." *Surg Clin North Am* 77 (1997): 637-650.
- Roca-Rivada, A., J. Alonso, O. Al-Massadi, C. Castelao, J. R. Peinado, L. M. Seoane, F. F. Casanueva and M. Pardo. "Secretome analysis of rat adipose tissues shows location-specific roles for each depot type." *J Proteomics* 74 (2011): 1068-1079.
- Russell, S. T. and M. J. Tisdale. "Antidiabetic properties of zinc-alpha2-glycoprotein in ob/ob mice." *Endocrinology* 151 (2010): 948-957.
- Schaberg, D. R. "Resistant gram-positive organisms." *Ann Emerg Med* 24 (1994): 462-464.
- Schafer, M. and S. Werner. "Transcriptional control of wound repair." *Annu Rev Cell Dev Biol* 23 (2007): 69-92.
- Schmitt, R., A. Marlier and L. G. Cantley. "Zag expression during aging suppresses proliferation after kidney injury." *J Am Soc Nephrol* 19 (2008): 2375-2383.
- Schreml, S., R. M. Szeimies, L. Prantl, S. Karrer, M. Landthaler and P. Babilas. "Oxygen in acute and chronic wound healing." *Br J Dermatol* 163 (2010): 257-268.
- Schwarz, E. J., M. J. Reginato, D. Shao, S. L. Krakow and M. A. Lazar. "Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription." *Mol Cell Biol* 17 (1997): 1552-1561.
- Selva, D. M., A. Lecube, C. Hernandez, J. A. Baena, J. M. Fort and R. Simo. "Lower zinc-alpha2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients unrelated to insulin resistance." *J Clin Endocrinol Metab* 94 (2009): 4499-4507.
- Sewter, C. P., F. Blows, A. Vidal-Puig and S. O'Rahilly. "Regional differences in the response of human pre-adipocytes to PPARgamma and RXRalpha agonists." *Diabetes* 51 (2002): 718-723.
- Shahparaki, A., L. Grunder and A. Sorisky. "Comparison of human abdominal subcutaneous versus omental preadipocyte differentiation in primary culture." *Metabolism* 51 (2002): 1211-1215.
- Shibata, S., Y. Tada, Y. Asano, C. S. Hau, T. Kato, H. Saeki, T. Yamauchi, N. Kubota, T. Kadowaki and S. Sato. "Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway." *J Immunol* 189 (2012): 3231-3241.
- Singer, A. J. and R. A. Clark. "Cutaneous wound healing." *N Engl J Med* 341 (1999): 738-746.
- Smith, R. L., J. K. Bohl, S. T. McElearney, C. M. Friel, M. M. Barclay, R. G. Sawyer and E. F. Foley. "Wound infection after elective colorectal resection." *Ann Surg* 239 (2004): 599-605; discussion 605-597.
- Smyth, E. T. and A. M. Emmerson. "Surgical site infection surveillance." *J Hosp Infect* 45 (2000): 173-184.
- Sonoda, J., J. Laganriere, I. R. Mehl, G. D. Barish, L. W. Chong, X. Li, I. E. Scheffler, D. C. Mock, A. R. Bataille, F. Robert, C. H. Lee, V. Giguere and R. M. Evans. "Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense." *Genes Dev* 21 (2007): 1909-1920.

