



**Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München**

Institut für
Klinische Chemie und Pathobiochemie
des Klinikums rechts der Isar der
Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. J. Ruland)

**YKL-40 - ein neuer Biomarker im Serum für bronchopulmonale Erkrankungen:
Analytische Charakterisierung und klinische Evaluierung**

Ludwig Maximilian Bulst

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

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. P. B. Lippa
2. Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 18.05.2016 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.12.2016 angenommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht unter:

Schmalenberg, M., Beaudoin, C., Bulst, L., Steubl, D. & Luppa, P.B., 2015. Magnetic bead fluorescent immunoassay for the rapid detection of the novel inflammation marker YKL40 at the point-of-care. *Journal of Immunological Methods*, 427, pp.36-41.

*Für meine Familie
und
insbesondere meine liebe Oma,
die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben darf*

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Infektionskrankheiten	1
1.2. Grundlagen zu YKL-40.....	2
1.2.1. Entdeckung und Namensgebung	2
1.2.2. Struktur, Genetik und Expression.....	3
1.2.3. Regulation.....	5
1.2.4. Biologische Aktivität.....	5
1.3. YKL-40 als Biomarker	8
1.3.1. Referenzwerte und Stabilität	8
1.3.2. YKL-40 und maligne Erkrankungen.....	9
1.3.3. YKL-40 und nicht-maligne Erkrankungen.....	10
1.3.4. YKL-40 und die Lunge.....	11
1.3.4.1. Infektionen der Lunge.....	11
1.3.4.2. Chronische Lungenerkrankungen	12
1.3.4.3. Pädiatrische Lungenerkrankungen.....	13
1.3.4.4. Maligne Lungenerkrankungen	14
1.3.4.5. Alternative Probenmaterialien	14
1.4. Zusammenfassung.....	15
2. Zielsetzung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Chemikalien	17
3.1.2. Puffer	17
3.1.3. Proteine	17
3.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.5. Geräte.....	18
3.1.6. Software.....	18
3.1.7. Votum der Ethikkommission	19
3.1.8. Patientenkollektiv der explorativen Studie.....	19
3.1.9. Patientenkollektiv der prospektiven Studie.....	21
3.2. Methoden	23
3.2.1. Prinzip des Immunoassay-Systems zur Bestimmung von YKL-40	23
3.2.2. Vorbereitung des Immunoassays	23
3.2.3. Durchführung des Immunoassays am Messtag.....	24
3.3. Statistische Auswertung	25
3.3.1. ROC-Kurven (Receiver-Operating-Characteristic)	25
3.3.2. Box-Whisker-Plots	26
3.3.3. Korrelationsanalyse nach Spearman	27
3.3.4. Signifikanz	27

4. Ergebnisse	28
4.1. <i>Performance</i> des Immunoassays	28
4.1.1. Richtigkeit	28
4.1.2. Verdünnungslinearität.....	28
4.1.3. <i>Recovery</i>	28
4.1.4. Präzision	29
4.2. Ergebnisse der explorativen Studie	30
4.2.1. Ergebnisse im Kontrollkollektiv.....	30
4.2.2. Korrelation von CRP und YKL-40.....	32
4.2.3. YKL-40 und CRP bei Lebererkrankungen.....	35
4.2.4. YKL-40 und CRP bei malignen Erkrankungen	38
4.2.5. YKL-40 und CRP als Inflammationsmarker.....	42
4.2.6. YKL-40 und CRP bei Lungenerkrankungen	45
4.2.7. Vergleiche mit PCT.....	50
4.2.8. Ergebnisse der Verlaufsmessungen.....	52
4.3. Ergebnisse der prospektiven Studie	57
4.3.1. Auswertung der Messdaten.....	57
4.4. Zusammenfassung.....	59
5. Diskussion	61
5.1. Fragestellung	61
5.2. YKL-40 als Biomarker	61
5.2.1. Referenzwerte bei gesunden Personen	61
5.2.2. Der mögliche Nutzen von YKL-40 in der Diagnostik	62
5.2.2.1. Lebererkrankungen.....	62
5.2.2.2. Maligne Erkrankungen.....	63
5.2.2.3. Orthopädie/Unfallchirurgie	66
5.2.2.4. Inflammation	67
5.2.2.5. Lungenerkrankungen.....	69
5.3. YKL-40 im Vergleich mit CRP und PCT.....	72
5.4. Hinweise der Verlaufsbeobachtung.....	75
6. Zusammenfassung und Ausblick	80
7. Danksagung	82
8. Abkürzungsverzeichnis	83
9. Tabellenverzeichnis	85
10. Abbildungsverzeichnis	86
11. Literaturverzeichnis	88

1. Einleitung

1.1. Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten gehören zu den bedeutendsten Krankheitsgruppen der Medizin. Diese Bedeutung steigt in unserer immer älter werdenden Bevölkerung zudem kontinuierlich weiter an, da das Risiko Infektionen zu erleiden mit zunehmendem Alter erhöht ist. Ebenso ist das Alter mit einem schlechteren *Outcome* bei Infektionen assoziiert (Gavazzi & Krause 2002). Dementsprechend sind Infektionskrankheiten auch wichtige Todesursachen. Infektionen des unteren Atemtraktes sind beispielsweise seit vielen Jahren weltweit nach ischämischen Herzerkrankungen und zerebrovaskulären Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache. Im Jahr 2011 starben 3,2 Millionen Menschen an Infektionen des unteren Atemtraktes. Doch auch andere Infektionskrankheiten fordern viele Todesopfer. Auf Platz 5 der weltweit häufigsten Todesursachen finden sich Durchfallerkrankungen, die zumeist infektiös bedingt sind. Fast 1,9 Millionen Menschen verstarben im Jahr 2011 an Erkrankungen dieser Gruppe. Mit knapp 1,6 Millionen Menschen starben nur geringfügig weniger Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion, die damit Platz 6 der häufigsten Todesursachen weltweit darstellt. In Afrika und Südostasien sind Infektionskrankheiten sogar die Haupttodesursache (Mathers et al. 2013).

Doch nicht nur schwer verlaufende Infektionen sind medizinisch bedeutsam. Auch leicht verlaufende Infektionen, wie die gewöhnliche Erkältung, können folgenreich sein und bedürfen daher ebenfalls besonderer Aufmerksamkeit hinsichtlich Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten. In den USA konsultieren jährlich etwa 25 Millionen Menschen mit unkomplizierten Infektionen des oberen Atemweges ihren Hausarzt. Dies entspricht fast 8% der gesamten Bevölkerung der USA. Diese leichten Infektionen resultieren in der Folge in etwa 20 Millionen Krankheitstagen der arbeitenden Bevölkerung und etwa 22 Millionen Krankheitstagen bei Schülern allein in den USA. Kleine Kinder haben schätzungsweise 6-8 Erkältungsepisoden jährlich, bei Erwachsenen sind es immerhin noch 2-4 Erkältungen pro Jahr (Heikkinen & Järvinen 2003). Die geschätzten Gesamtkosten für virale Infektionen des Atemtraktes belaufen sich allein in den USA auf fast 40 Mrd. US-Dollar jährlich (Fendrick et al. 2003). Aus diesen Daten lässt sich die enorme gesellschaftliche Bedeutung vermeintlich harmloser Infektionen abschätzen.

Insgesamt zeigt sich, dass den Infektionskrankheiten eine immense Bedeutung innerhalb der Medizin zukommt. Daher ist es wichtig, Infektionen sicher erkennen und deren Verlauf bestmöglich erfassen zu können. Dafür können neben der Anamnese und klinischen bzw.

mikrobiologischen Untersuchungen auch verschiedene Akute-Phase-Proteine entscheidend sein. Zu den letzteren gehört unter anderem das C-reaktive Protein (CRP). Hierbei handelt es sich um ein Protein, das in der Leber gebildet und bei Entzündungsreizen während der Akute-Phase-Reaktion vermehrt synthetisiert wird. Somit ist das CRP geeignet, Aussagen über Entzündungsvorgänge im menschlichen Körper zu treffen (Dörner 2009). In dieser Funktion wird das CRP schon seit einiger Zeit in der klinischen Routine verwendet (Gavazzi & Krause 2002; Pepys & Hirschfield 2003).

Ein weiteres Protein, das oft als Entzündungsmarker Verwendung findet, ist das Procalcitonin (PCT). Dieses Protein wird von C-Zellen der Schilddrüse gebildet und ist vorwiegend bei bakteriellen Infektionen erhöht im Serum messbar. Interessanterweise stammt es in diesen Fällen aber vermutlich nicht aus der Schilddrüse, sondern ebenso wie das CRP aus der Leber (Dörner 2009). Dabei liefert das PCT ebenso wie das CRP keine Hinweise auf den Ort des Entzündungsgeschehens (Assicot et al. 1993; Gendrel & Bohuon 1997; Gendrel et al. 1999).

Doch nicht nur Proteine werden als Entzündungsmarker verwendet. Auch eine Erhöhung der Leukozyten im Blut, wie sie bereits durch Anfertigung eines kleinen Blutbildes erkannt werden kann, wird zur Diagnose und Verlaufskontrolle entzündlicher Vorgänge im menschlichen Körper verwendet (Dörner 2009).

Aufgrund der oben dargestellten Bedeutung von Infektionskrankheiten für die Medizin wäre es wünschenswert, neben allgemeinen Entzündungsmarkern wie den Proteinen CRP und PCT oder der Leukozytenzahl noch weitere Methoden zur Verfügung zu haben, um verschiedene Infektionen selektiver erkennen und auch den Verlauf noch effizienter erfassen zu können. Damit wäre es eventuell möglich, eine Verschlechterung des Zustandes der Patienten frühestmöglich zu detektieren und so auch früher und effektiver therapieren zu können. In dieser Arbeit soll mit dem Protein YKL-40 ein neuer potentieller Biomarker für Infektionskrankheiten vorgestellt und hinsichtlich seiner klinischen Wertigkeit überprüft werden.

1.2. Grundlagen zu YKL-40

1.2.1. Entdeckung und Namensgebung

Das Protein YKL-40 wurde 1989 aus der Osteosarkomzelllinie MG63 identifiziert und galt ursprünglich als neues Knochenprotein. *In vitro* wird YKL-40 von dieser Zelllinie in großer Menge sezerniert. Später erkannte man, dass YKL-40 identisch mit einem Protein ist, das bereits 1985 von Millis et al. in differenzierten glatten Muskelzellen aus Schweineaortengewebe isoliert wurde (Millis et al. 1985; Johansen 2006). Außerdem ist

Einleitung

YKL-40 identisch mit einem Protein, das 1988 von Rejman et al. in bovinen Proteinsekreten während der nichtlaktierenden Phase nachgewiesen wurde (Rejman & Hurley 1988; Johansen 2006), sowie mit einem Heparin-bindenden Protein aus humanen Synovialzellen (Nyirkos & Golds 1990; Johansen 2006).

Der Name „YKL-40“ setzt sich aus den drei N-terminalen Aminosäuren Tyrosin (Y), Lysin (K) und Leucin (L), sowie dem Molekulargewicht des Proteins von ca. 40 kDa zusammen (Julia S Johansen et al. 1992; Julia S Johansen 2006). YKL-40 ist in der Literatur auch unter anderen Namen bekannt geworden, zum Beispiel *Human Cartilage glycoprotein 39* (HC-gp39) (Hakala et al. 1993), *38 kDa heparin-binding glycoprotein* (gp38k) (Shackelton et al. 1995), *Chitinase 3-like1* (CHI3L1) (Rehli et al. 1997), *Chondrex* (Harvey et al. 1998), *40 kDa mammary gland protein* (MPG-40) (Mohanty et al. 2003) oder *Breast regressing protein 39 Kd* (Morrison & Leder 1994). Zumeist wird aber die Bezeichnung YKL-40 verwendet.

1.2.2. Struktur, Genetik und Expression

Ein Monomer des humanen YKL-40 besteht aus 383 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 40.476 Da (Hakala et al. 1993) und der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von etwa 7,6 (Renkema et al. 1998). Zwischen verschiedenen Spezies zeigt sich eine hohe Konservierung der N-terminalen Aminosäuresequenz, wohingegen die C-terminale Sequenz eine höhere Variabilität zeigt (Johansen 2006). Die kristalline Struktur von YKL-40 wurde bereits im Jahr 2003 von Fusetti et al. beschrieben (Fusetti et al. 2003).

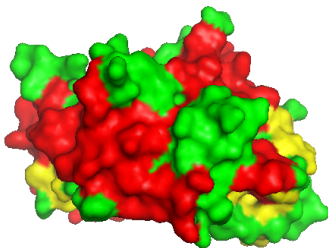


Abbildung 1: Struktur von YKL-40
(nach Fusetti et al. 2003)

Das für YKL-40 kodierende Gen wird mit dem Namen *CHI3L1* bezeichnet. Es befindet sich auf Chromosom 1q31-q32 und besteht aus 10 Exons. Das Gen enthält etwa 8 kB große genomische DNA (Rehli et al. 2003). Durch seine Lokalisation auf Chromosom 1q31-q32 liegt *CHI3L1* in unmittelbarer Nähe der Gene eines MHC-Paralogons (Funkhouser & Aronson 2007). Von *CHI3L1* existieren verschiedene genetische Varianten, von denen bestimmte Varianten mit einem erhöhten Risiko für Asthma assoziiert sind (Ober et al. 2008; Prakash et al. 2013).

Zur Expression von YKL-40 gibt es viele Daten. Einige Aspekte sollen nachfolgend erläutert werden. Prinzipiell wird YKL-40 *in vivo* von verschiedensten Zelltypen exprimiert. Dabei spielt es vor allem bei inflammatorischen und remodellierenden Prozessen eine Rolle (Johansen 2006).

Einleitung

An beiden Vorgängen sind Zellen des Immunsystems beteiligt, von denen einige YKL-40 exprimieren. Ein Beispiel dafür sind die Makrophagen. Diese zeigen jedoch unterschiedliche Expression *in vitro* oder *in vivo*. In der Zellkultur exprimieren sie YKL-40 während der letzten Phasen ihrer Differenzierung (Krause et al. 1996; Rehli et al. 1997; Renkema et al. 1998; Rehli et al. 2003). Im Körper wird YKL-40 von Makrophagen dagegen erst bei verschiedensten Entzündungsprozessen und Remodellierungs-Vorgängen direkt im betroffenen Gewebe gebildet (Johansen 2006).

Auch neutrophile Granulozyten exprimieren YKL-40, wobei es zunächst in spezifischen Granula gespeichert und nach vollständiger Aktivierung der Neutrophilen freigesetzt wird (Volck et al. 1998; Boussac & Protøines 2000). Diese Tatsache stützt die Theorie, dass YKL-40 an Gewebeumbauvorgängen beteiligt sein könnte, da in den Granula der neutrophilen Granulozyten auch andere Matrix-verändernde Proteine gespeichert werden (Nordenbaek et al. 1999).

Zu den remodellierenden Prozessen zählen auch Umbauvorgänge im Knochengewebe. Passend dazu konnte die Expression von YKL-40 in primären Osteozyten und Osteoblasten während der Knochenbildung gezeigt werden. Reife Osteoblasten und Osteoklasten zeigen dagegen keine Sekretion (Connor et al. 2000; Julia S Johansen 2006).

Des Weiteren kann YKL-40 von glatten Muskelzellen in der Adventitia der Gefäße sowie in atherosklerotischen Plaques gebildet werden (Johansen et al. 1999; Nishikawa & Millis 2003). Bei der Entstehung solcher atherosklerotischen Plaques kommt es ebenso zu Umbauvorgängen im Gewebe der Gefäßwände unter Beteiligung glatter Muskelzellen und Makrophagen (Baretton et al. 2008). Letztere könnten für die dortige Nachweisbarkeit von YKL-40 verantwortlich sein.

Ein wichtiges Organ für inflammatorische Prozesse ist die Leber. Diese bildet wie in Kapitel 1.1 besprochen das Protein CRP im Rahmen von Entzündungsprozessen. Interessanterweise konnte für Hepatozyten keine YKL-40-Expression gezeigt werden. In der Leber scheint YKL-40 nur in Arealen mit bestehender Fibrose gebildet zu werden. Dies geht wiederum konform mit der Beteiligung von YKL-40 an Umbauvorgängen von Gewebe, da die Fibrose einen solchen Prozess darstellt (Johansen et al. 1997; Johansen et al. 2000). Dazu passt auch die Beobachtung, dass Veränderungen der extrazellulären Matrix die Regulation der Synthese von YKL-40 beeinflussen (Johansen 2006).

Es gibt noch weitere Zelltypen, die unter bestimmten Bedingungen YKL-40 bilden und sezernieren. Zusammenfassend zeigt sich dabei, dass YKL-40 vor allem eine Rolle bei entzündlichen Prozessen und bei starken Umbauvorgängen des Gewebes, wie beispielsweise im Rahmen der Knochenneubildung oder der Fibrose zu spielen scheint (Johansen 2006). Es ist jedoch kein hepatisch gebildetes Akute-Phase-Protein.

1.2.3. Regulation

Es konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten-Kulturen *in vitro* auf eine Behandlung mit Interleukin-6 (IL-6) (Xing et al. 1998), IL-17 (Miossec 2003) und IL-18 (Olee et al. 1999) durch Bildung von YKL-40 reagieren (J S Johansen et al. 2001; Julia S Johansen 2006). Zytokine und Wachstumsfaktoren scheinen demnach an der Regulation beteiligt zu sein. Uneinigkeit besteht bezüglich der Wirkungsweise des Zytokins Tumornekrosefaktor- α (TNF α) auf die Regulation von YKL-40. So gaben Nielsen et al. 2011 an, TNF α würde im Gegensatz zur Regulation anderer Akute-Phase-Proteine keine Rolle bei der Regulation von YKL-40 spielen (Nielsen et al. 2011). Die Arbeitsgruppe um Prakash et al. entdeckte dagegen einen synergistischen Effekt für TNF α (Prakash et al. 2013). Prakash und Kollegen führten zudem einige weitere Faktoren an, die YKL-40 synergistisch oder antagonistisch beeinflussen. Synergistisch wirken demnach die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase), Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAP-Kinase) oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), antagonistisch wirken beispielsweise IL-10 oder *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Prakash et al. 2013).

Aktuell konnte von einer Arbeitsgruppe um Bhardwaj et al. für menschliche Astrozyten ein weiterer möglicher Signalweg gezeigt werden: IL-1 sowie IL-6 und ein verwandtes Zytokin dieser Gruppe, Oncostatin M, sind zusammen in der Lage die Expression von YKL-40 *in vivo* zu initiieren. Dies erfolgt wahrscheinlich mittels eines Komplexes namens RelB/p50, der direkt an den YKL-40-Promoter bindet und bei Entzündungsreizen vermehrt synthetisiert wird (Bhardwaj et al. 2015).

Einige Faktoren der Regulation der Synthese von YKL-40 konnten demnach identifiziert werden, die vollständigen Mechanismen bleiben allerdings bisher unklar (Johansen 2006; Prakash et al. 2013).

1.2.4. Biologische Aktivität

YKL-40 ist ein sezerniertes Protein. Dies legt nahe, dass seine Funktionen vor allem - wenn nicht sogar ausschließlich - extrazellulär sein dürften. Es konnten bisher jedoch keine spezifischen löslichen oder membrangebundenen Rezeptoren für YKL-40 gefunden werden. Ebenfalls kann noch keine genaue Aussage über seine exakte biologische Funktion getroffen werden (Johansen 2006). Es wurden jedoch schon einige Effekte und Interaktionen von YKL-40 entdeckt, die nachfolgend erläutert werden sollen. Dabei kann erneut ein Zusammenhang zu remodellierenden und inflammatorischen Prozessen hergestellt werden.

Einleitung

Die Bildung von YKL-40 durch glatte Gefäßmuskelzellen wurde bereits im vorherigen Kapitel erläutert. Malinda et al. entdeckten passend dazu, dass YKL-40 im Rahmen der Angiogenese die Migration und Organisation der Gefäßzellen stimuliert (Malinda et al. 1999). Des Weiteren beeinflusst es die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen und könnte somit an der Entstehung und Organisation atherosklerotischer Plaques beteiligt sein (Nishikawa & Millis 2003). Im Rahmen dieses Vorgangs könnte YKL-40 mit der Hyaluronsäure interagieren, da diese ebenfalls eine Rolle bei der Atherogenese spielt. Beide Moleküle scheinen generell an ähnlichen Vorgängen beteiligt zu sein, daher könnten deren Funktionen durchaus miteinander verbunden sein. Eine Bindung der Hyaluronsäure durch YKL-40 ist zwar nicht nachgewiesen, allerdings wurden zwei Bindestellen für Hyaluronsäure an YKL-40 entdeckt (Malinda et al. 1999; Nishikawa & Millis 2003). Die Bindung könnte lokale Konzentrationen der Hyaluronsäure beeinflussen und hätte damit eventuell einen Einfluss auf die Zelladhäsion und Zellmigration im Rahmen entzündlicher Prozesse, Fibrose-Entstehung, Metastasierung von Malignomen oder eben der Atherogenese (Johansen 2006). Da YKL-40 stark in Zusammenhang mit Gewebeumbau zu stehen scheint, mutmaßten Recklies et al., dass es einen Wachstumsfaktor darstellen könnte. Dazu passt auch die Entdeckung, dass YKL-40 *in vitro* das Fibroblastenwachstum anregen und über die MAP-Kinase und PI-3K-Signalkaskaden die Mitogenese stimulieren kann. Eventuell stellt es dabei sogar ein anti-apoptisches Protein dar (Recklies et al. 2002). Die PI3K/MAP-Kinase-Signalkaskade kann unter anderem über Syndecan 1 aktiviert werden. Dabei handelt es sich um eine Komponente von Basalmembranen und extrazellulären Matrices zahlreicher Gewebe. Syndecan 1 bindet mit seiner extrazellulären Domäne Heparansulfat (Prakash et al. 2013). YKL-40 wiederum bindet an Heparansulfat und kann so die Signalkaskade initiieren (siehe Abbildung 2). Ein weiterer potentieller Ligand für YKL-40 ist somit auch Perlecan, das wie Syndecan 1 in der Basalmembran lokalisiert ist und auf der extrazellulären Seite an Heparansulfat bindet (Johansen 2006; Prakash et al. 2013).

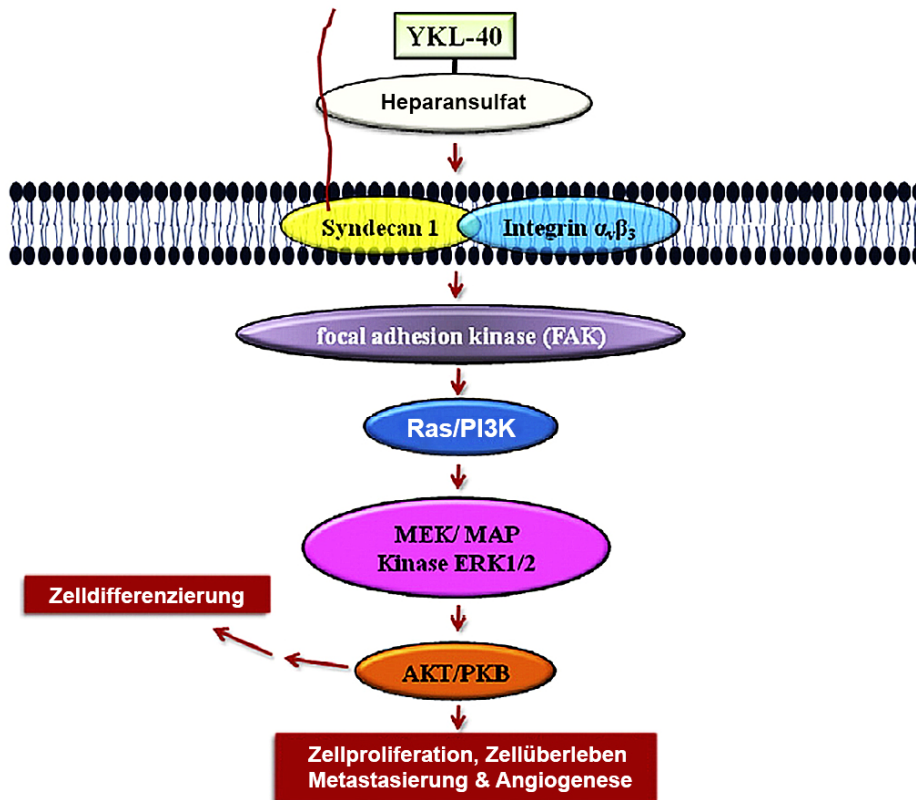


Abbildung 2: Einbindung von YKL-40 in eine Signalkaskade der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Angiogenese (modifiziert nach Prakash et al. 2013)

In Bezug auf mögliche Funktionen bei entzündlichen Vorgängen konnte als Ligand des YKL-40 das Chitin identifiziert werden (Hakala et al. 1993; Renkema et al. 1998; Houston et al. 2003). YKL-40 gehört zur Gruppe der „Chitinase-like“-Proteine, da es strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Proteinen dieser Gruppe besitzt. Aufgrund einer Aminosäure-Substitution besitzt es aber selbst keine hydrolytische Aktivität mehr und kann gebundenes Chitin somit nicht spalten (Renkema et al. 1998). Ob ein physiologischer Nutzen der Bindung von Chitin an YKL-40 besteht bleibt bisher unklar. Eine Theorie von Houston et al. besagt, YKL-40 könne eine Art Chitin-Sensormolekül darstellen, welches das angeborene Immunsystem aktiviert und reguliert (Houston et al. 2003).

Von Renkema et al. wurde darüber hinaus eine weitere Theorie in Bezug auf die Rolle von YKL-40 bei inflammatorischen Prozessen aufgestellt: Demnach könnte YKL-40 auch ein Opsonin im Rahmen entzündlicher Vorgänge darstellen. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass YKL-40 von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert wird, die an der frühen Phase der Immunabwehr gegen Pathogene beteiligt sind (Renkema et al. 1998).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass YKL-40 in der Lunge die Bildung von Mucin5AC steigert. Die Überproduktion von Muzinen tritt im Rahmen vieler chronisch-inflammatorischer

Erkrankungen der Lunge auf und kann für verschiedenste Komplikationen verantwortlich sein. YKL-40 könnte an diesen Prozessen daher mitbeteiligt sein (Liu et al. 2013).

Zusammenfassend zeigt sich erneut die Beteiligung von YKL-40 an verschiedensten Prozessen der Inflammation und der Remodellierung. Die genauen Funktionen im Körper bleiben bisher zwar unklar, für Erkrankungen, die mit diesen Prozessen einhergehen, könnte YKL-40 aber bedeutsam sein. Die folgenden Kapitel sollen daher einen Überblick über solche Erkrankungen bieten und die bisherigen Untersuchungen hinsichtlich YKL-40 darstellen.

1.3. YKL-40 als Biomarker

1.3.1. Referenzwerte und Stabilität

Um die folgenden Angaben besser einordnen zu können sollen in diesem Abschnitt kurz allgemeine Informationen bezüglich der YKL-40-Analytik dargestellt werden.

YKL-40 kann aus Serumproben bestimmt werden. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur beginnt die gemessene Serumkonzentration fälschlicherweise anzusteigen. Daher sollten die Serumproben nicht länger als drei Stunden bei Raumtemperatur belassen werden, um falsch-hohe Messergebnisse zu vermeiden. Lagert man die Serumproben bei 4°C, bleibt YKL-40 für mindestens 72 Stunden stabil (Høgdall et al. 2000; Johansen 2006). Längerfristige Lagerungen der Serumproben sollten bei -80°C erfolgen. Bei diesen Temperaturen bleibt YKL-40 für mindestens acht Jahre stabil (Johansen 2006). Wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Serums hat keinen Einfluss auf die gemessene YKL-40-Konzentration (Høgdall et al. 2000).

Eine Arbeitsgruppe um Bojesen et al. führte 2011 eine Studie an gesunden Probanden durch, um so die Referenzwerte von YKL-40 in Serum bestimmen zu können. Letztlich konnte an 3130 Probanden eine mediane Serumkonzentration von 40 ng/mL (2,5-97,5% Referenzbereich: 14 - 155 ng/mL) gemessen werden (Bojesen et al. 2011). Eine weitere Studie von Harvey et al. ergab einen medianen Referenzwert von etwa 42,9 ng/mL (Harvey et al. 1998). Bojesen et al. konnten des Weiteren zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der YKL-40-Serumkonzentration und dem Alter besteht. Ältere Personen weisen auch höhere YKL-40-Titer auf. Dabei werden Konzentrationen von bis zu 200 ng/mL bei einem Median von etwa 80 ng/mL gefunden. Innerhalb einer Person steigen die YKL-40-Serumkonzentrationen nur geringfügig an, ein überdurchschnittlich hoher Anstieg könnte also mit erhöhtem Krankheitsrisiko einhergehen (Bojesen et al. 2011).

Bezüglich der Kinetik gibt es Hinweise, dass YKL-40 bei Inflammationsprozessen schneller ansteigt als das CRP. Somit könnte das YKL-40 die Informationen des CRP sinnvoll ergänzen (J S Johansen et al. 2005).

1.3.2. YKL-40 und maligne Erkrankungen

Viele solide Tumore produzieren YKL-40. Die meisten zeigen sogar eine Überexpression des Proteins. Beispiele dafür sind das metastasierte Mammakarzinom (Johansen et al. 1995; Jensen et al. 2003; Johansen et al. 2003), Karzinome des Kolons und des Rektums (Cintin et al. 1999; Cintin et al. 2002; Johansen et al. 2015), das kleinzellige (Johansen et al. 2004) und das nicht-kleinzellige (Wang et al. 2015) Lungenkarzinom, das Melanom (H Schmidt et al. 2006; Henrik Schmidt et al. 2006), sowie renale Karzinome (Geertsen et al. 2003). Darüber hinaus konnten erhöhte Serumkonzentrationen auch bei Patienten mit Ovarialkarzinomen (Dehn et al. 2003; Dupont et al. 2004), Endometriumkarzinomen (Diefenbach et al. 2007), Pankreaskarzinomen (Fukushima et al. 2005), Gliomen wie dem Glioblastoma multiforme (Tanwar et al. 2002) und Prostatakarzinomen (Brasso et al. 2006) gefunden werden. Auch bei hämatologischen Neoplasien wie der akuten myeloischen Leukämie (Bergmann et al. 2005), dem multiplen Myelom (Mylin et al. 2006; Mylin et al. 2009; Mylin et al. 2015) und dem Hodgkin-Lymphom (Biggar et al. 2008) konnten erhöhte YKL-40-Konzentrationen gemessen werden. Oftmals ist YKL-40 sogar eines der am meisten überexprimierten Proteine im Rahmen des Tumorgeschehens. Dies konnte insbesondere für High-Grade-Gliome (Lal et al. 1999; Markert et al. 2001; Tanwar et al. 2002), papilläre Schilddrüsenkarzinome (Huang et al. 2001) und extrazelluläre myxoide Chondrosarkome (Sjögren et al. 2003) gezeigt werden. Von myxoiden Liposarkomen wird dagegen kein YKL-40 sezerniert oder produziert (Sjögren et al. 2003).

Wie in Kapitel 1.2.4 bereits erwähnt, ist die genaue biologische Funktion von YKL-40 bisher nicht bekannt. Dies gilt auch für dessen Funktion im Rahmen der Kanzerogenese, wobei YKL-40 hier, wie im letzten Kapitel erläutert, einen Wachstumsfaktor und gegebenenfalls sogar ein anti-apoptisches Protein darstellen könnte (Johansen 2006).

Eine weitere Theorie in Bezug auf maligne Erkrankungen und YKL-40 besagt, dass YKL-40 für die Entstehung des peritumoralen fibroblastischen Stromas verantwortlich oder zumindest mitverantwortlich sein könnte. Dies gilt sowohl für den Primärtumor, als auch eventuelle Metastasen. Diese Vermutung entstand aus der Beobachtung, dass tumorassoziierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten im tumornahen Bindegewebe YKL-40 exprimieren. YKL-40 könnte dabei die Fibroblasten-Reifung und -Differenzierung stimulieren sowie zur vermehrten Bildung von Matrix-Metalloproteinasen und verstärkter

Neovaskularisation führen. Dies steht in Einklang zur Theorie, dass YKL-40 an der Angiogenese beteiligt ist und einen Wachstumsfaktor darstellen könnte. Alle zuvor genannten Prozesse fördern letztlich das Tumorstadium und bewirken verstärkte Invasivität und Destruktivität der Krebszellen. Dies steht eventuell auch in Zusammenhang mit der Tendenz zur Metastasierung (Dvorak 1986; Basset et al. 1990; Grégoire & Lieubeau 1995; Rønnev-Jessen et al. 1996; Bissell & Radisky 2001; Kenny & Bissell 2003; Johansen 2006). Aus den genannten Theorien lässt sich ableiten, dass YKL-40 eventuell einen neuen Tumormarker darstellen könnte. Dagegen spricht aber die Tatsache, dass YKL-40 auch bei nicht-malignen Erkrankungen deutlich erhöht sein kann (Johansen 2006).

1.3.3. YKL-40 und nicht-maligne Erkrankungen

Wie eingangs beschrieben spielt YKL-40 vorwiegend bei Erkrankungen mit inflammatorischen Prozessen sowie Erkrankungen mit Umbauvorgängen des Gewebes eine Rolle. Bei rheumatoider Arthritis beispielsweise konnte in entzündlich veränderter Synovia eine starke YKL-40-Expression gefunden werden, auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist YKL-40 in erhöhten Werten im Serum messbar. Bei diesen beiden Erkrankungsgruppen könnte YKL-40 ein Autoantigen darstellen und so für die chronischen Entzündungsprozesse entscheidend sein (Vos et al. 2000; Johansen 2006). Die Leberfibrose wurde bereits als Erkrankung mit erhöhtem YKL-40 erwähnt. Auch bei Krankheitsentitäten, die Granulome bilden, scheint YKL-40 erhöht im Serum messbar zu sein. Dies wurde z.B. für die Sarkoidose bereits nachgewiesen (Julia S Johansen et al. 2005).

In Bezug auf infektiöse Erkrankungen konnte eine Erhöhung von YKL-40 bereits für einige Entitäten gezeigt werden, darunter die *Streptokokkus pneumoniae*-Pneumonie (Nordenbaek et al. 1999) bzw. *Streptokokkus pneumoniae*-Bakteriämie (Kronborg et al. 2002), die Tuberkulose (Johansen 2006) sowie die Meningitis, bei der im Liquor cerebrospinalis YKL-40 nachweisbar ist. Bei der Meningitis bleibt jedoch anzumerken, dass Patienten mit nicht-infektiösen Spinalerkrankungen, wie einer lumbalen Bandscheibenprotrusion oder einer lumbalen Spinalkanalstenose, noch höhere Werte im Liquor aufweisen (Østergaard et al. 2002; Tsuji et al. 2002).

