

Aus der Klinik für Gastroenterologie und gastrointestinale Onkologie

(Prof. Dr. med. V. Ellenrieder)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Assoziation des *PDCD1* rs11568821 GG-Genotyps mit stärkerer Morbidität bei Intensivpatienten mit Krankheitsbild Sepsis:  
Vergleich der *SOFA-Sub-Scores***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Sebastian Gerber**

aus

Wittlich

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. S. Mihm

Ko-Referent/in: Prof. Dr. H. Bickeböller

Datum der mündlichen Prüfung: 30.06.2016

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Assoziation des *PDCD1* rs11568821 GG-Genotyps mit stärkerer Morbidität bei Intensivpatienten mit Krankheitsbild Sepsis: Vergleich der SOFA-Sub-Scores" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Krankheitsbild Sepsis.....	1
1.1.1 Einführung.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Definitionen und Diagnosekriterien.....	5
1.1.3.1 Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock.....	5
1.1.3.2 <i>Sequential organ failure assessment (SOFA)-Score</i> .....	8
1.1.3.3 <i>APACHE-II-Score</i> .....	10
1.1.4 Wichtige klinische und pathophysiologische Aspekte der Organdys- funktion und des Organversagens bei Sepsis.....	12
1.1.5 Therapiemöglichkeiten.....	16
1.2 Die Aktivierung der angeborenen Immunität als erste Instanz und die Dysfunktion von Effektorzellen als eine späte bei Sepsis.....	18
1.2.1 Der Rezeptor PD-1.....	21
1.2.2 Liganden des Rezeptors PD-1.....	22
1.2.3 PD-1-Signaltransduktion und intrazelluläre Signalkaskaden.....	23
1.2.4 Bedeutungen von PD-1 in peripherer Toleranz, Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen.....	25
1.2.5 Bedeutungen von PD-1 für Sepsis und Infektionskrankheiten.....	25
1.2.6 Der genetische Polymorphismus <i>PDCD1</i> rs11568821.....	27
1.3 Fragestellung.....	30
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
2.1 Patienten.....	31
2.2 Material.....	32
2.2.1 Substanzen.....	32
2.2.2 Gebrauchswaren.....	33
2.2.3 Kits und Assays.....	33
2.2.4 Geräte.....	34
2.3 Methoden.....	35
2.3.1 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs).....	35
2.3.2 Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus PBMCs.....	37

2.3.3	Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus Heparin-Vollblut.....	37
2.3.4	Messung der DNA-Konzentration/DNA-Reinheit und Kontrolle der DNA-Integrität.....	38
2.3.5	Genotypisierung mittels <i>Real Time</i> PCR.....	39
2.3.5.1	Prinzip einer PCR.....	39
2.3.5.2	Allelische Diskriminierung.....	41
2.3.6	Kollaborative Erhebung klinischer und experimenteller Daten.....	45
2.3.7	Auswertung und Statistik.....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1	Häufigkeitsverteilung der <i>PDCD1</i> rs11568821-Genotypen im Kollektiv.....	48
3.2	Epidemiologische und klinische Parameter bei Sepsis-Beginn.....	49
3.3	Klinische Daten im Krankheitsverlauf.....	52
3.3.1	Organersatzverfahren und Verweildauer.....	52
3.3.2	SOFA-Score und SOFA-Sub-Scores.....	53
3.3.2.1	Assoziationen von SOFA- und SOFA-Sub-Scores mit <i>PDCD1</i> rs11568821.....	53
3.3.2.2	Möglicher Einfluss weiterer Faktoren auf den SOFA-Score/Sub- Scores.....	59
3.4	Mortalitätsanalysen.....	62
3.4.1	Kaplan-Meier Methode.....	62
3.4.2	Cox-Regression.....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
6.1	Internetquellen.....	88

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Der Zusammenhang zwischen Infektion, Sepsis und SIRS.....	5
Abbildung 2	Wichtige Mechanismen, die zu einer Vasodilatation bei Sepsis führen.....	13
Abbildung 3	Entstehung von Gewebe-Hypoperfusion und Verlust der Diffusions-Barriere des Endothels.....	15
Abbildung 4	Potentielle Phasen einer inflammatorischen Antwort bei Sepsis.....	19
Abbildung 5	Vorkommen und Funktion des PD-1/PD-L1/PD-L2-Pfades.....	23
Abbildung 6	Intrazelluläre Signalkaskaden von PD-1 nach Stimulierung von TCR/CD3 und CD28 einer T-Zelle.....	24
Abbildung 7	Der SNP <i>PDCDI</i> rs11568821.....	28
Abbildung 8	Leucosep nach Zentrifugation.....	36
Abbildung 9	DNA-Banden im Agarose-Gel unter UV-Licht.....	39
Abbildung 10	Allelische Diskriminierung.....	42
Abbildung 11	Resultat einer allelischen Diskriminierung.....	43
Abbildung 12	Kinetik der PCR-Reaktion.....	44
Abbildung 13	Der SOFA-Score als Funktion von <i>Follow-Up</i> -Tag und Genotyp-Gruppe.....	55
Abbildung 14	Durchschnittliche SOFA-Sub-Scores an allen <i>Follow-Up</i> -Tagen.....	57
Abbildung 15	Kaplan-Meier-Kurve.....	63

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Führende Todesursachen in den USA im Jahre 2012.....	2
Tabelle 2	Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock.....	7
Tabelle 3	Die Zusammensetzung des <i>Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-</i> <i>Scores</i> .....	9
Tabelle 4	Der APACHE-II-Score zur Klassifikation der Schwere einer Erkrankung.....	11
Tabelle 5	Die zwei Reporter der TaqMan™-Sonde und ihre zu bindenden Allele.....	44
Tabelle 6	Verteilung der <i>PDCDI</i> rs11568821-Genotypen innerhalb des Kollektivs.....	48
Tabelle 7	Epidemiologische und klinische Patientendaten unter Berücksichtigung des jeweiligen <i>PDCDI</i> rs11568821-Genotyps.....	50
Tabelle 8	Klinische Patientendaten an <i>Follow-Up</i> -Tag 1 unter Berücksichtigung des jeweiligen <i>PDCDI</i> rs11568821-Genotyps.....	51
Tabelle 9	Organersatzverfahren im Krankheitsverlauf und Verweildauer.....	52

Tabelle 10	Durchschnittlicher SOFA-Score und <i>Sub-Scores</i> innerhalb des Krankheitsverlaufs.....	54
Tabelle 11	Zusammenhang (in Form des p-Wertes) der Genotyp-Gruppe mit dem SOFA-Score und dessen <i>Sub-Scores</i> in verschiedenen Phasen des Krankheitsverlaufs.....	54
Tabelle 12	Durchschnittliche SOFA-Scores für jeden <i>Follow-Up</i> -Tag.....	56
Tabelle 13	p-Werte der sechs SOFA- <i>Sub-Scores</i> für alle <i>Follow-Up</i> -Tage.....	58
Tabelle 14	Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den SOFA-Score in verschiedenen Phasen.....	60
Tabelle 15	Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den Lungen- und Herz/Kreislauf- <i>Sub-Score</i> in verschiedenen Phasen.....	60
Tabelle 16	Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den ZNS- und Nieren- <i>Sub-Score</i> in verschiedenen Phasen.....	61
Tabelle 17	Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den Blut- und Leber- <i>Sub-Score</i> in verschiedenen Phasen.....	61
Tabelle 18	Mortalitätsraten an <i>Follow-Up</i> -Tag 28 und 90.....	62
Tabelle 19	Cox-Regression.....	64

## Abkürzungsverzeichnis

AKI	Akute Niereninsuffizienz ( <i>engl. acute kidney injury</i> )
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>engl. analysis of variance</i> )
APACHE	<i>Acute physiology and chronic health evaluation</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle
aPC	Aktiviertes Protein C
APS	<i>Acute physiology Score</i>
ARDS	<i>Acquired respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CdK	Cyclin-abhängige Kinase
CHP	<i>Chronic health point</i>
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DC	Dendritische Zelle
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorischer Sauerstoffanteil ( <i>engl. fraction of inspired oxygen</i> )
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
gDNA	Genomische DNA
GenoSep	Bedeutung genetischer Polymorphismen der angeborenen Immunabwehr bei Sepsis und Organversagen
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen-DR</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
ICD-X	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, X. Ausgabe
ICU	Intensivstation ( <i>engl. intensive care unit</i> )
IFN-	Interferon-
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin-
ITIM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv
ITSM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Umstell-Motiv
LOS	Verweildauer ( <i>engl. length of stay</i> )
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MAP	Mittlerer arterieller Druck ( <i>engl. middle arterial pressure</i> )
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MEK-ERK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular-signal-regulated kinase</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MODS	<i>Multiple organ dysfunction Score</i>
MOV	Multiorganversagen
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
n	Probenanzahl
NFQ	<i>Non fluorescent quencher</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	<i>No template control</i>
NYHA	New York Heart Association
OP	Operation
p	Irrtumswahrscheinlichkeit



---

PaX	Partialdruck des Gases X
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death 1 (Protein)</i>
<i>PDCD1</i>	Humanes PD-1-Gen
PD-L	<i>Programmed death-ligand</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
rs#	<i>Reference SNP cluster</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
RUNX-1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
S-	Serum-
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SHP-2	<i>Src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOFA	<i>Sequential organ failure assessment</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>eff</sub> -Zelle	Effektor-T-Zelle
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T <sub>reg</sub> -Zelle	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
x g	X Vielfaches der Erdbeschleunigung (g=9,81 m/s <sup>2</sup> )

---

ZNS            Zentrales Nervensystem



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Krankheitsbild Sepsis

### 1.1.1 Einführung

Bei einer folgenden kurzen Betrachtung der Etymologie des Begriffs „Sepsis“ offenbaren sich erste Erklärungsversuche der Pathophysiologie und die über Jahrtausende hinwegreichende Aktualität dieser komplexen Erkrankung, die bis in die Gegenwart reicht (Botero und Pérez 2012; Majno 1991). Trotz des Jahrtausende langen Wissens um die Existenz eines Krankheitskomplexes, den wir heute als Sepsis bezeichnen, wurden tiefgreifende Erkenntnisse darüber erst in den letzten 200 Jahren gewonnen (Vincent und Abraham 2006).

Der Begriff „Sepsis“ hat seinen Ursprung im Altgriechischen (*σηψις*) und bedeutet in der deutschen Übersetzung etwa „Fäulnis von tierischen oder pflanzlichen Substanzen“ (Majno 1991). Erste Erwähnungen des Wortes „Sepsis“ finden wir in den Gedichten Homers und später auch in den Werken Hippokrates´ (Geroulanos und Douka 2006; Sullivan 1996). Im Umfeld der damals anerkannten Humoralpathologie (Säftelehre), bei der insbesondere Körperflüssigkeiten Bestandteil der Betrachtung waren, wurde der Begriff „Sepsis“ in seiner oben erwähnten Bedeutung z.B. bei Verletzungen angewandt, die einen eitrigen, übelriechenden Ausfluss und Fieber zur Folge hatten, was unseren modernen Sepsis-Diagnosekriterien bereits recht nahe kommt (Bone et al. 1992; Grmek 1991; Majno 1991). Mit Ausgang des 14. Jahrhunderts und der Einführung von Feuerwaffen und den dadurch verursachten Verletzungen sprach der Arzt Hieronymus Brunschwig (1450 – 1533) bereits bei bestimmten konsekutiven Krankheitsbildern von einer „Blutvergiftung“ (Botero und Pérez 2012). Dies tat er jedoch mit der Annahme, dass das Schwarzpulver als Gift der Auslöser sei. Aus heutiger Sicht sind wohl die durch die Feuerwaffen erzeugten größeren Wunden und das dadurch immens erhöhte Infektionsrisiko als Ursache anzusehen (Botero und Pérez 2012). Solche Beispiele an Interpretationsversuchen von mutmaßlich septischen Krankheitsbildern, wie hier genannt, ziehen sich durch die gesamte Geschichtsschreibung (Botero und Pérez 2012), bis schließlich Hugo Schottmüller 1914 eine erste moderne Definition der Sepsis gab:

*„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, dass durch diese Invasion subjektiv oder objektiv Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (S. 260 f.).*

Dass nicht nur das Pathogen selber, z.B. ein Bakterium oder sein Toxin, einen septischen Zustand bis hin zum Tod des von ihm infiltrierten Wirtes hervorruft, sondern dass das auf das Pathogen reagierende Immunsystem und dessen einzelnen Komponenten einen nicht unerheblichen Anteil an der Pathogenese der Sepsis haben müssen, wurde in den folgenden Jahrzehnten sichtbar (Waage et al. 1989; Waage et al. 1987; Beutler et al. 1985).

### 1.1.2 Epidemiologie

Im August 2015 veröffentlichte das US-amerikanische Gesundheitsministerium (United States Department of Health and Human Services, HHS) einen Bericht zur Statistik der Bevölkerungsentwicklung, in dem die Todesfälle in den USA des Jahres 2012 analysiert wurden (National Vital Statistics Reports). Daraus geht hervor, dass, basierend auf dem ICD-10-Diagnoseschlüssel, das Krankheitsbild Sepsis im Jahre 2012 insgesamt die elfthäufigste Todesursache in den USA darstellt, bei Kindern im ersten Lebensjahr ist die bakterielle Sepsis gar an der siebthäufigsten Stelle als Todesursache zu finden (Murphy et al. 2015, vgl. **Tabelle 1**).

**Tabelle 1: Führende Todesursachen in den USA im Jahre 2012<sup>1</sup>**

<b>Rang</b>	<b>Todesursache</b>	<b>Anteil an Gesamt-Todesursachen</b>
1.	Herzkrankheiten	23,6 %
2.	Maligne Neoplasien	22,9 %
3.	Chron. Erkrankungen der unteren Atemwege	5,6 %
4.	Zerebrovaskuläre Krankheiten	5,1 %
5.	Unfälle	5,0 %
6.	Morbus Alzheimer	3,3 %
7.	Diabetes mellitus	2,9 %
8.	Influenza und Pneumonien	2,0 %
9.	Nephritis, Nephrotisches Syndrom	1,8 %
10.	Suizid	1,6 %
11.	<b>Sepsis</b>	<b>1,4 %</b>
12.	Chronische Leberkrankheiten	1,4 %
13.	Bluthochdruck	1,1 %
14.	Morbus Parkinson	0,9 %
15.	Pneumonitis durch Festkörper und Flüssigkeiten	0,7 %

<sup>1</sup>[http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr63/nvsr63\\_09.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr63/nvsr63_09.pdf)

Aus einem anderen Bericht (Zhao Y und Encinosa 2010) der US-Agentur für Forschung und Qualität im Gesundheitswesen (Agency for Healthcare Research and Quality, AHRQ), einer Behörde des US-amerikanischen Gesundheitsministeriums, wird ersichtlich, dass im Jahre

2007 bei Todesfällen unter stationär behandelten Patienten mit 15,2 % Anteil die führende Hauptdiagnose Sepsis lautet. Um sich der bedeutenden Tragweite dieses Anteils Gewahr zu werden, sei erwähnt, dass die zweithäufigste Hauptdiagnose bei Todesfällen unter stationär behandelten Patienten mit einem deutlich geringeren Anteil von 8,7 % das Lungenversagen darstellt (Zhao Y und Encinosa 2010).

Diese von zwei Regierungsbehörden erhobenen Zahlen geben einen ersten Eindruck von der hohen Relevanz der Sepsis am Beispiel der USA. Auch in Deutschland stellt das septische Krankheitsgeschehen eine bedeutende Todesursache dar. Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes der Bundesrepublik Deutschland kletterte im Vergleich mit anderen Todesursachen die ICD-10-Diagnose A41.- (Sonstige Sepsis) von Rang 50 (im Jahre 1998) auf Rang 25 (2013) der häufigsten Todesursachen (Vgl. <http://www.gbe-bund.de/> Suchbegriff „Sterbefälle, Sterbeziffer, Ränge, Anteile der 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998)“).

Klinische Studien, die sich mit der Epidemiologie von septischen Krankheitsbildern beschäftigen haben, offenbaren, wie die oben genannten Zahlen von Regierungsbehörden bereits erahnen lassen, dass septischen Erkrankungen weltweit eine große Bedeutsamkeit zukommt. Es wird geschätzt, dass jährlich weltweit ca. 17 Millionen Fälle von Sepsis und deren Komplikationen auftreten (Adhikari et al. 2010). In einer internationalen, multizentrischen Studie, die 2002 publiziert wurde, erhoben Alberti et al. Daten von 28 ICUs (*Intensive Care Unit*; Intensivstation) in sechs europäischen Ländern, Kanada und Israel im Zeitraum Mai 1997 bis Mai 1998. Dabei wurden Patienten, die intensivpflichtig waren, hinsichtlich möglicher Infektionen und SIRS-Kriterien (Klinischer Infektionsverdacht und zwei SIRS-Kriterien entsprechen einer Sepsis; SIRS *systemic inflammatory response syndrome* siehe 1.1.3.1) untersucht. Hier zeigte sich bei ICU-Aufnahme eine Inzidenz von 21,1 % für Patienten mit einer Infektion. Bei Patienten, die länger als 24 h intensivpflichtig waren, fand sich bei deren ICU-Aufnahme eine Inzidenz von 32,3 % für bestehende Infektionen. Im weiteren Verlauf des ICU-Aufenthalts wurde ermittelt, dass bei diesen Patienten 28,3 % der beobachteten Episoden von Infektionen mit Sepsis assoziiert waren, weitere 23,9 % mit schwerer Sepsis und 29,9 % mit septischem Schock. Lediglich 17,9 % der Episoden mit Infektion zeigten eine Infektion ohne SIRS (Alberti et al. 2002).

Im Fokus der SOAP-Studie standen 198 ICUs in 24 europäischen Staaten (Vincent et al. 2006). Diese brachte hervor, dass 37,4 % der ICU-Patienten septisch waren. Die ICU-Mortalitätsrate von Patienten ohne Sepsis betrug 13,7 %, die von Patienten mit Sepsis 27 %.

Noch höhere Mortalitätsraten zeigten ICU-Patienten mit schwerer Sepsis (32,2%) und im septischen Schock (54,1 %).

Ähnlich hohe Zahlen erbrachte eine deutsche Studie (Engel et al. 2007), die 454 ICUs in 310 deutschen Krankenhäusern betrachtete. Nach deren Beobachtungen betrug die ICU-Mortalitätsrate der Patienten mit schwerer Sepsis 48,4 %. Von allen ICU-Patienten hatten sich 35% mit einer Infektion auseinandersetzen. Aus den gesammelten Daten wurde eine Prävalenz von 12,4 % für Sepsis und 11,0 % für schwere Sepsis inklusive septischem Schock errechnet (Engel et al. 2007). Außerdem ließ sich schlussfolgern, dass in Deutschland die jährlich neu diagnostizierte Anzahl von Patienten mit schwerer Sepsis 76-110/100 000 Einwohner beträgt (Engel et al. 2007).

Die in einer US-amerikanischen Multizenterstudie zusammengestellten Daten für das Jahr 1995 (Angus et al. 2001) zeigen, dass bei der Untersuchung von Klinik-Entlassungsakten von 6 621 559 Patienten, 192 980 Patienten die Kriterien für eine schwere Sepsis laut ICD-9 erfüllten. Deren Mortalitätsrate während des Klinikaufenthalts betrug 28,6 %, was für die USA etwa 215 000 Tote jährlich bedeuten würde, genauso viele Tote wie durch einen akuten Myokardinfarkt (Angus et al. 2001). Die Inzidenz der schweren Sepsis für die USA betrug 3,0 Fälle pro 1000 Einwohner (Angus et al. 2001). Zu interessanten Ergebnissen kamen Martin et al. im Jahre 2003 als sie Daten von 700 Millionen Patienten, die zwischen 1979 und 2000 stationär in den USA behandelt wurden, analysierten. Innerhalb dieses Patientenkollektivs wurden 10 319 418 Sepsis-Fälle identifiziert. Eine Steigerung der Inzidenz von 82,7/100000 Einwohner im Jahre 1979 auf 240,4/100000 Einwohner im Jahre 2000 konnte beobachtet werden. Die Mortalitätsrate sank zwar von 27,8 % (für die Jahre 1979-1984) auf 17,9 % (1995-2000), jedoch stieg die absolute Zahl der Todesfälle durch Sepsis an, was eine Folge des wachsenden Anteils der älteren Bevölkerung sein dürfte (Martin et al. 2003). Auch Lagu et al. zeigten 2012 einen Anstieg der hospitalisierten Fälle von schwerer Sepsis um 71 % in den USA zwischen 2003 und 2007.

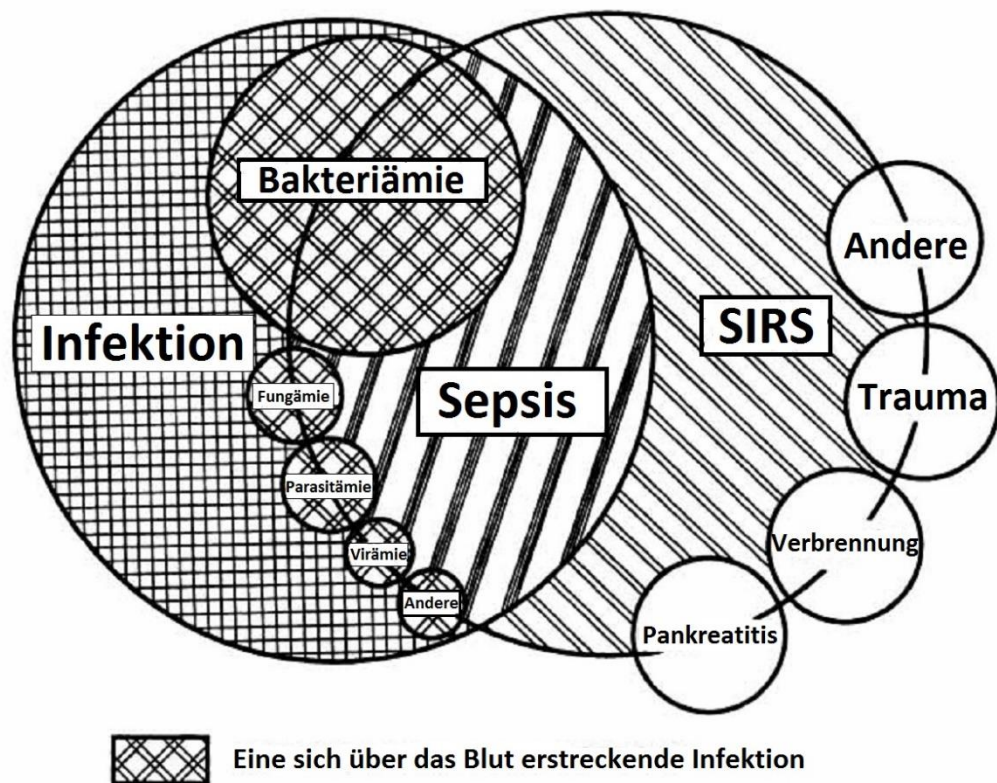
Eine Untersuchung aus Finnland (Finnsepsis-Studie, Karlsson et al. 2007) fand heraus, dass 10,5 % der Patienten, die neu auf ICU aufgenommen wurden, unter einer schweren Sepsis litten. Deren Mortalitätsrate betrug während des ICU-Aufenthalts 15,5%, während des Krankenhausaufenthalts 28,3%, nach einem Jahr wurde ein Anteil der Überlebenden von 59,1 % beobachtet. Ebenfalls aus dieser Studie ging eine auf Finnland bezogene Inzidenzrate von 0,38 / 1000 für Fälle von schwerer Sepsis hervor. Zu einer mehr als doppelt so hohen Inzidenzrate (0,95 / 1000) kam die französische EPISEPSIS-Arbeitsgruppe im Jahre 2004. Diese stellten bei der Beobachtung von 206 ICUs fest, dass sich 14,6% aller neu aufgenommenen

Patienten im Zustand eines septischen Schocks bzw. einer schweren Sepsis befanden. Die 30-Tages-Mortalitätsrate betrug 35%, nach zwei Monaten waren 41,9% der Patienten verstorben (The EPISEPSIS Study Group 2004).

### 1.1.3 Definitionen und Diagnosekriterien

#### 1.1.3.1 Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock

Die Definitionen, die heute im klinischen Alltag zur Diagnostik vom Krankheitskomplex Sepsis verwendet werden, entstammen der 1992 abgehaltenen Konsensus Konferenz der US-Amerikanischen Gesellschaften ACCP (American College of Chest Physicians) und SCCM (Society of Critical Care Medicine) unter der Leitung von Roger C. Bone, einem Vorreiter der Diagnostik und des Managements septischer Patienten (Balk 2011; Reinhart et. al. 2010; Levy et al 2003; Bone et al. 1992). Hauptleistungen dieser Konferenz beinhal-



**Abbildung 1: Der Zusammenhang zwischen Infektion, Sepsis und SIRS**

Eine Sepsis wird als das Vorhandensein einer Infektion und eines SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) bezeichnet. Andere Zustände wie Traumata, Verbrennungen oder eine Pankreatitis können ebenfalls mit einem SIRS vergesellschaftet sein

(Abb. modifiziert nach Bone et al. 1992, S. 865).



teten die Definition der Sepsis durch Einführung der SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*)-Kriterien (**Tabelle 2**) und einer damit einhergehenden Differenzierung zwischen septischen und nicht-septischen Zuständen, die jedoch klinisch ähnlich imponieren können, wie z.B. Infektionen. Zusätzlich wurden Merkmale zur Beschreibung des Schweregrades der Sepsis bestimmt. Es wurde nun zwischen einer Sepsis, einer schweren Sepsis und einem septischen Schock unterschieden (Bone et al. 1992).

Bei der Re-Evaluation der Ergebnisse der Konsensus Konferenz im Jahre 2001, bei der mehrere nordamerikanische und europäische Gesellschaften für Intensivmedizin zusammentrafen (International Sepsis Definitions Conference), wurden die früheren Definitionen bestätigt. Jedoch wurde das Konzept der SIRS-Kriterien um eine weiter umfassendere Liste von Symptomen ergänzt um dadurch zuverlässiger einen septischen Patienten im klinischen Alltag diagnostizieren zu können. Um der Heterogenität des septischen Krankheitskomplexes gerecht zu werden, wurde nicht definiert, wie viele Kriterien dieser erweiterten Liste nun zur Diagnose einer Sepsis zutreffen müssen. Dem Bedürfnis nach klaren, eindeutigen Kriterien für die klinische Forschung wurde nicht nachgegangen. Als klare Einschluss-Kriterien für klinische Studien werden deswegen, wie auch für die Patienten dieser Dissertation, die SIRS-Kriterien von 1992 herangezogen (Levy et al 2003). Auch gingen diese Kriterien von 1992, und nicht die erweiterte Liste von 2001, in die aktuelle deutsche Leitlinie zur „Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis“ von 2010 ein (Reinhart et al. 2010). Eine Sepsis wird nun definiert als eine Infektion zuzüglich einer systemisch inflammatorischen Reaktion (d.h. mindestens zwei der vier SIRS-Kriterien sind positiv) (**Abbildung 1; Tabelle 2**; Bone et al. 1992). Dabei wird eine Infektion als pathologischer Prozess definiert, der durch das Vorhandensein von (fakultativ) pathogenen Mikroorganismen verursacht wird, die sich in sonst sterilen Loci (Gewebe, Flüssigkeit, Körperhöhle) befinden (Levy et al. 2003). Da je nach Studie in bis zu 40 % der Sepsis-Fälle kein Erregernachweis gelingt, kann ein Nachweis einer Infektion auch über das Vorhandensein von klinischen Kriterien erfolgen (Reinhart et al. 2010; Vincent et al. 2006; Levy et al. 2003). Andere Ursachen eines SIRS, wie in **Abbildung 1** dargestellt, müssen ausgeschlossen werden. Eine schwere Sepsis ist definiert als Sepsis mit begleitenden akuten Organdysfunktionen (Bone et al. 1992). Bezüglich der Definition einer akuten Organdysfunktion im Kontext Sepsis hat sich unsere Arbeitsgruppe nach den Empfehlungen der Deutschen Sepsis-Leitlinie gerichtet (**Tabelle 2**; Reinhart et al. 2010). Liegt nun eine Sepsis vor, die von einer persistierenden arteriellen Hypotension begleitet wird, die keine andere Ursache hat als die Sepsis und trotz angemessener Flüssigkeitssubstitution besteht, so spricht man von einem septischen Schock (Rein-

**Tabelle 2: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock<sup>1</sup>**

<b>I. Nachweis der Infektion</b> - Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien
<b>II. Systemic inflammatory host response (SIRS) (mind. zwei Kriterien)</b> - Fieber ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36^{\circ}\text{C}$ ) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder vesikale Messung - Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90$ /min - Tachypnoe (Frequenz $\geq 20$ /min) oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 \leq 4,3$ kPa/ $\leq 33$ mmHg) - Leukozytose ( $\geq 12000/\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4000/\text{mm}^3$ ) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild
<b>III. Akute Organdysfunktion (mind. ein Kriterium)</b> - Akute Enzephalopathie: Eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium. - Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 h oder Thrombozytenzahl $\leq 10^5/\text{mm}^3$ . Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung/immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein. - Art. Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa ( $\leq 75$ mmHg) unter Raumluft oder eine $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Ratio <sup>2</sup> von $\leq 33$ kPa ( $\leq 250$ mmHg) unter $\text{O}_2$ -Applikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein. - Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5$ ml/kg/h für wenigstens 2 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des S-Kreatinins $> 2x$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches. - Metabolische Azidose: <i>Base Excess</i> $\leq -5$ mmol/l oder eine Laktat-[c] $> 1,5x$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
<b>Sepsis:</b> Kriterien I und II <b>Schwere Sepsis:</b> Kriterien I, II und III <b>Septischer Schock:</b> Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 h ein systolischer art. Blutdruck $\leq 90$ mmHg bzw. ein mittlerer art. Blutdruck $\leq 65$ mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90$ mmHg oder den art. Mitteldruck (MAP) $\geq 65$ mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

<sup>1</sup>Nach Sepsis-Leitlinie der DSG/DIVI 2010 (Reinhart et al. 2010). <sup>2</sup> $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  = arterieller Sauerstoffpartialdruck/inspiratorische Sauerstoffkonzentration.

hart et al. 2010; Bone et al. 1992). Dabei muss

„[...] für wenigstens 1 h ein systolischer arterieller Blutdruck [von]  $\leq 90$  mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck [von]  $\leq 65$  mmHg [erreicht werden] oder notwendiger Vasopressoreinsatz [zum Einsatz kommen, um die vorher genannten Blutdrücke zu halten]“ (Reinhart et al. 2010, S. 349).

Bereits die International Sepsis Definitions Conference von 2001 brachte zur Sprache, dass zukünftig Biomarker als Grundlage einer Definition der Sepsis dienen können (Levy et al 2003). Eine im Blutgefäßsystem erhöht messbare Konzentration von Procalcitonin (PCT), welche auf eine bakterielle Infektion hinweisen kann, hat sich bereits eine Position innerhalb der Diagnostik einer Sepsis gesichert (Wacker et al. 2013) Paugam-Burtz et al. z.B. zeigten

2010, dass sich die Plasma-Proteome von septischen und nicht-septischen Patienten nach Leber-Transplantation unterscheiden. Eine andere Studie beschrieb unterschiedliche Genexpressions-Profile von Patienten mit einem SIRS und Patienten mit einem SIRS, die zusätzlich später eine Sepsis entwickelten (Johnson et al. 2007). Auch Urin-Proteom-Analysen offenbaren Biomarker, die sich in der Prognose der Sepsis als aussagekräftig erwiesen (Su et al. 2013). Diese und auch weitere Erkenntnisse stellen erste Schritte zur Diagnose einer Sepsis mithilfe von Biomarkern dar, die jedoch weiter validiert werden müssen um Einzug in die klinische Praxis erhalten zu können (Christaki und Giamarellos-Bourboulis 2014).

#### 1.1.3.2 *Sequential organ failure assessment (SOFA)-Score*

Im Jahre 1994 trat die European Society of Intensive Care Medicine, kurz ESICM, in Paris zusammen. Ihr Ziel war es, ein Punktesystem zu entwerfen, das die Schwere einer Organdysfunktion bzw. das Feststellen eines Organversagens bis hin zum MOV (Multiorganversagen), so wie es oft im Kontext einer Sepsis erscheint, objektiv und mithilfe möglichst einfach zu bestimmender klinischer Parameter definiert (Vincent et al. 1996). Dieses Punktesystem wurde anfänglich *sepsis-related organ failure assessment Score* genannt, später *sequential organ failure assessment Score*, da es nicht spezifisch ist für ein septisches Geschehen, schließlich können auch Organdysfunktionen nicht infektiöser Genese auftreten (Vincent et al. 1998). Der *Score* ist dazu gedacht, den täglichen Ist-Zustand des Patienten zu beschreiben um auf der einen Seite den Verlauf einer Organdysfunktion besser verstehen und um auf der anderen Seite die Ergebnisse verschiedener Therapieformen besser bewerten zu können. Dabei werden für sechs Organsysteme jeweils ein funktionell repräsentativer Parameter erhoben und mit diesem für jedes Organsystem ein sogenannter *Sub-Score* gebildet, der je nach Dysfunktion null bis vier Punkte (null Punkte = normale Funktion) umfasst (**Tabelle 3**). Der Gastrointestinaltrakt wird wegen zu hoher Komplexität nicht in die Betrachtung eingeschlossen (Vincent et al. 1996). Gleichbedeutend mit einem Organversagen sind drei oder mehr Punkte eines Organsystems, wobei für einen *SOFA-Score*  $\geq 15$  die Mortalität auf 90% ansteigen kann (Vincent et al. 1998). Der *SOFA-Score* wird einmal pro Tag durch Addition der täglich höchsten *Sub-Scores* gebildet (Vincent et al. 1996).

Der *SOFA-Score* wurde primär zur Beschreibung der Morbidität konzipiert. Eine retrospektive Analyse von 1643 ICU-Patienten mit Sepsis ließ erkennen, dass ein höherer *SOFA-Score* am Aufnahmetag auch mit einer höheren Mortalitätsrate korreliert (Vincent et al. 1996). Durch eine prospektive Multicenter-Studie mit 1449 ICU-Patienten wurde diese Kor-

relation und auch die Sinnhaftigkeit der klinischen Verwendung des SOFA-Scores zur Erkennung und Überwachung von Organdysfunktionen/-versagen bestätigt (Vincent et al. 1998). Dabei fiel auf, dass Patienten mit Infektionen und Patienten, die den ICU-Aufenthalt nicht überleben, konstant höhere SOFA-Scores aufweisen (Vincent et al. 1998). Eine epide-

**Tabelle 3: Die Zusammensetzung des *sequential organ failure assessment (SOFA)-Scores*<sup>1</sup>**

Organsystem	1 SOFA-Punkt	2 SOFA-Punkte	3 SOFA-Punkte	4 SOFA-Punkte
<b>Lunge</b> p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> [mmHg]	< 400	< 300	< 200 und Beatmung	< 100 und Beatmung
<b>Niere</b> Kreatinin [mg/dl] bzw. Ausfuhrmenge [ml/Tag]	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 bzw. < 500	≥ 5,0 bzw. < 200
<b>Leber</b> Bilirubin [mg/dl]	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	> 12,0
<b>Herz/ Kreislauf</b> Blutdruck [mmHg] und Katecholamine [µg/kg*min]	MAP < 70	Dopamin ≤ 5 oder Dobutamin für mind. 1 h	Dopamin > 5 oder (Nor)adrenalin ≤ 0,1	Dopamin > 15 oder (Nor)adrenalin > 0,1
<b>Blut</b> Thrombozyten [1000/mm <sup>3</sup> ]	< 150	< 100	< 50	< 20
<b>ZNS</b> Glasgow Coma Scale	14-13	12-10	9-6	<6

<sup>1</sup>Modifiziert nach Vincent et al. 1996

miologische Studie mit fast 4000 Patienten (The EPISEPSIS Study Group 2004) stellte fest, dass sowohl höhere SOFA-Scores als auch ein durch die *Sub-Scores* definiertes Organversagen der Organsysteme Herz/Kreislauf, Leber und Niere unabhängige Risikofaktoren für ein Versterben darstellen. Bei einer weiteren Publikation zu dem bereits von Vincent et al.

1998 genutzten Patientenkollektiv lässt sich anhand einer in dieser Arbeit gezeigten Tabelle erkennen, dass vor allem die *Sub-Scores* der Organsysteme Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS (Zentrales Nervensystem) an der letztendlichen Höhe der durchschnittlich maximalen *SOFA-Scores* beteiligt sind, was von den Autoren jedoch nicht explizit hervorgehoben wurde (Moreno et al. 1999). Eine Erkenntnis der Arbeit von Moreno et al. war, dass bei einer Untersuchung zu möglichen Wechselbeziehungen zwischen den *Sub-Scores* mit Auswirkung auf die Höhe des *SOFA-Scores* eine Zwei-Faktoren Struktur zu erkennen ist. Diese besteht auf der einen Seite aus den eben genannten *Sub-Scores*, nämlich derer die Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS repräsentieren und auf der anderen Seite aus den Nieren-, Leber- und Blut-*Sub-Scores* (Moreno et al. 1999). Zusätzlich zeigte sich, dass der Herz/Kreislauf-Score mit der höchsten relativen Beteiligung am Überlebensstatus bei ICU-Entlassung assoziiert ist (Moreno et al. 1999). Eine getrennte Betrachtung der *SOFA-Scores* für den ersten Beobachtungstag und für den Krankheitsverlauf erwies sich als sinnvolle Einteilung (Moreno et al. 1999; Vincent et al. 1998), die auch bei weiteren Arbeitsgruppen Anwendung fand (Huang H et al. 2015; Oda et al. 2000; Janssens et al. 2000), und deren klinisches Nutzen sich wiederholt zeigte (Bota et al. 2002; Ferreira et al. 2001). Dass sich die Anwendung des *SOFA-Scores* etabliert hat, wird auch dadurch gezeigt, dass die International Sepsis Definitions Conference 2001, bei der verschiedene Nordamerikanische und Europäische Vereinigungen für Intensivmedizin zusammentraten, u.a. den *SOFA-Score* als Bewertungssystem zur Bestimmung des Grades der Organdysfunktion vorschlugen (Levy et al. 2003). Im Vergleich mit weiteren *Scores*, die ebenfalls täglich Organdysfunktionen abbilden können (MODS; *multiple organ dysfunction Score*, APACHE-III, LODS; *logistic organ dysfunction system*, Denver MOFS; *multiple organ failure Score*), bewies der *SOFA-Score* eine vergleichbar gute Prognosefähigkeit bzgl. der Überlebensrate der ICU-Patienten bei angemessener Repräsentation der Organfunktionen (Dewar et al. 2014; Pettilä et al. 2002; Bota et al. 2002). Im direkten Vergleich des MODS mit dem *SOFA-Score*, die die meist genutzten Punktesysteme zur Bewertung von Organdysfunktionen darstellen (Bota et al. 2002), ergab sich in Bezug auf das Herz/Kreislauf-System für den zugehörigen *Sub-Score* des *SOFA-Scores* ein Vorteil, da dieser besser mit der Mortalität der ICU-Patienten korrelierte (Bota et al. 2002).

### 1.1.3.3 APACHE-II-Score

Der APACHE (*acute physiology and chronic health evaluation*)-II-Score, eine überarbeitete Version des APACHE (Knaus et al. 1981), stellt ein Klassifikationssystem dar, das einmal

**Tabelle 4: Der APACHE-II-Score zur Klassifikation der Schwere einer Erkrankung<sup>1</sup>**

<i>Acute physiology Score</i>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	
Temperatur- rektal [°C]	≥ 41	39- 40,9		38,5- 38,9	36- 38,4	34- 35,9	32- 33,9	30- 31,9	≤ 29,9	
Mittlerer arterieller Blutdruck MAP [mmHg]	≥ 160	130 - 159	110 - 129		70 - 109		50 - 69		≤ 49	
Herzfrequenz/min	≥ 180	140 - 179	110 - 139		70 - 109		55 - 69	40 - 54	≤ 39	
Atemfrequenz/min	≥ 50	35 - 49		25 - 34	12- 24	10-11	6-9		≤ 5	
Oxygenierung										
FiO <sub>2</sub> ≥0,5: AaDO <sub>2</sub> [mmHg]*	≥ 500	350 - 499	200 - 349		< 200					
FiO <sub>2</sub> <0,5: PaO <sub>2</sub> [mmHg]					> 70	61 - 70		55 - 60	< 55	
Arterieller pH	≥ 7,7	7,6 - 7,69		7,5 - 7,59	7,33 - 7,49		7,25 - 7,32	7,15 - 7,24	≤ 7,15	
S-Natrium [mmol/l]	≥ 180	160 - 179	155 - 159	150 - 154	130 - 149		120 - 129	111 - 119	≤ 110	
S-Kalium [mmol/l]	≥ 7	6 - 6,9		5,5 - 5,9	3,5 - 5,4	3 - 3,4	2,5 - 2,9		≤ 2,5	
S-Kreatinin [mg/dl]	≥ 3,5	2 - 3,4	1,5 - 1,9		0,6 - 1,4		< 0,6			
Hämatokrit [%]	≥ 60		50 - 59,9	46 - 49,9	30 - 45,9		20 - 29,9		< 20	
Leukozyten (x1000)	≥ 40		20 - 39,9	15 - 19,9	3 - 14,9		1 - 2,9		< 1	
Glasgow-Coma-Scale	Punkte = 15 - aktueller Glasgow-Coma-Scale									
<b>Age points</b> (Alter [Jahre]):	<b>0</b> (≤44)	<b>2</b> (45-54)	<b>3</b> (55-64)	<b>5</b> (65-74)	<b>6</b> (≥75)					
<b>Chronic health points</b> (nur, wenn ein Kriterium vor dem aktuellen Krankenhausaufenthalt bereits zutraf)									<b>Ja</b>	<b>nein</b>
Durch Biopsie gesicherte Zirrhose <b>und</b> portaler Hochdruck										
Obere gastrointestinale Blutungen in der Vorgeschichte, ausgehend von einem portalen Hochdruck										
Vorhergehende Episoden mit hepatischer Insuffizienz/hepatischer Enzephalopathie/hepatischem Koma										
Chronische restriktive, obstruktive oder vaskuläre Erkrankungen, die mit einer schweren Einschränkung bei leichten Aufgaben einhergehen (z.B. Unfähigkeit Treppen zu steigen oder Haushalt zu führen)										
Chronische Hypoxie, Hyperkapnie, sekundäre Polyzythämie, schwere pulmonale Hypertension (> 40mmHg)										
Chronische Dialyse										
Therapien oder Erkrankungen, die mit einer Immunsuppression bzw. -schwäche einhergehen (z.B. Chemotherapie, Bestrahlung bzw. Leukämie, Lymphom, AIDS)										
Sollte ein CHP Kriterium bereits vor dem Krankenhausaufenthalt zutreffen, Entscheidung, ob aktuell elektiv postop oder Notfall postop/konservativ									<b>5</b>	<b>0</b>
									<b>2</b>	<b>0</b>
<div style="text-align: center;"> <b>APS + Age points + CHP = APACHE-II</b> </div>										

<sup>1</sup>Modifiziert nach Knaus et al. 1985; \*1. PiO<sub>2</sub> = FiO<sub>2</sub> x 713 mmHg,2. PAO<sub>2</sub> = PiO<sub>2</sub> - (PaCO<sub>2</sub> x 1,25), 3. AaDO<sub>2</sub> = PAO<sub>2</sub> - PaO<sub>2</sub>; OP=Operation

innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme eines Patienten auf einer Intensivstation erhoben werden kann, um so die aktuelle Schwere einer Erkrankung von ICU-Patienten zu quantifizieren. Dieser *Score* ermöglicht nicht nur für verschiedene Patientengruppen, sondern auch für einzelne Patienten, Aussagen zu angebrachten Therapieoptionen und zu Prognosen verschiedener Krankheitsbilder treffen zu können (Knaus et al 1985). Diese Prognosen beinhalten die Höhe der Wahrscheinlichkeit, während des Krankenhausaufenthalts zu sterben. Einsatzmöglichkeiten für den APACHE-II-*Score* ergeben sich daher auch für die Evaluierung der Effizienz von Intensivstationen oder auch von möglichen Therapieerfolgen, darüber hinaus können für klinische Studien festgestellt werden, ob z.B. Versuchs- und Kontrollgruppe vergleichbar sind (Knaus et al 1985).

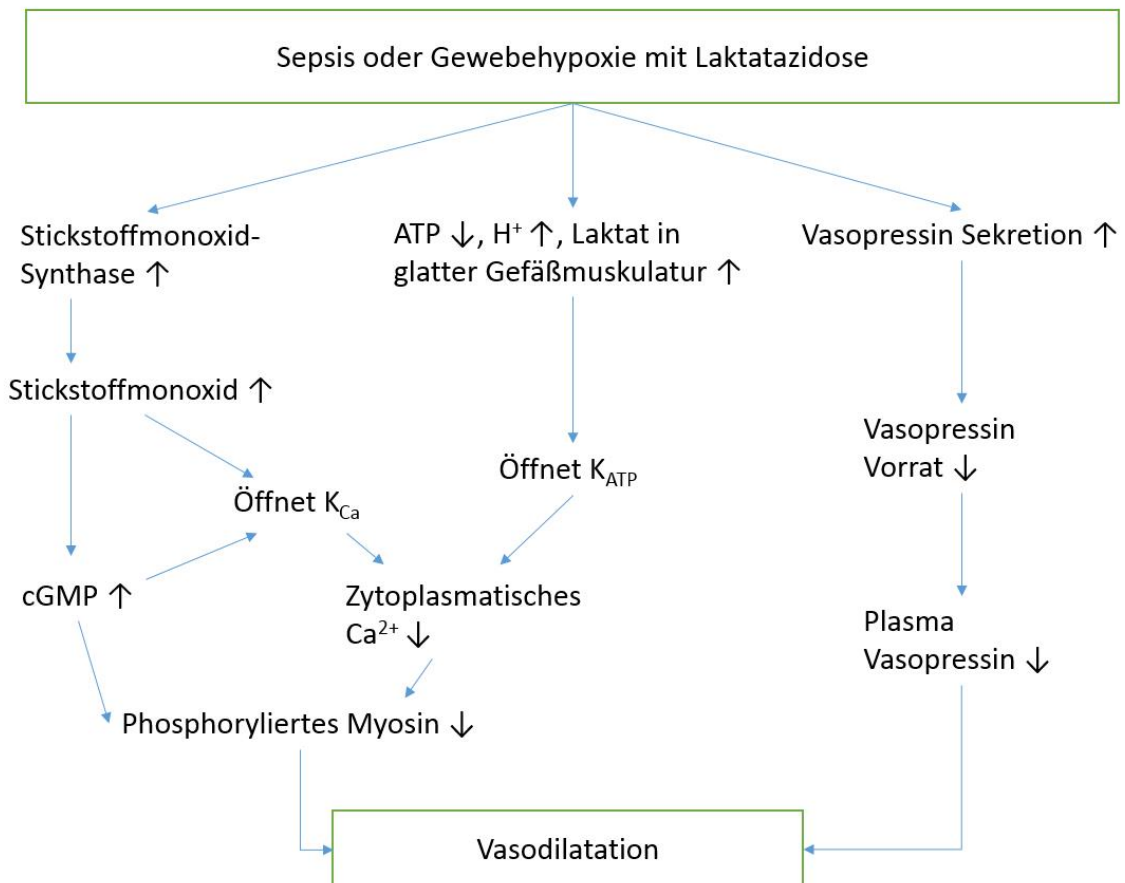
Der APACHE-II-*Score* wird aus Parametern der ersten 24 Stunden auf ICU gebildet, deren Höhe die ausgeprägtesten Pathologien zeigen (**Tabelle 4**). Er besteht aus drei Teilen: Zwölf laborchemischen und klinischen Parametern, die den aktuellen Zustand des Patienten repräsentieren (APS, *acute physiology Score*), das Alter des Patienten und Angaben zu möglichen chronischen Vorerkrankungen (CHP, *chronic health Score*). Die beiden letztgenannten Teile betten dabei den APS in einen Kontext von Risikofaktoren ein (Knaus et al 1985). Aus Gründen der Evidenz sind nicht für jeden Parameter des APS Werte von 0,1,2,3 oder 4 vergeben (Vgl. **Tabelle 4**). Die zwei Kriterien, die sonst dem CHP zugehörig sind, nämlich Heimbeatmung und eine Herzinsuffizienz Stadium NYHA (New York Heart Association) IV werden in **Tabelle 4** nicht mehr genannt, da diese ohnehin Ausschlusskriterien für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten darstellen.

#### **1.1.4 Wichtige klinische und pathophysiologische Aspekte der Organdysfunktion und des Organversagens bei Sepsis**

Eine Sepsis kann ihrer Definition gemäß, nämlich einer systemischen inflammatorischen Antwort (SIRS) auf eine Infektion, klinisch äußerst heterogen imponieren, abhängig von verschiedenen Faktoren wie z.B. Primärfokus der Infektion, Erregerkonstellation und Gesundheitsstatus des Patienten (Angus und van der Poll 2013; Levy et al. 2003). Gefürchtete Komplikationen einer Sepsis sind akute Organdysfunktionen bis hin zu Organversagen und/oder eine persistierende arterielle Hypotension (Levy et al. 2003). An betroffenen Organen stehen Lunge und das Herz/Kreislauf-System an erster Stelle (Angus und van der Poll 2013). An der Lunge manifestiert sich eine Sepsis-assoziierte Organdysfunktion klassischerweise als ein Sepsis-assoziiertes ARDS (*Acquired respiratory distress syndrome*) (Rubenfeld et al. 2005). Ein ARDS ist definiert als Hypoxämie mit bilateralen, pulmonalen Verschattungen,

welche nicht-kardialen Ursprungs sind und nicht durch übermäßige Volumenretention verursacht wurden (The ARDS Definition Task Force 2012). Zusätzlich können myokardiale Dysfunktionen (engl. *myocardial depressions*) vergesellschaftet sein, welche sowohl den linken als auch den rechten Ventrikel sowohl in Systole als auch in Diastole betreffen und bei Überlebenden eines septischen Schocks reversibel sind (Parker et al. 1990; Ognibene et al. 1988; Kimchi et al. 1984; Parker et al. 1984; Weisel et al. 1977).

Eine arterielle Hypotension durch Vasodilatation (**Abbildung 2**) kann erste funktionelle Defizite des Herz/Kreislauf-Systems aufzeigen (Suffredini et al. 1989). Dies wird beispielshalber mittels einer gesteigerten NO (Stickstoffmonoxid)-Synthese durch Induktion der



**Abbildung 2: Wichtige Mechanismen, die zu einer Vasodilatation bei Sepsis führen**

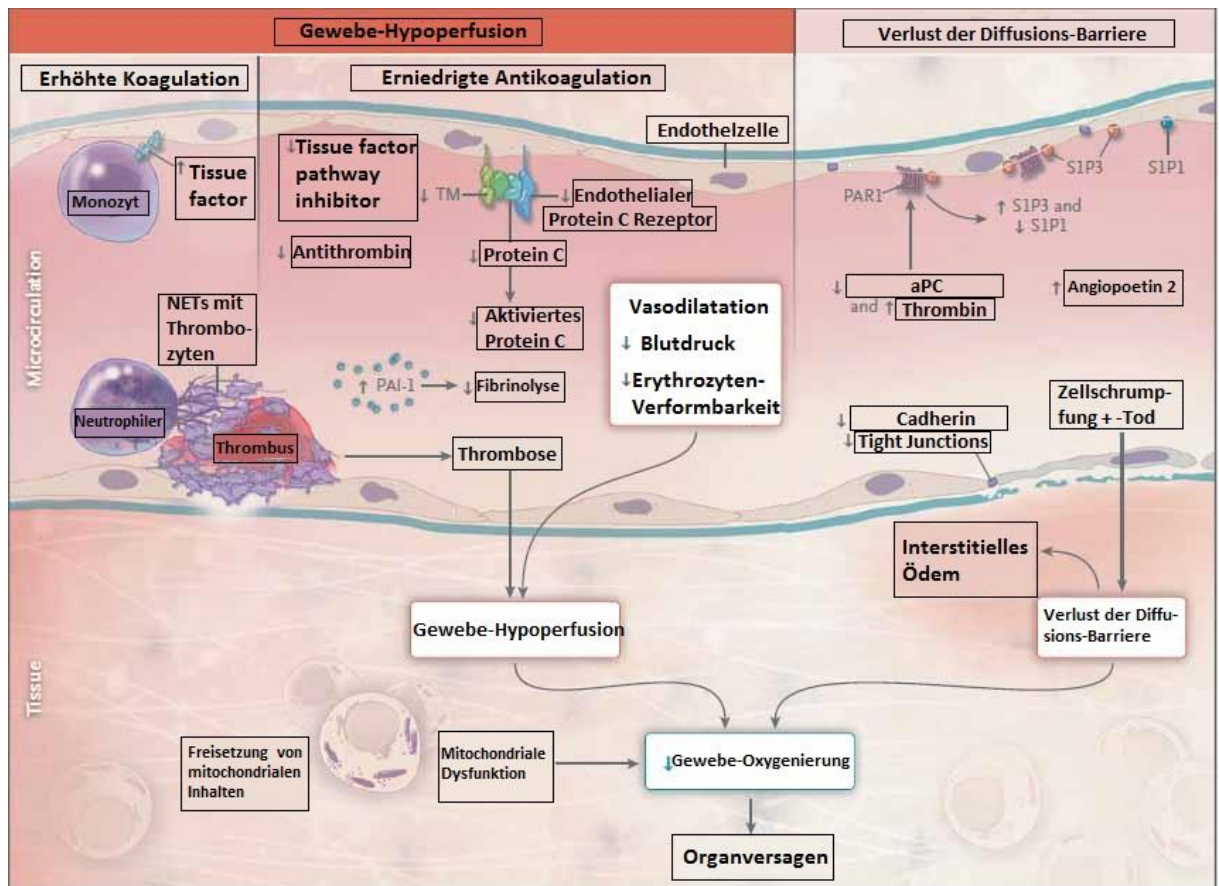
Sepsis und Zustände eines verlängerten septischen Schocks mit Gewebehypoxie führen zu einer Vasodilatation. Dies wird über viele Wege erreicht, u.a. über einen erschöpften S-Vasopressin Spiegel. Weiterhin über ein erhöhtes Vorhandensein der NO-Synthese, die über eine cGMP-Erhöhung (Cyclisches Guanosinmonophosphat) und einen verminderten zyttoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel zu vermindert vorhandenen Aktin-Myosin-Interaktionen führen. Mediatoren, die zu diesen verminderten Interaktionen führen, sind vermehrt geöffnete ATP-sensitive und Calcium-regulierte K-Kanäle,  $\text{K}_{\text{Ca}}$  und  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Abb. modifiziert nach Landry und Oliver 2001, S. 593).



iNOS (induzierbare NO-Synthase) durch z.B. LPS (Lipopolysaccharide), IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) und IL-1 (Interleukin-1) oder mittels einer verminderten systemischen Vasopressin-Konzentration bewirkt (Landry et al. 1997; Griscavage et al. 1996; Xie et Nathan 1994; Gross et al. 1991). Ferner wird unter Gewebe-Hypoxie bzw. erhöhtem Gewebe-Stoffwechsel (Zelluläre ATP-Konzentration  $\downarrow$ ) eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit für den  $K_{ATP}$ -Kanal der glatten Muskelzelle beobachtet, die für eine Muskelzellhyperpolarisation sorgt (Quayle et al. 1997; Keung et Li 1991; Davies 1990).

Weiterhin betroffen sein können das ZNS in Form einer SAE (Sepsis-assoziierten Enzephalopathie), welche eine zerebrale Dysfunktion in Form eines Delirs bis hin zu einem Koma verursacht (Zhang Q et al. 2014; Young 2013; Ebersoldt et al. 2007). Eine Nierenbeteiligung stellt sich als AKI (akute Niereninsuffizienz) mit verminderter Urinproduktion und erhöhtem S-Kreatinin (Serum-Kreatinin) dar (Gomez et al. 2014; Kellum und Lameire 2013). Ebenso können Leber (steigendes S-Bilirubin) und der Gastrointestinaltrakt (paralytischer Ileus) betroffen sein (Königsrainer et al. 2011; Moreno et al. 1999).

Ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismen-Komplex, der bei Sepsis und damit assoziierten Organdysfunktionen auftritt, beinhaltet eine erhöhte Koagulationsneigung mit konsekutiven mikrovaskulären Thromben bis hin zu einer DIC (disseminierte intravasale Koagulopathie) (Simmons und Pittet 2015). Zusammen mit der oben genannten Vasodilatation kann dies zu einer ausgeprägten Gewebs-Hypoperfusion führen (**Abbildung 3**). Das dabei entstehende lokale Minderangebot von Sauerstoff führt zu oxidativem Stress, welcher zusätzlich mitochondriale Dysfunktionen herbeiruft und die Produktion des zellulären Energie-Lieferanten ATP vermindert (Galley 2011). Darüber hinaus führen verschiedene Mechanismen zu einem Verlust der Diffusions-Barriere des Endothels. Dies tritt ein durch vermehrten Endothelzell-Tod (Xu et al 2009; Hu et al. 2009), Zell-Schrumpfung (Gröger et al. 2009) oder durch vermindertes Vorhandensein von Bausteinen, die den Zell-Zell-Kontakt aufrechterhalten (z.B. Cadherin und *zonulae occludentes*, Gavard et al. 2009), was zu einer Aufhebung der Gewebe-Kompartimentierung und zu interstitiellen Ödemen führt (Gröger et al 2009). All dies kann letztendlich zu Sepsis-assoziierten Organdysfunktionen bis hin zu einem Organversagen führen (Angus und van der Poll 2013; Lee W L und Liles 2011).



**Abbildung 3: Entstehung von Gewebe-Hypoperfusion und Verlust der Diffusions-Barriere des Endothels**

Eine während der Sepsis auftretende Koagulopathie lässt sich auf eine Erhöhung von pro-koagulatorischen und eine gleichzeitige Abnahme anti-koagulatorischer Faktoren begründen. Bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Sepsis wird eine Erhöhung des Gewebefaktors (*tissue factor*) festgestellt, welcher die Gerinnungsfaktoren VII und schließlich X aktiviert (Biemond et al. 1995). Der Gewebefaktor kann von vielen Zellen wie aktivierten Endothelien, Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Astrozyten und Parenchymzellen des Gehirns, des Herzens, der Lunge und der Niere exprimiert werden (Pawlinski und Mackman 2010). Weiterhin bewirkt eine gesteigerte Synthese des Plättchen aktivierenden Faktors (*platelet activating factor*, PAF) eine Leukozyten-Thrombozyten-Endothel-Interaktion, was zu vermehrter Thrombenbildung führt (Zimmerman et al. 2002). Sogenannte NETs (*Neutrophil extracellular traps*), die Pathogene binden, unterstützen ebenfalls eine Thrombenbildung (Fuchs et al. 2010). Auch der TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*), welcher sonst die Faktoren Xa und VIIa inhibiert, steht während einer Sepsis weniger zur Verfügung (Semeraro et al. 2012). Das aPC (aktiviertes Protein C), welches die Faktoren V und VIII inaktiviert, wird u.a. durch eine Runterregulierung des endothelialen Protein C Rezeptors in geringeren Mengen aktiviert (Guitton et al 2011). Eine verminderte Fibrinolyse entsteht durch vermehrten PAI (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor), welcher von aktiviertem Endothel und Thrombozyten exprimiert wird (Van Deventer et al. 1990). Ein erniedrigtes aPC und ein erhöhter Thrombin-Spiegel bewirken über den PAR1 (*Protease-activated receptor-1*) ein erhöhtes S1P3/S1P1-Verhältnis (Sphingosin-1-Phosphat 3 bzw. 1) (Van der Poll und Levi 2012; Finigan et al. 2005). S1P1 ist dafür bekannt, die Integrität der Zell-Zell-Grenzen zu erhöhen, S1P3 dafür, sie zu erniedrigen (Van der Poll und Levi 2012). Dies und ein Verlust weiterer Zell-Zell-Kontakte durch andere Mechanismen (Cadherin ↓, *Tight Junctions* ↓, Zellschrumpfung und -tod) verursachen so interstitielle Ödeme, was zu einer

geringeren Gewebe-Oxygenierung führt (Angus und van der Poll 2013). (Abb. modifiziert nach Angus und van der Poll 2013, S. 845).

### 1.1.5 Therapiemöglichkeiten

Die unterschiedlichen Therapien können in kausale, supportive und adjunktive Therapien eingeteilt werden (Dellinger et al. 2013; Hagel und Brunkhorst 2011; Reinhart et al. 2010). Vor allem ein Fortschritt innerhalb der Antibiotika, welche Teil der kausalen Therapien sind, und der supportiven Therapien haben zu einer Prognose-Verbesserung von Patienten mit Sepsis geführt (Opal et al. 2014).

Bestandteil der kausalen Therapieformen sind I) Ausmachung einer Infektionsquelle (Fokus) und dessen Sanierung und II) die antimikrobielle Therapie. Möglichst früh nach Diagnose einer Sepsis und nach Abnahme der Blutkulturen sollte dabei eine intravenöse, kalkulierte Antibiotika-Gabe erfolgen, die nach Vorlage des mikrobiologischen Erreger- und Resistenzmusters angepasst und alle 24 h neu evaluiert wird (Dellinger et al. 2013; Reinhart et al. 2010).

Supportive Therapien beinhalten „*elementare organbezogene intensivmedizinische Standardmaßnahmen*“ (Hagel und Brunkhorst 2011, S.64), darunter Maßnahmen zur hämodynamischen Stabilisierung, sprich Volumensubstitution und Applikation von Vasopressoren und Inotropika, Nierenersatzverfahren und Atemwegsmanagement/Beatmung. Zielkriterien der hämodynamischen Stabilisierung ist u.a. eine zentralvenöse Sättigung von  $> 70 \%$  oder auch ein  $\text{MAP} \geq 65 \text{ mmHg}$ , welche primär durch Volumensubstitution zu erreichen versucht wird. Scheitert dies, so kann als erste Wahl von Noradrenalin und, bei Bedarf, zusätzlich oder als Ersatz Adrenalin Gebrauch gemacht werden. Bei myokardialen Dysfunktionen oder weiter bestehenden Zeichen von Organhypoperfusionen, trotz adäquatem MAP, kann Dobutamin eingesetzt werden. Bei akuter Niereninsuffizienz kann ein CVVH (kontinuierliches, konvektives venöses Nierenersatzverfahren) oder ein IHD (intermittierendes diffuses Verfahren) gewählt werden. Es wird empfohlen, Patienten mit schwerer Sepsis/septischem Schock frühzeitig zu beatmen um ein ausreichendes Sauerstoffangebot in der Peripherie zu sichern (Reinhart et al. 2010). Für Patienten mit ARDS existieren Empfehlungen zum Beatmungsmanagement, wie z.B. ein Tidalvolumen von  $6 \text{ ml/kg}$  Standardkörpergewicht (Reinhart et al. 2010). Zusätzliche supportive Maßnahmen beinhalten u.a. Blutprodukte, eine Stressulkus-Prophylaxe, eine Thrombose-Prophylaxe, eine Anpassung der Ernährung, Sedation, Analgesie und eine neuromuskuläre Blockade (Dellinger et al. 2013; Reinhart et al. 2010).

Zuletzt können zusätzliche, adjunktive Therapeutika eingesetzt werden. Darunter fallen z.B. Glukokortikosteroide (als *ultima ratio* Therapie) und Insulin.

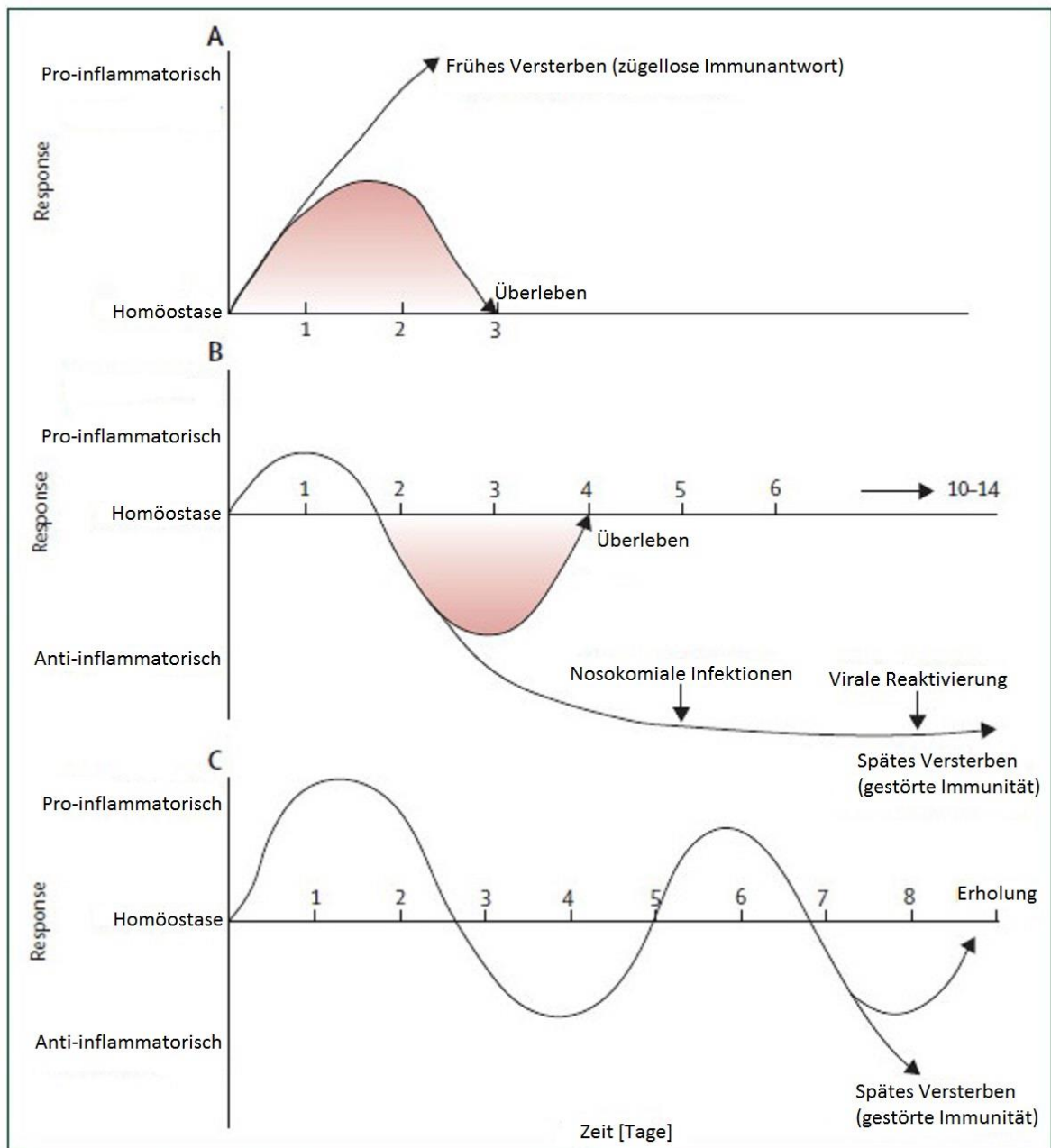
Neben den oben genannten in der klinischen Praxis eingesetzten Therapeutika existieren weitere potentielle Therapeutika, die Gegenstand der Forschung sind:

Eine neue Klasse an Therapeutika, die in erster Linie für die Krebstherapie entwickelt werden, sind die sogenannten *checkpoint*-Inhibitoren (*immune checkpoint inhibitors*, ICIs). Sie blockieren die Bindung eines Liganden (z.B. auf einer Tumorzelle) an einen negativ regulatorischen Rezeptor einer aktivierten Effektorzelle (z.B. T-Lymphozyt oder NK-Zelle; Natürliche Killerzellen) und können dadurch die Effektorfunktion dieser Zellen wiederherstellen/aufrechterhalten. Zu diesen *checkpoint*-Inhibitoren zählen Antikörper, die sich gegen PD-1 (*programmed cell death 1*) richten (Hutchins et al. 2014). Die Wirksamkeit und Sicherheit der Anwendung von anti-PD-1-Antikörpern bei Patienten mit verschiedenen Tumoren wurde bereits gezeigt, für das fortgeschrittene maligne Melanom sind bereits zwei (Nivolumab und Pembrolizumab) von der FDA (Food and Drug Administration) in den USA und auch seit Mai bzw. Ende Juli 2015 von der EMA (Europäischen Arzneimittel-Agentur) zugelassen (Robert et al. 2015; Topalian et al. 2014; Lipson et al. 2013; <http://www.ema.europa.eu/ema/> Suchbegriffe „Nivolumab“ und „Pembrolizumab“). Für die Behandlung von Patienten mit Sepsis wurden diese Antikörper ebenfalls vorgeschlagen, da innerhalb mehrerer *in vitro* Studien zur Sepsis und mehrerer *in vivo* Sepsis-Mausmodellen eine Blockade des PD-1/PD-L1 (PD-L; *programmed death-ligand*)-Pfads einen signifikanten Vorteil für diverse Immunzellfunktionen und für das Überleben zu Tage brachte (Chang K et al. 2014; Ayala et al. 2014; Chang K C et al. 2013; Zhang Y et al. 2010; Brahmamdam et al. 2010). Weitere in Untersuchung befindliche Präparate sind u.a. Polymyxin B und Thrombomodulin (Opal et al. 2014; Klein et al. 2014; Takazono et al. 2014; Levi und van der Poll 2013; Yamakawa et al. 2013).

## 1.2 Die Aktivierung der angeborenen Immunität als erste Instanz und die Dysfunktion von Effektorzellen als eine späte bei Sepsis

Pathogene, die den Wirtsorganismus infiltriert haben, werden von Keimbahn kodierten Rezeptoren innerhalb und auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems und Zellen wie Epi-/ Endothelien und Fibroblasten erkannt (Takeuchi und Akira 2010). Diese sogenannten PRRs (*pattern recognition receptors*) bestehen aus vier Klassen (TLRs, Toll-like Rezeptoren; CLRs, *C-type lectin* Rezeptoren; RLRs, *Retinoic acid-inducible gene* (RIG)-*I-like* Rezeptoren und NLRs, *NOD-like* Rezeptoren) die fähig sind, Strukturen der Pathogene (sog. PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), welche innerhalb des jeweiligen Mikroorganismus hoch konserviert sind, zu erkennen. Darüber hinaus können durch diese Rezeptoren auch die DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) aus beschädigten, sterbenden Zellen erkannt werden. Die Bindung von Liganden an PRRs führt hernach zu einer Aktivierung der Transkription pro-inflammatorischer Zytokine, Interferone und antimikrobieller Proteine und stellt so eine Verteidigung gegen die eingedrungenen Pathogene her (Takeuchi und Akira 2010). Die PRRs befinden sich auf Makrophagen, DCs (dendritischen Zellen) und anderen nicht-Immunzellen (Takeuchi und Akira 2010; Akira et al. 2006). Im Falle einer Sepsis führt nach momentanen Vorstellungen eine inadäquat starke Stimulation der PRRs, unter Mitwirkung von durch IRA(*innate response activator*)-B-Zellen produziertem IL-3, zu einem „Zytokin-Sturm“ (IL-6, Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ , usw.) und vermehrtem Vorhandensein anderer pro-inflammatorischer Mediatoren (Weber et al. 2015; Takeuchi und Akira 2010). Dies imponiert klinisch mit erhöhten Infekt-typischen Parametern (SIRS) und übertrifft die eigentliche Aufgabe, nämlich die Eradikation der eingedrungenen Pathogene, indem begleitende Gewebeschäden verursacht werden können, die bis zu einem septischen Schock und einem MOV führen (Takeuchi und Akira 2010; Rittirsch et al. 2008; Abraham und Singer 2007; Pinsky et al. 1993). Versuche, mittels der Applikation immunsupprimierender Agenzien wie Drotrecogin (aktiviertes humanes Protein C), Eritoran (TLR-4 Antagonist) oder dem anti-TNF- $\alpha$  Fragment Antikörper AZD9773/CytoFab den klinischen Zustand von Patienten mit Sepsis zu verbessern, sind jedoch gescheitert (Bernard et al. 2014; Ranieri et al. 2012; Williams 2012; Angus 2011).

Ein alternativer Ansatz besagt, dass während einer Sepsis neben einer frühen überbetonten pro-inflammatorischen Phase eine späte anti-inflammatorische Phase (CARS, *compensatory anti-inflammatory response syndrome*) eine pathophysiologische Instanz der Sepsis darstellt, die in der Vergangenheit vernachlässigt wurde (Hotchkiss et al. 2013; Bosmann und



**Abbildung 4: Potentielle Phasen einer inflammatorischen Antwort bei Sepsis**

Zur Darstellung kommen möglich denkbare Verläufe von pro- und anti-inflammatorischen Phasen während des Verlaufs einer Sepsis. **A** Hier, v.a. bei jungen, gesunden Patienten, überwiegt eine zügellose pro-inflammatorische Phase die zu Schock und Organversagen führt. **B** Patienten mit Komorbiditäten, geschwächtem Allgemeinzustand/Immunsystem oder in höherem Alter können nach einer ersten pro-inflammatorischen Phase in eine verstärkt anti-inflammatorische Phase geraten und sekundäre Infektionen erfahren. **C** Ein Wechsel der beiden Phasen ist ebenfalls denkbar, wobei nach einer prolongierten Krankheitsphase schließlich durch ein geschwächtes Immunsystem der Tod eintritt (Abb. modifiziert nach Hotchkiss et al. 2013, S. 261).

Ward 2013; Bone et al. 1997). Denkbare Verlaufsformen dieser Phasen zeigt **Abbildung 4**. Probat dazu sind die Untersuchungen von Boomer et al. von 2011. Diese bestimmten

unmittelbar *postmortem* den Immunstatus bei an Folge von schwerer Sepsis auf ICU Verstorbenen (Boomer et al. 2011). Dazu wurde Milz- und Lungengewebe entnommen und mit ebenfalls *postmortem* gewonnenen Gewebeproben nicht-septischer Patienten verglichen. Es zeigte sich bei den Leukozyten der Milz (*Splenocytes*) der Sepsis-Patienten im Vergleich mit den Kontroll-Proben eine um mehr als 90 % verminderte Fähigkeit zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6 aber auch IL-10 (Zell-Dysfunktion; *Cell exhaustion*). Außerdem zeigte sich, mit einigen Unterschieden zwischen den Geweben, eine erhöhte Expression von negativ ko-stimulierenden Rezeptoren (auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) und deren Liganden (PD-L1 auf Makrophagen und anderen Antigen präsentierenden Zellen, APCs). Weitere Zellen, die eine Immunantwort supprimieren, wie T<sub>reg</sub>-Zellen (regulatorische T-Zellen) und MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*), wurden bei den Patienten mit Sepsis ebenfalls vermehrt nachgewiesen (Boomer et al. 2011). Bei einem weiteren Kollektiv von septischen Patienten waren erhöhte Mengen an zirkulierenden T<sub>reg</sub>-Zellen mit einem erhöhten SOFA-Score und einer erhöhten Mortalität assoziiert (Huang H et al. 2015). Wiederum das Kollektiv von Boomer et al. betreffend, so war darüber hinaus im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine erniedrigte Expression des positiv ko-stimulierenden Rezeptors CD28 auf CD4<sup>+</sup>-/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und dessen Ligand CD86 auf APCs zu beobachten (Boomer et al. 2011). Viele, durch dieses Kollektiv gewonnenen, Erkenntnisse wurden ebenfalls bei der Analyse von PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) lebender Patienten mit schwerer Sepsis bestätigt (Boomer et al. 2012). Eine weitere entdeckte Begebenheit, nämlich die quantitative Abnahme (Depletion) von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz wurde nicht nur bei dem *postmortal* untersuchten Kollektiv (Durchschnittsalter 71,1) von Boomer et al. gefunden. Auch verstorbene Kinder mit schwerer Sepsis/septischem Schock zeigten eine Lymphozyten-Depletion innerhalb der Milz, zusätzlich auch innerhalb des Thymus und der untersuchten Lymphknoten. Erkennbar bei diesen Kindern war außerdem eine erhöhte Apoptose-Rate der Leukozyten der Milz (Felmet et al. 2005).

Weiterhin von Bedeutung für das Konzept einer anti-inflammatorischen Phase ist die bei Sepsis vermehrt vorhandene Präsenz von sekundären Infektionen. Otto et al. fanden heraus, dass Infektionen mit opportunistischen Bakterien und *Candida spp. (species pluralis)*, die sonst bei medikamentöser Immunsuppression oder Immundefizienz verschiedener Genese vorkommen, vermehrt in der späten Phase der Sepsis (ab Tag 16) auftreten (Otto et al. 2011). Weiterhin wurde bei septischen Patienten die Reaktivierung einer Infektion mit dem HCMV (humanes Cytomegalievirus = Humanes Herpesvirus 5, HHV-5) beobachtet, eine höhere

Reaktivierungsrate war mit einer längeren Hospitalisierung bzw. einem häufigeren Versterben assoziiert (Limaye et al. 2008).

Dass eine Immun-Dysfunktion (*Exhaustion*) eine zentrale Rolle während der Sepsis einnimmt, argumentieren einige Autoren auch mit dem hohen Durchschnittsalter der betroffenen Patienten und einem parallel im Alter auftretenden Phänomen der weniger effektiven Immunantwort, der sog. Immunoseneszenz (Hotchkiss et al. 2013).

### 1.2.1 Der Rezeptor PD-1

Der Rezeptor PD-1 ist ein monomerer, aus 288 Aminosäuren bestehender und zur Ig (Immunoglobulin) Superfamilie gehörender, Typ 1 Transmembran Rezeptor (Finger et al. 1997; Agata et al. 1996; Ishida et al. 1992). Der zytoplasmatische Teil enthält ein ITIM (Immunorezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv) und ein ITSM (Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Umstell-Motiv) (Chemnitz et al. 2004; Finger et al. 1997). Exprimiert wird PD-1 von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und einigen myeloischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und DCs (**Abbildung 5**; Patsoukis et al. 2012; Youngblood et al. 2011; Barber et al. 2006; Keir et al. 2006). PD-1 wurde als Bestandteil einer molekularen Signatur von dysfunktionalen (*exhausted*) T-Zellen ausgemacht (Wherry et al. 2007). Wird nun eine Zelle aktiviert, findet eine induzierte, vermehrte Expression von PD-1 statt, wodurch bei Bindung mit dessen Liganden die Effektor-Funktionen der Zelle limitiert werden können (Keir et al. 2008; Latchman et al. 2001; Agata et al. 1996). Dabei ist PD-1 bei Bindung seiner Liganden in der Lage, die Produktion von IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  und des Zell-Überlebens-Gen BCL- $x_L$  (*B-cell lymphoma-extra large*) zu hemmen (Keir et al. 2006; Chemnitz et al. 2004; Latchman et al. 2001). Sowohl unter vorheriger alleiniger TCR-Stimulation (T-Zell-Rezeptor) als auch unter vorausgegangener TCR-CD28-Stimulation kann eine Inhibierung der Zytokin-Produktion durch PD-1 stattfinden. An CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine PD-1-Stimulierung zusätzlich zu einer Inhibierung der Proliferation führt, indem die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in einen Zellzyklus-Arrest in G0/G1-Phase geführt werden (Patsoukis et al. 2012; Latchman et al. 2001; Dong et al. 1999). PD-1 besitzt außerdem eine negativ regulatorische Funktion auf die Proliferation und Aktivierung von B-Zellen und deren Fähigkeit zur Produktion von Zytokinen (Thibult et al. 2013; Nishimura et al. 1998). Gleichsam negativ regulatorische Funktionen wurden ebenfalls für NK-Zellen beschrieben (Alvarez et al. 2010). Sowohl PD-1, als auch dessen wichtiger Ligand PD-L1 werden auf T<sub>reg</sub>-Zellen exprimiert. PD-1 nimmt dadurch eine wichtige Rolle bei der Inhibition von T-Zell- und B-Zell-Antworten ein, da gezeigt werden konnte, dass PD-L1 sowohl die Konversion von naiven



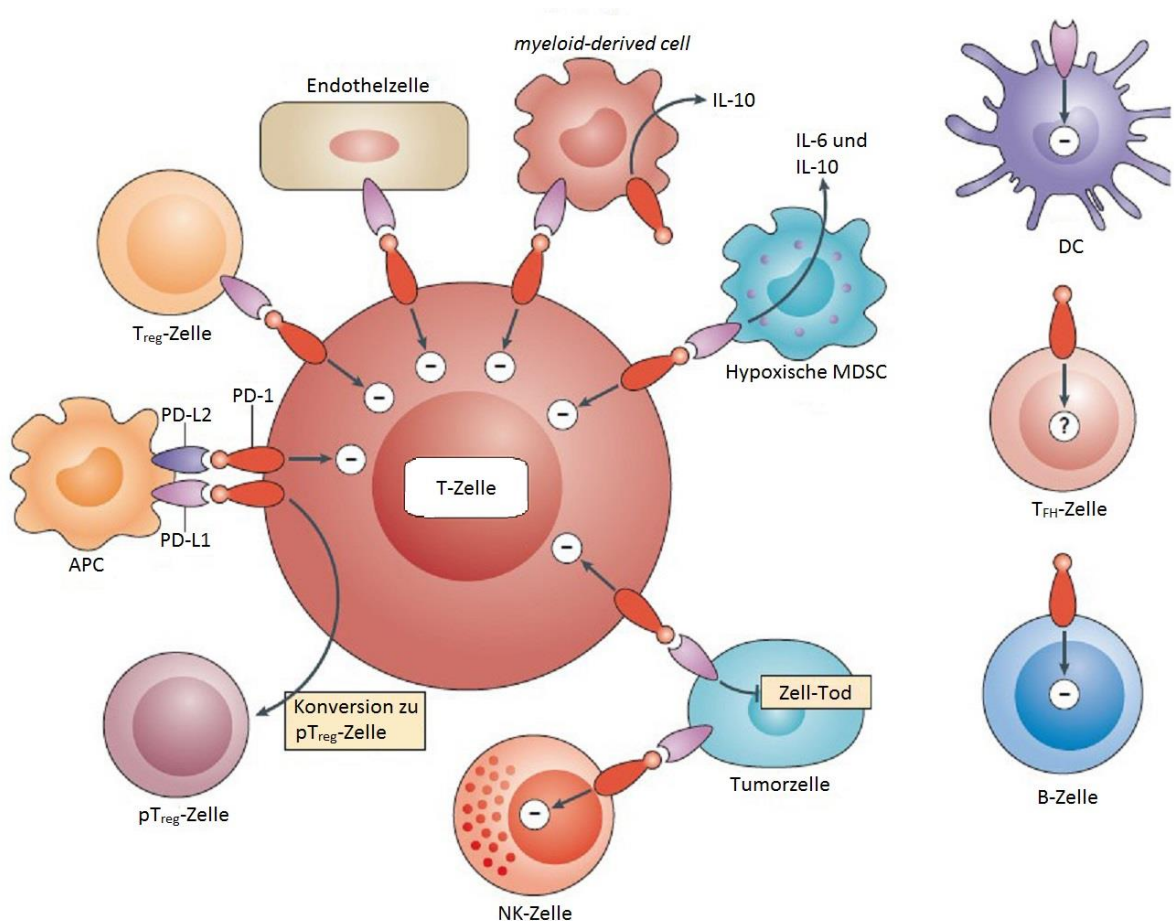
CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>reg</sub>-Zellen induziert, als auch die Zell supprimierende Wirkung von T<sub>reg</sub>-Zellen aufrecht erhält (Gotot et al. 2012; Francisco et al. 2009). Weiterhin wirkt PD-1 über eine Induktion von Immobilität erregerspezifischer T-Zellen in der Milz (Zinselmeyer et al. 2013). Eine direkte zytopathische Wirkung von PD-1, wie sie ursprünglich propagiert wurde, konnte wiederholt in verschiedenen Modellen nicht beobachtet werden (Chemnitz et al. 2004; Latchman et al. 2001). PD-1 wird außerdem auf einer Sub-Klasse von T-Gedächtnis-Zellen und T<sub>FH</sub>-Zellen (follikuläre T-Helfer-Zellen) exprimiert, deren genaue Funktion ist noch ungeklärt (Duraiswamy et al. 2011; Haynes et al. 2007).

### 1.2.2 Liganden des Rezeptors PD-1

PD-1 besitzt zwei Liganden: PD-L1 und PD-L2. PD-L1 (auch B7-H1/CD274) ist weit verbreitet, exprimiert wird dieser Ligand auf hämatopoetischen und auf nicht-hämatopoetischen (z.B. Endothel des Herzens oder Trophoblasten der Plazenta) Zellen (**Abbildung 5**), auf denen er auch induzierbar ist (Keir et al. 2008; Kinter et al. 2008; Brown et al. 2003). Auch viele Tumoren des Menschen exprimieren vermehrt PD-L1 (Brown et al. 2003; Dong et al. 2002). Die Expression von PD-L2 (auch B7-DC/CD273) ist stärker restringiert. Er findet sich auf Makrophagen und DCs (**Abbildung 5**), v.a. nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  (Brown et al. 2003; Latchman et al. 2001; Tseng et al. 2001).

In der Inhibierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigt PD-L1 eine höhere Potenz als PD-L2 (Latchman et al. 2001). PD-L1 und PD-L2 auf APCs besitzen teils synergistische inhibitorische Wirkungen, nämlich auf die Zytokin-Produktion (IFN- $\gamma$ , IL-2 von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T<sub>eff</sub>-Zellen (Effektor-T-Zellen), teils spezifische inhibitorische Wirkungen, wie die von PD-L1 gegenüber selbstreaktiven T-Zellen (Keir et al. 2006). Für PD-L1/PD-L2 wurde auch ein inverser Signalweg, sprich das Phänomen, dass Liganden zu Rezeptoren werden, (*Reverse signaling*) beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Liganden den Reifungsprozess von DCs behindern (Kuipers et al. 2006).

Die Wichtigkeit der Expression von PD-L1 auf parenchymatösen im Vergleich zu auf hämatopoetischen Zellen für die Unterdrückung von Autoimmun-Reaktionen wird hervorgehoben (Keir et al. 2006). Bei Mäusen konnte eine erhöhte PD-L1-Expression während einer Sepsis auf verschiedenen Immunzellen wie Monozyten, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beobachtet werden. Septische PD-L1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten hier eine signifikant niedrigere Mortalität im Vergleich zu septischen WT (Wildtyp)-Mäusen (Huang X et al. 2014).



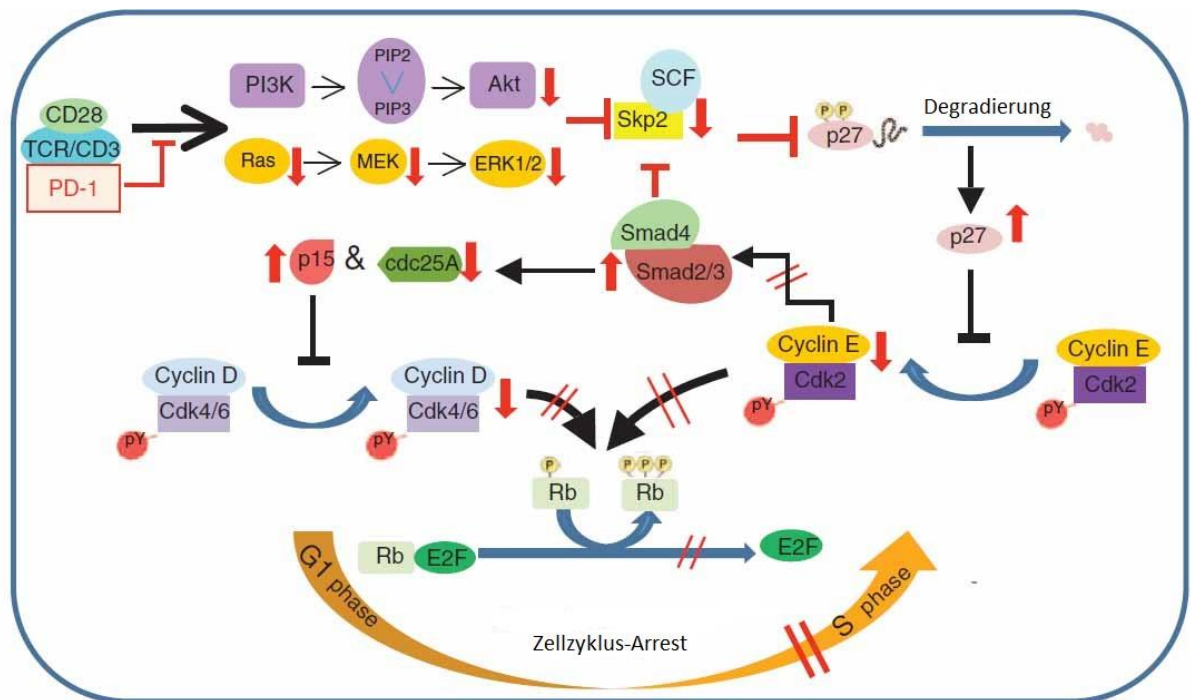
**Abbildung 5: Vorkommen und Funktion des PD-1/PD-L1/PD-L2-Pfades**

Zusammengefasst dargestellt sind die Lokalisationen und die prinzipielle Funktion von PD-1 und seinen beiden Liganden (Abb. modifiziert nach Nguyen und Ohashi 2015, S. 47).

### 1.2.3 PD-1-Signaltransduktion und intrazelluläre Signalkaskaden

Hinreichend untersucht wurde die intrazelluläre Signalweiterleitung des aktivierten Rezeptors PD-1 bei humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Proliferation dadurch unterbunden wird (Patsoukis et al. 2012). Bindet nun PD-L1/PD-L2 mit PD-1 auf einer T-Zelle, die durch Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR)-CD3 Komplexes und CD28 aktiviert wurde, so rekrutiert das ITSM von PD-1, nicht das ITIM, die Phosphatase SHP-2 (*src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2*) und phosphoryliert diese um damit das TCR-Signal herunter zu regulieren (Chemnitz et al. 2004; Latchman et al. 2001). Auch das Signal des aktivierten BCR (B-Zell-Rezeptor) wird durch eine Phosphorylierung von SHP-2 durch das ITSM des PD-1 inhibiert (Okazaki et al. 2001). Auf weiterem Wege werden danach die in **Abbildung 6** dargestellten intrazellulären Signalkaskaden in Gang gesetzt, die zu einem G1-Arrest der Zelle führen und somit einen Übergang in Phase S, in der die DNA (Desoxyribonukleinsäure) verdoppelt wird, verhindern (Patsoukis et al. 2012). PD-1 vermittelt dabei über einen IL-2 abhängigen Pfad (Ras-MEK-ERK; Ras-Mitogen-activated protein kinase kinase-

*extracellular-signal-regulated kinase*) und einen IL-2 unabhängigen Pfad (PI3K-Akt; Phosphoinositid-3-Kinase), sodass die Wirkung von PD-1 nur partiell durch den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 aufgehoben werden kann (Patsoukis et al. 2012). Sowohl bei T- als auch bei B-Zellen führt die Aktivierung von PD-1 zu einer Deaktivierung von PI3K und ERK (Okazaki et al. 2001).



**Abbildung 6: Intrazelluläre Signalkaskaden von PD-1 nach Stimulierung von TCR/CD3 und CD28 einer T-Zelle**

PD-1 unterdrückt die Transkription des Skp2 Gens durch Inhibition i) des IL-2 abhängigen Ras-MEK-ERK-Pfades und ii) des IL-2 unabhängigen PI3K-Akt-Pfades. Skp2 kodiert für eine Komponente der Ligase SCF (*Skp, Cullin, F-box containing*), welche nun nicht mehr den Cdk (Cyclin-abhängige Kinase)-Inhibitor p27 degradieren kann, was zu einem Abfall der Cdk2-Aktivität führt. Cdk2, und auch Cdk4, sind notwendig für den Übergang von der G1- zur S-Phase. Dadurch wird das Retinoblastom Gen-Produkt nicht phosphoryliert, was zu einer Unterdrückung der Aktivität von E2F Transkriptionsfaktoren führt. Dies wird zusätzlich dadurch verstärkt, da die steigende Aktivität der Transkriptionsfaktoren Smad2/3 zu einer vermehrten Expression des G1-Phase Inhibitors p15 und zu einer verminderten Expression der Cdk aktivierenden Phosphatase cdc25A führt. Letztendlich wird so verhindert, dass Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie nicht den G1/S-Phasenübertritt ermöglichen können (Abb. modifiziert nach Patsoukis et al. 2012, S. 11).

Interessant ist die Rolle des Transkriptionsfaktors Smad3, da er einen Schnittpunkt der Signalweiterleitung sowohl des PD-1/PD-L1-Pfades als auch von TGF (*transforming growth factors*)- $\beta$  darstellt (Patsoukis et al. 2012; Matsuura et al. 2004). PD-1 und TGF- $\beta$  sind beide

bekannt dafür, die Umwandlung von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen zu fördern (Francisco et al. 2009).

#### **1.2.4 Bedeutungen von PD-1 in peripherer Toleranz, Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen**

PD-1 besitzt eine wichtige Rolle in der Wahrung der peripheren Toleranz, sprich der Suppression autoreaktiver Lymphozyten (Probst et al. 2005; Okazaki et al 2002). Um sich die Funktionalität von PD-1 in diesem Kontext vor Augen zu führen, sei darauf hingewiesen, dass PD-1<sup>-/-</sup>-BALB/c-Mäuse eine infauste autoimmun dilatative Kardiomyopathie mit erhöhten zirkulierenden IgG entwickeln (Nishimura et al. 2001). Außerdem binden PD-1-Liganden auf T<sub>reg</sub>-Zellen direkt an PD-1 auf autoreaktiven B-Zellen, um diese so zu deaktivieren, deren Proliferation zu unterdrücken und deren Apoptose zu induzieren. Dabei nutzen T<sub>reg</sub>-Zellen PD-L2 nur, wenn nicht genügend PD-L1 verfügbar ist (Gotot et al. 2012). PD-L1/PD-L2<sup>-/-</sup>-NOD-Mäuse entwickeln schneller einen Diabetes mit einer gesteigerten Anzahl an T<sub>eff</sub>-Zellen in pankreatischen Lymphknoten (Keir et al. 2006). Auch einige Tumoren können PD-L1 exprimieren und so mittels Ligation von PD-1 auf T-Zellen, deren Apoptose-Rate daraufhin steigt, der Immunantwort entgehen (Dong et al. 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass tumorspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Tumorumgebung vermehrt PD-1 exprimieren und die Zytokin-Produktion dieser Zellen sich als beeinträchtigt darstellte (Ahmadzadeh et al. 2009).

#### **1.2.5 Bedeutungen von PD-1 für Sepsis und Infektionskrankheiten**

In vielen Modellen, in denen sowohl murine als auch humane Immunzellen betrachtet wurden, konnte eine Beteiligung von PD-1 an der Pathophysiologie von infektiösen bis hin zu septischen Krankheitsbildern nachgewiesen werden. So konnte bei Patienten im septischen Schock eine vermehrte Expression von PD-1 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden (Guignant et al. 2011). Eine Hochregulierung von PD-1, PD-L1, PD-L2 auf Monozyten ist ebenso Bestandteil während des septischen Schocks, wie eine zusätzlich erhöhte PD-L1-Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen an den ersten fünf Tagen nach Beginn des septischen Schocks (Guignant et al. 2011; Zhang Y et al. 2011; Huang X et al. 2009). Assoziiert mit diesen veränderten Monozyten-Konfigurationen sind eine erhöhte IL-10 Sekretion und ein gehäuftes Auftreten von sekundären nosokomialen Infektionen (Guignant et al. 2011). Eine erhöhte Plasma IL-10 Konzentration assoziierte darüber hinaus mit einer schlechten Prognose der Patienten (Guignant et al. 2011). Betreffend der erhöhten PD-1-Expression auf

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im septischen Schock wurde eine Assoziation mit einer verminderten Fähigkeit dieser Zellen zur Proliferation festgestellt (Guignant et al. 2011). Ein weiteres Merkmal eines septischen Schocks ist die erhöhte Apoptose von CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD19<sup>+</sup>-B-Zellen, welche mit einer verminderten Fähigkeit der IL-2 Synthese einhergeht (Zhang Y et al. 2011; Roger et al. 2009). Durch Blockade des PD-1/PD-L1-Pfades *in vitro* kann ein Rückgang dieser gesteigerten Apoptose von T-Zellen induziert werden, welcher außerdem von einer verminderten Produktion von IL-10 durch Monozyten begleitet ist (Zhang Y et al. 2011). Gleichsam findet man auch bei Patienten mit Sepsis eine verminderte Sekretion von IL-2 und auch IFN- $\gamma$  durch Lymphozyten, eine vermehrte PD-1 und eine verminderte PD-L1-Expression auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und eine vermehrte PD-L1- und eine verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten (Chang K et al. 2014). Auch wird eine Assoziation von vermehrten PD-1<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit einer erhöhten Apoptose-Rate beschrieben, gleichzeitig steigt mit den PD-1<sup>high</sup>-(sehr hoch exprimiert)-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und HLA-DR<sub>low</sub>-Monozyten die Rate an sekundären Infektionen an (Chang K et al. 2014). Ähnlich den Patienten im septischen Schock können auch bei Patienten mit Sepsis durch anti-PD-1- bzw. anti-PD-L1-Antikörper-Therapien *in vitro* die Apoptoserate von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vermindert und die IFN- $\gamma$  und IL-2 Produktion gesteigert werden (Chang K et al. 2014). In einem Sepsis-Modell mit PD-1<sup>+/+</sup>-(WT) und PD-1<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte die Rolle von Makrophagen eruiert werden. Hier wurde eine Assoziation von erhöhter PD-1-Expression auf Makrophagen mit deren supprimierten Fähigkeit zur Phagozytose und verminderter TNF- $\alpha$  und IL-6 Produktion gezeigt (Huang X et al. 2009). Auch konnte in zwei weiteren Modellen bei septischen PD-1<sup>-/-</sup>-Mäusen eine erhöhte Fähigkeit zur Phagozytose festgestellt werden im Vergleich zu PD-1<sup>+/+</sup>-Mäusen (Huang X et al. 2014; Ayala et al 2014). Interessant ist, dass ein Sepsistypischer Gewebeschaden diverser Organe größtenteils bei den PD-1<sup>-/-</sup>-Mäusen ausblieb (Huang X et al. 2009). Auch bei septischen PD-L1<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte ein annäherndes Fehlen von histologischen Organschäden von Gastrointestinaltrakt, Nieren, Milz und Thymus beobachtet werden, welche jedoch bei den WT-Mäusen vorherrschten (Huang X et al. 2014). Verbunden waren diese fehlenden Organschäden mit verminderten Spiegeln von zirkulierenden Zytokinen wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10, was für eine insgesamt weniger kraftvolle inflammatorische Antwort gegenüber der Sepsis spricht (Huang X et al. 2014). Die bakterielle Last bei den WT- und den PD-1<sup>-/-</sup>-Mäusen war vergleichbar. Andere Organsysteme wurden in diesem Modell leider nicht untersucht (Huang X et al. 2014).

Was das topografische Ausmaß der Antwort von Makrophagen betrifft, so findet sich, im Vergleich zu septischen PD-1<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei septischen WT-Mäusen eine vermehrte Fähigkeit zur Migration und eine erhöhte Motilität von Makrophagen (Ayala et al. 2014). Dies dürfte einer der fördernden Faktoren einer massiven inflammatorischen Reaktion bei Sepsis mit begleitenden Gewebeschäden darstellen (Ayala et al. 2014).

Es wurde gezeigt, dass PD-1 einer epigenetischen Kontrolle unterliegt und dass bei einer Virus-Infektion das Ausmaß der TCR-Stimulation mit einer transienten Demethylierung verschiedener *PDCDI*-Loci (*PDCDI*; humanes PD-1-Gen) korreliert (Youngblood et al. 2011). Parallel zum Virus-Titer wird dementsprechend auch die PD-1-Expression auf antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gesteigert bzw. gesenkt (Youngblood et al. 2011). Merkmal erschöpfter (*exhausted*) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, auf denen eine hohe Expressionsrate von PD-1 zu finden ist, sind völlig demethylierte *PDCDI*-Loci, die auch nach Absinken des Virus-Titers und der PD-1-Expression demethyliert bleiben und somit eine Prädisposition für weiter verringerte T-Zell-Funktionen darstellt (Youngblood et al. 2011; Barber et al. 2006). Dass die im Umfeld einer Virusinfektion verringerte Antwort von erschöpften T-Zellen eine Folge von vermehrter PD-1-Expression und dessen Stimulation darstellt, wurde dadurch gezeigt, dass nach der Blockade des PD-1/PD-L1-Pfades die T-Zell-Funktion wiederhergestellt wurde, was sich in Form von gesteigerter Fähigkeit zur Proliferation, Zytokin-Sekretion (IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ), Abtötung von infizierten Zellen und Senkung der viralen Last zeigte (Blackburn et al. 2008; Barber et al. 2006).

### 1.2.6 Der genetische Polymorphismus *PDCDI* rs11568821

Der Rezeptor PD-1 wird vom *PDCDI*-Gen kodiert und besitzt eine Größe von 9625 bp (Shinohara et al. 1994; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF363458>). Dieses Gen befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q37.3) (Shinohara et al. 1994).

Der in dieser Arbeit untersuchte SNP (*single nucleotide polymorphism*) mit der *reference* SNP (rs) # 11568821, früher auch als PD-1.3 bezeichnet, befindet sich im *PDCDI*-Gen (Position 241 849 881 – 241 858 908; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5133>) in Intron 4 (**Abbildung 7**) an Position 241 851 760 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11568821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11568821)). Die zwei an dieser Lokalisation möglichen Allel-Formen, die die Basen Guanin (G) und Adenin (A) enthalten, werden mittels der Orientierung am Rückwärtsstrang der DNA (*reverse genomic orientation*, REV) definiert (Prokunina et al. 2002; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?-rs=11568821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?-rs=11568821)). Da es gilt, dass „*das in einer*

natürlichen Population am häufigsten vorliegende Erscheinungsbild eines Merkmals [als Wildtyp bezeichnet wird]“ (Campbell und Reece 2009, S. 386), bekommt das Wildtypallel die Base Guanin (Allelfrequenz  $G=0.952$  weltweit,  $G=0.897$  für eine europäische Subpopulation) zugewiesen. Somit besitzt das mutierte Allel mit einer weltweiten MAF (*minor allele frequency*) von 0.048 (MAF=0.103 für eine europ. Subpopulation) die Base Adenin. Die hier genannten Allelfrequenzen wurden den Daten des 1000 Genomes Project (1000 Genomes Project Consortium et al. 2012) entnommen und können im Detail auf <http://www.1000genomes.org/home> eingesehen werden.

*PDCDI* rs11568821 befindet sich innerhalb einer *Enhancer*-Struktur (Prokunina et al. 2002). Dort befinden sich mehrere Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, u.a. für den Faktor RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*), dessen Bindungsstelle *PDCDI* rs11568821 beinhaltet. RUNX1 bindet dabei nur an diesen *Enhancer*, wenn das Wildtyp-Allel G vorliegt. Bei Vorhandensein des A-Allels wurde keine Bindung von RUNX1 beobachtet. Es wird davon ausgegangen, dass dieses A-Allel die RUNX1-Bindungsstelle verändert. Da außerdem bei Stimulation niedrigere Expressionsraten von

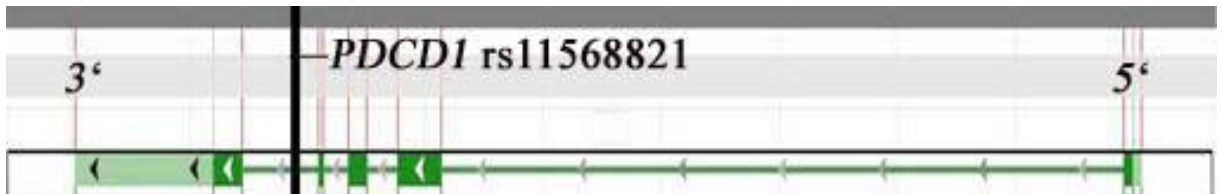


Abbildung 7: Der SNP *PDCDI* rs11568821

Abgebildet ist das *PDCDI*-Gen in grün mitsamt dessen SNP rs11568821 im Intron 4 (Abb. modifiziert nach [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11568821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=11568821)).

*PDCDI*-mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) bei GA/AA-Genotypen im Vergleich zum GG-Genotyp beobachtet wurden, zog man daraus den Schluss, dass bei Vorhandensein des Wildtyp-*Enhancers* ein rapider Anstieg der *PDCDI*-mRNA-Expression zu erwarten ist, bei Vorliegen des A-Alles jedoch eine abweichende Regulation, sprich eine verminderte Expression von *PDCDI*-mRNA (Prokunina et al. 2002). Zwei Studien, die Patienten mit SLE (systemischer Lupus erythematosus) untersuchten, bestätigten diese Ergebnisse dahingehend, dass eine signifikante Korrelation von niedrigeren PD-1-Expressionsraten mit dem Vorhandensein des *PDCDI* rs11568821 A-Allels beobachtet wurde (Kristjansdottir et al. 2010; Bertias et al. 2009).



Das seltenere A-Allel ist vermutlich die Variante des ancestralen G-Allels. Denn die Häufigkeit des A-Allels (MAF) ist in westlich-europäischen Kollektiven höher als in einem mexikanischen und sehr selten in einem afroamerikanischen (Prokunina et al. 2002).

Für kaukasische Kollektive wurden Assoziationen für das A-Allel bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wie SLE (Bertsias et al. 2009; Velázquez-Cruz et al. 2007; Prokunina et al. 2004 a ; Prokunina et al. 2002), SLE mit einem bestimmten Autoantikörper-Status (Sanghera et al. 2004), Diabetes mellitus Typ I (Nielsen et al. 2003), einer Untergruppe der rheumatoiden Arthritis (Prokunina et al. 2004 b) und einem Fortschreiten der Krankheit bei Multipler Sklerose (Kroner et al. 2005) nachgewiesen. Keine Assoziation wurde für das A-Allel und Patienten mit Morbus Basedow gefunden (Newby et al. 2007). In einer Metanalyse wurde das Fehlen einer Assoziation des A-Allels mit Morbus Bechterew festgestellt (Yang et al. 2015). In anderen Untersuchungen wurde für das A-Allel eine Tendenz zur Assoziation mit SLE (Nielsen et al. 2004) oder auch eine Assoziation mit renalen Manifestationen bei SLE-Patienten gezeigt (Johansson et al. 2005).

Einige Unterschiede bezüglich der Ergebnisse innerhalb dieser Fall-Kontroll-Studien, die auch bei einer Fragestellung zur Assoziation des A-Allels mit SLE in den Ergebnissen gegenteilig waren (Ferreiros-Vidal et al. 2004; Prokunina et al 2002), ließen sich auf Unterschiede der A-Allel-Frequenzen der Kontrollgruppen zurückführen. Tatsächlich ist vom Nordosten Europas in Richtung südwestliches Europa eine Zunahme der A-Allel-Frequenz innerhalb der Kontrollgruppen gefunden worden, wobei jedoch die Frequenz der untersuchten SLE-Patienten konstant blieb (Ferreiros-Vidal et al. 2007).

Weiterhin ließ sich ein völliges Fehlen des A-Allels in einem gesunden japanischen (Mori et al. 2005) bzw. in chinesischen Kollektiven von rheumatoider Arthritis erkennen (Liu et al. 2014; Kong et al. 2005).



### 1.3 Fragestellung

In den letzten Jahren änderte sich die vorherrschende Ansicht, dass für die Pathophysiologie der Sepsis vor allem eine frühe, hyper-inflammatorische Phase relevant sei, dahingehend, dass nun auch einer gegensteuernden, späteren, hypo-inflammatorischen Phase eine Bedeutung beigemessen wird (Hotchkiss et al. 2009; Adib-Conquy und Cavaillon 2009). Zahlreiche Arbeiten untermauern die Relevanz negativ ko-stimulierender Rezeptoren des Immunsystems, wie des Rezeptors PD-1, für die Pathophysiologie der Sepsis (Chang K et al. 2014; Boomer et al. 2011; Guignant et al. 2011). Da für das G-Allel eines SNPs innerhalb des PD-1 kodierenden Gens (*PDCDI* rs11568821), eine höhere Expression von PD-1 angenommen wird (Kristjansdottir et al. 2010; Prokunina et al. 2002), wurden in der Arbeitsgruppe die Morbidität und die Mortalität bei Patienten mit Sepsis und deren *PDCDI* rs11568821-Genotyp untersucht. Aufgrund der Notwendigkeit hoher Fallzahlen für genetische Assoziationsstudien wurden konsekutiv von mehreren Promovenden die Patienten über einen mehrjährigen Zeitraum rekrutiert (siehe 2.3.6.), biologisches Material (Blut) asserviert und analysiert, und klinische Daten im Verlauf erhoben. Anhand des Materials und der Daten der ersten 219 Patienten konnte gezeigt werden, dass der *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyp mit einer höheren Mortalität an *Follow-Up*-Tag 90 und einer höheren Morbidität (gemessen am *SOFA-Score*) korreliert (Mansur et al. 2014).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, herauszuarbeiten, ob sich die gefundene Assoziation zwischen dem *PDCDI* rs11568821-Genotyp und der Morbidität spezifisch in einem oder mehreren der sechs vom etablierten *SOFA-Score* erfassten Organsystemen manifestiert. Für diese Untersuchungen stand ein Kollektiv von 300 Patienten zur Verfügung. Die klinischen Daten an den *Follow-Up*-Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 und 28 in Form des *SOFA-Scores* und dessen organbezogenen *Sub-Scores* wurden auf Assoziationen mit dem *PDCDI* rs11568821-Genotyp hin überprüft. Zusätzlich wurden weitere das Kollektiv beschreibende Parameter behandelt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Im Rahmen des Projekts „Bedeutung genetischer Polymorphismen der angeborenen Immunabwehr bei Sepsis und Organversagen“ (kurz GenoSep) werden seit dem 21. März 2012 nach den Sepsis-Leitlinien geltenden Richtlinien entsprechend (Reinhart et al. 2010) Patienten auf einer allgemeinchirurgischen (Station 1014) und zwei anästhesiologischen Intensivstationen (Station 0117 und 0118) der Universitätsmedizin Göttingen von der Arbeitsgruppe diagnostiziert und rekrutiert. Demnach mussten bei einem Patienten eine Infektion, bestätigt durch einen mikrobiologischen Nachweis oder hinreichend belegt durch klinische Kriterien, bestehen und außerdem mindestens zwei der SIRS-Kriterien erfüllt sein um sicher ein septisches Krankheitsbild feststellen zu können. Aus Gründen der Homogenität wurden nur Patienten kaukasischer Herkunft in die Studie eingeschlossen. Außerdem wurde sichergestellt, dass 1) die Patienten in den sechs Wochen vor Einschluss in die Studie sich weder einer immunsuppressiven Therapie unterziehen mussten, 2) noch in diesem Zeitraum die Diagnose/Verdacht eines Myokardinfarktes gestellt wurde. Patienten mit 3) HIV (Humanes Immundefizienz Virus)-Infektion, 4) Herzinsuffizienz Grad NYHA IV oder 5) einer vorbestehenden unheilbaren Erkrankung, die eine niedrige Überlebenschance für den ab Studieneinschluss beginnenden 28 tägigen Zeitraum nach sich zieht (Dies umfasst auch unheilbaren Krebs, Nieren- und Lungenerkrankungen im Endstadium und Sauerstoffbedarf in der Häuslichkeit), 6) Schwangere, stillende Mütter, 7) Jugendliche unter 18 Jahren und Patienten, für die eine 8) DNR (*Do Not Resuscitate*)/ DNT (*Do Not Treat*) Order existierte oder die sich 9) in einem chronisch vegetativen Zustand (Apallisches Syndrom) befanden, wurden ebenso von der Studie ausgeschlossen. Das für diese Studie notwendige positive Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen wurde am 15. Januar 2012 erteilt. Die ethischen Grundsätze der Deklaration von Helsinki in der Revision von 2008 wurden eingehalten.

Jedem Patienten wurden über einen bereits liegenden arteriellen oder zentralvenösen Zugang etwa 25 ml Blut in heparinisierten Monovetten zur Isolierung von PBMCs (periphere mononukleäre Zellen) und etwa 10 ml bzw. 5 ml Blut in einer silikathaltigen Monovette zur Serumgewinnung abgenommen. Das gewonnene Material wurde für verschiedene Fragestellungen verwendet.

Für die vorliegende Dissertation wurden 300 Patienten, die zwischen März 2012 und November 2013 rekrutiert worden sind, hinsichtlich des *PDCDI* rs11568821-Genotyps und ihres klinischen Verlaufs ausgewertet.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Substanzen

10x <i>Glycine</i> (Bestandteil von “Chip-IT™ <i>Express Enzymatic</i> ”)	Active Motif Rixensart, Belgien
10x PBS (Bestandteil von “Chip-IT™ <i>Express Enzymatic</i> ”)	Active Motif Rixensart, Belgien
100mM PMSF (Bestandteil von “Chip-IT™ <i>Express Enzymatic</i> ”)	Active Motif Rixensart, Belgien
2-Mercaptoethanol UN 2966	Merck Schuchardt OHG Hofenbrunn
AGAROSE <i>Electrophoresis Grade</i>	Invitrogen Ltd. Paisley, UK
Ampuwa 1000ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH Bad Homburg v.d.H.
Bidestilliertes Wasser	Eigene Herstellung der Univer- sitätsmedizin Göttingen
<i>Buffer</i> RLT Plus RNeasy <i>Plus lysis buffer</i> (Bestandteil von “ <i>AllPraep</i> DNA/RNA Mini Kit“)	QIAGEN GmbH Hilden
Ethanol 80% (V/V)	B. Braun Melsungen AG
Ethanol <i>absolute for analysis</i>	Merck KGaA Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 0,025% i. d. Tropfflasche	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe
Fermentas 6x DNA <i>Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific Bal- tics UAB Vilnius, Litauen
Fermentas Fast Ruler™ DNA <i>Ladder High Range</i>	Thermo Fisher Scientific Bal- tics UAB Vilnius, Litauen
Fermentas Fast Ruler™ DNA <i>Ladder Middle Range</i>	Thermo Fisher Scientific Bal- tics UAB Vilnius, Litauen
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Schweden
<i>Formaldehyde solution</i> 36,5-38%	SIGMA-ALDRICH, Co. St. Louis, MO USA
Gibco® DPBS (1x)	Life Technologies Corporation Paisley, UK

ORTHO-Borsäure EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur	Merck KGaA Darmstadt
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (PIC) (Bestandteil von Chip-IT™ <i>Express Enzymatic</i> ™)	Active Motif Rixensart, Belgien
PUFFERAN® ≥99, 9%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe
Titriplex® III	Merck KGaA Darmstadt
Trypanblau (0, 4%)	SIGMA-ALDRICH, Co. St. Louis, MO USA

### 2.2.2 Gebrauchswaren

BD Falcon 50ml <i>Polypropylene Conical Tube</i>	BD Franklin Lakes, NJ USA
Deckgläser für Haemacytometer (20x26mm) <i>Disposable, single sealed cuvettes</i> <i>Gentle Skin sensitive</i> REF 1221	Menzel GmbH Braunschweig Eppendorf AG Hamburg Rösner-Mautby Meditrade GmbH Kiefersfelden
Leucosep™ 50ml, <i>sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen
MicroAmp® <i>Fast Optical 96-Well Reaction</i> <i>Plate with Barcode</i> (0.1 mL)	Applied Biosystems CA, USA
MicroAmp™ <i>Optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems CA, USA
Pipettenspitzen:	
Premium Tips 10µl	Biozym Hessisch Oldendorf
TipOne 100µl <i>Bevelled, Filter Tip (sterile)</i>	STARLAB GmbH Hamburg
TipOne RPT 1000µl XL <i>Graduated, Filter Tip</i> ( <i>sterile</i> )	STARLAB GmbH Hamburg
Reagiergefäß 1,5ml	SARSTEDT AG&Co. Nüm- brecht
Röhre 5ml, 57 x 15,3 mm PP	SARSTEDT AG&Co. Nüm- brecht
Serologische Pipette 5ml	SARSTEDT AG&Co Nüm- brecht

### 2.2.3 Kits und Assays

AllPrep DNA/RNA <i>Mini Kit</i>	QIAGEN GmbH Hilden
QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit</i> (250)	QIAGEN GmbH Hilden

TaqMan® *Genotyping Master Mix*

Applied Biosystems CA, USA

TaqMan® *SNP Genotyping Assays, Human SM*

Applied Biosystems CA, USA

PDCD 1 ID: C\_57931290\_10

## 2.2.4 Geräte

APELAB Gyroskop

JC Montagne, Frankreich

Power Pac 300 Netzteil

Bio-Rad Laboratories GmbH  
München

DPU-414 *Thermal Printer*

Seiko Instruments Inc.

*Electronic Timer Clock*

Elektrophoresegerät Model H5

Life Technologies Inc.  
Gaithersburg MD, USA

Eppendorf Bio Photometer

Eppendorf AG Hamburg

Eppendorf Reference® Pipette 1000, 100, 10

Eppendorf AG Hamburg

Eppendorf Thermomixer 5436

Eppendorf-Netheler-Hinz  
GmbH Hamburg

Gilson PIPETMAN 200

Gilson Inc., Frankreich

ID03 Mikroskop

Carl Zeiss AG Jena

IVO Handzähler

Baumer IVO GmbH & Co. KG  
Villingen-Schwenningen

Mitsubishi *video copy processor* P66E

Mitsubishi Corp. Tokio, Japan

Multipipette® plus

Eppendorf AG Hamburg

Neubauer *Improved*

Laboroptik Friedrichsdorf

neoLab® Eisbad 1-6030

neoLab Migge GmbH Heidel-  
berg

CN-1000 DARKROOM

peqlab Biotechnologie GmbH  
Erlangen

PHILIPS Whirlpool M611 *Space Cube*  
Mikrowelle

Whirlpool Benton Harbor, MI  
USA

Pipetus®-Akku

Hirschmann Laborgeräte GmbH  
& Co. KG Eberstadt

Rainbow CCTV RMB92

Rainbow CCTV

sartorius Waage

Sartorius AG, Göttingen

Sicherheitswerkbank Lamin Air® LB-48-C

Heraeus Instruments GmbH  
Hamburg

StepOnePlus™ *Real-Time* PCR  
Inkl. Software Version 2.1

Applied Biosystems Darmstadt

Vortexmischer REAX 1R Typ 54113

Heidolph Instruments GmbH &

Co.KG Schwabach

Zentrifugen:

Eppendorf 5415D

Megafuge 1.0R

ROTANA 96R

ROTIXA/A

Sigma 3K30

Eppendorf AG Hamburg

Heraeus Holding GmbH Hanau

Hettich Zentrifugen Lauenau

Hettich Zentrifugen Lauenau

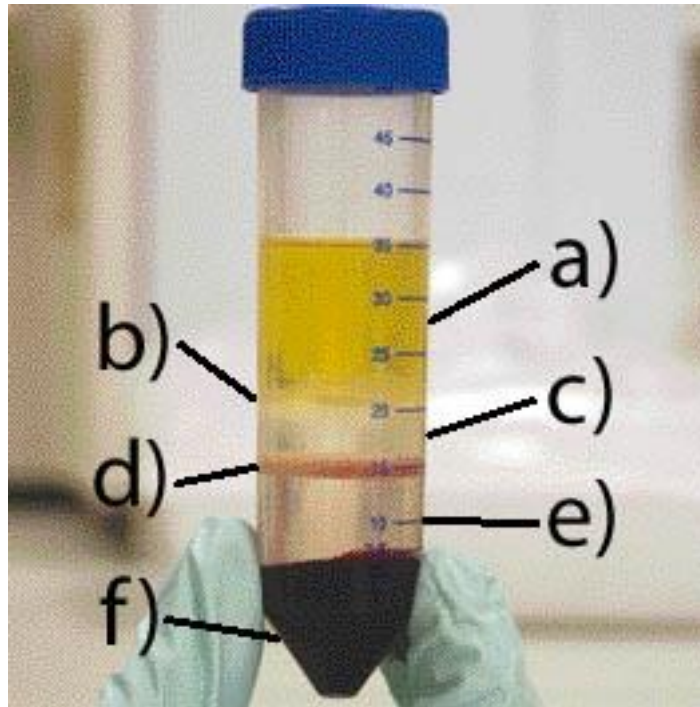
Sigma Laborzentrifugen GmbH

Osterode am Harz

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Zur Isolierung der PBMCs wurde das heparinisierte Vollblut (~25 ml), nachdem es von dem in den Monovetten befindlichem Lithium-Heparinat-Granulat getrennt wurde, in ein 50 ml Leucosep™-Röhrchen oberhalb einer Trennscheibe überführt. Dieses wurde im Voraus mit 15 ml Ficoll als Separationsmedium befüllt und bei RT (Raumtemperatur) und  $916 \times g$  (2300 rpm, Megafuge 1.0R;  $g=9,81 \text{ m/s}^2$ ) für 5 min zentrifugiert, um zu erreichen, dass sich das Ficoll unterhalb dieser Trennscheibe innerhalb des Röhrchens befindet. Die Wirksamkeit und die Vorteile von Ficoll im Vergleich zu anderen Separationsmedien bei der Leukozytenisolierung aus menschlichem Blut wurden bereits 1967 von Noble und Cutts erkannt. Der Vorteil der Trennscheibe liegt darin, dass das vorsichtige Überschichten des Separationsmediums mit dem aufzutrennenden Blut entfällt und deren Durchmischung verhindert wird. Danach wurde das Leucosep™-Röhrchen bei RT und  $916 \times g$  (2300 rpm, ROTANA 96R) für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch wurde innerhalb eines sich aufbauenden Dichtegradienten das Blut in seine Bestandteile aufgeteilt. Erythrozyten, Granulozyten und eine Ficoll-Schicht befanden sich nun unterhalb der Trennscheibe, oberhalb der Trennscheibe erkannte man eine Plasma-, eine Lymphozyten/PBMC- und eine weitere Ficoll-Schicht (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8: Leucosep nach Zentrifugation**

Durch die Zentrifugation wird das Blut in das Plasma a), Lymphozyten/PBMCs b) und in ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten f) aufgetrennt. Oberhalb und unterhalb der Trennscheibe d) erkennt man das Separationsmedium Ficoll c)+e) (Abb. modifiziert nach greiner bio-one [https://www.gbo.com/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Product\\_Flyers/Product\\_Flyers\\_BioScience/F071043\\_Leucosep\\_Manual.pdf](https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Product_Flyers/Product_Flyers_BioScience/F071043_Leucosep_Manual.pdf), S. 1).

Das Plasma und die PBMC wurden nun in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt und in drei Durchgängen in einer PBS-Lösung (*Phosphate buffered saline*) gewaschen, d. h. bei 4 °C, 292 x g (1300 rpm, Megafuge 1.0R) für 10 min zentrifugiert. Durch das Waschen wurde das Plasma und die Reste an Ficoll entfernt. Nach dem dritten Waschgang wurde das Zellsediment in 10 ml PBS suspendiert, davon 20 µl im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau in einem Eppendorfgefäß gemischt und mittels Mikroskop und Neubauerzählkammer die Zellzahl der Probe bestimmt um bei der Überführung der Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße pro Gefäß eine Zellzahl zwischen  $3,0 - 6,0 \times 10^6$  zu erhalten.

Zur Vorbereitung auf die weitere Verarbeitung wurden die Eppendorfgefäße bei 4 °C und 128 x g (1200 rpm, Sigma 3K30) 5 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, die Zellen in 350 µl *Buffer RLT plus/Mercaptoethanol* (Verhältnis 100/1) aufgenommen und durch 1 min *Vortexen* lysiert und homogenisiert. Das Lysat wurde dann bei -20 °C eingefroren. In den darauf folgenden Schritten wurde die für die Genotypisierung benötigte gDNA (genomische DNA) aus isolierten PBMCs (2.3.2) oder alternativ aus Vollblut (2.3.3) extrahiert.

### 2.3.2 Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus PBMCs

Für die Extraktion aus den PBMCs wurde das AllPrep DNA/RNA *Mini Kits* verwendet. Die hier in 2.3.2 genannten Drehzahlangaben in [rpm] beziehen sich auf die Eppendorf 5415D Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg).

Das PBMC-Lysat wurde auf eine DNA-Säule in einem Sammelgefäß gegeben und 30 s bei 9300 x g (10000 rpm) zur Trennung von DNA und RNA (Ribonukleinsäure) zentrifugiert. Die auf der Säule gebundene DNA wurde nun zwei Waschschritten unterzogen:

1. 500 µl AW 1 Puffer auf die Säule pipettieren und 15 s bei 9300 x g (10000 rpm) waschen.
2. 500 µl AW 2 Puffer auf die Säule pipettieren und 2 min bei 16100 x g (13200 rpm) waschen.

Die Säule wurde nun 1 min bei 15700 x g (13000 rpm) getrocknet um danach die gebundene DNA zu eluieren. Dazu wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß gestellt, 50 µl EB Puffer auf die Säule gegeben, eine Minute bei RT inkubiert und zuletzt 1 min bei 9300 x g (10000 rpm) zentrifugiert. Das dabei gewonnene Eluat enthielt nun die gDNA.

### 2.3.3 Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus Heparin-Vollblut

Für die Extraktion von gDNA aus Vollblut wurde das QIAamp® DNA *Blood Mini Kit* (250) verwendet.

Sämtliche in 2.3.3 genannten Drehzahlangaben in [rpm] gelten für die Eppendorf 5415D Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg).

Je Probe befüllten wir ein 1,5 ml Eppendorfgefäß, welches bereits mit 20 µl Proteaselösung vorgelegt worden war, mit 150 µl aufgetautem Heparinat-Vollblut (eingefroren bei -20 °C) und 50 µl PBS. Zusätzlich wurde 200 µl AL Puffer hinzugegeben und durch 15 sekundiges Vortexen gemischt. Im Anschluss inkubierte die Mischung für 10 min bei 56 °C in einem Thermomixer. Danach wurden 200 µl absoluter Ethanol zur Ausfällung von Proteinen hinzugefügt und wiederum im *Vortexer* für 15 s gemischt.

Nun wurde das Lysat auf eine DNA-Säule gegeben und bei 5900 x g (8000 rpm) 1 min zentrifugiert.

Im Anschluss folgten mehrere Waschschriffe: Zuerst wurde die Säule mit 500 µl AW 1 Puffer aufgefüllt und bei 5900 x g (8000 rpm) 1 min zentrifugiert, nachfolgend mit 500 µl AW 2 Puffer befüllt und bei 16100 x g (13200 rpm) 3 min zentrifugiert. Anschließend, ebenfalls



bei 16100 x g, wurde die Säule 2 min lang getrocknet. Das in Sammelgefäßen aufgefangene Zentrat wurde nach jeder Zentrifugation verworfen.

Zur finalen Elution gaben wir 200 µl AE Puffer auf die Säule und zentrifugierten diese nach 1 minütiger Inkubationszeit weitere 60 s bei 5900 x g (8000 rpm). Das Eluat wurde bei -20 °C verwahrt.

#### **2.3.4 Messung der DNA-Konzentration/DNA-Reinheit und Kontrolle der DNA-Integrität**

Da zur optimalen Amplifizierung genetischen Materials mittels einer PCR (*Polymerase chain reaction*) pro *Well* eine definierte gDNA-Menge in Lösung eingesetzt wurde, musste die gDNA-Konzentration jeder Ausgangsprobe bestimmt und die Proben entsprechend verdünnt werden.

Dazu wurden 4 µl des Eluats mit 96 µl Ampuwa verdünnt und die photometrische Extinktion der in der Probe gelösten Nukleine zur Konzentrationsbestimmung herangezogen: Das Absorptionsmaximum bei 260 nm zur Konzentrationsbestimmung der gDNA und bei 280 nm zur Bestimmung der Konzentration der Proteine. Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  ( $E_x$ ; Extinktion von Strahlung der Wellenlänge X) betrachtet, der bei etwa 1,8 (1,6-2,0) liegen sollte.

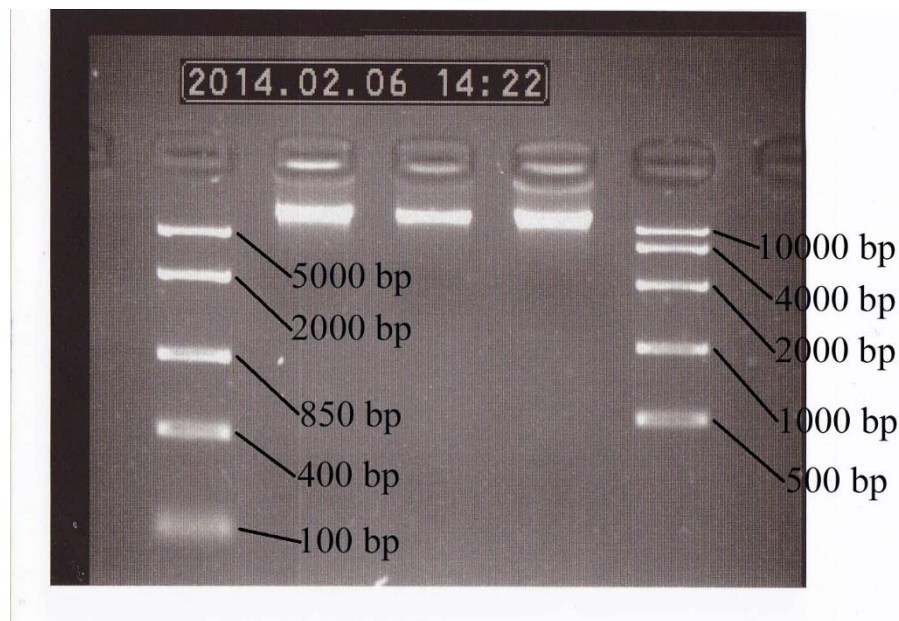
Des Weiteren wurde die Integrität der Nukleinsäuren in einem 1,5%-igen Agarose-Gel überprüft.

Agarose-Gel (1,5 %) -Herstellung:

1,85 g Agarose und 125 ml 1x TBE-Puffer\* (TRIS-Borat-EDTA-Puffer, EDTA: Ethylendiamintetraacetat, TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan) wurden in einen Erlenmeyerkolben gegeben und gekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Danach wurden acht Tropfen 0,025%-iges Ethidiumbromid (Ethidiumbromidlösung 0,025% i. d. Tropfflasche) hinzugegeben. Die Gelflüssigkeit wurde auf einen Gelträger gegossen, einen Kamm zur Taschenbildung eingesetzt und gewartet, bis sie ausgehärtet war.

\*Zur TBE-Puffer-Herstellung wurden 108 g TRIS-Base, 55 g Borsäure und 7,44 g EDTA zusammengegeben und mit bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.) auf 500 ml aufgefüllt. Mittels Salzsäure wurde der pH auf 8,0 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt. Das nun erhaltene 10x TBE wurde mit Aqua bidest. auf 1x TBE verdünnt.

Das fertige Gel wurde nun in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt und je Tasche 13  $\mu$ l Probe (Säuleneluat mit 150 ng gDNA, mittels Ampuwa auf 10  $\mu$ l aufgefüllt, zusätzlich 3  $\mu$ l *Loading Dye*) oder 5  $\mu$ l der Referenzlängen (*Ladder High Range* und *Ladder Middle Range*) aufgetragen. Mit 100 V und 40 min wurde der Gellauf gestartet. Da Ethidiumbromid in Nukleinsäuren interkaliert und dadurch seine Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50-100 zunimmt, konnte die im Spannungsfeld gewanderte DNA unter UV-Licht (ultraviolett) betrachtet werden (**Abbildung 9**).



**Abbildung 9: DNA-Banden im Agarose-Gel unter UV-Licht**

Die Abb. zeigt im oberen Abschnitt die größtenteils entleerten Gel-Taschen. Darin bzw. darunter erkennt man die unter Spannung gewanderten hellen, fluoreszierenden DNA-Banden, wobei zwei verschiedene Referenzlängen verwendet wurden: Links *Ladder Middle Range*, rechts *Ladder High Range*. Zwischen diesen sind gDNA-Proben dreier Patienten zu erkennen. Je Patient stellt sich eine breite gDNA-Bande dar, deren DNA-Fragmente wohl  $\geq 10000$  bp lang sind, was für eine hohe Integrität bzw. eine niedrige DNA-Degradierung der Proben unserer Patienten spricht.

### 2.3.5 Genotypisierung mittels *Real Time PCR*

#### 2.3.5.1 Prinzip einer PCR

Die grundlegende Intention, die hinter einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) steht, ist die Vervielfältigung von DNA. Kary Banks Mullis stellte diese neue Methode 1986 der Öffentlichkeit vor (Mullis et al. 1986) und erhielt 1993 für seine Erfindung den Nobelpreis in Chemie.

In der einfachsten Versuchsanordnung werden benötigt: Die zu amplifizierende DNA-Sequenz (*template*), eine DNA-Polymerase, die an der *template* DNA einen neuen, komplementären DNA-Strang erstellt, zwei Primer, die das Amplifikat flankieren und den Startpunkt der DNA-Polymerase am *template* festlegen und schließlich die neuen Bausteine für den komplementären DNA-Strang, vier verschiedene Desoxyribonucleosidtriphosphate mit den Basen Adenin, Thymin, Guanin, und Cytosin. Außerdem müssen Pufferlösungen, die eine optimale chemische Reaktionsumgebung schaffen, und  $Mg^{2+}$ , das essentiell für die Polymerasenfunktion ist, hinzugefügt werden. Es werden drei Phasen unterschieden, die einen Zyklus bilden, der während einer PCR mit 40-50 Wiederholungen durchlaufen wird:

### 1. Denaturierung:

Die Einzelstränge der dsDNA (doppelsträngige DNA) werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Diese Verbindungen müssen gelöst werden, damit Primer und Polymerasen an der DNA ansetzen können. Dazu wird der DNA genügend Energie in Form von Wärme zugefügt, sie wird für 15 s auf 95 °C erhitzt. Oft geht der ersten Denaturierungsphase ein Initialschritt (*holding stage*) voraus (95 °C bei 10 min) in dem die DNA-Polymerase aktiviert werden muss (sog. *hot start enzyme*) und sichergestellt wird, dass nur Einzelstränge vorliegen.

### 2. Primerhybridisierung:

Die Temperatur wird nun so gesenkt (~60 °C), dass sich die Primer an die Zielsequenzen der DNA-*templates* anlagern können. Diese optimale Temperatur ist abhängig von der Primersequenz und -länge und liegt etwa 3 °C unter dessen Schmelztemperatur. Wird eine zu hohe Temperatur gewählt, sprich das System zu viel thermische Energie innehat und damit deren Moleküle eine zu hohe kinetische Energie, wird die Anlagerung der Primer ineffizient, bei zu niedriger Temperatur lagern sich die Primer auch an nicht vollständig komplementäre Sequenzen des *templates* an und verringern so die Spezifität der Reaktion. Der von uns verwendete *Genotyping Master Mix* enthält eine bei RT inaktive DNA-Polymerase (*hot start enzyme*), nämlich die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Der Vorteil in solchen Taq-Polymerasen (entdeckt in thermophilen *Thermus Aquaticus* Bakterien) liegt darin, dass sie thermostabil sind und so nicht nach jeder Denaturierung erneut hinzugefügt werden müssen.

### 3. Elongation:

Die DNA-Polymerasen katalysieren nun am 3`-Ende der Primer, welche weiterhin an den DNA *templates* gebunden sind, die Synthese der DNA (5`→3`-Synthese), komplementär zum *template*. Dies geschieht ebenso bei 60 °C.

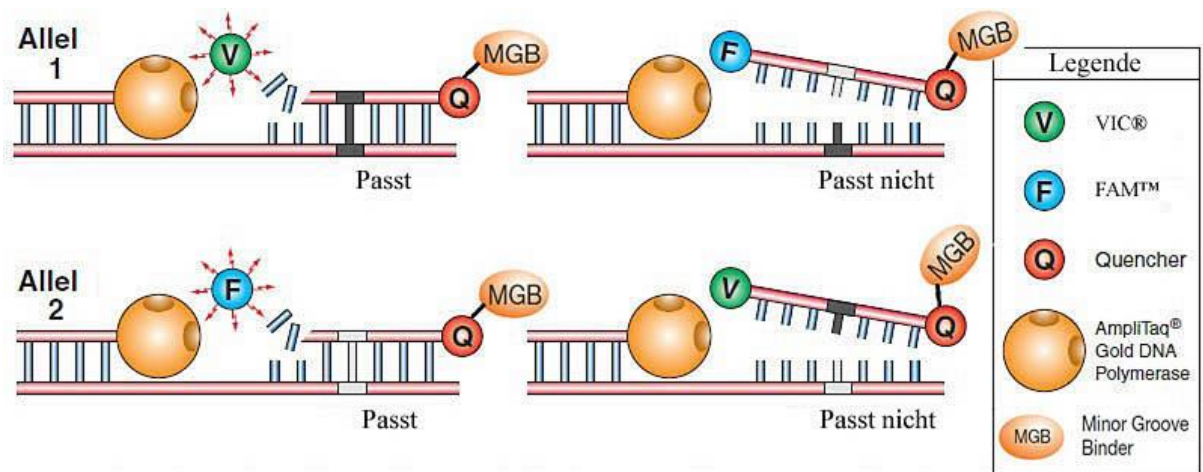
Da nach diesen 3 Phasen Mutter- und Tochterstränge vorliegen, verdoppelt sich unter optimalen Bedingungen in der exponentiellen Phase der Reaktion somit die Menge der DNA-Produkte zum Ende jedes Zyklus:

$$N = N_0 * (1+E)^n$$

N= Menge der amplifizierten DNA, N<sub>0</sub>= Menge der anfänglichen DNA, n= Anzahl der Zyklen, E=Effizienz der Reaktion (optimal E=1)

#### 2.3.5.2 Allelische Diskriminierung

Auf dem Prinzip der PCR wurde nun eine Methode entwickelt, die neben der Vervielfältigung von u.a. DNA auch eine gleichzeitige Quantifizierung der gebildeten DNA ermöglicht: Die *Real Time* PCR. Den genetischen Proben werden hierbei komplexe fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonden hinzugefügt. Das Fluoreszenz-Signal entsteht bei Verdau der an das *template* gebundenen Sonde durch die DNA-Polymerase (5`→3`-Exonuklease-Aktivität) proportional zur Strang-Synthese. Um eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Allelen (Allelische Diskriminierung) und damit eine Anlagerung an spezifische Nukleotid-Sequenzen zu erreichen, werden sog. FRET-Sonden (Förster-Resonanzenergietransfer), wie z.B. die auch von uns verwendete TaqMan™-Sonde, verwendet. Lee L G et al. beschrieben 1993 erstmalig die Benutzung jener Sonden, die sich zum einen die 5`→3`-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase (Holland et al. 1991) und zum anderen den FRET (Förster 1948) zunutze machen. TaqMan™-Sonden bestehen aus 20-30 Nukleotiden, an ihrem 5`-Terminus besitzen sie ein Fluorophor (*reporter*), am 3`-Terminus einen *quencher* (*engl. to quench*: abfangen; unterdrücken). Soll nun, wie in unserem Versuchsaufbau, die DNA-Probe eines Patienten hinsichtlich des Genotyps eines bestimmten SNP untersucht werden, setzt man zwei verschiedene TaqMan™-Sonden ein, die jeweils für ein Allel des SNP spezifisch sind.



Ein reichlicher Anstieg in...	Deutet auf...
Lediglich VIC® Fluoreszenz	Homozygotie für Allel 1
Lediglich FAM™ Fluoreszenz	Homozygotie für Allel 2
Beide Fluoreszenzsignale	Heterozygotie für Allel 1 / Allel 2

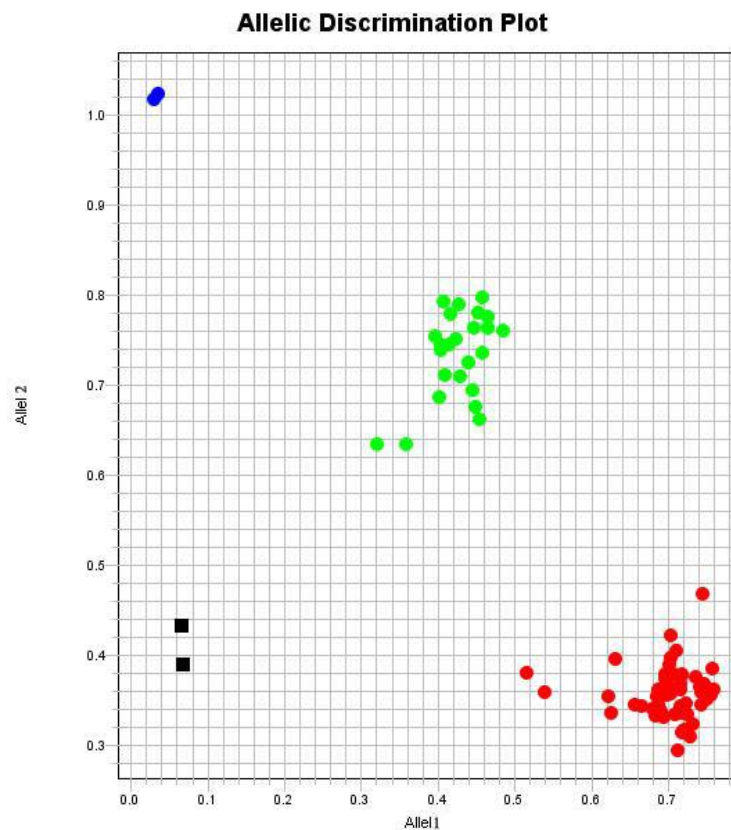
**Abbildung 10: Allelische Diskriminierung**

Schematisch dargestellt ist die Bindung der Sonde an ihre komplementäre DNA-Sequenz und die konsekutive Freisetzung des *reporters* (VIC/FAM) durch die Taq-Polymerase (Abb. modifiziert nach Applied Biosystems [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/general-documents/cms\\_042315.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general-documents/cms_042315.pdf), S. 3. [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_050341.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050341.pdf), S. 8).

Bindet nun eine Sonde an der zu ihr komplementären *template*-Sequenz, wird der *reporter* zunächst durch die räumliche Nähe des *quencher*s in seiner fluoreszierenden Aktivität unterdrückt, d.h. der potentiell fluoreszierende *reporter* (Donor) wird zwar durch Photonen zum Leuchten angeregt, jedoch geht diese Energie unmittelbar, strahlungsfrei über den Förstermechanismus, auf den *quencher* (Akzeptor) über, der nun Licht in einer anderen Frequenz als der des *reporters*, d.h. Licht in einer für seine molekulare Struktur üblichen Frequenz emittiert. Erfolgt nun aber die Elongation durch eine Taq-Polymerase, so wird diese durch ihre 5'→3'-Exonuklease-Aktivität die TaqMan™-Sonde hydrolysieren, bevor sie die entstandene Lücke wieder füllt. Bei diesem Vorgang wird der *reporter* vom *quencher* getrennt, der räumliche Abstand nimmt zu, dadurch nimmt der Förstermechanismus ab und der *reporter* emittiert Strahlung in Form von Licht, das gemessen wird (**Abbildung 10** und **Abbildung 11**). Auch wenn *reporter* und *quencher* bei Anregung in unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren, wird trotzdem die Genauigkeit der Messung der Fluoreszenz des *reporters* durch die Fluoreszenz des *quencher*s beeinträchtigt, sodass NFQ (*non fluorescent quencher*)

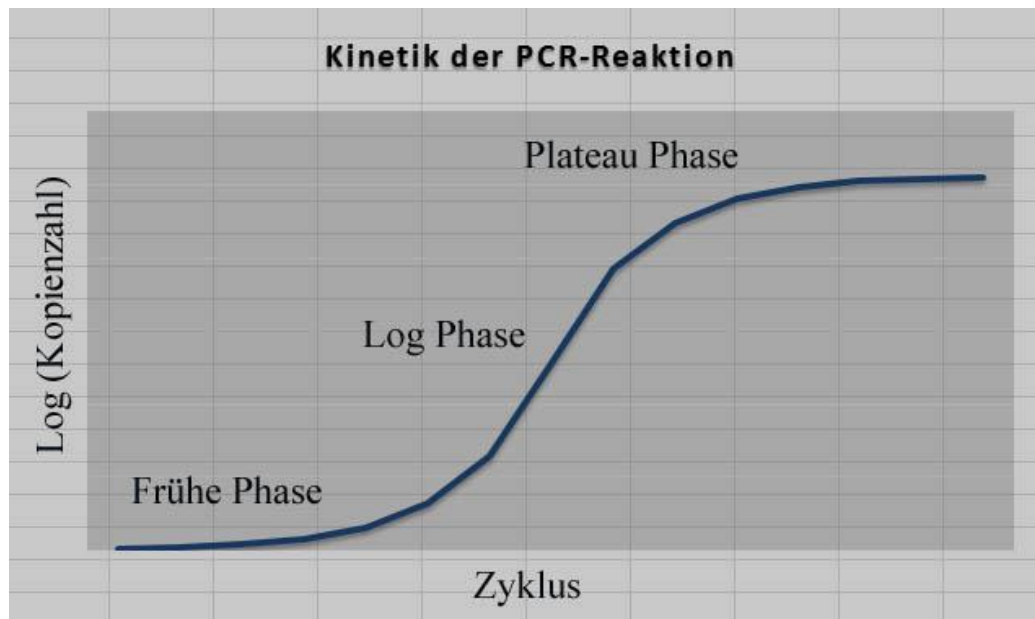
entwickelt wurden, die die durch den Förster-Mechanismus absorbierte Energie nicht in Form von Licht sondern in Form von Wärme abgeben (Huang S et al. 2007; Peng et al. 2009; Bustin 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden solche NFQ-TaqMan™-Sonden verwendet, welche außerdem über ein MGB-Molekül (*minor groove binder*, **Abbildung 10**) verfügen, das die Schmelztemperatur, bei gleichbleibender Sondenlänge, erhöht (Afonina et al. 1997). Das MGB-Molekül erlaubt sogar kürzere Sonden und erhöht so  $\Delta$  Schmelztemperatur von Sonden, die an vorhergesehener Stelle binden zu Sonden, die auch an nicht zu 100% komplementären Sequenzen binden.

Da in der sog. Log-Phase der PCR die DNA-Menge exponentiell zunimmt, steigt auch die gemessene Fluoreszenz exponentiell bis zu der Plateauphase an (Zur Kinetik, siehe **Abbildung 12**). Um nun zwei verschiedene Allele voneinander unterscheiden zu können, werden



**Abbildung 11: Resultat einer allelischen Diskriminierung**

Beispielhaft dargestellt ist eine Grafik, die die Bestimmung eines Genotyps bestehend aus Allel 1 und Allel 2 mehrerer Individuen mittels *Real Time Detection* PCR zeigt. Auf der x-Achse aufgetragen wurde die Stärke des Fluoreszenzsignals für Allel 1, auf der y-Achse jenes für Allel 2. Die rot markierten Proben stellen dementsprechend Individuen dar, die homozygot für Allel 1 sind, die blauen repräsentieren Individuen, die homozygot für Allel 2 sind. Folglich wurde bei der grünen Menge sowohl für Allel 1 als auch für Allel 2 ein ausreichendes Fluoreszenzsignal gemessen, sodass jene Individuen als heterozygot gelten. Die 2 schwarzen Quadrate stellen Negativkontrollen ohne Zusatz von gDNA dar (*non-template control*, NTC).



**Abbildung 12: Kinetik der PCR-Reaktion**

In der frühen Phase findet noch keine optimale Amplifikation statt, diese wird erst während der Log Phase erreicht, die PCR-Amplifikate werden exponentiell vervielfältigt. Limitierende Reagenzien und die Bildung von inhibierenden Reaktionsprodukten sind die Ursache für die Plateau-Phase.

Sonden mit unterschiedlichen *reporter* eingesetzt, die nach Fluoreszenzanregung (bei 488nm) Licht in unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (VIC®=Grün, 6FAM™= Blau). Bevor die Initialisierungsphase und das nachfolgende Durchlaufen der PCR-Zyklen (*amplification run*) beginnt, wird in einem *pre-read run* die Hintergrundfluoreszenz der Primer und Sonden bestimmt um diese in einem *post-read run* von den während der DNA-Amplifikation gemessene Fluoreszenz zu subtrahieren um genauere PCR-Ergebnisse zu erhalten. Der in dieser Arbeit untersuchte SNP rs11568821 des *PDCDI*-Gens wurde mittels eines kommerziellen TaqMan® SNP *Genotyping Assays* (ID: C\_57931290\_10) genotypisiert. Da der Hersteller die Primer- und Sonden-Sequenzen nicht veröffentlicht, sind im Folgenden nur die den SNP flankierenden Sequenzen und die Zugehörigkeit der der verschiedenfarbigen *reporter*-Fluoreszenzsonden zu dem jeweiligen Allel dargestellt (**Tabelle 5**).

**Tabelle 5: Die zwei Reporter der TaqMan™-Sonde und ihre zu bindenden Allele<sup>1</sup>**

<i>Reporter</i>	Allel des rs11568821 Polymorphismus
VIC®	5` ACATGGGCCGGGCACCCCGGAGAC <b>C</b> GCAGGTGGGCTGGGGCCCCAGATCA 3`
6FAM™	5` ACATGGGCCGGGCACCCCGGAGAC <b>T</b> GCAGGTGGGCTGGGGCCCCAGATCA 3`

<sup>1</sup>Sequenz und Sonden-Zuordnung wurde der beigelegten CD-ROM des Assay C\_57931290\_10 der Fa. Applied Biosystems entnommen)



Wir führten bei jeder Patientenprobe eine Doppelbestimmung durch, zusätzlich wurden pro 96-Well-Platte zwei Negativkontrollen (*No Template Control*, NTC) bestimmt. Folgender PCR-Ansatz wurde jeweils in einen Well pipettiert, wobei gDNA verwendet wurde, die entweder aus Heparinat oder aus PBMC extrahiert worden ist:

PCR Ansatz (10  $\mu$ l):

5 $\mu$ l	2x <i>TaqMan™ Genotyping Master Mix</i>
0,25 $\mu$ l	40x <i>SNP Genotyping Assay by Design</i>
2,75 $\mu$ l	Ampuwa
2 $\mu$ l	gDNA (Konzentration 10 ng/5 $\mu$ l, entspricht 4 ng gDNA im Ansatz)

Damit keine Luftbläschen am Boden eines Wells die Messungen beeinflussen können, wurde die Well-Platte einige Sekunden bei 760 x g (2000 rpm, ROTIXA/A) zentrifugiert. Durchgeführt wurde die PCR mit einem StepOnePlus™ Thermozykler nach folgendem Thermoprofil:

95 °C 10 min	Holding Stage
95 °C 15 s	Cycling Stage (45 Zyklen)
60 °C 1 min	
60 °C 30 s	Post-PCR Read

Die in unserem Kollektiv bestimmten Allelfrequenzen wurden auf ihre Plausibilität überprüft und entsprechen einer erwarteten Verteilung in einem kaukasischen Kollektiv, dazu siehe auch **3.1**.

### **2.3.6 Kollaborative Erhebung klinischer und experimenteller Daten**

Die in einem kooperativen Projekt (GenoSep) der Klinik für Gastroenterologie und der Klinik für Anaesthesiologie erhobenen klinischen und experimentellen Daten sind auf den Servern an der Universitätsmedizin Göttingen hinterlegt. Die Daten, auf denen die vorliegende Dissertation basiert, entstammen dieser Datenbank. Die z.T. täglich erhobenen klinischen Daten wurden primär in sog. CRFs (*clinical report form*) erfasst und dann in die Datenbank übertragen. Die experimentell erhobenen Daten wurden darüber hinaus auch in eine Excel Datei eingefügt. Beteiligt an der Erstellung der Datenbank über mehrere Jahre seit März 2012 waren etwa zu gleichen Anteilen die Promovenden Bronja Hillebrecht, Benjamin Liese, Luisa von Gruben, Simon Wilmers, Yvonne Klee, Chang-Ho Hong, Maximilian



Steinau, Evelyn Mulwande und ich. Alle Beteiligten greifen im Rahmen ihrer Dissertationen auf diese Datenbank zurück. Die eindeutig voneinander abgegrenzten Fragestellungen sind rein klinisch (unter Verwendung der klinischen Daten) oder wie in der vorliegenden Schrift klinisch-experimentell (zusätzliche Nutzung der experimentell erhobenen Daten). Das Projekt umfasste die Patientenrekrutierung, -nachverfolgung und das Gewinnen und Asservieren von Vollblut- und Serumproben und ihre Analyse durch die Promovenden. Persönlich war ich für die gänzliche vorlesungsfreie Zeit eines klinischen Semesters und für ein gesamtes, folgendes Freisemester neun Monate, von Juli 2013 bis März 2014 (Patient 254-391), mit diesen Arbeiten betraut. Die täglichen Aufgaben, die im Zeitraum von 09:00 Uhr bis 17:00 Uhr, meist in Teamarbeit zu zweit, ausgeführt wurden, stellten sich wie folgt dar: Zuerst wurden die elektronischen Patientenkurven der auf den oben genannten Stationen befindlichen Patienten nach oben genannten möglichen Einschluss- und Ausschlusskriterien hin überprüft. Im Rahmen dessen wurde außerdem eine *study nurse* konsultiert. Nach Rücksprache mit den Stationsärzten wurden unter Anleitung der Studienärzte, nach Einwilligung des Patienten bzw. dessen gesetzlichen Betreuers, die Blutproben entnommen. Diese wurden danach von einem Promovenden in Laboren der Klinik für Gastroenterologie weiter verarbeitet und analysiert (im Wesentlichen DNA- und RNA-Extraktionen, Genotypisierungen und quantitative Genexpressionsanalysen), parallel dazu übertrug der zweite Promovend die klinischen Parameter der Patienten in die genannten CRFs und in die Datenbank. Alle Promovenden übernahmen täglich abwechselnd diese Aufgaben. Weiterhin wurden Kontrollen der Eingaben in CRFs und Datenbank angefertigt und nach *Follow-Up*-Tag 90 Überlebenskontrollen der Patienten erstellt.

### 2.3.7 Auswertung und Statistik

Dass die in dieser Dissertation befindlichen statistischen Auswertungen *lege artis* durchgeführt worden sind, wurde durch Konsultation der Kurzberatung bei der „Zentrale Serviceeinheit Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik“ (verankert im „Institut für Medizinische Statistik“ der Universitätsmedizin Göttingen) sichergestellt. Mit freundlicher Unterstützung fanden darüber hinaus Beratungen per E-Mail durch die wissenschaftliche Mitarbeiterin Xenia Schulz mit Unterstützung des Leiters der Serviceeinheit PD Dr. Klaus Jung statt.

Die Ergebnisse der PCR wurden mittels der StepOne™ Software (Version 2.1 für Windows Betriebssysteme; Applied Biosystems, Foster City, CA USA) ausgewertet. Zur statistischen Analyse, und auch zur Darstellung der Boxplot-Grafiken, wurde sich der STATISTICA 10

Software (StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA für Windows (Software-System für Datenanalyse), Version 10.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).) und der Online-Software des Institutes für Humangenetik am Helmholtz Zentrum München (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) bedient. Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p \leq 0,05$  wurden als „signifikant“ bewertet,  $p \leq 0,01$  als „sehr signifikant“ und  $p \leq 0,001$  als „hoch signifikant“.

Ob sich die Häufigkeitsverteilung der Genotypen unseres Kollektivs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) befindet, wurde mittels des Exakt-Tests der oben genannten Software des Helmholtz Zentrum München überprüft und bei  $p \geq 0,05$  als im Gleichgewicht befindlich angesehen. Bei der Untersuchung der Genotyp-Gruppen sowohl auf Unterschiede hinsichtlich epidemiologischer/klinischer Daten bei Sepsis-Beginn und hinsichtlich klinischer Daten während des *Follow-Up*-Tags 1 wurden für die Analysen kontinuierlicher Variablen der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Des exakten Tests nach Fisher wurde sich bedient, wenn es sich dabei um kategorische Variablen handelte. Gleichsam wurde bei der Untersuchung zu Organersatzverfahren während des Krankheitsverlaufs, zu der Verweildauer der Patienten und bei der Betrachtung der SOFA-Scores und *Sub-Scores* an den einzelnen *Follow-Up*-Tagen vorgegangen. Bei den Darlegungen zu den SOFA-Scores/den *Sub-Scores* und zu möglichen Einflussfaktoren auf diese zu verschiedenen Phasen während des Krankheitsverlaufs fanden Varianzanalysen (ANOVA) mit Messwertwiederholung Anwendung, da es sich bei der Gesamtheit der einbezogenen *Scores* um abhängige Werte handelt, die im Krankheitsverlauf zu mehreren Zeitpunkten erhoben wurden.

Für die Mortalitätsanalyse wurde eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt. Mittels dieser können die Anteile der Überlebenden (Überlebensanteile) - und somit indirekt die Mortalität - einer Ausgangspopulation über die Zeit dargestellt werden. Dabei wurden die G-homozygoten Patienten den A-Allel-Trägern gegenübergestellt und per Log-rank-Test miteinander verglichen. Mögliche Einflussfaktoren auf die Mortalität wurden zusätzlich mithilfe einer Cox-Regression untersucht.

### 3 Ergebnisse

Von dem ursprünglich 302 Patienten umfassenden Kollektiv mussten bei einer vor den statistischen Analysen durchgeführten Datenkontrolle zwei Patienten von der Studie ausgeschlossen werden. Dabei erfüllten beide Patienten, die kardial schwer vorbelastet waren, jeweils ein Ausschlusskriterium im Sinne eines NYHA IV-Stadiums.

Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p < 0,05$  werden im Folgenden zur besseren Übersicht fett dargestellt.

Hinter gebildeten Mittelwerten sind die jeweiligen Standardabweichungen (SD) zu finden (Mittelwert  $\pm$  SD).

#### 3.1 Häufigkeitsverteilung der *PDCDI* rs11568821-Genotypen im Kollektiv

300 Patienten wurden am SNP rs11568821 im Intron 4 des *PDCDI*-Gens mit einem, wie in 2.3.5 beschrieben, kommerziell erhältlichen Assay genotypisiert, wobei die SNP *call rate* 100 % betrug. Es wurden zwei Untergruppen für die homozygoten Merkmalsträger (GG, AA) und eine Untergruppe für die heterozygoten Merkmalsträger (GA) gebildet.

Dabei entfielen 236 Patienten (78,7 %) des Gesamtkollektives auf die GG-Untergruppe (**Tabelle 6**). 57 Patienten (19 %) waren heterozygot (GA) und sieben (2,3 %) zeigten eine Homozygotie für das A-Allel. Für die weiteren Analysen wurden die beiden Gruppen der seltenen A-Allel-Träger zu einer Gruppe zusammengefasst (GA/AA) und den homozygoten Trägern des G-Allels (GG) gegenübergestellt.

Nach den oben genannten Häufigkeiten ergab sich für das untersuchte Kollektiv eine MAF von 0,118 (**Tabelle 6**). Diese entsprach in etwa der zu erwartenden Verteilung in einer europäischen Population (MAF = 0,103 siehe auch 1.2.6). Außerdem befand sich die Genotyp-Verteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $p = 0,1577$ ).

**Tabelle 6: Verteilung der *PDCDI* rs11568821-Genotypen innerhalb des Kollektivs**

	<i>PDCDI</i> rs11568821-Genotyp			MAF	HWE*
	GG	GA	AA		
Gesamtkollektiv (n=300)	236 (78,7 %)	57 (19 %)	7 (2,3 %)	0,118	p=0,1577

\*Exakt-Test

### 3.2 Epidemiologische und klinische Parameter bei Sepsis-Beginn

Die Daten, die im Folgenden dargestellt werden, wurden am ersten *Follow-Up*-Tag erhoben. Sie zeigen epidemiologische Details des Patientenkollektivs und repräsentieren den klinischen Zustand der Patienten am ersten Beobachtungstag nach Diagnose der Sepsis. Außerdem wurde untersucht, ob bezüglich dieser Daten Unterschiede im jeweiligen Vergleich zwischen den *PDCDI* rs11568821 G-Allel-Homozygoten (GG) und den Trägern des seltenen A-Allels bestanden.

Bei Betrachtung des Gesamtkollektivs ergab sich ein Durchschnittsalter von  $63 \pm 15$  Jahren, die Anteile der männlichen und weiblichen Patienten lagen bei 64 % bzw. 36 % und es zeigte sich ein durchschnittlicher BMI (*Body Mass Index*) von  $28 \pm 7$  kg/m<sup>2</sup> (**Tabelle 7**). Für all diese Parameter wurden im jeweiligen Vergleich der beiden Genotyp-Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dennoch sei auf den höheren, wenn auch nicht signifikanten ( $p = 0,1055$ ), Anteil von Frauen unter den G-Homozygoten (38 %) im Vergleich zu den A-Allel-Trägern (27 %) hingewiesen (**Tabelle 7**).

Außerdem ließen sich ähnlich große Anteile der beiden Genotyp-Gruppen bei den Vorerkrankungen und der Art der Vorbehandlung erkennen (**Tabelle 7**), wobei die arterielle Hypertonie (jeweils 58 %) die größten Anteile an beobachteten Vorerkrankungen darstellt, gefolgt von Tumoren, COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) und chronisch renalen Dysfunktionen. Einzig die Anteile der Patienten mit chronischen Lebererkrankungen in den beiden Genotyp-Gruppen war derart unterschiedlich hoch (9% GG; 2 % GA/AA), was sich auch in einem niedrigen p-Wert widerspiegelt ( $p = 0,0559$ ).

Sowohl insgesamt auf das Kollektiv als auch auf die beiden Genotyp-Gruppen betrachtet, wurde der größte Anteil unserer Patienten in der Vorbehandlung vor Beginn der Sepsis operativ versorgt (Gesamt: Notoperation 46 %; elektive OP 30 %), etwa ein Viertel erhielt ein konservatives Behandlungsschema (**Tabelle 7**).

An *Follow-Up*-Tag 1, also am ersten Tag, an dem das septische Krankheitsgeschehen klinisch auffällig wurde, befanden sich bereits 59 % im Zustand eines septischen Schocks (**Tabelle 8**). Hinsichtlich der beiden Genotyp-Gruppen fand sich jeweils ein ähnlicher Anteil. Um den Grad des kritischen Zustandes zu definieren, wurden für diesen Tag die durchschnittlichen SOFA- (Gesamt:  $9,2 \pm 4,1$ ) und APACHE-II-Scores (Gesamt  $21,8 \pm 7,3$ ) ermittelt, wobei für beide Scores die GG-Gruppe einen um 0,4 Punkte höheren Wert im Vergleich zur GA/AA-Gruppe aufwies (**Tabelle 8**).

**Tabelle 7: Epidemiologische und klinische Patientendaten unter Berücksichtigung des jeweiligen *PDCDI* rs11568821-Genotyps**

	<b>Gesamt (n=300)</b>	<b>GG (n=236)</b>	<b>GA/AA (n=64)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter [Jahre]</b>	63 ± 15	64 ± 15	61 ± 16	0,2271
<b>Geschlecht (m/w) [n]</b>	193/107 (36 % ♀)	146/90 (38 % ♀)	47/17 (27 % ♀)	0,1055
<b>Body mass index [kg/m<sup>2</sup>]</b>	28 ± 7	28 ± 7	29 ± 8	0,6698
<b>Vorerkrankungen [n]</b>				
Art. Hypertonus	174 (58 %)	137 (58 %)	37 (58 %)	1,0000
Tumoren	57 (19 %)	46 (20 %)	11 (17 %)	0,8575
COPD	55 (18 %)	44 (19 %)	11 (17 %)	0,8574
Chronisch renale Dysfunktionen	41 (14 %)	31 (13 %)	10 (14 %)	0,6815
Diabetes mellitus (NIDDM) <sup>1</sup>	27 (9 %)	23 (10 %)	4 (6 %)	0,4690
Diabetes mellitus (IDDM) <sup>2</sup>	27 (9 %)	23 (10 %)	4 (6 %)	0,4690
Myokardinfarkt	24 (8 %)	19 (8 %)	5 (8 %)	1,0000
Chronische Lebererkrankungen	22 (7 %)	21 (9 %)	1 (2 %)	0,0559
Zerebrale Insulte	22 (7 %)	20 (9 %)	2 (3 %)	0,1827
<b>Art der Vorbehandlung [n]</b>				0,6002
Elektive OP	90 (30 %)	73 (31 %)	17 (27 %)	
Notoperation	138 (46 %)	105 (44 %)	33 (52 %)	
Konservativ	72 (24 %)	58 (25 %)	14 (22 %)	

<sup>1</sup>Nicht insulinpflichtiger Diabetes, <sup>2</sup>Insulinpflichtiger Diabetes

Für diesen Unterschied war keine statistische Signifikanz zu erkennen. Dies galt auch für die Betrachtung der primären Infektionsfokuse, die insgesamt in 80 % der Fälle pulmonale oder abdominelle Fokuse darstellten, wobei für zwei Patienten die eindeutige Feststellung des Primärfokus nicht möglich war (**Tabelle 8**). 84 % der Patienten erhielten unterstützend eine mechanische Ventilation, 59 % wurden mit einer Vasopressor-Therapie versorgt und 10 % beanspruchten ein Nierenersatzverfahren (**Tabelle 8**). Die Anteile an Organersatzver-

fahren beanspruchenden Patienten innerhalb der Genotyp-Gruppen wichen kaum vom Gesamtkollektiv ab, sodass signifikante Unterschiede zwischen diesen Gruppen nicht zu erkennen waren (**Tabelle 8**).

**Tabelle 8: Klinische Patientendaten an *Follow-Up*-Tag 1 unter Berücksichtigung des jeweiligen *PDCDI* rs11568821-Genotyps**

	<b>Gesamt (n=300)</b>	<b>GG (n=236)</b>	<b>GA/AA (n=64)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Schwere der Sepsis [n]</b>				0,7764
Sepsis/Schwere Sepsis	122 (41 %)	95 (40 %)	27 (42 %)	
Septischer Schock	178 (59 %)	141 (60 %)	37 (58 %)	
<b>SOFA-Score</b>	9,2 ± 4,1	9,3 ± 4,1	8,9 ± 4,2	0,5713
<b>APACHE-II-Score</b>	21,8 ± 7,3	21,9 ± 7,5	21,5 ± 6,5	0,8270
<b>Primärfokus [n]</b>				0,2552
Lunge	155 (52 %)	124 (53 %)	31 (48 %)	
Abdomen	84 (28 %)	62 (27 %)	22 (34 %)	
Knochen/Bindegewebe	19 (6 %)	17 (7 %)	2 (3 %)	
Chirurgische Wunde	5 (2 %)	5 (2 %)	0 (0 %)	
Urogenital	5 (2 %)	5 (2 %)	0 (0 %)	
Primäre Bakteriämie	16 (5 %)	10 (4 %)	6 (9 %)	
Andere	14 (5 %)	11 (5 %)	3 (5 %)	
Kein eindeutiger Fokus	2 (1%)	2 (1 %)	0 (0 %)	
<b>Organersatzverfahren [n]</b>				
Mechanische Ventilation	252 (84 %)	199 (84 %)	53 (83 %)	0,8476
Vasopressor-Therapie	178 (59 %)	141 (60 %)	37 (58 %)	0,7764
Nierenersatzverfahren	31 (10 %)	23 (10 %)	8 (13 %)	0,4944

### 3.3 Klinische Daten im Krankheitsverlauf

Die folgenden analysierten Daten wurden, sofern nicht anders deklariert, an den *Follow-Up*-Tagen 2, 3, 5, 7, 14, 21 und 28, repräsentativ für den Krankheitsverlauf, erhoben.

#### 3.3.1 Organersatzverfahren und Verweildauer

Um den Stellenwert der Organfunktion unterstützenden Verfahren innerhalb der beiden Genotyp-Gruppen im Krankheitsverlauf bewerten zu können, auch im Vergleich mit der an *Follow-Up*-Tag 1 eingesetzten Organverfahren (**Tabelle 8**), wurden die innerhalb des Krankheitsverlaufs erhobenen Anteile der *Follow-Up*-Tage mit durchgeführten Organersatzverfahren an der Gesamtanzahl der der *Follow-Up*-Tage untersucht (**Tabelle 9**). Dabei ergab sich für den Krankheitsverlauf ein im Vergleich zu *Follow-Up*-Tag 1 leicht erhöhter Anteil an Nierenersatzverfahren (ca. 14 %), der Einsatz von mechanischer Ventilation verringerte sich um etwa 9 % und die Vasopressor-Therapie nahm um etwa 17 % ab.

Bei Analyse der Anteile an Tagen mit mechanischer Ventilation und Vasopressor-Therapie innerhalb der Genotyp-Gruppen ließen sich signifikante Unterschiede ausmachen. So fand für die G-homozygoten Patienten an relativ mehr Tagen eine Vasopressor-Therapie (GG 43 % und GA/AA 37 %; **p = 0,0204**) und mechanische Ventilation (GG 77 % und GA/AA 71 %; **p = 0,0350**) Anwendung (**Tabelle 9**).

**Tabelle 9: Organersatzverfahren im Krankheitsverlauf und Verweildauer**

	<b>Gesamt</b> <b>(n=300)</b>	<b>GG</b> <b>(n=236)</b>	<b>GA/AA</b> <b>(n=64)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Organersatzverfahren*</b>				
[%]				
Mechanische Ventilation	75	77	71	<b>0,0350</b>
Vasopressor-Therapie	42	43	37	<b>0,0204</b>
Nierenersatzverfahren	14	14	12	0,4935
<b>Verweildauer ICU [Tage]</b>	21 ± 16	21 ± 17	21 ± 14	0,2951
<b>Verweildauer ICU ab Sepsis-Beginn [Tage]</b>	18 ± 16	18 ± 16	18 ± 14	0,5022

\*Prozentangaben basieren auf den *Follow-Up*-Tagen

Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen den Anteilen an Tagen mit Nierenerersatzverfahren und den Genotyp-Gruppen. Die Verweildauer (*Length of Stay*; LOS) der Patienten auf ICU betrug, unabhängig vom Genotyp, 21 Tage (**Tabelle 9**). Da manche Patienten erst im Laufe ihres Aufenthaltes ein septisches Krankheitsgeschehen entwickelten, wurde auch die Verweildauer auf ICU ab Sepsis-Beginn untersucht. Diese betrug 18 Tage, auch hier war kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gesamtpopulation bzw. den Genotyp-Gruppen erkennbar (**Tabelle 9**).

### 3.3.2 SOFA-Score und SOFA-Sub-Scores

Neben der zu Krankheitsbeginn untersuchten Morbidität innerhalb der Genotyp-Gruppen hat uns die Morbidität innerhalb jener Gruppen während des Krankheitsverlaufs interessiert. Dazu wurde wiederum, getrennt nach den Genotyp-Gruppen, der SOFA-Score betrachtet um mögliche Assoziationen mit *PDCDI* rs11568821 zu erkennen. Zusätzlich wurden bestimmte Organsysteme, die durch die SOFA-Sub-Scores repräsentiert sind, auf deren Beteiligung an der Gesamtmorbidität und ebenfalls auf Assoziationen mit *PDCDI* rs11568821 hin untersucht. Wir analysierten die Scores zuerst für den gesamten Zeitraum, dann für bestimmte Abschnitte innerhalb des dokumentierten Zeitraums und schließlich für jeden einzelnen *Follow-Up*-Tag. Abschließend wurde der Frage nachgegangen, inwieweit mögliche begleitende Einflüsse anderer Faktoren diese Ergebnisse beeinflussten.

#### 3.3.2.1 Assoziationen von SOFA- und SOFA-Sub-Scores mit *PDCDI* rs11568821

Bei Betrachtung des Krankheitsverlaufs ließ sich mittels Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0019$ ; **Tabelle 10**) zwischen dem durchschnittlichen SOFA-Score der G-Homozygoten ( $7,9 \pm 4,6$ ) und dem der A-Allel-Träger ( $7,0 \pm 4,2$ ) erkennen. Bei der Analyse der Sub-Scores war der Ursprung dieses Unterschiedes auszumachen (**Tabelle 10**): Für die G-Homozygoten ergaben sich durchschnittlich höhere ZNS Sub-Scores (GG:  $2,2 \pm 1,5$ ; GA/AA:  $1,8 \pm 1,4$ ;  $p < 0,0001$ ) und durchschnittlich höhere kardiovaskuläre Sub-Scores (GG:  $1,8 \pm 1,5$ ; GA/AA:  $1,5 \pm 1,5$ ;  $p = 0,0041$ ). Außerdem bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den homozygoten Trägern des G-Allels und einem durchschnittlich höheren Lungen Sub-Score (GG:  $2,2 \pm 1,1$ ; GA/AA:  $2,0 \pm 1,0$ ;  $p = 0,0111$ ). Für die Sub-Scores, die für die Organsysteme Niere, Blut und Leber repräsentativ sind, ließen sich keine Assoziationen erkennen. Per Mann-Whitney-U-Test konnte ein signifikanter Einfluss der Zeit, sprich die Anzahl der erhobenen *Follow-Up*-Tage eines einzelnen Patienten,



nicht sicher ausgeschlossen werden. Deshalb wurden zusätzlich Varianzanalysen mit Messwiederholungen durchgeführt, die diese Umstände berücksichtigen (**Tabelle 11**).

**Tabelle 10: Durchschnittlicher SOFA-Score und Sub-Scores innerhalb des Krankheitsverlaufs**

	<b>Gesamt</b> (n=300)	<b>GG</b> (n=236)	<b>GA/AA</b> (n=64)	<b>p-Wert<sup>1</sup></b>
<b>SOFA-Score</b>	7,7 ± 4,5	7,9 ± 4,6	7,0 ± 4,2	<b>0,0019</b>
<b>SOFA-Sub-Scores</b>				
Lunge	2,1 ± 1,1	2,2 ± 1,1	2,0 ± 1,0	<b>0,0111</b>
Herz/Kreislauf	1,7 ± 1,5	1,8 ± 1,5	1,5 ± 1,5	<b>0,0041</b>
ZNS	2,1 ± 1,5	2,2 ± 1,5	1,8 ± 1,4	<b>&lt;0,0001</b>
Niere	1,0 ± 1,4	1,0 ± 1,4	1,0 ± 1,4	0,9649
Blut	0,4 ± 0,8	0,4 ± 0,9	0,4 ± 0,8	0,6983
Leber	0,4 ± 0,8	0,4 ± 0,9	0,4 ± 0,8	0,8216

<sup>1</sup>Mann-Whitney-U-Test

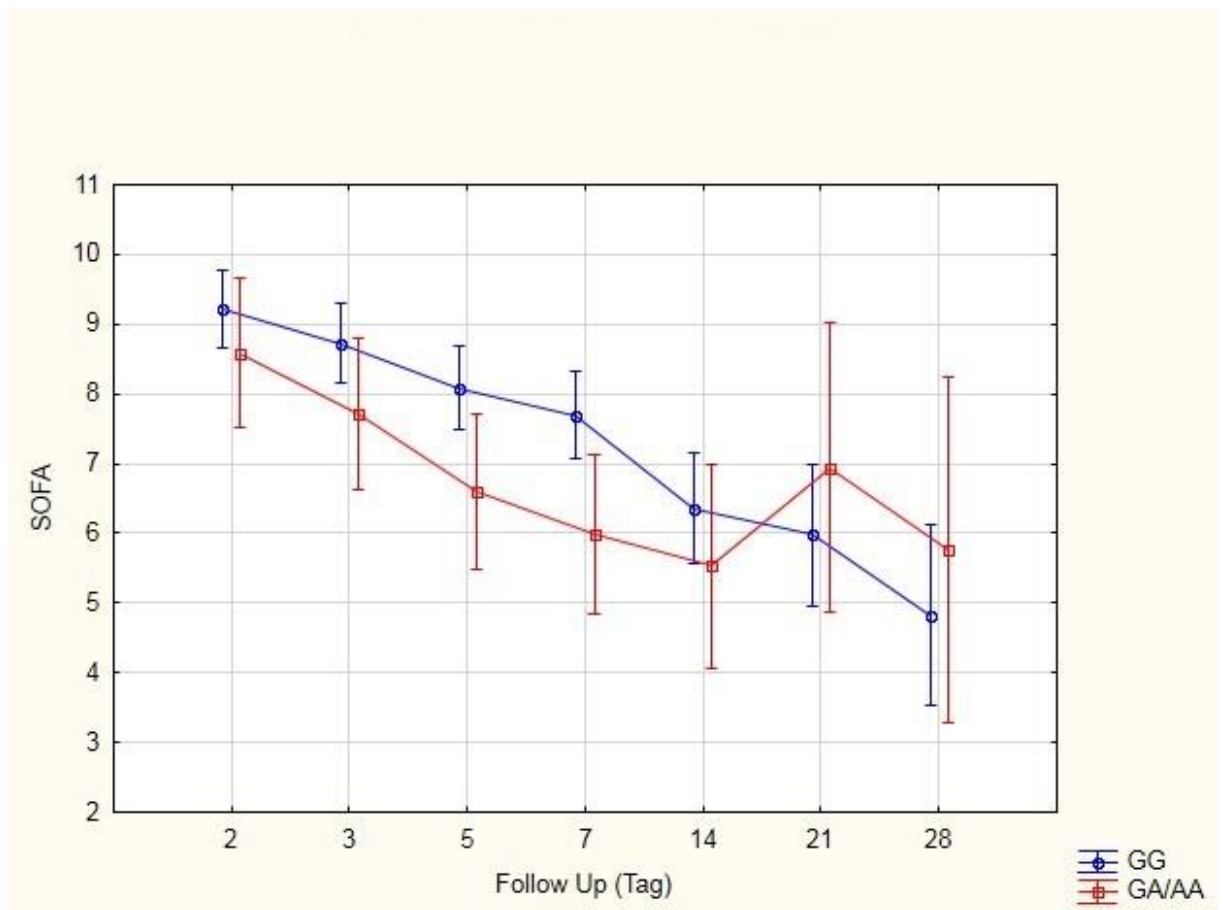
**Tabelle 11: Zusammenhang (in Form des p-Wertes<sup>1</sup>) der Genotyp-Gruppe mit dem SOFA-Score und dessen Sub-Scores in verschiedenen Phasen des Krankheitsverlaufs**

<b>Follow-Up-Tage</b>	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>
<b>SOFA-Score</b>	<b>0,0077</b>	0,0613	0,6664	0,8936
<b>SOFA-Sub-Scores</b>				
Lunge	<b>0,0109</b>	0,0676	0,9514	0,6589
Herz/Kreislauf	<b>0,0156</b>	0,0964	0,8758	0,8083
ZNS	<b>0,0027</b>	0,0743	0,3155	0,8709
Niere	0,5582	0,8202	0,7074	0,7883
Blut	0,5865	0,6162	0,8724	0,9287
Leber	0,7182	0,2112	0,3408	0,6221

<sup>1</sup>ANOVA mit Messwiederholungen

Dabei zeigte sich, dass, auf den gesamten Krankheitsverlauf betrachtet, der Genotyp keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe des SOFA-Scores und dessen Sub-Scores besaß (**Tabelle 11: Follow-Up-Tag 2-28**). Anderes ergab sich jedoch für das Zeitfenster von *Follow-Up-*

Tag 2 bis 7 (**Tabelle 11: Follow-Up-Tag 2-7**). Für diese Tage konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Genotyp-Gruppe und dem SOFA-Score ( $p = 0,0077$ ), dem Lungen *Sub-Score* ( $p = 0,0109$ ), dem kardiovaskulären *Sub-Score* ( $p = 0,0156$ ) und dem ZNS *Sub-Score* ( $p = 0,0027$ ) feststellen. Für die anderen untersuchten Zeiträume ergaben sich keine signifikanten Werte (**Tabelle 11**). Dazu muss vermerkt werden, dass sich das Kollektiv der GA/AA-Träger ab *Follow-Up-Tag* 14 bis 28 rapide verkleinert (**Tabelle 13, rechte Spalte**) und sich somit auch die Konfidenzintervalle der SOFA-Scores für diese Tage vergrößern (**Abbildung 14**), was die Interpretation der Analysen für diese Tage erschwerte. Zusätzlich wurden die SOFA-Scores (**Abbildung 13, Tabelle 12**) und die sechs *Sub-Scores* (**Abbildung 14, Tabelle 13**) getrennt für jeden der dokumentierten *Follow-Up*-Tage im zeitlichen Krankheitsverlauf betrachtet.



**Abbildung 13: Der SOFA-Score als Funktion von *Follow-Up*-Tag und Genotyp-Gruppe**

Visualisiert wurde der zeitliche Verlauf der SOFA-Scores der G-Homozygoten und der A-Allel-Träger. Kennzeichnet sind Mittelwerte und die 95% Konfidenzintervalle.

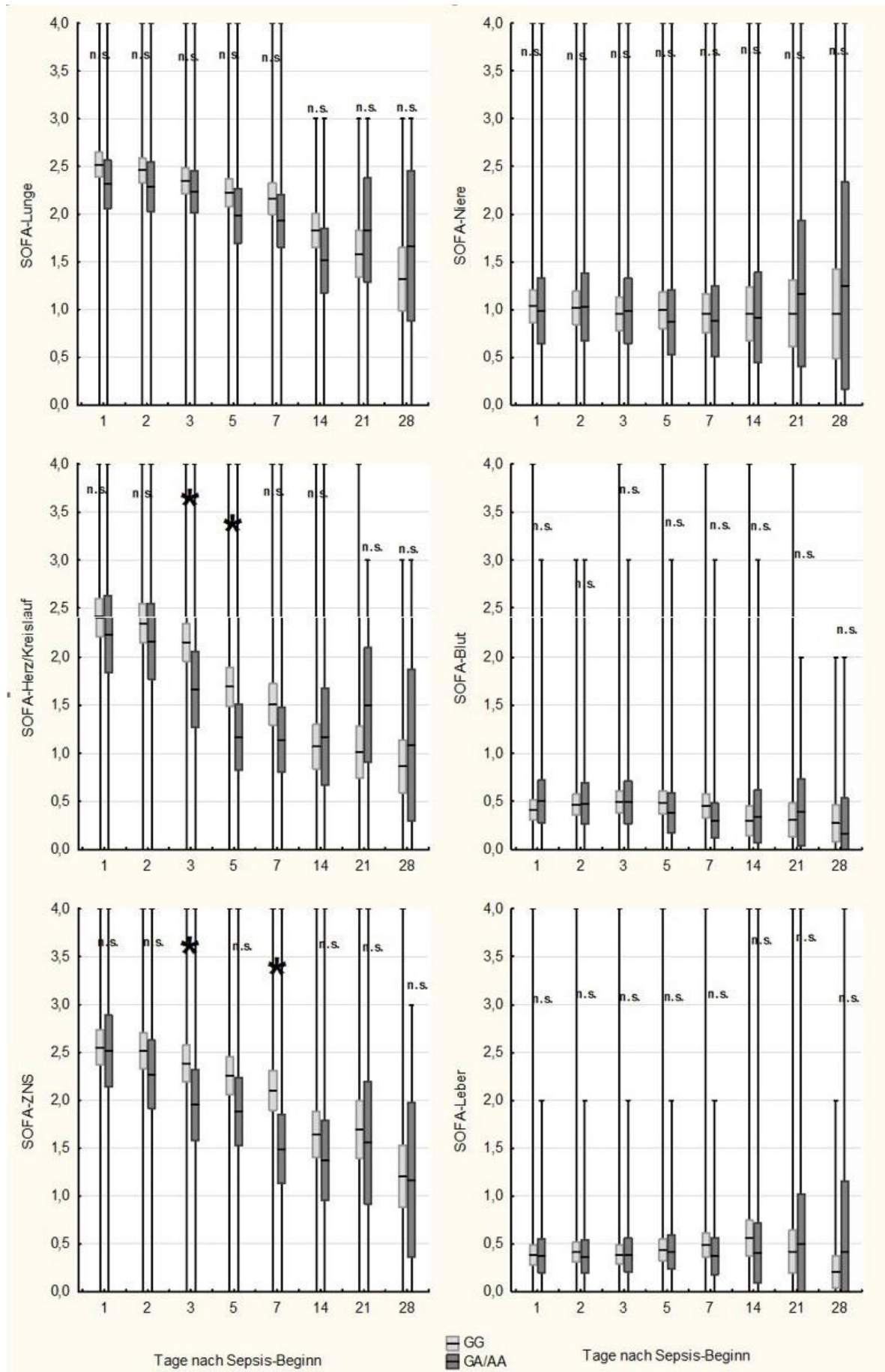
Im gesamten Kollektiv fielen die SOFA-Scores von  $9,1 \pm 4,3$  an Tag 2 auf  $5,0 \pm 3,7$  an Tag 28 (**Tabelle 12**). Hierbei wurden Assoziationen des GG-Genotyps mit höheren SOFA-Scores für *Follow-Up*-Tag 5 ( $p = 0,0265$ ) und Tag 7 ( $p = 0,0103$ ) erkennbar (**Tabelle 12**). Für die anderen Tage ergaben sich keine Signifikanzen. Zu beachten ist der Verlauf des p-Wertes, der von Tag 2 bis 7 abnimmt um ab Tag 14 wieder anzusteigen. Anschaulich wird auch in **Abbildung 13** gezeigt, dass die SOFA-Score-Mittelwerte der beiden Genotyp-Gruppen sich von Tag 2 bis Tag 7 mehr und mehr voneinander entfernten und nach Tag 7 sich zunehmend annäherten und hernach für Tag 21 und 28 die A-Allel-Träger die höheren Mittelwerte aufzeigten.

**Tabelle 12: Durchschnittliche SOFA-Scores für jeden *Follow-Up*-Tag**

	Gesamt (n=300)	GG (n=236)	GA/AA (n=64)	p-Wert <sup>1</sup>
<b>SOFA-Score an</b>				
<b>Tag 2</b>	9,1±4,3	9,2±4,3	8,6±4,0	0,3285
<b>Tag 3</b>	8,5±4,5	8,7±4,5	7,7±4,3	0,1206
<b>Tag 5</b>	7,8±4,5	8,1±4,6	6,6±4,0	<b>0,0265</b>
<b>Tag 7</b>	7,3±4,7	7,7±4,8	6,0±4,0	<b>0,0103</b>
<b>Tag 14</b>	6,2±4,2	6,4±4,2	5,5±4,2	0,1737
<b>Tag 21</b>	6,2±4,2	6,0±4,2	6,9±4,6	0,6608
<b>Tag 28</b>	5,0±3,7	4,8±3,5	5,8±4,6	0,5294

<sup>1</sup> Mann-Whitney-U-Test

Auch hier zu erwähnen ist die ausgeprägte Verkleinerung des GA/AA-Kollektivs für Tag 14-28 (**Tabelle 13**, rechte Spalte). Bei Betrachtung der Mittelwerte der *Sub-Scores*, die für jeden *Follow-Up*-Tag dargestellt wurden (**Abbildung 14**), wurde ersichtlich, dass die *Sub-Scores* der Organsysteme Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS den Hauptanteil am SOFA-Score ausmachten, wobei die Mittelwerte der übrigen Organsysteme über die gesamte Beobachtungszeit relativ niedrig und konstant bei etwa 0,5 Punkten (Leber, Blut) und 1 Punkt (Niere) verblieben. Ab Tag 14 vergrößerte sich bei allen *Sub-Scores*, vor allem bei den GA/AA-Trägern bei bereits oben erwähnten Sachverhalten, das 95 % Konfidenzintervall (**Abbildung 14**). Außerdem fiel auf, dass die homozygoten G-Allel-Träger bei den Organsystemen Leber und Blut die Höchstwerte von vier Punkten nahezu an jedem Tag erreichten, bei den A-Allel-Trägern waren es größtenteils Höchstwerte von zwei Punkten (Leber) und drei Punkten (Blut) (**Abbildung 14**). Dabei ergaben sich für diese beiden Organsysteme und für den



**Abbildung 14: Durchschnittliche SOFA-Sub-Scores an allen Follow-Up-Tagen**

Dargestellt sind für jeden Tag die Mittelwerte der *Sub-Scores* der G-Homozygoten und der A-Allel-Träger. Im Vergleich der täglichen Mittelwerte dieser beiden Gruppen sind signifikante (\* $p < 0.05$ ) und nicht-signifikante (n.s.) Unterschiede gekennzeichnet. Innerhalb der Box befindet sich das Konfidenzintervall, die Antennen (Whisker) zeigen die höchsten und niedrigsten *Sub-Scores* an einem Tag an.

**Tabelle 13: p-Werte der sechs SOFA-Sub-Scores für alle Follow-Up-Tage**

	p-Wert <sup>1</sup>			Gesamtanzahl Patienten
	Lunge	Herz/Kreislauf	ZNS	/ GA, AA-Träger [n]
<b>Tag 1</b>	0,0964	0,4307	0,8844	300/64
<b>Tag 2</b>	0,1767	0,3379	0,1415	298/63
<b>Tag 3</b>	0,2253	<b>0,0188</b>	<b>0,0298</b>	295/63
<b>Tag 5</b>	0,1297	<b>0,0191</b>	0,0610	268/59
<b>Tag 7</b>	0,0999	0,2772	<b>0,0068</b>	241/56
<b>Tag 14</b>	0,1094	0,8583	0,3276	149/34
<b>Tag 21</b>	0,3666	0,1203	0,6608	88/17
<b>Tag 28</b>	0,3636	0,8417	0,8184	56/12

	p-Wert <sup>1</sup>			Gesamtanzahl Patienten
	Niere	Blut	Leber	/ GA, AA-Träger [n]
<b>Tag 1</b>	0,8012	0,5424	0,8006	300/64
<b>Tag 2</b>	0,9790	0,8222	0,8991	298/63
<b>Tag 3</b>	0,8131	0,9376	0,8436	295/63
<b>Tag 5</b>	0,6834	0,5232	0,7330	268/59
<b>Tag 7</b>	0,7748	0,4221	0,5469	241/56
<b>Tag 14</b>	0,9490	0,6585	0,4709	149/34
<b>Tag 21</b>	0,4833	0,5653	0,6978	88/17
<b>Tag 28</b>	0,6750	0,6389	0,8574	56/12

<sup>1</sup> Mann-Whitney-U-Test

Nieren *Sub-Score* zwischen den Genotyp-Gruppen an allen *Follow-Up*-Tagen keine signifikanten Unterschiede (**Tabelle 13, Abbildung 14**).

Signifikanzen ergaben sich für die *Sub-Scores* von ZNS (*Follow-Up*-Tag 3,  $p = 0,0298$  und *Follow-Up* Tag 7,  $p = 0,0068$ ) und Herzkreislaufsystem (*Follow-Up*-Tag 3,  $p = 0,0188$  und *Follow-Up*-Tag 5,  $p = 0,0191$ ), für den Lungen *Sub-Score* sind Tendenzen zu erkennen (**Tabelle 13**).

### 3.3.2.2 Möglicher Einfluss weiterer Faktoren auf den SOFA-Score/*Sub-Scores*

Da sich die G-Homozygoten von den A-Allel-Trägern hinsichtlich der Faktoren „Geschlecht“ und „chronische Lebererkrankungen“ (aus Übersichtsgründen im Folgenden „Lebervorerkrankung“) annähernd signifikant unterschieden, wie bereits in den epidemiologischen Patientendaten (**Tabelle 7**) dargestellt, musste ausgeschlossen werden, dass die in **3.3.2.1** beobachteten Signifikanzen auf den Einfluss dieser Faktoren zurückzuführen waren. Um diese Sachverhalte zu untersuchen, wurden weitere ANOVA mit Messwiederholungen durchgeführt, die im Folgenden dargestellt werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Zeit auf die *Scores*, d.h. die Veränderung der *Scores* über die *Follow-Up*-Tage, quantifiziert. Mögliche Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Faktoren mit Auswirkung auf den SOFA-Score bzw. dessen *Sub-Scores* konnten nur für die Faktoren-Kombinationen Zeit und Geschlecht/Lebervorerkrankung/Genotyp-Gruppe erhoben werden. Andere Kombinationen zu untersuchen, war nicht möglich, da nicht für alle nötigen Kombinationsmöglichkeiten Werte existierten, z.B. befanden sich ab Tag 21 keine Frauen mit Lebervorerkrankungen im zu untersuchenden Kollektiv.

Bei der Überprüfung des SOFA-Scores erkannten wir, dass bis auf die Zeit keiner der untersuchten Faktoren einen signifikanten Einfluss besaß (**Tabelle 14**). Dass der Faktor Zeit hier durchweg eine Signifikanz aufwies, kann dahingehend gedeutet werden, dass die mittleren SOFA-Scores sich zu jedem erhobenen Zeitpunkt ändern (Vgl. **Abbildung 13**). Solch ein Zusammenhang mit der Zeit galt auch für die *Sub-Scores* der Organsysteme Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS, nicht jedoch für die Nieren, Blut und Leber *Sub-Scores* (**Tabelle 15, Tabelle 16 und Tabelle 17**). Zur Visualisierung des Einflusses der Zeit auf die *Sub-Scores* kann **Abbildung 14** herangezogen werden. Für den Faktor Geschlecht ergaben sich Signifikanzen für das Herz/Kreislauf-System (Zeitraum Tag 2-14;  $p = 0,0103$  und Tag 2-21;  $p = 0,0258$ , **Tabelle 15**). Auch für den Nieren *Sub-Score* besaß das Geschlecht einen signifikanten Einfluss (Tag 2-7;  $p = 0,0222$ , **Tabelle 16**).

Weiterhin fanden wir für den Leber *Sub-Score* (**Tabelle 17**) signifikante Zusammenhänge mit den Faktoren Lebererkrankung (Tag 2-7; **p = 0,0170**), Lebererkrankung\*Zeit (Tag 2-14; **p = 0,0373**) und Genotyp\*Zeit (Tag 2-28; **p = 0,0158**).

**Tabelle 14: Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den SOFA-Score in verschiedenen Phasen**

<i>Follow-Up-Tage</i>	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>
<b>Geschlecht</b>	0,6977	0,1886	0,1227	0,6792
<b>Lebererkrankung</b>	0,2754	0,9458	0,5642	0,3908
<b>Zeit</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
<b>Zeit*Geschlecht</b>	0,6761	0,4001	0,3222	0,6585
<b>Zeit*Lebererkrankung</b>	0,7870	0,7400	0,8077	0,7626
<b>Zeit*Genotyp-Gruppe</b>	0,3124	0,5082	0,3002	0,7213

**Tabelle 15: Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den Lungen- und Herz/Kreislauf-Sub-Score in verschiedenen Phasen**

<i>Follow-Up-Tage</i>	<b>Lunge</b>				<b>Herz-Kreislauf</b>			
	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>
<b>Geschlecht</b>	0,1630	0,6054	0,6003	0,1414	0,3760	<b>0,0103</b>	<b>0,0258</b>	0,3138
<b>Lebererkrankung</b>	0,2712	0,0621	0,0776	0,0841	0,1976	0,0854	0,4874	0,8748
<b>Zeit</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	0,0933	0,0788	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0000</b>
<b>Zeit*Geschlecht</b>	0,8133	0,4982	0,7076	0,9623	0,8719	0,9481	0,4737	0,1945
<b>Zeit*Lebererkrankung</b>	0,7690	0,9295	0,6633	0,4599	0,8707	0,3773	0,5884	0,5312
<b>Zeit*Genotyp-Gruppe</b>	0,6718	0,1828	0,4768	0,5866	0,3101	0,0783	0,1463	0,4085

**Tabelle 16: Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den ZNS- und Nieren-Sub-Score in verschiedenen Phasen**

<i>Follow-Up-Tage</i>	<b>ZNS</b>				<b>Niere</b>			
	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>
<b>Geschlecht</b>	0,6076	0,0884	0,1471	0,2134	<b>0,0222</b>	0,2860	0,8064	0,4428
<b>Lebervorerkrankung</b>	0,4920	0,2876	0,4237	0,5235	0,1564	0,5968	0,3143	0,1898
<b>Zeit</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,5847	0,7215	0,9199	0,8897
<b>Zeit*Geschlecht</b>	0,8138	0,2038	0,3636	0,6317	0,6684	0,9230	0,9989	0,9942
<b>Zeit*Lebervorerkrankung</b>	0,4189	0,4988	0,5675	0,4574	0,6162	0,2873	0,9995	0,9976
<b>Zeit*Genotyp-Gruppe</b>	0,5285	0,7680	0,8250	0,7744	0,4801	0,6400	0,3953	0,4822

**Tabelle 17: Einfluss (in Form des p-Wertes) auf den Blut- und Leber-Sub-Score in verschiedenen Phasen**

<i>Follow-Up-Tage</i>	<b>Blut</b>				<b>Leber</b>			
	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>	<b>2-7</b>	<b>2-14</b>	<b>2-21</b>	<b>2-28</b>
<b>Geschlecht</b>	0,4919	0,2231	0,0583	0,0776	0,8408	0,5346	0,3538	0,6505
<b>Lebervorerkrankung</b>	0,2810	0,5300	0,6543	0,6628	<b>0,0170</b>	0,1739	0,2667	0,4837
<b>Zeit</b>	0,0532	0,0753	0,9400	0,8022	0,6871	0,4308	0,4313	0,1959
<b>Zeit*Geschlecht</b>	0,6863	0,3552	0,0853	0,6239	0,3751	0,0978	0,0747	0,9093
<b>Zeit*Lebervorerkrankung</b>	0,3911	0,7648	0,6585	0,8624	0,5244	<b>0,0373</b>	0,1540	0,0749
<b>Zeit*Genotyp-Gruppe</b>	0,4089	0,4479	0,9201	0,9779	0,9528	0,9976	0,2038	<b>0,0158</b>

Da in diesem Kapitel  $n = 168$  Hypothesen geprüft wurden, sollte die durch multiples Testen entstehende Alphafehlerkumulierung mitberücksichtigt werden und die Bonferroni-Methode Anwendung finden, sprich die Irrtumswahrscheinlichkeit, unterhalb derer von einem signifikanten Unterschied ausgegangen werden konnte, musste angepasst werden. Schon bei einer vergleichsweise progressiven Vorgehensweise mit  $m = 6$  (6 Faktoren) und einem daraus folgendem neuen Signifikanzniveau  $\alpha' = \alpha/6 = 0,05/6 \approx 0,0083$  wurden keine signifi-



kanten Unterschiede in der Morbidität in Abhängigkeit der hier untersuchten Faktoren „Geschlecht“ und „chronische Lebererkrankungen“ festgestellt. Einzig der Faktor Zeit spiegelte weiterhin die signifikant sinkende Morbidität des Kollektivs mit der Dauer des Krankheitsverlaufs wieder.

### 3.4 Mortalitätsanalysen

An den *Follow-Up*-Tagen 28 und 90 wurde außerdem die Mortalität des 300 Patienten umfassenden Kollektivs betrachtet (**Tabelle 18**). Dabei lag nach einer Beobachtungsdauer, die 28 Tage ab Sepsis-Beginn betrug, die Mortalität bei 21,3 %. Nach dem maximalen Beobachtungszeitraum von 90 Tagen lag die Gesamtmortalität des Kollektivs bei 32,7 %.

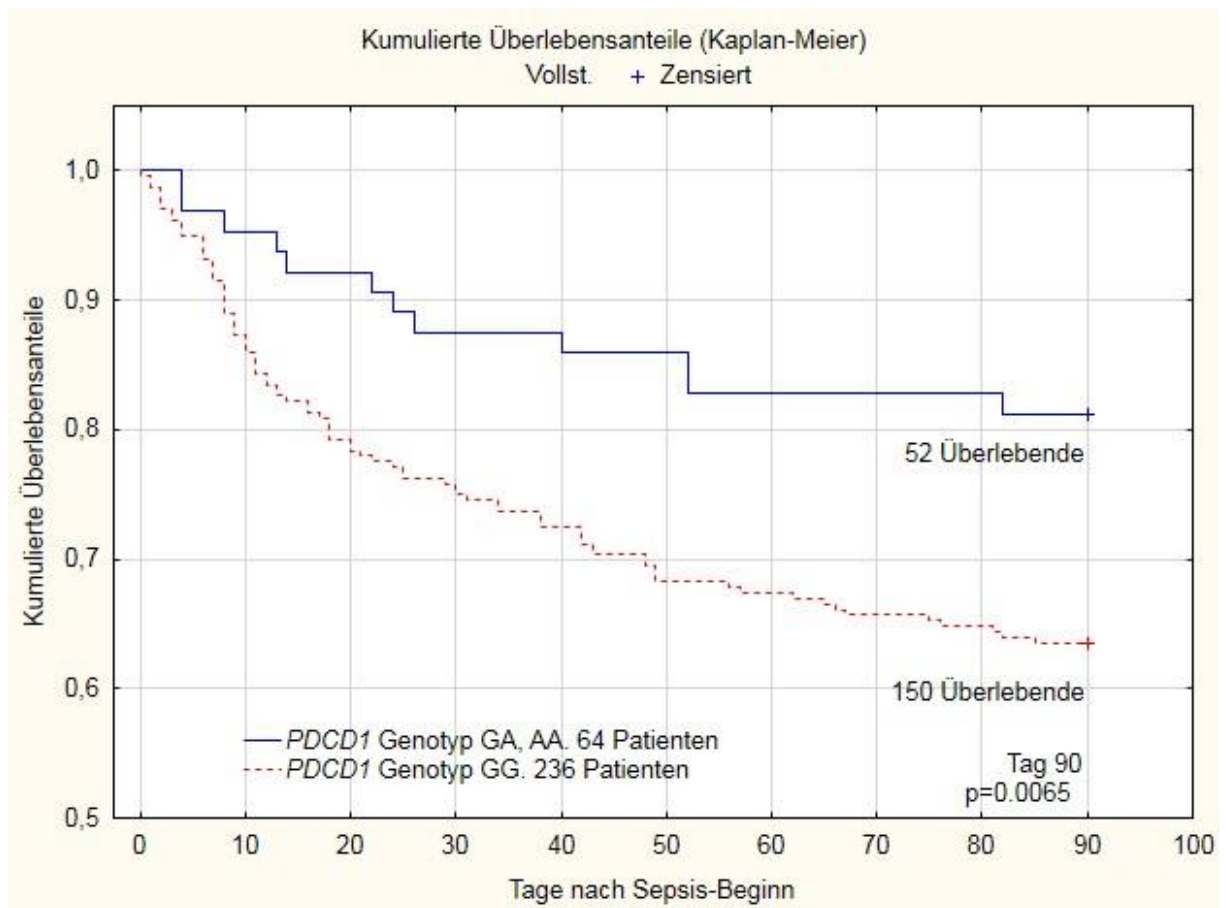
Im Vergleich zwischen den Mortalitätsraten der beiden Genotyp-Gruppen GG und GA/AA zeigte sich für den Zeitraum bis *Follow-Up*-Tag 28 eine tendenziell höhere Mortalität (23,7 %) für die GG-Gruppe (GA/AA-Gruppe: 12,5 %), diese erreichte keine statistische Signifikanz ( $p = 0,0586$ ; **Tabelle 18**). Bis *Follow-Up*-Tag 90 betrachtet, hier lag die Mortalität für die G-Homozygoten bei 36,4 % und für die A-Allel-Träger bei 18,8 %, stellte sich mit  $p = 0,0070$  ein statistisch sehr signifikanter Unterschied ein (**Tabelle 18**).

**Tabelle 18: Mortalitätsraten an *Follow-Up*-Tag 28 und 90**

	Gesamt	GG	GA/AA	p-Wert
Verstorben bis Tag 28 [n]	64 (21,3 %)	56 (23,7 %)	8 (12,5 %)	0,0586
Verstorben bis Tag 90 [n]	98 (32,7 %)	86 (36,4%)	12 (18,8%)	<b>0,0070</b>

#### 3.4.1 Kaplan-Meier Methode

Über den Zeitraum von 90 Tagen wurden außerdem die Anteile der überlebenden Patienten der beiden Genotyp-Gruppen mittels einer Analyse der kumulierten Überlebensanteile nach Kaplan-Meier untersucht (**Abbildung 15**). Dabei war, über den gesamten Zeitraum betrachtet, eine Assoziation zwischen dem GG-Genotyp und einer niedrigeren Überlebensrate, sprich einer höheren Mortalitätsrate, im Vergleich zur GA/AA-Gruppe zu erkennen ( $p = 0,0065$ ).



**Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve**

Bei der Gegenüberstellung der Überlebenden der G-Homozygoten Patienten und der A-Allel-Trägern ergab sich für den Beobachtungszeitraum von 90 Tagen ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0065$ ).

### 3.4.2 Cox-Regression

Auch hier, wie bereits in 3.3.2.2 geschehen, wurde die mögliche Beteiligung anderer Faktoren untersucht. Dazu zogen wir die Cox-Regression (*engl.: Cox's proportional hazards model*) heran und überprüften mögliche Einflüsse der Faktoren „Geschlecht“ und „Chronische Lebererkrankungen“ auf die in 3.4.1 gezeigten sehr signifikant unterschiedlichen Überlebensanteile der GG- und der GA/AA-Genotyp-Gruppen.

Dabei bestätigten sich die mittels des Log-rank-Tests innerhalb der Kaplan-Meier Methode errechneten Ergebnisse: Gezeigt wurde eine sehr signifikante Assoziation zwischen dem GG-Genotyp und einer höheren Überlebenszeit ( $p = 0,0074$ , **Tabelle 19**), wohingegen für das weibliche Geschlecht und das Vorhandensein von chronischen Vorerkrankungen keine statistisch signifikante Relevanz auf die Überlebenszeit gefunden wurde. Gefestigt werden diese Erkenntnisse von der *Hazard-Ratio*, die für den GG-Genotyp, im Vergleich zu den anderen Genotypen, ein 2,3-fach höheres Risiko zu sterben nachwies (**Tabelle 19**). Zwar besaßen auch Frauen (1,2-fach höher) und Patienten mit chronischen Lebererkrankungen

(1,4-fach höher) ein gering höheres Risiko zu sterben, jedoch beinhaltet das Konfidenzintervall der Faktoren „Geschlecht“ und „Chronische Lebererkrankungen“ (wohlgemerkt im Gegensatz zum Faktor „Genotyp-Gruppe) die 1, sodass wahrscheinlich doch kein Unterschied für das Sterberisiko innerhalb der beiden Faktoren besteht (**Tabelle 19**).

Fasst man zusammen, so wurden die Ergebnisse der Kaplan-Meier Methode bestätigt, andere möglich beteiligte Faktoren wurden ausgeschlossen.

**Tabelle 19: Cox-Regression**

	<b>p-Wert</b>	<b>Hazard-Ratio</b>	<b>95 % Konfidenzintervall für das Hazard-Ratio</b>
<b>Genotyp-Gruppe (GG/GA,AA)</b>	<b>0,0074</b>	2,2957	1,2492-4,2189
<b>Geschlecht(m/w)</b>	0,4915	1,1569	0,7638-1,7521
<b>Chronische Lebererkrankungen (ja/nein)</b>	0,4173	1,4089	0,6154-3,2254

## 4 Diskussion

Eine beträchtliche Anzahl an epidemiologischen Studien zum Krankheitsbild Sepsis existiert. Genauso vielfältig fanden dabei auch unterschiedliche Studiendesigns Anwendung (1.1.2). Daher sind direkte Vergleiche mit den gewonnenen epidemiologischen Analysen dieser Dissertation nur partiell möglich.

Bei Betrachtung einer deutschen (Engel et al. 2007) und einer europäischen (Vincent et al. 2006) epidemiologischen Studie zeigen sich allgemein Übereinstimmungen mit unseren Ergebnissen. So liegt das Durchschnittsalter unseres Kollektivs bei 63 Jahren (**Tabelle 7**), bei dem europäischen Kollektiv sind es 65 Jahre (Vincent et al. 2006). Auch nur marginal unterscheiden sich die Anteile der Geschlechter: 36 % unserer Patienten sind weiblich, europaweit beläuft sich dieser Anteil auf 37 % (Vincent et al. 2006). Bei Engel et al. ergaben sich, wenn dort auch nur die Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock betrachtet wurden, für die Art der Vorbehandlung Ergebnisse, ähnlich denen des Sepsis-Kollektivs dieser Dissertation (**Tabelle 7**): Elektive OP 22 % (Eigenstudie 30 %), Notoperation 39,5 % (Eigenstudie 46 %), konservative Vorbehandlung 38 % (Eigenstudie 24 %). Zwar liegt unser Anteil an Patienten mit septischem Schock höher (59 %, **Tabelle 8**) als bei einer vergleichbaren Studie (37 %, van Gestel et al. 2004), deren Daten beziehen sich jedoch nur auf Patienten, deren ICU-Aufnahme mit deren Sepsis-Beginn zusammenfiel. Da unsere Patienten auch im Verlauf ihres ICU-Aufenthaltes eine Sepsis entwickelten (**Tabelle 9**: Verweildauer ICU minus Verweildauer ICU ab Sepsis-Beginn), ließe sich dieser prozentuale Unterschied mutmaßlich darauf zurückführen, dass Patienten, die sich bereits seit einigen Tagen auf ICU befinden, einen protrahierten Krankheitsverlauf aufweisen und somit eher für schwerere Verläufe der Sepsis, wie einen septischen Schock, zugänglich werden. Einen konkreten Anhalt dafür gäbe die Art des Allgemeinzustandes des Patienten, wie z.B. die Höhe des durchschnittlichen SOFA-Scores in den Tagen vor Sepsis-Beginn, wieder. Leider wurden solche Parameter weder von uns, noch von van Gestel et al. erhoben.

Die Höhe der unsrigen an *Follow-Up*-Tag 1 erhobenen Scores lassen sich mit den Ergebnissen einer Studie an Patienten mit schwerer Sepsis/septischer Shock vereinbaren (**Tabelle 8** und Blanco et al. 2008). So finden sich bei uns ein durchschnittlicher SOFA-Score von  $9,2 \pm 4,1$  ( $9,6 \pm 3,7$  für Blanco et al. 2008) und ein APACHE-II-Score von  $21,8 \pm 7,3$  ( $25,5 \pm 7,1$  für Blanco et al. 2008). Dass unsere Daten auch Patienten mit wenig schwerwiegender Symptomatik, sprich Sepsis, beinhalten, dürfte unsere leicht niedrigeren Scores erklären. Das Vorkommen der Primärfokusse unserer Patienten entspricht in etwa europäischen Kollektiven (**Tabelle 8**, Vincent et al. 2006). So stellen Lunge (52 %) und Abdomen (28 %) die

häufigsten Primärfokusse dar (Respektive 68 % und 22 % bei Vincent et al. 2006). Bei der Betrachtung der bei uns für *Follow-Up*-Tag 1 erhobenen Organersatzverfahren lassen sich ähnliche Anteile wie bei den Ergebnissen von Engel et al. 2007 ausmachen: Mechanische Ventilation 80 % (Eigenstudie 84 %), Vasopressor-Therapie 65 % (Eigenstudie 59 %) und Nierenersatzverfahren 20 % (Eigenstudie 10 %). Hier muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei der von Engel et al. durchgeführten Betrachtung um eine eintägige Querschnittsstudie handelt und somit nur ein sehr vorsichtiger Vergleich möglich ist. Die Organersatzverfahren bilden auch im Krankheitsverlauf für unser Kollektiv eine therapeutische Option mit hohem Stellenwert, was sich an den im Vergleich zu *Follow-Up*-Tag 1 immer noch recht hohen Anteilen der eingesetzten Organverfahren an den *Follow-Up*-Tagen äußert: Mechanische Ventilation (75 %), Vasopressor-Therapie (42 %) und Nierenersatzverfahren (14%) (**Tabelle 9**). Die während des Krankheitsverlaufs innerhalb der Gruppe der G-Homozygoten im Vergleich zu den A-Allel-Trägern höheren Anteile an Organersatzverfahren ( $p = 0,0350$  für mechanische Ventilation und  $p = 0,0204$  für Vasopressor-Therapie) weisen bereits auf eine höhere Morbidität in dieser Gruppe hin. Bei dem Vergleich der Verweildauer (LOS) auf ICU unserer Patienten mit denen von Engel et al. ergibt sich ein LOS von 21 Tagen für unser Kollektiv, bei Engel et al. beträgt der durchschnittliche LOS für Patienten mit schwerer Sepsis/septischem Schock in universitären Einrichtungen 19 Tage (**Tabelle 9** und Engel et al 2007).

Da keine signifikanten Unterschiede (d. h. Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p$  deutlich  $>0,05$ ) für all die untersuchten epidemiologischen und klinischen Daten bei Sepsis-Beginn zwischen den Genotyp-Gruppen vorliegen (**Tabelle 7**, **Tabelle 8**), können wir mit hoher Wahrscheinlichkeit sicherstellen, dass diese Faktoren keinen Einfluss auf die eruierten Assoziationen des *PDCD1* rs11568821 GG-Genotyps haben. Auch die zwei Faktoren, die auf die beiden Genotyp-Gruppen mit annähernder Signifikanz unterschiedlich verteilt sind („Geschlecht“:  $p = 0,1055$  und „chronische Lebererkrankungen“:  $p = 0,0559$ ; **Tabelle 7**), können als Einflussquelle ausgeschlossen werden (**3.3.2.2** und **3.4.2**).

Bei den Untersuchungen zur den SOFA-Scores und seinen *Sub-Scores* fällt auf, dass sich die sechs *Sub-Scores* anhand der Höhe ihrer Beteiligung am SOFA-Score in zwei Gruppen einteilen lassen (**Abbildung 14**, rechte und linke Spalte). So beschrieben Moreno et al. 1999 bereits eine Zwei-Faktoren Struktur innerhalb des SOFA-Scores, bestehend aus den *Sub-Scores* der Organsysteme Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS als ersten Faktor und derer von Niere, Blut und Leber als zweiten Faktor. Dabei konnte entweder Faktor 1 oder Faktor 2

dominieren. Auch unsere Daten zeigen diese Struktur auf, wobei wir darüber hinaus feststellen können, dass im Mittel der erste Faktor dieser Struktur über alle *Follow-Up*-Tage hinweg dominiert (**Abbildung 14**): Die *Sub-Scores* für Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS machen den Hauptteil des *SOFA-Scores* aus, ihre Dynamik entscheidet über die letztendliche Höhe des *SOFA-Scores*. Dagegen bewegen sich die *Sub-Scores* der Organe Niere, Blut und Leber über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant um Werte von 0,5 (Blut und Leber) bzw. 1 (Niere). Moreno et al. brachten als Erklärung für diese Struktur eine *two-target* Erklärung ins Spiel, bei der die Höhe des ersten Faktors, bestehend aus Lungen-, Herz/Kreislauf- und ZNS-*Sub-Score*, stellvertretend für das Ausmaß der Infektion zu Sepsis-Beginn stehen und die Höhe der *Sub-Scores* des zweiten Faktors die späten Konsequenzen dieser anfänglichen Infektion, nämlich eine überschießende Immunantwort repräsentieren soll (Moreno et al. 1999). Dem heutigen Wissenstand nach, nämlich dass neben primärer Infektion und einer hyper-inflammatorischen Phase auch sekundäre Infektionen, inklusive einer Reaktivierung latenter Viren (Otto et al. 2011; Limaye et al. 2008) in einer späten hypo-inflammatorischen Phase (Hotchkiss et al. 2013) Charakteristika einer Sepsis darstellen, hält diese vereinfachte These von Moreno et al. jedoch nicht stand. Darüber hinaus stellt das septische Krankheitsbild eine heterogene Systemerkrankung dar, eine strikte Trennung zweier Gruppen von Organen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten betroffen sein sollen, ist mit aktuellen Erkenntnissen nicht vereinbar (Simmons und Pittet 2015; Abraham und Singer 2007). Diese Heterogenität sei am Beispiel der Niere gezeigt: Die Vorstellung, dass die Sepsis-assoziierte AKI ausschließlich einer renalen Minderperfusion im Rahmen von globaler Hypoperfusion bei septischem Schock geschuldet sei, wurde in den letzten Jahren durch Erkenntnisse ergänzt, die eine AKI auch bei normaler und gesteigerter renalen Perfusion vorweisen. Inflammatorische Komponenten, mikrovaskuläre Störungen und adaptive Zell-Antworten wie die der Tubulus-Zellen tragen ebenfalls zur Entstehung einer septischen AKI bei (Gomez et al. 2014). Festhalten können wir, dass im Krankheitsverlauf einer Sepsis die Organsysteme Niere, Blut und Leber in ihrer Funktion, repräsentiert durch die den jeweiligen *SOFA-Sub-Score* zugrunde liegenden Parameter, kaum (Blut und Leber) bis niedrig (Niere) eingeschränkt sind. Die Organsysteme Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS treten dadurch, was die Klinik der Sepsis angeht, klar in den Vordergrund. Betreffend den Nieren-*SOFA-Sub-Score*, so ist Folgendes zu beachten: Wir können feststellen, dass die Patienten über den gesamten Beobachtungszeitraum durchweg eine mittlere Kreatinin-Konzentration von 1,2-1,9 md/dl (**Abbildung 14, Tabelle 3**) aufweisen. Dies stellt für den Durchschnitts-Patienten eine geringfügige Organdysfunktion dar. Daraus jedoch eine AKI diagnostizieren zu können

oder sie auszuschließen, wäre falsch, da *per definitionem* eine AKI vorhanden ist, wenn ein definierter Anstieg der S-Kreatinin-Konzentration, im Vergleich zu einem Vorwert, vorliegt (Kellum et al. 2013). Denn auch wenn unsere Daten durchweg niedrige Kreatinin-Konzentrationen zeigen, so finden sich doch in großen Kollektiven bei 42,1 % aller septischen Patienten AKIs (Bagshaw et al. 2008). Da unsere Patienten ein hohes Durchschnittsalter aufweisen ( $63 \pm 15$  Jahre), 14 % dieser bereits unter einer chronischen Niereninsuffizienz (CKD) leiden, 58 % (Art. Hypertonie) bzw. 18 % (Diabetes mellitus) wichtige Risikofaktoren (**Tabelle 7**) für eine potentiell noch nicht diagnostizierte CKD vorweisen und keine Laborwerte vor ICU-Aufnahme vorliegen, ist es nicht ausgeschlossen, dass Patienten bereits vor Studienaufnahme eine Kreatinin-Konzentration  $>1,2$  md/dl aufwiesen. Außerdem kann durch eine positive Flüssigkeitsbilanz mittels Verdünnung eine falsch niedrige S-Kreatinin-Konzentration entstehen (Macedo et al. 2010). Prinzipiell sind bereits präklinisch pathologische *Sub-Scores* auch bei anderen Organsystemen denkbar.

Bei der Analyse der *Sub-Scores* und der Genotypen können wir signifikante Assoziationen des *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyps mit höheren SOFA-*Sub-Scores*, sprich höheren Dysfunktionen, der Organsysteme Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS für die Krankheitsphase zwischen *Follow-Up*-Tag 2-7 insgesamt betrachtet, nachweisen (Lunge  $p=0,0109$ , Herz/Kreislauf  $p=0,0156$  und ZNS  $p=0,0027$ , **Tabelle 11**). Auch hierbei ist das schwindende Kollektiv der GA/AA-Träger ab Tag 14 zu beachten. Bei einem größeren Kollektiv würden sich die Assoziationen vielleicht auf weitere Tage des Krankheitsverlaufs ausweiten. Dass für den GG-Genotyp auch signifikante Assoziationen mit höheren *Sub-Scores* für ZNS und Herz/Kreislauf-System für einzelne *Follow-Up*-Tage existieren (ZNS: Tag 3  $p=0,0298$  und Tag 7  $p=0,0068$ , Herz/Kreislauf: Tag 3  $p=0,0188$  und Tag 5  $p=0,0191$ , **Tabelle 13**), interpretieren wir dahingehend, dass das Vorhandensein des *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyps darüber hinaus auch mit einer prolongiert schwereren Organdysfunktion der Organe ZNS und Herz/Kreislauf einhergeht. Dies wird auch bei Betrachtung von **Abbildung 14** ersichtlich, da sich hier die über *Follow-Up*-Tag 3 bis 7 erstreckenden signifikant unterschiedlich hohen Mittelwerte in ein System von über die Zeit stetig sinkenden *Sub-Scores* einfügen, oder anders formuliert, die *Sub-Scores* der A-Allel-Träger sinken an den Tagen mit Assoziationen stärker zu den Vortagen wie die *Sub-Scores* der G-homozygoten Patienten.

PD-1 zählt zu den negativ ko-stimulierenden Rezeptoren und wird auf T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und DCs exprimiert. Bei Vorhandensein des *PDCDI* rs11568821

G-Allels wird eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor RUNX1 an der DNA-Vorlage gebildet. Für diese Bedingung wurden höhere Expressionsraten von PD-1 gezeigt. Zudem unterliegt die PD-1-Expression einer epigenetischen Kontrolle (Siehe **Kapitel 1.2**).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass septische Patienten mit *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyp vermehrt den Rezeptor PD-1 auf zirkulierenden Zellen (und denkbar auch auf residenten Zellen) exprimieren und dadurch diese Zellen sensitiver auf die Interaktion mit PD-L1 und PD-L2 in den Organen Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS mit Deaktivierung reagieren. Dies würde zu lokal hypo-inflammatorischen Zuständen führen und durch eine entsprechende infektiöse Last ausgeprägtere Dysfunktionen dieser Organe ermöglichen. Denkbarer Bestandteil dieses Modells wäre eine lokal vermehrte Expression von PD-L1 und PD-L2, ein Prinzip, wie es bei vielen Tumoren nachgewiesen werden konnte (Dong et al. 2002). So wurde belegt, dass humane bronchiale Epithelzellen, die mit dem RSV (*Respiratory syncytial virus*) oder dem Influenza-Virus infiziert sind, vermehrt PD-L1 exprimieren und dass die virale Last der RSV- bzw. Influenza-Infektion in infizierten Bronchialzellen durch Blockade von PD-L1 signifikant vermindert und die Effektorfunktionen der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gesteigert werden konnten (McNally et al. 2013; Telcian et al. 2011). Für humane Makrophagen der Lunge wurde eine durch das Influenza-Virus induzierte gesteigerte Expression von PD-L1 beschrieben (Staples et al. 2015). Ebenso kürzlich (2015) wurde von Lei et al. für die *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie nachgewiesen, dass MDSCs durch den PD-1/PD-L1-Pfad die Aktivität der Alveolarmakrophagen herabsetzen. Für eine Sepsis, die ebenfalls mit sekundären Infektionen einhergehen kann (Otto et al. 2011; Limaye et al. 2008), wären solche Mechanismen ebenfalls denkbar. Eine bei Mäusen an Tag 5 und 7 nach Infektion mit HMPV (Humanes Metapneumovirus) signifikante Zunahme der PD-L1-Expression in Lungen-Gewebe (Erickson et al. 2012) gibt einen weiteren Hinweis auf einen lokalen hypo-inflammatorischen Zustand, der auch bei einer Sepsis zu einer pulmonalen Dysfunktion führen könnte. Ähnliche Erkenntnisse liegen zum Organ Herz vor. So konnte bei einer Infektion mit dem Cocksackie B-Virus und durch eine *in vitro* Stimulation mit IFN- $\gamma$  eine vermehrte PD-L1-Expression auf murinen kardialen Endothelzellen bzw. Myokardzellen gezeigt werden (Seko et al. 2007; Rodig et al. 2003). Auch Anteile des ZNS (Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen und Mikroglia (residente Makrophagen des ZNS)) exprimieren PD-L1 vermehrt unter Stimulierung durch TNF und IFN- $\gamma$  (Pittet et al. 2011 a). Dazu kommt, dass das Durchschreiten der Blut-Hirn-Schranke von CD4- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch eine vermehrte Expression von PD-L1 und PD-L2 auf humanen Endothelzellen des Gehirns verhindert wird (Pittet et al. 2011 b). Der PD-1/PD-L1/PD-L2-Pfad



spielt darüber hinaus eine komplexe und scheinbar tragende Rolle bei einigen neuro-inflammatorischen Erkrankungen (Zhao S et al. 2014).

Neben den Assoziationen der drei oben behandelten Organen zeigen unsere Analysen außerdem, dass Träger des A-Allels an den ersten sieben *Follow-Up*-Tagen ein maximales S-Bilirubin von 5,9 mg/dl aufweisen, G-Homozygote jedoch maximale Werte von > 12 mg/dl erreichen (**Abbildung 14, Tabelle 3**). Daher scheint das Vorhandensein des A-Allels in den ersten Tagen einer Sepsis einen gewissen Schutz darzustellen, ein nach den SOFA-*Sub-Scores* definiertes ( $Sub-Score \geq 3$  SOFA-Punkte) akutes Leberversagen zu entwickeln. Da die Leber selbst durch ihre mannigfaltigen Funktionen ständig mit Antigenen konfrontiert wird, existieren bei ihr auch Toleranz induzierende Mechanismen um Autoimmunreaktionen zu vermeiden (Makarova-Rusher et al. 2015). Teil dessen ist der PD-1/PD-L1-Pfad. So besitzen u.a. Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Sinusendothelzellen die Fähigkeit zur Expression von PD-L1 (Makarova-Rusher et al. 2015). Eine vermehrte Expression von PD-L1 und eine einhergehende Interaktion mit PD-1, die eine pathogenetische Rolle beim hepatozellulären Karzinom einnimmt (Makarova-Rusher et al. 2015), wäre auch bei einer Sepsis denkbar. Ob dieser Schutz des *PDCDI* rs11568821 A-Allels vor einem akuten Leberversagen auch bei größeren, unabhängigen Kollektiven bestätigt werden kann, bleibt zu eruieren. Interessant wäre hierbei auch für die Zukunft, inwiefern und in welchem Ausmaß A-Allel-Träger von anderen infektiös oder autoimmun bedingten hepatischen Störungen betroffen sein könnten. Da ein Leber-*Sub-Score*  $\geq 3$  SOFA-Punkte ein unabhängiger Risikofaktor für ein Versterben darstellt (The EPISEPSIS Study Group 2004), lassen unsere Daten der Bestimmung des *PDCDI* rs11568821-Genotyps deshalb im Hinblick auf die Evaluierung eines möglichen Sepsis-assoziierten Leberversagens eine besonders hohe Bedeutung zukommen. Gleiches gilt für die in dieser Arbeit gezeigten Assoziationen der Patienten mit *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyp mit höheren Herz/Kreislauf-*Sub-Scores*, da dieses Organsystem die höchste relative Beteiligung am Überlebensstatus bei ICU-Entlassung aufweist (Moreno et al. 1999).

Für die Organsysteme Niere und Blut existieren keine Assoziationen des SOFA-*Scores/Sub-Scores* mit einer Genotyp-Gruppe. Gleichwohl kann auf renalen Tubulus-Epithelien eine vermehrte PD-L1-Expression mittels Interferonen induziert werden (Waeckerle-Men et al. 2007). Dass trotz dieser Erkenntnis keine Assoziationen des *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyps mit höheren Dysfunktionen des Organs Niere zu finden waren, lässt sich eventuell auf die AKI-spezifische Pathophysiologie zurückführen, bei der der PD-1/PD-LX-Pfad mit-

tels T<sub>reg</sub>-Zellen eine nephroprotektive Wirkung, zumindest bei einer ischämischen AKI (Jaworska et al. 2015), einnimmt. Die Evaluierung von PD-1 bei einer DIC bleibt noch Gegenstand der Forschung.

Anti-PD-1-Antikörper können bei Sepsis-Modellen (Maus und Mensch) *in vitro* diverse Immunzellfunktionen aufrechterhalten bzw. wiederherstellen und erweisen sich als protektiv in *in vivo* Sepsis-Modellen der Maus (Chang K et al. 2014; Chang K C et al. 2013; Brahmamdam et al. 2010). Die gute Verträglichkeit des anti-PD-1-Antikörpers und dessen Wirksamkeit beim fortgeschrittenen malignen Melanom (Robert et al. 2015; Topalian et al. 2014) stellen dessen Einsatz auch bei Sepsis-Patienten in Aussicht. Der *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyp lässt dabei stärkeren Nutzen von dieser möglichen Therapie erhoffen. Daher leitet sich die Empfehlung ab, die Ergebnisse zukünftiger Studien mit anti-PD-1-Antikörpern auch hinsichtlich des *PDCDI* rs11568821-Genotyps zu stratifizieren.

## 5 Zusammenfassung

Bei steigenden Antibiotika-Resistenzen und älter werdenden Gesellschaften sind Kliniker weltweit in zunehmendem Maße mit der symptomatisch heterogenen Erkrankung der Sepsis konfrontiert. Wechselnde Definitionen und der gescheiterte Einsatz verschiedener Therapeutika zur Behandlung der Sepsis in den letzten Jahrzehnten verdeutlichen die vielen noch existenten Unkenntnisse über dieses Krankheitsbild. Vor allem die hohen Mortalitätsraten der schweren Sepsis und des septischen Schocks begründen den Bedarf an wirksamen und gezielten Therapeutika. Die Pathogenese der Sepsis ist immer noch Gegenstand aktueller Forschung. Eine grundlegende Änderung der letzten Jahre findet sich in der Erkenntnis, dass neben dem „Zytokin-Sturm“ der frühen hyper-inflammatorischen Phase auch negativ ko-stimulierende Rezeptoren einer späteren hypo-inflammatorischen Phase eine Relevanz für die Pathophysiologie der Sepsis besitzen. Einer dieser Rezeptoren ist PD-1. Kodiert wird dieser durch das Gen *PDCDI*. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, inwiefern eine genetische Prädisposition (der *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyp), welche eine mutmaßlich höhere Expression von PD-1 bedeutet, mit einer höheren Dysfunktion verschiedener Organsysteme bei septischen Patienten einhergeht. Dazu wurden bei 300 ICU-Patienten, die nach international anerkannten Kriterien als septisch galten, der *PDCDI* rs11568821-Genotyp aus genomischer DNA bestimmt. Die täglich erhobenen klinischen Parameter, die u.a. den *sequential organ failure assessment (SOFA)-Score* bilden, wurden hinsichtlich dieses SNPs ausgewertet. Mögliche Störvariablen wurden berücksichtigt und ausgeschlossen. Die Analysen dieser Arbeit können erstmals Assoziationen des *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyps mit einer höheren Morbidität der Organsysteme ZNS, Lunge, Herz/Kreislauf und Leber bei Patienten während einer Sepsis aufzeigen. Diese äußern sich in signifikant höheren mittleren *SOFA-Sub-Scores* der Organsysteme Lunge, Herz/Kreislauf und ZNS für den anfänglichen Krankheitsverlauf und in protrahiert höheren mittleren *Sub-Scores* der Organe ZNS und Herz/Kreislauf. Zusätzlich zeigt sich für den anfänglichen Krankheitsverlauf, dass keiner der A-Allel-Träger, im Gegensatz zu den Patienten mit GG-Genotyp, ein akutes Leberversagen entwickelt. Zusätzliche Mortalitätsanalysen belegen Assoziationen des *PDCDI* rs11568821 GG-Genotyps mit einer niedrigeren Überlebensrate und bestätigen damit vorherige Ergebnisse an einem kleineren Kollektiv.

Somit können für das Erkrankungsbild der Sepsis Assoziationen einer genetischen Variation im Gen des negativ ko-stimulierenden Rezeptors PD-1 mit einer höheren Morbidität ausgewählter Organsysteme aufgezeigt werden. Nach einer Validierung dieser Ergebnisse an einem unabhängigen Kollektiv könnte dem SNP *PDCDI* rs11568821 eine Bedeutung sowohl

als prognostischer als auch als prädiktiver Faktor im Zusammenhang mit einer Therapie ausgewählter Sepsis-assoziiierter Organdysfunktionen mit anti-PD-1-Antikörpern im Rahmen der voranschreitenden personalisierten Medizin zuteilwerden.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis G R, Auton A, Brooks L D, DePristo M A, Durbin R M, Handsaker R E, Kang H M, Marth G T, McVean G A (2012): An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56–65
- Abraham E, Singer M (2007): Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* 35, 2408-2416
- Adhikari N K J, Fowler R A, Bhagwanjee S, Rubenfeld G D (2010): Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 376, 1339-1346
- Adib-Conquy M, Cavaillon J-M (2009): Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 101, 36-47
- Afonina I, Zivarts M, Kutyaev I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer R B (1997): Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 25, 2657–2660
- Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T (1996): Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8, 765-772
- Ahmadzadeh M, Johnson L A, Heemskerk B, Wunderlich J R, Dudley M E, White D E, Rosenberg S A (2009): Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537-1544
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783-801
- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R (2002): Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 28, 108–121
- Alvarez I B, Pasquinelli V, Jurado J O, Abbate E, Musella R M, de la Barrera S S, García V E (2010): Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 202, 524-532
- Angus D C (2011): The Search for Effective Therapy for Sepsis Back to the Drawing Board? *JAMA* 306, 2614-2615
- Angus D C, van der Poll T (2013): Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 369, 840-851
- Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M R (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29, 1303–1310
- Ayala A, Elphick G F, Kim Y S, Huang X, Carreira-Rosario A, Santos S C, Shubin N J, Chen Y, Reichner J, Chung CS (2014): Sepsis-Induced Potentiation of Peritoneal Macrophage Migration is mitigated by PD-1 Gene Deficiency. *J Innate Immun* 6, 325-338
- Bagshaw S M, George C, Bellomo R; ANZICS Database Management Committee (2008): Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care* 12, R47

- Balk R (2011): Roger C. Bone, MD and the Evolving Paradigms of Sepsis. *Contrib Microbiol* 17, 1-11
- Barber D L, Wherry E J, Masopust D, Zhu B, Allison J P, Sharpe A H, Freeman G J, Ahmed R (2006): Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687
- Bernard G R, Francois B, Mira J P, Vincent J L, Dellinger R P, Russell J A, Larosa S P, Laterre P F, Levy M M, Dankner W (2014): Evaluating the efficacy and safety of two doses of the polyclonal anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  fragment antibody AZD9773 in adult patients with severe sepsis and/or septic shock: randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Crit Care Med* 42, 504-511
- Bertsias G K, Nakou M, Choulaki C, Raptopoulou A, Papadimitraki E, Goulielmos G, Kritikos H, Sidiropoulos P, Tzardi M, Kardassis D (2009): Genetic, Immunologic, and Immunohistochemical Analysis of the Programmed Death 1/Programmed Death Ligand 1 Pathway in Human Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 60, 207-218
- Beutler B, Milsark I W, Cerami A C (1985): Passive Immunization Against Cachectin/Tumor Necrosis Factor Protects Mice from Lethal Effect of Endotoxin. *Science* 229, 869-871
- Biemond B J, Levi M, ten Cate H, Soule H R, Morris L D, Foster D L, Bogowitz C A, van der Poll T, Büller H R, ten Cate J W (1995): Complete inhibition of endotoxin-induced coagulation activation in chimpanzees with a monoclonal Fab fragment against factor VII/VIIIa. *Thromb Haemost* 73, 223-230
- Blackburn S D, Shin H, Freeman G J, Wherry E J (2008): Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by  $\text{PD-L1}$  blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15016-15021
- Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, Collado J, García-Labattut A, Carriedo D, Valledor M (2008): Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 12, R158
- Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M H, Sibbald W J, Abrams J H, Bernard G R (1992): American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20, 864-874
- Bone R C, Grodzin C J, Balk R A (1997): Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest* 112, 235-243
- Boomer J S, To K, Chang K C, Takasu O, Osborne D F, Walton A H, Bricker T L, Jarman S D 2nd, Kreisel D, Krupnick A S (2011): Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306, 2594-2605
- Boomer J S, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss R S, Green J M (2012): A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 16, R112
- Bosmann M, Ward P A (2013): The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* 34, 129-136
- Bota D P, Melot C, Ferreira F L, Ba V N, Vincent J-L (2002): The Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) versus the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score in outcome prediction. *Intensive Care Med* 28, 1619-1624
- Botero J S H und Pérez M C F: The History of Sepsis from Ancient Egypt to the XIX

- Century; in: Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge; hrsg. v. Azevedo L; InTech Publishing 2012, 3-32
- Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, Chang K C, McDunn J E, Hotchkiss R S (2010): Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol* 88, 233-240
- Brown J A, Dorfman D M, Ma F R, Sullivan E L, Munoz O, Wood C R, Greenfield E A, Freeman G J (2003): Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 170, 1257-1266
- Bustin S A (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39
- Campbell N A und Reece J B: Biologie. 8., aktualisierte Auflage; Pearson Education, München 2009
- Chang K C, Burnham C A, Compton S M, Rasche D P, Mazuski R J, McDonough J S, Unsinger J, Korman A J, Green J M, Hotchkiss R S (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 K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, Sato B, Rasche D, Wilson S, Robbins P, Ulbrandt N, Suzich J, Green J (2014): Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care* 18, R3
- Chemnitz J M, Parry R V, Nichols K E, June C H, Riley J L (2004): SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173, 945-954
- Christaki E, Giamarellos-Bourboulis E J (2014): The beginning of personalized medicine in sepsis: small steps to a bright future. *Clin Genet* 86, 56-61
- Davies N W (1990): Modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in skeletal muscle by intracellular protons. *Nature* 343, 375-377
- Dellinger R P, Levy M M, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal S M, Sevransky J E, Sprung C L, Douglas I S, Jaeschke R (2013): Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 41, 580-637
- Dewar D C, White A, Attia J, Tarrant S M, King K L, Balogh Z J (2014): Comparison of postinjury multiple-organ failure scoring systems: Denver versus Sequential Organ Failure Assessment. *J Trauma Acute Care Surg* 77, 624-629
- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L (1999): B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5, 1365-1369
- Dong H, Strome S E, Salomao D R, Tamura H, Hirano F, Flies D B, Roche P C, Lu J, Zhu G, Tamada K (2002): Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-801
- Duraiswamy J, Ibegbu C C, Masopust D, Miller J D, Araki K, Doho G H, Tata P, Gupta S, Zilliox M J, Nakaya H I (2011): Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol* 186, 4200-4212

- Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D (2007): Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med* 33, 941-950
- Engel C, Brunkhorst F M, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, Mayer J S (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33, 606–618
- Erickson J J, Gilchuk P, Hastings A K, Tollefson S J, Johnson M, Downing M B, Boyd K L, Johnson J E, Kim A S, Joyce S (2012): Viral acute lower respiratory infections impair CD8+ T cells through PD-1. *J Clin Invest* 122, 2967-2982
- Felmet K A, Hall M W, Clark R S, Jaffe R, Carcillo J A (2005): Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol* 174, 3765-3772
- Ferreira F L, Bota D P, Bross A, Mélot C, Vincent J-L (2001): Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients. *JAMA* 286, 1754-1758
- Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino J J, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, Liz M, Martin J, Ordi J, Vicario JL (2004): Association of PDCD1 With Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: Evidence of Population-Specific Effects. *Arthritis Rheum* 50, 2590-2597
- Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli F N, Marchini M, Scorza R, Migliaresi S, Sebastiani G D, Endreffy E, Mavromati M (2007): Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun* 8, 138-146
- Finger L R, Pu J, Wasserman R, Vibhakar R, Louie E, Hardy R R, Burrows P D, Billips L G (1997): The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene* 197, 177-187
- Finigan J H, Dudek S M, