

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
(Prof. Dr. med. K. Meissner)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss genetischer Varianten aus dem  
*CTLA-4*-Gen auf den Krankheitsverlauf  
von Patienten mit Sepsis**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Caspar Niclas Mewes

aus

Kiel

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Mansur

Ko-Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. M. Grade

### **Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. med. A. Mansur

Ko-Referent: Prof. Dr. med. R. Dressel

Drittreferent/in: Priv.-Doz. Dr. med. M. Grade

Datum der mündlichen Prüfung: 25. August 2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss genetischer Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit Sepsis" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 01. August 2020

.....

(Unterschrift)

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden zum Teil veröffentlicht:

- Mewes C**, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Tzvetkov M, Shen-Orr S, Bergmann I et al. (2018): The CTLA-4 rs231775 GG genotype is associated with favorable 90-day survival in Caucasian patients with sepsis. *Sci Rep* **8**, 15140
- Mewes C**, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Tzvetkov M, Jensen O, Runzheimer J et al. (2019): CTLA-4 genetic variants predict survival in patients with sepsis. *J Clin Med* **8**, 70

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden auf Fachkongressen zum Vortrag angenommen:

- Mewes C**, Büttner B, Popov AF, Hinz J, Bergmann I, Mansur A: The CTLA-4 rs231775 GG genotype is associated with favorable 90-day and 28-day survival in Caucasian patients with sepsis. Freier Vortrag (Teilnahme am Vortragswettbewerb der besten vier experimentellen Studien), 20. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie (HAI 2018), Berlin, September 2018
- Mewes C**, Büttner B, Popov AF, Hinz J, Bergmann I, Mansur A: The CTLA-4 rs231775 GG genotype is associated with favorable 90-day survival in Caucasian patients with sepsis. Posterpräsentation, International Sepsis Forum 2018 (ISF 2018), Bangkok, Oktober 2018
- Mewes C**, Hinz J, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Tzvetkov M, Runzheimer J, Shen-Orr S, Quintel M, Mansur A: Genetische Varianten aus dem CTLA-4-Gen haben prognostische Bedeutung für das Überleben septischer Patienten. Freier Vortrag und Vorsitz der Sitzung „Sepsis und Inflammation“, Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DAC 2019), Leipzig, Mai 2019
- Mewes C**, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Jensen O, Runzheimer J, Quintel M, Shen-Orr S et al.: CTLA-4 genetic variants predict survival in patients with sepsis. Posterpräsentation (Teilnahme wegen Terminüberschneidung abgesagt), International Sepsis Forum 2019 (ISF 2019), Rio de Janeiro, Mai 2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Krankheitsbild Sepsis.....	1
1.1.1 Definition und Diagnosestellung der Sepsis .....	1
1.1.2 Epidemiologie der Sepsis .....	4
1.1.3 Pathogenese der Sepsis.....	5
1.1.4 Therapie der Sepsis .....	8
1.2 Das <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i> (CTLA-4) .....	11
1.2.1 Definition des CTLA-4.....	11
1.2.2 Funktion des CTLA-4 .....	11
1.2.3 Funktionelle Bedeutung von CTLA-4 im Rahmen der Sepsis .....	13
1.2.4 Genetische Varianten aus dem <i>CTLA-4</i> -Gen .....	14
1.3 Fragestellung .....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Studiendesign .....	17
2.1.1 Primäre und sekundäre Zielgrößen .....	17
2.1.2 Patientenrekrutierung .....	17
2.1.3 Studieneinverständnis und ethische Gesichtspunkte .....	18
2.2 Datenerhebung .....	19
2.3 Material.....	22
2.3.1 Geräte.....	22
2.3.2 Substanzen.....	22
2.3.3 Verbrauchsmaterialien .....	23
2.3.4 <i>Kits</i> und <i>Assays</i> .....	23
2.4 Methoden.....	24
2.4.1 Extraktion genomischer DNA.....	24
2.4.2 Genotypisierung mittels <i>Real-Time-PCR</i> .....	25
2.5 Auswertung und Statistik .....	30
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1 Überblick.....	32
3.2 Epidemiologische Beschreibung des Patientenkollektivs .....	32
3.3 Genotypisierung und Haplotypisierung.....	33
3.3.1 Ergebnisse der Genotypisierung und Allel-Frequenzen .....	33
3.3.2 <i>Linkage-Disequilibrium</i> -Analyse .....	34
3.3.3 Haplotypen-Bildung.....	35

---

3.3.4	Haplotypen-Verteilung.....	36
3.4	Epidemiologische und klinische Basischarakteristika zu Sepsis-Beginn.....	37
3.5	Kaplan-Meier Überlebenszeitanalysen.....	41
3.6	Multivariate Cox-Regressionsanalysen.....	45
3.7	Parameter zur Analyse der Krankheitsschwere.....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1	Genetische Varianten aus dem <i>CTLA-4</i> -Gen als Prädiktoren der Sepsis-Mortalität....	51
4.2	Einordnung in die aktuelle Forschung.....	52
4.3	Epidemiologie der Studienpopulation im nationalen und internationalen Vergleich ...	54
4.4	Erklärungsansätze der entdeckten Assoziationen ... ..	56
4.4.1	... des CTLA-4 rs231775 SNPs.....	56
4.4.2	... des CTLA-4 rs3087243 SNPs.....	57
4.4.3	... des CTLA-4 H1: TAA-Haplotyps .....	58
4.5	Limitationen der Untersuchung.....	60
4.6	Fazit und Ausblick.....	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>76</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gegenüberstellung der SIRS- und qSOFA-Kriterien.....	3
Abbildung 2: Die Wirtsimmunreaktion im Rahmen der Sepsis.....	6
Abbildung 3: Hyper- und Hypoinflammation der Wirtsimmunreaktion bei Sepsis.....	7
Abbildung 4: Kostimulierende und -inhibierende Signale während der spezifischen zellulären Immunantwort. ....	12
Abbildung 5: SNP-Positionen und <i>minor allele frequencies</i> . ....	14
Abbildung 6: Beispiel zur Erfassung der Vorerkrankungen in der elektronischen Datenbank. ....	20
Abbildung 7: Beispiel eines Allelischen Diskriminierungs-Plots.....	29
Abbildung 8: <i>Linkage-Disequilibrium</i> -Analyse der Einzelnukleotidpolymorphismen CTLA-4 rs733618, rs231775 und rs3087243.....	34
Abbildung 9: Bildung der CTLA-4-Haplotypen.....	35
Abbildung 10: 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen unter Betrachtung des CTLA-4 rs231775 Genotyps.....	42
Abbildung 11: 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen unter Betrachtung des CTLA-4 rs3087243 Genotyps.....	43
Abbildung 12: 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen unter Betrachtung des CTLA-4 H1: TAA-Haplotyps.....	44

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des SOFA- <i>Scores</i> .....	2
Tabelle 2: Patienten-Ausschlusskriterien .....	18
Tabelle 3: Flankierende DNA-Sequenzen und allelspezifische Farbstoffmarkierungen .....	26
Tabelle 4: PCR-Ansatz für eine Reaktion.....	27
Tabelle 5: <i>Thermocycler</i> -Profil.....	28
Tabelle 6: Verteilung der Genotypen und Allel-Frequenzen.....	33
Tabelle 7: Haplotypen-Verteilung.....	36
Tabelle 8: Patientenbasischarakteristika in Bezug auf CTLA-4 rs231775 Genotypen.....	38
Tabelle 9: Patientenbasischarakteristika in Bezug auf CTLA-4 rs3087243 Genotypen.....	39
Tabelle 10: Patientenbasischarakteristika in Bezug auf den H1: TAA-Haplotyp.....	40
Tabelle 11: Vergleich der 28- und 90-Tage Mortalitätsraten .....	41
Tabelle 12: Cox-Regressionsanalyse in Bezug auf CTLA-4 rs231775 Genotypen .....	45
Tabelle 13: Cox-Regressionsanalyse in Bezug auf CTLA-4 rs3087243 Genotypen .....	46
Tabelle 14: Cox-Regressionsanalyse in Bezug auf den CTLA-4 H1: TAA-Haplotyp.....	47
Tabelle 15: Analyse der Krankheitsschwere in Bezug auf CTLA-4 rs231775 Genotypen.....	48
Tabelle 16: Analyse der Krankheitsschwere in Bezug auf CTLA-4 rs3087243 Genotypen.....	49
Tabelle 17: Analyse der Krankheitsschwere in Bezug auf den CTLA-4 H1: TAA-Haplotyp....	50
Tabelle 18: Top-Forschungsschwerpunkte der <i>Surviving Sepsis Campaign</i> .....	52



## Abkürzungsverzeichnis

AF	Atemfrequenz
ALT	Alanin-Aminotransferase
APACHE II	<i>Acute physiology and chronic health evaluation</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (dt.: Antigen-präsentierende Zelle)
aPTT	Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> (dt.: akutes Atemnotsyndrom)
AST	Aspartat-Aminotransferase
BGA	Blutgasanalyse
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMI	<i>Body mass index</i> (dt.: Körpermaßindex)
CEPH	<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i> (dt.: Untersuchungszentrum humaner Polymorphismen)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD4+	CD4-positiv
CMV	Zytomegalievirus
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> (dt.: chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CRF	<i>Case report form</i> (dt.: Prüfbogen)
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CVVH	Kontinuierliche venovenöse Hämofiltration
DAC	Deutscher Anästhesiecongress
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i> (dt.: gefahrenspezifische molekulare Muster)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGAI	Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin e.V.
DGIIN	Deutsche Gesellschaft für Internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin e.V.
DHC	<i>Ductus hepaticus communis</i>
DIC	<i>Disseminated intravascular coagulation</i> (dt.: disseminierte intravasale Gerinnung)
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin e.V.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
DNR	<i>Do not resuscitate</i> (dt.: nicht wiederbeleben)
DNT	<i>Do not treat</i> (dt.: nicht behandeln)
DRG	<i>Diagnosis related groups</i> (dt.: diagnosebezogene Fallgruppen)
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (dt.: Ethylendiamintetraessigsäure)
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
GCS	<i>Glasgow coma score</i>

---

GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HAI	Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (dt.: Humanes Immundefizienz-Virus)
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICD	<i>International statistical classification of diseases and related health problems</i> (dt.: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme)
IDDM	<i>Insulin dependent diabetes mellitus</i> (dt.: insulinabhängiger Diabetes mellitus)
IL-1	Interleukin-1
IQR	<i>Interquartile range</i> (dt.: Interquartilsabstand)
ISF	<i>International Sepsis Forum</i>
KG	Körpergewicht
LADA	<i>Latent autoimmune diabetes in adults</i> (dt.: latenter Typ-1 Diabetes bei Erwachsenen)
LPS	Lipopolysaccharid
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MAF	<i>Minor allele frequency</i> (dt.: Häufigkeit des selteneren Allels)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (dt.: Haupthistokompatibilitätskomplex)
MS	Multiple Sklerose
NIDDM	<i>Non insulin dependent diabetes mellitus</i> (dt.: nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus)
NTC	<i>Non-template control</i> (dt.: Negativkontrolle)
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (dt.: Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (dt.: Polymerasekettenreaktion)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (dt.: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PD-1	<i>Programmed cell death Protein 1</i>
PDMS	Patientendatenmanagementsystem
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i> (dt.: Mustererkennungszepetor)
qSOFA	<i>Quick sequential organ failure assessment</i>
SIRS	Systemisch inflammatorisches Response-Syndrom
SLE	Systemischer <i>Lupus erythematoses</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (dt.: Einzelnukleotidpolymorphismus)
SOFA	<i>Sequential organ failure assessment</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> (dt.: T-Zell-Rezeptor)
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
UTR	Untranslatierte Region
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVD	Zentralvenöser Druck

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Krankheitsbild Sepsis

### 1.1.1 Definition und Diagnosestellung der Sepsis

Sepsis ist ein komplexes, facettenreiches Krankheitsbild, welches sich durch eine systemisch-inflammatorische Reaktion des Körpers auf eine Infektion auszeichnet (Singer et al. 2016). Die Definition der Sepsis ist durch grundlagenwissenschaftliche und klinische Erkenntnisse Gegenstand laufender Diskussion und wurde zuletzt im Jahr 2016 durch eine Arbeitsgruppe der *Society of Critical Care Medicine* und der *European Society of Intensive Care Medicine* im Rahmen einer Konsensuskonferenz aktualisiert (Singer et al. 2016). Die zuvor international gültigen Definitionen der Sepsis von 1992 und 2001, die man post hoc auch als „Sepsis-1“ und „Sepsis-2“ bezeichnete, charakterisierten Sepsis durch das Vorliegen eines systemisch inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) bei klinisch oder mikrobiologisch nachgewiesener Infektion (Bone et al. 1992; Levy et al. 2003). Demnach waren das Vorliegen von mindestens zwei von vier der nachfolgend aufgeführten SIRS-Kriterien und ein bestehender Infektverdacht ausschlaggebend für die Diagnose einer Sepsis (s. Abbildung 1). Zudem wurde in den Sepsis-1- und Sepsis-2-Definitionen je nach Schweregrad der Erkrankung zwischen Sepsis (SIRS mit Infektion), schwerer Sepsis (Sepsis mit Organdysfunktion) und septischem Schock (Sepsis mit flüssigkeitsrefraktärer Hypotonie) unterschieden (Bone et al. 1992).

Mit der „Dritten Internationalen Konsensusdefinition für Sepsis und Septischen Shock“ (Sepsis-3) wurde im Jahr 2016 von den ursprünglich dominanten SIRS-Kriterien und der Abstufung ‚schwere Sepsis‘ aufgrund ihrer geringen Sensitivität und Spezifität Abstand genommen (Vincent et al. 2013; Churpek et al. 2015). Die Organdysfunktion (z. B. Leber- oder Nierenversagen) ist seither bestimmende Komponente der Definition von Sepsis, die das Krankheitsbild beschreibt als „lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine mutmaßliche Infektion hervorgerufen wird“ (Singer et al. 2016). Die im Zentrum der Definition stehende Organdysfunktion ist wiederum charakterisiert als akuter Anstieg des *Sequential Organ Failure Assessment Scores* (SOFA) um mindestens zwei Punkte als Folge der Infektion. Der SOFA-Score zur Erkennung einer akuten Schädigung der körpereigenen Gewebe und Organe ist ein Punktesystem, welches insgesamt sechs verschiedene Organsysteme mit Hilfe einfach zu bestimmender klinischer Parameter betrachtet (Vincent et al. 1996); für jedes der betrachteten Organsysteme – Respiration, Gerinnung, Leber, Herz-Kreislauf, Zentrales Nervensystem (ZNS) und Niere – werden Punktwerte zwischen null (normale Funktion) und vier (massiv

eingeschränkte Funktion) vergeben (s. Tabelle 1). Der kumulierte SOFA-Score, der zwischen null und 15 Punkten beträgt und alle 24 Stunden im Verlauf der intensivmedizinischen Behandlung bestimmt werden soll, gibt Auskunft über den Grad der Organdysfunktion und das Mortalitätsrisiko (Seymour et al. 2016).

**Tabelle 1: Zusammensetzung des SOFA-Scores**

Organsystem	Punktwert				
	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> [mmHg]	≥ 400	< 400	< 300	Beatmung & < 200	Beatmung & < 100
<b>Gerinnung</b> Thrombozyten [10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ]	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
<b>Leber</b> Bilirubin [mg/dl]	< 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	> 12,0
<b>Herz-Kreislauf</b> MAD [mmHg] bzw. Katecholamine [µg/kg/min]	MAD > 70	MAD < 70	Dopamin ≤ 5 oder Dobutamin (jede Dosis)	Dopamin > 5 oder (Nor)Adrenalin ≤ 0,1	Dopamin > 15 oder (Nor)Adrenalin > 0,1
<b>ZNS</b> <i>Glasgow coma score</i>	15	13-14	10-12	6-9	< 6
<b>Niere</b> Kreatinin [mg/dl] bzw. Ausfuhrmenge [ml/Tag]	< 1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 bzw. < 500	>5,0 bzw. < 200

Eigene Tabelle nach Vincent et al. 1996.

Der Terminus schwere Sepsis wird entsprechend der neuen Sepsis-Definition nicht mehr verwendet; ebenfalls hat sich die Definition des „septischen Schocks“ geändert. Er ist nunmehr eine Untergruppe der Sepsis, bei der eine vorliegende zirkulatorische Störung zu einer substanziellen Zunahme der Sterblichkeit führt (Singer et al. 2016; Rhodes et al. 2017). Als Kriterien für das Vorliegen eines septischen Schocks wird die Notwendigkeit der Gabe von Vasopressoren zur Aufrechterhaltung des mittleren arteriellen Drucks (MAD) von > 65 mmHg trotz adäquater Volumensubstitution sowie eine metabolische Dysfunktion im Sinne eines Laktats > 2 mmol/l genannt (Singer et al. 2016).

Mit der Vorstellung der Sepsis-3 Definition wurde ebenfalls der *quick Sequential Organ Failure Assessment Score* (qSOFA), ein Früherkennungs-Score zur raschen Diagnostik einer sich entwickelnden Organdysfunktion eingeführt (s. Abbildung 1). Das Vorliegen von mindestens zwei qSOFA Kriterien erlaubt den Verdacht einer Sepsis. Der qSOFA-Score löst somit die SIRS-Kriterien als *Screening Tool* insbesondere in der präklinischen Routine ab, die

fortan nicht mehr Bestandteil der Sepsis-Definition sind, allerdings weiterhin zur klinischen Identifikation von Infektionen herangezogen werden können (Churpek et al. 2017; Finkelsztein et al. 2017).

SIRS-Kriterien	qSOFA-Kriterien
Fieber ( $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Tachykardie (Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ ) Tachypnoe (Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$ ) oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 \leq 33\text{ mmHg}$ in einer arteriellen Blutgasanalyse (BGA)) Leukozytose ( $\geq 12.000/\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4.000/\text{mm}^3$ ) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild	Verändertes Bewusstsein ( <i>Glasgow coma score</i> $< 14$ ) Tachypnoe (Atemfrequenz $\geq 22/\text{min}$ ) Hypotonie (systolischer Blutdruck $\leq 100\text{ mmHg}$ )

**Abbildung 1: Gegenüberstellung der SIRS- und qSOFA-Kriterien.** (Abb. modifiziert nach Finkelsztein et al. 2017; CC BY 4.0).

Nachdem die deutsche S-2k Leitlinie „Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge“ der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) zum 01.02.2015 ihre Gültigkeit verloren hat, wurde im Februar 2020 die neue S3 Leitlinie von 14 wissenschaftlich-medizinischen Fachgesellschaften unter Federführung der DSG herausgegeben (Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V. 2018). Sie besitzt rückwirkende Gültigkeit zum 31.12.2018 und beinhaltet mehr als 100 Empfehlungen zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. Zur Diagnostik der Sepsis wird die Anwendung des qSOFA- und des SOFA-Scores empfohlen. Voraussetzung für das Vorliegen einer Sepsis ist den Leitlinien entsprechend eine dokumentierte oder suspektete Infektion, die mittels Entnahme mikrobiologischer Kulturen (inkl. aerober und anaerober Blutkulturen) gesichert werden soll – wenn klinisch möglich vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie (Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V. 2018). Es kommt jegliches mikrobiologische Material in Betracht, das zum Erregernachweis dienen kann und aus dem mutmaßlichen Infektfokus stammt. Zur Fokussuche und Diagnostik der Organdysfunktion ist i.d.R. ebenfalls die Durchführung spezifischer bildgebender Diagnostik (v. a. Röntgen-Thorax) und umfangreiche Labordiagnostik (v. a. Blutbild, organspezifische Parameter, Blutgasanalysen) erforderlich. Einen sepsisspezifischen Biomarker gibt es derzeit allerdings nicht (Reinhart et al. 2012). In der präklinischen Routine wird ein qSOFA-Score von mindestens zwei Punkten zur Verdachtsdiagnose der Sepsis herangezogen, während eine manifeste klinische Diagnose der Sepsis über eine infektionsbedingte Erhöhung des SOFA-Scores um mindestens zwei Punkte gestellt wird. Bei einem Vasopressor-Bedarf zur Aufrechterhaltung eines MAD  $> 65\text{ mmHg}$  und gleichzeitigem Vorliegen eines Serumlaktats  $> 2\text{ mmol/l}$  gilt die Diagnose eines septischen Schocks als gesichert (Singer et al. 2016; Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V. 2018).

### 1.1.2 Epidemiologie der Sepsis

Die Inzidenz dokumentierter Sepsis-Fälle steigt sowohl in Deutschland als auch weltweit kontinuierlich an (Angus et al. 2006; Hall et al. 2011; Fleischmann et al. 2016). Die Zunahme älterer multimorbider Patienten im Rahmen des demographischen Wandels und die Zunahme invasiver und medikamentöser therapeutischer Eingriffe in der modernen medizinischen Versorgung sowie vor allem der Intensivmedizin haben zu einem signifikanten Inzidenzanstieg der Sepsis beigetragen (Angus et al. 2006; Fleischmann et al. 2015). So zeigte eine 2015 veröffentlichte Studie des *Center for Sepsis Control and Care* des Universitätsklinikums Jena einen durchschnittlichen jährlichen Anstieg der Sepsis-Fälle in Deutschland um 5,7 % im Zeitraum von 2007 bis 2013, während die Letalität der Erkrankung im gleichen Zeitraum nur um insgesamt 2,7 % gefallen ist. Im Jahr 2013 wurden in Deutschland ca. 280.000 Sepsis-Fälle dokumentiert, was einer adjustierten Rate von 335 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner entsprach; davon verliefen knapp 68.000 Fälle mit Todesfolge; die Krankenhaussterblichkeit betrug 24,3 %. Für Erkrankte mit septischem Schock betrug die Krankenhaussterblichkeit sogar 58,8 % (Fleischmann et al. 2015). Aufgrund nicht erfasster ambulanter und nicht dokumentierter Sepsis-Fälle darf darüber hinaus von einer erheblichen Dunkelziffer ausgegangen werden. Sepsis stellt somit die dritthäufigste Todesursache und häufigste nicht-kardiologische Todesursache auf Intensivstationen in Deutschland dar (Engel et al. 2007). Im Vergleich zu Frauen wiesen Männer eine ungefähr 1,8-fach höhere Sepsis-Häufigkeit auf, und mit einem Altersgipfel in der Gruppe der  $\geq 85$ -jährigen darf Sepsis als Erkrankung des Alters bezeichnet werden (Fleischmann et al. 2016). Die Leistungsausgaben betrugen laut Bundesversicherungsamt im Jahr 2013 im Mittel knapp 28.000 Euro pro Sepsis-Fall, was einen extrapolierten Gesamtaufwand in Höhe von 9,1 Milliarden Euro für die stationäre und nachfolgende ambulante Behandlung der Sepsis und Sepsis-Folgen ausmachte (Drösler et al. 2017). Dies entsprach ca. 3 % der Gesamtausgaben des nationalen Gesundheitswesens in Deutschland (Fleischmann et al. 2015).

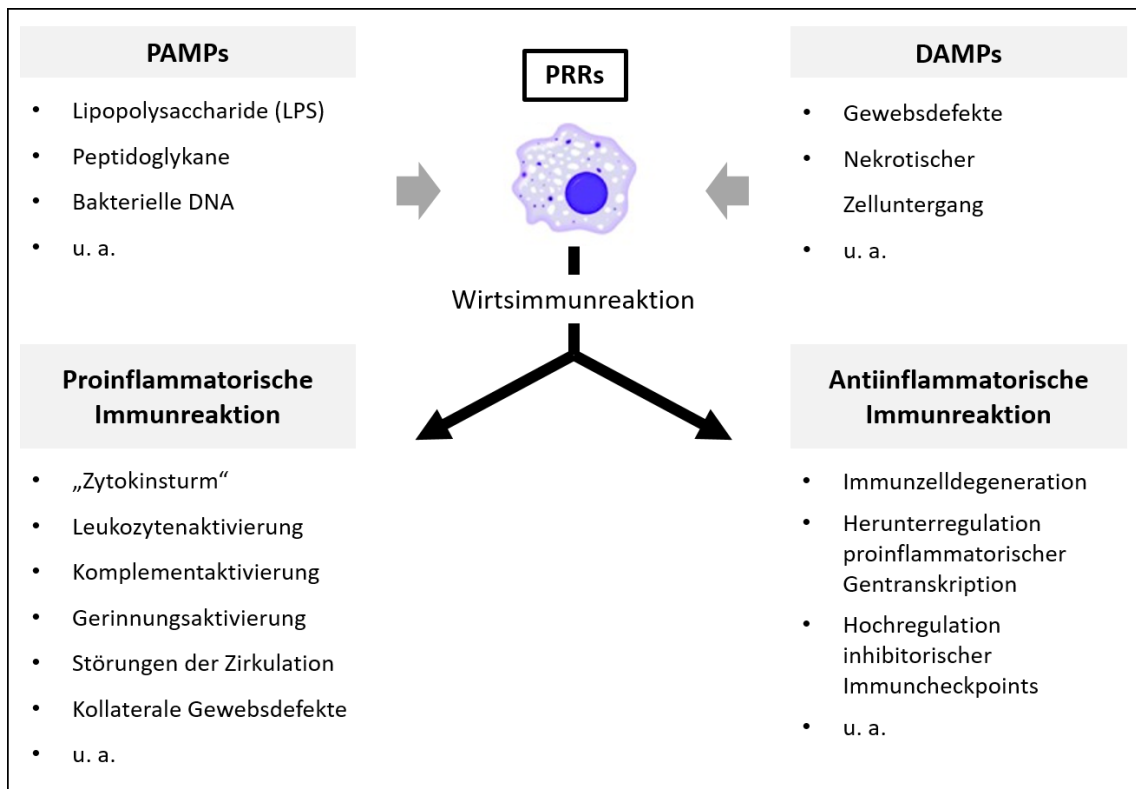
Obwohl die Anwendung unterschiedlicher Studiendesigns und Sepsis-Definitionen die Vergleichbarkeit bestehender epidemiologischer Studien einschränken, kann zusammenfassend von einem Anstieg der Sepsis-Häufigkeit und des Leistungsaufwands der Behandlung bei geringfügigem Rückgang der Krankenhaussterblichkeit ausgegangen werden. Extrapolierte Daten von Nationen mit hohem Pro-Kopf-Einkommen gehen von jährlich über 30 Millionen Sepsis-Erkrankungen und über 5 Millionen Sepsis-Toten weltweit aus (Fleischmann et al. 2016).