- Soper, D. E., R. C. Bump and W. G. Hurt. "Wound infection after abdominal hysterectomy: effect of the depth of subcutaneous tissue." *Am J Obstet Gynecol* 173 (1995): 465-469; discussion 469-471.
- Sorensen, L. T., U. Hemmingsen, F. Kallehave, P. Wille-Jorgensen, J. Kjaergaard, L. N. Moller and T. Jorgensen. "Risk factors for tissue and wound complications in gastrointestinal surgery." *Ann Surg* 241 (2005): 654-658.
- Spalding, K. L., E. Arner, P. O. Westermarck, S. Bernard, B. A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen and P. Arner. "Dynamics of fat cell turnover in humans." *Nature* 453 (2008): 783-787.
- Stappenbeck, T. S. and H. Miyoshi. "The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair." *Science* 324 (2009): 1666-1669.
- Tada, T., I. Ohkubo, M. Niwa, M. Sasaki, H. Tateyama and T. Eimoto. "Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues." *J Histochem Cytochem* 39 (1991): 1221-1226.
- Tanaka, F., K. Tominaga, M. Ochi, T. Tanigawa, T. Watanabe, Y. Fujiwara, K. Ohta, N. Oshitani, K. Higuchi and T. Arakawa. "Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats." *Life Sci* 83 (2008): 771-779.
- Tang, R., H. H. Chen, Y. L. Wang, C. R. Changchien, J. S. Chen, K. C. Hsu, J. M. Chiang and J. Y. Wang. "Risk factors for surgical site infection after elective resection of the colon and rectum: a single-center prospective study of 2,809 consecutive patients." *Ann Surg* 234 (2001): 181-189.
- Tchkonina, T., N. Giorgadze, T. Pirtskhalava, T. Thomou, M. DePonte, A. Koo, R. A. Forse, D. Chinnappan, C. Martin-Ruiz, T. von Zglinicki and J. L. Kirkland. "Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes." *Diabetes* 55 (2006): 2571-2578.
- Todorov, P. T., T. M. McDevitt, D. J. Meyer, H. Ueyama, I. Ohkubo and M. J. Tisdale. "Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor." *Cancer Res* 58 (1998): 2353-2358.
- Trayhurn, P., C. Bing and I. S. Wood. "Adipose tissue and adipokines--energy regulation from the human perspective." *J Nutr* 136 (2006): 1935S-1939S.
- Uhlig, N. *Kurzlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2005)
- Van Harmelen, V., K. Rohrig and H. Hauner. "Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects." *Metabolism* 53 (2004): 632-637.
- Vegiopoulos, A., K. Muller-Decker, D. Strzoda, I. Schmitt, E. Chichelnitskiy, A. Ostertag, M. Berriel Diaz, J. Rozman, M. Hrabe de Angelis, R. M. Nusing, C. W. Meyer, W. Wahli, M. Klingenspor and S. Herzig. "Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes." *Science* 328 (2010): 1158-1161.
- Vidal, H., D. Auboeuf, P. De Vos, B. Staels, J. P. Riou, J. Auwerx and M. Laville. "The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue." *J Clin Invest* 98 (1996): 251-255.
- Villena, J. A., B. Cousin, L. Penicaud and L. Castella. "Adipose tissues display differential phagocytic and microbicidal activities depending on their localization." *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 (2001): 1275-1280.
- Waisbren, E., H. Rosen, A. M. Bader, S. R. Lipsitz, S. O. Rogers, Jr. and E. Eriksson. "Percent body fat and prediction of surgical site infection." *J Am Coll Surg* 210 (2010): 381-389.
- Watanabe, A., S. Kohnoe, R. Shimabukuro, T. Yamanaka, Y. Iso, H. Baba, H. Higashi, H. Orita, Y. Emi, I. Takahashi, D. Korenaga and Y. Maehara. "Risk factors associated with surgical site infection in upper and lower gastrointestinal surgery." *Surg Today* 38 (2008): 404-412.
- Weiss, C. A., 3rd, C. L. Statz, R. A. Dahms, M. J. Remucal, D. L. Dunn and G. J. Beilman. "Six years of surgical wound infection surveillance at a tertiary care center: review of the

- microbiologic and epidemiological aspects of 20,007 wounds." Arch Surg 134 (1999): 1041-1048.
- Werner, S. and R. Grose. "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev 83 (2003): 835-870.
- West, A. P., I. E. Brodsky, C. Rahner, D. K. Woo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. C. Walsh, Y. Choi, G. S. Shadel and S. Ghosh. "TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS." Nature 472 (2011): 476-480.
- West, A. P., G. S. Shadel and S. Ghosh. "Mitochondria in innate immune responses." Nat Rev Immunol 11 (2011): 389-402.
- Wilson, J. A. and J. J. Clark. "Obesity: impediment to postsurgical wound healing." Adv Skin Wound Care 17 (2004): 426-435.
- Yang, X. and U. Smith. "Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer?" Diabetologia 50 (2007): 1127-1139.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman. "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature 372 (1994): 425-432.
- Ziouzenkova, O., G. Orasanu, M. Sharlach, T. E. Akiyama, J. P. Berger, J. Viereck, J. A. Hamilton, G. Tang, G. G. Dolnikowski, S. Vogel, G. Duyster and J. Plutzky. "Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity." Nat Med 13 (2007): 695-702.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick. "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng 7 (2001): 211-228.

VII. DANKSAGUNG

Bei der Entstehung einer solchen Arbeit sind stets viele Menschen involviert, manche davon sehr offensichtlich, andere eher im Hintergrund. Alle jedoch mit dem gleichen Ziel einer fachlichen oder auch emotionalen Unterstützung, die mich stets voran getrieben hat und ohne die diese Arbeit niemals vollendet worden wäre.

Zuallererst möchte ich meiner Familie danken. Insbesondere meinen Eltern, die sowohl an erfolgreichen als auch an frustrierenden Tagen stets für mich da waren und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Für eure uneingeschränkte Unterstützung und dem übermittelten Gefühl, dass nichts unerreichbar ist. Für motivierende, erinnernde, tröstende, ablenkende und gelegentlich auch einfach mal gar keine Worte.

Besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Sonja Gillen, die mich nicht nur weit über das Fachliche hinaus in dieser Zeit betreut hat, sondern mit Ihrem Ehrgeiz, Ihrer stetigen Energie und ihrer Ausdauer auch ein Exempel statuiert. Vielen Dank für Alles.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Doktorvater Jörg Kleeff bedanken, für seine ausgezeichnete fachliche Anleitung und seine immense Geduld.

Ein weiteres Danke geht an dieser Stelle an Bo Kong, ein Wissenschaftler wie er im Buche steht, der mich mit seiner Faszination für Neues und Unentdecktes anstecken konnte und mir im Labor stets ein verlässlicher und motivierter Ansprechpartner war, an jedem Wochentag, zu jeder Tageszeit.

An das ganze Laborteam, die immer ein offenes Ohr für Fragen hatten und mich in der Durchführung der Experimente unterstützt haben.

Christian, für sein brüderliches Dasein. Meinen Freunden und Weggefährten, ohne die kein Tag der Gleiche gewesen wäre, und ich nicht zu dem Menschen geworden wäre, der ich heute bin.