YKL-40 scheint zumindest in manchen Situationen ein beginnendes entzündliches Geschehen früher anzuzeigen als das CRP (J S Johansen et al. 2005). Die genaue Funktion von YKL-40 im Rahmen von Entzündungen bleibt jedoch unklar. Die Serumkonzentration von YKL-40 steigt um mehr als 25% an, sobald im Körper ein Entzündungsreiz vorliegt. Dies gilt ebenso für den bereits etablierten Inflammationsmarker CRP (Kushner 1982; J S Johansen et al. 2005; Prakash et al. 2013).

Es erscheint daher möglich, dass YKL-40 ebenso wie das CRP einen klinisch wertvollen Inflammationsmarker darstellen könnte, der aber nicht wie Akute-Phase-Proteine abseits des Inflammationsherdes, z.B. in der Leber gebildet, sondern von den Zellen des Immunsystems direkt am Ort des Entzündungsgeschehens sezerniert wird. Somit kann es eventuell einen anderen Aspekt der Entzündung anzeigen und wird ggf. weniger durch Begleiterkrankungen, wie Störungen der Leberfunktion, beeinflusst. YKL-40 könnte somit die Informationen des CRP sinnvoll ergänzen oder sogar neue Informationen über ablaufende Entzündungen liefern (Johansen 2006).

1.3.4. YKL-40 und die Lunge

Die aktuelle Literatur beschreibt sehr viele verschiedene Lungenerkrankungen in Verbindung mit YKL-40. Dieses Kapitel soll einen Überblick über diese Erkrankungen bieten und die mögliche Bedeutung von YKL-40 in der Diagnostik von Lungenerkrankungen aufzeigen.

Generell spricht für die Eignung von YKL-40 als lungenspezifischer Marker, dass dessen Serumkonzentration nicht durch Rauchen verfälscht wird (Julia S Johansen et al. 2004; Létuvé et al. 2008). Andere Marker für pulmonale Erkrankungen sind bei Rauchern per se auch ohne Vorliegen einer Pathologie erhöht. Dies gilt unter anderem für Cytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies im Rahmen der COPD (Létuvé et al. 2008). All diese Marker sind daher für Raucher nur bedingt zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung bei Lungenerkrankungen geeignet. Es wäre somit gerade hinsichtlich der Lunge von Vorteil, einen spezifischen Marker zur Verfügung zu haben, der durch Rauchen nicht beeinflussbar ist und wirklich nur das Vorliegen einer manifesten Erkrankung des Organs anzeigt.

Im Folgenden sollen einige Krankheitsbilder besprochen werden, für die YKL-40 möglicherweise von Bedeutung sein könnte.

1.3.4.1. Infektionen der Lunge

Im vorigen Kapitel 1.3.3 wurde bereits angedeutet, dass YKL-40 bei Patienten mit Pneumonie erhöht messbar ist. Die Pneumonie soll daher hier als erstes Beispiel dienen. Die höchsten YKL-40-Werte sind in der Gruppe der Pneumonie-Patienten bei *Streptokokkus pneumoniae*-Infektion messbar. Patienten mit Komplikationen im Rahmen der Pneumonie, beispielsweise einem Empyem, zeigen dabei noch höhere Werte als solche mit einer verhältnismäßig blande verlaufenden Pneumonie. Auch Patienten mit einer begleitenden *Streptokokkus pneumoniae*-Bakteriämie zeigen höhere Werte. So wurde in einer Studie von

Nordenbaek et al. 1999 bei Patienten mit *Streptokokkus pneumoniae*-Bakteriämie eine mediane Serumkonzentration von 1080 ng/mL (n=15) gemessen, während Patienten mit lediglich positiver Sputumkultur eine mediane Konzentration von 704 ng/mL (n=7) aufwiesen (Nordenbaek et al. 1999). Für gesunde Personen wurde, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, eine mediane Serumkonzentration von 40 ng/mL (2,5-97,5% Referenzbereich: 14 - 155 ng/mL) ermittelt (Bojesen et al. 2011). Die Serumkonzentrationen waren also bei *Streptokokkus pneumoniae*-Bakteriämie deutlich über die obere Referenzwert-Grenze erhöht. Interessant ist die Beobachtung, dass bei diesen Patienten die Höhe des YKL-40 auch entscheidend mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert zu sein scheint. Beispielsweise haben Patienten, die im Verlauf ihrer Erkrankung künstlich beatmet werden müssen oder eine Hämodialyse benötigen, deutlich höhere Werte als Patienten, die ohne eine dementsprechende Therapieform behandelt werden können. Die YKL-40-Serumkonzentration stellt bei dieser Patientengruppe wohl einen unabhängigen Prognosefaktor für das Überleben dar (Kronborg et al. 2002). Nach Therapiebeginn fällt YKL-40 bei *Streptokokkus pneumoniae*-Pneumonie Patienten schneller ab, als das CRP (Nordenbaek et al. 1999).

Doch nicht nur *Streptokokkus pneumoniae* geht mit einer Erhöhung der Serumkonzentration von YKL-40 einher, auch *Mycobacterium tuberculosis* führt im Rahmen der pulmonalen Tuberkulose zu einem Anstieg des YKL-40 im Serum (Kim et al. 2012).

1.3.4.2. Chronische Lungenerkrankungen

Abseits der infektiösen Erkrankungen gibt es noch weitere Krankheitsgruppen, die mit YKL-40 in Verbindung gebracht werden konnten. Ein Beispiel ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Bei COPD-Patienten ist YKL-40 im Serum erhöht nachweisbar. Ebenfalls können bei dieser Patientengruppe erhöhte Werte an YKL-40 in der Flüssigkeit einer Bronchiallavage nachgewiesen werden (Létuvé et al. 2008). In beiden Fällen ist YKL-40 bei den COPD-Patienten stark mit dem Grad der Atemwegsobstruktion korreliert und gibt somit indirekt einen Anhalt für die Schwere der Erkrankung. YKL-40 hängt bei dieser Patientengruppe außerdem mit der Lungendiffusionskapazität für Kohlenmonoxid zusammen. Diese wiederum zeigt eine Korrelation zum Ausmaß eines eventuell im Rahmen der COPD entstandenen Lungenemphysems an. YKL-40 könnte somit auch generell mit dem Vorliegen eines Lungenemphysems verknüpft sein, dieser Zusammenhang muss aber noch genauer untersucht werden (Létuvé et al. 2008; Sakazaki et al. 2011; Gumus et al. 2013).

1.3.4.3. Pädiatrische Lungenerkrankungen

Es gibt Erkrankungen der Lunge, die bereits im Kindesalter manifest werden. Darunter finden sich unter anderem die bronchopulmonale Dysplasie, die Mukoviszidose und das Asthma bronchiale. All diese Krankheiten wurden auf ihren Zusammenhang mit YKL-40 hin untersucht. Einige Aspekte, die dabei gezeigt werden konnten, sollen nachfolgend erläutert werden.

- Sohn et al. konnten einen Schutzeffekt des YKL-40 vor der Toxizität von Sauerstoff zeigen. Hyperoxie inhibiert die Expression von YKL-40. Bei Frühgeborenen, die eine bronchopulmonale Dysplasie entwickeln, ist YKL-40 im Trachealsekret erniedrigt. In normaler Konzentration könnte YKL-40 somit vor der Entwicklung einer durch erhöhte Sauerstoffzufuhr bedingten bronchopulmonalen Dysplasie schützen (Sohn et al. 2010).
- Die Mukoviszidose (Zytische Fibrose) ist eine Erkrankung, die nicht ausschließlich die Lunge betrifft. Jedoch kommt es bei Mukoviszidose-Patienten wie bei der COPD zum Auftreten einer vorwiegend neutrophilen Inflammation des Lungengewebes (Létuvé et al. 2008; Hector et al. 2011). Aus diesem Grund wurde die YKL-40-Konzentration im Serum und Sputum dieser Patientengruppe untersucht. YKL-40 war hier in beiden Probenmatrices erhöht, wobei die Werte im Sputum höher als diejenigen im Serum lagen. Ebenso ist YKL-40 in dieser Patientengruppe wie auch bei der COPD mit dem Grad der Atemwegobstruktion korreliert und stellt somit eventuell einen Biomarker für den Schweregrad der Erkrankung dar (Hector et al. 2011).
- Das Asthma bronchiale ist eine Erkrankung, welche nur die Atemwege betrifft. YKL-40 kann bei Patienten mit dieser Erkrankung ebenfalls in erhöhter Konzentration im Serum gemessen werden. Höhere Werte sind dabei mit einem höheren Schweregrad des Asthmas assoziiert, ebenso wie es auch bei der COPD und der Zystischen Fibrose der Fall ist. Bei schwerem Asthma werden Serumkonzentrationen bis 158 ng/mL (Median 77 ng/mL) erreicht (Chupp et al. 2007). Die Werte liegen bei den Asthma-Patienten in etwa auf dem Niveau der Werte von COPD-Patienten, interessanterweise ist YKL-40 aber bei Asthma-Patienten in der Bronchiallavage mit Konzentrationen um 3 ng/mL kaum nachweisbar. Eventuell ist dies auf das unterschiedliche Entzündungsgeschehen der beiden Erkrankungen zurückzuführen. Während die COPD - wie oben bereits angeführt - eher durch eine neutrophile Entzündung gekennzeichnet ist, stehen beim Asthma bronchiale mehr die eosinophilen Granulozyten im Vordergrund (Létuvé et al. 2008). Die Produktion von YKL-40 wurde vor allem für neutrophile Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen (Boussac & Protøines 2000; Johansen 2006). Daher könnte das im

Serum messbare YKL-40 bei beiden Erkrankungen aus den Alveolarmakrophagen stammen, das YKL-40 in der Bronchiallavage bei COPD-Patienten könnte dagegen von den bei dieser Erkrankung vorhandenen neutrophilen Granulozyten gebildet werden.

1.3.4.4. Maligne Lungenerkrankungen

In Kapitel 1.3.2 wurden bereits maligne Erkrankungen besprochen. Da dem Organ Lunge ein eigenes Kapitel gewidmet wird, sollen hier die malignen Erkrankungen der Lunge noch ausführlicher hinsichtlich YKL-40 besprochen werden.

YKL-40 ist bei malignen Prozessen in der Lunge erhöht messbar. So zeigt sich bei einigen Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentration des Proteins. Je weiter fortgeschritten die Erkrankung ist, desto höher wird der Anteil an Patienten mit erhöhtem YKL-40 und desto höher werden auch die Absolutwerte an YKL-40 bezogen auf Patienten mit noch lokal begrenztem kleinzelligem Lungenkarzinom. YKL-40 ist somit mit der Ausbreitung des Karzinoms korreliert, einige Patienten weisen jedoch trotz der Erkrankung noch normale Serumkonzentrationen auf. Diese Patienten haben dabei aber eine höhere Überlebenszeit als diejenigen mit erhöhtem YKL-40. Somit scheint YKL-40 auch ein Marker für die Aggressivität des kleinzelligen Lungenkarzinoms zu sein (Johansen et al. 2004). Auch für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome konnte ein Zusammenhang mit erhöhten YKL-40-Werten gefunden werden. YKL-40 ist dabei auch mit der Rezidivneigung und somit der Prognose assoziiert (Wang et al. 2015)

1.3.4.5. Alternative Probenmaterialien

Im Rahmen von Lungenerkrankungen erhöht sich, wie schon am Beispiel der Bronchiallavage und des Sputums angedeutet, nicht allein die Serumkonzentration von YKL-40, sondern das Protein kann auch in anderen Medien in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden. So ist es beispielsweise bei nahezu allen bisher behandelten Entitäten auch im Pleuraerguss messbar, sofern ein solcher im Rahmen der jeweiligen Erkrankung begleitend vorliegt. Die höchsten Werte sind hier bei Patienten mit Tuberkulose zu finden, gefolgt von exsudativen Pleuraergüssen im Rahmen einer Pneumonie sowie im Rahmen von Malignomen. Interessanterweise ist es auch bei transsudativen Pleuraergüssen mit primär kardialer Genese messbar, wenn auch in geringerer Konzentration als bei den anderen eben genannten Krankheitsgruppen. Die pleurale Konzentration war in allen

Einleitung

Gruppen höher als diejenige im Serum. Während die Tuberkulose aber die höchsten Konzentrationen im Pleuraerguss aufweist, so gilt dies im Serum für Pneumonien, welche hier die höchsten Werte zeigen. Dies lässt sich eventuell durch eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der Lunge im Rahmen von Pneumonien erklären (Kim et al. 2012).

1.4. Zusammenfassung

YKL-40 ist ein Protein, das von verschiedensten Zellen und Gewebetypen gebildet wird. Über die genaue Funktion des Proteins im menschlichen Körper sowie seine Regulation ist bisher wenig bekannt. Lediglich ein Zusammenhang zu inflammatorischen und remodelierenden Vorgängen konnte gezeigt werden (Johansen 2006). YKL-40 liegt bei einer Reihe von Erkrankungen in erhöhter Konzentration im Serum vor. Dies gilt insbesondere für diverse Erkrankungen maligner Natur, Entzündungsreaktionen, sowie Erkrankungen, welche die Lunge betreffen. Daher könnte es möglicherweise einen neuen informativen Serum-Biomarker für diese Erkrankungen darstellen.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wertigkeit von YKL-40 als Inflammations-Biomarker untersucht werden. In einem breit angelegten Vorversuch explorativer Natur soll ermittelt werden, bei welchen Krankheitsgruppen und Krankheitsentitäten YKL-40 interessante und klinisch wertvolle Informationen liefern könnte. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf akuten Entzündungen im Allgemeinen, auf pulmonalen sowie hepatischen Erkrankungen jedweder Genese, sowie auf malignen Erkrankungen, wobei hier nicht zwischen soliden und nicht-soliden malignen Erkrankungen unterschieden wird. Mittels der Ergebnisse dieser explorativen Vorstudie sollen Hypothesen über den möglichen klinischen Nutzen von YKL-40 erstellt werden. In einer daraufhin angeschlossenen prospektiven Studie sollen diese Hypothesen nochmals genauer an einem neuen Patientenkollektiv validiert werden.

Hierbei soll die Beziehung zwischen YKL-40 zu anderen Inflammationsmarkern, insbesondere dem CRP dargestellt werden, mit dem Ziel eine Aussage darüber treffen zu können, ob YKL-40 andere oder zusätzliche Informationen anzeigen kann als das CRP.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Name	Hersteller
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Co. LLC (Taufkirchen, Deutschland)

3.1.2. Puffer

Tabelle 2: Puffer

Name	Zusammensetzung	Hersteller
Blockpuffer Reagent Diluent	1%-BSA in PBS; pH 7,2 - 7,4	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)
Phosphate-buffered Saline-Puffer (PBS)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4	Eigene Herstellung
Waschpuffer für ELISA	0,05% Tween 20 in PBS; pH 7,1 - 7,4	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)

3.1.3. Proteine

Tabelle 3: Proteine

Name	Konzentration	Hersteller
Anti-Human CHI3L1 IgG aus Ratte	360 $\mu\text{g}/\text{mL}$	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)
Anti-Human CHI3L1 IgG aus Ziege, biotinyliert	36 $\mu\text{g}/\text{mL}$	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)
Rekombinantes humanes CHI3L1 als ELISA-Standard	120 ng/mL	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)
Streptavidin-HRP	Nicht bekannt	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)

Material und Methoden

Diese Proteine waren allesamt Bestandteil des DuoSet-ELISA-Development-Systems „human Chitinase 3-like 1“ der Firma R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA).

3.1.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Costar EIA-Platten	R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA)
Immunoplaten Nunc MaxiSorp®	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Millipore Express Plus-Filter 0,22 µm	Millipore (Billerica, MA, USA)
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

3.1.5. Geräte

Tabelle 5: Geräte

Name	Hersteller
Automatisierte 8-Kanal Pipette	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Automatisierte Pipette Multipette stream	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
ELx808 Absorbance Microplate Reader	BioTek (Winooski, VT, USA)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Milli-Q-Plus-Anlage	Millipore (Billerica, MA, USA)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

3.1.6. Software

Tabelle 6: Software

Name	Hersteller
Gen5 Data Analysis	BioTek (Winooski, VT, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, WA, USA)
SPSS Statistics Version 21	IBM (Armonk, NY, USA)
OriginPro Version 8	OriginLabs (Northampton, MA, USA)

3.1.7. Votum der Ethikkommission

Die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unter dem Vorsitz von Prof. Dr. Georg Schmidt hat der Studie zur diagnostischen Wertigkeit von YKL-40 zugestimmt (Projektnummer 395/13). Alle Studienteilnehmer wurden fachgerecht über die Studie aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Untersuchung ihrer Serumproben. Eine Aufwandsentschädigung wurde nicht gewährt. Entsprechend den Vorgaben des Datenschutzes wurden sämtliche Patientendaten pseudonymisiert.

3.1.8. Patientenkollektiv der explorativen Studie

Im Rahmen der explorativen Studie sollte vor allem evaluiert werden, für welche Patienten- und Krankheitsgruppen der Biomarker YKL-40 von Vorteil sein könnte. Dabei sollte vor allem die Wertigkeit im Vergleich zum CRP festgestellt werden. Es wurden dazu Serumproben von 178 Patienten aus dem Routinelabor des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (MRI) gesammelt. Es wurden nur Seren gesammelt, bei denen die klinische Routineuntersuchung bereits abgeschlossen war, und die somit zur Entsorgung freigegeben waren („*left-over material*“). Bei all diesen Seren war bereits das CRP im Routinelabor gemessen worden. Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, ein möglichst breites Spektrum des Markers CRP zu erfassen und so eine Auswahl an nicht ($<0,5$ mg/dL), niedrig (0,5-4,9 mg/dL), stark (5,0-14,9 mg/dL) und sehr stark ($\geq 15,0$ mg/dL) erhöhten Probenwerten zur Verfügung zu haben. Die Einteilung der Grenzwerte für die einzelnen Gruppierungen erfolgte rein empirisch. Die höchste CRP-Konzentration lag bei 46,2 mg/dL, der Median aller CRP-positiven Patienten lag bei $15,0 \pm 10,6$ mg/dL. Einzige Voraussetzung zum Einschluss der Patientenproben war ein bereits gemessener CRP-Wert. Weitere Einschlusskriterien gab es nicht. Es gab außerdem keine Ausschlusskriterien, da in dieser Studie in alle Richtungen untersucht werden sollte und so ein möglichst breites Spektrum an Diagnosen und Hospitalisierungsgründen berücksichtigt werden konnte. Von 176 Patienten konnte im Anschluss an die Sammlung eine Liste mit deren jeweiligen Diagnosen erstellt werden. Dabei wurde zwischen akuten Diagnosen sowie Dauerdiagnosen aufgrund chronischer Leiden unterschieden. Des Weiteren wurde unterschieden, ob die Patienten ein akutes Entzündungsgeschehen, eine Lungenerkrankung unabhängig von der genauen Entität, eine Lebererkrankung unabhängig von der genauen Entität oder eine maligne Erkrankung jedweder Herkunft aufwiesen. Wenn möglich wurden auch die entsprechenden Konzentrationen des PCT erfasst. Dies war im Rahmen dieser Studie lediglich bei 45 Patienten möglich. Außerdem wurde das Alter aller Patienten dokumentiert. In diesem Kollektiv lag das mediane Alter bei $69,0 \pm 18,3$ Jahren. Bezüglich des Geschlechts

Material und Methoden

wurde darauf geachtet, eine in etwa identische Anzahl an Proben zu messen, es wurden letztlich 90 männliche Patienten sowie 88 weibliche Patientinnen eingeschlossen. Mehrfache Einschlüsse gleicher Patienten, z.B. nach erneuter Krankenhauseinlieferung, wurden nicht vorgenommen.

Die nachfolgende Tabelle 7 zeigt nochmals das gesamte Patientenkollektiv, aufgeschlüsselt nach den definierten CRP-Kategorien:

Tabelle 7: Patientenkollektiv der explorativen Studie (M = Männlich; W = Weiblich).

Kategorie	Anzahl		Alter (Median±Standardabweichung)
CRP normal (<0,5 mg/dL)	M	21	67,0±18,15
	W	14	
CRP schwach erhöht (0,5-4,9 mg/dL)	M	10	66,0±21,98
	W	21	
CRP stark erhöht (5,0-14,9 mg/dL)	M	24	72,5±18,55
	W	20	
CRP sehr stark erhöht (≥15,0 mg/dL)	M	35	68,0±16,25
	W	33	
Gesamt	M	90	69,0±18,3
	W	88	

Um auch eine vergleichende Aussage über den Verlauf der Marker treffen zu können, wurde von acht Patienten mehrfach Serum gesammelt und das YKL-40 gemessen. Für die Einzelauswertung wurde von diesen mehrfach gemessenen Patienten jeweils eine Probe zufällig ausgewählt, um keine Verfälschung der Ergebnisse hervorzurufen.

Da in einem Krankenhaus nur Proben von hospitalisierten Patienten gesammelt werden können, die mit sehr wenigen Ausnahmen schließlich alle eine Pathologie jedweder Genese aufweisen, können mit diesem Kollektiv keine sicheren Aussagen über die Referenzwerte des YKL-40 in einem komplett gesunden Kollektiv getroffen werden. Daher wurden zusätzlich zum Krankenhauskollektiv 100 Serumproben von gesunden Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) in München gesammelt und als Kontrollkollektiv verwendet. Die Blutspender gaben am Tag der Spende ein subjektives Gesundheitsgefühl an, somit kann ein akutes Krankheitsgeschehen bestmöglich ausgeschlossen werden.

Alle Serumproben wurden nach Sammlung aliquotiert, anschließend bei -80°C eingefroren gelagert und erst kurz vor der Messung wieder aufgetaut. Unmittelbar nach der Messung wurde das verbliebene Material wieder bei -80°C eingefroren. Sollten Nachmessungen erforderlich gewesen sein, so wurden die Aliquots erneut unmittelbar vor der Messung aufgetaut.

3.1.9. Patientenkollektiv der prospektiven Studie

Aufbauend auf die Ergebnisse der explorativen Erststudie wurden für die daran angeschlossene prospektive Studie Serumproben von Patienten aus zwei Krankheitskategorien benötigt. Die erste Kategorie wurde von Patienten mit einer radiologisch bestätigten Pneumonie gebildet („*Untersuchungsgruppe*“), während die zweite Kategorie von Patienten mit anderweitigen Entzündungsformen außer Pneumonien gebildet wurde („*Kontrollgruppe*“). Es wurde wie bereits bei der explorativen Studie Serum aus dem Routinelabor des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (MRI) gesammelt. Bei allen Serumproben waren die Routinemessungen bereits abgeschlossen und das Material zur Entsorgung freigegeben („*left-over material*“). Für alle Serumproben wurde bereits vor der Sammlung der jeweilige Wert des CRP im Serum bestimmt. Diese zuvor erfolgte Messung der CRP-Serumkonzentration stellte unabhängig von ihrer genauen Konzentration neben der bestätigten Diagnose das einzige Einschlusskriterium dar. Ausschlusskriterien für beide Kategorien waren neben dem Vorhandensein einer pulmonalen Begleitdiagnose das Vorliegen einer orthopädisch-unfallchirurgischen Erkrankung bzw. das Vorliegen einer Sepsis oder eines systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS). Dies entsprach Beobachtungen der explorativen Studie und sollte eine Überlagerung bzw. Verfälschung der Messergebnisse bestmöglich verhindern.

Für die Untersuchungsgruppe blieb die Ätiologie der Pneumonie unberücksichtigt, es kann also nicht zwischen bakteriell, viral oder mykotisch verursachten Pneumonien bzw. anderen Ursachen wie Reflux oder Strahlenbehandlung differenziert werden.

In die Kontrollgruppe wurden folgende Diagnosen eingeschlossen:

- Blepharitis
- Cholangitis
- Cholezystitis
- Divertikulitis
- Endokarditis
- Endophthalmitis
- Erysipel
- Harnwegsinfekt
- Hepatitis (autoimmun)
- Kolitis
- Pankreatitis
- Phlebitis
- Pleuritis (isoliert)
- unspezifische bakterielle Infektion mit *Escherichia coli*

Es wurde Serum von insgesamt 58 Patienten gesammelt, wovon 28 Patienten der Untersuchungsgruppe und 30 Patienten der Kontrollgruppe zugeordnet wurden. Bei der Auswahl der Probanden wurde darauf geachtet eine möglichst identische Anzahl von

männlichen und weiblichen Probanden in beiden Gruppen einzuschließen. Des Weiteren wurde die Altersverteilung in beiden Gruppen bestmöglich angeglichen. Hierfür wurde jedoch keine Geschlechtertrennung vollzogen. Das mediane Alter der Patienten dieses Kollektivs sollte zudem mit dem Altersmedian des gesamten Kollektivs der explorativen Studie vergleichbar sein.

Eine Übersicht über das Patientenkollektiv gibt folgende Tabelle 8:

Tabelle 8: Patientenkollektiv der prospektiven Studie (M = Männlich; W = Weiblich).

Gruppe	Anzahl der Patienten		Alter (Median±Standardabweichung)
Untersuchungsgruppe	M	16	71±13
	W	12	
Kontrollgruppe	M	19	72±13
	W	11	
Gesamt (beide Gruppen)	M	35	72±13
	W	23	

Für den Vergleich der Messergebnisse beider Gruppen mit einem gesunden Kollektiv wurde erneut das bereits in der explorativen Studie verwendete Kollektiv aus 100 gesunden Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) herangezogen. Diese Gruppe wird im Folgenden als „Gesunde“ bezeichnet.

Wie schon in der explorativen Studie wurden alle Serumproben unmittelbar nach Sammlung aliquotiert, anschließend bei -80°C eingefroren gelagert und erst kurz vor der Messung wieder aufgetaut. Verbliebenes Material wurde nach der Messung unverzüglich wieder bei -80°C eingefroren. Für gegebenenfalls erforderliche Nachmessungen wurden die Aliquots erneut unmittelbar vor der Messung aufgetaut.

3.2. Methoden

3.2.1. Prinzip des Immunoassay-Systems zur Bestimmung von YKL-40

In dieser Arbeit kam als Immunoassay zur Bestimmung von YKL-40 ein ELISA zum Einsatz. Das Prinzip dieses Systems wird schematisch durch nachfolgende Abbildung 3 verdeutlicht:

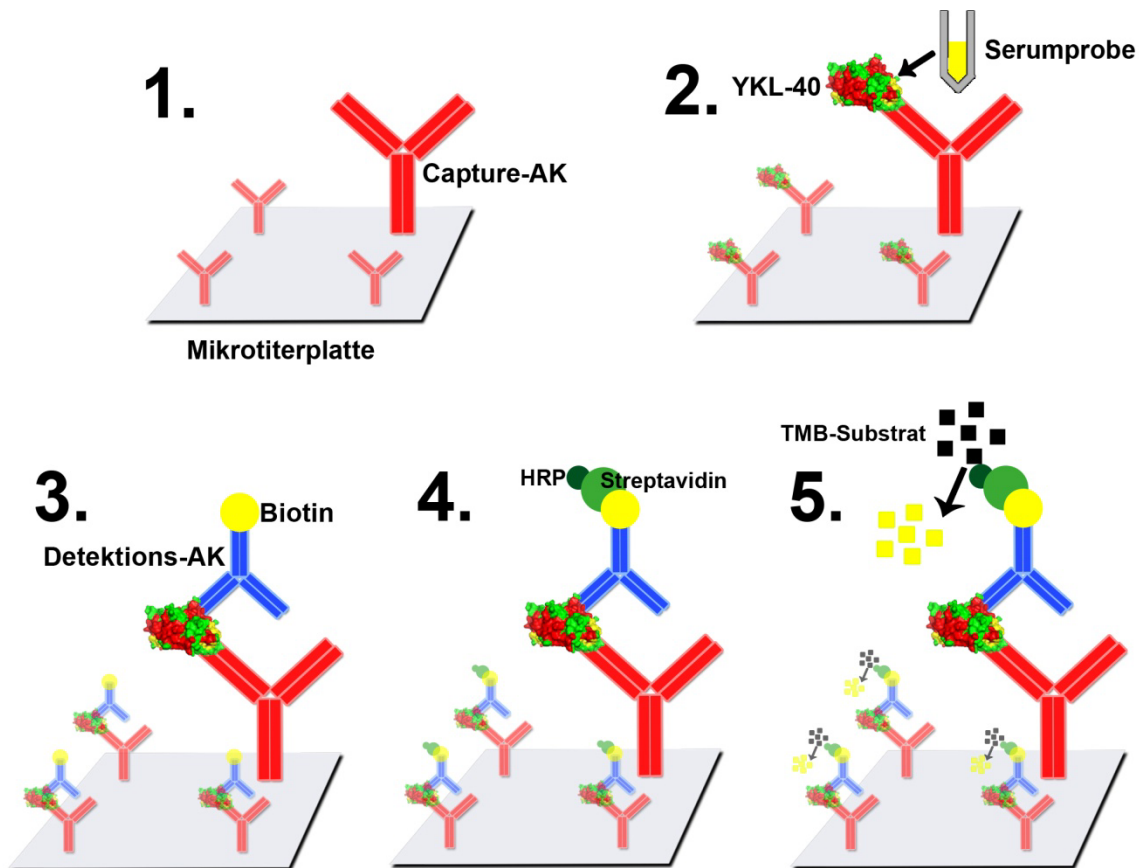


Abbildung 3: Prinzip der YKL-40-Detektion mittels Immunoassay (ELISA). (AK=Antikörper; Struktur von YKL-40 nach Fusetti et al. 2003)

3.2.2. Vorbereitung des Immunoassays

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Duoset-ELISA-Development-System „human Chitinase 3-like-1“ der Firma R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet. Es handelt sich hierbei nicht um einen validierten Routine-Assay. Die Reaktionsoberfläche in den Wells der ELISA-Platten musste durch Fixieren der *Capture*-Antikörper selbst hergestellt werden. Zudem wurden die beiden Antikörper und der Standard für den ELISA lyophilisiert geliefert und mussten aufgelöst werden. Dies kann zu Problemen in der Reproduzierbarkeit zwischen einzelnen Platten bzw. verschiedenen Batches des Systems führen.

Das Auflösen der Lyophilisate wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Der *Capture*-Antikörper wurde in 1,0 mL PBS-Puffer gelöst, um eine Konzentration von 360 µg/mL zu erreichen. Der Detektionsantikörper wurde in 1,0 mL *Reagent Diluent* gelöst, bei einer Konzentration von 36 µg/mL. Das Lyophilisat des Standards wurde in 0,5 mL *Reagent Diluent* gelöst, damit wurde eine Konzentration von 120 ng/mL erzielt. Anschließend wurden aus den Lösungen 60 µL Aliquots hergestellt. Die Aliquots wurden schließlich bei -80°C eingefroren, gelagert und kurz vor der Verwendung wieder vollständig aufgetaut.

Der PBS-Puffer wurde entsprechend der Angaben von R&D-Systems hergestellt. Jeweils am Vortag der Messung wurde 1 Liter PBS-Puffer neu angesetzt. Im Anschluss wurde der PBS-Puffer bei 0,22 µm filtriert und schließlich bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Platten wurden am Vortag mit den *Capture*-Antikörpern aus dem ELISA-Kit von R&D-Systems beschichtet. Dazu wurde ein Aliquot des *Capture*-Antikörpers vollständig aufgetaut und anschließend 58 µL mit 10,392 mL PBS-Puffer auf 2,0 µg/mL verdünnt. 100 µL des verdünnten Antikörpers wurden pro Well mittels der automatischen Repetierpipette aufgetragen. Die Platte wurde daraufhin über Nacht bei RT abgedeckt *gecoated*.

3.2.3. Durchführung des Immunoassays am Messtag

Zunächst wurde der benötigte Waschpuffer sowie der *Reagent Diluent* vorbereitet. Der Waschpuffer wurde 1:25 verdünnt. Der *Reagent Diluent* wurde 1:10 verdünnt. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit PBS-Puffer.

Nach der Inkubation über Nacht wurde die ELISA-Platte vollständig trocken geklopft und anschließend gewaschen. Dazu wurden mittels einer 8-Kanal Pipette von Eppendorf 400 µL der Waschlösung in jedes Well gegeben, die Platte ausgekippt und anschließend erneut trocken geklopft. Die Prozedur wurde noch zweimal wiederholt.

Zum Blocken der Platte wurden 300 µL *Reagent Diluent* pro Well pipettiert, für eine Stunde inkubiert und die Platte anschließend erneut gewaschen.

Die vollständig aufgetauten Serumproben und der Standard wurden für die Erstmessung 1:100 in *Reagent Diluent* verdünnt. Falls die Ergebnisse nicht im Bereich der Kalibrationsreihe lagen, wurde die Probe 1:500, 1:5000, 1:10.000 beziehungsweise 1:25.000 verdünnt und erneut gemessen. Für die Kalibriergerade wurde als höchste Konzentration 2000 ng/mL angesetzt. Diese wurde sechs Mal im Verhältnis 1:1 mit *Reagent Diluent* vermischt, so dass eine 7-Punkt-Standardkurve erreicht wurde. Es wurden je 100 µL des verdünnten Serums und des Standards pro Well in Doppelbestimmung luftblasenfrei aufgetragen. Die Platte wurde zwei Stunden inkubiert und wiederum drei Mal gewaschen.

Danach konnte der Detektionsantikörper in einer Konzentration von 200 ng/mL aufgetragen werden. Nach Auftragen von 100 µL dieser Lösung folgte eine erneute zweistündige Inkubationszeit inklusive drei Waschschritten. Um die Detektionsantikörper mit HRP zu markieren, wurden 100 µL der Streptavidin-HRP aufgetragen. Diese war zuvor entsprechend dem Herstellerprotokoll verdünnt worden. Es wurde für 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Währenddessen wurde die TMB-Substrat-Lösung auf Raumtemperatur gebracht. Nach erneutem Waschen der Platte wurden 100 µL Substrat pro Well zugegeben und 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µL 2 M Schwefelsäure beendet, was einen Farbumschlag von blau nach gelb zur Folge hatte.

Schließlich konnte die Platte mit dem ELx808 *Absorbance Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen werden. Die ausgelesene optische Dichte konnte nun über den Standard in die YKL-40-Konzentration umgerechnet werden.

3.3. Statistische Auswertung

Die Verwaltung der Datensätze erfolgte mit der Software Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Die Erstellung der Grafiken für die Auswertung der Daten der Verlaufsmessungen erfolgte mit der Software OriginPro Version 8 (OriginLabs, Northampton, MA, USA). Die Auswertung aller anderen Daten und die statistischen Analysen erfolgten mit der Software IBM SPSS Statistics Version 21 (IBM, Armonk, NY, USA).

3.3.1. ROC-Kurven (Receiver-Operating-Characteristic)

ROC-Kurven dienen der Feststellung der diagnostischen Wertigkeit von Tests oder Markern für bestimmte Fragestellungen. Bei der Erstellung einer ROC-Kurve wird für verschiedene Schwellenwerte die Sensitivität auf der Ordinate gegen 1-Spezifität auf der Abszisse aufgetragen. Letzteres entspricht dem Wert der falsch erkannten Kranken an allen Kranken. Die Spezifität selbst beschreibt den Anteil der richtig erkannten Gesunden an allen Gesunden. Sie wird wie folgt berechnet:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig erkannten Gesunden}}{\text{Anzahl aller Gesunden}}$$

Die Sensitivität beschreibt den Anteil der richtig erkannten Kranken an allen Kranken, berechnet sich also folgendermaßen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig erkannten Kranken}}{\text{Anzahl aller Kranken}}$$

Bei der Erstellung der ROC-Kurve wird für jeden Messwert angenommen, dass es sich dabei um den Schwellenwert zur Unterscheidung Gesunder und Kranker handelt. Sensitivität und Spezifität werden unter dieser Annahme für jeden Messwert berechnet und die Punkte graphisch dargestellt und verbunden. Eine ideale ROC-Kurve läge exakt auf der linken bzw. oberen Begrenzungslinie des dargestellten Quadrats. Liegt die ROC-Kurve nahe an der diagonalen Bezugsgeraden, sind die Aussagen des untersuchten Tests dem Zufall unterworfen.

Um die diagnostische Qualität des untersuchten Tests bzw. Markers mit einer Zahl visualisieren zu können, wird bei ROC-Analysen stets die Fläche unter der ROC-Kurve (engl. *Area Under the Curve*; AUC) berechnet. Ein AUC-Wert von 0,5 entspricht der Bezugsgeraden in der Grafik und bedeutet dabei wiederum, dass die Aussagen des Tests bzw. Markers zufälliger Natur sind. Ein Wert von 1,0 wäre der Idealwert und würde eine exzellente diagnostische Wertigkeit anzeigen. Generell gilt, je höher der AUC-Wert, desto höher die diagnostische Güte des Tests.

ROC-Kurven ermöglichen es also einen Schwellenwert zu bestimmen, bei dem Sensitivität und Spezifität für den untersuchten Test bestmöglich sind. Außerdem wird es durch Verschieben des Schwellenwerts möglich, den Gewinn an zusätzlichen richtig-positiven gegenüber dem Nachteil an gleichzeitig vermehrten falsch-positiven Ergebnissen einzuschätzen (Metz 1978; Zweig & Campbell 1993).

3.3.2. Box-Whisker-Plots

Box-Whisker-Plots (syn. Boxplots) sind eine Methode zur grafischen Darstellung von Lage- und Streuungsmaßen eines Datensatzes. Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau eines Boxplots. Ein Boxplot besteht aus der eigentlichen „Box“, die durch zwei senkrechte Linien nach oben und unten ergänzt wird. Diese Linien bezeichnet man als „Whisker“. Die Einrahmung der Box kennzeichnet das 25%-Quantil (unten) bzw. das 75%-Quantil (oben). Quantile zeigen einen Schwellenwert an, an dem ein gewisser Prozentsatz der Werte kleiner ist als der Schwellenwert, der Rest der Werte liegt darüber. Der jeweilige Prozentsatz wird dem Begriff Quantil vorangestellt. Der Bereich zwischen dem 75%-Quantil und dem 25%-Quantil wird als Interquartilen-Abstand bezeichnet. Dieser zeigt die Streuung der Messwerte an.

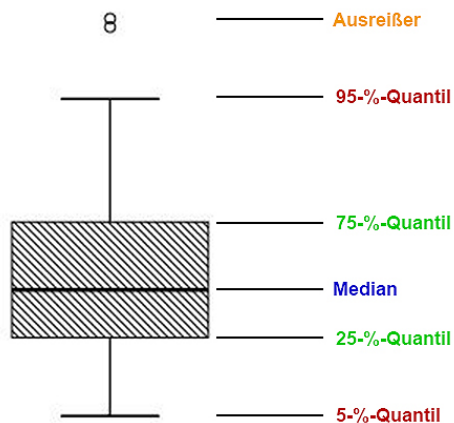


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Boxplots

In der Box wird mit einem waagerechten Strich der Median dargestellt. Der Median entspricht formal dem 50%-Quantil, die Hälfte der Daten ist also kleiner als der Wert des Medians, die andere Hälfte ist größer.

Die Whisker kennzeichnen das 5%-Quantil (unten) sowie das 95%-Quantil (oben). Ausreißer werden meist mit Kreisen oder anderen Symbolen über den Whiskern dargestellt.

Boxplots dienen dazu, sich schnell einen Überblick über die Verteilung von Daten verschaffen zu können. Außerdem können mehrere Boxplots nebeneinander aufgetragen werden. Dies ermöglicht einen schnellen Vergleich der Daten zwischen verschiedenen Untergruppen (Tukey 1977; McGill et al. 1978).

3.3.3. Korrelationsanalyse nach Spearman

Die Korrelation der Marker wurde in dieser Arbeit aufgrund fehlender Normalverteilung der Daten nach Spearman berechnet. Diese Art der Korrelationsanalyse ist von der Datenverteilung unabhängig, da nicht die eigentlichen Messwerte, sondern diesen Werten zugeordnete Rangplätze ausgewertet werden. Zudem wird dieser Test durch Ausreißer nicht so stark beeinflusst wie andere Korrelationsanalysen (Zöfel 2001).

3.3.4. Signifikanz

Die Berechnung der Signifikanz wurde für deskriptive Statistiken und AUC-Werte von ROC-Analysen aufgrund fehlender Normalverteilung der Daten mittels des nichtparametrischen Tests für unverbundene Stichproben nach Mann-Whitney-U durchgeführt. Es wurden folgende Signifikanzniveaus definiert: Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet, Werte von $p > 0,05$ dagegen als nicht signifikant. Zusätzlich wurden Werte von $p \leq 0,01$ als signifikant mit geringer Irrtumswahrscheinlichkeit und von $p \leq 0,001$ als signifikant mit sehr geringer Irrtumswahrscheinlichkeit betrachtet. In den Grafiken dieser Arbeit sind folgende Markierungen enthalten: Signifikante Werte ($p \leq 0,05$) sind mit einem Stern (*), signifikante mit geringer Irrtumswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,01$) mit zwei Sternen (**), und signifikante mit sehr geringer Irrtumswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,001$) mit 3 Sternen (***) gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Performance des Immunoassays

In diesem Abschnitt werden die *Performance*-Daten des in dieser Arbeit verwendeten Immunoassays besprochen. Das System kam sowohl in der explorativen Vorstudie, als auch der daran angeschlossenen prospektiven Studie zum Einsatz, weshalb die *Performance*-Daten für beide Studien gemeinsam bestimmt wurden.

4.1.1. Richtigkeit

Aufgrund des Fehlens eines international anerkannten Standards für YKL-40 und damit eines wahren Wertes konnte die Richtigkeit des Immunoassays nicht ermittelt werden. Vergleiche mit Daten aus der Literatur ergeben jedoch mit den Ergebnissen dieser Studie vergleichbare Serumkonzentrationen (vgl. beispielsweise Kapitel 5.2.1.).

4.1.2. Verdünnungslinearität

Für die Bestimmung der Verdünnungslinearität wird eine Probe in mehreren Verdünnungsstufen gemessen und die Abweichungen der Messwerte zum Ergebnis der unverdünnten Probe bewertet. Die durchschnittliche Wiederfindung des verwendeten Immunoassays beträgt ca. 91 ± 11 % (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verdünnungslinearität des Immunoassays.

Verdünnungsfaktor	Wiederfindung im Durchschnitt [%] (n=5)	Standardabweichung [%]
2	90,8	11,0
4	90,1	11,8

4.1.3. Recovery

Ebenso wie für die Bestimmung der Richtigkeit eines Immunoassays, wird auch für die Bestimmung der *Recovery* eine international anerkannte Standardlösung mit bekannter Konzentration benötigt. Daher wurde die *Recovery* des Immunoassays im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Da es sich um einen kommerziell erhältlichen Assay handelt, der vollständig nach Herstellerangaben verwendet wurde und analog in anderen Studien eingesetzt wird, wird von einer ausreichenden *Assay-Performance* ausgegangen.

4.1.4. Präzision

Um die Streuung der Messwerte bestimmen zu können, wurden Variationskoeffizienten bestimmt. Dies erfolgte durch Messung zweier Serumproben auf 13 exemplarischen Platten, eine davon mit niedriger YKL-40-Serumkonzentration von ca. 20 ng/mL („*Low Control*“), die andere mit einer höheren Serumkonzentration von ca. 88 ng/mL („*High Control*“). Die Proben wurden im Doppelansatz gemessen, so dass aus der Schwankung zwischen den beiden gemessenen Werten der *intra-assay*-Variationskoeffizient (engl. *Coefficient of Variation*; CV) berechnet werden konnte. Dieser lag im Durchschnitt bei 2,30%. Die Schwankung zwischen den einzelnen Platten wird als *inter-assay*-CV bezeichnet und betrug 7,95%. Tabelle 10 zeigt die einzelnen Daten für die Berechnung des *intra-assay*-CV:

Tabelle 10: *Intra-Assay*-CV des Immunoassays (CV=Variationskoeffizient; HC=High Control; LC=Low Control; MW=Mittelwert).

Platte	Ergebnis 1 LC [ng/mL]	Ergebnis 2 LC [ng/mL]	CV LC [%]	Ergebnis 1 HC [ng/mL]	Ergebnis 2 HC [ng/mL]	CV HC [%]
1	21,19	21,30	0,38	98,10	98,52	0,30
2	20,77	19,71	3,72	101,20	103,02	1,25
3	20,34	16,87	13,18	83,40	83,79	0,32
4	19,97	20,13	0,58	81,02	80,89	0,11
5	18,04	17,36	2,73	75,94	76,24	0,28
6	18,85	17,75	4,25	82,44	78,85	3,15
7	18,85	17,75	4,25	82,44	78,85	3,15
8	19,55	20,05	1,80	88,97	93,01	3,14
9	18,89	18,17	2,75	81,43	80,31	0,98
10	21,07	20,45	2,12	84,17	86,66	2,06
11	19,66	20,11	1,62	92,55	94,55	1,51
12	21,17	20,05	3,86	90,60	91,09	0,38
13	21,95	21,87	0,25	95,21	97,53	1,70
MW	-	-	3,19	-	-	1,41

Ergebnisse

Tabelle 11 zeigt analog die Daten für die Berechnung des *inter-assay*-CV:

Tabelle 11: *Inter-Assay*-CV des Immunoassays (CV=Variationskoeffizient; MW=Mittelwert).

Platte	Low Control [ng/mL]	High Control [ng/mL]
1	21,25	98,31
2	20,24	102,11
3	18,60	83,60
4	20,05	80,95
5	17,70	76,09
6	18,30	80,65
7	18,30	80,65
8	19,80	90,10
9	18,53	80,87
10	20,76	85,41
11	19,88	93,55
12	20,61	90,85
13	21,91	96,37
MW	19,69	87,72
	6,59	9,30
CV [%]	7,95	

4.2. Ergebnisse der explorativen Studie

4.2.1. Ergebnisse im Kontrollkollektiv

Als Kontrollen wurden gesunde Blutspender des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) in München verwendet. Mittels des in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Immunoassay-Systems von R&D-Systems wurden die Serumproben auf ihre YKL-40-Konzentration hin gemessen.

Tabelle 12 fasst die Ergebnisse der Messung zusammen:

Ergebnisse

Tabelle 12: YKL-40-Serumkonzentration im Kontrollkollektiv (n=100).

	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Minimum	Maximum	Perzentile 2,5	Perzentile 97,5
YKL-40 [ng/mL]	27,8	24,8	14,1	6,4	76,9	11,8	71,3

Die Serumkonzentration des YKL-40 ergab für die Proben der gesunden Blutspender einen medianen Wert von 24,8 ng/mL. Der Referenzbereich von Perzentile 2,5 bis 97,5 lag bei 11,8 - 71,3 ng/mL. Dies ist Ausdruck einer Spannweite des vermutlichen Referenzwerts auf das etwa dreifache des Medians.

Abbildung 5 fasst das Ergebnis nochmal graphisch in einem Boxplot zusammen:

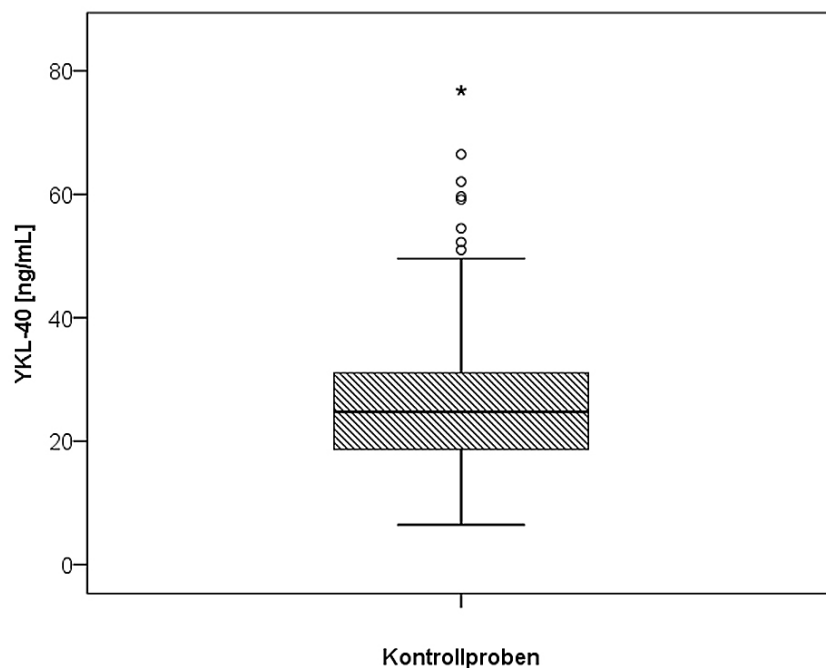


Abbildung 5: Boxplot der YKL-40-Serumkonzentrationen in den BRK Kontrollproben (n=100). Die schwarzen Kreise kennzeichnen nahe Ausreißer, der Stern einen extremen Ausreißer.

Der Boxplot zeigt die Verteilung der Messwerte. Auffällig wird hier das Vorhandensein einiger Ausreißer nach oben. Außerdem fällt ein extremer Ausreißer (Stern) bei einem Wert von 76,9 ng/mL (Maximum in Tabelle 12) auf. Diese Ausreißer bedingen den im Vergleich zum Median hohen Wert der 97,5%-Perzentile. Wie im Boxplot ersichtlich reicht die obere Grenze ohne Berücksichtigung der Ausreißer nur bis etwa 50 ng/mL. Dies sollte bei der Interpretation der vermutlichen Referenzwerte berücksichtigt werden.

4.2.2. Korrelation von CRP und YKL-40

In der Einleitung (Kapitel 1.1) wurde das CRP bereits als etablierter Entzündungsmarker vorgestellt. Ebenfalls wurde in der Einleitung YKL-40 als möglicher Marker für verschiedene entzündliche Erkrankungen charakterisiert. Da demzufolge beide Marker für die Diagnostik entzündlicher Erkrankungen interessant sind, wurden die Messergebnisse der Serumkonzentrationen beider Proteine hinsichtlich ihrer allgemeinen Korrelation untersucht. Die Ergebnisse werden in diesem Kapitel erläutert. Die Korrelation wurde anhand des im Abschnitt Material und Methoden (Kapitel 3.1.8) aufgeführten Klinikkollektivs analysiert. Dabei handelt es sich um Serumproben von Patienten, bei denen noch keinerlei Gruppierung nach Diagnosen vorgenommen wurde.

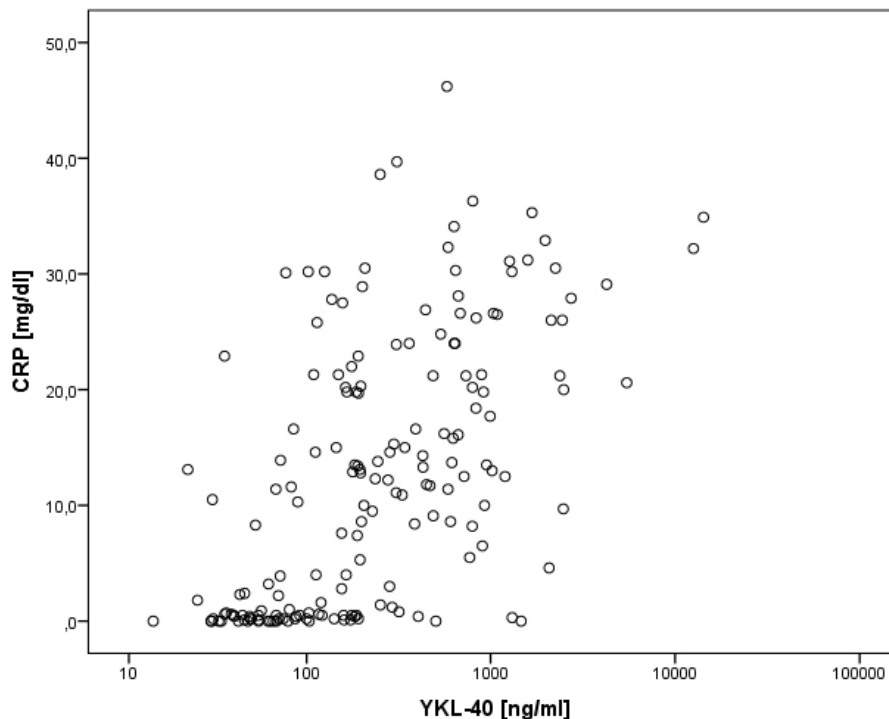


Abbildung 6: Streudiagramm aller Proben des Klinikkollektivs. X-Achse logarithmisch. Jeder Punkt steht für eine Probe (n=178). Korrelation nach Spearman $p=0,607$.

Das Streudiagramm in Abbildung 6 zeigt alle 178 gemessenen Proben des Klinikkollektivs. Dabei wird die YKL-40-Serumkonzentration gegen die Serumkonzentration des CRP aufgetragen. Es wird ersichtlich, dass es einige Patientenproben gibt, bei denen sowohl YKL-40 als auch das CRP deutlich erhöht sind. Genauso gibt es aber einige Werte, bei denen das YKL-40 gegenüber dem Referenzwert von etwa 25 ng/mL erhöht ist, das CRP jedoch niedrige Konzentrationen aufweist. Wenige Patienten wiesen auch eine deutlich erhöhte CRP-Konzentration bei normaler bis hochnormaler YKL-40-Konzentration auf. Eine allgemeine Korrelation zwischen YKL-40 und CRP kann schon allein aufgrund der Abbildung

Ergebnisse

vermutet werden. Die visuelle Vermutung wird durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman bestätigt. Sie ergibt einen Wert von 0,607. Dieser ist auf dem Niveau von 0,01 statistisch signifikant ($p=0,01$; zweiseitig). Es konnte also eine mittelstarke Korrelation zwischen CRP und YKL-40 in diesem Krankenhauskollektiv gezeigt werden.

Im Folgenden sollen kurz die gefundenen Diagnosen bei obig genannten drei Gruppen dargestellt werden. Die Grenzwerte für die Einteilung in die Gruppen wurden rein empirisch festgelegt.

Gruppe 1: CRP erhöht bei gleichzeitig normalem YKL-40

In diese Gruppe wurden drei Patienten einsortiert. Kriterium für den Einschluss in diese Gruppe war eine YKL-40-Serumkonzentration von <100 ng/mL bei einer gleichzeitigen CRP-Erhöhung über 15 mg/dL. Aufgrund der geringen Anzahl erscheint eine genaue statistische Aufschlüsselung nicht sinnvoll. Die YKL-40-Serumkonzentrationen lagen mit 35,3 - 84,8 ng/mL im Referenzbereich, die CRP-Konzentrationen im Serum mit 16,6 - 30,1 mg/dL deutlich oberhalb der oberen Referenzwertgrenze. Alle drei Patienten hatten eine jeweils andere Krankheitsentität, so war eine Patientin mit einer gedeckt perforierten Sigmadivertikulitis vorstellig geworden, ein Patient war wegen einer Sepsis bei Agranulozytose in Behandlung und der dritte Patient war wegen eines Lungenkarzinoms stationär aufgenommen worden. Es zeigt sich also, dass es kaum Patienten zu geben scheint, bei denen nur das CRP erhöht nachweisbar ist, während das YKL-40 nicht ansteigt. Bei den drei zufällig gefundenen Patienten ist hierbei auch keinerlei Schema erkennbar, alle drei Patienten litten an verschiedenen Krankheiten.

Gruppe 2: CRP und YKL-40 erhöht

In diese Gruppe wurden 25 Patienten eingeschlossen. Dies entspricht 14% des Klinikkollektivs. Bei all diesen Patienten lag das CRP bei über 20 mg/dL, das YKL-40 war auf mindestens 600 ng/mL erhöht.

Wie aus nachfolgender Tabelle 13 ersichtlich wird, konnten die Patienten in dieser Gruppe in drei Krankheitskategorien eingeteilt werden. Dabei gilt es zu beachten, dass einige Patienten mehrfach eingeteilt werden mussten, da sie an mehreren der aufgeführten Krankheiten litten.

Tabelle 13: Gruppierung der 25 Patienten mit erhöhtem CRP und erhöhtem YKL-40 in vier Kategorien, je nachdem ob die entsprechende Kategorie bei einem Patienten zugrunde lag (Ja) oder nicht (Nein).

Krankheitskategorie	Ja	Nein
Akute Entzündung	19	6
Maligne Erkrankung	12	13
Lungenerkrankung	8	17
Keine der obigen Kategorien	2	23

Unter den acht Patienten mit einer Lungenerkrankung fanden sich sieben mit einer Pneumonie, sowie ein Patient mit chronisch-obstruktivem Asthma bronchiale. Es zeigt sich, dass beide Marker vor allem bei Patienten mit akut entzündlichem Geschehen erhöht sind, jedoch lag bei immerhin der Hälfte der Patienten auch eine maligne Grunderkrankung vor. Es gab unter diesen 25 Patienten lediglich zwei, die in keine der drei Kategorien eingeteilt werden konnten. Darunter befand sich eine Patientin mit einer Angina pectoris, einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und einem chronischen Nierenleiden sowie ein Patient mit einer Coxarthrose und einem Herzklappenfehler.

Gruppe 3: CRP normal bei gleichzeitig erhöhtem YKL-40

In diese Gruppe wurden 21 Patienten eingeschlossen. Dies entspricht ca. 12% des Klinikkollektivs. Alle hatten einen verhältnismäßig niedrigen CRP-Wert, der hier als $\leq 3,0$ mg/dL definiert wurde. Gleichzeitig lag bei allen Patienten eine Erhöhung des YKL-40 auf mindestens 100 ng/mL vor.

Tabelle 14: Gruppierung der 21 Patienten mit erhöhtem YKL-40 und niedrigem CRP in drei Kategorien, je nachdem ob die entsprechende Kategorie bei einem Patienten zugrunde lag (Ja) oder nicht (Nein).

Krankheitskategorie	Ja	Nein
Orthopädie	8	13
Kardiovaskulär	7	14
andere	6	15

Wie in Tabelle 14 ersichtlich, konnten in dieser Gruppe zwei Krankheitskategorien unterschieden werden: zum einen die Kategorie der orthopädischen Erkrankungen, zum anderen die Kategorie der kardiovaskulären Erkrankungen. Unter den orthopädischen Pathologien fanden sich vier Frakturen, weiterhin eine Rippenprellung, eine Spondylolisthesis, eine offene Bursa praepatellaris sowie eine Spinalkanalstenose.

Ergebnisse

Zu den kardiovaskulären Pathologien wurde gerechnet: Bradyarrhythmie in Kombination mit Hypertonie und Vorhofflimmern, Thrombophlebitis, subretinale Blutung, Lungenembolie bei gleichzeitigem Hämatothorax durch eine rupturierte Aortendissektion, Bauchaaortenaneurysma sowie ein zerebraler Infarkt und eine akute gastrointestinale Blutung.

Sechs Patienten konnten keiner Kategorie zugeordnet werden.

Bei Analyse der YKL-40-Serumkonzentration in den drei gebildeten Kategorien ergibt sich folgendes Bild:

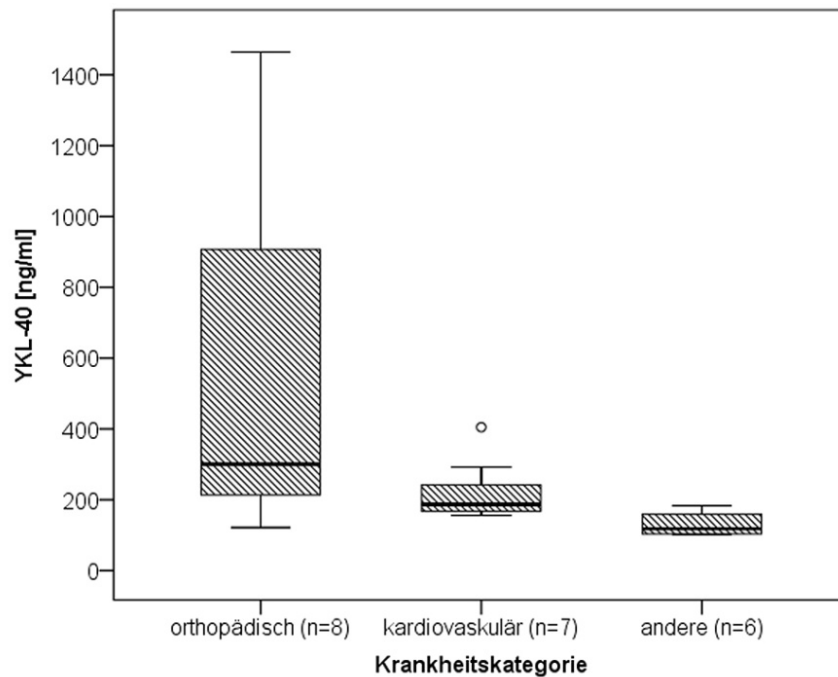


Abbildung 7: YKL-40-Konzentration in den drei Krankheitskategorien (n=21).

Die Spannweite war bei den orthopädischen Erkrankungen mit einem Minimum von 121,42 ng/mL und einem Maximum von 1464,06 ng/mL am höchsten ausgeprägt. Der Median der Serumkonzentration lag bei 300,85 ng/mL.

Aber auch die Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen zeigte bei einem Median von 181,44 ng/mL erhöhte Werte.

4.2.3. YKL-40 und CRP bei Lebererkrankungen

Alle Patienten wurden im Hinblick auf ihre Diagnosen ausgewertet und dabei in vier Kategorien eingeteilt: Lebererkrankungen, maligne Erkrankungen, pulmonale Erkrankungen sowie akute Entzündungsgeschehen allgemein. Die Ergebnisse in diesen vier Kategorien sollen in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

Ergebnisse

Zunächst sollen die Lebererkrankungen behandelt werden. Als Lebererkrankungen wurden folgende Diagnosen gewertet:

- Akutes Leberversagen
- Chronisches Leberversagen
- Hämangiome der Leber
- Hepatozelluläres Karzinom
- Leberfibrose
- Lebermetastasen
- Leberzirrhose
- Steatosis hepatis
- toxische Lebererkrankung
- Virus-Hepatitis

Es ist offensichtlich, dass alle Erkrankungen ganz unabhängig von der genauen Entität bzw. Ätiologie untersucht wurden. Es sollte lediglich überprüft werden, ob CRP bzw. YKL-40 in der Lage sein könnte, einen Leberzellschaden anzuzeigen und somit eine gewisse Organspezifität für die Leber aufweisen würde. Bei allen oben aufgeführten Diagnosen kommt es zu solchen Leberzellschädigungen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. In Abbildung 8 sind alle untersuchten Serumproben dargestellt und farblich im Hinblick auf Vorliegen einer Lebererkrankung (grün) oder Fehlen einer solchen (rosa) gekennzeichnet.

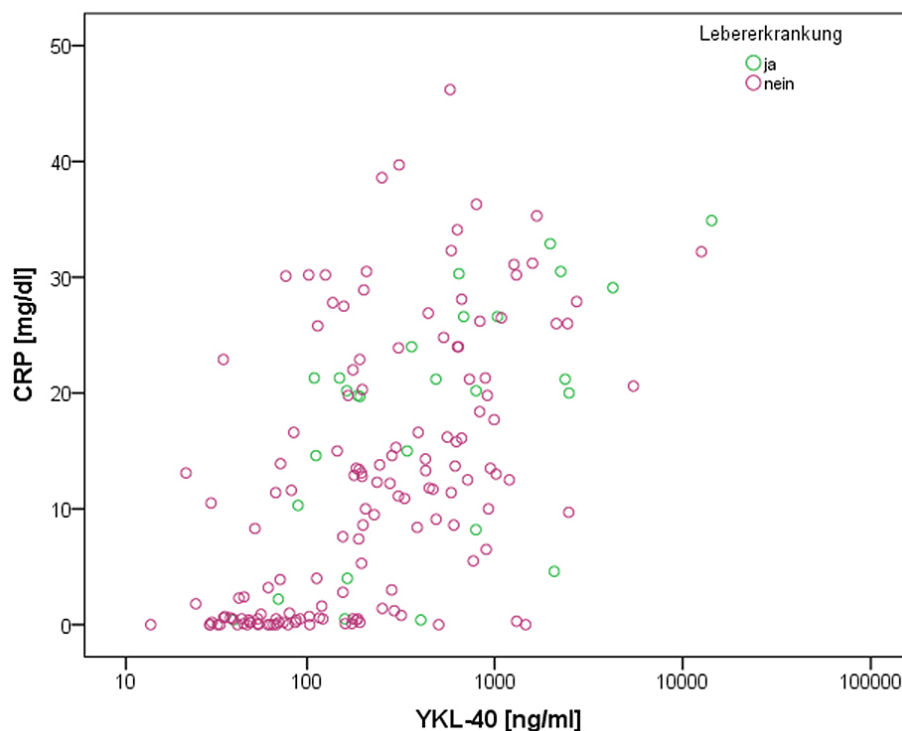


Abbildung 8: Streudiagramm von CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer Lebererkrankung. X-Achse logarithmisch. Jeder Punkt steht für ein Patientenserum mit (grün) oder ohne (rosa) Vorliegen einer Lebererkrankung. (n=176).

Ergebnisse

Bei Betrachtung des Streudiagramms erscheint rein visuell keine Gruppierung möglich zu sein. Es gibt für beide Marker Patienten mit einer Lebererkrankung und niedrigen Serumkonzentrationen, ebenso gibt es aber auch bei beiden Markern Patienten mit einer Lebererkrankung und hohen Serumkonzentrationen. Dies ist aus der unstrukturierten Verteilung grüner (Patienten mit Lebererkrankung) bzw. rosafarbener (Patienten ohne Lebererkrankung) Punkte entlang beider Achsen zu erkennen.

Im Folgenden wird die Verteilung von YKL-40 für beide Gruppen noch genauer betrachtet:

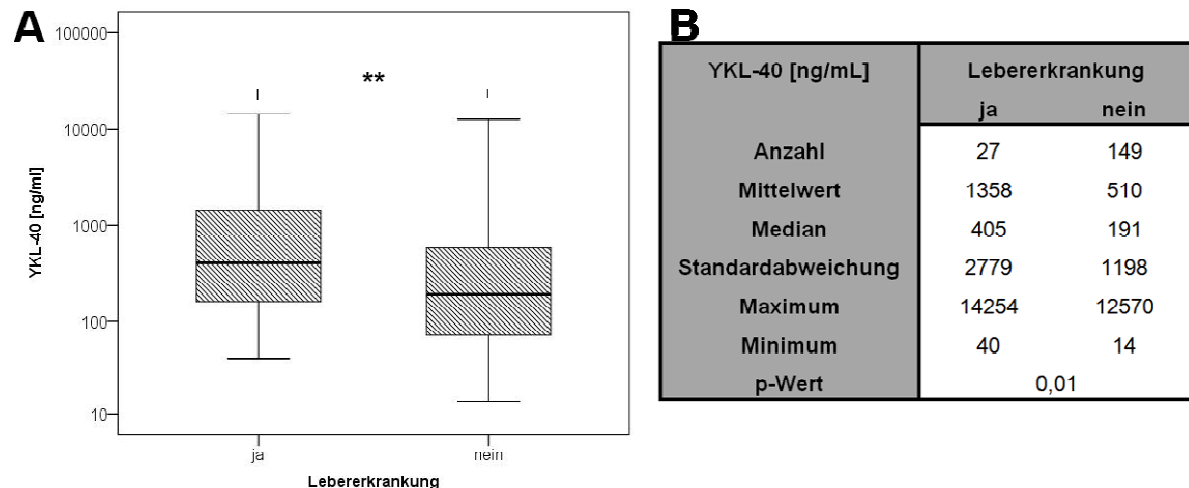


Abbildung 9.A: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer Lebererkrankung. Y-Achse logarithmisch. **B:** Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung für Lebererkrankungen.

Auffällig ist zunächst die enorme Spannweite der gemessenen Serumkonzentrationen in beiden Gruppen, erkennbar an den weit auseinander liegenden Maxima bzw. Minima sowie der hohen Standardabweichung. Des Weiteren liegt keine Normalverteilung der Serumkonzentrationen vor, was anhand des großen Unterschieds zwischen Mittelwert und Median hervorgeht. Der Median ist in der Gruppe der Patienten mit Lebererkrankung etwa doppelt so hoch gelegen wie bei den Patienten ohne hepatische Beeinträchtigung. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist auf dem Niveau von 0,01 statistisch signifikant. Auffällig ist darüber hinaus, dass es in beiden Gruppen Werte im Referenzbereich gibt, der Median aber stets deutlich über normalen Serumkonzentrationen liegt.

Im letzten Schritt sollte die diagnostische Wertigkeit, also die mögliche Sensitivität und Spezifität von YKL-40 und CRP für Lebererkrankungen bestimmt werden. Die Daten wurden dafür mittels einer *Receiver-Operating-Characteristic-Kurve* (ROC-Kurve) visualisiert und ausgewertet. Nachfolgende Abbildung 10 zeigt das Ergebnis:

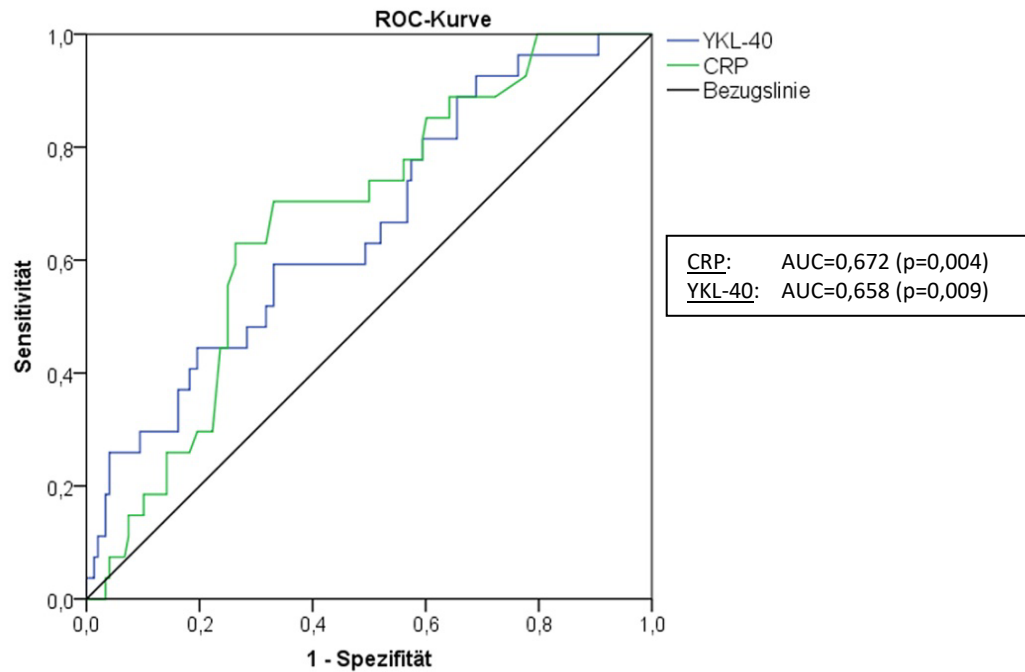


Abbildung 10: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer Lebererkrankung (positiv: n=27; negativ: n=148).

Die Fläche unter der Kurve (englisch: *Area under the curve*, AUC) beträgt für CRP 0,672 und für YKL-40 0,658. Beide Kurven liegen in etwa übereinander und nur knapp oberhalb der Bezugsgeraden. Bei einem Verlauf direkt auf der Bezugsgeraden mit einer AUC von 0,5 wären die Aussagen komplett dem Zufall unterworfen. Die Ergebnisse dieser ROC-Analyse sind statistisch signifikant ($p < 0,01$).

4.2.4. YKL-40 und CRP bei malignen Erkrankungen

Zu den malignen Erkrankungen wurden folgende Diagnosen gezählt:

- AEG-Karzinom des Magens
- Antrum-Karzinom des Magens
- Akute lymphatische Leukämie
- Akute myeloische Leukämie
- Bronchial-Karzinom
- B-Zell-Lymphom
- *Cancer of Unknown Primary* (CUP-Syndrom)
- Chronisch lymphatische Leukämie
- Chronisch myeloische Leukämie
- Endometrium-Karzinom
- Fibrosarkom
- Gingiva-Karzinom
- Gliom
- Glioblastoma multiforme
- Harnblasen-Karzinom
- Hepatozelluläres Karzinom
- Larynx-Karzinom

Ergebnisse

- Leiomyosarkom
- Mamma-Karzinom
- Mantelzelllymphom
- Myelodysplastisches Syndrom
- Nasopharynx-Karzinom
- Nierenbecken-Karzinom
- Nierenzell-Karzinom
- Ösophagus-Karzinom
- Osteosarkom
- Ovarial-Karzinom
- Prostata-Karzinom
- Rektum-Karzinom
- T-Zell-Lymphom
- Zervix-Karzinom
- Zungen-Karzinom

Es konnten verschiedenste maligne Prozesse aus unterschiedlichsten Gewebetypen berücksichtigt werden. Auch in dieser Kategorie wurde keine weitere Subgruppierung vorgenommen, sondern die generelle Eignung von CRP und YKL-40 als allgemeiner Tumormarker untersucht.

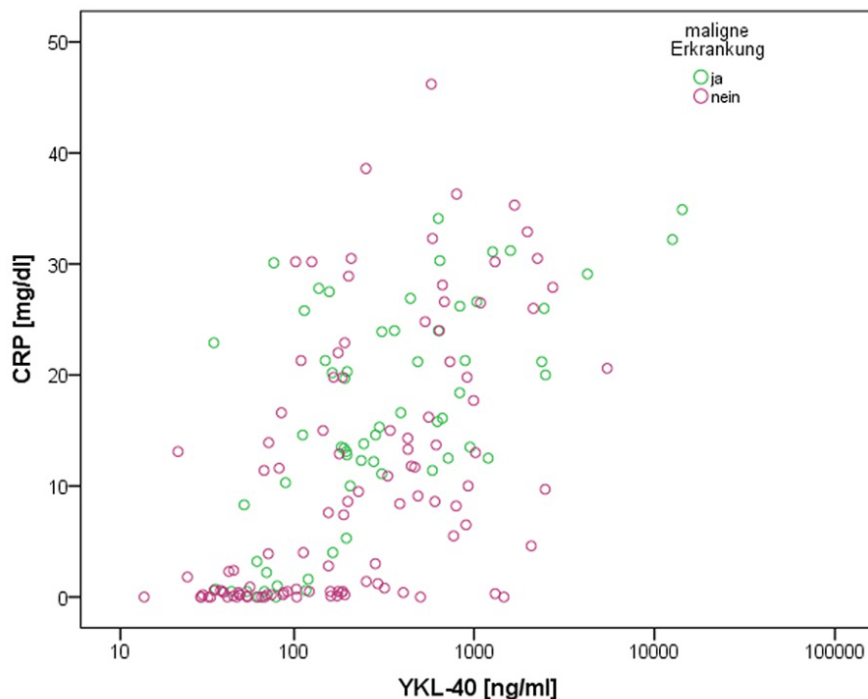


Abbildung 11: Streudiagramm für CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer malignen Erkrankung. x-Achse logarithmisch. Jeder Punkt steht für ein Patientenserum mit (grün) oder ohne (rosa) Vorliegen einer malignen Erkrankung (n=176).

Ergebnisse

Abbildung 11 zeigt wiederum alle Serumproben für CRP und YKL-40 im Streudiagramm, aufgeteilt nach Vorliegen eines malignen Prozesses (grün) bzw. Fehlen eines solchen (rosa). Wie schon bei den Lebererkrankungen zeigt sich auch hier keine generelle Strukturierung in der Verteilung der Messwerte, wobei man aber vermuten kann, dass Patienten mit maligner Erkrankung durchaus höhere Werte an CRP und YKL-40 aufweisen (mehr grüne Punkte im Bereich höherer Konzentrationen der beiden Marker). Eine Häufung der malignen Erkrankungen im Bereich eines der beiden Marker wird jedoch nicht ersichtlich.

Abbildung 12 zeigt die Auswertung der Messergebnisse für YKL-40:

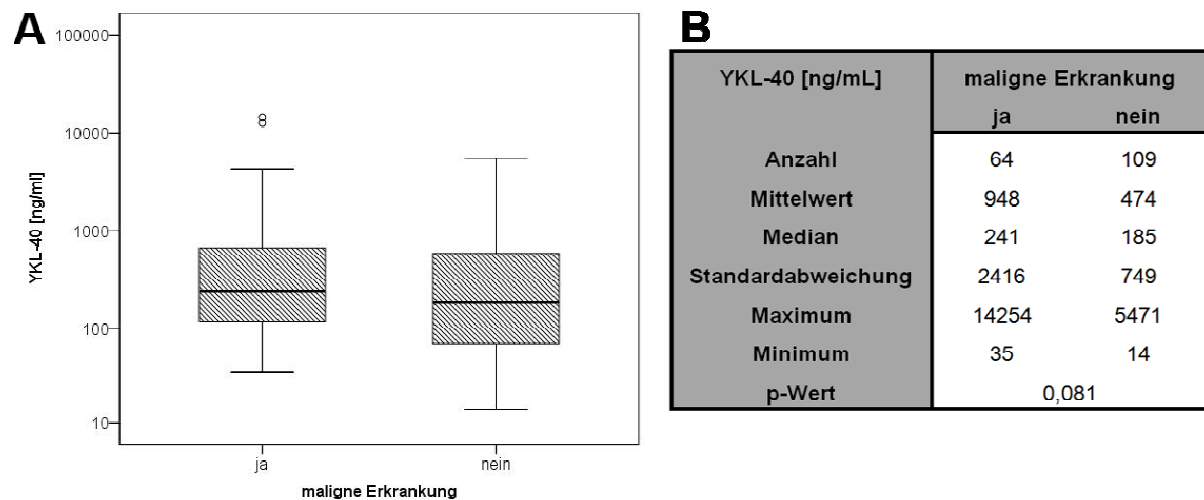


Abbildung 12.A: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer malignen Erkrankung. Y-Achse logarithmisch. Die schwarzen Kreise kennzeichnen zwei nahe Ausreißer. Die Unterschiede in den Populationen unterscheiden sich nicht signifikant. (ja: n=62; nein: n=108). B: Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung für maligne Erkrankungen.

Es liegt keine Normalverteilung der Daten vor, da Mittelwert und Median deutlich voneinander abweichen. Minimale Werte im Referenzbereich sowie sehr hohe Maxima weisen zusammen mit der hohen Standardabweichung auf eine große Spannweite der gemessenen YKL-40-Konzentrationen im Serum hin. Beide Gruppen weisen erhöhte mediane Werte auf. Der Unterschied in der Verteilung der Messergebnisse zwischen beiden Gruppen ist jedoch nicht signifikant ($p=0,081$).

Die Daten wurden zur letztendlichen Einschätzung der Eignung von CRP und YKL-40 als allgemeiner Tumormarker zusätzlich mittels ROC-Kurven-Analyse ausgewertet:

Ergebnisse

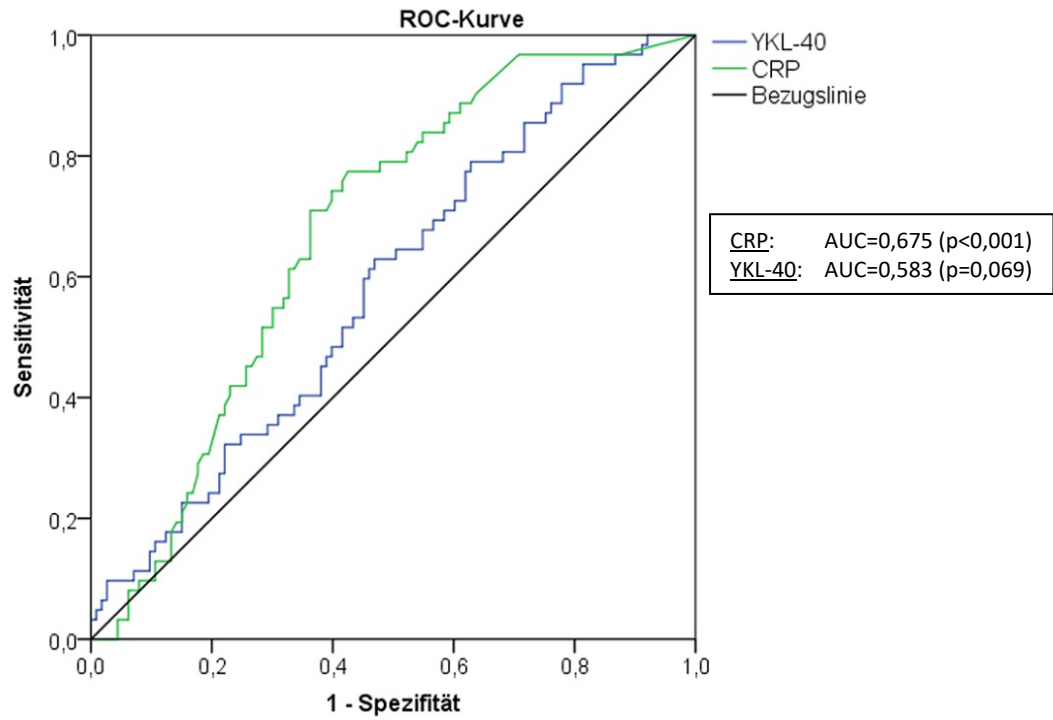


Abbildung 13: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer malignen Erkrankung (positiv: n=62; negativ: n=113).

Die AUC liegt hier für CRP bei 0,675 und für YKL-40 bei 0,583. Das CRP hebt sich von der Bezugsgeraden ab, während YKL-40 nahezu deckungsgleich mit dieser verläuft. Berücksichtigt werden muss die fehlende statistische Signifikanz dieses Tests für YKL-40 ($p=0,069$).

4.2.5. YKL-40 und CRP als Inflammationsmarker

Im Folgenden wurde die Eignung von CRP und YKL-40 als Inflammationsmarker untersucht. Das CRP ist schon lange als Entzündungsmarker bekannt und wird täglich gemessen (Pepys & Hirschfield 2003). Aus diesem Grund soll insbesondere dieser Abschnitt einen Vergleich zwischen CRP und YKL-40 ermöglichen. Als Positivgruppe dienten hier alle Patienten mit einem akuten Entzündungsgeschehen. Dazu zählten im Einzelnen die folgenden Diagnosen:

- Abszess (keimunabhängig)
- Appendizitis
- Aspergillose
- Bronchitis
- Cholangitis
- Cholezystitis
- Dekubitus (infiziert)
- Diszitis
- Endokarditis
- Endophtalmitis
- Erysipel
- Gastroenteritis
- Hepatitis
- infizierte Endoprothese
- Kolitis
- Lymphangitis
- Mastitis
- Mukositis
- Multiple Sklerose (akuter Schub)
- Pankreatitis
- paraspinale Infektionen
- Peritonitis
- Pneumonie
- Prostatitis
- Pyelonephritis
- Sepsis
- Sigmadivertikulitis
- Sinusitis
- Thrombophlebitis
- Tonsillitis
- zerebrales Hämatom (infiziert)
- Zystitis

In dieser Gruppe konnten wiederum viele verschiedene Diagnosen und Organsysteme berücksichtigt werden. Somit können organ- und diagnoseunabhängige Aussagen getroffen werden. Dies ermöglicht wiederum eine gute Einschätzung der Wertigkeit von CRP und hier vor allem YKL-40 als allgemeine, systemische Entzündungsfaktoren.

Ergebnisse

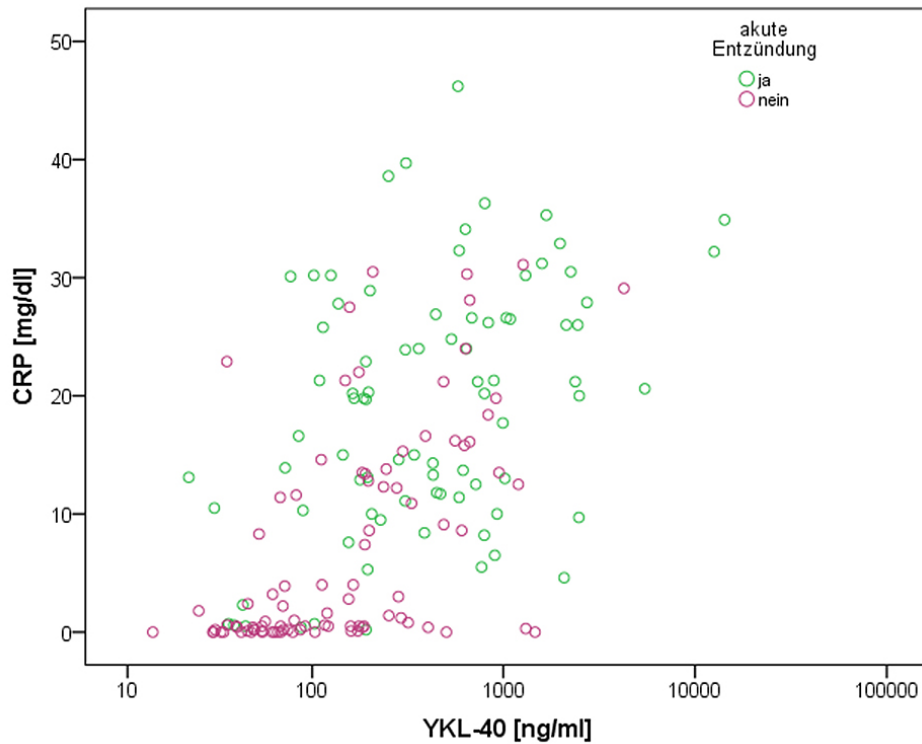


Abbildung 14: Streudiagramm für CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion. X-Achse logarithmisch. Jeder Punkt steht für ein Patientenserum mit (grün) oder ohne (rosa) Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion. (n=176).

Aus dem Streudiagramm wird ersichtlich, dass der überwiegende Anteil der Proben in den hohen Konzentrationsbereichen beider Marker grün dargestellt ist, also von Patienten mit akuten Entzündungsreaktionen stammt. Mit zunehmender Konzentration der Marker finden sich stets weniger Proben von Patienten ohne akut inflammatorische Erkrankungen. Im linken unteren Eckbereich - dem Bereich niedriger Konzentrationen - finden sich dagegen nahezu keine positiven Proben. Ein Unterschied in der Verteilung zwischen CRP und YKL-40 kann jedoch nicht festgestellt werden.

Ergebnisse

Die Messergebnisse für YKL-40 werden nachfolgend detailliert gezeigt:

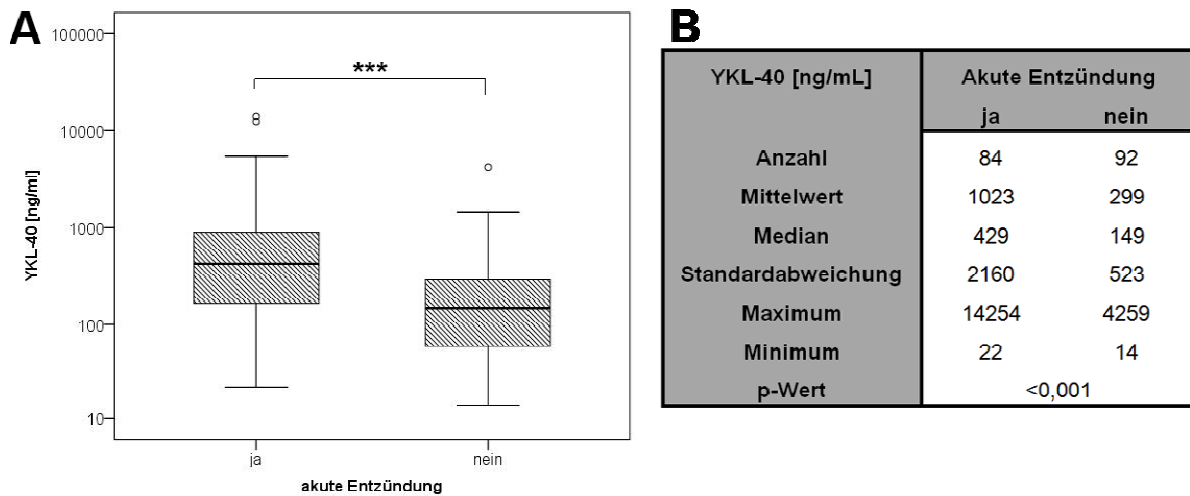


Abbildung 15.A: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion. Y-Achse logarithmisch. Die schwarzen Kreise kennzeichnen nahe Ausreißer. **B:** Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung für akute Entzündungen.

Erneut zeigt sich eine hohe Spannweite der Messergebnisse mit großen Unterschieden in den Maxima und Minima sowie hoher Standardabweichung. Darüber hinaus liegt abermals keine Normalverteilung vor. Werte im Referenzbereich können in beiden Gruppen gefunden werden. Der Median und auch das Maximum liegen für die Gruppe der akuten Entzündung ca. 3x höher als bei den Patienten ohne die selbige. Dieser Unterschied in der Datenverteilung ist statistisch signifikant. Dies ist im Boxplot (Abbildung 15A) ebenso erkennbar, da der Median der Negativgruppe knapp unterhalb des 25%-Quantils der Positivgruppe liegt.

Eine ROC-Kurven-Analyse diene wiederum der genauen Einschätzung der diagnostischen Wertigkeit von YKL-40 und CRP für akut inflammatorische Prozesse:

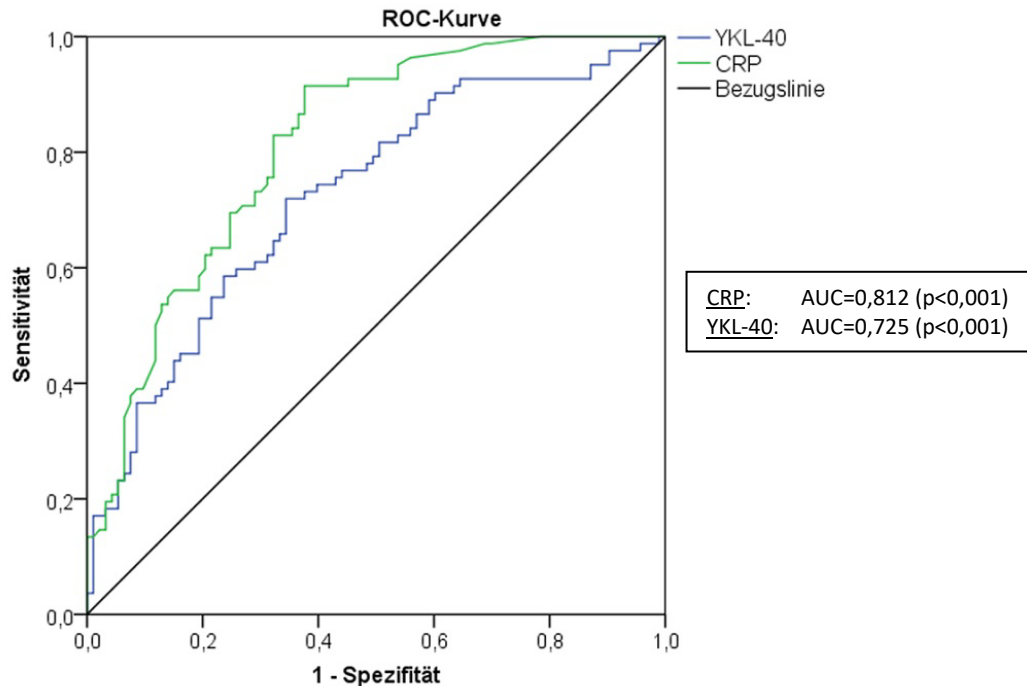


Abbildung 16: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion (positiv: n=82; negativ: n=93).

Beide Kurven heben sich deutlich von der Bezugsgeraden ab. Die Kurve von CRP liegt dabei noch etwas oberhalb der Kurve von YKL-40. Dazu passend ergab sich eine AUC von 0,812 für CRP sowie von 0,725 für YKL-40. Die Ergebnisse sind mit $p < 0,001$ statistisch als höchstsignifikant einzuschätzen.

4.2.6. YKL-40 und CRP bei Lungenerkrankungen

Wie in der Einleitung beschrieben, scheint es einen Zusammenhang zwischen YKL-40 und Lungenerkrankungen zu geben. Diese Theorie sollte in dieser Arbeit überprüft werden. Wie in den Abschnitten zuvor wurden zunächst alle Krankheiten zusammengefasst, die in jedweder Form die Lunge betreffen. Im Einzelnen wurden folgende Diagnosen als Lungenerkrankung gewertet:

- Aspergillose (generalisiert)
- Asthma bronchiale (chronisch-obstruktiv)
- Bronchial-Karzinom
- Bronchitis (purulent)
- Bronchopneumonie
- chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
- Lungenembolie
- Lungenödem (kardialer Genese)
- Pneumonie

Ergebnisse

- pulmonale Hypertonie
- pulmonale Metastasen anderer Primärkarzinome
- respiratorische Insuffizienz mit begleitendem Pleuraerguss
- Verlust von Teilen der Lunge

In diesem Kollektiv konnte ein breites Spektrum an möglichen Diagnosen berücksichtigt werden und somit die generelle Lungenspezifität von YKL-40 - auch im Vergleich mit CRP - untersucht werden.

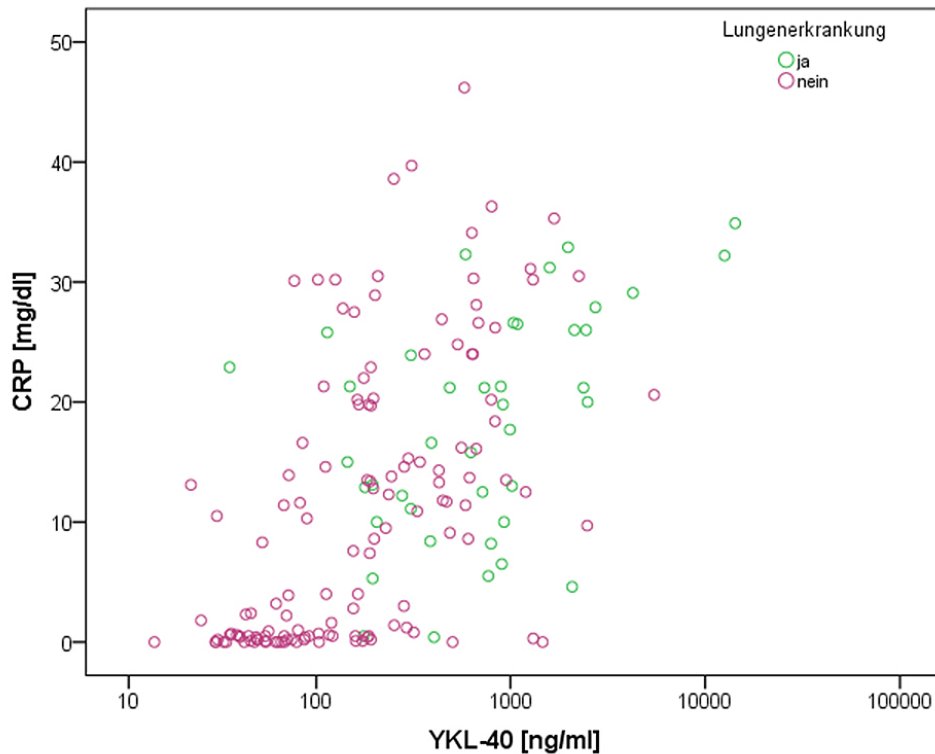


Abbildung 17: Streudiagramm für CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer Lungenerkrankung. X-Achse logarithmisch. Jeder Punkt steht für ein Patientenserum mit (grün) oder ohne (rosa) Vorliegen einer Lungenerkrankung. (n=176).

Bei Betrachtung des Streudiagramms in Abbildung 17 entsteht rein visuell der Eindruck, dass der überwiegende Anteil der Proben mit den höchsten YKL-40-Konzentrationen von Patienten mit pulmonalen Erkrankungen stammt. Für das CRP ergibt sich dieser Eindruck nicht, hier findet sich eine gemischte Verteilung der beiden Gruppen. Darüber hinaus erkennt man, dass im Bereich der niedrigen Konzentrationen nahezu ausschließlich Proben von Patienten ohne Lungenerkrankung zu finden sind. Dies gilt vor allem für YKL-40, jedoch auch - in geringerem Ausmaß - für das CRP.

Ergebnisse

Abbildung 18 zeigt die Messergebnisse für YKL-40 im Detail:

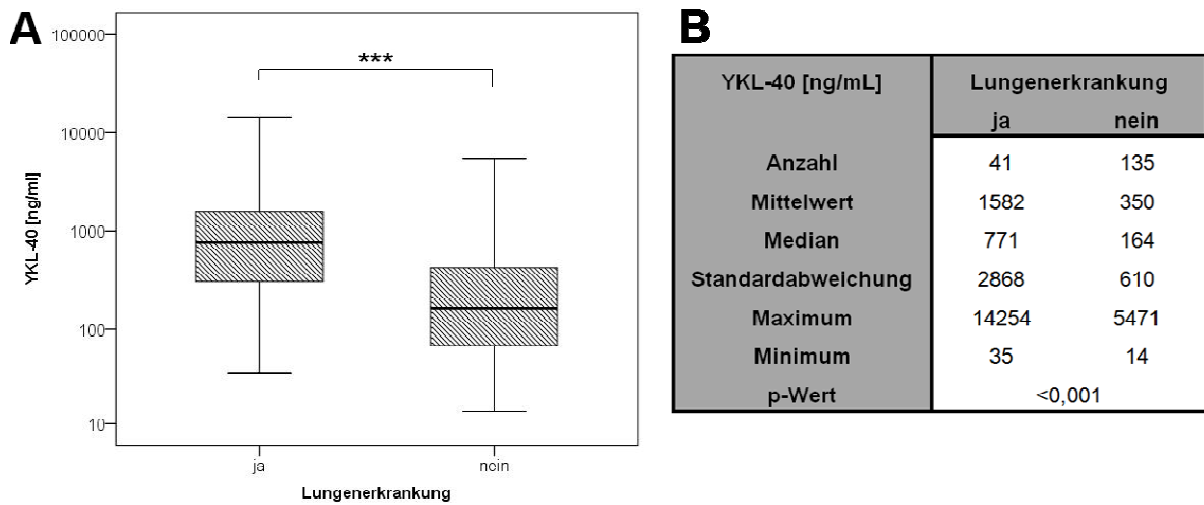


Abbildung 18.A: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer Lungenerkrankung. y-Achse logarithmisch. (ja: n=41; nein: n=132). B: Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung für Lungenerkrankungen.

Wie schon in den zuvor besprochenen Krankheitskategorien liegt keine Normalverteilung der Daten vor. Ebenso lässt sich wiederum eine enorme Spannweite erkennen, mit Minima im Normbereich und Maxima, die bis zu 500-fach darüber liegen. Der Median in der Gruppe der Lungenerkrankungen liegt ca. 4,5-fach höher als der Median der Negativgruppe. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant, was sich in der Position des Medians in der Negativgruppe deutlich unterhalb des 25%-Quantils der Positivgruppe widerspiegelt. Der Median der Positivgruppe liegt darüber hinaus etwa 30x höher als der Referenzwert von ca. 25 ng/mL. Jedoch gibt es auch in dieser Gruppe - wie bereits angesprochen - Werte im Referenzbereich. Die Positivgruppe erreicht dennoch insgesamt deutlich höhere Werte, entsprechend dem ca. 3x höheren Maximum.

Eine abschließend durchgeführte ROC-Kurven-Analyse diene abermals der Einschätzung der diagnostischen Wertigkeit der beiden Proteine:

Ergebnisse

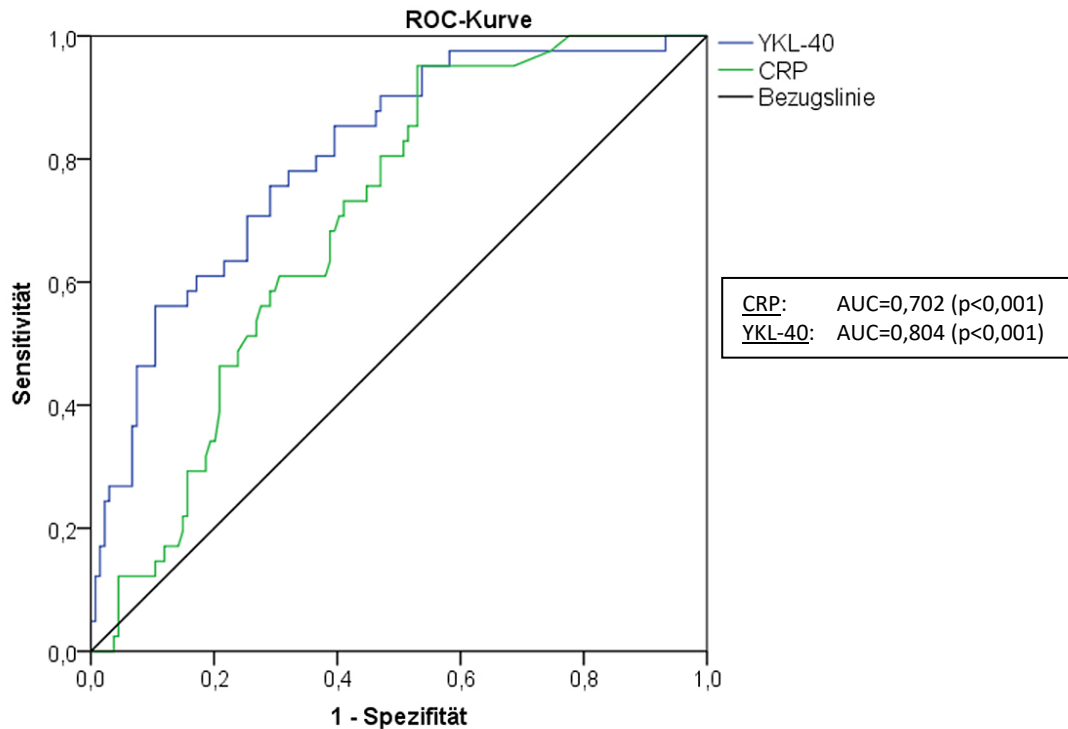


Abbildung 19: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer Lungenerkrankung (positiv: n=41; negativ: n=134).

Auffällig ist der deutliche Unterschied der ROC-Kurve von YKL-40 zur Bezugsgeraden, was sich in einer AUC von 0,804 ausdrückt (Abbildung 19). Auch die Kurve von CRP hebt sich von der Bezugsgeraden ab, liegt jedoch unterhalb von YKL-40. Die AUC für CRP ergab einen Wert von 0,702. Diese Ergebnisse sind als statistisch signifikant zu bewerten.

Da es in der Literatur - wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.3) beschrieben - Hinweise gab, dass YKL-40 einen Biomarker sowohl für Lungenerkrankungen als auch für akute Entzündungsreaktionen darstellen könnte und die Ergebnisse dieser Arbeit in eine ähnliche Richtung weisen, sollte nun eine Subgruppe analysiert werden, die diese beiden Krankheitskategorien vereint. Aus der Gruppe der Patienten mit Lungenerkrankung werden nur diejenigen betrachtet, die an einer akut entzündlichen Lungenerkrankung litten (Aspergillose, Bronchitis, Bronchopneumonie oder Pneumonie). In der ROC-Kurven-Analyse ergeben sich in diesem Fall nur minimal veränderte AUC-Werte. Für CRP wird nun eine AUC von 0,701 (im Vergleich zu 0,702) erzielt ($p=0,001$). Der AUC-Wert für YKL-40 steigt von 0,80 auf 0,81 ($p<0,001$). Diese Werte entsprechen also im Wesentlichen denen bei Betrachtung aller Lungenerkrankungen.

Eine weitere Herangehensweise war die Betrachtung eines veränderten Kollektivs mit ausschließlich entzündlichen Erkrankungen. Dazu wurden aus allen gesammelten Serumproben diejenigen ausgewählt, die von Patienten mit akut entzündlichen Erkrankungen stammten. Innerhalb dieser Gruppe wurde dann nochmals unterschieden

Ergebnisse

zwischen Patienten mit einer akut entzündlichen Lungenerkrankung und Patienten mit einer anderweitigen akuten Inflammationsreaktion. Untersucht man diese Stichprobe nun hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit für die Detektion einer Lungenentzündung, so ergibt sich folgende ROC-Kurve:

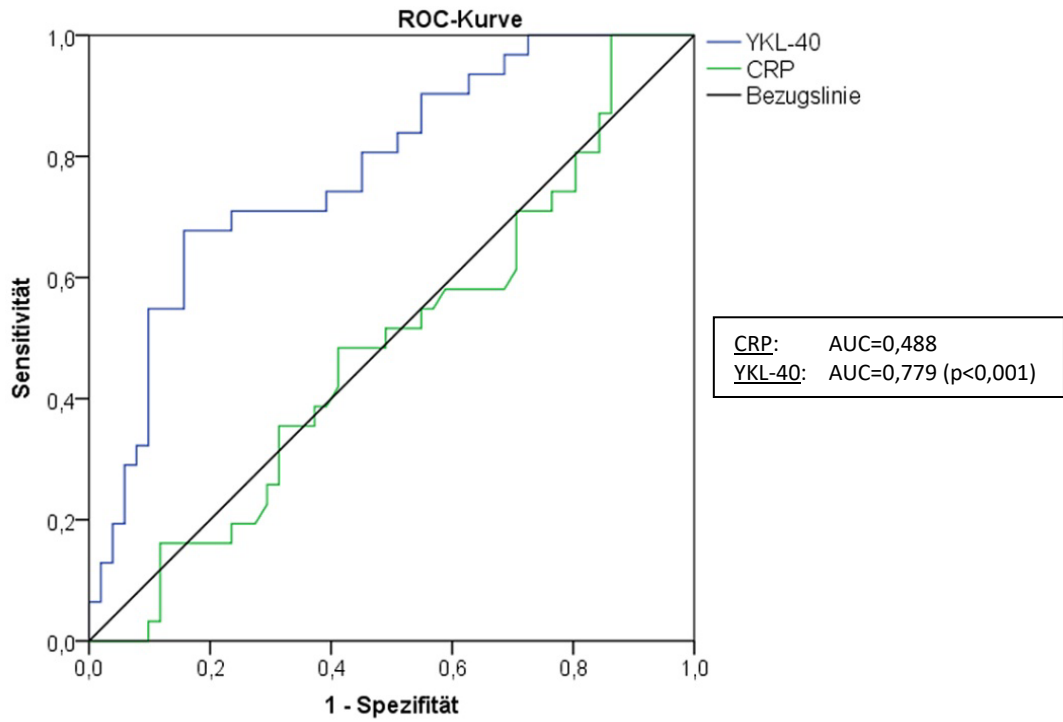


Abbildung 20: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer Lungenentzündung in einem Kollektiv aus akuten entzündlichen Erkrankungen (positiv: n=31; negativ: n=51).

Mit einer AUC von 0,488 unterscheidet sich das CRP nicht von der Bezugsgeraden. Das YKL-40 liegt deutlich über dieser, was im AUC-Wert mit 0,779 zum Ausdruck kommt. Das Ergebnis war für YKL-40 statistisch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass YKL-40 bei vielen Patienten mit vorliegender Lungenerkrankung erhöht im Serum messbar ist. Für das CRP lässt sich eine Kumulation von Patienten mit Lungenerkrankungen bei hohen Serumkonzentrationen nicht so deutlich erkennen. Dementsprechend kann in der ROC-Kurven-Analyse für Lungenerkrankungen auch ein größerer Wert der AUC für YKL-40 (YKL-40: 0,804; CRP: 0,702) nachgewiesen werden. In einem Kollektiv aus entzündlichen Erkrankungen ergibt sich in der ROC-Analyse ein Wert von 0,488 für CRP und ein Wert von 0,779 für YKL-40. Somit erscheint es möglich, dass YKL-40 bei vorhandenen Entzündungszeichen mit Hilfe eines entsprechend festgelegten Schwellenwerts, sowie in Zusammenschau mit anderen klinischen bzw. laborchemischen Befunden in der Lage sein könnte, eine (Mit-)Beteiligung der Lunge am Entzündungsgeschehen anzuzeigen, respektive auszuschließen. Diese Theorie sollte im

Rahmen der angeschlossenen prospektiven Studie (Kapitel 4.3) nochmals exakter validiert werden.

4.2.7. Vergleiche mit PCT

Die bisherigen Kapitel dienen dem Vergleich von YKL-40 und CRP. Jedoch gibt es in der klinischen Routine auch andere wichtige humorale Entzündungsmarker. Einen hohen Stellenwert hat das PCT, welches in der Einleitung (Kapitel 1.1) bereits vorgestellt wurde. Da auch das PCT oft in der klinischen Routine zum Einsatz kommt (Assicot et al. 1993; Gendrel & Bohuon 1997; Gendrel et al. 1999) wäre ein Vergleich mit YKL-40 interessant. Dieses Kapitel soll einige vergleichende Aspekte zwischen diesen Markern liefern, wobei das CRP mit berücksichtigt wird. Wie bereits im Abschnitt „Patientenkollektiv der explorativen Studie“ (Kapitel 3.1.8) beschrieben, lag der PCT-Wert nicht für alle verwendeten Patientenproben vor, es konnten lediglich für 45 Patienten Werte erhoben werden. Daher sind hier keine genauen Analysen möglich und alle Ergebnisse lediglich als hinweisgebend aufzufassen. Die Sensitivitätsanalysen sind erneut nach den bereits in Kapitel 4.2.3 bis 4.2.6 verwendeten Kategorien vorgenommen worden. Tabelle 15 fasst die AUC-Werte von CRP, PCT und YKL-40 für die einzelnen Krankheitsgruppen zusammen. Aufgrund der geringen Fallzahl erscheint die graphische Auswertung der ROC-Kurven aller Gruppen in dieser Arbeit nicht sinnvoll. Lediglich die für diese Arbeit relevantesten Krankheitsgruppen der akuten Entzündung sowie der Lungenerkrankungen sollen genauer betrachtet werden. Zu beachten ist die fehlende statistische Signifikanz für die AUC-Werte von CRP und PCT in diesen Analysen. Diese war lediglich bei Betrachtung der akuten Entzündungen gegeben.

Tabelle 15: AUC-Werte der ROC-Analysen für CRP, PCT und YKL-40 in verschiedenen Krankheitsgruppen.

Krankheitsgruppe	AUC (CRP)	AUC (PCT)	AUC (YKL-40)
Lebererkrankung	0,399	0,313	0,535
Maligne Erkrankung	0,567	0,500	0,481
Akute Entzündung	0,743 (p=0,009)	0,706 (p=0,027)	0,754 (p=0,006)
Lungenerkrankung	0,438	0,551	0,712 (p=0,025)
Akut entzündliche Lungenerkrankung	0,509	0,572	0,729 (p=0,029)
Lungenerkrankung bei Selektion rein entzündlicher Krankheitsbilder	0,337	0,524	0,726 (p=0,048)

Es ergaben sich für hepatische und maligne Erkrankungen AUC-Werte nahe der Bezugsgeraden mit Werten von 0,31 bis 0,57. Die AUC-Werte für akute Entzündungen liegen für alle drei Marker dagegen deutlich darüber (Abbildung 21).

Ergebnisse

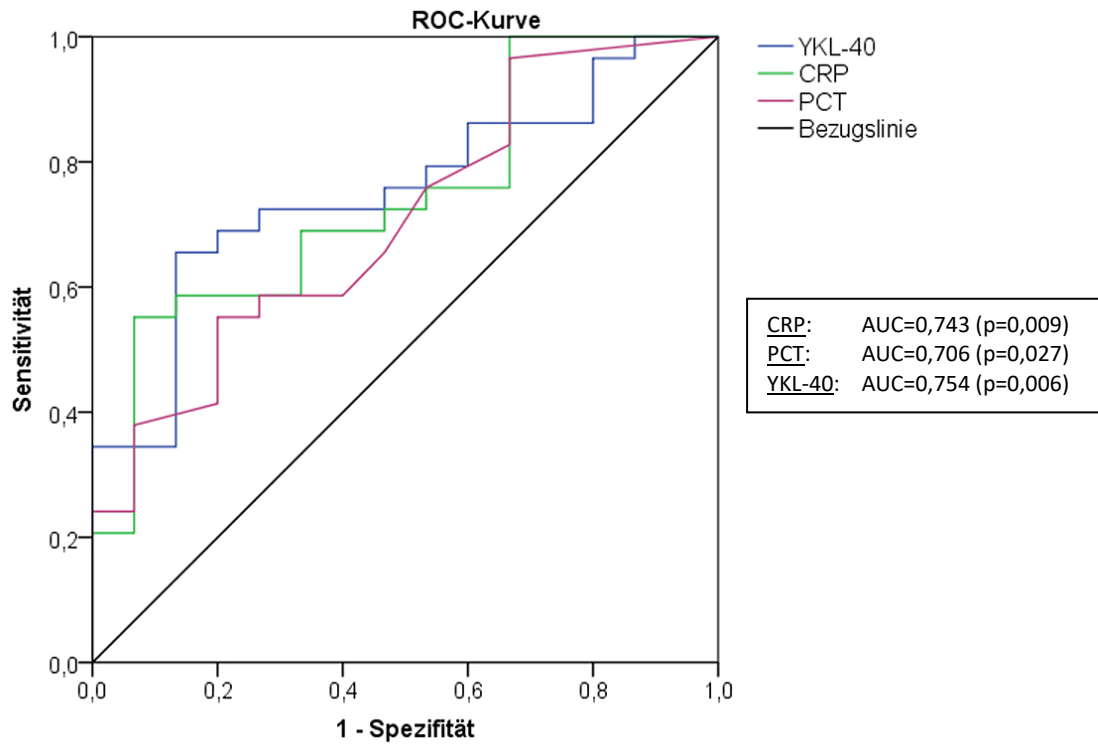


Abbildung 21: ROC-Kurve für YKL-40 (blau), CRP (grün) sowie PCT (rosa) bei Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion (positiv: n=29; negativ: n=15).

Auffällig wird in dieser Grafik, dass alle drei Kurven einen vergleichbaren Verlauf zeigen. Dies ist auch aus den ähnlichen AUC-Werten ersichtlich. Die Ergebnisse für diese Gruppe sind für alle drei Marker statistisch signifikant.

Ergebnisse

Nachfolgende Abbildung 22 zeigt die ROC-Kurven-Analyse für Lungenerkrankungen, bei Auswertung des Klinikkollektivs:

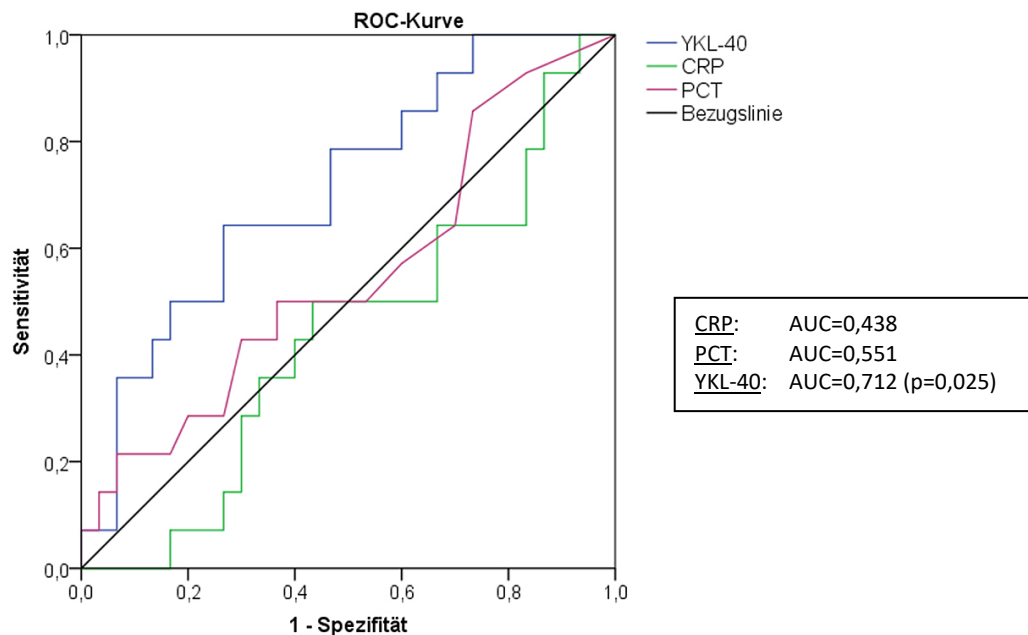


Abbildung 22: ROC-Kurve für YKL-40 (blau), CRP (grün) sowie PCT (rosa) bei Vorliegen einer Lungenerkrankung (positiv: n=14; negativ: n=30).

CRP und PCT heben sich hierbei nicht von der Bezugsgeraden ab, während YKL-40 oberhalb davon verläuft. Somit konnte in dieser Analyse - trotz der niedrigeren Probenzahl und der damit einhergehenden Unschärfe der Auswertung - ein ähnlicher Verlauf wie bei Betrachtung des gesamten Kollektivs gezeigt werden (Kapitel 4.2.6).

Tabelle 15 zeigt zusätzlich die AUC-Werte für rein entzündliche Lungenerkrankungen. Hier ergeben sich - ebenfalls wie bei Betrachtung des gesamten Kollektivs - nur minimale Änderungen. Auch die Werte für das veränderte Kollektiv aus rein entzündlichen Erkrankungen entsprechen im Wesentlichen den - statistisch genaueren - Ergebnissen bei Auswertung ohne Berücksichtigung des PCT.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Ergebnisse für PCT tendenziell denen des CRP entsprechen. Unterschiede zwischen YKL-40 und CRP, die bereits bei Betrachtung des Gesamtkollektivs gefunden wurden, werden auch in dieser kleineren Stichprobe unter Berücksichtigung des PCT abgebildet.

4.2.8. Ergebnisse der Verlaufsmessungen

Wie im Abschnitt „Patientenkollektiv der explorativen Studie“ (Kapitel 3.1.8) bereits beschrieben, wurde von acht Patienten mehrfach Probenmaterial gesammelt, um Hinweise auf den Verlauf der Markerkonzentrationen zu erhalten und eventuell vergleichende

Ergebnisse

Aussagen treffen zu können. Hierbei konnte zumeist auch das PCT zusätzlich zu CRP und YKL-40 mit in die Auswertung einbezogen werden.

Insgesamt zeigten die drei Marker bei den Patienten meist gleichförmige und gleich gerichtete Bewegungen (Anstieg bzw. Abfall), es konnte kein generelles Muster im Verlauf der einzelnen Marker festgestellt werden.

In Bezug auf YKL-40 fanden sich aber einige interessante Aspekte, die Hinweise auf mögliche Vorteile dieses Proteins in bestimmten Situationen geben könnten. Im Folgenden sollen exemplarisch einige dieser Aspekte dargestellt werden. Eine Interpretation der Beobachtungen folgt im Rahmen der Diskussion (Kapitel 5.4).

Patient 1:

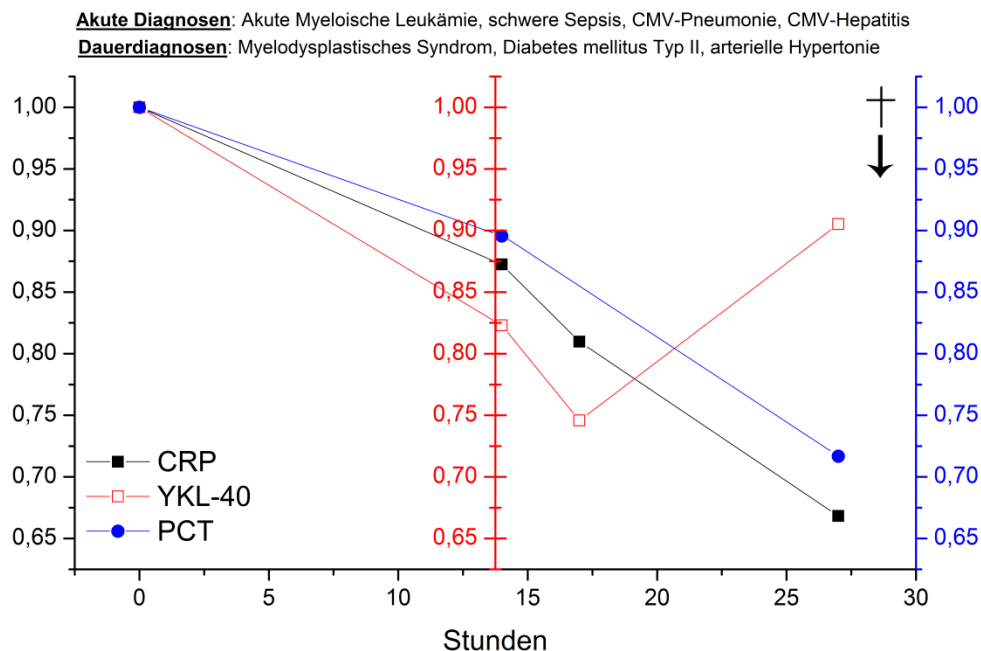


Abbildung 23: Patient 1: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau). Fehlende Punkte bedeuten, dass zu diesem Abnahmezeitpunkt der entsprechende Wert nicht erhoben wurde. Die Absolutwerte wurden auf die jeweiligen Maximalwerte normalisiert, um in den entsprechenden y-Achsen die relative Änderung darstellen zu können und somit eine bessere visuelle Vergleichbarkeit zu erzielen. Der entsprechende Maximalwert lag für CRP bei 43,1 mg/dL, für YKL-40 bei 19.114,02 ng/mL und für PCT bei 148,3 ng/mL. Auf der x-Achse ist der Zeitverlauf in Stunden ausgehend von der ersten gesammelten Probe angegeben. Über der Grafik sind die Diagnosen des Patienten unterteilt nach akuten Pathologien und Dauerdiagnosen aufgrund chronischer Leiden angegeben. Das Kreuz kennzeichnet den Todeszeitpunkt des Patienten.

Die Diagnosen von Patient 1, wie sie in Abbildung 23 aufgeführt sind, machen deutlich, dass es sich um einen sehr schwer kranken Patienten handelte, der kurz nach der letzten Blutentnahme verstorben ist. Alle drei Marker waren deutlich über die Norm erhöht, das YKL-40 zeigte hier mit einem Maximalwert von 19.114,02 ng/mL sogar die höchste in dieser Arbeit gemessene Serumkonzentration. Auch das PCT war mit einem Maximalwert von 148,3 ng/mL extrem erhöht. Der Patient wurde zum Abnahmezeitpunkt aller hier

Ergebnisse

berücksichtigten Blutproben bereits therapiert. Abbildung 23 zeigt den Verlauf der drei Marker. Es ist - wie zuvor beschrieben - erkennbar, dass alle drei Marker bis 14 Stunden nach der ersten Blutprobe ähnlich stark abfallen. Nach Stunde 17 fällt das CRP weiter ab und erreicht wie auch das PCT seinen kleinsten Wert in Stunde 27. YKL-40 hingegen steigt ab Stunde 17 erneut an und erreicht in Stunde 27 wieder 90% des Ausgangswertes.

Patient 2:

Akute Diagnosen: Herzstillstand mit erfolgreicher Reanimation, Dekubitalgeschwüre °1 und °2
Dauerdiagnosen: Diabetes mellitus Typ II, diabetische Polyneuropathie, Atherosklerose, chronische Nierenerkrankung

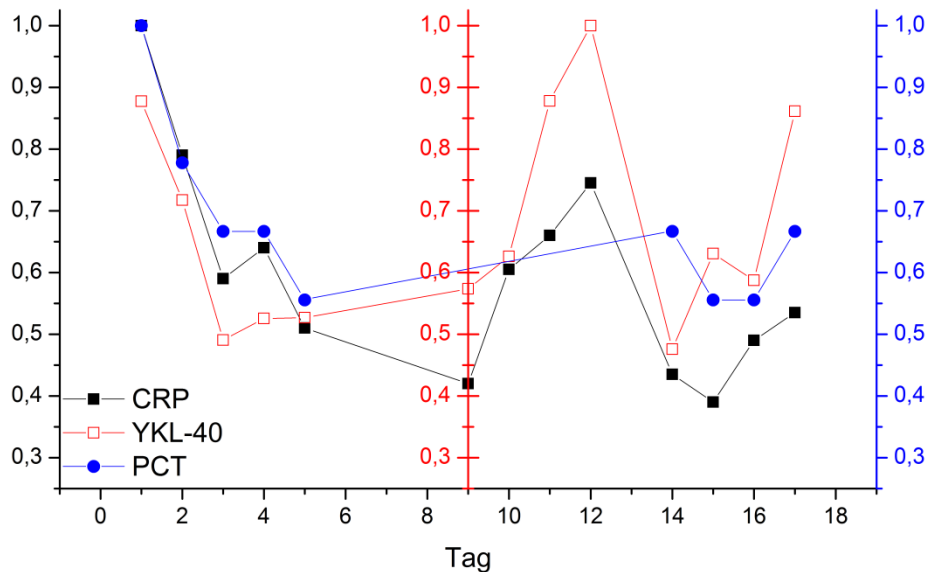


Abbildung 24: Patient 2: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau). Fehlende Punkte bedeuten, dass zu diesem Abnahmezeitpunkt der entsprechende Wert nicht erhoben wurde. Die Absolutwerte wurden auf die jeweiligen Maximalwerte normalisiert, um in den entsprechenden y-Achsen die relative Änderung darstellen zu können und somit eine bessere visuelle Vergleichbarkeit zu erzielen. Der entsprechende Maximalwert lag für CRP bei 20,0 mg/dL, für YKL-40 bei 916,5 ng/mL und für PCT bei 0,9 ng/mL. Auf der x-Achse ist der Zeitverlauf in Tagen ausgehend von der ersten gesammelten Probe angegeben. Über der Grafik sind die Diagnosen des Patienten unterteilt nach akuten Pathologien und Dauerdiagnosen aufgrund chronischer Leiden angegeben.

Patient 2 litt nicht an einem akuten Entzündungsgeschehen. Dennoch sind vor allem CRP und YKL-40 mit Maximalwerten von 20 mg/dL beziehungsweise 916,5 ng/mL deutlich über die Norm erhöht. Bei Betrachtung von Abbildung 24 ist ersichtlich, dass alle drei Marker bei diesem Patienten zumeist etwa gleich geartete Verläufe zeigen. Zunächst fallen alle drei Marker ab, von Tag 3 bis 4 findet sich eine kurze Stagnation des Abfalls, bevor daraufhin die Werte an Tag 5 weiter abfallen. Diese Bewegungen werden von allen drei Markern in nahezu gleicher Art und Weise ausgeführt. Bei genauerer Betrachtung ist aber interessant, dass CRP bis Tag 9 weiter abfällt und erst danach in den Peak an Tag 12 ansteigt. YKL-40 beginnt dagegen schon ab Tag 5 wieder anzusteigen und hat ebenfalls an Tag 12 einen Peak. Ähnliches gilt für den Verlauf ab Tag 14. Hier fällt das CRP zunächst ebenfalls noch ab, YKL-40 beginnt dagegen schon ab diesem Zeitpunkt erneut anzusteigen. Das CRP

Ergebnisse

reagiert wiederum einen Tag später. Das PCT beginnt sogar erst ab Tag 16 mit dem Wiederanstieg und damit erst zwei Tage nach YKL-40. Bei beiden Peaks steigt YKL-40 auch relativ gesehen am stärksten an.

Patient 3:

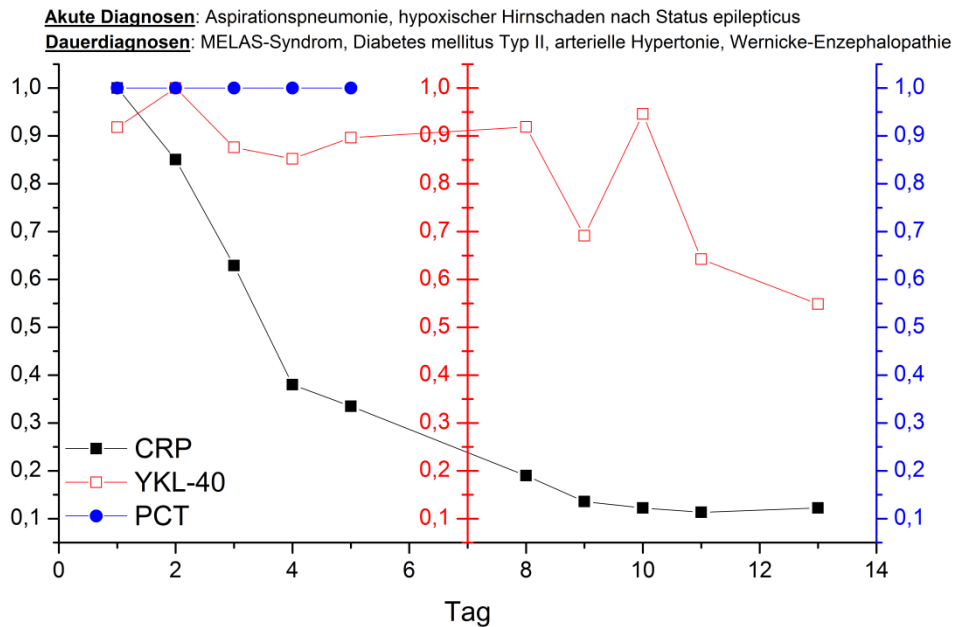


Abbildung 25: Patient 3: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau). Fehlende Punkte bedeuten, dass zu diesem Abnahmezeitpunkt der entsprechende Wert nicht erhoben wurde. Die Absolutwerte wurden auf die jeweiligen Maximalwerte normalisiert, um in den entsprechenden y-Achsen die relative Änderung darstellen zu können und somit eine bessere visuelle Vergleichbarkeit zu erzielen. Der entsprechende Maximalwert lag für CRP bei 22,1 mg/dL, für YKL-40 bei 454,8 ng/mL und für PCT bei 0,2 ng/mL. Auf der x-Achse ist der Zeitverlauf in Tagen ausgehend von der ersten gesammelten Probe angegeben. Über der Grafik sind die Diagnosen des Patienten unterteilt nach akuten Pathologien und Dauerdiagnosen aufgrund chronischer Leiden angegeben.

Patient 3 litt an einer Aspirationspneumonie. YKL-40 ist mit einem Maximum von 454,8 ng/mL etwa 18-fach über die Norm erhöht, aber auch CRP ist mit einem Maximum von 22,1 mg/dL zunächst deutlich erhöht. Das PCT ist bei diesem Patienten mit 0,2 ng/mL nur marginal erhöht und zeigt über den zeitlichen Verlauf keine Veränderung und ist damit nicht geeignet um eine Verlaufsaussage zu treffen. Interessanterweise sinkt das CRP von Anfang an kontinuierlich ab, wohingegen YKL-40 fast auf Ausgangsniveau verbleibt und erst gegen Ende der Messreihe, ab Tag 10, langsam absinkt. In diesem Fall gab es also einen deutlich unterschiedlichen Verlauf der beiden Proteine.

Ergebnisse

Patient 4:

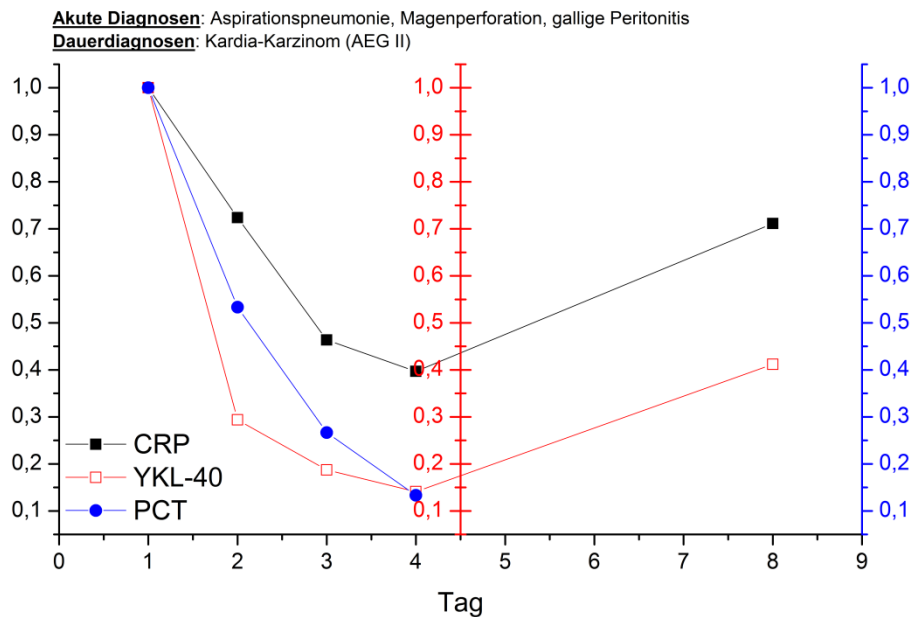


Abbildung 26: Patient 4: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau). Fehlende Punkte bedeuten, dass zu diesem Abnahmezeitpunkt der entsprechende Wert nicht erhoben wurde. Die Absolutwerte wurden auf die jeweiligen Maximalwerte normalisiert, um in den entsprechenden y-Achsen die relative Änderung darstellen zu können und somit eine bessere visuelle Vergleichbarkeit zu erzielen. Der entsprechende Maximalwert lag für CRP bei 31,5 mg/dL, für YKL-40 bei 5101,1 ng/mL und für PCT bei 7,5 ng/mL. Auf der x-Achse ist der Zeitverlauf in Tagen ausgehend von der ersten gesammelten Probe angegeben. Über der Grafik sind die Diagnosen des Patienten unterteilt nach akuten Pathologien und Dauerdiagnosen aufgrund chronischer Leiden angegeben.

Auch Patient 4 litt an einer Aspirationspneumonie sowie einer galligen Peritonitis nach Magenperforation. Das CRP war mit einem Ausgangswert von 31,5 mg/dL mehr als 60-fach über die Referenzwertobergrenze von 0,5 mg/dL erhöht. YKL-40 war mit einem Ausgangswert von 5.101,1 ng/mL sogar mehr als 200x über den Referenzwert von etwa 25 ng/mL erhöht. Dieser Patient unterstreicht nochmals die zuvor getroffene Aussage eines in großen Teilen identischen Verlaufs der drei Marker. Alle drei zeigen in diesem Beispiel initial einen deutlichen Abfall der Serumkonzentration bis Tag 4, daraufhin steigen CRP und YKL-40 bis Tag 8 parallel wieder an. Zu beachten ist, dass die Kurve für YKL-40 in Abbildung 26 zwar unter der des CRP liegt, die Erhöhung über den Referenzwert aber bei YKL-40 ausgeprägter ist, was aus der Graphik so nicht ersichtlich ist.

4.3. Ergebnisse der prospektiven Studie

4.3.1. Auswertung der Messdaten

In der prospektiven Studie sollte das vielversprechendste Ergebnis der explorativen Erststudie nochmals exakter an einem neuen Patientenkollektiv validiert werden. Das Ergebnis, welches nun für diese Studie ausgewählt wurde, war der mögliche Vorteil von YKL-40 in der Detektion entzündlicher pulmonaler Prozesse in einem Kollektiv aus entzündlichen Erkrankungen. Es wurde überprüft, ob YKL-40 in der Lage ist, bei Vorhandensein von entzündlichen Erkrankungen oder unspezifischen Entzündungszeichen eine pulmonale (Mit-)Beteiligung anzuzeigen. Für die Studie wurde das in Kapitel 3.1.9 beschriebene Patientenkollektiv verwendet.

Nachfolgende Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Serumkonzentrationen von YKL-40 und CRP für die Untersuchungs- und Kontrollgruppe, sowie das gesunde Vergleichskollektiv. Als Untersuchungsgruppe wurden diejenigen Patienten mit einer radiologisch bestätigten Pneumonie bezeichnet, während die Kontrollgruppe von Patienten mit anderweitigen Entzündungsformen außer Pneumonien gebildet wurde (vgl. Kapitel 3.1.9).

Tabelle 16: Übersicht der Serumkonzentrationen von YKL-40 und CRP in den drei Untersuchungskategorien (n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; Max.=Maximum; Min.=Minimum; p-Wert U/K=Untersuchungsgruppe bezogen auf Kontrollgruppe; p-Wert x/G= Gruppe bezogen auf Gesunde).

		n	MW	Median	SD	Max.	Min.	p-Wert U/K	p-Wert x/G
YKL-40 [ng/mL]	Untersuchungsgruppe	28	405,6	243,1	427,0	1666,2	57,4	0,003	<0,001
	Kontrollgruppe	30	213,4	96,6	303,4	1439,2	17,6	-	<0,001
	Gesunde	100	27,8	24,8	14,1	76,9	6,4	-	-
CRP [mg/dL]	Untersuchungsgruppe	28	13,2	9,7	11,4	43,2	0,2	0,858	<0,001
	Kontrollgruppe	30	11,6	10,4	8,5	36,7	1,7	-	<0,001
	Gesunde	100	0,2	0,1	0,3	2,4	0,0	-	-

Es zeigt sich, dass das YKL-40 mit einem medianen Wert von 243,1 ng/mL in der Untersuchungsgruppe am höchsten war. Die mediane Serumkonzentration in der Kontrollgruppe betrug nur ca. 40% dieses Werts, während die Gruppe der Gesunden normale Serumkonzentrationen aufwies. Sowohl in der Untersuchungs- als auch in der Kontrollgruppe gab es jedoch eine hohe Spannweite in der Verteilung der Serumkonzentrationen, erkennbar am weit auseinander liegenden Maximum und Minimum, sowie der hohen Standardabweichung. Während das Minimum in der Kontrollgruppe im sehr niedrigen Bereich liegt (17,6 ng/mL), ist der minimale Wert in der Untersuchungsgruppe mit

Ergebnisse

57,4 ng/mL noch etwa 3x höher gelegen. Die maximal gemessene Serumkonzentration ist in beiden Gruppen vergleichbar.

Für das CRP ergaben sich in der Gruppe der Gesunden normale Serumkonzentrationen mit geringer Standardabweichung. In der Untersuchungs- wie auch der Kontrollgruppe zeigten sich mit 9,7 bzw. 10,4 mg/dL erhöhte Konzentrationen. Jedoch konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Auch die Spannweite war in beiden Gruppen vergleichbar (Abbildung 27).

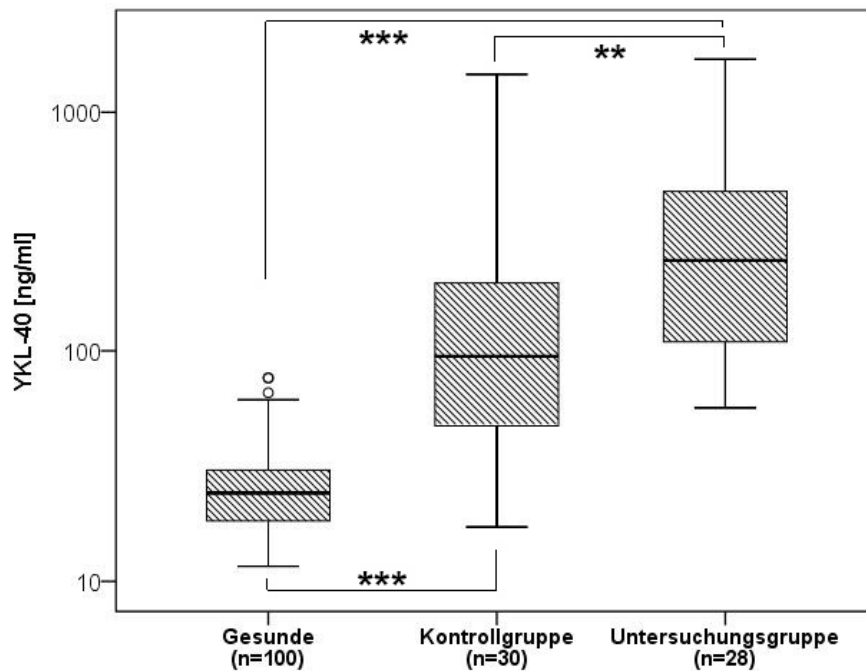


Abbildung 27: Verteilung der YKL-40-Serumkonzentrationen in den drei untersuchten Proben-Kategorien. Y-Achse logarithmisch. Die schwarzen Kreise kennzeichnen nahe Ausreißer. (n (gesamt) = 158).

Wie bereits beschrieben sind die YKL-40-Serumkonzentrationen in der Untersuchungsgruppe am höchsten. Erkennbar wird, dass der Median in der Untersuchungsgruppe höher als das 75%-Quantil der Kontrollgruppe liegt. Zudem zeigt sich, dass YKL-40 in beiden Erkrankungsgruppen zum überwiegenden Anteil höhere Werte aufweist als im gesunden Kollektiv.

Um nun die Ausgangsfrage dieser Studie zu klären, ob das YKL-40 in diesem Kollektiv aus inflammatorischen Erkrankungen besser als CRP geeignet ist pulmonal lokalisierte Entzündungsprozesse anzuzeigen, wurde eine ROC-Kurven-Analyse durchgeführt:

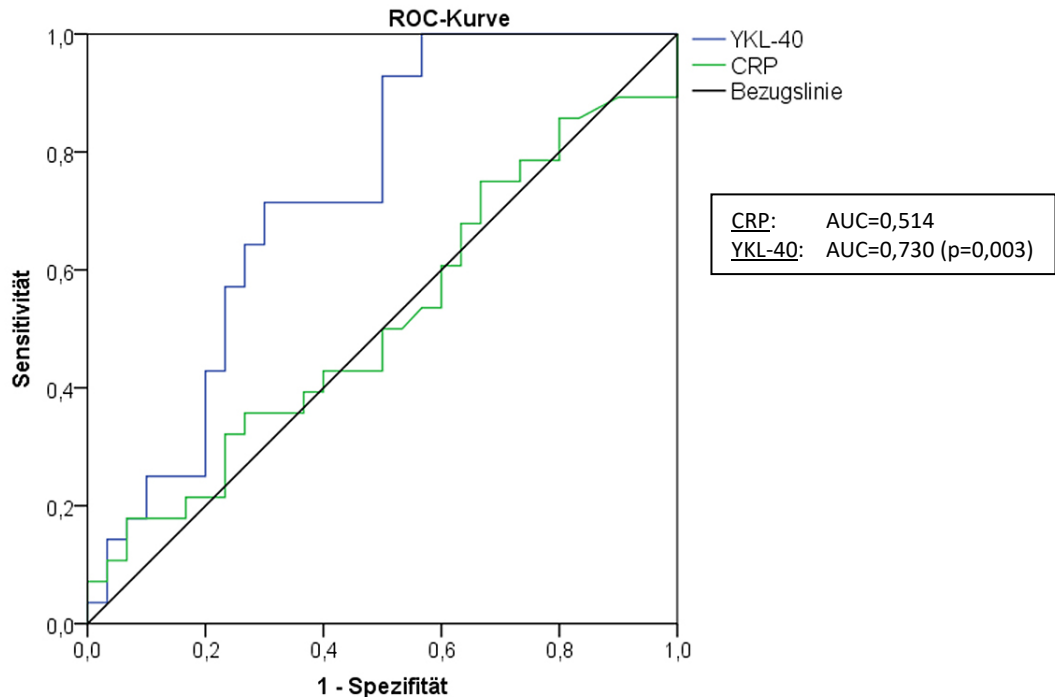


Abbildung 28: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) für die Untersuchungsgruppe (Pneumonien).

Wie in Abbildung 28 ersichtlich, verläuft die ROC-Kurve von CRP entlang der Bezugsgeraden (AUC 0,514). Die ROC-Kurve von YKL-40 verläuft im Gegensatz dazu oberhalb der Bezugsgeraden und weist eine AUC von 0,730 auf. Dieses Ergebnis ist für YKL-40 statistisch signifikant ($p=0,003$).

4.4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte der klinische Nutzen des Proteins YKL-40 evaluiert werden. Zunächst wurde an Serumproben gesunder Blutspender ein Referenzbereich der YKL-40-Serumkonzentration von 11,8 - 71,3 ng/mL (2,5 - 97,5%) bei einem Median von 24,8 ng/mL ermittelt. Anschließend wurde in einer ersten orientierenden Studie für verschiedene Krankheitsgruppen untersucht, ob YKL-40 im Falle erhöhter Serumkonzentrationen in der Lage sein könnte, Erkrankungen der jeweiligen Gruppen anzuzeigen. Zugleich wurden die Ergebnisse mit bereits etablierten Labormarkern wie CRP und - mit Abstrichen - PCT verglichen. Analysen der Mittelwerte und Mediane zeigten vor allem für akute Entzündungsreaktionen erhöhte Serumkonzentrationen aller untersuchten Marker. YKL-40 scheint zudem bei Lungenerkrankungen in den meisten Fällen erhöht zu sein. Die diagnostische Wertigkeit wurde mittels ROC-Kurven-Analysen untersucht. Die dabei berechneten AUC-Werte dienen als Hinweis auf die diagnostische Güte der Labormarker hinsichtlich der Detektion von Erkrankungen der verschiedenen Gruppen. Die höchsten

Ergebnisse

AUC-Werte ergaben sich für CRP und YKL-40 hinsichtlich entzündlicher und pulmonaler Erkrankungen. Ein nennenswerter Unterschied in den AUC-Werten konnte bei Betrachtung eines rein entzündlichen Kollektivs gefunden werden, wenn man dabei die Wertigkeit bezüglich der Selektion pulmonaler Entzündungsprozesse aus diesem Kollektiv untersuchte. Hierbei ergab sich für das CRP mit 0,488 ein AUC-Wert nahe der Bezugsgeraden, während YKL-40 eine AUC von 0,779 aufwies. Vergleiche mit PCT waren nicht für alle Proben möglich und konnten lediglich als hinweisgebend gelten. Die Ergebnisse für PCT waren ähnlich den Ergebnissen von CRP.

In einer angeschlossenen prospektiven Zweitstudie wurde an einem neuen Patientenkollektiv nochmals die Beobachtung der explorativen Studie validiert, dass YKL-40 im Vergleich zu CRP in einem Kollektiv aus rein inflammatorischen Erkrankungen selektiv pulmonale Entzündungsprozesse anzeigen könnte. ROC-Kurven-Analysen erbrachten hierbei mit einer AUC von 0,730 für YKL-40 sowie von 0,514 für CRP ähnliche Ergebnisse wie die zuvor durchgeführte explorative Studie. Die Beobachtungen der explorativen Erststudie konnten demnach bestätigt werden.

5. Diskussion

5.1. Fragestellung

YKL-40 ist ein ca. 40 kDa großes Glykoprotein, das von verschiedensten Zelltypen gebildet und ins Blut sezerniert wird. Dazu zählen unter anderem Makrophagen, neutrophile Granulozyten, glatte Muskelzellen und Osteoblasten. YKL-40 wird vorwiegend während entzündlicher Aktivität und/oder im Rahmen von Gewebeumbauvorgängen sezerniert (Johansen 2006).

Ziel dieser Arbeit war es aufgrund dieser Beobachtungen die Eignung von YKL-40 als Serum-Biomarker für verschiedenste Krankheitsbilder zu untersuchen. Es wurden vier große Gruppen untersucht: hepatische Erkrankungen, pulmonale Erkrankungen, inflammatorische Erkrankungen sowie maligne Erkrankungen.

Es sollte versucht werden, folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist YKL-40 in der Lage, pathologische Prozesse in den Organen Leber oder Lunge anzuzeigen?
2. Stellt YKL-40 einen allgemeinen Tumormarker dar?
3. Stellt YKL-40 einen Entzündungsmarker dar?
4. Wie verhält sich YKL-40 im Vergleich zu bereits etablierten Labormarkern wie CRP und PCT?

Diese Fragen wurden mittels der in Kapitel 3 vorgestellten Methoden untersucht und erzielten die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse. Die Diskussion versucht nun die Ergebnisse im Hinblick auf oben genannte Fragen zu interpretieren und in den aktuellen Stand der Forschung einzuordnen.

5.2. YKL-40 als Biomarker

5.2.1. Referenzwerte bei gesunden Personen

Um die Werte bei kranken Patienten einordnen zu können, wurde zunächst versucht Referenzwerte der Serumkonzentration von YKL-40 für gesunde Personen zu bestimmen. Eine dänische Arbeitsgruppe um Bojesen et al. hat 2011 eine Studie mit 3130 freiwilligen gesunden Blutspendern durchgeführt. Als Ergebnis dieser Studie wurde eine mediane YKL-40-Serumkonzentration von 40 ng/mL (2,5-97,5% Referenzbereich: 14 - 155 ng/mL) angegeben (Bojesen et al. 2011). Eine weitere Arbeitsgruppe um Kim et al. erzielte in einer

Studie mit 73 Probanden einen Referenzbereich der YKL-40-Serumkonzentration von 14 - 58 ng/mL bei einem Median von 28 ng/mL (Kim et al. 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 100 freiwillige Blutspender des Bayerischen Roten Kreuzes untersucht. Dabei wurde ein Referenzbereich der YKL-40-Serumkonzentration von 11,8 - 71,3 ng/mL (2,5 - 97,5%) bei einem Median von 24,8 ng/mL gefunden. Diese Werte stimmen gut mit den Werten der Studie von Kim et al. überein. Die Studie von Bojesen et al. erzielte dagegen für den Median und die obere Referenzwertgrenze etwas höhere Werte. Ursächlich hierfür könnte beispielsweise sein, dass die Arbeitsgruppe um Bojesen et al. ein anderes ELISA-System zur Messung der YKL-40-Serumkonzentrationen nutzte.

Zudem bleibt zu berücksichtigen, dass YKL-40 mit dem Alter ansteigen könnte. Die Studie von Bojesen et al. zeigte einen exponentiellen Anstieg mit zunehmendem Alter (Bojesen et al. 2011). Dem gegenüber steht jedoch eine Studie von Harvey et al., die keinen Anstieg in höherem Alter feststellen konnten (Harvey et al. 1998).

Darüber hinaus gibt es genetische Varianten des *CHI3L1*-Gens, welche mit erhöhter oder verminderter basaler YKL-40-Sekretion einhergehen. Diese Varianten könnten einen möglichen Grund für die hohe Spannweite des Referenzbereichs von YKL-40 im Serum darstellen (Ober et al. 2008).

Gegebenenfalls müssen also das Alter sowie mögliche genetische Varianten bei der Interpretation von YKL-40-Konzentrationen im Serum berücksichtigt werden. Hierfür wären jedoch weitere Studien zur Bestätigung des Einflusses dieser Faktoren notwendig.

5.2.2. Der mögliche Nutzen von YKL-40 in der Diagnostik

Wie bereits mehrfach erwähnt, gibt es Hinweise darauf, dass YKL-40 in der klinischen Diagnostik von Nutzen sein könnte. In dieser Arbeit wurde die Eignung von YKL-40 als Biomarker für verschiedene Krankheitsgruppen untersucht. Die Ergebnisse wurden bereits in Kapitel 4 dargestellt und werden nachfolgend diskutiert und bewertet.

5.2.2.1. Lebererkrankungen

YKL-40 wird in normalen Leberzellen nicht exprimiert (Hu et al. 1996; Johansen et al. 1997). Eine Arbeitsgruppe um Hakala et al. konnte 1993 zwar mRNA-Expression in menschlichen Leberzellen nachweisen (Hakala et al. 1993), das untersuchte Gewebe könnte jedoch aus fibrotisch verändertem Lebergewebe stammen (Johansen 2006). Dass YKL-40 in Leberarealen mit nachweisbarer Fibrose exprimiert wird, konnte bereits gezeigt werden (Johansen et al. 1997; Johansen et al. 2000). Außerdem wurde die YKL-40-Expression für

Leberzellen gezeigt, die mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert waren (Shackel et al. 2003). Bei derartigen Patienten fand sich die YKL-40-Expression vorwiegend in Arealen mit vorhandenen Mottenfraßnekrosen (Johansen et al. 2000).

Aus diesen Hinweisen ergab sich die Vermutung, YKL-40 könnte ein genereller Marker für pathologisch verändertes Lebergewebe sein, zumal es von gesundem Lebergewebe - wie gerade angesprochen - nicht gebildet wird. Diese Vermutung sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Kapitel 4.2.3 zeigte die eingeschlossenen Diagnosen und die Ergebnisse für die Untersuchung der Lebererkrankungen. Auffällig war ein im Vergleich zu Patienten mit anderweitigen Erkrankungen ohne hepatische Beteiligung annähernd verdoppelter Wert der medianen YKL-40-Konzentration. Die Spannweite der Werte war jedoch annähernd gleich und es gab für beide Gruppen Werte im Referenzbereich. Die maximalen Werte lagen für beide Gruppen über 10.000 ng/mL, was vermutlich durch akute Begleiterkrankungen zu erklären ist. Nicht alle Patienten mit pathologischen Prozessen in der Leber hatten eine isolierte Lebererkrankung.

Eine ROC-Kurven-Analyse ergab eine AUC von 0,658 für YKL-40 bzw. von 0,672 für CRP. Beide Proteine scheinen also nahezu identische Aussagen zu liefern, wobei der Unterschied zur Bezugsgeraden (AUC=0,5) sehr gering ausfällt. Dementsprechend scheint YKL-40 ebenso wie das CRP nicht geeignet, Hepatopathien in einem Kollektiv kranker Klinikpatienten anzuzeigen. Es bleibt anzumerken, dass in dieser Arbeit die allgemeine Eignung von YKL-40 pathologische Prozesse in verschiedenen Organsystemen anzuzeigen, untersucht wurde, unabhängig von genauen Entitäten. Weitere Studien mit entsprechenden Patientenkollektiven könnten eventuell Aufschluss über eine dennoch vorhandene Wertigkeit für spezifische hepatische Krankheitsbilder geben. Beispielsweise ist YKL-40 - wie oben erwähnt - in fibrotischen Leberarealen nachzuweisen (Johansen et al. 1997; Johansen et al. 2000). Gegebenenfalls wäre daher eine Untersuchung interessant, ob die Höhe des YKL-40 im Serum den Fortschritt bzw. den Grad einer Leberfibrose widerspiegeln könnte. Auch auf die mögliche Bedeutung für die Hepatitis C wurde anfangs bereits hingewiesen.

5.2.2.2. Maligne Erkrankungen

YKL-40 steht in Zusammenhang mit der Proliferation, der Differenzierung, dem Überleben und der Invasivität von malignen Zellen. Diese Wirkungen werden durch eine Reihe verschiedener Interaktionen von YKL-40 mit dem peritumoralen Stroma und verschiedenen Zellen, die ebenfalls an diesen Vorgängen beteiligt sind, erzielt (Dvorak 1986; Basset et al. 1990; Grégoire & Lieubeau 1995; Rønnov-Jessen et al. 1996; Bissell & Radisky 2001; Kenny

& Bissell 2003; Johansen 2006). Aus diesen Beobachtungen konnte die Vermutung abgeleitet werden, dass YKL-40 einen Tumormarker darstellen könnte (Johansen 2006). Tatsächlich wurde schon bei vielen unterschiedlichen Tumorentitäten ein erhöhtes YKL-40 im Serum gefunden und es ist dabei oftmals mit einer schlechten Prognose assoziiert. Beispiele dafür wurden bereits in der Einleitung (Kapitel 1.3.2) erwähnt.

Im Gegensatz zu diesen Studien, die YKL-40 im Hinblick auf spezifische Tumorentitäten getestet haben, sollte in der vorliegenden Arbeit die Eignung als allgemeiner Tumormarker untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob ein hohes YKL-40 im Serum generell in der Lage wäre ein Tumorgeschehen anzuzeigen. Dafür wurde Serum von Patienten mit unterschiedlichsten Tumorentitäten gesammelt und getestet. Die eingeschlossenen Diagnosen und die Ergebnisse wurden bereits in Kapitel 4.2.4 dargestellt. Auffällig war ein erhöhter Median bei Patienten mit einer malignen Erkrankung (241 ng/mL gegenüber 185 ng/mL bei Patienten ohne maligne Erkrankung). Jedoch war die Standardabweichung in beiden Gruppen sehr hoch (2416 ng/mL bei Patienten mit und 749 ng/mL bei Patienten ohne maligne Erkrankung) und es gab stets Werte im Referenzbereich. Ein deutlicher Unterschied in der Serumkonzentration konnte also nicht festgestellt werden. Die hohen Maximalwerte von bis zu 14.254 ng/mL können vermutlich durch akute Begleiterkrankungen erklärt werden. Die Patienten waren nicht alle primär wegen ihrer malignen Grunderkrankung in Behandlung, sondern oftmals wegen akuter Komplikationen wie bakteriellen Infektionen. Eine genauere Differenzierung der aktuellen Behandlungsursache wäre für zukünftige Studien erstrebenswert. Eine ebenfalls durchgeführte ROC-Kurven-Analyse ergab eine AUC von 0,583 für YKL-40 respektive 0,675 für CRP. Der Unterschied zur Bezugsgeraden mit einer AUC von 0,5 fällt für YKL-40 marginal aus. Der Wert für CRP hebt sich von dieser ab, das Protein scheint jedoch mit einer AUC von $<0,7$ ebenfalls nur bedingt zur Detektion maligner Erkrankungen geeignet zu sein. Eine Eignung von YKL-40 und CRP als allgemeiner Tumormarker kann somit weitgehend ausgeschlossen werden, wobei die fehlende Signifikanz der ROC-Analyse für YKL-40 berücksichtigt werden muss.

YKL-40 wird wie eingangs erläutert von vielen Tumorentitäten vermehrt gebildet, dennoch scheint es nicht als diagnostisch bedeutsamer Tumormarker geeignet zu sein. Ein möglicher Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass YKL-40 auch bei vielen anderen, nicht-malignen Erkrankungen erhöht im Serum messbar ist, beispielweise bei entzündlichen Prozessen (Johansen 2006; Liberos & Iragavarapu-Charyulu 2015). Entzündliche Vorgänge wurden 2011 von Hanahan und Weinberg als elementares Kennzeichen von malignen Tumoren beschrieben (Hanahan & Weinberg 2011). Man kann deshalb vermuten, dass der Ursprung der vermehrten YKL-40-Bildung maligner Tumoren nicht in den Tumoren selbst zu suchen ist, sondern in der begleitenden inflammatorischen Reaktion (Liberos & Iragavarapu-Charyulu 2015). Diese Vermutung wird durch eine aktuelle Studie von Kjaergaard et al. 2015

unterstützt. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein erhöhtes YKL-40 im Serum mit einem erhöhten Risiko, an verschiedenen Tumorentitäten zu erkranken, assoziiert ist. Genetisch bedingte erhöhte YKL-40-Expression ist im Gegensatz dazu nicht mit dem vermehrten Auftreten dieser malignen Tumoren verknüpft. Als Ergebnis wurde die Theorie postuliert, dass YKL-40 nicht für die Krebsentwicklung verantwortlich sein kann, sondern als inflammatorischer Biomarker aufgrund der begleitenden entzündlichen Reaktion bei Tumoren vermehrt gebildet wird. Somit könnte YKL-40 für die Erfolgskontrolle von Tumorthérapien von Nutzen sein, da sich ein Ansprechen der Therapie in einer verringerten entzündlichen Reaktion und einer damit einhergehenden abfallenden YKL-40-Konzentration zeigen könnte. Da entzündliche Vorgänge jedoch selbst ein Risikofaktor für bestimmte Tumoren sind, könnte YKL-40 in diesen Fällen auch das erhöhte Risiko anzeigen (Kjaergaard et al. 2015). In jedem Fall müssen bei der Interpretation der YKL-40-Werte von Tumorpatienten vorhandene Komorbiditäten berücksichtigt werden (Johansen et al. 2009).

Eine Ausnahme zu der Feststellung, YKL-40 könne nicht verantwortlich für die Krebsentwicklung sein, wurde allerdings bereits von Kawada et al. gezeigt: Bei kolorektalen Karzinomen scheint YKL-40 selbst die Proliferation der Krebszellen anzuregen und die Angiogenese zu stimulieren (Kawada et al. 2012).

Auch wenn YKL-40 kein allgemeiner Tumormarker ist, gibt es Hinweise, dass es in Kombination mit anderen Markern von Nutzen für die Tumordiagnostik sein könnte. Eine Arbeitsgruppe um Johansen et al. führte 2015 eine Studie an 4496 Patienten mit kolorektalen Karzinomen durch. YKL-40 hatte in dieser Studie eine größere Aussagekraft hinsichtlich der Vorhersage von kolorektalen Karzinomen, wenn man es zusammen mit dem bereits etablierten Marker CEA betrachtete (Johansen et al. 2015). Es könnte daher interessant sein, YKL-40 in Kombination mit bereits etablierten Tumormarkern zu untersuchen, da es unterstützend die Sensitivität für die jeweilige Entität erhöhen könnte.

Beurteilt man die Ergebnisse dieser Arbeit und die verschiedenen Beispiele aus der Literatur, so lässt sich zusammenfassend feststellen, dass YKL-40 für viele verschiedene Tumorentitäten als Biomarker interessant sein könnte. Eine Eignung als allgemeiner Tumormarker kann weitgehend ausgeschlossen werden. Dies liegt vor allem daran, dass YKL-40 zu allererst ein Biomarker für Inflammation zu sein scheint. Aus diesem Grund ist es auf jeden Fall erforderlich, Komorbiditäten von Patienten mit malignen Tumoren bei der Interpretation von YKL-40 zu berücksichtigen. Zukünftige Studien können eventuell die Rolle von YKL-40 im Rahmen von malignen Geschehen besser aufdecken und somit noch weitere Hinweise liefern, inwiefern das Protein für die Diagnostik dieser Erkrankungen von Nutzen sein könnte.

5.2.2.3. Orthopädie/Unfallchirurgie

YKL-40 wird während der Knochenbildung von primären Osteozyten und Osteoblasten gebildet. Reife Osteozyten sowie Osteoklasten zeigen im Gegensatz dazu keine Sekretion von YKL-40. Das Protein wird also vermutlich nur während der Neubildung von Knochengewebe sezerniert (Connor et al. 2000; Johansen 2006). Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, YKL-40 könnte auch im Rahmen orthopädischer bzw. unfallchirurgischer Knochenaffektionen erhöht sezerniert werden. Diese Vermutung wurde in dieser Arbeit zwar primär nicht untersucht, doch fanden sich Hinweise, die diese Theorie stützen könnten. In Kapitel 4.2.2 wurden die Ergebnisse der Korrelation von CRP mit YKL-40 für die Patienten der explorativen Studie vorgestellt, wobei drei Gruppen unterschieden wurden. In Gruppe 3 wurden 21 Patienten mit normalem CRP und erhöhtem YKL-40 eingeteilt. Davon waren acht Patienten (ca. 38%) wegen einer orthopädischen Erkrankung stationär aufgenommen worden. Diese acht Patienten wiesen mit einer medianen YKL-40-Serumkonzentration von 300,85 ng/mL deutlich erhöhte Werte auf. Das Maximum lag bei 1464,06 ng/mL und damit ca. 58-fach über dem in der explorativen Studie gemessenen Referenzwert von etwa 25 ng/mL. Dieser Patient war wegen einer Jochbeinfraktur in Kombination mit einer Orbitabodenfraktur in Behandlung. Gerade bei Frakturen kommt es zu deutlich verstärkter Knochenneubildung und konsequenterweise war das YKL-40 bei diesem Patienten auch deutlich erhöht.

Diese Beobachtungen stützen die oben formulierte These. In der Literatur gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass YKL-40 das *Monitoring* ossärer Erkrankungen ergänzend zu bereits etablierten bildgebenden Methoden unterstützen könnte. Ein Beispiel ist schon die Tatsache, dass YKL-40 zuerst in Osteosarkomzellen, einer malignen Neoplasie des Knochens, isoliert wurde (Johansen et al. 1992; Johansen 2006). Darüber hinaus gibt es eine aktuelle Studie von Mylin et al., in welcher YKL-40 als prognostischer Faktor für skelettale Komplikationen bei Patienten mit Multiplem Myelom untersucht wurde. Mylin et al. konnten an 230 Patienten mit dieser Erkrankung eine Erhöhung der YKL-40-Serumkonzentration (Median 113 ng/mL) zeigen. Außerdem war ein hohes YKL-40 im Serum mit einer *High-Risk*-Erkrankung entsprechend dem Internationalen Staging System (ISS) assoziiert (Mylin et al. 2015). Tsuji et al. konnten zeigen, dass im Liquor cerebrospinalis hohe Werte an YKL-40 bei Patienten mit nicht-infektiösen Spinalerkrankungen, wie einer lumbalen Bandscheiben-Protrusion oder einer lumbalen Spinalkanalstenose, messbar sind. Diese Werte sind dabei sogar höher als YKL-40-Konzentrationen im Liquor während einer Meningitis (Østergaard et al. 2002; Tsuji et al. 2002).

In Zusammenschau dieser Beispiele und der Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit scheint es wahrscheinlich, dass YKL-40 bei Krankheiten, die mit Knochenneubildung

und/oder -zerstörung einhergehen, vermehrt gebildet und ins Serum sezerniert wird. Für zukünftige Studien gilt es diese Tatsache mit einzuplanen, da Begleiterkrankungen im Skelettsystem die Aussagekraft hinsichtlich der untersuchten Erkrankungen, wie Pneumonien, schmälern könnten. Ein erhöhtes YKL-40 könnte auch von den Knochenläsionen herrühren. In der prospektiven Folgestudie der vorliegenden Arbeit wurden orthopädische Vorerkrankungen aufgrund der geschilderten Beobachtungen der explorativen Studie ausgeschlossen, um ebensolche Verfälschungen bestmöglich zu verhindern.

5.2.2.4. Inflammation

YKL-40 wird von Zellen des Immunsystems gebildet und nach Aktivierung der Zellen im Rahmen inflammatorischer Prozesse freigesetzt. Verschiedenste Subtypen von Makrophagen exprimieren YKL-40 beispielsweise direkt am Ort des Entzündungsgeschehens (Johansen 2006). Neutrophile Granulozyten speichern YKL-40 in ihren Granula und setzen es bei entsprechenden Stimuli frei (Volck et al. 1998; Boussac & Protøines 2000).

Die Serumkonzentration von YKL-40 steigt auf einen Entzündungsreiz hin um mehr als 25% an. Dies kann auch bei Akute-Phase-Proteinen beobachtet werden, die schon länger als Inflammationsmarker bekannt sind und genutzt werden (J S Johansen et al. 2005).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde schon länger vermutet, YKL-40 könne einen neuen humoralen Inflammationsmarker darstellen, der bereits etablierte Marker wie CRP und PCT sinnvoll ergänzen könnte (Johansen 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Theorie nun untersucht. Die eingeschlossenen Diagnosen und die Ergebnisse wurden bereits in Kapitel 4.2.5 dargestellt. 84 Patienten mit akuten Entzündungsformen wiesen eine mediane YKL-40-Serumkonzentration von 429 ng/mL bei einer Standardabweichung von 2160 ng/mL auf. YKL-40 liegt also bei Entzündungen - wie zu erwarten war - in deutlich erhöhter Serumkonzentration vor (ca. 17x höher als der Referenzwert von ca. 25 ng/mL). Das Maximum war mit 14.254 ng/mL extrem erhöht, jedoch gab es auch bei ca. 10% der Patienten Werte im Referenzbereich. Daher und auch aufgrund der hohen Standardabweichung empfiehlt es sich, bei der Interpretation der Serumkonzentrationen von YKL-40 stets andere Parameter, wie den klinischen Zustand des Patienten oder anderweitige Entzündungsmarker, mit zu berücksichtigen.

Interessant ist der Vergleich mit den anderen Patienten der explorativen Studie. Dabei handelte es sich ebenfalls um kranke Patienten, die aber nicht an akut inflammatorischen Erkrankungen litten. Diese Patienten hatten eine mediane YKL-40-Serumkonzentration von 149 ng/mL mit einer Standardabweichung von 523 ng/mL. Folglich waren die Werte auch bei

diesen Patienten erhöht, jedoch nur etwa sechsfach gegenüber der oberen Referenzwertgrenze. Zu berücksichtigen ist auch hier die hohe Standardabweichung, weshalb YKL-40 stets im Zusammenspiel mit anderen Parametern betrachtet werden sollte. Es lässt sich dennoch vermuten, dass YKL-40 seine höchsten Konzentrationen tatsächlich im Rahmen inflammatorischer Prozesse erreicht. Andere Erkrankungen führen zwar ebenfalls zu verstärkter Expression des Proteins, jedoch in geringerem Ausmaß.

Um die diagnostische Wertigkeit noch genauer zu überprüfen wurde wiederum eine ROC-Kurven-Analyse durchgeführt. Diese ergab eine AUC von 0,725 für YKL-40 und eine AUC von 0,812 für CRP bei statistischer Signifikanz ($p < 0,001$). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Proteine als allgemeine Inflammationsmarker geeignet sind. Bei entsprechend gewähltem Schwellenwert ist eine gute Sensitivität zu erreichen. Das CRP ist als Entzündungsmarker bereits Teil der täglichen klinischen Routine. YKL-40 scheint eine etwas schlechtere Wertigkeit zu besitzen, aber dennoch gut geeignet, allgemeine Inflammationsvorgänge anzuzeigen. Diese Ergebnisse passen gut zu den Vermutungen, die sich aus den anfangs genannten Beispielen der Literatur aufstellen ließen. Interessant wäre nun eine genauere Beurteilung der Ätiologie akuter Entzündungsgeschehen. So konnte eine Arbeitsgruppe um Nordenbaek et al. bereits zeigen, dass YKL-40 bei durch *Streptococcus pneumoniae*-ausgelösten Pneumonien erhöht ist, während es bei atypischen Pneumonien nur leicht bzw. im Fall von *Haemophilus influenzae* nicht erhöht war (Nordenbaek et al. 1999). In diesem Fall war also die Ätiologie der Pneumonie entscheidend für die Höhe der YKL-40-Serumkonzentration. Auch der Schweregrad der Entzündung kann eine Rolle spielen: Die selbe Studie zeigte niedrigere YKL-40-Konzentrationen bei Patienten mit lediglich positiver Sputumkultur für *Streptococcus pneumoniae* im Vergleich zu Patienten mit *Streptococcus pneumoniae*-Bakteriämie (Nordenbaek et al. 1999). YKL-40 könnte also eventuell für bestimmte Entzündungsformen - wie im Beispiel von Nordenbaek et al. bei bakteriell ausgelösten Infektionen - noch bessere Aussagen liefern. Darüber hinaus wäre es interessant, ob höhere YKL-40-Konzentrationen mit einer schlechteren Prognose korreliert sein könnten. Hinweise dafür liefert eine Studie von Kronborg et al., die zeigen konnte, dass YKL-40 bei Patienten mit *Streptococcus pneumoniae*-Bakteriämie mit dem Schweregrad und dem Überleben korreliert war. Patienten mit Komplikationen, wie dem Bedarf einer Hämodialyse oder Beatmungspflichtigkeit, hatten signifikant höhere Werte als Patienten ohne diese Komplikationen. Zudem war YKL-40 bei Patienten, welche die Infektion nicht überlebten, deutlich erhöht (Kronborg et al. 2002). Untersuchungen von Wittenhagen et al. konnten zudem zeigen, dass das CRP bei Patienten mit dieser *Streptococcus pneumoniae*-Bakteriämie nicht mit der Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert war (Wittenhagen et al. 2004).

Zusammenfassend zeigt sich, dass YKL-40 ein humoraler Inflammationsmarker ist, der jedoch in seiner Aussagekraft etwas hinter dem CRP zurück steht. Für bestimmte Entzündungsformen könnte YKL-40 die Aussagen des CRP unterstützen. Zudem scheint YKL-40 bei einigen Erkrankungen mit der Prognose korreliert zu sein, während dies für das CRP in diesen Fällen nicht zutrifft. Studien, die nur bestimmte Subgruppen von Entzündungsformen einschließen, könnten darüber genauere Aussagen ermöglichen.

5.2.2.5. Lungenerkrankungen

Gerade in Bezug auf die Lunge existieren viele Studien, die einen Zusammenhang von YKL-40 mit verschiedensten Erkrankungen dieses Organs zeigen konnten. Diese wurden bereits in Kapitel 1.3.4 vorgestellt. Aufgrund dieser Untersuchungen sollte im Rahmen dieser Arbeit evaluiert werden, ob YKL-40 einen Biomarker für Erkrankungen der Lunge im Allgemeinen darstellen könnte. Wie schon für die anderen Erkrankungsgruppen wurden auch hierfür Seren von Patienten mit verschiedensten Lungenerkrankungen gesammelt und ausgewertet.

Die eingeschlossenen Diagnosen und die dazugehörigen Messergebnisse wurden in Kapitel 4.2.6 dargestellt. 41 gemessene Seren von Patienten mit Lungenerkrankungen ergaben eine mediane YKL-40-Serumkonzentration von 771 ng/mL bei einer Standardabweichung von 2868 ng/mL. 135 Seren von Patienten ohne Lungenerkrankung dienten als Vergleichsgruppe. Hierfür ergab sich eine mediane YKL-40 Konzentration von 164 ng/mL bei einer Standardabweichung von 610 ng/mL. In beiden Gruppen gab es Werte im Referenzbereich, das Maximum lag bei 14.254 ng/mL (Lungenerkrankung) bzw. 5471 ng/mL (keine Lungenerkrankung), was Ausdruck einer enormen Spannweite der möglichen Serumkonzentrationen ist. Der Median war in beiden Gruppen gegenüber dem Referenzwert erhöht, die Gruppe der Patienten mit Lungenerkrankung zeigte dabei jedoch einen im Vergleich ca. 4,7x höheren Wert als die Vergleichsgruppe.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass YKL-40 bei pulmonalen Krankheitsprozessen tatsächlich höhere Werte im Serum aufweist als bei anderen Erkrankungen. Die Vergleichsgruppe bestand aus Patienten mit unterschiedlichsten anderen Erkrankungen. Jedoch war YKL-40 auch hier zum Teil deutlich erhöht (Maximum 5471 ng/mL) und es gab - wie bereits beschrieben - auch in der Gruppe der Lungenerkrankungen unauffällige Werte. Es gibt daher pulmonale Erkrankungen, bei denen YKL-40 nicht vermehrt exprimiert wird. Außerdem gilt es wiederum die hohe Standardabweichung zu berücksichtigen.

Eine ROC-Kurven-Analyse im erkrankten Klinikkollektiv ergab eine AUC von 0,804 für YKL-40 sowie von 0,702 für CRP. Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant. Daraus lässt sich schließen, dass YKL-40 dennoch gut geeignet ist, Erkrankungen der Lunge anzuzeigen, und dem CRP darin überlegen ist.

YKL-40 wird vor allem im Rahmen entzündlicher Prozesse und bei remodellierenden Vorgängen gebildet (Johansen 2006). Auch in dieser Arbeit konnte YKL-40 als Inflammationsmarker bestätigt werden, wie bereits in Abschnitt 5.2.2.4 dargestellt. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen und weitere Hinweise zu erhalten, inwiefern YKL-40 als Biomarker für die Lunge geeignet sein könnte, wurden im nächsten Schritt lediglich entzündliche Lungenerkrankungen betrachtet. Die ROC-Analyse ergab hierbei nahezu identische AUC-Werte (YKL-40: 0,810; CRP: 0,701; n (positiv)=28; n (negativ)=147). Da nun alle nicht entzündlichen Lungenerkrankungen ausgeklammert wurden und die Werte sich nicht verändert haben, kann man schlussfolgern, dass die Wertigkeit von YKL-40 in der Tat für entzündliche Lungenerkrankungen gelten dürfte. Andernfalls wäre ein im Vergleich niedrigerer AUC-Wert zu erwarten gewesen. Somit stellte sich die Frage, ob YKL-40 innerhalb aller entzündlichen Erkrankungen eine Organselektivität für die Lunge besitzen könnte.

Dies wäre vor allem dann interessant, wenn andere Inflammationsmarker wie CRP und PCT, welche diese Selektivität nicht besitzen, eine unklare Erhöhung zeigen, da man in diesem Fall durch zusätzliche Bestimmung von YKL-40 einen Hinweis auf den Focus der Entzündung erhalten könnte. Im folgenden Schritt wurde nun also ein verändertes Kollektiv betrachtet: Es wurden nur akut entzündliche Erkrankungen ausgewertet und die entzündlichen Erkrankungen der Lunge mit einer Vielzahl anderer entzündlicher Erkrankungen vergleichend ausgewertet. Die ROC-Analyse erbrachte bei dieser Herangehensweise eine statistisch signifikante AUC von 0,779 für YKL-40 sowie eine AUC von 0,488 für CRP (n (positiv)=31; n (negativ)=51). Die Ergebnisse für PCT waren statistisch nicht signifikant und werden daher an dieser Stelle nicht berücksichtigt.

Diese Werte sind bemerkenswert, da das CRP sich nicht von der Bezugsgeraden (AUC 0,5) unterscheidet und somit - wie zu erwarten gewesen war - keine Lungenselektivität besitzt, während das YKL-40 tatsächlich eine gewisse pulmonale Selektivität im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen hat.

Dieses Ergebnis aus der explorativen Vorstudie sollte nachfolgend in einer gezielten Studie validiert werden ("prospektive Folgestudie"). Die Ergebnisse dieser angeschlossenen Studie wurden in Kapitel 4.3.1 dargestellt. Hierbei ergab sich in der ROC-Analyse eine statistisch signifikante AUC von 0,730 für YKL-40 und von 0,514 für CRP. Diese Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen denjenigen der explorativen Erststudie. Somit konnte die in der explorativen Studie erarbeitete Hypothese, dass YKL-40 im Gegensatz zu CRP in einem

Kollektiv aus rein inflammatorischen Erkrankungen eine hohe Selektivität für die Lunge besitzt, in der prospektiven Studie anhand eines neuen Patientenkollektivs verifiziert werden. Zu beachten ist jedoch, dass die Ergebnisse für CRP - im Gegensatz zu den signifikanten Ergebnissen für YKL-40 - statistisch nicht signifikant waren.

Dieses Ergebnis könnte durchaus von klinischem Nutzen sein. Im klinischen Alltag begegnet man dem Öfteren Patienten, die hohe humorale Entzündungsparameter aufweisen, ohne einen klinischen Hinweis auf den Focus zu zeigen. In diesen Fällen könnte eine zusätzliche Messung von YKL-40 Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Lunge geben. Hierfür wären jedoch zunächst noch weiterführende klinische Studien notwendig, die entsprechende Schwellenwerte für die YKL-40-Konzentration bestimmen müssten.

Die vorliegende Arbeit bestätigt damit die Eignung von YKL-40 zur Detektion entzündlicher bronchopulmonaler Erkrankungen. Die Ergebnisse entsprechen dabei den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. So konnten Wang et al. 2013 an 61 Patienten mit einer AUC von 0,81 eine gute Wertigkeit von YKL-40 für ambulant erworbene Pneumonien zeigen. YKL-40 war zudem ein Indikator für den Schweregrad der Erkrankung (Wang et al. 2013). In einer aktuelleren Studie an 64 Probanden konnten Cinarka et al. ebenfalls zeigen, dass YKL-40 in der Diagnostik ambulant erworbener Pneumonien von Nutzen sein könnte (Cinarka et al. 2015). Messungen am Tag der Krankenhausaufnahme ergaben jedoch mit einer medianen YKL-40-Konzentration im Serum in Höhe von 89,24 ng/mL niedrigere Werte als in der prospektiven Studie dieser Arbeit (243,1 ng/mL). Der Median der gesunden Kontrollen bei Cinarka et al. lag bei 47,44 ng/mL und damit höher als der im Rahmen dieser Arbeit gemessene Median (24,8 ng/mL) (Cinarka et al. 2015). Eine mögliche Ursache für die Differenz der Werte könnte der Einfluss des verwendeten ELISA-Systems sein, da bei Cinarka et al. ein anderes System zum Einsatz kam als in dieser Arbeit. Vergleicht man die medianen Konzentrationen der jeweils gemessenen Referenzwerte mit denen der Pneumoniegruppe, so ergibt sich bei Cinarka et al. eine Erhöhung um den Faktor 1,9 während in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung um den Faktor 9,8 beobachtet werden konnte. Ein Grund dafür könnte sein, dass Cinarka et al. lediglich ambulant erworbene Pneumonien betrachteten, während für die vorliegende Arbeit nicht zwischen ambulant und nosokomial erworbenen Pneumonien bzw. Bronchitiden unterschieden wurde. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein höheres Keimspektrum mit eingeschlossen. Es wäre möglich, dass einzelne Keime höhere YKL-40-Konzentrationen induzieren als andere. Genauso könnte es Erreger geben, bei denen die YKL-40-Erhöhung schwächer ausfällt, als bei anderen. Diese Vermutung passt zu den bereits erwähnten Beobachtungen von Nordenbaek et al., die eine YKL-40-Erhöhung für *Streptokokkus pneumoniae* zeigen konnten, während das Protein bei Patienten mit atypischen Pneumonien nicht bzw. nur leicht

erhöht im Serum vorlag (Nordenbaek et al. 1999). Darüber hinaus konnten James et al. eine Erhöhung bei Kindern mit bakteriell ausgelöster Pneumonie sowie Bronchiolitis durch *Respiratory-Syncytial-Virus* (RSV) zeigen, während akute Bronchiolitiden durch das Rhinovirus (RV) keine erhöhte YKL-40-Sekretion aufwiesen (James et al. 2014). Zukünftige Studien sollten daher das Keimspektrum der untersuchten Patienten berücksichtigen, da dieses mit hoher Wahrscheinlichkeit Einfluss auf die zu erwartende Höhe der YKL-40-Konzentration haben dürfte. Somit könnten eventuell noch genauere Hinweise gefunden werden, welche Erkrankungen und ätiologischen Subgruppen durch ein erhöhtes YKL-40 erkannt werden könnten.

Interessant ist darüber hinaus, dass YKL-40 bei pathologischen Prozessen der Lunge und der Bronchien nicht nur im Serum in erhöhter Konzentration messbar ist, sondern auch in begleitenden Pleuraergüssen. Die Höhe der gemessenen Konzentration von YKL-40 im Pleuraerguss könnte dabei sogar hinweisgebend für die Ätiologie des Ergusses sein (Kim et al. 2012). Diese Untersuchungen stimmen mit den Beobachtungen von Adamidi et al. überein (Adamidi et al. 2014). Während in der vorliegenden Arbeit lediglich Serumproben berücksichtigt werden konnten, wäre es zukünftig interessant, alternative Probenmaterialien - wie das Pleurapunktat im Rahmen pulmonaler Prozesse - mit einzubeziehen. Eine Kombination aus Serumkonzentration und den Konzentrationen in anderen Probenmaterialien könnte eine bessere Differentialdiagnostik durch YKL-40 erlauben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass YKL-40 einen Biomarker für bronchopulmonale Prozesse darstellt. Eine Eignung für verschiedenste bronchopulmale Krankheitsbilder konnte bereits festgestellt werden und wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Dabei scheint die diagnostische Wertigkeit vor allem für inflammatorische Prozesse gegeben. In einem Kollektiv entzündlicher Erkrankungen konnte diese Arbeit sogar eine relative Organselektivität nachweisen. Diese Eignung als Lungenbiomarker ist umso wertvoller, da die Konzentration von YKL-40 durch Rauchen nicht beeinflusst wird (Johansen et al. 2004; Létuvé et al. 2008). Zukünftige Studien könnten spezifische Krankheitsbilder und alternative Probenmaterialien aufdecken, bei denen YKL-40 die Diagnosefindung verbessern und erleichtern könnte.

5.3. YKL-40 im Vergleich mit CRP und PCT

Um einordnen zu können, in welchen Situationen ein neuer Marker die Diagnostik verbessern und unterstützen kann, ist es essentiell, Vergleiche mit bereits etablierten klinisch-chemischen Kenngrößen der untersuchten Krankheitsgruppen anzustellen. In dieser Arbeit wurde YKL-40 stets im Vergleich mit CRP betrachtet. Im Rahmen der explorativen

Studie konnte - wie in Kapitel 4.2.7 beschrieben - bei einigen wenigen Patienten auch das PCT in den Vergleich einbezogen werden. Verlaufsbeobachtungen der drei Inflammationsmarker sind Gegenstand des nächsten Abschnitts, in diesem Teil wird die Eignung der drei Proteine als Biomarker für die untersuchten Krankheitsgruppen vergleichend diskutiert.

In Kapitel 4.2.2 wurde die Korrelation von YKL-40 und CRP für die explorative Studie ausgewertet. Es zeigte sich eine mittelstarke Korrelation der beiden Proteine im untersuchten Kollektiv (Spearman-Koeffizient 0,607; $p=0,01$). Eine Korrelation der Marker war auch zu erwarten gewesen, da beide Proteine humorale Inflammationsmarker darstellen. In der Tat waren beide Proteine am häufigsten bei akut entzündlichen Erkrankungen gemeinsam erhöht. Auch bei malignen und pulmonalen Erkrankungen waren beide Marker zumeist gemeinsam erhöht.

Dass die Korrelation insgesamt jedoch nicht stärker ausfiel, ließ die Vermutung aufkommen, es könne Krankheiten geben bei denen jeweils eines der beiden Proteine höher im Serum vorliegt, während das andere nicht bzw. nur leicht erhöht ist. Für ein erhöhtes CRP bei normalem YKL-40 konnte dabei kein Muster festgestellt werden. Für den umgekehrten Fall eines erhöhten YKL-40 bei normalen bis niedrigen CRP-Werten fanden sich jedoch gehäuft zwei Gruppen: orthopädische, sowie kardiovaskuläre Krankheitsbilder. Diese Beobachtung überraschte zunächst. Bei genauerer Betrachtung und Recherche fanden sich jedoch Hinweise, dass YKL-40 in der Tat bei ossären Schäden vermehrt exprimiert wird. Diese wurden bereits in Abschnitt 5.2.2.3 dargestellt und diskutiert. Für die Einteilung der Gruppen wurde für das CRP rein empirisch ein niedriger Wert als ≤ 3 mg/dL definiert. Laut Untersuchungen von Yoon et al. steigt das CRP bei Frakturen - gerade bei konservativer Therapie - bei komplikationslosem Verlauf meist nicht über diesen Wert an, bei operativer Therapie steigt es höher, fällt aber rasch wieder unter 3 mg/dL ab (Yoon et al. 1993). Dies könnte erklären, weshalb orthopädische Erkrankungen gehäuft in der Gruppe des erhöhten YKL-40 bei normalen bis niedrigen CRP-Werten auftraten, zumal 50% der hier berücksichtigten Patienten auch wegen einer Fraktur in Behandlung waren. Die anderen Diagnosen einer Rippenprellung, einer Spondylolisthesis sowie einer Spinalkanalstenose gehen - einen komplikationslosen Verlauf vorausgesetzt - nicht mit einer akuten Inflammationsreaktion einher, weshalb auch hier niedrige CRP-Werte erwartet werden konnten. Lediglich bei einem Patienten mit offener Bursa war eine Entzündungsreaktion beteiligt. Insgesamt lässt sich aber vermuten, dass YKL-40 gerade für diese Erkrankungen als Biomarker für das *Monitoring* des Heilungsverlaufs - ergänzend zu bereits etablierten Methoden, wie bildgebenden Verfahren - interessant und dem CRP überlegen sein könnte. Dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, die Hinweise, die aber zufällig

gefunden wurden und in Zusammenschau mit der Literatur erhärtet werden konnten, wären ein interessanter Aspekt für zukünftige Studien.

Wie erwähnt gab es zusätzlich ein gehäuftes Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere solche mit Schädigung der Gefäßwände. Diese Beobachtung steht ebenfalls in Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. So konnte eine Arbeitsgruppe um Malinda et al. - wie in der Einleitung bereits ausgeführt - zeigen, dass YKL-40 an der Angiogenese beteiligt ist, indem es die Migration und Organisation der Gefäßzellen stimuliert (Malinda et al. 1999). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass YKL-40 im Rahmen von Gefäßwandschädigungen vermehrt exprimiert wird, um seine Aufgaben bei der notwendigen Neubildung dieser Strukturen erfüllen zu können. Außerdem wird YKL-40 von glatten Muskelzellen in der Adventitia der Gefäße gebildet. In diesem Zusammenhang konnte auch eine erhöhte Bildung von YKL-40 bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques - einem Prozess der ebenfalls mit der Störung der normalen Gefäßwandarchitektur und -integrität einhergeht - gezeigt werden (Johansen et al. 1999; Nishikawa & Millis 2003).

Die Beobachtung eines erhöhten YKL-40 bei kardiovaskulären Erkrankungen lässt die Vermutung aufkommen, YKL-40 könnte bei diesen Erkrankungen potentiell als Biomarker genutzt werden. Tatsächlich gibt es bereits Untersuchungen für eine Reihe von Krankheitsbildern, die eben dies untersucht haben und einen Einsatz von YKL-40 - auch zur Verlaufsbeobachtung - nahelegen. Beispiele dafür sind folgende Krankheitsbilder: frühe Formen der Atherosklerose (Boot et al. 1999), Verlauf und Entstehung vaskulärer Komplikationen bei arterieller Hypertonie (Ma et al. 2012), chronische Herzinsuffizienz (Harutyunyan et al. 2012), Koronare Herzerkrankung (Harutyunyan et al. 2013) sowie instabile atherosklerotische Plaques bzw. der Myokardinfarkt (Wang et al. 2008; Mygind & Kastrup 2015). Diese Beispiele und die Beobachtungen in dieser Arbeit zeigen, dass YKL-40 durchaus wertvoll in der Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen und dabei anderen Inflammationsmarkern überlegen sein könnte. Zukünftige Studien wären allerdings notwendig, um diese Theorie zu bestätigen und einen klinischen Nutzen nachzuweisen.

Neben der allgemeinen Korrelation zwischen CRP und YKL-40 wurden in der vorliegenden Arbeit auch ROC-Analysen für beide Kenngrößen erstellt. In geringerem Umfang wurde auch das PCT einbezogen. Der Vergleich zwischen CRP und YKL-40 wurde bereits in den entsprechenden Abschnitten der Diskussion von YKL-40 als Markerprotein (Kapitel 5.2.2) integriert. Im Folgenden sollen nun noch kurz die Ergebnisse des Vergleichs mit PCT mit einbezogen werden. Zu beachten ist dabei die fehlende Signifikanz der meisten Ergebnisse aufgrund der geringen Probenzahl.

In Bezug auf Lebererkrankungen sowie maligne Erkrankungen ergab sich kein nennenswerter Unterschied zwischen den drei Markern. Keines der drei Proteine scheint als

Biomarker für hepatische Erkrankungen bzw. maligne Prozesse geeignet. Dies lässt sich aus den AUC-Werten schließen, die für alle drei Marker einen Wert nahe 0,5 ergaben. Die bereits bekannte Eignung von PCT als Inflammationsmarker konnte in dieser Arbeit trotz der geringen Probenanzahl jedoch statistisch signifikant bestätigt werden. Die Wertigkeit scheint dabei in etwa identisch mit CRP und YKL-40 zu sein. Interessant wäre für zukünftige Arbeiten eine genauere Unterscheidung der Ätiologie eingeschlossener Inflamationsprozesse. Es erscheint durchaus möglich, dass einzelne Marker für einzelne Subgruppen von Entzündungen den anderen Markern überlegen sein könnten. So stellt PCT zum Beispiel vor allem einen Marker für bakteriell verursachte Inflammationsvorgänge und septisches Geschehen dar (Assicot et al. 1993; Gendrel & Bohuon 1997; Gendrel et al. 1999).

Die für diese Arbeit interessante Kategorie der Lungenerkrankungen ergab für PCT eine AUC von 0,551. PCT besitzt für diese Gruppe also wie das CRP keinen Wert als Biomarker. YKL-40 dagegen ist wie bereits besprochen durchaus in der Lage, pulmonale Prozesse anzuzeigen. Dies gilt insbesondere in einem Kollektiv aus rein inflammatorischen Erkrankungen. Auch in diesem Kollektiv scheint PCT mit einer AUC von 0,524 keine Aussagekraft zu besitzen.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass YKL-40 ein humoraler Inflammationsmarker ist, der in seiner Aussagekraft in etwa auf dem Niveau bereits etablierter Entzündungsmarker wie CRP und PCT zu liegen scheint. Weitere Studien könnten aufzeigen, inwiefern einzelne Marker den anderen bei ätiologischen Unterformen entzündlicher Erkrankungen überlegen sein könnten.

Darüber hinaus könnte YKL-40 für einige andere Erkrankungsgruppen von höherem Wert als CRP und PCT sein. Dies könnte beispielsweise für orthopädische bzw. unfallchirurgische sowie kardiovaskuläre Erkrankungen gelten. Sicher scheint, dass YKL-40 in der Diagnostik pulmonal-inflammatorischer Prozesse als Biomarker besser geeignet ist als CRP und PCT.

5.4. Hinweise der Verlaufsbeobachtung

In der explorativen Erststudie dieser Arbeit konnten von acht Patienten mehrfache Serumproben gesammelt und ausgewertet werden. Dies ermöglichte es den Verlauf von YKL-40, CRP und PCT zu beobachten. Die drei Proteine wurden bei diesen Patienten vergleichend betrachtet und es wurde nach Hinweisen gesucht, ob es generelle oder bei einzelnen Patienten Unterschiede im Verlauf der Serummarker geben könnten, z.B. schnelleren bzw. späteren Abfall, erneuter Anstieg etc.

Wie schon in Kapitel 4.2.8 beschrieben konnte hierbei kein generelles Muster gefunden werden. YKL-40, CRP und PCT zeigten überwiegend gleichförmige und gleich gerichtete Bewegungen ihrer Serumkonzentration. Somit konnte für Verlaufsbeobachtungen kein genereller Vorteil eines der drei Marker gefunden werden, es scheint vielmehr als wäre die Wertigkeit zumeist identisch, sofern der jeweilige Marker bei der entsprechenden Erkrankung primär erhöht war. Zu beachten ist natürlich, dass die Patienten für die Verlaufsmessungen rein zufällig ausgewählt wurden. Es gab keine Kriterien, nach denen ausgewählt wurde und in Folge dessen gab es, wenn überhaupt, nur zufällige Überschneidungen in den Krankheitsbildern der Patienten. Dies stellt die größte Limitation dieser Untersuchung dar. Genauere Studien mit definierten Krankheitsbildern und Ein- bzw. Ausschlusskriterien sind in jedem Fall wünschenswert. Ziel dieser Arbeit war es lediglich, durch diese zufällige Auswahl an Patienten Hinweise zu finden, bei welchen Krankheitsbildern diese Studien von Interesse sein könnten. Wie im Ergebnisteil ausgeführt, waren vier Patienten aus unterschiedlichsten Gründen interessant. Diese wurden grafisch ausgewertet und dargestellt. Nachfolgend sollen die Ergebnisse dieser vier Patienten interpretiert und eingeordnet werden. Die zugehörigen Grafiken sowie die Auflistung aller Diagnosen der einzelnen Patienten sind in Kapitel 4.2.8 zu finden. Im Folgenden werden nur für die Diskussion relevante Fakten und Diagnosen nochmals kurz rekapituliert.

Patient 1:

Es handelte sich um einen Patienten mit schwerer Sepsis, bei sekundärer akuter myeloischer Leukämie aufgrund eines myelodysplastischen Syndroms. Zudem bestanden eine Pneumonie und Hepatitis, beide durch CMV ausgelöst. Im Verlauf der drei Labormarker zeigte sich initial eine starke Erhöhung aller drei Marker, sowie im Therapieverlauf ein in etwa gleich starker und gleich schneller Abfall der Proteine. Interessant ist die Auswertung der letzten Serumprobe. Während CRP und PCT weiter abfielen, stieg die Serumkonzentration von YKL-40 erneut deutlich an. Dieser neuerliche Anstieg hätte gegebenenfalls ein Hinweis dafür sein können, dass sich der Zustand des Patienten noch weiter verschlechtert, wie es auch der Realität entsprach, da der Patient kurz darauf verstorben ist. CRP und PCT suggerierten durch den kontinuierlichen Abfall ihrer Konzentration in diesem konkreten Fall dagegen eher eine Verbesserung des Zustandes des Patienten. Ursache dafür könnte ggf. ein präterminal vorhandenes Multiorganversagen gewesen sein, dass die Bildung von CRP und PCT beeinträchtigte. Daher wäre YKL-40 zur Verlaufskontrolle dieses Patienten eventuell besser geeignet gewesen.

Patient 2:

Patient 2 war nach Herzstillstand erfolgreich reanimiert worden. Als Grunderkrankung bestanden unter anderem ein Diabetes mellitus Typ 2, sowie eine Atherosklerose. Alle Marker waren initial stark erhöht und zeigten im Verlauf zumeist einen gleichgerichteten Verlauf. Interessant war, dass YKL-40 an zwei Zeitpunkten wieder anstieg, während CRP und PCT nicht bzw. erst verspätet wieder erhöht im Serum messbar waren. Des Weiteren war der Anstieg von YKL-40 relativ gesehen stets am stärksten ausgeprägt. Auch hier lässt sich eine Überlegenheit von YKL-40 zur Diagnostik eventueller Verschlechterungen des Zustands des Patienten diskutieren. Eine Überlegenheit von YKL-40 wäre ggf. dadurch zu erklären, dass dieses Protein, wie weiter oben bereits diskutiert, im Gegensatz zu CRP und PCT bei kardiovaskulären sowie orthopädischen Erkrankungen als Marker gut geeignet zu sein scheint. Patient 2 hatte durch seinen Herzstillstand gewiss Schäden der Herzgefäße und der Herzmuskulatur. Darüber hinaus wurden bei der Reanimation vermutlich die Rippen des Patienten frakturiert - ein häufiger Befund bei Reanimationen. Es bestand also eine Verletzung der Knochenstruktur. Dies könnte die hohen YKL-40-Serumkonzentrationen in diesem Fall erklären. Dass YKL-40 schneller und höher ansteigt als die anderen Marker könnte ebenfalls mit Prozessen in diesen Strukturen zusammenhängen. Für genauere Aussagen hinsichtlich des klinischen Nutzens dieser Vermutungen müsste jedoch der klinische Zustand des Patienten in die Auswertung einbezogen und mit dem Verlauf der Marker korreliert werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Patient 3:

Der Patient litt an einer Aspirationspneumonie. Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit war die YKL-40-Konzentration im Serum initial auf 454,8 ng/mL erhöht. Das PCT war zu allen Messpunkten mit 0,2 ng/mL nur schwach erhöht und zeigte keine Schwankungen im Verlauf. Interessant ist in diesem Fall der Vergleich des Verlaufs von YKL-40 und CRP. Das CRP fiel kontinuierlich ab, bis es nach etwa zwei Wochen nur noch sehr schwach erhöht war. Dieser Abfall suggeriert eine laborchemische Verbesserung der Krankheitssituation. Das YKL-40 blieb bis etwa Tag 10 deutlich erhöht und nahe dem Ausgangswert. Erst danach sinken die Konzentrationen ab. Diese Beobachtungen könnten zweierlei zeigen: Zum einen könnte es sein, dass das YKL-40 dem CRP hinterherhinkt und erst später eine Verbesserung anzeigt. Zum anderen könnte es umgekehrt sein. YKL-40 könnte besser in der Lage gewesen sein den Krankheitsverlauf zu beobachten. Dafür spricht eine Untersuchung von Nordenbaek et al., die zeigen konnte, dass YKL-40 bei Patienten mit *Streptokokkus pneumoniae*-Pneumonie schneller abfällt als CRP (Nordenbaek et al. 1999). Berücksichtigt man diese Beobachtung, spricht mehr für die Theorie, dass YKL-40 im Falle von Patient 3 nicht verspätet abfiel, sondern die Krankheitssituation des Patienten schlicht genauer anzeigte.

Ein Einfluss der ätiologischen Unterschiede der Pneumonien von Patient 3 bzw. den Patienten von Nordenbaek et al. wäre jedoch ebenfalls denkbar. Für eine definitive Aussage müsste deshalb der klinische Zustand des Patienten mit einbezogen werden, was leider nicht möglich war. Dennoch zeigt dieser Fall, dass es durchaus Situationen gibt, in denen CRP, PCT und YKL-40 unterschiedlich reagieren. Zukünftige Studien könnten für solche Patientenfälle genauer herausarbeiten, wann welcher Marker besser zur Verlaufskontrolle geeignet sein könnte.

Patient 4:

Dieser Patient litt neben einer Aspirationspneumonie an einer galligen Peritonitis nach Magenperforation bei Kardiakarzinom. Alle drei Biomarker waren initial deutlich erhöht. Die relativ gesehen stärkste Erhöhung zeigte YKL-40 mit Serumkonzentrationen bis zu 5101 ng/mL. Die Konzentration aller drei Biomarker fällt zunächst deutlich ab. Daraufhin verzeichnet sich ein erneuter gleichgerichteter Anstieg von CRP und YKL-40 (für PCT waren keine Daten mehr vorhanden). Dieser Fall ist deshalb interessant, weil er in Kontrast zu Patient 3 steht. Beide Patienten litten an einer Aspirationspneumonie. In Falle von Patient 3 unterschied sich aber der Verlauf der Marker, während er bei diesem Patienten nahezu identisch ist. Der Grund dafür könnte in den vorhandenen Begleiterkrankungen zu suchen sein. Patient 4 litt zusätzlich an einer hochentzündlichen Peritonitis, während Patient 3 keine entzündliche Begleiterkrankung hatte. Im Falle von Patient 4 könnten die Aussagen also durch die zweite - noch stärkere - Entzündung überlagert sein. Bei Patient 3 dagegen bilden die Inflammationsmarker lediglich den Verlauf der Pneumonie ab, und hier könnte sich der mögliche Vorteil von YKL-40 zeigen. Diese Tatsache könnte ein Hinweis darauf sein, dass YKL-40 bei isolierten Pneumonien dem CRP überlegen sein könnte, während dies bei zusätzlich vorhandenen Entzündungsherden so nicht gilt.

Es gibt in der Literatur Hinweise, dass YKL-40 in der Tat dem CRP in manchen Fällen überlegen sein könnte. Johansen et al. führten 2005 eine bereits erwähnte Studie an gesunden, freiwilligen Probanden durch. Im Rahmen dieser Studie wurde den Probanden *Escherichia-coli*-Endotoxin verabreicht und die Veränderungen der Serumkonzentration diverser Marker untersucht. Die Studie zeigte, dass YKL-40 bereits nach zwei Stunden in erhöhter Konzentration messbar war, während das CRP erst nach acht Stunden eine Erhöhung zeigte (J S Johansen et al. 2005). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit im Allgemeinen nicht gemacht werden. Gerade der Abfall der Serumkonzentrationen war bei den Patienten stets nahezu gleichmäßig ausgeprägt. Zu beachten ist jedoch, dass in dieser Arbeit meist nicht im Intervall von Stunden, sondern vielmehr von Tagen Proben ausgewertet wurden. Die Änderungen während dieser Zeit blieben unberücksichtigt. Zudem kann es

bekanntermaßen deutliche Unterschiede bei verschiedenen Krankheitsbildern geben. Die Studie von Nordenbaek et al. 1999 (Nordenbaek et al. 1999) wurde bereits erläutert und stimmt mit den Befunden von Johansen et al. überein. In beiden Studien fiel YKL-40 schneller ab als CRP. Dem gegenüber steht die Studie von Cinarka et al. an 40 Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie. YKL-40 war in dieser Studie zunächst auf mediane 89,24 ng/mL erhöht und fiel innerhalb von sieben Tagen auf eine mediane Konzentration von 74,37 ng/mL ab. Dieser Abfall der Serumkonzentration zeigt laut den Autoren die Eignung von YKL-40 als Biomarker in der Verlaufskontrolle ambulant erworbener Pneumonien auf. Das ebenfalls gemessene CRP fiel von medianen 22,2 mg/dL im selben Zeitraum auf 5,78 mg/dL ab (Cinarka et al. 2015). Vergleicht man nun die Relation des Abfalls beider Proteine wird offensichtlich, dass das CRP einen stärkeren Abfall verzeichnete. In diesem konkreten Fall wäre das CRP wohl der geeignetere Marker zur Verlaufsbeobachtung gewesen, wobei auch in dieser Arbeit von Cinarka et al. keine Berücksichtigung der klinischen Situation der Patienten erfolgte.

Insgesamt zeigt sich, dass es Fälle gibt, in denen sich YKL-40, CRP und PCT ähnlich zu verhalten scheinen. Es gibt aber auch Fälle, bei denen deutliche Unterschiede im Verlauf der Proteine erkennbar sind. Gerade für solche Patienten wären weiterführende Studien wünschenswert, die aufzeigen könnten, wann konkret welcher Marker am besten geeignet ist den Therapieerfolg zu kontrollieren, um ggf. rechtzeitig eine Anpassung des Therapieregimes vollziehen zu können.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der neue Biomarker YKL-40 hinsichtlich seines möglichen diagnostischen Nutzens evaluiert. Der Name YKL-40 setzt sich aus den drei N-terminalen Aminosäuren Tyrosin (Y), Lysin (K) und Leucin (L) sowie seinem Molekulargewicht von etwa 40 kDa zusammen. Das Protein wird von verschiedensten Zelltypen gebildet und sezerniert, dazu zählen zum Beispiel Zellen des Immunsystems, glatte Muskelzellen oder Zellen des Knochenmilieus. Seine Funktion ist bis heute nicht restlos aufgeklärt, seine Rolle im Rahmen inflammatorischer sowie remodellierender Prozesse konnte jedoch mehrfach gezeigt werden.

Es gab bereits zahlreiche Studien, die YKL-40 hinsichtlich einer möglichen Eignung als Biomarker für unterschiedlichste Erkrankungen untersucht haben. Die vorliegende Arbeit verfolgte darauf aufbauend das Ziel, YKL-40 als Inflammationsmarker zu charakterisieren und hinsichtlich seines möglichen Nutzens für Übergruppen von Erkrankungen bzw. Organsysteme zu evaluieren. Aufgrund der aktuellen Forschungslage sollte ein Hauptaugenmerk auf bronchopulmonale Erkrankungen gelegt werden.

Zunächst wurde eine explorative Studie mit Serumproben von 178 Klinikpatienten und 100 gesunden Blutspendern durchgeführt. Im Rahmen dieser Vorstudie sollte ermittelt werden, für welche Organsysteme und in welchen Situationen YKL-40 von diagnostischem Nutzen sein könnte. Des Weiteren sollte YKL-40 im Vergleich zu CRP und PCT betrachtet werden. Als Referenzbereich der YKL-40-Serumkonzentration wurde ein Bereich von 11,8 - 71,3 ng/mL (2,5 - 97,5%) bei einem Median von 24,8 ng/mL ermittelt.

Als Ergebnis der explorativen Datenanalyse der Proben des Klinikkollektivs ergab sich, dass YKL-40 bei vielen unterschiedlichen Erkrankungen erhöht im Serum messbar ist.

Interessant war die Beobachtung, dass YKL-40 bei Erkrankungen des Skelettsystems sowie bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems im Gegensatz zu CRP als Biomarker geeignet sein könnte. Dies zu untersuchen war nicht Ziel dieser Arbeit, es stellt jedoch einen Ansatz für zukünftige Studien dar.

Verlaufsbeobachtungen, die im Rahmen der explorativen Vorstudie dieser Arbeit vergleichend zu CRP und PCT durchgeführt wurden, konnten Situationen aufzeigen, in denen YKL-40 anders reagiert als die bereits etablierten Marker. Somit könnte YKL-40 ggf. auch in der Verlaufsbeobachtung einiger Krankheitsbilder die Diagnostik verbessern und ergänzen.

In dieser Arbeit konnte ein möglicher klinischer Nutzen von YKL-40 vor allem für akute Entzündungen sowie pulmonale Erkrankungen gezeigt werden. YKL-40 stellt einen humoralen Inflammationsmarker dar, der in seiner Aussagekraft in etwa auf dem Niveau von CRP und PCT liegt. Zusätzlich besitzt YKL-40 jedoch im Gegensatz zu diesen bereits in der

klinischen Routine genutzten Biomarken eine gewisse Organselektivität für entzündliche Prozesse der Lunge. Es konnte gezeigt werden, dass YKL-40 im Gegensatz zu CRP in einem Kollektiv aus unterschiedlichsten entzündlichen Erkrankungen in der Lage ist, entzündliche Erkrankungen dieses Organs herauszufiltern. Dies ist für Patienten mit unklar erhöhten Entzündungswerten zur Fokussuche interessant. Diese während der explorativen Studie erarbeitete Hypothese wurde daraufhin in einer angeschlossenen, prospektiven Studie anhand eines neuen Kollektivs verifiziert.

Serumproben von 28 Patienten mit Pneumonien ergaben dabei eine mediane YKL-40-Konzentration im Serum von 243,1 ng/mL (Mittelwert 405,6 ng/mL; Minimum 57,4 ng/mL; Maximum 1666,2 ng/mL).

Serumproben von 30 Patienten mit anderweitigen inflammatorischen Erkrankungen ergaben eine mediane YKL-40-Konzentration im Serum von 96,6 ng/mL (Mittelwert 213,4 ng/mL; Minimum 17,6 ng/mL; Maximum 1439,2 ng/mL).

Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant ($p=0,003$).

Insgesamt zeigte sich also, dass YKL-40 für die klinische Routine von Wert sein könnte. Es bedarf aber noch weiterer Studien und Untersuchungen, um das Protein näher zu charakterisieren, seine Regulation und Aufgaben im menschlichen Organismus zu verstehen und daraus seinen Nutzen für die klinische Medizin ableiten zu können.

7. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die vielfältige Unterstützung, die mir von vielen Seiten zuteilwurde, nicht möglich gewesen.

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Peter B. Lippa bedanken, der die Idee zu dieser Arbeit hatte und mir das Thema freundlicherweise überlassen hat. Außerdem danke ich ihm für die Bereitstellung der Laborausrüstung und für die kontinuierliche Betreuung während der Durchführung der Experimente.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer, Herrn Michael Schmalenberg. Ohne die tolle Einführung in den Umgang mit den Arbeitsgeräten und die vielen Hilfestellungen seinerseits wäre ich zu Anfang ziemlich verloren gewesen im "Abenteuer Laborarbeit". Außerdem danke ich ihm für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Großer Dank gilt auch meiner Kollegin und guten Freundin Frau Dr. Carmen Kocot, die mich während der Erstellung der Arbeit in vielen Diskussionen mit tollen Tipps und Anregungen begleitet hat. Außerdem ebenfalls ein großes Dankeschön für das Korrigieren dieser Arbeit!

Frau Dr. Aline Schindler möchte ich ebenso ganz herzlich für ihre tolle Unterstützung, gerade auch während des Schreibens der Arbeit danken!

Dem restlichen Team der Arbeitsgruppe, Frau Dr. Heike Bittersohl, Herrn Dr. Alexander Le Blanc, Herrn Dr. Andreas Bietenbeck, Herrn Dr. Markus Thaler sowie Frau Anita Schreiegg danke ich für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima. Es hat mir viel Spaß bereitet in diesem Team mitarbeiten zu können!

Dem Bayerischen Roten Kreuz und den Medizinischen Kliniken des Klinikums rechts der Isar München danke ich für die Bereitstellung der Proben. In diesem Sinne natürlich auch ein herzliches Danke an alle Patienten, die mir einen Teil ihres Blutes überlassen haben und ohne die diese Arbeit unmöglich gewesen wäre!

Zu guter Letzt ein riesiges Dankeschön an meine Eltern, die mich während des gesamten Studiums stets unterstützt und mit fast grenzenloser Geduld viel mit mir durchgestanden haben!

8. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AUC	<i>Area under the Curve</i> (= Fläche unterhalb der Kurve)
BRK	Bayerisches Rotes Kreuz
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (= Bovines Serumalbumin)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHI3L1	<i>Chitinase-3-like-1</i>
CMV	Zytomegalievirus
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i> (= chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CRP	C-reaktives Protein
CV	<i>Coefficient of Variation</i> (= Variationskoeffizient)
Da	Dalton
dL	Deziliter
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (= Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
HC	<i>High Control</i> (= Kontrolle mit hoher Konzentration)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (= Meerrettich-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ISS	<i>International Staging System</i>
kB	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
LC	<i>Low Control</i> (= Kontrolle mit niedriger Konzentration)
M	männlich
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i> (= Mitogen-aktiviertes Protein)
Max	Maximum
mg	Milligramm
Min	Minimum
mL	Milliliter
Mrd	Milliarden
MRI	Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
MW	Mittelwert

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
ng	Nanogramm
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> (= Phosphat-Salzpufferlösung)
PCT	Procalcitonin
PI3	Phosphoinositid-3
PKB	Proteinkinase-B
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i> (= Respiratorische Synzytial-Viren)
RT	Raumtemperatur
RV	Rhinovirus
SD	<i>Standard Deviation</i> (=Standardabweichung)
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (= Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumornekrosefaktor Alpha
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (= Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
W	weiblich

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	17
Tabelle 2: Puffer	17
Tabelle 3: Proteine	17
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 5: Geräte.....	18
Tabelle 6: Software.....	18
Tabelle 7: Patientenkollektiv der explorativen Studie	20
Tabelle 8: Patientenkollektiv der prospektiven Studie	22
Tabelle 9: Verdünnungslinearität des Immunoassays	28
Tabelle 10: <i>Intra-Assay-CV</i> des Immunoassays	29
Tabelle 11: <i>Inter-Assay-CV</i> des Immunoassays	30
Tabelle 12: YKL-40-Serumkonzentration im Kontrollkollektiv	31
Tabelle 13: Gruppierung der 25 Patienten mit erhöhtem CRP und erhöhtem YKL-40 in vier Kategorien	34
Tabelle 14: Gruppierung der 21 Patienten mit erhöhtem YKL-40 und niedrigem CRP in drei Kategorien	34
Tabelle 15: AUC-Werte der ROC-Analysen für CRP, PCT und YKL-40 in verschiedenen Krankheitsgruppen.....	50
Tabelle 16: Übersicht der Serumkonzentrationen von YKL-40 und CRP in den drei Untersuchungskategorien	57

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von YKL-40 (nach Fusetti et al. 2003).....	3
Abbildung 2: Einbindung von YKL-40 in eine Signalkaskade der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Angiogenese (modifiziert nach Prakash et al. 2013).....	7
Abbildung 3: Prinzip der YKL-40-Detektion mittels Immunoassay (ELISA)	23
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Boxplots	27
Abbildung 5: Boxplot der YKL-40-Serumkonzentrationen in den BRK Kontrollproben	31
Abbildung 6: Streudiagramm aller Proben des Klinikkollektivs.....	32
Abbildung 7: YKL-40-Konzentration in den drei Krankheitskategorien	35
Abbildung 8: Streudiagramm von CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer Lebererkrankung.....	36
Abbildung 9: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer Lebererkrankung.....	37
Abbildung 10: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer Lebererkrankung.....	38
Abbildung 11: Streudiagramm für CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer malignen Erkrankung.	39
Abbildung 12: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer malignen Erkrankung	40
Abbildung 13: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer malignen Erkrankung.....	41
Abbildung 14: Streudiagramm für CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion.....	43
Abbildung 15: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion..	44
Abbildung 16: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion	45
Abbildung 17: Streudiagramm für CRP und YKL-40, differenziert nach Vorliegen einer Lungenerkrankung.	46
Abbildung 18: YKL-40 bei Differenzierung nach Vorliegen einer Lungenerkrankung	47
Abbildung 19: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer Lungenerkrankung	48
Abbildung 20: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) bei Vorliegen einer Lungenentzündung in einem Kollektiv aus akuten entzündlichen Erkrankungen .	49
Abbildung 21: ROC-Kurve für YKL-40 (blau), CRP (grün) sowie PCT (rosa) bei Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion	51
Abbildung 22: ROC-Kurve für YKL-40 (blau), CRP (grün) sowie PCT (rosa) bei Vorliegen einer Lungenerkrankung	52

Abbildung 23: Patient 1: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau).....	53
Abbildung 24: Patient 2: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau).....	54
Abbildung 25: Patient 3: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau).....	55
Abbildung 26: Patient 4: Verlauf von CRP (schwarz), YKL-40 (rot) sowie PCT (blau).....	56
Abbildung 27: Verteilung der YKL-40-Serumkonzentrationen in den drei untersuchten Proben-Kategorien.	58
Abbildung 28: ROC-Kurve für YKL-40 (blau) und CRP (grün) für die Untersuchungsgruppe (Pneumonien).	59

11. Literaturverzeichnis

- Adamidi, T., Soultziz, N., Neofytou, E., Georgiou, A., Benidis, K., Papadopoulos, A., Siafakas, N.Î. & Schiza, S.Î., 2014. Expression of YKL-40 and MIP-1a proteins in exudates and transudates: Biomarkers for differential diagnosis of pleural effusions? *European Respiratory Journal*, 44(Suppl 58).
- Assicot, M., Gendrel, D., Carsin, H., Raymond, J., Guilbaud, J. & Bohuon, C., 1993. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *The Lancet*, 341, pp.515–518.
- Baretton, G.B., Kirkpatrick, C.J. & Bültmann, B.D., 2008. *Pathologie 4. Auflage*.
- Basset, P., Bellocq, J., Wolf, C., Stoll, I., Utin, P., Limacher, J., Podhajcer, O., Chenard, M., Rio, M. & Chambon, P., 1990. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, 348, pp.699–704.
- Bergmann, O., Johansen, J.S., Klausen, T.W., K.Mylin, A., Kristensen, J.S., Kjeldsen, E. & Johnsen, H.E., 2005. High Serum Concentration of YKL-40 Is Associated with Short Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 11(24), pp.8644–8652.
- Bhardwaj, R., Yester, J.W., Singh, S.K., Biswas, D.D., Surace, M.J., Waters, M.R., Hauser, K.F., Yao, Z., Boyce, B.F. & Kordula, T., 2015. RelB/p50 Complexes Regulate Cytokine-Induced YKL-40 Expression. *The Journal of Immunology*, 194(6), pp.2862–2870.
- Biggar, R.J., Johansen, J.S., Smedby, K.E., Rostgaard, K., Chang, E.T., Adami, H.-O., Glimelius, B., Molin, D., Hamilton-Dutoit, S., Melbye, M. & Hjalgrim, H., 2008. Serum YKL-40 and interleukin 6 levels in Hodgkin lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 14(21), pp.6974–6978.
- Bissell, M.J. & Radisky, D., 2001. Putting tumours in context. *Nature reviews Cancer*, 1(1), pp.46–54.
- Bojesen, S.E., Johansen, J.S. & Nordestgaard, B.G., 2011. Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population. *Clinica Chimica Acta*, 412(9/10), pp.709–712.
- Boot, R.G., van Achterberg, T.A., van Aken, B.E., Renkema, G.H., Jacobs, M.J., Aerts, J.M. & de Vries, C.J., 1999. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19(3), pp.687–694.
- Boussac, M. & Protœines, C., 2000. Calcium-dependent secretion in human neutrophils : A proteomic approach. *Electrophoresis*, 21, pp.665–672.
- Brasso, K., Christensen, J., Johansen, J.S., Teisner, B., Garnero, P., Price, P.A. & Iversen, P., 2006. Prognostic value of PINP, bone alkaline phosphatase, CTX-I, and YKL-40 in patients with metastatic prostate carcinoma. *The Prostate*, 66(5), pp.503–513.
- Chupp, G.L., Lee, C.G., Jarjour, N., Shim, Y.M., Holm, C.T., He, S., Dziura, J.D., Reed, J., Coyle, A.J., Kiener, P., Cullen, M., Grandsaigne, M., Dombret, M.-C., Aubier, M., Pretolani, M. & Elias, J.A., 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *The New England Journal of Medicine*, 357(20), pp.2016–2027.
- Cinarka, H., Gumus, A., Karatas, M., Kayhan, S., Kirba, A., Ozyurt, S. & Kurt, A., 2015. The Clinical Utility of Serum YKL-40 Levels in Community Acquired Pneumonia. *Advances in Bioscience and Clinical Medicine*, 3(1), pp.10–16.

- Cintin, C., Johansen, J.S., Christensen, I.J., Price, P. a., Sørensen, S. & Nielsen, H.J., 1999. Serum YKL-40 and colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 79(9/10), pp.1494–1499.
- Cintin, C., Johansen, J.S., Christensen, I.J., Price, P. a., Sørensen, S. & Nielsen, H.J., 2002. High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer*, 95(2), pp.267–274.
- Connor, J.R., Dodds, R.A., Emery, J.G., Kirkpatrick, R.B., Rosenberg, M. & Gowen, M., 2000. Human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by in-situ hybridization. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(2), pp.87–95.
- Dehn, H., Høgdall, E.V.S., Johansen, J.S., Jørgensen, M., Price, P.A., Engelholm, S.A.A. & Høgdall, C.K., 2003. Plasma YKL-40, as a prognostic tumor marker in recurrent ovarian cancer. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 82(3), pp.287–93.
- Diefenbach, C.S.M., Shah, Z., Iasonos, A., Barakat, R.R., Levine, D.A., Aghajanian, C., Sabbatini, P., Hensley, M.L., Konner, J., Tew, W., Spriggs, D., Fleisher, M., Thaler, H. & Dupont, J., 2007. Preoperative serum YKL-40 is a marker for detection and prognosis of endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 104(2), pp.435–442.
- Dörner, K., 2009. *Klinische Chemie und Hämatologie 7*. Auflage., Georg Thieme Verlag.
- Dupont, J., Tanwar, M.K., Thaler, H.T., Fleisher, M., Kauff, N., Hensley, M.L., Sabbatini, P., Anderson, S., Aghajanian, C., Holland, E.C. & Spriggs, D.R., 2004. Early detection and prognosis of ovarian cancer using serum YKL-40. *Journal of Clinical Oncology*, 22(16), pp.3330–3339.
- Dvorak, H.F., 1986. Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 315(26), pp.1650–1659.
- Fendrick, A.M., Monto, A.S., Nightengale, B. & Sarnes, M., 2003. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Archives of Internal Medicine*, 163(4), pp.487–494.
- Fukushima, N., Koopmann, J., Sato, N., Prasad, N., Carvalho, R., Leach, S.D., Hruban, R.H. & Goggins, M., 2005. Gene expression alterations in the non-neoplastic parenchyma adjacent to infiltrating pancreatic ductal adenocarcinoma. *Modern Pathology*, 18(6), pp.779–787.
- Funkhouser, J.D. & Aronson, N.N., 2007. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 7, p.96.
- Fusetti, F., Pijning, T., Kalk, K.H., Bos, E. & Dijkstra, B.W., 2003. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(39), pp.37753–37760.
- Gavazzi, G. & Krause, K.-H., 2002. Reviews Ageing and infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(November), pp.659–666.
- Geertsen, P., Johansen, J.S., Von der Maase, H., Jensen, B. V & Price, P.A., 2003. High pretreatment serum level of YKL-40 is related to short survival in patients with advanced renal cell carcinoma treated with high-dose continuous intravenous infusion of interleukin-2. In *Meeting Proceedings of ASCO*. pp. 339–350.
- Gendrel, D. & Bohuon, C., 1997. Procalcitonin, a marker of bacterial infection. *Infection*, 25(3), pp.133–134.

- Gendrel, D., Raymond, J., Coste, J., Moulin, F., Lorrot, M., Guérin, S., Ravilly, S., Lefèvre, H., Royer, C., Lacombe, C., Palmer, P. & Bohuon, C., 1999. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 18(10), pp.875–881.
- Grégoire, M. & Lieubeau, B., 1995. The role of fibroblasts in tumor behavior. *Cancer and Metastasis Reviews*, 14(4), pp.339–350.
- Gumus, A., Kayhan, S., Cinarka, H., Kirbas, A., Bulmus, N., Yavuz, A., Sahin, U. & Ozkaya, S., 2013. High Serum YKL-40 Level in Patients with COPD Is Related to Hypoxemia and Disease Severity. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 229, pp.163–170.
- Hakala, B.E., White, C. & Recklies, A.D., 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(34), pp.25803–25810.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Harutyunyan, M., Christiansen, M., Johansen, J.S., Køber, L., Torp-Petersen, C. & Kastrup, J., 2012. The inflammatory biomarker YKL-40 as a new prognostic marker for all-cause mortality in patients with heart failure. *Immunobiology*, 217(6), pp.652–656.
- Harutyunyan, M., Gøtze, J.P., Winkel, P., Johansen, J.S., Hansen, J.F., Jensen, G.B., Hilden, J., Kjølner, E., Kolmos, H.J., Gluud, C. & Kastrup, J., 2013. Serum YKL-40 predicts long-term mortality in patients with stable coronary disease: A prognostic study within the CLARICOR trial. *Immunobiology*, 218(7), pp.945–951.
- Harvey, S., Weisman, M., O'Dell, J., Scott, T., Krusemeier, M., Visor, J. & Swindlehurst, C., 1998. Chondrex: new marker of joint disease. *Clinical Chemistry*, 44(3), pp.509–516.
- Hector, A., Kormann, M., Mack, I., Latzin, P., Kieninger, E., Zhou, Z., Yildirim, A., Bohla, A., Rieber, N., Kappler, M., Koller, B., Eickmeier, O., Zielen, S., Eickelberg, O., Riethmüller, J., Graepler-Mainka, U., Stem, M., Griese, M., Mall, M. & Hartl, D., 2011. The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PloS one*, 6(9), p.e24399.
- Heikkinen, T. & Järvinen, A., 2003. The common cold. *The Lancet*, 361, pp.51–59.
- Høgdall, E. V., Johansen, J.S., Kjaer, S.K., Price, P.A., Blaakjaer, J. & Høgdall, C.K., 2000. Stability of YKL-40 concentration in blood samples. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 60(4), pp.247–251.
- Houston, D.R., Recklies, A.D., Krupa, J.C. & van Aalten, D.M.F., 2003. Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), pp.30206–30212.
- Hu, B., Trinh, K., Figueira, W.F. & Price, P.A., 1996. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(32), pp.19415–19420.
- Huang, Y., Prasad, M., Lemon, W.J., Hampel, H., Wright, F.A., Kornacker, K., LiVolsi, V., Frankel, W., Kloos, R.T., Eng, C., Pellegata, N.S. & de la Chapelle, A., 2001. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), pp.15044–15049.
- James, A., Stenberg-Hammar, K., Reinius, L., Konradsen, J., Pedroletti, C., Melén, E., Söderhäll, C., Kere, J., Dahlén, S.-E. & Hedlin, G., 2014. Serum YKL-40 is elevated in children with pneumonia and RSV infection. *European Respiratory Journal*, 44(Suppl 58).

- Jensen, B.V., Johansen, J.S. & Price, P.A., 2003. High Levels of Serum HER-2 / neu and YKL-40 Independently Reflect Aggressiveness of Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 9, pp.4423–4434.
- Johansen, J.S., 2006. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Danish Medical Bulletin*, 53(2), pp.172–209.
- Johansen, J.S., Baslund, B., Garbarsch, C., Hansen, M., Stoltenberg, M., Lorenzen, I. & Price, P.A., 1999. YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arteritis. *Arthritis and Rheumatism*, 42(12), pp.2624–2630.
- Johansen, J.S., Christensen, I.J., Jørgensen, L.N., Olsen, J., Rahr, H.B., Nielsen, K.T., Laurberg, S., Brunner, N. & Nielsen, H.J., 2015. Serum YKL-40 in Risk Assessment for Colorectal Cancer: A Prospective Study of 4,496 Subjects at Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 24(3), pp.621–626.
- Johansen, J.S., Christensen, I.J., Riisbro, R., Greenall, M., Han, C., Price, P.A., Smith, K., Brünner, N. & Harris, A.L., 2003. High serum YKL-40 levels in patients with primary breast cancer is related to short recurrence free survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, 80(1), pp.15–21.
- Johansen, J.S., Christoffersen, P., Møller, S., Price, P.A., Henriksen, J.H., Garbarsch, C. & Bendtsen, F., 2000. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *Journal of Hepatology*, 32(6), pp.911–920.
- Johansen, J.S., Cinton, C., Jørgensen, M., Kamby, C. & Price, P.A., 1995. Serum YKL-40: a new potential marker of prognosis and location of metastases of patients with recurrent breast cancer. *European Journal of Cancer*, 31A(9), pp.1437–1442.
- Johansen, J.S., Drivsholm, L., Price, P.A. & Jarle, I., 2004. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer*, 46, pp.333–340.
- Johansen, J.S., Krabbe, K.S., Møller, K. & Pedersen, B.K., 2005. Circulating YKL-40 levels during human endotoxaemia. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(2), pp.343–348.
- Johansen, J.S., Milman, N., Hansen, M., Garbarsch, C., Price, P.A. & Graudal, N., 2005. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis--a potential marker of disease activity? *Respiratory Medicine*, 99(4), pp.396–402.
- Johansen, J.S., Møller, S., Price, P.A., Bendtsen, F., Junge, J., Garbarsch, C. & Henriksen, J.H., 1997. Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(6), pp.582–590.
- Johansen, J.S., Olee, T., Price, P.A., Hashimoto, S., Ochs, R.L. & Lotz, M., 2001. Regulation of YKL-40 production by human articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 44(4), pp.826–837.
- Johansen, J.S., Schultz, N.A. & Jensen, B. V., 2009. Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncology*, 5(7), pp.1065–1082.
- Johansen, J.S., Williamson, M.K., Rice, J.S. & Price, P.A., 1992. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(5), pp.501–512.
- Kawada, M., Seno, H., Kanda, K., Nakanishi, Y., Akitake, R., Komekado, H., Kawada, K., Sakai, Y., Mizoguchi, E. & Chiba, T., 2012. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncogene*, 31(26), pp.3111–3123.

- Kenny, P.A. & Bissell, M.J., 2003. Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues. *International Journal of Cancer*, 107(5), pp.688–695.
- Kim, H.-R., Jun, C.-D., Lee, K.-S., Cho, J.-H., Jeong, E.-T., Yang, S.-H., Lee, Y.-J. & Park, D.-S., 2012. Levels of YKL-40 in pleural effusions and blood from patients with pulmonary or pleural disease. *Cytokine*, 58(3), pp.336–343.
- Kjaergaard, A.D., Nordestgaard, B.G., Johansen, J.S. & Bojesen, S.E., 2015. Observational and genetic plasma YKL-40 and cancer in 96,099 individuals from the general population. *International Journal of Cancer*, 137(11), pp.2696–2704.
- Krause, S.W., Rehli, M., Kruetz, M., Schwarzfischer, L., Paulauskis, J.D. & Andreesen, R., 1996. Differential screening identifies to macrophage maturation genetic markers of monocyte. *Journal of Leukocyte Biology*, 60, pp.540–545.
- Kronborg, G., Ostergaard, C., Weis, N., Nielsen, H., Obel, N., Pedersen, S.S., Price, P.A. & Johansen, J.S., 2002. Serum level of YKL-40 is elevated in patients with Streptococcus pneumoniae bacteremia and is associated with the outcome of the disease. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34, pp.323–326.
- Kushner, I., 1982. The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389, pp.39–48.
- Lal, A., Lash, A.E., Altschul, S.F., Velculescu, V., Zhang, L., Mclendon, R.E., Marra, M.A., Prange, C., Morin, P.J., Polyak, K., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Strausberg, R.L. & Riggins, G.J., 1999. A Public Database for Gene Expression in Human Cancers. *Cancer Research*, 59, pp.5403–5407.
- Létuvé, S., Kozhich, A., Arouche, N., Grandsaigne, M., Reed, J., Kiener, P.A., Aubier, M., Coyle, A.J., Pretolani, M. & Dombret, M.-C., 2008. YKL-40 Is Elevated in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Activates Alveolar Macrophages. *The Journal of Immunology*, 181, pp.5167–5173.
- Libreros, S. & Iragavarapu-Charyulu, V., 2015. YKL-40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(December), pp.1–6.
- Liu, C., Li, Q., Zhou, X., Kolosov, V.P. & Perelman, J.M., 2013. The chitinase-like protein YKL-40 increases mucin5AC production in human bronchial epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 319(18), pp.2866–2873.
- Ma, W., Wang, X., Du, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Wei, D., Guo, L. & Bu, P.-L., 2012. Association between human cartilage glycoprotein 39 (YKL-40) and arterial stiffness in essential hypertension. *BMC Cardiovascular Disorders*, 12(1), p.35.
- Malinda, K.M., Ponce, L., Kleinman, H.K., Shackelton, L.M. & Millis, A.J., 1999. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 250(1), pp.168–173.
- Markert, J.M., Fuller, C.M., Gillespie, G.Y., Bubien, K., Mclean, L.E.E.A., Hong, R.L., Lee, K., Steven, R., Mapstone, T.B., Benos, D.J., Gullans, S.R., James, M., Yancey, G., Bubien, J.K., Mclean, L.A., Hong, L. & Timothy, B., 2001. Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiological Genomics*, 5, pp.21–33.
- Mathers, C., Stevens, G. & Ma Fat, D., 2013. WHO methods and data sources for global causes of death 2000 - 2011. *Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/HSI/GHE/2013.3*. Available at: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalCOD_method_2000-2011.pdf.

- McGill, R., Tukey, J.W. & Larsen, W.A., 1978. Variations of Box Plots. *The American Statistician*, 32(1), pp.12–16.
- Metz, C.E., 1978. Basic Principles of ROC Analysis. *Seminars in Nuclear Medicine*, VIII(4), pp.283–298.
- Millis, A.J.T., Hoyle, M., Reich, E. & Mann, D.M., 1985. Isolation and Characterization of a Mr = 38,000 Protein from Differentiating Smooth Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6), pp.3754–3761.
- Miossec, P., 2003. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis & Rheumatism*, 48(3), pp.594–601.
- Mohanty, A.K., Singh, G., Paramasivam, M., Saravanan, K., Jabeen, T., Sharma, S., Yadav, S., Kaur, P., Kumar, P., Srinivasan, A. & Singh, T.P., 2003. Crystal structure of a novel regulatory 40-kDa mammary gland protein (MGP-40) secreted during involution. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), pp.14451–14460.
- Morrison, B.W. & Leder, P., 1994. neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors. *Oncogene*, 9(12), pp.3417–3426.
- Mygind, N.D. & Kastrop, J., 2015. YKL-40 as Biomarker: Focus on Cardiovascular Disease. In V. R. Preedy & V. B. Patel, eds. *General Methods in Biomarker Research and their Application*. pp. 783–810.
- Mylin, A.K., Abildgaard, N., Johansen, J.S., Heickendorff, L., Kreiner, S., Waage, A., Turesson, I. & Gimsing, P., 2015. Serum YKL-40: a new independent prognostic marker for skeletal complications in patients with multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, (September 2014), pp.1–10.
- Mylin, A.K., Andersen, N.F., Johansen, J.S., Abildgaard, N., Heickendorff, L., Standal, T., Gimsing, P. & Knudsen, L.M., 2009. Serum YKL-40 and bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *International Journal of Cancer*, 124(October 2008), pp.1492–1494.
- Mylin, A.K., Rasmussen, T., Johansen, J.S., Knudsen, L.M., Nørgaard, P.H., Lenhoff, S., Dahl, I.M.S. & Johnsen, H.E., 2006. Serum YKL-40 concentrations in newly diagnosed multiple myeloma patients and YKL-40 expression in malignant plasma cells. *European Journal of Haematology*, 77(5), pp.416–424.
- Nielsen, A.R., Plomgaard, P., Krabbe, K.S., Johansen, J.S. & Pedersen, B.K., 2011. IL-6, but not TNF- α , increases plasma YKL-40 in human subjects. *Cytokine*, 55(1), pp.152–155.
- Nishikawa, K.C. & Millis, A.J., 2003. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Experimental Cell Research*, 287(1), pp.79–87.
- Nordenbaek, C., Johansen, J.S., Junker, P., Borregaard, N., Sørensen, O. & Price, P.A., 1999. YKL-40, a matrix protein of specific granules in neutrophils, is elevated in serum of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(5), pp.1722–1726.
- Nyirkos, P. & Golds, E.E., 1990. Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period. *The Biochemical journal*, 268(1), pp.265–268.
- Ober, C., Tan, Z., Sun, Y., Possick, J., Pan, L., Nicolae, R., Radford, S., Parry, R.R., Heinzmann, A., Deichmann, K.A., Lester, L.A., Gern, J.E., Robert, L., Nicolae, D.L., Elias, J.A. & Chupp, G.L., 2008. Effect of Variation in CHI3L1 on Serum YKL-40 Level, Risk of Asthma, and Lung Function. *The New England Journal of Medicine*, 358(16), pp.1682–1691.

- Olee, T., Hashimoto, S., Quach, J. & Lotz, M., 1999. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *Journal of Immunology*, 162(2), pp.1096–1100.
- Østergaard, C., Johansen, J.S., Benfield, T., Price, P.A. & Lundgren, J.D., 2002. YKL-40 Is Elevated in Cerebrospinal Fluid from Patients with Purulent Meningitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(3), pp.598–604.
- Pepys, M.B. & Hirschfield, G.M., 2003. C-reactive protein : a critical update. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(12), pp.1805–1812.
- Prakash, M., Bodas, M., Prakash, D., Nawani, N., Khetmalas, M., Mandal, A. & Eriksson, C., 2013. Diverse pathological implications of YKL-40: answers may lie in “outside-in” signaling. *Cellular Signalling*, 25(7), pp.1567–1573.
- Recklies, A.D., White, C. & Ling, H., 2002. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochemical Journal*, 365, pp.119–126.
- Rehli, M., Krause, S.W. & Andreesen, R., 1997. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics*, 43(2), pp.221–225.
- Rehli, M., Niller, H.-H., Ammon, C., Langmann, S., Schwarzfischer, L., Andreesen, R. & Krause, S.W., 2003. Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), pp.44058–44067.
- Rejman, J. & Hurley, W., 1988. Isolation and Characterization of a novel 39 kilodalton whey protein from bovine mammary secretions collected during the nonlactating period. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 150(1), pp.329–334.
- Renkema, G.H., Boot, R.G., Au, F.L., Donker-Koopman, W.E., Strijland, A., Muijsers, A.O., Hrebicek, M. & Aerts, J.M., 1998. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *European Journal of Biochemistry*, 251, pp.504–509.
- Rønnov-Jessen, L., Petersen, O.W. & Bissell, M.J., 1996. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiological Reviews*, 76(1), pp.69–125.
- Sakazaki, Y., Hoshino, T., Takei, S., Sawada, M., Oda, H., Takenaka, S., Imaoka, H., Matsunaga, K., Ota, T., Abe, Y., Miki, I., Fujimoto, K., Kawayama, T., Kato, S. & Aizawa, H., 2011. Overexpression of Chitinase 3-Like 1/YKL-40 in Lung-Specific IL-18-Transgenic Mice, Smokers and COPD. *PLoS one*, 6(9).
- Schmidt, H., Johansen, J.S., Gehl, J., Geertsen, P.F., Fode, K. & von der Maase, H., 2006. Elevated serum level of YKL-40 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 106(5), pp.1130–1139.
- Schmidt, H., Johansen, J.S., Sjoegren, P., Christensen, J., Sorensen, B.S., Fode, K., Larsen, J. & von der Maase, H., 2006. Serum YKL-40 Predicts Relapse-Free and Overall Survival in Patients With American Joint Committee on Cancer Stage I and II Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24(5), pp.798–804.
- Shackel, N.A., McGuinness, P.H., Abbott, C.A., Gorrell, M.D. & McCaughan, G.W., 2003. Novel Differential Gene Expression in Human Cirrhosis Detected by Suppression Subtractive Hybridization. *Hepatology*, 38(3), pp.577–588.

- Shackelton, L.M., Mann, D.M. & Millis, A.J.T., 1995. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), pp.13076–13083.
- Sjögren, H., Meis-Kindblom, J.M., Orndal, C., Bergh, P., Ptaszynski, K., Aman, P., Kindblom, L.-G. & Stenman, G., 2003. Studies on the molecular pathogenesis of extraskeletal myxoid chondrosarcoma - cytogenetic, molecular genetic, and cDNA microarray analyses. *The American Journal of Pathology*, 162(3), pp.781–792.
- Sohn, M.H., Kang, M.-J., Matsuura, H., Bhandari, V., Chen, N.-Y., Lee, C.G. & Elias, J.A., 2010. The chitinase-like proteins breast regression protein-39 and YKL-40 regulate hyperoxia-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(7), pp.918–928.
- Tanwar, M.K., Gilbert, M.R. & Holland, E.C., 2002. Gene Expression Microarray Analysis Reveals YKL-40 to Be a Potential Serum Marker for Malignant Character in Human Glioma. *Cancer Research*, 62, pp.4364–4368.
- Tsuji, T., Matsuyama, Y., Natsume, N., Hasegawa, Y., Kondo, S., Kawakami, H., Yoshihara, H. & Iwata, H., 2002. Analysis of Chondrex (YKL-40, HC gp-39) in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Spine Disease. *Spine*, 27(7), pp.732–735.
- Tukey, J.W., 1977. Exploratory Data Analysis. *Addison-Wesley Series in Behavioral Science: Quantitative Methods.*, pp.667–688.
- Volck, B., Price, P.A., Johansen, J.S., Sorensen, O., Benfield, T.L., Nielsen, H.J., Calafat, J. & Borregaard, N., 1998. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 110(4), pp.351–360.
- Vos, K., Steenbakkens, P., Miltenburg, A.M.M., Bos, E., van Den Heuvel, M.W., van Hogezaand, R.A., de Vries, R.R., Breedveld, F.C. & Boots, A.M., 2000. Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(7), pp.544–548.
- Wang, H.-L., Hsiao, P.-C., Tsai, H.-T., Yeh, C.-B. & Yang, S.-F., 2013. Usefulness of Plasma YKL-40 in Management of Community-Acquired Pneumonia Severity in Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), pp.22817–22825.
- Wang, X.-W., Cai, C.-L., Xu, J.-M., Jin, H. & Xu, Z.-Y., 2015. Increased expression of chitinase 3-like 1 is a prognosis marker for non-small cell lung cancer correlated with tumor angiogenesis. *Tumor Biology*, 36(2), pp.901–907.
- Wang, Y., Ripa, R.S., Johansen, J.S., Gabrielsen, A., Steinbruchel, D.A., Friis, T., Bindsløv, L., Haack-Sørensen, M., Jørgensen, E. & Kastrup, J., 2008. YKL-40 a new biomarker in patients with acute coronary syndrome or stable coronary artery disease. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 42(5), pp.295–302.
- Wittenhagen, P., Kronborg, G., Weis, N., Nielsen, H., Obel, N., Pedersen, S.S. & Eugen-Olsen, J., 2004. The plasma level of soluble urokinase receptor is elevated in patients with Streptococcus pneumoniae bacteraemia and predicts mortality. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(5), pp.409–415.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.F. & Achong, M.K., 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(2), pp.311–320.
- Yoon, S.I., Lim, S.S., Rha, J.D., Kim, Y.H., Kang, J.S., Back, G.H. & Yang, K.H., 1993. The C-reactive protein (CRP) in patients with long bone fractures and after arthroplasty. *International Orthopaedics*, 17, pp.198–201.

Literaturverzeichnis

- Zöfel, P., 2001. *Statistik verstehen: ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung*, Addison-Wesley Verlag.
- Zweig, M.H. & Campbell, G., 1993. Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine. *Clinical Chemistry*, 39(4), pp.561–577.