### 1.1.3 Pathogenese der Sepsis

Sepsis ist eine generalisierte, entzündliche und oft lebensbedrohliche Reaktion des Körpers unterschiedlicher Ätiologie und komplexer Pathophysiologie. Sie darf als eine Sequenz aus Infektion, inadäquater, dysregulierter Immunreaktion und in der Folge Organdysfunktion verstanden werden (Delano und Ward 2016; van der Poll et al. 2017). Am Anfang dieses polymorphen Krankheitsbildes steht die Infektion mit einem pathogenen Erreger (z. B. Bakterien, seltener auch Pilze, Viren oder Parasiten), wobei grampositive Erreger wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*, gramnegative Erreger wie *Pseudomonas species* und *Escherichia coli* sowie fungale Erreger wie *Candida albicans* die häufigsten nachgewiesenen Pathogene sind (Vincent et al. 2009). Überwiegend lösen Infektionen der Atemwege (v. a. Pneumonien) und des Gastrointestinaltrakts (z. B. Sigmadivertikulitiden) gefolgt von primären Bakteriämien und urogenitalen Infektionen (z. B. Harnwegsinfekte, Pyelonephritiden) eine Sepsis aus (Vincent et al. 2009; Mayr et al. 2014). Grundsätzlich kann aber jede Art der Infektion in eine Sepsis münden, und es gelingt bei nur ca. ein bis zwei Dritteln der Patienten der mikrobiologische Erregernachweis (Kempker und Martin 2016).

Endogene Faktoren, wie eine gestörte Immunabwehr, chronische Erkrankungen und Komorbiditäten, die Einnahme immunsuppressiver Medikamente, aber auch Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft und genetische Merkmale können mitbestimmende bzw. begünstigende Faktoren für eine inadäquate Wirtsreaktion auf eine Infektion sein (Angus und van der Poll 2013; Wiersinga et al. 2014). Gleichmaßen können exogene Faktoren wie eine hohe Erregerzahl, gesteigerte Erregerpathogenität oder -virulenz Einfluss auf den Intensitätsgrad der Immunreaktion haben (Stearns-Kurosawa et al. 2011; Ramachandran 2014).

Im Rahmen der Erregerinvasion werden spezifische Erregerbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane oder bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) – sog. *Pathogene-associated Molecular Patterns* (PAMPs) – durch körpereigene Rezeptoren – sog. *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) – der angeborenen Immunantwort erkannt (van der Poll und Opal 2008; Kawai und Akira 2010; Wiersinga et al. 2014). Die PRRs, zu denen bspw. zellmembranebundene *Toll-like* Rezeptoren (TLR) gehören, erkennen nicht nur exogene PAMPs, sondern auch endogene Strukturen – sog. *Danger-associated Molecular Patterns* (DAMPs) –, welche körpereigen bspw. bei Traumata, Verbrennungen oder Gewebnekrosen freigesetzt werden (Reinhart et al. 2012) (s. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Die Wirtsimmunreaktion im Rahmen der Sepsis.** Dargestellt ist beispielhaft eine körpereigene Immunzelle (z. B. Makrophage), die mit zelloberflächengebundenen PRRs exogene PAMPs sowie endogene DAMPs erkennen kann. Die dadurch ausgelöste Immunreaktion ist gekennzeichnet durch simultan auftretende proinflammatorische (z. B. Ausschüttung von Zytokinen) sowie antiinflammatorische (z. B. Immunzelldegeneration) Mechanismen. (Abb. modifiziert nach Wiersinga et al. 2014; CC BY-NC 3.0).

Die Interaktion der PAMPs mit spezifischen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, insb. TLRs, löst die Immunreaktion des Körpers aus. Es werden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) freigesetzt, die wiederum zur Aktivierung weiterer proinflammatorischer Signalkaskaden, bspw. der Aktivierung des Komplementsystems oder der Freisetzung weiterer Interleukine, führen (Wiersinga et al. 2014). In dieser hyperinflammatorischen Phase des „Zytokinsturms“ kommt es zudem zur Aktivierung von Leukozyten, des Komplementsystems sowie der Blutgerinnung mit Gefahr der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC). Infolge der dysregulierten Immunantwort können sich Störungen der Mikrozirkulation, kollaterale Gewebsdefekte und nekrotischer Zelluntergang ergeben, die in der Freisetzung antiinflammatorisch wirkender DAMPs münden (Angus und van der Poll 2013; Hotchkiss et al. 2013b; Wiersinga et al. 2014). Diese wiederum sind für eine simultane immunsuppressive Reaktion des Körpers verantwortlich, im Rahmen derer Immunzellen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Apoptose von T- und B-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen) und die proinflammatorische Gentranskription herunterreguliert wird (Wiersinga et al. 2014). Weiterhin kommt es zur Hochregulation inhibitorisch wirkender Zellrezeptoren wie *Programmed Cell Death 1 Protein* (PD-1) oder *Cytotoxic T-Lymphocyte*





Zusammenfassend zeichnet sich Sepsis durch eine komplexe simultane Aktivierung sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Signalkaskaden aus (Munford und Pugin 2001; Hotchkiss et al. 2013b). Die Interaktion zwischen Pathogenen und dem Wirtsimmunsystem bestimmt dabei die Balance zwischen den teilweise konkurrierenden pro- und antiinflammatorischen Signalpfaden und ist somit für den Krankheitsverlauf des individuellen Patienten von entscheidender Bedeutung (Hotchkiss et al. 2013b).

#### 1.1.4 Therapie der Sepsis

Für das Krankheitsbild Sepsis gibt es weder einen spezifischen diagnostischen Marker (vgl. 1.1.1) noch eine spezifische Therapie. Die Therapie der Sepsis setzt sich vielmehr aus einer (I) kausalen antimikrobiellen Therapie und/oder operativ-interventionellen Herdsanierung, (II) supportiven (organbezogenen) intensivmedizinischen Therapiemaßnahmen und (III) adjunktiven, also zusätzlichen, therapeutischen Verfahren zusammen (Hagel und Brunkhorst 2011; Dellinger et al. 2013).

Die Initialtherapie der Sepsis sollte auf den Vorgaben der S3-Sepsis-Leitlinie der DSG und auf dem *1-Hour Sepsis Bundle* basieren, welches 2018 als Update zur Sepsis-3 Konsensusdefinition herausgegeben wurde (Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V. 2018; Levy et al. 2018). Diese sehen eine unverzügliche Breitbandantibiotikatherapie, eine rasche Volumensubstitution mittels 30 ml/kg KG kristalloider Infusionslösung und eine Katecholamintherapie bei einem MAD < 65 mmHg innerhalb der ersten Stunde (< 1 h) nach Sepsis-Diagnose vor.

Die kausale Therapie (I) der Sepsis beinhaltet die antimikrobielle Therapie und die Infektfokussuche und -kontrolle. Vor Beginn der antimikrobiellen Therapie wird die Abnahme einer Blutkulturdiagnostik (aerobe und anaerobe Blutkulturen) empfohlen, sofern diese eine schnellstmögliche Antibiotikagabe nicht verzögert (Rahmel 2018). Initial sollte eine kalkulierte intravenöse Antibiotikatherapie mit einer breiten und auf das Erregerspektrum abgestimmten Wirksamkeit (zumeist mittels Acylaminopenicillinen in Kombination mit  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren, Cephalosporinen oder Carbapenemen), erfolgen. Eine Reevaluation der Antibiotikagabe sollte daraufhin alle 24 Stunden stattfinden. Basierend auf der mikrobiologischen Erregerdiagnostik und klinischen Parametern ist eine Eskalation, Deeskalation oder das Absetzen sowie die Umstellung auf eine gezielte antimikrobielle Therapie zu erwägen (Kumar 2016; Rhodes et al. 2017).

Potentiell chirurgisch sanierbare Infektionsherde (bspw. Abszesse, Katheterinfektionen etc.) sind schnellstmöglich, ggf. interventionell, im Rahmen der kausalen Therapie zu behandeln (Wilhelm 2013).

Zur supportiven – also organbezogenen – Therapie (II) der Sepsis gehören die hämodynamische Stabilisierung, der Einsatz von Nierenersatzverfahren sowie die maschinelle Ventilation (Rahmel 2018). Sepsis und septischer Schock sind vitale

medizinische Notfallsituationen, da es infolge endothelialer Schädigung und peripheren Widerstandsverlusts zu einer erheblichen Hypovolämie kommen kann (Wilhelm 2013). Entsprechend ist eine initiale hämodynamische Stabilisierung der Patienten mittels 30 ml/kg KG kristalloider Flüssigkeit (s. o.) erforderlich. Bis zur Normalisierung des Serumlaktats ( $< 2$  mmol/l) und des MADs ( $> 65$  mmHg) ist die Flüssigkeitszufuhr unter Kontrolle des zentral venösen Drucks (ZVD), der Nieren- und Elektrolytparameter sowie des arteriellen Blutdrucks fortzusetzen (Rhodes et al. 2017). Gelingt eine Blutdruckstabilisierung nicht durch Volumengabe, werden Inotropika und/oder Vasopressoren eingesetzt. Norepinephrin (Startdosis  $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) ist die Therapie der ersten Wahl; additiv können Epinephrin oder Dobutamin zum Einsatz kommen. Der Einsatz von Dopamin sollte i.d.R. vermieden werden (Rhodes et al. 2017; Rahmel 2018).

Bei akuter Niereninsuffizienz kommen kontinuierliche Nierenersatzverfahren (CVVH, kontinuierliche venovenöse Hämofiltration) oder intermittierende Hämodialyse zum Einsatz (Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V. 2018).

Zur Sicherstellung der peripheren Sauerstoffversorgung sollten septische Patienten frühzeitig mit Tidalvolumina von 6-8 ml/kg Idealkörpergewicht beatmet werden. Hierbei wird eine  $30\text{-}45^\circ$  Oberkörperhochlagerung sowie die Anwendung von *Weaning*-Protokollen mit täglichen Spontanatmungsversuchen zur Beatmungsentwöhnung empfohlen (Rhodes et al. 2017).

Weitere supportive Therapiemaßnahmen sind Thrombose-Prophylaxe, Sedierung und Analgesie, Ernährungs-Management, Stressulkus-Prophylaxe und die Verabreichung von Blutprodukten (Reinhart et al. 2010).

Zu den adjunktiven Therapeutika (III) gehören bspw. Glukokortikoide, Insulin oder Immunglobuline. Die Gabe von Glukokortikoiden ist umstritten und sollte nur bei Patienten im volumen- und katecholaminrefraktären septischen Schock verabreicht werden. Die Gabe von Immunglobulinen wird aufgrund unklarer Evidenz in den aktuellen *Sepsis-Guidelines* derzeit nicht empfohlen (Rhodes et al. 2017).

Trotz des substanziellen klinischen und grundlagenwissenschaftlichen Fortschritts in der Sepsis-Forschung und der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Antibiotikatherapie, des Beatmungsmanagements und der Volumentherapie besteht weiterhin keine standardisierte sepsisspezifische Therapie, die insb. darauf abzielt, die sepsisinduzierte Immundysregulation zu beherrschen (Gaieski et al. 2013; Mayr et al. 2014; Vincent 2016).

Das fortschreitende Verständnis der Immunpathophysiologie der Sepsis bietet demgegenüber immer neue Anhaltspunkte für potentielle zukünftige Sepsis-Therapien (Reinhart et al. 2012; Delano und Ward 2016). Insbesondere Immun-Checkpoints wie PD-1 oder CTLA-4, die eine Schlüsselrolle in der sepsisinduzierten Immunsuppression und Morbidität spielen, rücken bei der Suche nach potentiellen Therapiemöglichkeiten in den Vordergrund (Fallon et al. 2018). Während sich eine immunmodulatorische Therapie mittels

---

CTLA-4-spezifischer humanisierter monoklonaler Antikörper bereits in der Therapie des malignen Melanoms oder des Prostata-Karzinoms durchgesetzt hat (Snyder et al. 2014; Blank und Enk 2015), konnten positive Effekte im Rahmen der Sepsis-Therapie bisher nur am Mausmodell gezeigt werden (Inoue et al. 2011; Chang et al. 2013). Ob sich eine derartige, möglicherweise individualisierte, immunmodulatorische Therapie der Sepsis auch beim Menschen durchsetzen wird, bleibt abzuwarten.

## 1.2 Das *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4)

### 1.2.1 Definition des CTLA-4

CTLA-4 ist ein Akronym für „*Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4*“, auch bekannt als CD152 entsprechend der *Cluster of Differentiation* (CD)-Nomenklatur. Das Protein wird als Rezeptor auf der Oberfläche aktivierter CD4 positiver (CD4+) T-Zellen sowie auf zytotoxischen T-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert (Verhagen et al. 2008; Walker 2013). CTLA-4 ist wie PD-1 ein antiinflammatorischer Immun-Checkpoint, der der erweiterten CD28 Familie angehört und auf dem *CTLA4*-Gen auf Chromosom 2q33 des menschlichen Genoms kodiert ist (Murphy und Weaver 2018). CTLA-4 konkurriert im Rahmen der spezifischen zellulären Immunantwort mit CD28 um die Bindung an B7.1 und B7.2 und hat somit eine inhibitorische Funktion in der proliferativen Phase der Immunantwort (vgl. 1.2.2). Die Intensität seiner inhibitorisch-regulatorischen Funktion wird über die Oberflächenexpression reguliert (Murphy und Weaver 2018).

CTLA-4 erlangte spätestens 2018 auch in der breiten Öffentlichkeit Bekanntheit, als für die Entdeckung der Therapie bestimmter Krebsleiden mit Hilfe humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4 (bspw. *Ipilimumab*) der Medizin-Nobelpreis 2018 vergeben wurde (Nobel Media AB 2018).

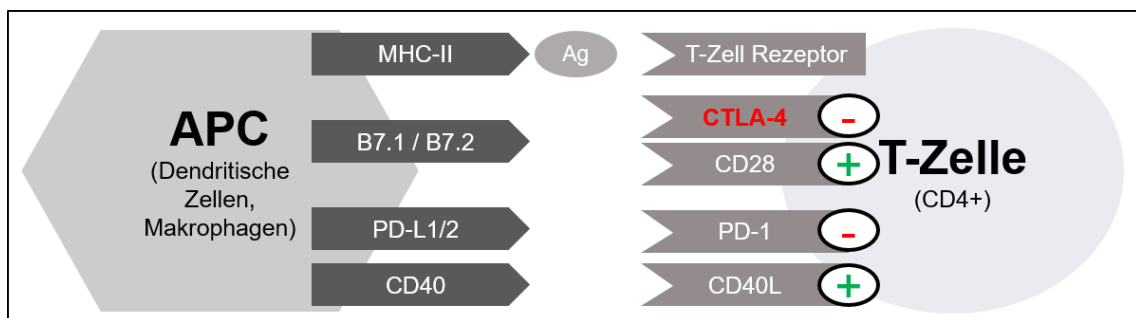
Des Weiteren sind mehrere Polymorphismen aus dem *CTLA4*-Gen mit Autoimmunerkrankungen, wie z. B. der Multiplen Sklerose (MS) oder dem Systemischen *Lupus erythematoses* (SLE), assoziiert (vgl. 1.2.3).

Es wird darüber hinaus angenommen, dass Immun-Checkpoints wie CTLA-4 und PD-1 auch im Rahmen der Immunantwort bei Sepsis eine entscheidende Rolle spielen (Stearns-Kurosawa et al. 2011; Mansur et al. 2014). So wurden bspw. gesteigerte Oberflächenexpressionslevels des immuninhibitorischen CTLA-4 während der sepsisbedingten Immunsuppression nachgewiesen (Kim und Ahmed 2010; Zhang et al. 2011; Fallon et al. 2018).

### 1.2.2 Funktion des CTLA-4

Während der spezifischen zellulären Immunreaktion werden Erregerantigene zunächst von dendritischen Zellen und Makrophagen – den sog. Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) – aufgenommen. Anschließend werden prozessierte Antigenpeptide auf MHC-II-Rezeptoren (*Major Histocompatibility Complex*) gegenüber naiven T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen – Milz, Lymphknoten sowie bronchus- und darmassoziierten Lymphgeweben – präsentiert (Pape et al. 2018). Es kommt zur Rezeptor-Interaktion zwischen dem MHC-II-gebundenem Antigenpeptid und dem T-Zell-Rezeptor (TCR). Die alleinige Bindung zwischen dem Antigen-MHC-II-Komplex und dem TCR (1. Signal) ist für die Aktivierung und Proliferation der T-Zelle noch nicht ausreichend; ohne ein weiteres kostimulierendes

Signal (2. Signal) verfallt die T-Zelle in Anergie – d. h. Refraktärität gegenüber weiteren Stimuli – oder in Apoptose (Nagel et al. 1998). Für eine Freisetzung von IL-2 und eine klonale Expansion und Differenzierung, die sog. T-Zell-Proliferation, ist die zusätzliche kostimulatorische Interaktion zwischen CD28 und B7.1 / B7.2 erforderlich (Murphy und Weaver 2018; Pape et al. 2018). Nach erfolgter Aktivierung exprimiert die T-Zelle weitere kostimulatorische (z. B. CD40L) und koinhibitorischen Rezeptoren (z. B. PD-1, CTLA-4) auf ihrer Zelloberfläche (s. Abbildung 4). Der koinhibitorische Rezeptor CTLA-4 bindet an dieselben kostimulierenden Liganden (B7.1 / B7.2) wie CD28, besitzt allerdings im Gegensatz zu CD28 eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen.



**Abbildung 4: Kostimulierende und -inhibierende Signale während der spezifischen zellulären Immunantwort.**

Zur Aktivierung naiver T-Zellen werden mehrere Signale benötigt: Einerseits die Antigenpeptidpräsentation (Ag) APC-gebundener MHC-II-Rezeptoren gegenüber T-Zell-gebundenen TCRs (1. Signal); andererseits die Bindung von CD28 an seine Liganden B7.1 oder B7.2 (2. Signal). Anschließend exprimieren aktivierte T-Zellen weitere kostimulatorische Rezeptoren (in der Abb. mit „+“ gekennzeichnet; z. B. CD40L) und koinhibitorische Rezeptoren (in der Abb. mit „-“ gekennzeichnet; z. B. PD-1, CTLA-4) auf ihrer Zelloberfläche. CTLA-4 konkurriert dabei mit CD28 um die Bindung an B7.1 und B7.2. (Abb. modifiziert nach Walker und Sansom 2015; CC BY 4.0).

CTLA-4 bindet an die B7-Liganden mit einer ca. 20-fach höheren Affinität als CD28 (Murphy und Weaver 2018); seine inhibitorische Funktion ist allerdings noch nicht in Gänze erforscht. Es gibt bisher keinen Nachweis dafür, dass CTLA-4 direkt inhibitorische Signalkaskaden aktiviert; demgegenüber gilt es als sicher, dass CTLA-4 zumindest teilweise durch seine hochaffine Bindung an B7.1 / B7.2 die Bindung zwischen CD28 und B7.1 / B7.2 blockiert und somit die Intensität der CD28-abhängigen Kostimulation verringert (Walker und Sansom 2015; Murphy und Weaver 2018). Durch die Oberflächenexpression von CTLA-4 werden also aktivierte CD4+ T-Zellen weniger empfindlich für eine Stimulation durch APC. Dabei wird die IL-2 Produktion der CD4+ T-Zellen, welche wichtig für ihre eigene Aktivierung und Proliferation ist, ebenfalls gemindert. Durch eine Steigerung der Oberflächenexpression von CTLA-4 auf CD4+ T-Zellen wird die Proliferation, Expansion und Aktivierung von T-Zellen – also die T-Zell-vermittelte Immunantwort – herunterreguliert (McCoy und Le Gros 1999; Gardner et al. 2014).

Auf der Oberfläche regulatorischer T-Zellen wird CTLA-4 für die normale Funktionsfähigkeit und zur Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz benötigt, was eine Assoziation funktioneller genetischer Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen mit Autoimmunerkrankungen erklären könnte (Klocke et al. 2016; Wang et al. 2017).

Zusammenfassend kann CTLA-4 eine wichtige regulatorische Funktion des Immunsystems, vor allem auf Basis der Vermittlung inhibitorischer Signale, zugeschrieben werden.

### 1.2.3 Funktionelle Bedeutung von CTLA-4 im Rahmen der Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis entsteht durch eine inadäquate, dysregulierte Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Organe und Organsysteme, die durch eine Infektion ausgelöst wird. Dabei werden die Pathogenese und der Krankheitsverlauf der Sepsis multifaktoriell durch diverse exogene und endogene Einflussfaktoren bestimmt (vgl. 1.1.3). Aufgrund seiner wichtigen Bedeutung in der Regulation und Modulation der Wirtsimmunantwort, könnte CTLA-4 eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Pathophysiologie der Sepsis spielen.

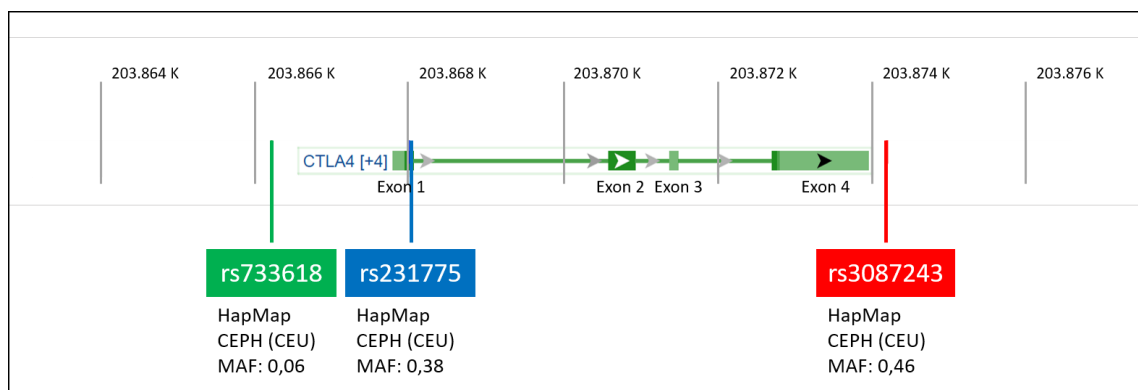
Vorausgegangene Studien konnten bereits eine Hochregulation der Expression des koinhibitorischen CTLA-4 auf CD4+ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen während der Sepsis am Mausmodell nachweisen (Inoue et al. 2011; Zhang et al. 2011). Diese Feststellung bestätigte sich ebenfalls bei Patienten mit Sepsis. Bei der Untersuchung septischer Patienten konnten signifikant erhöhte Expressionslevels von CTLA-4 im Rahmen der sepsisbedingten Immunsuppression und multiplen Organdysfunktion gezeigt werden (Boomer et al. 2011; Washburn et al. 2019). Neben dem Nachweis erhöhter CTLA-4-Expressionslevels bei septischen Patienten und Mäusen konnte darüber hinaus ein dosisabhängiger Effekt zwischen der CTLA-4-Konzentration und der Mortalität bei Mäusen mit Sepsis nachgewiesen werden (Inoue et al. 2011; Hutchins et al. 2014).

Die Feststellung der Assoziation zwischen CTLA-4-Expressionslevels und der Erkrankung an Sepsis sowie der Sepsis-Mortalität am Mausmodell führte zur Untersuchung des koinhibitorisch wirkenden CTLA-4-Rezeptors als Ansatzpunkt immunmodulatorischer Therapiestrategien. Während die Blockade bzw. Suppression des Moleküls bspw. bei der Therapie des malignen Melanoms eine therapeutische Stimulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen die Krebszellen induziert, konnte eine entsprechende Wirkung im Rahmen der sepsisbedingten Immunsuppression bisher noch nicht am Menschen nachgewiesen werden (Wolchok et al. 2013; Savoia et al. 2016). Am Mausmodell zeigte sich allerdings bereits eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit der Sepsis durch die Gabe humanisierter Antikörper gegen CTLA-4 (Inoue et al. 2011; Chang et al. 2013).

### 1.2.4 Genetische Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen

Das *CTLA-4*-Gen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 2 (2q33) lokalisiert ist, besteht aus vier Exonen und drei Intronen und beinhaltet mehr als 100 bisher identifizierte Einzelnukleotidpolymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) (Teft et al. 2006; Romo-Tena et al. 2013). Die funktionelle Bedeutung der SNPs sowie des CTLA-4-Proteins selbst für die Pathophysiologie der Sepsis ist weitgehend unbekannt. Für bestimmte genetische Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen wird jedoch ein Einfluss auf die Funktionalität des CTLA-4-Peptids oder die Expressionsstärke auf der Zelloberfläche CD4+ T-Zellen angenommen (Anjos et al. 2002). Genetische Varianten, die mit einer geminderten inhibitorischen Funktion des CTLA-4 und somit einer verstärkten T-Zell-Reaktion einhergehen, spielen eine besondere Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und möglicherweise auch bei der Sepsis (Scalapino und Daikh 2008).

Der Zusammenhang mehrerer SNPs mit einer erhöhten Suszeptibilität für diverse Autoimmunerkrankungen wurde nachgewiesen (Soskic et al. 2014; Klocke et al. 2016). Drei wichtige Vertreter dieser Gruppe, die SNPs CTLA-4 rs733618, CTLA-4 rs231775 und CTLA-4 rs3087243, wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: SNP-Positionen und *minor allele frequencies*.** Dargestellt ist das *CTLA-4*-Gen auf Chromosom 2q33, bestehend aus vier Exonen (grüne Balken) und drei Intronen (grüne Linien zwischen den Exonen). Auf dem dargestellten Genabschnitt wurden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SNPs, CTLA-4 rs733618 (grün), rs231775 (blau) und rs3087243 (rot) an ihrer entsprechenden Position hervorgehoben. Die Darstellung weist ebenfalls die *Minor Allele Frequencies* (MAFs) der jeweiligen SNPs in der Referenzpopulation HapMap CEPH (CEU) aus. (Eigene Darstellung).

#### 1.2.4.1 Der CTLA-4 rs733618 Einzelnukleotidpolymorphismus

Der CTLA-4 rs733618 SNP befindet sich in der Promotorregion des *CTLA-4*-Gens an Position „chr2:203866221“ (rs733618 RefSNP Report 2019). Er liegt im 5′ untranslatierten Bereich (englisch: 5′ *untranslated region*, 5′-UTR), einem Abschnitt, der v. a. regulatorische Sequenzen enthält. Das Wildtypallel an diesem Genlocus ist Thymin (T) mit einer Allel-



Frequenz von 0,94; das seltenere Allel ist Cytosin (C) mit einer MAF (*minor allele frequency*) von 0,06 in der europäischen Referenzpopulation HapMap CEPH (CEU) (rs733618 RefSNP Report 2019, s. Abbildung 5). Eine Assoziation des T-Allels an dieser Position mit einer höheren Auftretenshäufigkeit der Autoimmunerkrankungen *Myasthenia Gravis* und SLE wurde in Kaukasischen Populationen nachgewiesen (Hudson et al. 2002; Wang et al. 2008).

#### 1.2.4.2 Der CTLA-4 rs231775 Einzelnukleotidpolymorphismus

Der CTLA-4 rs231775 SNP befindet sich im kodierenden Bereich des Exons 1 im *CTLA4*-Gen an Position „chr2:203867991“ (rs231775 RefSNP Report 2019). Es handelt sich um eine *Missense*-Mutation, bei der eine Basenveränderung im Codon zu einem Aminosäureaustausch – nämlich von Threonin (Thr) zu Alanin (Ala) – im CTLA-4-Rezeptor führt. Das Wildtypallel an diesem Genlokus ist Adenin (A) mit einer Allel-Frequenz von 0,62, und das seltenere Allel ist Guanin (G) mit einer MAF von 0,38 in der europäischen Referenzpopulation HapMap CEPH (CEU) (rs231775 RefSNP Report 2019, s. Abbildung 5)).

Das seltenere Allel Guanin an diesem Genlokus ist durch eine inkomplette Glykosylierung des CTLA-4-Peptids mit niedrigeren Expressionslevels des Proteins auf der Zelloberfläche und somit einer gesteigerten T-Zell-vermittelten Immunantwort assoziiert (Ligers et al. 2001). Eine Vielzahl genetischer Assoziationsstudien liegt zu diesem SNP vor. Für diese Arbeit sind insbesondere Assoziationsstudien an Kaukasischen Patientenkollektiven von Relevanz; an diesen wurden Assoziationen zu diversen Autoimmunerkrankungen wie Hashimoto Thyreoiditis, rheumatoider Arthritis, Morbus Addison und insulin-abhängigem Diabetes mellitus (IDDM, *Insulin-dependent Diabetes Mellitus*) nachgewiesen (Donner et al. 1997; Marron et al. 1997; Benhatchi et al. 2011; Wolff et al. 2015).

#### 1.2.4.3 Der CTLA-4 rs3087243 Einzelnukleotidpolymorphismus

Der CTLA-4 rs3087243 SNP befindet sich an der Position „chr2:203874196“ des *CTLA4*-Gens (rs3087243 RefSNP Report). Er liegt im 3'-UTR, einem Abschnitt, der dem für das Protein kodierenden Bereich nachgelagert ist. Das Wildtypallel an diesem Genlokus ist Guanin (G) mit einer Allel-Frequenz von 0,54; das seltenere Allel ist Adenin (A) mit einer MAF von 0,46 in der europäischen Referenzpopulation HapMap CEPH (CEU) (rs3087243 RefSNP Report, s. Abbildung 5). Das Wildtypallel Guanin (G) an dieser Stelle ist u. a. mit den Autoimmunerkrankungen Hashimoto Thyreoiditis, latentem Autoimmundiabetes, Multipler Sklerose und SLE in Kaukasischen Patientenkollektiven assoziiert (Torres et al. 2004; Douroudis et al. 2009; Karabon et al. 2009; Zaletel et al. 2010).

### 1.3 Fragestellung

Zusammenfassend handelt es sich bei der Sepsis um ein polymorphes Syndrom von besonderer klinischer, wissenschaftlicher, aber auch gesundheitsökonomischer Bedeutung. Ein besseres, tieferes Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis ist erforderlich, um neue Biomarker zu entwickeln, Risikopatienten rechtzeitig zu identifizieren und moderne individualisierte Therapieverfahren zu entwickeln. Die Sepsis-Ursachen und die Pathophysiologie sind multifaktoriell und zumindest zu einem Teil genetisch bedingt (Giamarellos-Bourboulis und Opal 2016). Dabei bietet die Identifikation zur Sepsis beitragender genetischer Faktoren Anhaltspunkte zum besseren Verständnis der Pathophysiologie, zur Identifizierung genetischer Risikoprofile und zur Vorhersage klinischer Reaktionen, bspw. auf bestimmte Medikamente.

Zahlreiche Arbeiten konnten bereits die Relevanz des Immun-Checkpoints CTLA-4 für andere Erkrankungen, insbesondere Autoimmunerkrankungen und bestimmte Krebsleiden nachweisen. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist, ob und inwiefern die funktionellen genetischen Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen, CTLA-4 rs733618, CTLA-4 rs231775 und CTLA-4 rs3087243 sowie aus diesen Varianten abgeleitete Haplotypen Einfluss auf die Mortalität und den Krankheitsverlauf der Sepsis haben. Die 28- und 90- Tage Mortalität sollen zum Zweck dieser Untersuchung die primären Ergebnisparameter sein.

Als sekundäre Endpunkte sollen Parameter der Krankheitsschwere, wie z. B. Liegezeiten und Bedarf an Organersatzverfahren analysiert werden. Ausgangspunkt für diese Untersuchung ist die Annahme, dass genetische Varianten, die mit einer geminderten CTLA-4-Expression und somit einer erhöhten T-Zell-vermittelten Immunantwort – auch autoreaktiver Natur – einhergehen, ebenfalls im Rahmen der komplexen Immunreaktion der Sepsis von Bedeutung sein können. Die vorliegende Arbeit ist die erstmalige Untersuchung des Einflusses o. g. genetischer Varianten auf Sepsis-Mortalität und -Krankheitsverlauf.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine klinisch prospektive genetisch-epidemiologische Assoziationsstudie. Sie soll den Einfluss der funktionellen genetischen Varianten CTLA-4 rs733618, rs231775 und rs3087243 sowie daraus abgeleiteter Haplotypen auf die Mortalität und den Krankheitsverlauf bzw. die Krankheitsschwere von Patienten mit Sepsis untersuchen.

#### 2.1.1 Primäre und sekundäre Zielgrößen

Die primären Endpunkte dieser Studie sind die 28- und 90-Tage Mortalität im Hinblick auf o. g. genetische Varianten.

Sekundäre Zielgrößen sind Erhebungen zur Quantifizierung der Krankheitsschwere über den Betrachtungszeitraum; diese beinhalten die Untersuchung von Kenngrößen der allgemeinen und organspezifischen Organdysfunktion, die Dauer der Anwendung spezifischer Organersatzverfahren sowie Infekt-, Nieren- und Leberwerte. Genannte Zielgrößen werden näher spezifiziert in Abschnitt 2.2 dieser Arbeit.

#### 2.1.2 Patientenrekrutierung

In die vorliegende klinisch prospektive Untersuchung wurden im Zeitraum von April 2012 bis Juli 2018 644 Patienten mit Sepsis eingeschlossen. Durch die tägliche Sichtung und Evaluation aller stationär aufgenommenen Patienten der anästhesiologischen Intensivstation 0119 (ehemals der 0117 und 0118) sowie der allgemeinchirurgischen Intensivstationen 1012 und 1014 der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) wurden geeignete Patienten identifiziert. Voraussetzung für den Einschluss in die Untersuchung war neben dem Einverständnis zur Studienteilnahme das klinisch gesicherte Vorliegen des Krankheitsbildes Sepsis nach der jeweils gültigen Definition. Während ein Großteil der Patienten nach der Sepsis-2-Definition eingeschlossen worden ist, fanden ab Februar 2016 die SOFA-Kriterien der Sepsis-3-Definition Anwendung (vgl. 1.1.1). Ein eigens erstellter Screening-Bogen zur Verlaufsbetrachtung des SOFA-Scores und Identifizierung septischer Patienten kann dem Anhang dieser Arbeit entnommen werden (s. Anhang 1). Patienten, die mindestens eins der nachfolgenden Ausschlusskriterien erfüllten (s. Tabelle 2), waren von der Untersuchung ausgeschlossen:

**Tabelle 2: Patienten-Ausschlusskriterien**

<b>Ausschlusskriterien</b>
Alter unter 18 Jahren
Schwangerschaft oder stillende Mütter
Nicht-kaukasische Abstammung
Chemo-, immunsuppressive oder immunmodulatorische Therapie innerhalb von sechs Wochen vor Studieneinschluss
Myokardinfarkt innerhalb von sechs Wochen vor Studieneinschluss
HIV-Infektion ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
Chronische Herzinsuffizienz entsprechend NYHA-Klassifikation IV ( <i>New York Heart Association</i> )
Unheilbare Erkrankung im Endstadium, terminale Nierenerkrankung, therapierefraktäre Krebserkrankung oder Sauerstoffpflichtigkeit im häuslichen Umfeld (Heimbeatmung)
Palliatives Therapiekonzept, „ <i>Do not Resuscitate</i> “ (DNR)- oder „ <i>Do not Treat</i> “ (DNT)-Anweisung
Persistierender vegetativer Status (Apallisches Syndrom)
Teilnahme an interventioneller Studie
Familienangehörig oder selbst an Studie mitwirkend
Kein Einverständnis mit der Studienteilnahme

### 2.1.3 Studieneinverständnis und ethische Gesichtspunkte

Alle in diese Untersuchung eingeschlossenen Patienten oder deren gerichtlich eingesetzte Betreuer wurden über das Studienziel und den Studienablauf, die gesetzlichen Bestimmungen des Datenschutzes sowie die Möglichkeit der Einverständniserücknahme ihrer Studienteilnahme aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung ist von allen Studienteilnehmern oder deren gesetzlichen Betreuern eingeholt worden.

Das Studiendesign und die experimentellen Studienprotokolle wurden von der Ethikkommission der UMG unter der Antragsnummer 15/1/12 am 28. März 2012 genehmigt. Die Untersuchungen wurden unter Einhaltung der Vorgaben der Ethikkommission sowie der Grundsätze für medizinische Forschung am Menschen der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

## 2.2 Datenerhebung

Für alle in diese Untersuchung eingeschlossenen Patienten wurde eine Vielzahl persönlicher und klinischer Daten mittels *Case Report Forms* (CRFs) und einer elektronischen Datenbank erfasst. Alle anonymisiert aufgezeichneten und verarbeiteten patientenindividuellen Daten stammen aus den Patientendatenmanagementsystemen (PDMS) *IntelliSpace Critical Care & Anesthesia* (ICCA, ©Koninklijke Philips N.V., Amsterdam, Niederlande) und *Ixserv* (IXSERV.4, ©ixmid Software Technologie GmbH, Köln, Deutschland) sowie aus Arztbriefen, Verlegungsberichten und der klinischen Einschätzung der jeweils behandelnden Ärzte. Die erfassten Daten gliedern sich in Patientenbasischarakteristika und klinische Verlaufparameter während des Beobachtungszeitraums.

Die Patientenbasischarakteristika wurden zu Krankheitsbeginn der Sepsis erfasst; zu ihnen gehörten die patientenindividuellen Daten wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und *Body Mass Index* (BMI) und Daten der Krankenhaus- sowie Intensivstationsaufnahme, des Sepsis-Beginns und der Studienblutentnahme.

Weiterhin wurden sämtliche vorbestehende Medikationen und Vorerkrankungen erfasst, die entsprechend der nachfolgenden Abbildung aus der elektronischen Datenbank nach dem betreffenden Organsystem in kardiovaskulär, Atmung, Neurologie, gastrointestinal, Niere, Diabetes, Immunsystem und weitere Risikofaktoren gegliedert worden sind (s. Abbildung 6).

Zudem wurde für jeden Studienteilnehmer der *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score* (APACHE II), der *SOFA-Score* bei Sepsis-Beginn, das Vorhandensein eines septischen Shocks sowie die initiale Anwendung von Organersatzverfahren – wie mechanischer Ventilation, Katecholamin-Therapie oder Nierenersatzverfahren – ermittelt und in der Datenbank erfasst. Durch mikrobiologische Befunde bestätigte Infektfoki und der operative Status des Patienten – im Sinne einer konservativen Behandlung, einer Notfall-Operation oder einer elektiven Operation – wurden ebenfalls dokumentiert.

**Kardiovaskulär**

- Angina pectoris
- Arrythmie
- Herzvitium
- Myocardinfarkt
- Angeborener Herzfehler
- pAVK
- Hyperonus arteriell

Sonstige:

**Niere**

- Chronisches Nierenversagen

Sonstige:

**Diabetes**

- Diabetes mellitus (IDDM)
- Diabetes mellitus (NIDDM)
- Diabetes mit Organschäden

**Atmung**

- COPD
- Asthma bronchiale
- Cystische Fibrose
- Heimbeatmung

Sonstige:

**Immunsystem**

- Tumor
- Lymphom
- Leukämie
- Metastasen
- Rheumatoide Arthritis
- SLE

Sonstige:

**Neurologie**

- Apoplex
- Demenz

Sonstige:

**Gastro-Intestinal**

- Lebererkrankungen
- Gastro-Intestinale Blutung
- Gastro-Intestinal Sonstige

**Risikofaktoren Andere:**

- Langstreckige distale DHC-Stenose mit Aufstau der Gallenwege
- Z.n. ERCP mit Papillotomie 12/17
- Spinalkanalstenose
- Chron.Schmerzsyndrom

**Abbildung 6: Beispiel zur Erfassung der Vorerkrankungen in der elektronischen Datenbank.** (Eigene Darstellung).

Zur Bestimmung der primären Zielgrößen dieser Arbeit, der 28- und 90-Tage Mortalität, wurde das Überleben aller Studienteilnehmer mittels persönlichem Telefonat oder meldeamtlicher Anfrage nach 28 und 90 Tagen überprüft und vermerkt.

Während des Aufenthaltes auf der Intensivstation wurden für alle Patienten im Rahmen sogenannter täglicher „Visiten“ klinische Verlaufsparameter für einen Zeitraum von 28 Tagen erhoben, sofern der jeweilige Patient nicht vor Ablauf des 28-tägigen Zeitraums verstorben ist oder entlassen worden ist. Zu der täglichen Visitenfassung gehörten neben Röntgen-Thorax-Befundungen, mikrobiologischen Erregernachweisen, verabreichten Antibiotika und Blutprodukt-Substitutionen diverse nach Organsystem strukturierte klinische Parameter. Dazu zählten als allgemeine klinische Parameter die höchste und niedrigste Körpertemperatur [°C], Hämoglobin [g/dl], Hämatokrit [%], Erythrozyten- [ $10^6/\mu\text{l}$ ], Thrombozyten- [ $10^3/\text{mm}^3$ ] und Leukozytenzahlen [ $10^3/\text{mm}^3$ ].

Als Parameter des Herz-Kreislauf-Systems wurden minimale und maximale Herzfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ], minimaler und maximaler systolischer Blutdruck und MAD [mmHg] sowie die höchsten und niedrigsten Dosen der Katecholamine Norepinephrin [ $\mu\text{g}/\text{min}$ ], Epinephrin [ $\mu\text{g}/\text{min}$ ], und Dobutamin [ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ] erfasst.

Als Werte der respiratorischen Funktion wurden Atmungsform (spontan oder invasiv), minimale und maximale Atemfrequenz (AF) [ $\text{min}^{-1}$ ], der minimale Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) [mmHg] mit entsprechender inspiratorischer Sauerstofffraktion ( $\text{FiO}_2$ ) [mmHg], höchster und niedrigster arterieller pH-Wert und Basenüberschuss sowie der höchste Laktat-Wert [mmol/l] dokumentiert.

Aus Blutgasanalysen (BGAs) wurden die höchsten und niedrigsten täglichen Natrium- und Kaliumwerte [mmol/l] sowie der tagesdurchschnittliche Blutglukosespiegel [mg/dl] generiert.

Zur Beurteilung der Funktion der Niere wurden Serumkreatinin [mg/dl] und Urinausfuhr [ml/24h und ml/kg/24h] ausgewertet.

Als Leberparameter waren neben Bilirubin [mg/dl] und Transaminasen [IU/l] der Quick-Wert [%] und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) [sec.] Teil der Erhebung.

Anschließend wurden ebenfalls der höchste tägliche *Glasgow-coma-score*-Wert (GCS) zur Beurteilung des Bewusstseins und der ZNS-Funktion sowie das C-reaktive Protein (CRP) [mg/l] und das Procalcitonin [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ] als Entzündungsparameter dokumentiert.

Zur täglichen Erhebung der zuvor genannten Parameter wurden vorgefertigte Visitedatenbögen verwendet (s. Anhang 2).

Am Patientenstudieneinschluss und der Erfassung und Pflege der Daten in der elektronischen Datenbank waren zuvor mehrere Promotionskandidaten in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt. Der eigens erbrachte Arbeitsanteil an der Datenerhebung beinhaltete die 18-monatige Pflege, Ergänzung und Erweiterung der Datenbank sowie den Einschluss von etwa 100 Patienten mit Sepsis in die seit April 2012 bestehende Untersuchung.

## 2.3 Material

### 2.3.1 Geräte

Applied Biosystems™ 7900HT <i>Fast Real-Time PCR System with 384-Well Block Module</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Binder Standard-Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
BioRobot® EZ1 DSP <i>Workstation</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Eppendorf Bio Photometer®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Multipette® Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference® Pipette 1000, 100, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, variabel, 0,5 – 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
QIAcube® <i>Connect</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAcube® <i>Reagent Bottle Rack</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAcube® <i>Rotor Adapter Holder</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAcube® <i>Shaker Rack Plug</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
REAX 1R Labormixer (Vortexmischer)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Heraeus™ Multifuge™ X3R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
DNA Engine® <i>Thermal Cycler PTC-200 DNA Engine Cycler</i>	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

### 2.3.2 Substanzen

Ethanol <i>absolute for analysis</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TaqMan™ <i>Genotyping Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan™ SNP <i>Genotyping Assay</i> CTLA-4 rs231775 ( <i>Assay ID: C___2415786_20</i> )	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan™ SNP <i>Genotyping Assay</i> CTLA-4 rs3087243 ( <i>Assay ID: C___3296043_10</i> )	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan™ SNP <i>Genotyping Assay</i> CTLA-4 rs733618 ( <i>Assay ID: C___2415791_10</i> )	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland



### 2.3.3 Verbrauchsmaterialien

Avery Etiketten 38 x 21.2 mm weiß	AVERY ZWECKFORM GmbH, Oberlindern/Valley, Deutschland
Eppendorf Uvette® 8.5 mm <i>single sealed cuvettes</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gentle Skin® sensitive Untersuchungs- Handschuhe	Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Thermo Scientific™ <i>PCR Plates, 384-well, standard</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Thermo Scientific™ <i>Adhesive PCR Plate Seals</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Thermo Scientific™ <i>Absolute qPCR Plate Seals</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen:	
<i>Disposable Filter-Tips, 200 µl</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Disposable Filter-Tips, 1000 µl</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Micro Tips Premium 10 µl</i>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
TipOne® 100 µl <i>Bevelled Filter Tip (Sterile)</i>	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne® 1000 µl <i>RPT XL Graduated Filter Tip (Sterile)</i>	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
QIAcube® <i>Reagent Bottles, 30 ml</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAcube® <i>Rotor Adapters</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Röhrchen:	
<i>Collection Tubes (2 ml)</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Elution Tubes (1.5 ml)</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Screw-cap Sample Tubes CB (2 ml)</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
S-Monovette® 2.7 ml K3 EDTA	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 4.7 ml Lithium-Heparin-Gel	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

### 2.3.4 Kits und Assays

AllPrep DNA/RNA Mini <i>Kit</i> (50)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
EZ1 DNA <i>Blood</i> 350 µl <i>Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAamp® DNA <i>Blood</i> Mini <i>Kit</i> (250)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Extraktion genomischer DNA

Von allen 644 in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde genomische DNA für eine Genotypisierung mittels allelischer Diskriminierung extrahiert. Während die extrahierte DNA für 460 Patienten bereits aus vorherigen Studien am gleichen Patientenkollektiv vorlag, wurde die DNA der verbleibenden 184 Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit eigenständig extrahiert und photospektrometrisch bestimmt. Bereits vorliegende, gefrorene DNA ist einerseits mittels EZ1 DNA *Blood* 350  $\mu$ l *Kit* in der BioRobot EZ1 DSP *Workstation* aus 350  $\mu$ l Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Blut oder mittels QIAamp DNA *Blood* Mini *Kit* (250) aus 150  $\mu$ l EDTA-Blut extrahiert worden. Andererseits wurde DNA mit Hilfe des AllPrep DNA/RNA Mini *Kit* (50) aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus heparinisiertem Vollblut extrahiert. Reinheit und Konzentration der bereits vorliegenden DNA wurden photospektrometrisch bestimmt und ergaben für alle Proben normwertige 260 nm/280 nm-Extinktionsquotienten zwischen 1,7 und 1,9.

Die Extraktion genomischer DNA der verbleibenden 184 Studienteilnehmer wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit mittels QIAamp DNA *Blood* Mini *Kit* (250) im QIAcube *Connect* in den Laboratorien und unter der Supervision und Anleitung des Instituts für Klinische Pharmakologie der UMG (Direktor: Prof. Dr. med. J. Brockmöller) vorgenommen. Hierzu wurden die zu Beginn der Sepsis-Erkrankung abgenommenen und bei -20°C sachgemäß eingefrorenen EDTA-Blutproben zunächst bei 37°C im Inkubator aufgetaut.

Anschließend wurden in 12er-Chargen beschriftete 2 ml Schraubverschlussröhrchen mit jeweils 200  $\mu$ l Blut aus den EDTA-Monovetten befüllt. Die befüllten und mit Patientennummer gekennzeichneten Schraubverschlussröhrchen wurden nun in ein sog. *Shaker Rack* gestellt und mit diesem in den QIAcube Extraktionsroboter eingeführt. Vor dem Start des automatisierten Extraktionsverfahrens des QIAcubes wurde dieser mit *Disposable Filter Tips* 200  $\mu$ l und 1000  $\mu$ l, den Reagenzien des QIAamp DNA *Blood* Mini *Kits* sowie mit etikettierten 1,5 ml Elutionsröhrchen in vorgefertigten Rotoradaptern bestückt.

Im Anschluss daran konnte das ca. 40-minütige automatisierte Extraktionsprotokoll des QIAcubes gestartet werden. Am Ende dieses automatisch ablaufenden Pipettier-, Reaktions- und Zentrifugationsablaufs wurden die nun mit DNA-Eluat befüllten Elutionsröhrchen aus dem Roboter entnommen und die verbrauchten Einmalmaterialien im Infektionsmüll entsorgt.

Auch die Reinheit und Konzentration der nach dem zuvor beschriebenen Versuchsablauf eigenständig extrahierten DNA wurde mittels Photospektrometer bestimmt. Da das Absorptionsmaximum von DNA bei 260 nm und das verunreinigender Proteine bei 280 nm liegt, wurde die 260 nm/280 nm-Extinktionsfraktion zur Bestimmung der Probenreinheit herangezogen. Auch die eigenständig extrahierten DNA-Proben lagen analog zur o. g.

vorbestehenden extrahierten DNA im Normbereich zwischen 1,7 und 1,9. Für die DNA-Konzentration ergab sich anhand der Ausgabewerte des Photospektrometers ein Durchschnittswert von ca. 34 ng/µl mit einer *Range* von 10 bis 109 ng/µl, was ebenfalls im erwarteten Zielbereich der angewendeten Methode lag.

## 2.4.2 Genotypisierung mittels *Real-Time-PCR*

### 2.4.2.1 Grundlagen der Polymerasekettenreaktion

Die Methodik der Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) zur Vervielfältigung von DNA geht auf Kary Mullis zurück und wurde im Jahr 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (Mullis 1990). Grundlage dieser nicht mehr wegzudenkenden Labormethode ist die Aufspaltung der DNA-Doppelhelix und die wiederholte Replikation der antiparallel verlaufenden DNA-Stränge. Das Ziel ist die Vervielfältigung (Amplifikation) einer bekannten DNA-Sequenz.

Für die Reaktion werden neben der zu amplifizierenden DNA-Sequenz (*template*) sequenzspezifische *Primer*, eine DNA-Polymerase sowie Desoxyribonucleosidtriphosphate mit den vier Basen Thymin, Adenin, Cytosin und Guanin benötigt. Ein reibungsloser Reaktionsablauf wird durch eine ebenfalls benötigte Mg<sup>2+</sup>-haltige Pufferlösung sichergestellt. Die PCR läuft in mehreren Reaktionszyklen ab, die jeweils aus den drei Phasen Denaturierung (I), *Primer*-Hybridisierung (*Annealing*) (II) und Elongation (III) bestehen. Insgesamt sind 40 bis 50 Reaktionszyklen für eine ausreichende Amplifikat-Menge erforderlich.

In der Denaturierungsphase (I) werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelhelix bei 92-96°C gelöst, um die DNA in ihre Einzelstränge aufzuspalten.

Anschließend können sich in der Phase der *Primer*-Hybridisierung (II) sequenzspezifische *Primer*, die den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen, an die DNA-Einzelstränge anlagern; dieser Reaktionsschritt läuft bei einer *Primer*-spezifischen Reaktionstemperatur von ~60°C ab.

Die nachfolgende Elongationsphase (III) läuft ebenfalls bei einer Temperatur von ~60°C ab, bei der sich die DNA-Polymerase am 3'-Ende der *Primer* anlagert und von dort mit der Synthese der DNA komplementär zum *template* beginnt. Hierbei kommt eine thermostabile Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus Aquaticus* zur Anwendung, da sie die hohen Temperaturen der Denaturierungsphase aushalten kann; sie muss somit nicht nach jeder Denaturierungsphase erneut hinzugefügt werden.

Nach Ablauf der drei Phasen (I-III) sollten sich aus dem DNA-*template* zwei komplementäre Tochterstränge gebildet haben. Durch das mehrfache Durchlaufen der Reaktionszyklen erfolgt somit eine exponentielle Vermehrung der *template*-DNA. Mit zunehmender

Zyklusanzahl steigt allerdings auch das Risiko der Amplifikation unerwünschter Nebenprodukte.

#### 2.4.2.2 Grundlagen der Allelischen Diskriminierung

Zur Genotypisierung der Patienten war neben der spezifischen Amplifikation der untersuchten DNA-Sequenzen ebenfalls die Detektion und Quantifikation der vervielfältigten DNA-Abschnitte erforderlich.

Dieses erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung vorgefertigter TaqMan Genotypisierungs-*Assays*, welche neben SNP-spezifischen *Primern* auch farbstoffmarkierte TaqMan Sonden zum Nachweis spezifischer Allele in genomischer DNA beinhalteten.

Bei diesem Verfahren kommt es nur dann zu einer Erhöhung der zu messenden Fluoreszenz, wenn die amplifizierte DNA-Sequenz komplementär zur Sonde ist. Mit Hilfe eines TaqMan *Real Time* PCR Systems lässt sich somit das durch PCR-Amplifikation erzeugte Fluoreszenzsignal messen und genau bestimmen, welche Allele sich in der Probe befinden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Allelische Diskriminierung.

Nachfolgend sind die SNP-flankierenden DNA-Sequenzen mitsamt ihren allelspezifischen farbstoffmarkierten Fluoreszenzsonden (VIC, FAM) für die untersuchten SNPs dargestellt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Flankierende DNA-Sequenzen und allelspezifische Farbstoffmarkierungen

Farbstoff	SNP-flankierende Sequenzen (5' → 3') und jeweiliges Allel
<b>CTLA-4 rs733618:</b>	
<b>VIC</b>	TCTATCATGATCATGGGTTTAGCTG <b>C</b> CTGTCCCTGCCACTGCTGTGTGTTC
<b>FAM</b>	TCTATCATGATCATGGGTTTAGCTG <b>T</b> CTGTCCCTGCCACTGCTGTGTGTTC
<b>CTLA-4 rs231775:</b>	
<b>VIC</b>	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT <b>A</b> CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT
<b>FAM</b>	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT <b>G</b> CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT
<b>CTLA-4 rs3087243:</b>	
<b>VIC</b>	TC TTCACCACTATT TGGGATATAAC <b>A</b> TGGGTTAACACAGACATAGCAGTCC
<b>FAM</b>	TC TTCACCACTATT TGGGATATAAC <b>G</b> TGGGTTAACACAGACATAGCAGTCC

Eigene Darstellung.

### 2.4.2.3 Genotypisierung der Studienteilnehmer

Die Genotypisierung der Studienteilnehmer in Bezug auf die CTLA-4-Genloki rs733618, rs231775 und rs3087243 wurde nach dem Prinzip der Allelischen Diskriminierung mittels TaqMan Polymerasekettenreaktion und vorgefertigter SNP Genotypisierungs-*Assays* sachgemäß entsprechend der vorgestellten methodischen Grundlagen und Herstellerangaben durchgeführt.

Hierbei wurden die DNA-Sequenzen, welche die jeweils untersuchten SNPs beinhalteten, zunächst durch PCR amplifiziert und anschließend anhand von TaqMan Fluoreszenzmessungen bestimmt. Dabei kamen 3 unterschiedliche vom Hersteller vorgefertigte Genotypisierungs-*Assays* für die drei untersuchten CTLA-4-SNPs zum Einsatz. Es war zunächst die Vorbereitung eines PCR-Ansatzes entsprechend dem nachfolgenden Pipettierschema erforderlich (s. Tabelle 4).

**Tabelle 4: PCR-Ansatz für eine Reaktion**

TaqMan™ <i>Genotyping Master Mix</i>	2,5 µl
TaqMan™ SNP <i>Genotyping Assay</i>	0,1 µl
Ampuwa®	1,4 µl
Gesamtvolumen	4,0 µl

Anschließend wurden 384er *Well*-Platten mit 4 µl des PCR-Ansatzes und 1 µl der extrahierten DNA pro *Well* befüllt. Es wurde zum Zweck der Übersichtlichkeit nur die jeweils zweite Reihe der 384er *Well*-Platten befüllt, sodass pro Lauf maximal 184 Studienteilnehmer untersucht werden konnten. Es wurden bei jedem PCR-Ansatz Negativkontrollen mitgeführt, die alle Bestandteile des Ansatzes außer der hinzugefügten DNA enthielten. Sie dienten der Sicherstellung, dass keine Verunreinigungen vorlagen. Verunreinigte Ansätze wurden vollständig verworfen, sofern sich Signale in den Negativkontrollen im Rahmen der Allelischen Diskriminierung detektieren ließen. Ebenfalls wurden 20 % aller Proben zur Kontrolle zweifach untersucht.

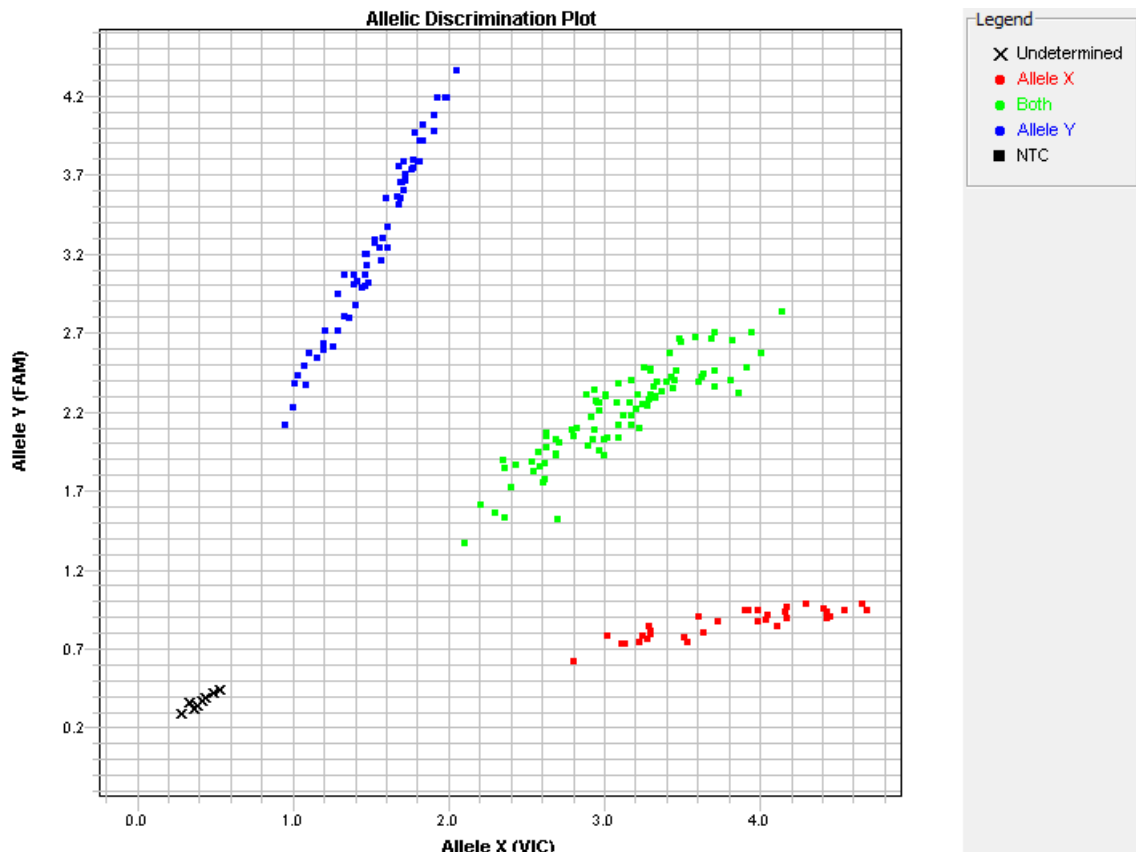
Nach kurzer Zentrifugation zur Vermeidung von Luftblasen wurden die nun befüllten und mit Abdeckfolie versehenen *Well*-Platten in den *Thermocycler* zum Reaktionsablauf der PCR entsprechend der Herstelleranweisungen gegeben; dabei kam das nachfolgende Thermoprofil des *Cyclers* zur Anwendung (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: *Thermocycler-Profil*

<b><i>Holding Stage:</i></b> Aktivierung der DNA-Polymerase	10 min 95°C	
<b><i>Cycling Stage:</i></b>		
a) Denaturierung	15 sec. 92°C	} 50 Zyklen
b) <i>Primer</i> -Hybridisierung	60 sec. 60°C	
c) Elongation	30 sec. 60°C	
Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung	4°C	

Im Anschluss an den knapp dreistündigen PCR-Reaktionsablauf wurden die Abdeckfolien der 384er *Well*-Platten durch optisch durchlässige Folien ausgetauscht zur Vorbereitung auf die Amplifikat-Detektion mittels quantitativer TaqMan *Real-Time* PCR. Bei diesem anschließenden Verfahren wurde die im Rahmen der PCR amplifizierte DNA durch ein automatisiertes *Real-Time* PCR Modul mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Als Ausgabewerte generierte das Modul sog. Allelische Diskriminierungs-*Plots* (s. Abbildung 7).

Die durchgeführten 20 % zweifach genotypisierten Kontrollen ergaben keine Abweichungen, sodass von einer hohen Qualität der Allelischen Diskriminierung ausgegangen werden kann. Darüber hinaus entsprachen die generierten Allel-Frequenzen des untersuchten Patientenkollektivs den erwarteten Verteilungen innerhalb einer Kaukasischen Referenzpopulation mit maximalen Abweichungen von ca. 2 % (vgl. 3.3.1).



**Abbildung 7: Beispiel eines Allelischen Diskriminierungs-Plots.** Dargestellt wird ein Allelischer Diskriminierungs-Plot am Beispiel des CTLA-4 rs3087243 SNPs für 184 durch farbige Punkte gekennzeichnete Studienteilnehmer und 8 als schwarze Kreuze dargestellte Negativkontrollen ohne Zusatz von DNA (NTCs, *non-template controls*). Auf der Ordinate ist die Stärke des Fluoreszenzsignals des Allels Y, auf der Abszisse die Stärke des Fluoreszenzsignals des Allels X abgetragen. Entsprechend stellen **blaue Punkte** homozygote Träger des Allels Y, **rote Punkte** homozygote Träger des Allels X und **grüne Punkte** Heterozygote dar. (Abbildung aus der Software SDS 2.4 - Applied Biosystems™ Sequence Detection System, Version 2.4 Enterprise Edition, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

## 2.5 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Genotypisierung und anschließenden Haplotypisierung der Studienteilnehmer wurde unter der Aufsicht und in Konsultation von Herrn Prof. Dr. M. Tzvetkov (Leiter des Instituts für Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald; zuvor: Institut für Klinische Pharmakologie der UMG) durchgeführt.

Zur Auswertung der mit Hilfe der o. g. molekulargenetischen Methoden ermittelten Genotypen kam die Software SDS 2.4 (Applied Biosystems™ Sequence Detection System, Version 2.4 Enterprise Edition, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) zur Anwendung. Hieraus konnten zunächst die Genotyp- und Allel-Frequenzen bestimmt werden. Es wurde mittels Chi-Quadrat-Test überprüft, ob sich die Allel-Häufigkeiten der Studienpopulation im Hardy-Weinberg-Equilibrium befanden.

Auf Basis der ermittelten patientenindividuellen Genotypen wurden im Rahmen dieser Arbeit Assoziationen bestimmter Allel-Ausprägungen mit einer erhöhten Mortalität bzw. einer erhöhten Krankheitsschwere untersucht. So kann die Veränderung eines einzelnen Nukleotids an einem bestimmten Genlocus (sog. SNP) bspw. über die Beeinflussung der Proteinfunktion oder der Genexpression ein gesteigertes Mortalitätsrisiko und/oder eine erhöhte Krankheitsschwere bewirken. Die Assoziation einer Allel-Ausprägung ist allerdings noch kein hinreichender Beweis eines kausalen Zusammenhangs mit einer erhöhten Mortalität und/oder Krankheitsschwere. Die Assoziation einer bestimmten Allel-Ausprägung kann auch durch das Kopplungsungleichgewicht, das sog. *Linkage Disequilibrium*, durch eine in räumlicher Nähe liegende abhängig vererbte andere Allel-Ausprägung zustande kommen (Burton et al. 2005). Eine *Linkage-Disequilibrium*-Analyse (Untersuchung des Koppelungsungleichgewichts) wurde aus diesem Grund anhand der HAPLOVIEW Software (Version 4.2, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA) vorgenommen.

Durch die Abhängigkeit der Allel-Ausprägung unterschiedlicher Polymorphismen, die in großem *Linkage* zueinanderstehen, ist die Anzahl in der Natur vorkommender möglicher Allel-Kombinationen eingeschränkt. Die Kombinationen aufgrund ihrer räumlichen Nähe gemeinschaftlich miteinander vererbter Allel-Ausprägungen auf demselben Chromosom werden Haplotypen genannt (Freudenberg et al. 2002; Ziegler 2002).

Durch die Rekonstruktion und Analyse von Haplotypen konnte der Informationsgehalt dieser genetischen Assoziationsstudie gesteigert und eine größere statistische Aussagekraft der Untersuchung erzielt werden (Clark 2004; Barrett et al. 2005). So können bspw. erst durch die Analyse von Haplotypen kombinierte bzw. additive Effekte nachgewiesen werden, die mehrere krankheitsassoziierte Loci umfassen. Dabei führt nicht die Genausprägung an einem einzelnen SNP, sondern erst die Kombination gemeinschaftlich vererbter benachbarter Allele zu dem untersuchten Effekt. Die Rekonstruktion von Haplotypen aus den Daten der Allelischen Diskriminierung erfolgte mit Hilfe der Software PHASE (Version



2.1, Matthew Stephens, Washington, Oklahoma, USA), welche auf Bayes'schen statistischen Verfahren basiert. Die Rekonstruktion der Haplotypen wurde in 100 Durchläufen zur Ermittlung der wahrscheinlichsten Haplotypen-Kombination für jeden Studienteilnehmer mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 99,9 % der angenommenen Haplotypen-Kombination durchgeführt.

Die resultierenden genetischen Varianten und daraus abgeleiteten Haplotypen wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede in Bezug auf die primären und sekundären Zielgrößen (vgl. 2.1) untersucht. Die sachgemäße Anwendung der korrekten statistischen Methoden wurde im Rahmen der Biometrie-Sprechstunde des Instituts für Medizinische Statistik der UMG sowie bei der Veröffentlichung der Ergebnisse durch Prof. Dr. T. Beißbarth (Direktor der Abteilung Medizinische Bioinformatik der UMG) überprüft und abgestimmt. Für die statistischen Auswertungen und die Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven wurde STATISTICA 13 Software (Version 13.5.0.17, TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA) genutzt. Dabei wurden P-Werte  $< 0,05$  als „signifikant“,  $< 0,01$  als „sehr signifikant“ sowie  $< 0,001$  als „hoch signifikant“ angenommen.

Der Pearson Chi-Quadrat-Tests und der zweiseitige exakte Fisher-Test wurden zur Auswertung diskreter Variablen der Patientenbasischarakteristika und der Analyse der Krankheitsschwere herangezogen. Die Darstellung diskreter Variablen erfolgte im Ergebnisteil dieser Arbeit als absolute Zahlen oder Prozentzahlen; demgegenüber wurden kontinuierliche Variablen als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung oder bei nicht normalverteilten Daten als Median mit Interquartilsabstand (IQR) dargestellt. Kontinuierliche Variablen sind mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests oder – wenn anwendbar – mit dem Kruskal-Wallis-Test untersucht worden.

Bei Überlebenszeitanalysen (*time-to-event*-Daten) kam der Log-Rank-Test zum Einsatz; die Darstellung der kumulierten Überlebensanteile erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurven.

Die Untersuchung des Einflusses bestimmter Genotypen bzw. Haplotypen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit erfolgte darüber hinaus unter Berücksichtigung potentieller Störfaktoren und Kovariablen im multivariaten Modell der Cox-Regressionsanalyse. Die kalkulierten Schätzer für die Größe des Einflusses werden als adjustierte *Hazard Ratios* mitsamt 95 %igem Konfidenzintervall (CI) angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Überblick

Als zentrale Fragestellung dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und inwieweit genetische Varianten der SNPs CTLA-4 rs733618, rs231775 und rs3087243 sowie daraus abgeleitete Haplotypen die Mortalität und den Krankheitsverlauf von Patienten mit Sepsis beeinflussen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind zwecks Übersichtlichkeit folgendermaßen gegliedert worden: Nach einer kurzen Betrachtung epidemiologischer Charakteristika der untersuchten Studienpopulation wurden die Ergebnisse der Genotypisierung und Haplotypisierung mitsamt Allel- und Haplotypen-Frequenzen dargestellt. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden Gruppen gleichartiger genetischer Merkmalsträger gebildet und Unterschiede dieser Gruppen in Bezug auf Basischarakteristika (d. h. klinischer Zustand bei Studieneinschluss), auf die Mortalität im Rahmen der Sepsis und auf Parameter der Krankheitsschwere untersucht. Neben den 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen sind darüber hinaus multivariate Regressionsanalysen zur Adjustierung für potentielle Störvariablen durchgeführt worden. Aufgrund der Menge an Untersuchungsergebnissen und klinischen Daten, beschränken sich die dargestellten Ergebnisse auf die genetischen Varianten, für die signifikante Mortalitätsunterschiede im Rahmen der Überlebenszeitanalysen nachgewiesen werden konnten.

### 3.2 Epidemiologische Beschreibung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden im Zeitraum von April 2012 bis Oktober 2018 644 kaukasische Patienten mit Sepsis in diese Untersuchung eingeschlossen. Die Patienten waren im Durchschnitt  $63 \pm 15$  Jahre alt, zum überwiegenden Anteil von 66 % männlichen Geschlechts und besaßen einen durchschnittlichen BMI von  $28 \pm 6$ . Mehr als die Hälfte der Patienten (53 %) entwickelte eine Sepsis im Anschluss an eine Notfalloperation, 29 % nach elektiven Eingriffen und 18 % im Rahmen einer konservativen Therapie. Häufige vor Einschluss in die Untersuchung bestehende Vorerkrankungen waren arterielle Hypertonie (54 %), Insulin-abhängiger und nicht Insulin-abhängiger Diabetes mellitus (20 %), Tumorleiden (16 %) sowie chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD, 15 %). Die Patienten hielten sich im Schnitt  $20 \pm 16$  Tage auf der Intensivstation und  $40 \pm 29$  Tage stationär in der UMG auf; sie befanden sich zu 51 % im septischen Schock. Zu Beginn der Sepsis betrug der mittlere *SOFA-Score*  $9,4 \pm 3,9$ ; der *APACHE II-Score* – als Kenngröße für den akuten und chronischen Gesundheitszustand von Patienten auf der Intensivstation – belief sich auf  $22 \pm 7$ . Von den Patienten wurden 86 % maschinell beatmet, 67 % erhielten Katecholamin-Therapie und 9 % Dialyse oder Hämofiltration als Nierenersatzverfahren. Alle erläuterten Daten können aus Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10 des Abschnitts 3.4 entnommen werden.

### 3.3 Genotypisierung und Haplotypisierung

#### 3.3.1 Ergebnisse der Genotypisierung und Allel-Frequenzen

Alle 644 in diese Untersuchung eingeschlossenen Studienteilnehmer konnten erfolgreich in Bezug auf die drei untersuchten Polymorphismen genotypisiert werden. Bei den 20 % zur Qualitätssicherung zweifach genotypisierten Patientenproben gab es keine Abweichungen von der erstmaligen Probenmessung. Es ergaben sich die in Tabelle 6 aufgelisteten Allel-Häufigkeiten, dargestellt als absolute Zahlen (n) und prozentuale Werte (%).

Hieraus wurden die Frequenzen des selteneren Allels, MAFs, für die Studienpopulation gebildet (kalkulierte MAF) und mit den MAFs der Kaukasischen HapMap CEPH (CEU) Referenzpopulation verglichen. Die kalkulierten MAFs des untersuchten Patientenkollektivs entsprachen in etwa denen der Referenzpopulation; es ergaben sich maximale Abweichungen i.H.v. < 2 % gegenüber den Erwartungswerten.

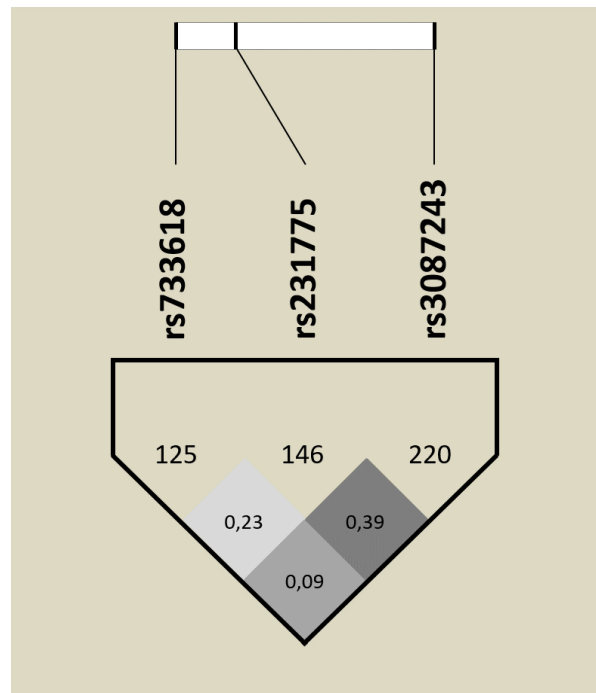
Daneben befanden sich alle Auftretenshäufigkeiten der untersuchten Genotypen im Hardy-Weinberg-Equilibrium ( $\chi^2$ -Test  $p > 0,05$ ).

**Tabelle 6: Verteilung der Genotypen und Allel-Frequenzen**

Einzelnukleotidpolymorphismus	Genotyp	n (%)	Kalkulierte MAF	HapMap CEPH (CEU) Referenz-MAF	Hardy-Weinberg Equilibrium ( $\chi^2$ -Test p-Wert)
CTLA-4 rs733618	CC	4 (0,62)	0,0788	0,06	0,8789
	CT	90 (13,98)			
	TT	550 (85,40)			
CTLA-4 rs231775	GG	101 (15,68)	0,3960	0,38	0,2156
	AG	289 (44,88)			
	AA	254 (39,44)			
CTLA-4 rs3087243	AA	142 (22,05)	0,4696	0,46	0,2448
	AG	305 (47,36)			
	GG	197 (30,59)			

### 3.3.2 Linkage-Disequilibrium-Analyse

Die durchgeführte *Linkage Disequilibrium* Analyse der drei untersuchten SNPs ergab die in Abbildung 8 graphisch dargestellten Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) von 0,39 für CTLA-4 rs231775 und rs3087243, 0,23 für rs733618 und rs231775 sowie 0,09 für rs733618 und rs3087243. Entsprechend befanden sich die untersuchten SNPs in niedrigem bzw. mäßigem *Linkage* zueinander.

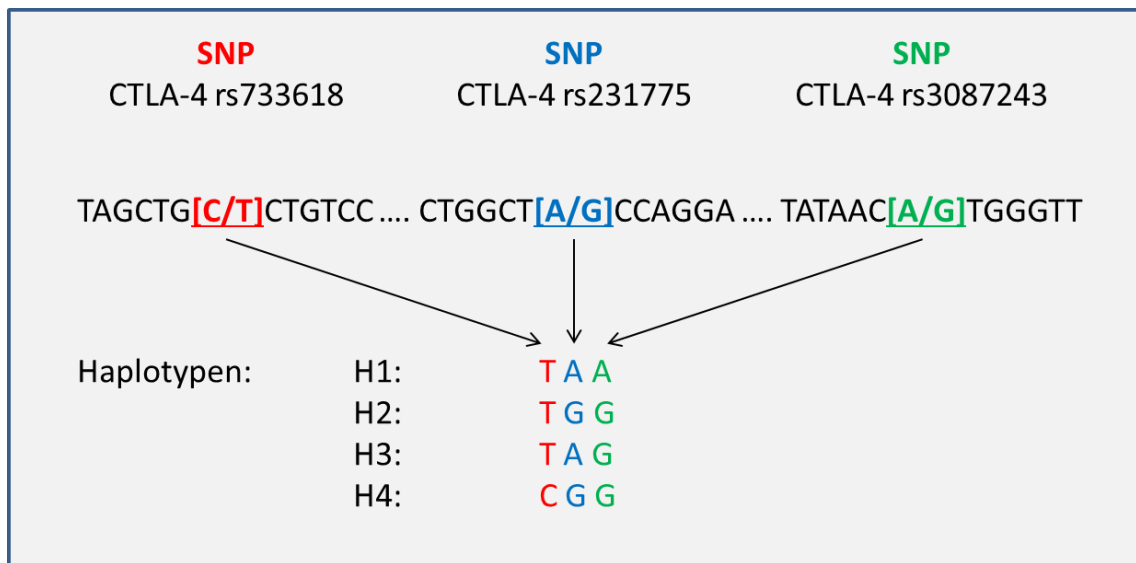


**Abbildung 8: Linkage-Disequilibrium-Analyse der Einzelnukleotidpolymorphismen CTLA-4 rs733618, rs231775 und rs3087243.** Dargestellt ist der Abschnitt des *CTLA-4*-Gens, der die untersuchten SNPs rs733618, rs231775 und rs3087243 beinhaltet (weißer Balken). Darauf eingetragen können die entsprechenden Lokalisationen der SNPs abgelesen werden (schwarze Markierungen). In Graustufen hinterlegt kann man der Abbildung die entsprechenden Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) jeweils zweier SNPs (z. B. 0,39) zueinander entnehmen. (Eigene Darstellung basierend auf HAPLOVIEW Software, Version 4.2, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA).

### 3.3.3 Haplotypen-Bildung

Aus den zuvor beschriebenen Ergebnissen der Genotypisierung in Bezug auf die drei untersuchten SNPs wurde die wahrscheinlichste Haplotypen-Kombination für jeden der Studienteilnehmer entsprechend den in Abschnitt 2.5 beschriebenen Methoden rekonstruiert.

In Abbildung 9 sind die in der Natur am häufigsten vorkommenden Haplotypen, H1: TAA, H2: TGG, H3: TAG und H4: CGG, die sich aus den Allel-Ausprägungen der SNPs ergeben, dargestellt.



**Abbildung 9: Bildung der CTLA-4-Haplotypen.** Dargestellt wurden die sich aus den SNPs CTLA-4 rs733618, rs231775 und rs3087243 abgeleiteten und in der Natur am häufigsten vorkommenden Genkombinationen, die Haplotypen H1: TAA, H2: TGG, H3: TAG und H4: CGG. (Eigene Darstellung).

### 3.3.4 Haplotypen-Verteilung

Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes des menschlichen Körpers kann jedes der untersuchten Individuen dieser Arbeit den jeweiligen Haplotyp H1: TAA, H2: TGG, H3: TAG und H4: CGG entweder kein Mal, ein Mal oder zwei Mal tragen. Die durch die Haplotypen-Analyse ermittelten Verteilungen der Haplotypen-Häufigkeiten können der Tabelle 7 als absolute Zahlen (n) sowie prozentuale Werte (%) entnommen werden.

Tabelle 7: Haplotypen-Verteilung

CTLA-4-Haplotypen	Anzahl an Haplotypen	n (%)
H1: TAA	0	197 (30,59)
	1	305 (47,36)
	2	142 (22,05)
H2: TGG	0	316 (49,07)
	1	263 (40,84)
	2	65 (10,09)
H3: TAG	0	451 (70,03)
	1	178 (27,64)
	2	15 (2,33)
H4: CGG	0	550 (85,40)
	1	90 (13,98)
	2	4 (0,62)

Den in vorausgegangenen Studien beschriebenen Assoziationen entsprechend (vgl. 1.2.4) wurden die CTLA-4 rs231775 A-Allel-Träger (AG- und AA-Genotyp; n = 543) für die weiteren Analysen dieser Arbeit zusammengefasst und homozygoten Trägern des G-Allels (GG; n = 101) gegenübergestellt; weiterhin wurden CTLA-4 rs3087243 G-Allel-Träger (AG- und GG-Genotyp; n = 502) den AA-Homozygoten (AA; n = 142) gegenübergestellt sowie Haplotyp H1: TAA positive, d. h. ein- oder zweimalige Träger des H1: TAA-Haplotyps (n = 447), gegenüber H1: TAA negativen Individuen (keine Träger des H1: TAA-Haplotyps; n = 197) zusammengefasst.

### 3.4 Epidemiologische und klinische Basischarakteristika zu Sepsis-Beginn

Bei der Untersuchung epidemiologischer und klinischer Basischarakteristika wurde der klinische Zustand der Patienten bei Beginn der Sepsis, also dem Zeitpunkt des Studieneinschlusses, analysiert. Hierbei lag der Fokus auf den Unterschieden zwischen den jeweiligen genetischen Merkmalsträgern.

CTLA-4 rs231775 GG-Homozygote wiesen bei Studieneinschluss signifikant höhere BMI-Werte als A-Allel-Träger ( $29 \pm 7$  ggü.  $27 \pm 6$ ;  $p = 0,0365$ ; s. Tabelle 8) auf, während sich keine signifikanten Unterschiede der Gruppen in Bezug auf Alter oder Geschlecht ergaben. Auch in Bezug auf die Krankheitsschwere bei Sepsis-Beginn, d. h. gemessen am Anteil der Patienten im septischen Schock sowie an durchschnittlichen SOFA- und APACHE II-Scores, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen festzustellen.

Das darüber hinaus untersuchte Profil an häufigen Vorerkrankungen erwies sich zwischen den zwei Gruppen als ähnlich verteilt mit Ausnahme der chronischen Lebererkrankungen, die signifikant häufiger bei GG-Homozygoten im Vergleich zu A-Allel-Trägern vorbestanden (11 % ggü. 6 %;  $p = 0,0425$ ; s. Tabelle 8).

Die Häufigkeiten vor Beginn der Sepsis durchgeführter operativer Eingriffe, der primären Infektlokalisationen (Infektfoki) sowie die Notwendigkeit der Anwendung von Organersatzverfahren waren ebenfalls ähnlich zwischen den zwei Gruppen verteilt. Allerdings sollte hervorgehoben werden, dass 6 % mehr der Gruppe GG-homozygoter Patienten bei Studieneinschluss Dialyse bzw. Hämodiafiltration als Organersatzverfahren erhielten im Vergleich zu den A-Allel-Trägern; dieser Unterschied (14 % ggü. 8 %;  $p = 0,0535$ ; s. Tabelle 8) erwies sich allerdings nicht als statistisch signifikant.

Tabelle 8: Patientenbasischarakteristika in Bezug auf CTLA-4 rs231775 Genotypen

Parameter	Alle (n = 644)	rs231775		p-Wert	
		GG (n = 101)	AG/AA (n = 543)		
Alter [Jahre]	63 ± 15	63 ± 14	63 ± 15	0,5354	
Männl. Geschlecht [%]	66	62	67	0,3829	
Body Mass Index	28 ± 6	29 ± 7	27 ± 6	<b>0,0365</b>	
<b>Sepsis-Krankheitsschwere</b>					
Septischer Schock, [%]	51	50	52	0,6786	
SOFA-Score Tag 1	9,4 ± 3,9	9,8 ± 3,9	9,3 ± 3,9	0,3057	
APACHE II-Score Tag 1	22 ± 7	22 ± 7	22 ± 7	0,5020	
<b>Komorbiditäten [%]</b>					
Arterieller Hypertonus	54	54	54	0,9540	
Erlittener Myokardinfarkt	5	6	2	0,0954	
COPD	15	15	15	0,9486	
Niereninsuffizienz	10	11	10	0,8613	
Nicht-Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus	9	11	8	0,4318	
Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus	11	14	10	0,2396	
Chronische Lebererkrankung	6	11	6	<b>0,0425</b>	
Tumorleiden	16	13	16	0,4221	
Erlittener Schlaganfall	6	6	6	0,9852	
<b>Vorheriger operativer Eingriff [%]</b>					
Elektive Operation	29	25	30	0,5320	
Notfalloperation	53	57	52		
Keine Operation	18	18	18		
<b>Primärer Infektfokus [%]</b>					
Lunge	62	63	62	0,6989	
Abdomen	20	22	20		
Knochen oder Weichteilgewebe	4	4	4		
Chirurgische Wunde	2	2	1		
Urogenital	2	1	3		
Primäre Bakteriämie	7	3	7		
Anderer	3	5	3		
<b>Organersatzverfahren [%]</b>					
Mechanische Ventilation	86	88	85		0,4520
Katecholamin-Therapie	67	70	66	0,3928	
Nierenersatzverfahren	9	14	8	0,0535	



In Bezug auf den CTLA-4 rs3087243 Genotyp konnte ebenfalls ein vergleichbarer klinischer Zustand der Patienten für nahezu alle untersuchten Kategorien – Krankheitsschwere, Häufigkeit von Komorbiditäten, vorherige operative Eingriffe, primäre Infektfoki sowie Anwendung von Organersatzverfahren – zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses festgestellt werden. Das untersuchte Patientenkollektiv wies lediglich einen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Alter auf: CTLA-4 rs3087243 AA-Homozygote waren bei Sepsis-Beginn im Schnitt  $67 \pm 14$  und G-Allel-Träger  $62 \pm 15$  Jahre alt ( $p = 0,0033$ ). AA-Homozygote erlitten vor Studieneinschluss häufiger Schlaganfälle als G-Allel-Träger (9 % ggü. 5 %), wofür allerdings keine statistische Signifikanz erreicht wurde ( $p = 0,0623$ ; s. Tabelle 9).

**Tabelle 9: Patientenbasischarakteristika in Bezug auf CTLA-4 rs3087243 Genotypen**

Parameter	Alle (n = 644)	rs3087243		p-Wert
		AA (n = 142)	GG/AG (n = 502)	
Alter [Jahre]	$63 \pm 15$	$67 \pm 14$	$62 \pm 15$	<b>0,0033</b>
Männl. Geschlecht [%]	66	64	67	0,5560
Body Mass Index	$28 \pm 6$	$27 \pm 6$	$28 \pm 6$	0,2881
<b>Sepsis-Krankheitsschwere</b>				
Septischer Schock, [%]	51	52	51	0,8467
SOFA-Score Tag 1	$9,4 \pm 3,9$	$9,4 \pm 3,9$	$9,4 \pm 3,9$	0,8047
APACHE II-Score Tag 1	$22 \pm 7$	$22 \pm 7$	$21 \pm 7$	0,2844
<b>Komorbiditäten [%]</b>				
Arterieller Hypertonus	54	53	55	0,7094
Erlittener Myokardinfarkt	5	6	5	0,9057
COPD	15	12	16	0,2436
Niereninsuffizienz	10	8	11	0,3879
Nicht-Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus	9	8	9	0,8492
Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus	11	12	10	0,5349
Chronische Lebererkrankung	6	6	6	0,9875
Tumorleiden	16	15	16	0,7830
Erlittener Schlaganfall	6	9	5	0,0623
<b>Vorheriger operativer Eingriff [%]</b>				
Elektive Operation	29	37	27	0,0831
Notfalloperation	53	46	55	
Keine Operation	18	17	18	
<b>Primärer Infektfokus [%]</b>				
Lunge	62	64	61	0,6920
Abdomen	20	20	20	
Knochen oder Weichteilgewebe	4	3	4	
Chirurgische Wunde	2	2	1	
Urogenital	2	1	3	
Primäre Bakteriämie	7	6	7	
Anderer	3	4	4	
<b>Organersatzverfahren [%]</b>				
Mechanische Ventilation	86	86	86	0,9381
Katecholamin-Therapie	67	66	67	0,9048
Nierenersatzverfahren	9	9	9	0,8851

Bei der Gegenüberstellung von Trägern des in der Natur am häufigsten vorkommenden Haplotyps H1: TAA mit H1: TAA negativen Studienteilnehmern zeigte sich eine hoch signifikant häufigere Anwendung von Nierenersatzverfahren der H1: TAA negativen Patienten zu Studieneinschluss (15 % ggü. 9 %,  $p = 0,0005$ ; s. Tabelle 10). In Bezug auf alle weiteren untersuchten epidemiologischen und klinischen Basischarakteristika wiesen die zwei Gruppen ähnliche Werte auf und demzufolge konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

**Tabelle 10: Patientenbasischarakteristika in Bezug auf den H1: TAA-Haplotyp**

Parameter	Alle (n = 644)	H1: TAA		p-Wert
		positive (n = 447)	negative (n = 197)	
Alter [Jahre]	63 ± 15	64 ± 15	62 ± 14	0,1014
Männl. Geschlecht [%]	66	67	64	0,4356
Body Mass Index	28 ± 6	28 ± 6	28 ± 7	0,2388
<b>Sepsis-Krankheitsschwere</b>				
Septischer Schock, [%]	51	51	53	0,6384
SOFA-Score Tag 1	9,4 ± 3,9	9,3 ± 3,9	9,7 ± 3,8	0,1802
APACHE II-Score Tag 1	22 ± 7	21 ± 7	22 ± 7	0,1474
<b>Komorbiditäten [%]</b>				
Arterieller Hypertonus	54	54	54	0,9671
Erlittener Myokardinfarkt	5	6	3	0,0758
COPD	15	15	16	0,5779
Niereninsuffizienz	10	10	11	0,6734
Nicht-Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus	9	9	8	0,6654
Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus	11	9	13	0,1480
Chronische Lebererkrankung	6	6	8	0,3893
Tumorleiden	16	12	17	0,0731
Erlittener Schlaganfall	6	6	6	0,8209
<b>Vorheriger operativer Eingriff [%]</b>				
Elektive Operation	29	31	26	0,4149
Notfalloperation	53	52	54	
Keine Operation	18	17	20	
<b>Primärer Infektfokus, n [%]</b>				
Lunge	62	64	58	0,1336
Abdomen	20	19	21	
Knochen oder Weichteilgewebe	4	3	6	
Chirurgische Wunde	2	2	2	
Urogenital	2	2	3	
Primäre Bakteriämie	7	7	6	
Anderer	3	3	4	
<b>Organersatzverfahren [%]</b>				
Mechanische Ventilation	86	86	85	0,8341
Katecholamin-Therapie	67	66	69	0,4944
Nierenersatzverfahren	9	6	15	<b>0,0005</b>

### 3.5 Kaplan-Meier Überlebenszeitanalysen

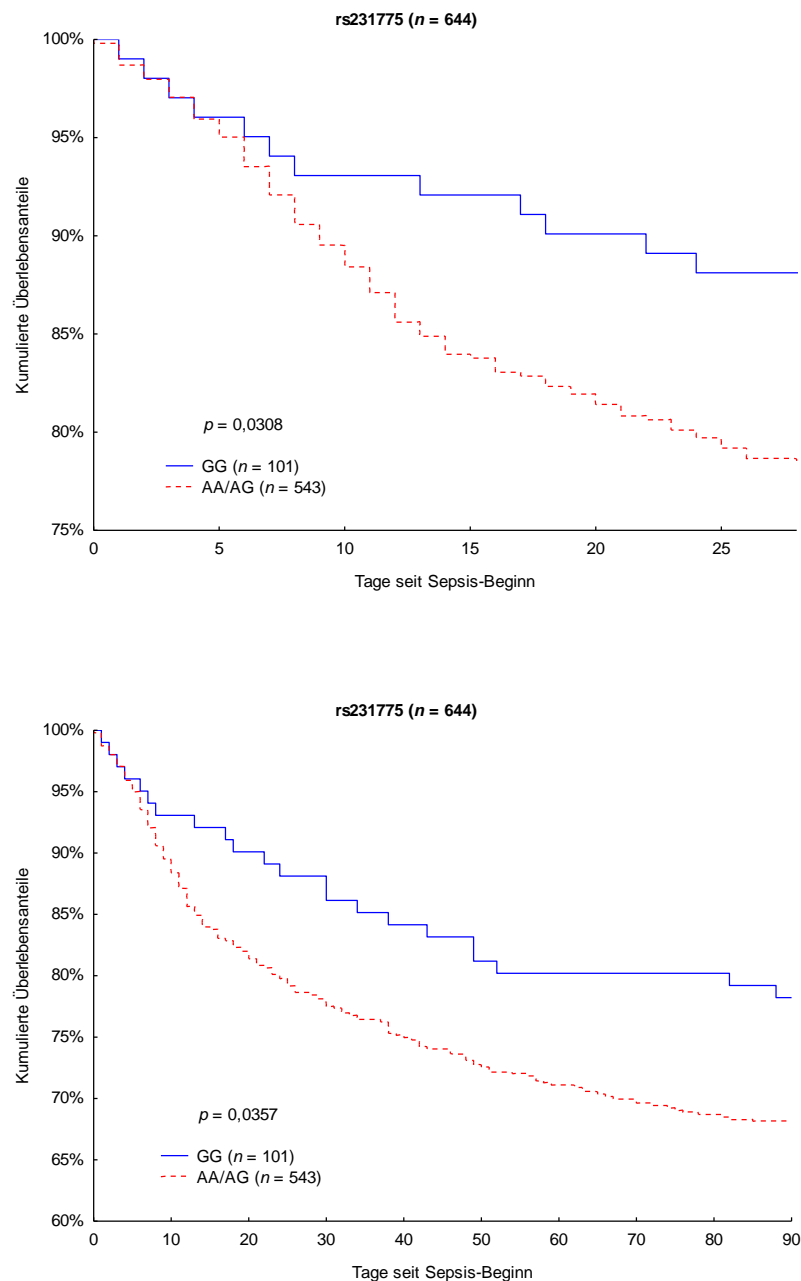
Die primären Zielgrößen dieser Arbeit – die 28- und 90- Tage Mortalitätsraten – wurden mittels Log-Rank-Test (vgl. 2.5) analysiert und durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Für die 644 septische Patienten umfassende Studienpopulation betrug die Gesamtmortalitätsrate nach 28 Tagen 20 % (n = 129) und nach 90 Tagen 30,3 % (n = 195; s. Tabelle 11).

Als wesentliches Ergebnis stellte sich heraus, dass für die 28- und 90-Tage Mortalitätsraten der CTLA-4-SNPs rs231775 und rs3087243 sowie für den CTLA-4-Haplotyp H1: TAA statistisch signifikante Unterschiede bestanden (s. Tabelle 11). Demgegenüber blieben die Mortalitätsunterschiede anderer genetischer Varianten (CTLA-4 rs733618, H2: TGG, H3: TAG und H4: CGG) ohne statistische Signifikanz.

**Tabelle 11: Vergleich der 28- und 90-Tage Mortalitätsraten**

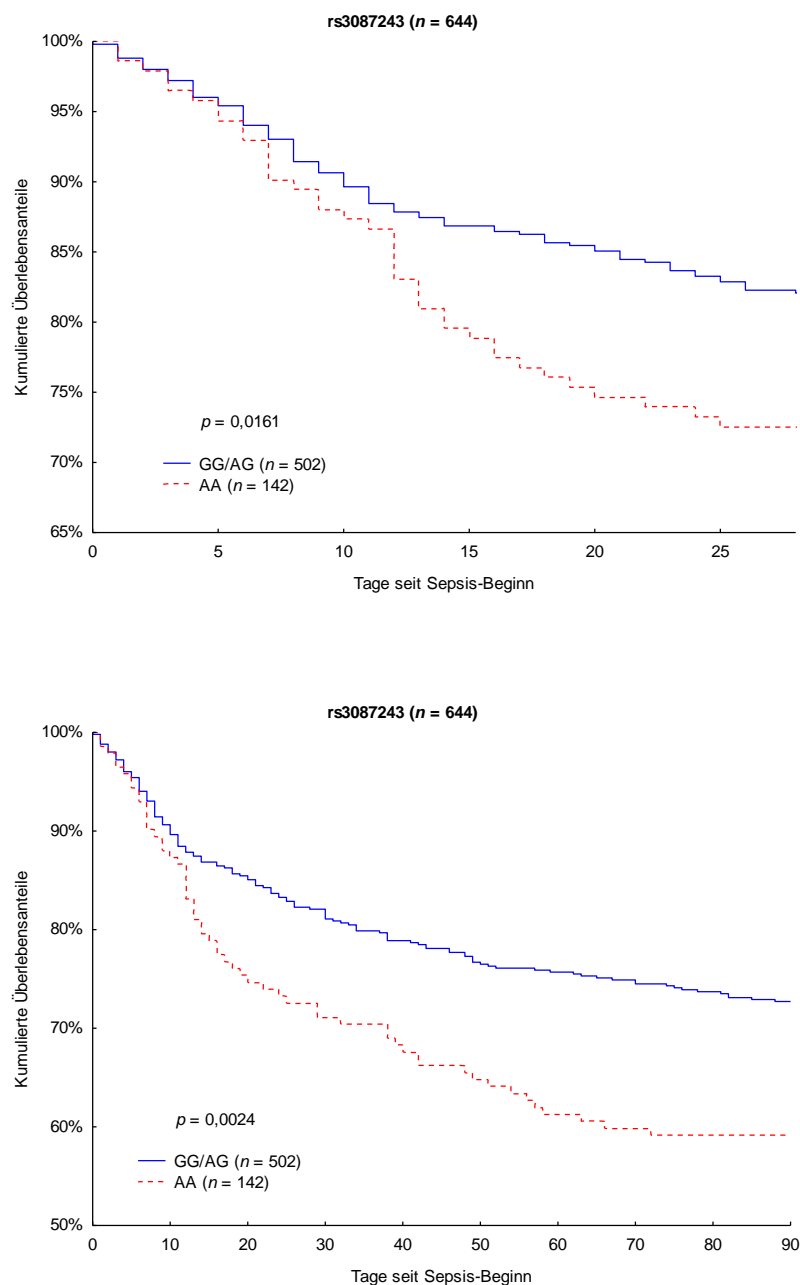
	n (%)		p-Wert
<b>Gesamte Studienpopulation (n = 644)</b>			
28 Tage Mortalität	129 (20 %)		
90-Tage Mortalität	195 (30,3 %)		
<b>CTLA-4 rs733618 SNP</b>			
	TT-Homozygote (n = 550)	C-Allel-Träger (n = 94)	
28 Tage Mortalität	113 (20,5 %)	16 (17 %)	0,4693
90-Tage Mortalität	168 (30,5 %)	27 (28,7 %)	0,6864
<b>CTLA-4 rs231775 SNP</b>			
	GG-Homozygote (n = 101)	A-Allel-Träger (n = 543)	
28 Tage Mortalität	12 (11,9 %)	117 (21,5 %)	<b>0,0308</b>
90-Tage Mortalität	22 (21,8 %)	173 (31,9 %)	<b>0,0357</b>
<b>CTLA-4 rs3087243 SNP</b>			
	AA-Homozygote (n = 142)	G-Allel-Träger (n = 502)	
28 Tage Mortalität	39 (27,5 %)	90 (17,9 %)	<b>0,0161</b>
90-Tage Mortalität	58 (40,8 %)	137 (27,3 %)	<b>0,0024</b>
<b>CTLA-4 H1: TAA-Haplotyp</b>			
	positive (n = 447)	negative (n = 197)	
28 Tage Mortalität	100 (22,4 %)	29 (14,7 %)	<b>0,0271</b>
90-Tage Mortalität	147 (32,9 %)	48 (24,4 %)	<b>0,0265</b>
<b>CTLA-4 H2: TGG-Haplotyp</b>			
	positive (n = 328)	negative (n = 316)	
28 Tage Mortalität	60 (18,3 %)	69 (21,8 %)	0,1955
90-Tage Mortalität	89 (27,1 %)	106 (33,5 %)	0,0613
<b>CTLA-4 H3: TAG-Haplotyp</b>			
	positive (n = 193)	negative (n = 451)	
28 Tage Mortalität	33 (17,1 %)	96 (21,3 %)	0,3004
90-Tage Mortalität	51 (26,4 %)	144 (31,9 %)	0,2220
<b>CTLA-4 H4: CGG-Haplotyp</b>			
	positive (n = 94)	negative (n = 550)	
28 Tage Mortalität	16 (17 %)	113 (20,5 %)	0,4693
90-Tage Mortalität	27 (28,7 %)	168 (30,5 %)	0,6864

Im Vergleich der Überlebenszeitanteile zwischen den genetischen Merkmalsträgern konnte eine signifikant niedrigere 28-Tage Mortalität CTLA-4 rs231775 GG-homozygoter Patienten (11,9 %) gegenüber A-Allel-Trägern an diesem Polymorphismus (21,5 %,  $p = 0,0308$ ; s. Abbildung 10, oberer Graph) nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten CTLA-4 rs231775 GG-homozygote Patienten auch über den untersuchten 90-tägigen Betrachtungszeitraum eine signifikant niedrigere Mortalität (21,8 %) als A-Allel-Träger (31,9 %,  $p = 0,0357$ ; s. Abbildung 10, unterer Graph).



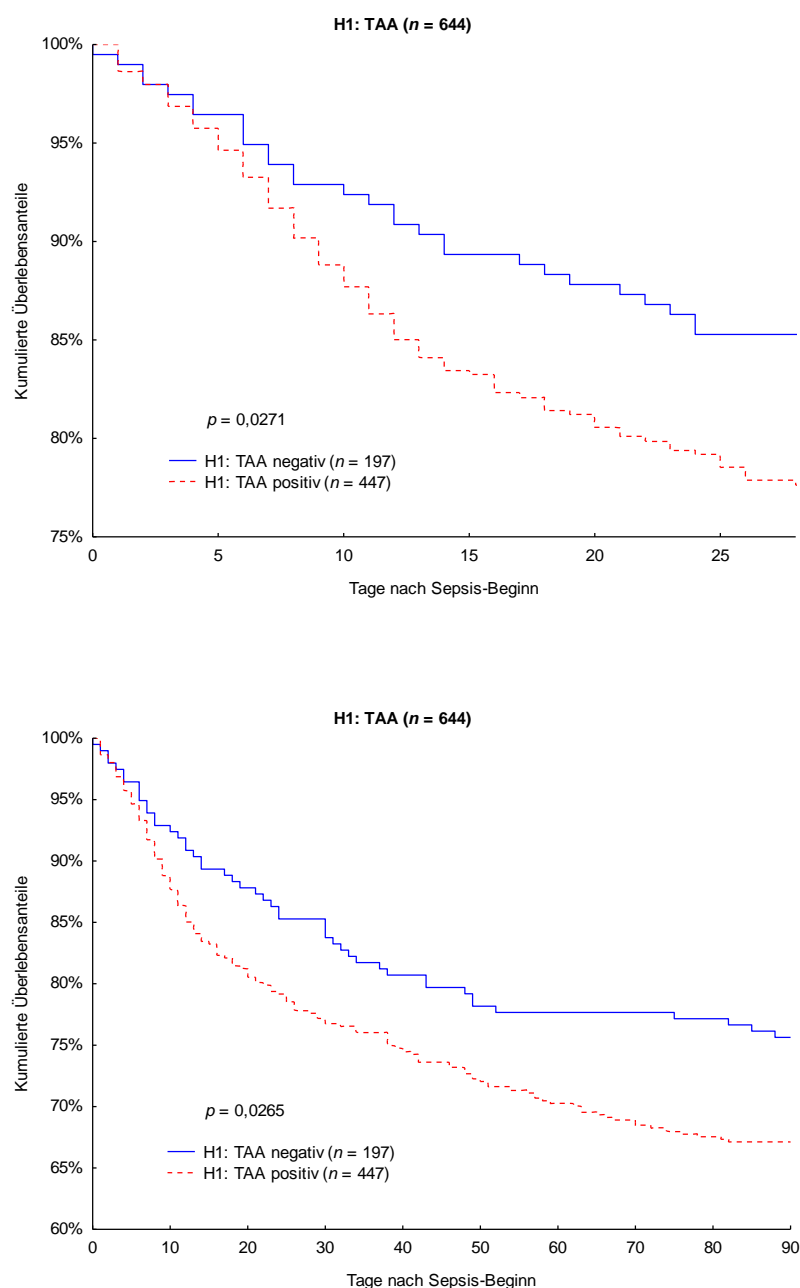
**Abbildung 10: 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen unter Betrachtung des CTLA-4 rs231775 Genotyps.** Die Abbildung zeigt die auf den Ordinaten abgetragenen kumulierten Überlebensanteile CTLA-4 rs231775 GG-homozygoter Patienten (**blaue Linien**) ggü. A-Allel-Trägern an diesem SNP (**rot gestrichelte Linien**) über die Betrachtungszeiträume von 28 Tagen (oberer Graph) und 90 Tagen (unterer Graph), abgetragen auf den Abszissen. (Eigene Darstellung).

Am CTLA-4 rs3087243 Genlocus war das Tragen des G-Allels mit einer signifikant niedrigeren 28- und 90-Tage Mortalitätsrate gegenüber dem AA-Genotyp assoziiert. Die Mortalitätsunterschiede zwischen den zwei untersuchten Gruppen beliefen sich in der Studienpopulation auf fast 10 Prozentpunkte nach 28 Tagen (17,9 % ggü. 27,5 %,  $p = 0,0161$ ; s. Abbildung 11, oberer Graph) und über 13 Prozentpunkte nach Ablauf des 90-Tage Zeitraums (27,3 % ggü. 40,8 %,  $p = 0,0024$ ; s. Abbildung 11, unterer Graph).



**Abbildung 11: 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen unter Betrachtung des CTLA-4 rs3087243 Genotyps.** Die Abbildung zeigt die auf den Ordinaten abgetragenen kumulierten Überlebensanteile CTLA-4 rs3087243 G-Allel-Träger (blaue Linien) ggü. AA-homozygoten Patienten an diesem SNP (rot gestrichelte Linien) über die Betrachtungszeiträume von 28 Tagen (oberer Graph) und 90 Tagen (unterer Graph), abgetragen auf den Abszissen. (Eigene Darstellung).

CTLA-4 H1: TAA negative Patienten verstarben innerhalb des 28-tägigen Betrachtungszeitraums zu 14,7 %, während 22,4 % der H1: TAA positiven Studienteilnehmer diesen Zeitraum nicht überlebten; dieser Unterschied erreichte statistische Signifikanz ( $p = 0,0271$ ; s. Abbildung 12, oberer Graph). Auch innerhalb von 90 Tagen zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil H1: TAA negativer gegenüber H1: TAA positiven Patienten (24,4 % ggü. 32,9 % Mortalität,  $p = 0,0265$ ; s. Abbildung 12, unterer Graph).



**Abbildung 12: 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen unter Betrachtung des CTLA-4 H1: TAA-Haplotyps.** Die Abbildung zeigt die auf den Ordinaten abgetragenen kumulierten Überlebensanteile CTLA-4 H1: TAA-Haplotyp negativer Patienten (blaue Linien) ggü. H1: TAA positiven Patienten (rot gestrichelte Linien) über die Betrachtungszeiträume von 28 Tagen (oberer Graph) und 90 Tagen (unterer Graph), abgetragen auf den Abszissen. (Eigene Darstellung).

### 3.6 Multivariate Cox-Regressionsanalysen

Eine multivariate Cox-Regressionsanalyse schloss sich den Kaplan-Meier Überlebenszeitanalysen an, um für den Einfluss potentieller Störvariablen und signifikant unterschiedlicher Basischarakteristika (vgl. 3.4) der untersuchten genetischen Varianten zu adjustieren. Anhand dieses multivariaten Modells ließen sich die Effektstärken einzelner Faktoren, einschließlich der mortalitätsbevorteilten genetischen Varianten, auf die 28- und 90-Tage Überlebenswahrscheinlichkeit als sog. adjustierte *Hazard Ratios* berechnen.

Bei der Untersuchung des CTLA-4 rs231775 Genotyps wurden neben den allgemein möglichen Störfaktoren – Alter, Geschlecht, BMI, SOFA- und APACHE II-Scores bei Studieneinschluss – auch das Vorliegen chronischer Lebererkrankungen entsprechend den Ergebnissen der Analyse der Patientenbasischarakteristika (vgl. 3.4) in das Model miteinbezogen. Es ergaben sich signifikante Einflüsse des Alters und des SOFA-Scores bei Sepsis-Beginn auf die 28-Tage Mortalität, zudem auch des APACHE II-Scores auf die 90-Tage Mortalität (s. Tabelle 12).

Auch unter der Berücksichtigung dieser Störvariablen erwies sich der CTLA-4 rs231775 GG-Genotyp trotzdem als signifikanter, unabhängiger Prädiktor der 28- und 90-Tage Mortalität ( $p = 0,0278$  und  $p = 0,0406$ , respektive).

Die berechneten adjustierten *Hazard Ratios*, als deskriptives Maß für die Mortalitätswahrscheinlichkeit, betragen 0,511 für die 28-Tage und 0,627 für die 90 Tage Mortalität CTLA-4 rs231775 GG-homozygoter Patienten gegenüber A-Allel-Trägern. Dabei lagen die *Hazard Ratios* mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit in einem Konfidenzintervall (KI) von 0,281 bis 0,929 für die 28-Tage Mortalität und 0,401 bis 0,980 für die 90-Tage Mortalität (s. Tabelle 12).

**Tabelle 12: Cox-Regressionsanalyse in Bezug auf CTLA-4 rs231775 Genotypen**

28-Tage Mortalität			
Variable	Hazard Ratio	95 %-KI	p-Wert
Alter	1,024	1,009 - 1,038	<b>0,0012</b>
Männliches Geschlecht	1,252	0,856 - 1,831	0,2473
Body Mass Index	0,979	0,947 - 1,011	0,1946
SOFA-Score Tag 1	1,090	1,031 - 1,152	<b>0,0023</b>
APACHE II-Score Tag 1	1,033	0,998 - 1,069	0,0616
Chronische Lebererkrankung	0,979	0,474 - 2,019	0,9532
<b>CTLA-4 rs231775 GG-Genotyp</b>	<b>0,511</b>	<b>0,281 - 0,929</b>	<b>0,0278</b>
90-Tage Mortalität			
Alter	1,026	1,015 - 1,038	<b>&lt;0,0001</b>
Männliches Geschlecht	1,091	0,795 - 1,450	0,6419
Body Mass Index	0,981	0,956 - 1,007	0,1557
SOFA-Score Tag 1	1,074	1,027 - 1,124	<b>0,0018</b>
APACHE II-Score Tag 1	1,033	1,005 - 1,062	<b>0,0224</b>
Chronische Lebererkrankung	0,886	0,479 - 1,639	0,6990
<b>CTLA-4 rs231775 GG-Genotyp</b>	<b>0,627</b>	<b>0,401 - 0,980</b>	<b>0,0406</b>

Auch in Bezug auf den CTLA-4 rs3087243 Genotyp erwiesen sich das Alter und der SOFA-Score bei Sepsis-Beginn als signifikante Einflussfaktoren auf die 28-Tage Mortalität sowie der APACHE II-Score zu Beginn der Sepsis-Erkrankung als weitere Einflussgröße auf die 90-Tage Mortalität (s. Tabelle 13).

Unter Adjustierung für diesen Effekt stellte sich auch an diesem Genlocus das Tragen des G-Allels als signifikanter prognostischer Marker für die 28-Tage ( $p = 0,0408$ ) und 90-Tage Mortalität ( $p = 0,0102$ ) heraus.

Die entsprechenden adjustierten *Hazard Ratios* für das Tragen des G-Allels beliefen sich auf 0,674 (95 %-KI: 0,462 - 0,984) für die 28-Tage Mortalität und 0,667 (95 %-KI: 0,489 - 0,908) für die 90-Tage Mortalität (s. Tabelle 13).

**Tabelle 13: Cox-Regressionsanalyse in Bezug auf CTLA-4 rs3087243 Genotypen**

28-Tage Mortalität			
Variable	Hazard Ratio	95 %-KI	p-Wert
Alter	1,022	1,008 - 1,037	<b>0,0026</b>
Männliches Geschlecht	1,256	0,859 - 1,837	0,2403
Body Mass Index	0,976	0,945 - 1,007	0,1310
SOFA-Score Tag 1	1,086	1,028 - 1,148	<b>0,0031</b>
APACHE II-Score Tag 1	1,033	0,998 - 1,070	0,0641
<b>CTLA-4 rs3087243 G-Allel</b>	<b>0,674</b>	<b>0,462 - 0,984</b>	<b>0,0408</b>
90-Tage Mortalität			
Alter	1,025	1,013 - 1,037	<b>&lt;0,0001</b>
Männliches Geschlecht	1,075	0,796 - 1,451	0,6382
Body Mass Index	0,979	0,954 - 1,005	0,1086
SOFA-Score Tag 1	1,073	1,025 - 1,122	<b>0,0023</b>
APACHE II-Score Tag 1	1,033	1,004 - 1,062	<b>0,0261</b>
<b>CTLA-4 rs3087243 G-Allel</b>	<b>0,667</b>	<b>0,489 - 0,908</b>	<b>0,0102</b>

In die Cox-Regressionsanalysen in Bezug auf das Tragen des CTLA-4 H1: TAA-Haplotyps wurde der Einsatz von Nierenersatzverfahren bei Sepsis-Beginn miteinbezogen, da dieser statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen in der Analyse der Basischarakteristika (vgl. 3.4) zeigte. Er erlangte allerdings keine statistische Signifikanz als Einflussgröße auf die 28- und 90-Tage Mortalität im multivariaten Modell.

Demgegenüber konnten erneut Alter, SOFA-Score und APACHE II-Score als relevante Einflussfaktoren auf die 28- und 90-Tage Mortalität identifiziert werden (s. Tabelle 14).

Auch das Nicht-Tragen des CTLA-4 H1: TAA-Haplotyps erwies sich als unabhängige positiv-prädiktive Variable für die 28- (*Hazard Ratio*: 0,631, 95 %-KI: 0,414 - 0,960,  $p = 0,0314$ ) und 90-Tage Mortalität (*Hazard Ratio*: 0,695, 95 %-KI: 0,499 - 0,969,  $p = 0,0320$ ; s. Tabelle 14).



Tabelle 14: Cox-Regressionsanalyse in Bezug auf den CTLA-4 H1: TAA-Haplotyp

28-Tage Mortalität			
Variable	Hazard Ratio	95%-KI	p-Wert
Alter	1,023	1,008 - 1,037	<b>0,0020</b>
Männliches Geschlecht	1,245	0,851 - 1,821	0,2586
Body Mass Index	0,978	0,947 - 1,010	0,1786
SOFA-Score Tag 1	1,093	1,029 - 1,159	<b>0,0035</b>
APACHE II-Score Tag 1	1,037	1,001 - 1,073	<b>0,0423</b>
Nierenersatzverfahren bei Sepsis-Beginn	0,851	0,477 - 1,517	0,5842
<b>CTLA-4 H1: TAA negativ</b>	<b>0,631</b>	<b>0,414 - 0,960</b>	<b>0,0314</b>
90-Tage Mortalität			
Alter	1,026	1,014 - 1,038	<b>&lt;0,0001</b>
Männliches Geschlecht	1,067	0,791 - 1,441	0,6705
Body Mass Index	0,981	0,956 - 1,007	0,1491
SOFA-Score Tag 1	1,076	1,025 - 1,129	<b>0,0030</b>
APACHE II-Score Tag 1	1,036	1,007 - 1,066	<b>0,0135</b>
Nierenersatzverfahren bei Sepsis-Beginn	0,875	0,540 - 1,417	0,5874
<b>CTLA-4 H1: TAA negativ</b>	<b>0,695</b>	<b>0,499 - 0,969</b>	<b>0,0320</b>

### 3.7 Parameter zur Analyse der Krankheitsschwere

Neben den zuvor dargestellten Erhebungen zur Mortalität und zu den Patientenbasischarakteristika bei Sepsis-Beginn wurden als sekundäre Endpunkte dieser Untersuchung Parameter der Krankheitsschwere in Bezug auf die jeweiligen genetischen Varianten untersucht. Die Betrachtung klinischer Verlaufparameter wie *SOFA-Scores* und organspezifischer *SOFA-Subscores*, Einsatz von Organersatzverfahren, Infekt-, Nieren- und Leberwerte über den gesamten Beobachtungszeitraum erlaubte dabei Aussagen zur Krankheitsschwere. Daneben wurden auch die Liegezeiten auf der Intensivstation und die Gesamtaufenthaltsdauer in der UMG in die Untersuchung miteinbezogen.

Für die gesamte Studienpopulation ergaben die Erhebungen eine durchschnittliche Klinik-Aufenthaltsdauer von  $40 \pm 29$  Tagen mit einer mittleren Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation von  $20 \pm 16$  Tagen. Die Patienten wiesen einen durchschnittlichen *SOFA-Score* von  $7 \pm 3,5$  über den gesamten Beobachtungszeitraum sowie mittlere Infektwerte von  $13.000 \pm 5.000$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , ein CRP von  $152 \pm 87$  mg/l und ein medianes Procalcitonin i.H.v.  $0,9$  ng/dl (IQR: 0,3-2,9) auf. Sie wurden an  $66 \pm 32$  % der Tage des Beobachtungszeitraums maschinell beatmet, erhielten an  $34 \pm 30$  % der Tage Katecholamine und wurden im Schnitt an  $9 \pm 23$  % der Tage dialysiert oder erhielten Hämodiafiltration. Die durchschnittliche Urinausscheidung betrug  $2.978 \pm 1.337$  ml/Tag, das Kreatinin betrug  $1,2 \pm 0,9$  mg/dl und die medianen Leberwerte waren 56 IU/l AST (IQR: 35-111), 45 IU/l ALT (IQR: 22-88) und ein Bilirubin i.H.v.  $0,6$  mg/dl (IQR: 0,4-1,1). Die dargestellten Werte können Tabelle 15, Tabelle 16 und Tabelle 17 entnommen werden.

In Bezug auf die genetische Merkmalsausprägung am CTLA-4 rs231775 SNP ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Krankheitsschwere zwischen den untersuchten Gruppen. GG-Homozygote, für die zuvor eine niedrigere 28- und 90-Tage Mortalität

nachgewiesen worden ist (vgl. 3.5), zeigten ähnliche Durchschnittswerte der analysierten Parameter über den Verlauf ihrer Sepsis-Erkrankung wie A-Allel-Träger an dieser Position (s. Tabelle 15).

**Tabelle 15: Analyse der Krankheitsschwere in Bezug auf CTLA-4 rs231775 Genotypen**

Variablen	Alle (n = 644)	rs231775		p-Wert
		GG (n = 101)	AG/AA (n = 543)	
Scores				
SOFA-Score	7,0 ± 3,5	7,1 ± 3,4	7,0 ± 3,6	0,5009
SOFA-Respiratorischer-Score	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,7	2,0 ± 0,8	0,9854
SOFA-Herz-Kreislauf-Score	1,5 ± 1,0	1,5 ± 1,0	1,5 ± 1,0	0,9986
SOFA-ZNS-Score	2,0 ± 1,1	2,0 ± 1,1	2,0 ± 1,1	0,9883
SOFA-Nieren-Score	0,2 (0-1,1)	0,2 (0-1,4)	0,2 (0-1,0)	0,6040
SOFA-Gerinnungs-Score	0 (0-0,4)	0 (0-0,3)	0 (0-0,4)	0,4978
SOFA-Leber-Score	0 (0-0,4)	0 (0-0,5)	0 (0-0,3)	0,6419
Organersatzverfahren, anteilig [%]				
Tage mit maschineller Ventilation / Beobachtungszeitraum	66 ± 32	64 ± 29	67 ± 32	0,1969
Tage mit Katecholamin-Therapie / Beobachtungszeitraum	34 ± 30	34 ± 30	34 ± 30	0,7022
Tage mit Nierenersatzverfahren / Beobachtungszeitraum	9 ± 23	12 ± 23	9 ± 23	0,2690
Infekt-Werte				
Leukozyten [1000/µl]	13 ± 5	13 ± 4	13 ± 5	0,8124
CRP [mg/l]	152 ± 87	177 ± 113	148 ± 81	0,2758
Procalcitonin [ng/dl]	0,9 (0,3-2,9)	1,1 (0,4-4,9)	0,9 (0,3-2,8)	0,1124
Nieren-Werte				
Urinausfuhr [ml/Tag]	2978 ± 1337	2806 ± 1179	3010 ± 1363	0,2993
Urinausfuhr [ml/kg/Tag]	1,6 ± 0,8	1,4 ± 0,8	1,6 ± 0,8	0,1014
Kreatinin [mg/dl]	1,2 ± 0,9	1,3 ± 1,1	1,2 ± 0,9	0,3945
Leber-Werte				
AST (GOT) [IU/l]	56 (35-111)	71 (37-116)	53 (35-111)	0,2059
ALT (GPT) [IU/l]	45 (22-88)	49 (27-87)	45 (22-88)	0,5080
Bilirubin [mg/dl]	0,6 (0,4-1,1)	0,6 (0,4-1,2)	0,6 (0,4-1,1)	0,8423
Liegezeiten [Tage]				
Intensivstation-Aufenthaltssauer	20 ± 16	19 ± 12	21 ± 17	0,5142
Klinik-Aufenthaltsdauer	40 ± 29	39 ± 25	40 ± 30	0,8072

Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass G-Allel-Träger am CTLA-4 rs3087243 Genlocus, die in den vorausgegangenen 28- und 90-Tage Mortalitätsanalysen den AA-Homozygoten signifikant überlegen waren (vgl. 3.5), auch einen signifikant besseren Krankheitsverlauf im Sinne niedrigerer SOFA-ZNS-Subscores und einer geringeren Notwendigkeit der maschinellen Ventilation zeigten. So wiesen die G-Allel-Träger an diesem Polymorphismus durchschnittliche SOFA-ZNS-Subscores – als Kenngröße der Bewusstseinslage – von  $1,9 \pm 1,1$  auf im Vergleich zu AA-Homozygoten mit  $2,2 \pm 1,0$ . Dieser Unterschied war statistisch sehr signifikant ( $p = 0,0094$ ; s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Analyse der Krankheitsschwere in Bezug auf CTLA-4 rs3087243 Genotypen

Variablen	Alle (n = 644)	rs3087243		p-Wert
		AA (n = 142)	GG/AG (n = 502)	
Scores				
SOFA-Score	7,0 ± 3,5	7,4 ± 3,8	6,9 ± 3,5	0,3005
SOFA-Respiratorischer-Score	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,8	0,6043
SOFA-Herz-Kreislauf-Score	1,5 ± 1,0	1,7 ± 1,0	1,5 ± 1,0	0,1284
SOFA-ZNS-Score	2,0 ± 1,1	2,2 ± 1,0	1,9 ± 1,1	<b>0,0094</b>
SOFA-Nieren-Score	0,2 (0-1,1)	0,1 (0-1,0)	0,2 (0-1,1)	0,6669
SOFA-Gerinnungs-Score	0 (0-0,4)	0 (0-0,4)	0 (0-0,4)	0,5521
SOFA-Leber-Score	0 (0-0,4)	0 (0-0,3)	0 (0-0,4)	0,9780
Organersatzverfahren, anteilig [%]				
Tage mit maschineller Ventilation / Beobachtungszeitraum	66 ± 32	71 ± 32	65 ± 32	<b>0,0280</b>
Tage mit Katecholamin-Therapie / Beobachtungszeitraum	34 ± 30	37 ± 33	33 ± 29	0,2919
Tage mit Nierenersatzverfahren / Beobachtungszeitraum	9 ± 23	9 ± 23	10 ± 22	0,8287
Infekt-Werte				
Leukozyten [1000/ $\mu$ l]	13 ± 5	13 ± 5	13 ± 5	0,1026
CRP [mg/l]	152 ± 87	137 ± 81	156 ± 88	0,1356
Procalcitonin [ng/dl]	0,9 (0,3-2,9)	0,7 (0,3-2,2)	1,0 (0,3-3,4)	0,0655
Nieren-Werte				
Urinausfuhr [ml/Tag]	2978 ± 1337	2973 ± 1388	2979 ± 1324	0,9387
Urinausfuhr [ml/kg/Tag]	1,6 ± 0,8	1,6 ± 0,8	1,6 ± 0,78	0,9051
Kreatinin [mg/dl]	1,2 ± 0,9	1,2 ± 0,9	1,3 ± 1,0	0,4218
Leber-Werte				
AST (GOT) [IU/l]	56 (35-111)	57 (35-121)	56 (34-108)	0,7476
ALT (GPT) [IU/l]	45 (22-88)	48 (26-101)	45 (22-87)	0,2135
Bilirubin [mg/dl]	0,6 (0,4-1,1)	0,6 (0,4-1,0)	0,6 (0,4-1,1)	0,5972
Liegezeiten [Tage]				
Intensivstation-Aufenthaltssauer	20 ± 16	21 ± 15	20 ± 16	0,3720
Klinik-Aufenthaltssauer	40 ± 29	41 ± 31	40 ± 28	0,4562

Weiterhin wurden die CTLA-4 rs3087243 G-Allel-Träger im Schnitt 65 ± 32 % der Beobachtungstage maschinell ventiliert, während AA-Homozygote 71 ± 32 % der Tage ventiliert wurden. Auch diese Differenz zwischen den zwei Gruppen erreichte mit einem p-Wert von 0,0280 statistische Signifikanz (s. Tabelle 16). In Bezug auf die weiteren untersuchten Parameter der Krankheitsschwere zeigten sich teilweise geringfügige Unterschiede zwischen den zwei Gruppen, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erlangen.

Schließlich wurden im Rahmen der Analyse der Krankheitsschwere auch die Träger des CTLA-4 H1: TAA-Haplotyps den in der 28- und 90-Tage Mortalitätsanalyse überlegenen H1: TAA negativen Studienteilnehmern (vgl. 3.5) gegenübergestellt. Hierbei zeigten sich hoch signifikant höhere Procalcitonin-Werte (1,4 ng/dl (IQR: 0,5-4,9) ggü. 0,8 ng/dl (IQR: 0,3-2,5), p = 0,0002) und eine signifikant niedrigere mittlere Urinausscheidung (2.792 ± 1.242 ml/Tag ggü. 3.060 ± 1.370 ml/Tag, p = 0,0229) H1: TAA negativer Patienten im Vergleich zu Trägern des H1: TAA-Haplotyps (s. Tabelle 17). In Bezug auf die

weiteren analysierten Merkmale der Krankheitsschwere wiesen die zwei verglichenen Gruppen überwiegend Ähnlichkeit auf.

**Tabelle 17: Analyse der Krankheitsschwere in Bezug auf den CTLA-4 H1: TAA-Haplotyp**

Variablen	Alle (n = 644)	H1: TAA		p-Wert
		positive (n = 447)	negative (n = 197)	
Scores				
SOFA-Score	7,0 ± 3,5	7,0 ± 3,6	7,1 ± 3,5	0,5088
SOFA-Respiratorischer-Score	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,8	1,9 ± 0,8	0,9796
SOFA-Herz-Kreislauf-Score	1,5 ± 1,0	1,5 ± 1,0	1,5 ± 1,0	0,7476
SOFA-ZNS-Score	2,0 ± 1,1	2,0 ± 1,1	1,9 ± 1,1	0,2731
SOFA-Nieren-Score	0,2 (0-1,1)	0,1 (0-1,0)	0,3 (0-1,4)	0,1230
SOFA-Gerinnungs-Score	0 (0-0,4)	0 (0-0,4)	0 (0-0,4)	0,6741
SOFA-Leber-Score	0 (0-0,4)	0 (0-0,3)	0 (0-0,5)	0,4264
Organersatzverfahren, anteilig [%]				
Tage mit maschineller Ventilation / Beobachtungszeitraum	66 ± 32	67 ± 32	65 ± 32	0,3607
Tage mit Katecholamin-Therapie / Beobachtungszeitraum	34 ± 30	33 ± 30	35 ± 30	0,6474
Tage mit Nierenersatzverfahren / Beobachtungszeitraum	9 ± 23	9 ± 22	11 ± 23	0,1246
Infekt-Werte				
Leukozyten [1000/μl]	13 ± 5	13 ± 5	13 ± 4	0,4087
CRP [mg/l]	152 ± 87	147 ± 81	162 ± 99	0,4562
Procalcitonin [ng/dl]	0,9 (0,3-2,9)	0,8 (0,3-2,5)	1,4 (0,5-4,9)	<b>0,0002</b>
Nieren-Werte				
Urinausfuhr [ml/Tag]	2978 ± 1337	3060 ± 1370	2792 ± 1242	<b>0,0229</b>
Urinausfuhr [ml/kg/Tag]	1,6 ± 0,8	1,6 ± 0,8	1,5 ± 0,8	0,0529
Kreatinin [mg/dl]	1,2 ± 0,9	1,2 ± 0,9	1,4 ± 1,1	0,0902
Leber-Werte				
AST (GOT) [IU/l]	56 (35-111)	54 (35-115)	59 (31-104)	0,9910
ALT (GPT) [IU/l]	45 (22-88)	48 (23-92)	41 (21-78)	0,1307
Bilirubin [mg/dl]	0,6 (0,4-1,1)	0,6 (0,4-1,1)	0,6 (0,4-1,1)	0,9584
Liegezeiten [Tage]				
Intensivstation-Aufenthaltssauer	20 ± 16	20 ± 16	20 ± 17	0,9209
Klinik-Aufenthaltssauer	40 ± 29	40 ± 29	41 ± 28	0,4146

## 4 Diskussion

### 4.1 Genetische Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen als Prädiktoren der Sepsis-Mortalität

Die zugrundeliegende Fragestellung der vorliegenden experimentellen, klinisch-prospektiven Untersuchung war, ob und inwiefern funktionelle genetische Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen Einfluss auf die Mortalität und den Krankheitsverlauf von Patienten mit klinisch definierter Sepsis haben. Zu diesem Zweck wurden 644 Patienten mit Sepsis, die prospektiv von den chirurgischen Intensivstationen der UMG eingeschlossen worden sind, in Bezug auf drei *CTLA-4*-SNPs und daraus rekonstruierten Haplotypen untersucht. Durch die Erhebung täglicher Visiten wurde der Krankheitsverlauf der Studienteilnehmer sowie deren 28- und 90-Tage Mortalität erfasst.

Die vorliegende Arbeit ist die erstmalige Untersuchung der *CTLA-4*-SNPs rs733618, rs231775 und rs3087243 sowie daraus rekonstruierter Haplotypen auf die Mortalität und den klinischen Verlauf des Krankheitsbildes Sepsis.

Als primäres Untersuchungsergebnis dieser Arbeit konnten statistisch signifikante Überlebensvorteile der *CTLA-4* rs231775 GG-homozygoten Patienten ( $p = 0,0308$  [28-Tage] und  $p = 0,0357$  [90-Tage]), der rs3087243 G-Allel-Träger ( $p = 0,0161$  [28-Tage] und  $p = 0,0024$  [90-Tage]) und der Nicht-Träger des abgeleiteten H1: TAA-Haplotyps ( $p = 0,0271$  [28-Tage] und  $p = 0,0265$  [90-Tage]) für die 28- und 90-Tage Mortalität in der untersuchten Studienpopulation nachgewiesen werden. Die überlegenen genetischen Varianten erwiesen sich darüber hinaus nach Adjustierung und unter Berücksichtigung potentieller Störgrößen im multivariaten Modell als signifikante, unabhängige, positiv-prädiktive Einflussgrößen auf die 28- und 90-Tage Mortalität der Sepsis.

Die Bedeutung dieser Erkenntnisse konnte anhand der Veröffentlichungen in den Journalen *Nature Scientific Reports* (Mewes et al. 2018) und *Journal of Clinical Medicine* (Mewes et al. 2019) nachgewiesen werden.

## 4.2 Einordnung in die aktuelle Forschung

Das Krankheitsbild der Sepsis weist eine steigende Inzidenz in alternden Gesellschaften sowie eine zunehmende gesundheitsökonomische Bedeutung auf (Fleischmann-Struzek et al. 2018). Die Pathophysiologie der Sepsis ist nach wie vor weitgehend unbekannt; schnelle und unkomplizierte diagnostische Verfahren sind Gegenstand laufender Diskussion und Forschung, und eine klinikübergreifende, einheitliche evidenz-basierte Therapie ist bisher nicht existent (Singer et al. 2016; Rhodes et al. 2017).

Vor diesem Hintergrund hat die *Surviving Sepsis Campaign*, bestehend aus den Autoren der aktuell gültigen Sepsis-*Guidelines* und -Definitionen, im Jahr 2018 die aktuellen Forschungsschwerpunkte für das Krankheitsbild Sepsis und seine Unterform – den septischen Schock – festgelegt (Coopersmith et al. 2018). Das Konsensus-Komitee aus 16 international anerkannten Experten der *European Society of Intensive Care Medicine* und der *Society of Critical Care Medicine* definierte in ihrer Veröffentlichung u. a. die folgenden Fragestellungen als aktuelle und zukünftige Top-Forschungsschwerpunkte (Coopersmith et al. 2018; s. Tabelle 18):

**Tabelle 18: Top-Forschungsschwerpunkte der *Surviving Sepsis Campaign***

Wissenschaftliche Leitfragestellungen
Welche Rolle spielen maßgeschneiderte, personalisierte Präzisionsmedizin-Ansätze zukünftig in der Therapie der Sepsis?
Sollen schnelle diagnostische Verfahren in die klinische Praxis implementiert werden?
Was sind die Prädiktoren der Morbidität und Mortalität der Sepsis?
Wie lässt sich Organdysfunktion identifizieren?

Auswahl von vier aus sechs Top-Forschungsschwerpunkten. (Übersetzt aus dem Englischen nach Coopersmith et al. 2018; die modifizierte Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer.).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können zur Verfolgung und Klärung dieser aktuellen wissenschaftlichen Leitfragestellungen einen Beitrag leisten:

Als zentrale Erkenntnisse dieser Arbeit konnten signifikante Überlebensvorteile bestimmter genetischer Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen im Rahmen der Sepsis festgestellt werden. Die primären Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen ein Beitrag zur o. g. Fragestellung nach den Prädiktoren der Sepsis-Mortalität dar. Zwar werden die Morbidität und die Mortalität der Sepsis nicht monokausal durch einzelne genetische Varianten bestimmt, sondern die Krankheitsschwere, der Krankheitsverlauf und die Krankheitsmortalität wie auch die Krankheits-Suszeptibilität des Symptomkomplexes Sepsis werden multifaktoriell determiniert (Hotchkiss und Karl 2003; Gotts und Matthay 2016). Dennoch wird auch ein

entscheidender Anteil der Pathophysiologie und des klinischen Phänotyps dieser Krankheit durch die genetische Disposition des Wirts bestimmt.

Die erbliche Komponente der Sepsis ist polygenetisch, und es konnten bereits diverse genetische Einflussfaktoren in vorausgegangenen Studien identifiziert werden (Mansur et al. 2014; Mansur et al. 2015; Rautanen et al. 2015; Hinz et al. 2017; Scicluna et al. 2017). Letztlich trägt eine Vielzahl genetischer Varianten in Wechselwirkung untereinander sowie in Wechselwirkung mit diversen patientenindividuellen Umweltfaktoren zur Ätiologie und dem Verlauf der Erkrankung bei (Hotchkiss et al. 2016; Uhle et al. 2016).

Die Identifikation mit dem Krankheitsverlauf assoziierter genetischer Varianten besitzt eine herausragende Bedeutung für das Verständnis der der Sepsis zugrundeliegenden biologischen und molekularen Mechanismen. Die durch die genetischen Varianten kodierten Auswirkungen auf Genexpressionen, Proteinfunktionalität und physiologische Parameter erlauben dabei Einblicke in die Krankheitspathophysiologie und können im Sinne sog. *Pharmacogenomics* eine entscheidende Rolle für die Entwicklung maßgeschneiderter Therapiekonzepte spielen (Freudenberg et al. 2002).

Somit ergeben sich aus den Hauptergebnissen dieser Arbeit nicht nur Antwortansätze auf die o. g. Frage nach den Prädiktoren der Sepsis-Morbidität und Sepsis-Mortalität, sondern auch Implikationen für die weiteren zuvor genannten wissenschaftlichen Leitfragestellungen bspw. nach personalisierten Therapieansätzen oder innovativen diagnostischen Verfahren.

### 4.3 Epidemiologie der Studienpopulation im nationalen und internationalen Vergleich

Grundsätzlich handelt es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Studienteilnehmern um ein relativ großes, repräsentatives, prospektives Kollektiv kritisch erkrankter Patienten mit Sepsis mehrerer chirurgischer Intensivstationen. Dabei ergaben sich die nachfolgend dargestellten Abweichungen und Gemeinsamkeiten im Vergleich mit anderen nationalen und internationalen repräsentativen Sepsis-Kollektiven:

In die vorliegende Untersuchung wurden 644 Patienten mit Sepsis eingeschlossen. Das durchschnittliche Patientenalter der Studienpopulation betrug 63,4 Jahre mit einem Altersgipfel in der Gruppe der 72- bis 78- jährigen. Im Vergleich zur INSEP-Studie, einer großen deutschen prospektiven, multizentrischen Beobachtungsstudie mit 1.503 septischen Studienteilnehmern, waren die Patienten dieser Untersuchung im Durchschnitt etwas jünger (SepNet Critical Care Trials Group 2016). Auch der Altersgipfel der in dieser Arbeit untersuchten Population unterschied sich von dem zuvor beschriebenen Altersgipfel innerhalb einer deutschen Vergleichspopulation (vgl. 1.1.2), der in der Gruppe der älter als 85-jährigen lag (Fleischmann et al. 2016). Im internationalen Vergleich lag das Durchschnittsalter septischer Patienten in aktuellen repräsentativen Sepsis-Kollektiven zwischen 65 und 71 Jahren (Bouza et al. 2014; Kaukonen et al. 2014; Rhee et al. 2017; Chen et al. 2019).

In der vorliegenden Erhebung waren 66,1 % der Studienteilnehmer männlichen Geschlechts. Der prozentuale Anteil männlicher Studienteilnehmer entsprach damit in etwa dem der deutschen INSEP-Studie mit 62,1 % (SepNet Critical Care Trials Group 2016) und wich von dem internationaler Sepsis-Kollektive aus Spanien (n = 240.939) mit 58,2 % (Bouza et al. 2014), aus Australien und Neuseeland (n = 101.064) mit 54 % (Kaukonen et al. 2014), aus den USA (n = 173.690) mit 57,6 % (Rhee et al. 2017) und Taiwan (n = 97.790) mit 54,2 % (Chen et al. 2019) ab. Es lässt sich festhalten, dass viele Studien für Männer eine höhere Erkrankungshäufigkeit im Vergleich zu Frauen aufzeigen konnten. Als Grund hierfür wird neben hormonellen und genetischen Ursachen auch ein unterschiedlicher Lebensstil von Männern diskutiert (Cohen et al. 2015; Fleischmann et al. 2016). Ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Sepsis-Mortalität konnte jedoch weder in dieser Untersuchung noch in anderen vorausgegangenen Studien festgestellt werden (Papathanassoglou et al. 2017; Vught et al. 2017).

Die ermittelten durchschnittlichen Mortalitätsraten der Studienpopulation i.H.v. 20 % innerhalb von 28 Tagen und 30,3 % innerhalb von 90 Tagen entsprachen in etwa der in Deutschland zwischen 2007 und 2013 von Fleischmann et al. observierten Sepsis-Mortalität i.H.v. 24,3 % (Fleischmann et al. 2015) bzw. 23,5 % zwischen 2010 und 2015 (Fleischmann-Struzek et al. 2018) . Auch im internationalen Vergleich ähnelten die hier observierten Mortalitätsraten der ebenfalls von Fleischmann et al. beschrieben globalen



Krankenhaussterblichkeit i.H.v. 17 % für Sepsis und 26 % für schwere Sepsis entsprechend der damals gültigen Sepsis-2-Definition (vgl. 1.1.1; Fleischmann et al. 2016) bzw. 24-34 % in den USA (Rhee et al. 2017) oder 32,1 % in England (Shankar-Hari et al. 2016). Die Mortalitätsrate der Sepsis ist weiterhin auf einem hohen Niveau, wobei im internationalen Vergleich der verschiedenen Länder merkbare Unterschiede gibt. So wurde bereits 2012 im Rahmen einer nicht-randomisierten Studie der *Surviving Sepsis Campaign* ein erheblicher Unterschied in der Mortalität der schweren Sepsis zwischen Europa mit 41,1 % und den USA mit 28,3 % festgestellt (Levy et al. 2012). Signifikante Unterschiede sind dabei u. a. auf soziale, ethnische und geographische Faktoren, Unterschiede in den medizinischen Versorgungssystemen und nicht zuletzt auch divergente Studiendesigns und Datengenerierung zurückzuführen (Linde-Zwirble und Angus 2004; Levy et al. 2012).

Die durchschnittlichen Liegezeiten der Studienteilnehmer beliefen sich in dieser Studie auf  $20 \pm 16$  Tage auf der Intensivstation und  $40 \pm 29$  Tage im Krankenhaus insgesamt. Die beobachteten Liege- und Aufenthaltszeiten wiesen eine hohe statistische Spannweite (Intensivstation-Liegedauer: 1-178 Tage; Krankenhaus-Aufenthaltsdauer: 2-196 Tage) auf und lagen über denen der INSEP-Studie und anderer internationaler Untersuchungen (Bouza et al. 2014; SepNet Critical Care Trials Group 2016; Rhee et al. 2017).

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Allel-Frequenzen an den untersuchten CTLA-4-Genloki (vgl. 3.3.1) entsprachen in etwa den Erwartungswerten internationaler Kaukasischer Referenzpopulationen, wie z. B. der *HapMap Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH) Population (HapMap Project 2019); es ergaben sich maximale Abweichungen von weniger als 2 % gegenüber den Erwartungswerten.

Zusammenfassend kann das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv von Patienten mit Sepsis als vergleichsweise unwesentlich jünger beschrieben werden. Der Anteil männlicher Studienteilnehmer war im Vergleich zu anderen Studien etwas größer, die Mortalität den nationalen Erwartungswerten weitgehend ähnlich und die Liege- und Aufenthaltszeiten erhöht. Die beschriebenen Abweichungen könnten darin begründet sein, dass in dieser Arbeit ein Kollektiv chirurgischer Patienten mit schweren Grunderkrankungen und einem hohen Anteil vorausgegangener komplexer invasiver chirurgischer Eingriffe untersucht wurde im Vergleich zu gemischten Sepsis-Kollektiven internistischer oder interdisziplinärer Intensivstationen in anderen Untersuchungen. Weiterhin lassen sich die vorliegenden Abweichungen auf unterschiedliche Studiendesigns und die festgelegten Einschlusskriterien zurückführen. Die beschriebenen nationalen wie internationalen Sepsis-Kollektive können aufgrund der Heterogenität der verwendeten Studiendesigns nur begrenzt miteinander verglichen werden; der Studieneinschluss im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte prospektiv anhand streng definierter Kriterien (vgl. 2.1) und nicht retrospektiv anhand von Patientenkodierungen wie bspw. ICD- oder DRG-*Codes*.

## 4.4 Erklärungsansätze der entdeckten Assoziationen ...

Dass koinhibitorische Immun-Checkpoint-Proteine wie CTLA-4 oder PD-1 eine entscheidende Rolle in der Immunpathophysiologie der Sepsis zu spielen scheinen, ist keine unbekanntes Erkenntnis (Zhang et al. 2011; Buchbinder und Desai 2016; Fallon et al. 2018). So kann mittlerweile davon ausgegangen werden, dass CTLA-4, welches u. a. auf der Oberfläche CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird, als negativ stimulatorischer Regulator der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation im Rahmen der Sepsis fungiert (vgl. 1.2.3). Somit ist CTLA-4 für die Herunterregulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort, bspw. im Rahmen der sepsisassoziierten Immunsuppression und Organdysfunktion, mitverantwortlich (Boomer et al. 2011; Boomer et al. 2014; Washburn et al. 2019). Expressionslevels von Immun-Checkpoints, wie CTLA-4, werden sogar als Messindikatoren des individuellen Immunstatus septischer Patienten vorgeschlagen (Fallon et al. 2018). Weiterhin konnte bereits am Mausmodell eine Verbesserung der Sepsis-Mortalität durch die Blockade des CTLA-4-Rezeptors mittels monoklonaler Antikörper, wie sie bspw. im Rahmen der Therapie des malignen Melanoms oder von Prostatakarzinomen zum Einsatz kommen, gezeigt werden (Inoue et al. 2011; Chang et al. 2013; Blank und Enk 2015). Die Anwendbarkeit entsprechender Therapieansätze am Menschen ist Gegenstand laufender Untersuchungen und klinischer Studien (Boutros et al. 2016; Peters van Ton et al. 2018).

Die erstmalig als Primärergebnis dieser Arbeit beschriebene Überlegenheit funktioneller genetischer Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen in der Sepsis-Mortalität lässt sich mit den bisherigen Erkenntnissen der Literatur sowie der eingangs aufgestellten Arbeitshypothese (vgl. 1.3) dieser Untersuchung vereinen.

### 4.4.1 ... des CTLA-4 rs231775 SNPs

Homozygote Träger des GG-Allels am CTLA-4 rs231775 SNP zeigten eine signifikant niedrigere 28- und 90-Tage Mortalität. Während innerhalb der ersten 28 Tage nach Sepsis-Beginn 11,9 % der GG-Homozygoten verstorben waren, betrug der Anteil der Verstorbenen unter den Trägern des A-Allels 21,5 %. Auch nach 90 Tagen war der Anteil der verstorbenen GG-Homozygoten mit 21,8 % erheblich niedriger als der der A-Allel-Träger mit 31,9 %.

Eine mögliche Erklärung für den entdeckten unabhängigen, starken Effekt des CTLA-4 rs231775 GG-Genotyps auf die Sepsis-Mortalität könnte sein, dass für diesen Genotyp in vorausgegangenen Studien niedrigere Oberflächenexpressionslevels des koinhibitorischen CTLA-4-Proteins nachgewiesen werden konnten (Ligers et al. 2001).

Weiterhin wird dem G-Allel an diesem SNP eine attenuierte Proteinfunktion durch inkomplette Glykosylierung des CTLA-4-Rezeptors zugeschrieben (Nisticò et al. 1996; Park et al. 2007). Die sich aus der reduzierten Oberflächenexpression und der geminderten Proteinfunktionalität des koinhibitorischen CTLA-4-Rezeptors ergebende Stärkung der proinflammatorischen T-Zell-vermittelten Immunantwort GG-homozygoter Patienten

(Kouki et al. 2000) könnte insbesondere im Rahmen der sepsisbedingten Immunsuppression und Organdysfunktion von Vorteil sein. Gleichzeitig geht sie allerdings auch mit einer gesteigerten autoreaktiven Immunantwort einher, was bereits von diversen vorausgegangenen Assoziationsstudien dieses SNPs mit Autoimmunerkrankungen wie Insulin-abhängigem Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis, SLE oder Hashimoto-Thyreoiditis beschrieben worden ist (Marron et al. 1997; Benhatchi et al. 2011; Chang et al. 2012; Ting et al. 2016; Pawlak-Adamska et al. 2017).

Die Annahme, dass eine gesteigerte proinflammatorische T-Zell-vermittelte Immunreaktion mit einer niedrigeren Mortalitätsrate der Sepsis einhergeht, wird weiterhin durch die Theorie gestärkt, dass ein Großteil der Sepsis-Patienten die initiale Phase der überschießenden Immunreaktion überlebt, aber in der darauffolgenden Phase der Immunsuppression mit einhergehenden sekundären Infektionen und multipler Organdysfunktion verstirbt (Hotchkiss et al. 2013a).

Im Rahmen der Untersuchung der sekundären Zielgrößen dieser Arbeit konnte ein höherer durchschnittlicher BMI und ein häufigeres Vorbestehen chronischer Lebererkrankungen bei CTLA-4 rs231775 GG-homozygoten Studienteilnehmern nachgewiesen werden. Ein signifikanter Einfluss des BMI oder des Vorbestehens chronischer Lebererkrankungen auf die 28- und 90-Tage Mortalität konnte allerdings im multivariaten Cox-Regressionsmodell nicht gezeigt werden, sodass diese zwei Parameter als Störvariablen des Einflusses des CTLA-4 rs231775 Genotyps auf die Mortalität vernachlässigt werden konnten. Die entdeckten Unterschiede sollten dennoch weiter untersucht und in anderen Kohorten verifiziert werden.

Ein signifikant besserer Krankheitsverlauf im Sinne niedrigerer SOFA-*Subscores*, seltenerer Einsätze von Organersatzverfahren oder geringerer Entzündungswerte konnte in der untersuchten Population nicht nachgewiesen werden. Die durchschnittlichen CRP- und Procalcitonin-Werte CTLA-4 rs231775 GG-homozygoter Patienten waren sogar höher als die der A-Allel-Träger. Diese Unterschiede erreichten allerdings keine statistische Signifikanz.

#### 4.4.2 ... des CTLA-4 rs3087243 SNPs

An der CTLA-4 rs3087243 Position wurde die Überlegenheit der G-Allel-Träger ggü. AA-homozygoten Patienten in der 28- und 90-Tage Mortalität festgestellt. Auch hier beliefen sich die Unterschiede der Mortalitätsraten auf knapp 10 Prozentpunkte für die 28-Tage Mortalität (17,9 % ggü. 27,5 %) und sogar deutlich über 10 Prozentpunkte in Bezug auf die 90-Tage Mortalitätsrate (27,3 % ggü. 40,8 %).

Der signifikant protektive Einfluss des CTLA-4 rs3087243 G-Allels auf die Sepsis-Mortalität lässt sich möglicherweise ebenfalls durch eine verminderte Oberflächenexpression des CTLA-4-Rezeptors erklären. Zwar kodiert dieser SNP im Gegensatz zum rs231775 SNP

nicht für einen Aminosäuretausch innerhalb des Proteins, aber er scheint mit seiner Lokalisation in der 3'-UTR-Region des *CTLA-4*-Gens – einem dem kodierenden Bereich nachgelagerten Abschnitt – ebenfalls eine regulatorische Funktion auf die Proteinexpression zu haben. Eine Assoziation bzw. ein unvollständiges *Linkage Equilibrium* (d. h. ein Kopplungsungleichgewicht) zu anderen SNPs in der Promoterregion und im kodierenden Bereich des Exon 1 des *CTLA-4*-Gens wurde in der Literatur bereits beschrieben (Torres et al. 2004).

Darüber hinaus wurde das G-Allel ebenfalls mit einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit diverser Autoimmunerkrankungen wie SLE, Hashimoto Thyreoiditis, LADA (*latent autoimmune diabetes in adults*) und Multipler Sklerose in Verbindung gebracht, was ebenfalls für eine erhöhte proinflammatorische Immunantwort dieser Merkmalsträger am rs3087243 Genlokus spricht (Hudson et al. 2002; Torres et al. 2004; Douroudis et al. 2009; Zaletel et al. 2010; Luterek-Puszyńska et al. 2017; Pawlak-Adamska et al. 2017).

Als Ergebnis der Untersuchung sekundärer Zielgrößen konnte ein signifikant niedrigeres Durchschnittsalter der CTLA-4 rs3087243 G-Allel-Träger ggü. den AA-Homozygoten zu Beginn der Sepsis-Erkrankung nachgewiesen werden. Das Tragen des G-Allels erwies sich jedoch auch unter Berücksichtigung des Alters als Störvariable im multivariaten Regressionsmodell als signifikante prognostische Einflussgröße auf die 28- und 90-Tage Mortalität.

Weiterhin konnte für Träger des G-Allels ein deutlich selteneres vorausgegangenes Schlaganfall-Ereignis als präexistente Komorbidität festgestellt werden im Vergleich zu AA-Homozygoten (5 % ggü. 9 %). Diese Beobachtung erreichte allerdings keine statistische Signifikanz.

Neben den niedrigeren 28- und 90-Tage Mortalitätsraten zeigten CTLA-4 rs3087243 G-Allel-Träger ebenfalls einen milderen Krankheitsverlauf in der Analyse der Krankheitsschwere. Sie wurden innerhalb der Beobachtungsperiode signifikant weniger maschinell beatmet und zeigten niedrigere kalkulierte organspezifische SOFA-ZNS-*Subscores*, was im Einklang mit den seltener vorausgegangenen Schlaganfall-Ereignissen stehen könnte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass eine stärkere proinflammatorische Immunantwort der Träger des G-Allels protektiv ggü. pulmonaler Organdysfunktion wirkt und/oder dem Auftreten sekundärer Infektionen wie bspw. Pneumonien vorbeugt.

#### 4.4.3 ... des CTLA-4 H1: TAA-Haplotyps

Durch die Untersuchung von Haplotypen – also die Kombination gemeinschaftlich vererbter, benachbarter Allele mit hoher lokaler Nähe auf dem Chromosom – konnte der Informationsgehalt und die Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung weiter gesteigert werden. Dabei erlaubte die Analyse von Haplotypen die Feststellung kombinierter bzw. additiver Effekte, die sich anhand der Analyse einzelner SNPs noch nicht nachweisen ließen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden für bestimmte Merkmalsträger des am häufigsten vorkommenden rekonstruierten Haplotyps CTLA-4 H1: TAA, bestehend aus den Allel-Ausprägungen rs733618 T, rs231775 A und rs3087243 A, signifikante Unterschiede in der 28- und 90-Tage Mortalitätsrate festgestellt. So zeigten H1: TAA negative Patienten ein signifikant besseres Überleben im Rahmen der Sepsis im Vergleich zu den Trägern dieses Haplotyps. Nicht-Träger dieses Haplotyps verstarben innerhalb der von 28 Tagen zu 14,7 %, während die H1: TAA positiven Patienten zu 22,4 % verstarben; innerhalb der 90-tägigen Beobachtungsperiode war der Unterschied mit 24,4 % ggü. 32,9 % sogar noch deutlicher.

Diese Ergebnisse sind mit der Erkenntnis in Einklang zu bringen, dass der CTLA-4 H1: TAA-Haplotyp aus den jeweils anderen Allel-Ausprägungen als den mit höheren Oberflächenexpressionen und Autoimmunerkrankungen assoziierten genetischen Merkmalen besteht. Im Umkehrschluss tragen H1: TAA negative Patienten diese Allele nicht, was mit einer verminderten Oberflächenexpression, attenuierten Proteinfunktionalität und somit gesteigerten T-Zell-vermittelten Immunantwort einhergehen könnte, ähnlich den Annahmen zu den zuvor genannten signifikanten Ergebnissen.

Trotz ihrer Überlegenheit in der 28- und 90-Tage Mortalität zeigten die H1: TAA negativen Patienten in der Analyse sekundärer Zielgrößen paradoxerweise einen signifikant schwereren Krankheitsverlauf. So erhielten H1: TAA negative Patienten zu Beginn der Sepsis signifikant mehr Dialyse oder Hämodiafiltration als Organersatzverfahren und zeigten höhere Serum-Procalcitonin-Spiegel sowie eine niedrigere tägliche Urinausfuhrmenge. Es lässt sich hieraus ableiten, dass H1: TAA negative Patienten in der vorliegenden Untersuchung über eine vergleichsweise reduzierte Nierenfunktion verfügten.

Auffällig war, dass H1: TAA negative Patienten trotz eines vermeintlich schwereren Krankheitsverlaufs den Trägern des H1: TAA-Haplotyps in der 28- und 90-Tage Mortalität überlegen waren. Einerseits könnte man daraus schließen, dass das Nicht-Tragen des H1: TAA-Haplotyps derart protektiv im Rahmen der Sepsis ist, dass diese Patienten sogar schwerere Krankheitsverläufe besser überleben. Träger dieser genetischen Variante weisen scheinbar einen Immunphänotyp auf, der mit erhöhter Krankheitsschwere aber gleichzeitig guter Aussicht auf Heilung einhergeht. Andererseits sollte auch kritisch hinterfragt werden, ob die untersuchten Parameter – insbesondere Serum-Procalcitonin – geeignete Marker der Sepsis-Krankheitsschwere bzw. der sepsisassoziierten Organdysfunktion sind. Procalcitonin – als gängiger Biomarker in der Identifikation bakterieller Infektionen – wurde in den vergangenen Jahren kontrovers als Biomarker in der Sepsis-Diagnostik diskutiert (Wacker et al. 2013; Rowland et al. 2015; Iankova et al. 2018). Wacker et al. (2013) kamen in ihrer vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten systematischen Bewertung und Meta-Analyse im *Lancet Infectious Diseases* zu dem Ergebnis, dass sich Procalcitonin zwar als Biomarker in der frühen Diagnostik der Sepsis eignet, allerdings aufgrund des starken Einflusses bspw. bestehender Komorbiditäten sehr vorsichtig interpretiert werden sollte (Wacker et al. 2013).

## 4.5 Limitationen der Untersuchung

Besondere Stärken der vorliegenden Untersuchung sind die im Vergleich zu anderen genetischen Assoziationsstudien relativ große Grundgesamtheit und das prospektive Studiendesign; gleichwohl ergeben sich auch für diese Untersuchung Limitationen:

Obwohl die Studienteilnehmer dieser Arbeit von mehreren Intensivstationen der UMG rekrutiert worden sind, ist die Ausrichtung dieser Studie auf ein monozentrisches Studiendesign eine Einschränkung. Durch die Einbeziehung mehrerer klinischer Zentren bzw. die Bestätigung der Ergebnisse in anderen Sepsis-Kohorten – bestenfalls sogar im Ausland mit unterschiedlichen diagnostischen und therapeutischen Standards – hätte sich eine noch höhere wissenschaftliche Aussagekraft und Validität der entdeckten genetischen Assoziationen erzielen lassen.

Weiterhin untersucht diese Arbeit ein Kollektiv überwiegend Kaukasischer Patienten, und damit einhergehend sind die Ergebnisse in ihrer Übertragbarkeit und Gültigkeit für andere Ethnien eingeschränkt. Hintergrund der Ausrichtung auf Kaukasische Patienten ist einerseits die mehrheitlich Kaukasische Abstammung der Sepsis-Patienten auf den untersuchten Intensivstationen; andererseits bestehen zwischen unterschiedlichen Ethnien teilweise erhebliche Divergenzen der Allel-Frequenzen bestimmter an der Immunantwort beteiligter Gen-Polymorphismen und damit zusammenhängend tiefgreifende Effekte bspw. auf die Pharmakokinetik oder den klinischen Phänotyp der Sepsis (Sutherland und Walley 2009; Flores 2015). Eine Verifikation der in dieser Untersuchung entdeckten Assoziation in Bezug auf unterschiedliche Ethnien wäre daher ein empfehlenswertes, aber ein weit über diese Studie hinausgehendes, deutlich aufwändigeres und umfangreicheres Studiendesign.

Eine weitere Einschränkung des untersuchten Patientenkollektivs ist die Beschränkung auf kritisch erkrankte Patienten chirurgischer Intensivstationen mit schweren Grunderkrankungen und einem hohen Anteil vorausgegangener komplexer invasiver chirurgischer Eingriffe wie bereits in Abschnitt 4.3 geschildert. Die Berücksichtigung und Einbeziehung weiterer Patienten bspw. von internistischen oder interdisziplinären Intensivstationen würde vermutlich die Repräsentativität der Untersuchung weiter erhöhen.

Diese Arbeit beinhaltet die Untersuchung dreier SNPs und daraus rekonstruierter Haplotypen. Das *CTLA4*-Gen beinhaltet allerdings eine Vielzahl weiterer Polymorphismen und Mutationen, die ebenfalls mit einer veränderten Proteinfunktionalität assoziiert sind oder Auswirkungen auf die Expression und Distribution des Genproduktes haben könnten (Romo-Tena et al. 2013). Eine möglicherweise bestehende genetische Kopplung und/oder synergistische Wirkung anderer genetischer Varianten innerhalb des *CTLA4*-Gens hätte in einem erweiterten Studiendesign berücksichtigt werden können; dieses konnte allerdings im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nur zu Teilen abgebildet werden.

## 4.6 Fazit und Ausblick

Ein bedeutsames Ergebnis dieser Arbeit ist, dass mit ihr erstmalig der Zusammenhang funktioneller genetischer Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen auf die Mortalität von Patienten mit Sepsis unter Berücksichtigung der zuvor genannten Limitationen nachgewiesen werden konnte. Damit leistet diese Arbeit einen weiteren Beitrag zu der Annahme, dass immunregulatorische Checkpoint-Proteine, wie z. B. CTLA-4, einen entscheidenden Einfluss auf den klinischen Verlauf des Symptomkomplexes Sepsis haben. Die diesen Assoziationen zugrundeliegenden biologischen und molekularen Mechanismen sollten in weiteren Untersuchungen analysiert werden, um die Rolle von CTLA-4 in der Immunpathophysiologie dieser Erkrankung noch transparenter zu machen und auf dieser Basis innovative Ansätze zur Diagnostik und Therapie entwickeln zu können.

Weiterhin eignen sich die in dieser Arbeit entdeckten, mit der Sepsis-Mortalität assoziierten, genetischen Varianten im *CTLA-4*-Gen zur Identifikation von Patienten mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko und können somit als unabhängige prognostische Marker im Rahmen der Sepsis von Bedeutung sein. Aufgrund ihrer Komplexität bleibt eine schnell verfügbare und praktikable Anwendung der genetischen Merkmalsidentifikation und Patienten-Risikostratifizierung bisher in der klinischen Routine allerdings noch offen.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Untersuchung erwecken dennoch Hoffnung, dass sich durch die Anwendung moderner molekularer diagnostischer Verfahren, wie z. B. der Identifikation krankheitsassoziiierter genetischer Varianten, neue Therapieansätze bspw. mittels patientenindividueller Gabe humanisierter monoklonaler Anti-CTLA-4-Antikörper ergeben könnten. Die entdeckten assoziierten genetischen Varianten könnten z. B. eine Rolle bei der Therapiesteuerung einer potentiellen Antikörper-Therapie mit Anti-CTLA-4 spielen.

## 5 Zusammenfassung

Das *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4) ist ein koinhibitorisches Immun-Checkpoint-Protein auf der Oberfläche CD4 positiver T-Lymphozyten. Im Rahmen der T-Zell-vermittelten Immunantwort besitzt CTLA-4 eine negativ kostimulierende immunregulatorische Funktion, um eine Überreaktion des Immunsystems zu vermeiden. Für die Entdeckung des therapeutischen Nutzens der Blockade des CTLA-4-Rezeptors mittels humanisierter monoklonaler Antikörper bei metastasierten Prostatakarzinomen und malignen Melanomen wurde 2018 der Medizinnobelpreis vergeben. Durch die therapeutische Abschwächung des inhibitorischen Signals von CTLA-4 kommt es dabei zu einer Verstärkung der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation.

Aufgrund zuvor beschriebener Assoziationen bestimmter funktioneller genetischer Varianten aus dem *CTLA4*-Gen mit einer attenuierten Funktion des Proteins und somit einer gesteigerten T-Zell-vermittelten Immunantwort sowie mit dem Auftreten diverser Autoimmunerkrankungen, wie Hashimoto Thyreoiditis oder rheumatoider Arthritis, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss dreier funktioneller Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) und abgeleiteter Haplotypen auf das Überleben und den Krankheitsverlauf von Patienten mit Sepsis untersucht. Die 28- und 90-Tage Mortalitätsraten wurden als primäre Zielgrößen definiert, während Patientenbasischarakteristika und Parameter der Krankheitsschwere als sekundäre Zielgrößen untersucht wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 644 prospektiv seit Februar 2012 von den chirurgischen Intensivstationen der Universitätsmedizin Göttingen eingeschlossene Patienten mit Sepsis untersucht. Allen Studienteilnehmern wurde zur Gewinnung von Erbmaterial innerhalb von 72 Stunden nach Beginn der Sepsis Blut abgenommen; relevante klinische Parameter wurden innerhalb der ersten 28 Tage nach Sepsis-Beginn dokumentiert und eine Überlebenskontrolle nach 28 und 90 Tagen durchgeführt. Alle Patienten wurden mittels TaqMan-Real-Time-Polymerasekettenreaktion (PCR) und vorgefertigter *genotyping assays* für die funktionellen CTLA-4-SNPs rs733618, rs231775 und rs3087243 genotypisiert; zudem wurden Haplotypen aus den Ergebnissen der Genotypisierung rekonstruiert. Für die durchgeführten Untersuchungen sowie für alle experimentellen Protokolle lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen mit der Antragsnummer 15/1/12 vor.

Mittels Kaplan-Meier 28- und 90-Tage Überlebenszeitanalysen konnten in dieser Arbeit erstmalig signifikante Überlebensvorteile bestimmter genetischer Merkmalsträger festgestellt werden: CTLA-4 rs231775 GG-Homozygote ( $n = 101$ ) zeigten gegenüber A-Allel-Trägern an dieser Stelle ( $n = 543$ ) eine signifikant niedrigere Mortalität nach 28 Tagen (11,9 % ggü. 21,5 %;  $p = 0,0308$ ) und 90 Tagen (21,8 % ggü. 31,9 %;  $p = 0,0357$ ). Auch das Tragen des CTLA-4 rs3087243 G-Allels ( $n = 502$ ) war mit einer überlegenen 28- (17,9 % ggü. 27,5 %;  $p = 0,0161$ ) und 90-Tage Mortalitätsrate (27,3 % ggü. 40,8 %;  $p = 0,0024$ ) ggü. AA-Homozygoten ( $n = 142$ ) assoziiert. Durch die Untersuchung von Haplotypen – also



aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf dem Chromosom gemeinschaftlich vererbter krankheitsassoziierter Allele – konnte der Informationsgehalt dieser Untersuchung weiter gesteigert werden. Nicht-Träger des H1: TAA-Haplotyps (bestehend aus CTLA-4 rs733618 T, rs231775 A und rs3087243 A; n = 197) zeigten gegenüber H1: TAA-Haplotyp positiven Studienteilnehmern (n = 447) ebenfalls signifikant bessere 28- (14,7 % ggü. 22,4 %; p = 0,0271) und 90-Tage Mortalitätsraten (24,4 % ggü. 32,9 %; p = 0,0265).

Nach statistischer Adjustierung für potentielle Störvariablen im Rahmen eines multivariaten Cox-Regressionsmodells erwiesen sich die überlegenen genetischen Varianten als signifikante unabhängige prognostische Marker für das 28- und 90-Tage Überleben. Es ergaben sich adjustierte *Hazard Ratios* von 0,511 (p = 0,0278) und 0,627 (p = 0,0406) der 28- und 90-Tage Mortalität für Träger des rs231775 GG-Genotyps, 0,674 (p = 0,0408) und 0,667 (p = 0,0102) für Träger des rs3087243 G-Allels sowie 0,631 (p = 0,0314) und 0,695 (p = 0,0320) für Nicht-Träger des TAA-Haplotyps.

Mit der vorliegenden Doktorarbeit konnte erstmalig die prognostische Bedeutung dreier genetischer Varianten aus dem *CTLA-4*-Gen in Bezug auf die 28- und 90-Tage Mortalität von Patienten mit Sepsis nachgewiesen werden. Die ermittelten krankheitsassozierten genetischen Varianten können für die Identifikation von Risikopatienten, zur weitergehenden Aufklärung der Pathophysiologie des Krankheitsbildes Sepsis und für eine potentielle Untersuchung individueller maßgeschneiderter Therapien septischer Patienten, bspw. mittels einer Anti-CTLA-4 Antikörpertherapie, von besonderer Bedeutung sein. Ein therapeutischer Nutzen der gezielten Blockade immunregulatorischer Proteine wie CTLA-4 oder PD-1 im Rahmen der Sepsis-Erkrankung konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden; die Identifikation prognostischer genetischer Varianten könnte allerdings bereits erste Anhaltspunkte hierfür geben. Die zugrundeliegenden biologischen und molekularen Mechanismen der vorliegenden Ergebnisse sollten in nachfolgenden Studien weiter untersucht werden.

# 6 Anhang

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Name:		Bettenplatz:	
Datum:	. . .	. . .	. . .
Coagulation:			
Niere:			
Leber:			
Cardiovascular:			
ZNS:			
Respiratory:			
SOFA-SCORE:			

Anhang 1: Täglicher Screening-Bogen zur Identifikation septischer Patienten

**Patientennummer:**

**Tag**  **ICU – Beginn Sepsis**

**Datum:**

Von 00:00 Uhr bis 23:59 Uhr

UNIVERSITÄTSMEDIZIN **UMG**  
GÖTTINGEN

durch: \_\_\_\_\_

SOFA

Temperatur (°C)	Höchste 3 <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigste 3 <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Hämoglobin (g/dl)	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Hämatokrit (%)	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Erythrozytenzahl (10 <sup>6</sup> /µl)	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Thrombozytenzahl (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		
Leukozytenzahl (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		

**Herz-Kreislaufsystem**

Herzfrequenz (min <sup>-1</sup> )	Höchste <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigste <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Systolischer Blutdruck (mmHg)	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Adrenalin (µg/min)	Höchste Dosis <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		
Noradrenalin (µg/min)	Höchste Dosis <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		
Dobutamin (µg/kg/min)	Höchste Dosis <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		

**Atmung / Säure-Basen Haushalt**

Atemfrequenz (min <sup>-1</sup> )	Höchste <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigste <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
PaO2 (mmHg)		Niedrigste <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Entsprechender PaCO2 (mmHg)		<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Entsprechende FiO2		(O <sub>2</sub> -Flow <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> l)	0, <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Beatmung*	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

\* Beatmung beinhaltet auch alle unterstützenden Beatmungsvarianten, wie CPAP, NIV, etc.

**BGA**

Arterieller pH	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Kalium (mmol/l)	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Natrium (mmol/l)	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Laktat (mmol/l)	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Base Excess	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	Niedrigster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Glucose (mg/dl)	Mittelwert <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		
Insulin	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	

**Leber**

Bilirubin (mg/dl)	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	ALT <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
AST / ALT (IU/l)	AST <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	ALT <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Quick (%) / aPTT (sec)	Quick <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	aPTT <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>	
Systemische Antikoagulation	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

**Niere**

Kreatinin (mg/dl)	Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		
Urinausscheidung (ml) / 24 h	<input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		
Dialyse*	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

\*CVVHF, Hämodialyse, Peritonealdialyse

**ZNS** Glasgow Coma Scale

Höchster <input style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>		Visite kontrolliert <input type="checkbox"/>	
		Eingabe kontrolliert <input type="checkbox"/>	

Anhang 2: Case Report Form – tägliche Patientenvsiste

## 7 Literaturverzeichnis

- Angus DC, van der Poll T (2013): Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369, 840–851
- Angus DC, Pereira CAP, Silva E (2006): Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6, 207–212
- Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkhalha H, Tessier MC, Polychronakos C (2002): A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 277, 46478–46486
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005): Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265
- Benhatchi K, Jochmanová I, Habalová V, Wagnerová H, Lazúrová I (2011): CTLA4 exon1 A49G polymorphism in Slovak patients with rheumatoid arthritis and Hashimoto thyroiditis - results and the review of the literature. *Clin Rheumatol* 30, 1319–1324
- Blank CU, Enk A (2015): Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *Int Immunol* 27, 3–10
- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL (1992): The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101, 1481–1483
- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, Kreisel D, Krupnick AS et al. (2011): Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306, 2594–2605
- Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM (2012): A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 16, R112
- Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS (2014): The changing immune system in sepsis. *Virulence* 5, 45–56
- Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, Izzeddine H, Marabelle A, Champiat S, Berdelou A et al. (2016): Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 473–486
- Bouza C, López-Cuadrado T, Saz-Parkinson Z, Amate-Blanco JM (2014): Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: A nationwide population-based analysis (2006-2011). *BMC Infect Dis* 14, 3863
- Buchbinder EI, Desai A (2016): CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol* 39, 98–106
- Burton PR, Tobin MD, Hopper JL (2005): Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 366, 941–951

- Chang KC, Burnham CA, Compton SM, Rasche DP, Mazuski R, McDonough J, Unsinger J, Korman AJ, Green JM, Hotchkiss RS (2013): Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit Care* 17, R85
- Chang WW, Zhang L, Yao YS, Su H (2012): Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and systemic lupus erythematosus: an updated analysis. *Mol Biol Rep* 39, 9159–9165
- Chen YJ, Chen FL, Chen JH, Wu MTM, Chen YL, Chien DS, Ko Y (2019): Epidemiology of sepsis in Taiwan. *Medicine (Baltimore)* 98, e15725
- Churpek MM, Zdravcevic FJ, Winslow C, Howell MD, Edelson DP (2015): Incidence and prognostic value of the systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunctions in ward patients. *Am J Respir Crit Care Med* 192, 958–964
- Churpek MM, Snyder A, Han X, Sokol S, Pettit N, Howell MD, Edelson DP (2017): Quick sepsis-related organ failure assessment, systemic inflammatory response syndrome, and early warning scores for detecting clinical deterioration in infected patients outside the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 195, 906–911
- Clark AG (2004): The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol* 27, 321–333
- Cohen J, Vincent JL, Adhikari NKJ, Machado FR, Angus DC, Calandra T, Jaton K, Giulieri S, Delaloye J, Opal S et al. (2015): Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* 15, 581–614
- Coopersmith C, Backer DD, Deutschman C, Ferrer R, Lat I, Machado F, Martin G, Martin-Loeches I, Nunnally M, Antonelli M et al. (2018): Surviving sepsis campaign: Research priorities for sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 46, 1334–1356
- Delano MJ, Ward PA (2016): The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* 274, 330–353
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R et al. (2013): Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 41, 580–637
- Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V. (2018): S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/079-001.html>; Zugriff am 14.03.2020.
- Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Ventz M, Walfish PG, Usadel KH, Badenhop K (1997): Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4130–4132
- Douroudis K, Prans E, Kisand K, Nemvalts V, Uibo R (2009): Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms are associated with latent autoimmune diabetes in adults. *Clin Chim Acta* 403, 226–228

- Drösler S, Garbe E, Hasford J, Schubert I, Ulrich V, van de Ven W, Wambach A, Wasem J, Wille E (2017): Sondergutachten zu den Wirkungen des morbiditätsorientierten Risikostrukturausgleichs - erstellt durch den Wissenschaftlichen Beirat zur Weiterentwicklung des Risikostrukturausgleichs im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit. Geschäftsstelle des Wissenschaftlichen Beirats zur Weiterentwicklung des morbiditätsorientierten Risikostrukturausgleichs beim Bundesversicherungsamt 645, 83–138
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S et al. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33, 606–618
- Fallon EA, Biron-Girard BM, Chung CS, Lomas-Neira J, Heffernan DS, Monaghan SF, Ayala A (2018): A novel role for coinhibitory receptors/checkpoint proteins in the immunopathology of sepsis. *J Leukoc Biol* 103, 1151–1164
- Finkelsztein EJ, Jones DS, Ma KC, Pabón MA, Delgado T, Nakahira K, Arbo JE, Berlin DA, Schenck EJ, Choi AMK, Siempos II (2017): Comparison of qSOFA and SIRS for predicting adverse outcomes of patients with suspicion of sepsis outside the intensive care unit. *Crit Care* 21, 73
- Fleischmann C, Hartmann M, Hartog C, Welte T, Heublein S, Thomas-Rueddel D, Dennler U, Reinhart K (2015): Epidemiology of sepsis in Germany: incidence, mortality and associated costs of care 2007-2013. *Intensive Care Med Exp* 3, A50
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K (2016): Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193, 259–272
- Fleischmann-Struzek C, Mikolajetz A, Schwarzkopf D, Cohen J, Hartog CS, Pletz M, Gastmeier P, Reinhart K (2018): Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between national health systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med* 44, 1826–1835
- Flores C (2015): Host genetics shapes adult sepsis survival. *Lancet Respir Med* 3, 7–8
- Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P (2002): Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch Arztebl Int* 99, 3190
- Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG (2013): Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 41, 1167–1174
- Gardner D, Jeffery LE, Sansom DM (2014): Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade. *Am J Transplant* 14, 1985–1991
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Opal SM (2016): The role of genetics and antibodies in sepsis. *Ann Transl Med* 4, 328

- Gotts JE, Matthay MA (2016): Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353, 1585
- Hagel S, Brunkhorst F (2011): Sepsis. *Intensivmed* 48, 57–73
- Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A (2011): Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief* 62, 1–8
- Hamers L, Kox M, Pickers P (2015): Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. *Minerva Anesthesiol* 81, 426–439
- HapMap Project (2019): <https://www.coriell.org/1/NIGMS/Collections/HapMap-project>; Zugriff am 28.12.2019.
- Hinz J, Büttner B, Kriesel F, Steinau M, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Tzvetkov M, Bergmann I, Mansur A (2017): The FER rs4957796 TT genotype is associated with unfavorable 90-day survival in Caucasian patients with severe ARDS due to pneumonia. *Sci Rep* 7, 9887
- Hotchkiss RS, Karl IE (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348, 138–150
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013a): Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13, 260–268
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013b): Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13, 862–874
- Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL (2016): Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16045
- Hudson L, Rocca K, Song Y, Pandey J (2002): CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet* 111, 452–455
- Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A (2014): The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med* 20, 224–233
- Iankova I, Thompson-Leduc P, Kirson NY, Rice B, Hey J, Krause A, Schonfeld SA, DeBrase CR, Bozzette S, Schuetz P (2018): Efficacy and safety of Procalcitonin guidance in patients with suspected or confirmed sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 46, 691–698
- Inoue S, Bo L, Bian J, Unsinger J, Chang K, Hotchkiss RS (2011): Dose dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis. *Shock* 36, 38
- Karabon L, Kosmaczewska A, Bilinska M, Pawlak E, Ciszak L, Jedynak A, Jonkisz A, Noga L, Pokryszko-Dragan A, Koszewicz M, Frydecka I (2009): The CTLA-4 gene polymorphisms are associated with CTLA-4 protein expression levels in multiple sclerosis patients and with susceptibility to disease. *Immunology* 128, 787–796

- Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R (2014): Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 311, 1308–1316
- Kawai T, Akira S (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373–384
- Kempker JA, Martin GS (2016): The changing epidemiology and definitions of sepsis. *Clin Chest Med* 37, 165–179
- Kim PS, Ahmed R (2010): Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol* 22, 223–230
- Klocke K, Sakaguchi S, Holmdahl R, Wing K (2016): Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 2383–2392
- Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ (2000): CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' Disease. *J Immunol* 165, 6606–6611
- Kumar A (2016): Systematic bias in meta-analyses of time to antimicrobial in sepsis studies. *Crit Care Med* 44, 234–235
- Levy M, Fink M, Marshall J, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal S, Vincent JL, Ramsay G (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 31, 1250–1256
- Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, Vincent JL, Townsend S, Lemeshow S, Dellinger RP (2012): Outcomes of the surviving sepsis campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 12, 919–924
- Levy MM, Evans LE, Rhodes A (2018): The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update. *Intensive Care Med* 44, 925–928
- Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J (2001): CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* 2, 145–152
- Linde-Zwirble WT, Angus DC (2004): Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care* 8, 222–226
- Luterek-Puszyńska K, Malinowski D, Paradowska-Gorycka A, Safranow K, Pawlik A (2017): CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 36, 1129–1135
- Mansur A, Hinz J, Hillebrecht B, Bergmann I, Popov AF, Ghadimi M, Bauer M, Beissbarth T, Mihm S (2014): Ninety-day survival rate of patients with sepsis relates to programmed cell death 1 genetic polymorphism rs11568821. *J Investig Med* 62, 638–643



- Mansur A, Liese B, Steinau M, Ghadimi M, Bergmann I, Tzvetkov M, Popov AF, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J (2015): The CD14 rs2569190 T>T genotype is associated with an improved 30-day survival in patients with sepsis: A prospective observational cohort study. *PLoS One* 10, e0127761
- Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Larrad M, Park Y, Zhang ZX, Goldstein DR, Tao YW et al. (1997): Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA-4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 6, 1275–1282
- Mayr FB, Yende S, Angus DC (2014): Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5, 4–11
- McCoy KD, Le Gros G (1999): The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol* 77, 1–10
- Mewes C, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Tzvetkov M, Shen-Orr S, Bergmann I, Mansur A (2018): The CTLA-4 rs231775 GG genotype is associated with favorable 90-day survival in Caucasian patients with sepsis. *Sci Rep* 8, 15140
- Mewes C, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Tzvetkov M, Jensen O, Runzheimer J et al. (2019): CTLA-4 genetic variants predict survival in patients with sepsis. *J Clin Med* 8, 70
- Monneret G, Venet F, Kullberg BJ, Netea MG (2011): ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med Mycol* 49, S17–S23
- Mullis KB (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262, 56–61, 64–65
- Munford RS, Pugin J (2001): Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 316–321
- Murphy K, Weaver C: *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2018
- Nagel T, Kalden JR, Manger B (1998): Regulation of T-cell activation by CD28 and CTLA-4. *Med Klin (Munich)* 93, 592–597
- Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS et al. (1996): The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 5, 1075–1080
- Nobel Media AB (2018): All Nobel Prizes. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes/>; Zugriff am 15.10.2018.
- Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC (2011): The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 15, 183
- Papathanassoglou E, Middleton N, Benbenishty J, Williams G, Christofi MD, Hegadoren K (2017): Systematic review of gender- dependent outcomes in sepsis. *Nurs Crit Care* 22, 284–292

- Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S: Physiologie. 6. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2018
- Park JH, Chang HS, Park CS, Jang AS, Park BL, Rhim TY, Uh ST, Kim YH, Chung IY, Shin HD (2007): Association analysis of CD40 polymorphisms with asthma and the level of serum total IgE. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 775–782
- Pawlak-Adamska E, Frydecka I, Bolanowski M, Tomkiewicz A, Jonkisz A, Karabon L, Partyka A, Nowak O, Szalinski M, Daroszewski J (2017): CD28/CTLA-4/ICOS haplotypes confers susceptibility to Graves' disease and modulates clinical phenotype of disease. *Endocrine* 55, 186–199
- Peters van Ton AM, Kox M, Abdo WF, Pickkers P (2018): Precision immunotherapy for sepsis. *Front Immunol* 9, 1926
- Rahmel T (2018): Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks – die neuen Leitlinien. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 53, 142–148
- Ramachandran G (2014): Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence* 5, 213–218
- Rautanen A, Mills TC, Gordon AC, Hutton P, Steffens M, Nuamah R, Chiche JD, Parks T, Chapman SJ, Davenport EE et al. (2015): Genome-wide association study of survival from sepsis due to pneumonia: an observational cohort study. *Lancet Respir Med* 3, 53–60
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S et al. (2010): Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI). *Anaesthesist* 59, 347–370
- Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS (2012): New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 25, 609–634
- Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, Kadri SS, Angus DC, Danner RL, Fiore AE et al. (2017): Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. *JAMA* 318, 1241
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME et al. (2017): Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med* 43, 304–377
- Romo-Tena J, Gómez-Martín D, Alcocer-Varela J (2013): CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmun Rev* 12, 1171–1176
- Rowland T, Hilliard H, Barlow G (2015): Procalcitonin: potential role in diagnosis and management of sepsis. *Adv Clin Chem* 68, 71–86
- rs231775 RefSNP Report (2019): dbSNP - NCBI rs231775 RefSNP Report. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs231775>; Zugriff am: 21.03.2019.

- rs733618 RefSNP Report (2019): dbSNP - NCBI rs733618 RefSNP Report.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs733618>; Zugriff am: 21.03.2019.
- rs3087243 RefSNP Report dbSNP - NCBI rs3087243 RefSNP Report.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3087243>; Zugriff am: 21.03.2019.
- Savoia P, Astrua C, Fava P (2016): Ipilimumab (Anti-Ctla-4 Mab) in the treatment of metastatic melanoma: Effectiveness and toxicity management. *Hum Vaccin Immunother* 12, 1092–1101
- Scalapino KJ, Daikh DI (2008): CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev* 223, 143–155
- Scicluna BP, van Vught LA, Zwinderman AH, Wiewel MA, Davenport EE, Burnham KL, Nürnberg P, Schultz MJ, Horn J, Cremer OL et al. (2017): Classification of patients with sepsis according to blood genomic endotype: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 5, 816–826
- SepNet Critical Care Trials Group (2016): Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med* 42, 1980–1989
- Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M et al. (2016): Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 762–774
- Shankar-Hari M, Harrison DA, Rowan KM (2016): Differences in impact of definitional elements on mortality precludes international comparisons of sepsis epidemiology - a cohort study illustrating the need for standardized reporting. *Crit Care Med* 44, 2223–2230
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Coopersmith CM, Hotchkiss RS et al. (2016): The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801
- Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh LA, Postow MA, Wong P, Ho TS et al. (2014): Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 371, 2189–2199
- Soskic B, Qureshi OS, Hou T, Sansom DM (2014): A transendocytosis perspective on the CD28/CTLA-4 pathway. *Adv Immunol* 124, 95–136
- Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG (2011): The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 6, 19–48
- Sutherland AM, Walley KR (2009): Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care* 13, 210
- Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J (2006): A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 24, 65–97

- Timsit JF, Ruppe E, Ferrer R (2018): Focus on sepsis: new concepts and findings in sepsis care. *Intensive Care Med* 44, 1997–1999
- Ting WH, Chien MN, Lo FS, Wang CH, Huang CY, Lin CL, Lin WS, Chang TY, Yang HW, Chen WF et al. (2016): Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease in children and adults: case-control study. *PLoS ONE* 11, e0154394
- Torres B, Aguilar F, Franco E, Sánchez E, Sánchez-Román J, Alonso JJ, Núñez-Roldán A, Martín J, González-Escribano MF (2004): Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50, 2211–2215
- Uhle F, Chousterman BG, Grützmann R, Brenner T, Weber GF (2016): Pathogenic, immunologic, and clinical aspects of sepsis - update 2016. *Expert Rev Anti Infect Ther* 14, 917–927
- van der Poll T, Opal SM (2008): Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 8, 32–43
- van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG (2017): The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 17, 407–420
- Verhagen J, Sabatos CA, Wraith DC (2008): The role of CTLA-4 in immune regulation. *Immunol Lett* 115, 73–74
- Vincent JL (2016): The clinical challenge of sepsis identification and monitoring. *PLoS Med* 13, e1002022
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996): The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working group on sepsis-related problems of the european society of intensive care medicine. *Intensive Care Med* 22, 707–710
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y et al. (2009): International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302, 2323–2329
- Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ (2013): Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381, 774–775
- Vught L van, Scicluna B, Wiewel M, Hoogendijk A, Klouwenberg PMK, Ong DS, Cremer O, Horn J, Franitza M, Toliat M et al. (2017): Association of gender with outcome and host response in critically ill sepsis patients. *Crit Care Med* 45, 1854–1862
- Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P (2013): Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 13, 426–435
- Walker LSK (2013): Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun* 45, 49–57

- Walker LSK, Sansom DM (2015): Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol* 36, 63–70
- Wang K, Zhu Q, Lu Y, Lu H, Zhang F, Wang X, Fan Y (2017): CTLA-4 +49 G/A polymorphism confers autoimmune disease risk: an updated meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 21, 222–227
- Wang X, Pirskanen R, Giscombe R, Lefvert AK (2008): Two SNPs in the promoter region of the CTLA-4 gene affect binding of transcription factors and are associated with human myasthenia gravis. *J Intern Med* 263, 61–69
- Washburn ML, Wang Z, Walton AH, Goedegebuure SP, Figueroa DJ, Van Horn S, Grossman J, Remlinger K, Madsen H, Brown J et al. (2019): T cell- and monocyte-specific RNA-sequencing analysis in septic and nonseptic critically ill patients and in patients with cancer. *J Immunol* 203, 1897–1908
- Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T (2014): Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 5, 36–44
- Wilhelm W (Hrsg.): *Praxis der Intensivmedizin*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2013
- Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, Allison JP, Urban WJ, Robert C, O'Day SJ, Hoos A, Humphrey R, Berman DM et al. (2013): Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 1291, 1–13
- Wolff ASB, Mitchell AL, Cordell HJ, Short A, Skinningsrud B, Ollier W, Badenhoop K, Meyer G, Falorni A, Kampe O et al. (2015): CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease. *Genes Immun* 16, 430–436
- Zaletel K, Krhin B, Gaberšček S, Biček A, Pajič T, Hojker S (2010): Association of CT60 cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphism with thyroid autoantibody production in patients with Hashimoto's and postpartum thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 161, 41
- Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, Zhu K, Wan X, Cai Z, Deng X (2011): Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* 15, R70
- Ziegler A (2002): *Genetische Epidemiologie - Gegenwart und Zukunft*. *Dtsch Arztebl International* 99, 2342

## Danksagung

Zu aller erst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ashham Mansur für die Bereitstellung der Fragestellung sowie die freundliche und sehr erfolgreiche Zusammenarbeit der letzten Jahre danken. Mein uneingeschränkter Dank gilt ihm für die umfangreiche Betreuung dieser Arbeit, seine hervorragende fachbezogene Unterstützung und die zahlreichen kollegialen und konstruktiven Gespräche.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. med. José Hinz für seine Hilfsbereitschaft und seine fachkundige Unterstützung bei der Ergebnisinterpretation und Administration des Projektes herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Mladen Tzvetkov sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie der UMG – insb. Frau Karoline Jobst und Herrn Ole Jensen – für ihre Hilfestellung bei der Genotypisierung und Haplotypen-Rekonstruktion.

Ein herzlicher Dank gebührt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Intensivstationen 0119, 0116, 1014 und 1012 der UMG für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und Probengewinnung.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern, Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe ‚Personalisierte Medizin‘ der Klinik für Anästhesiologie der UMG für die gute Zusammenarbeit und eine sehr schöne Zeit danken.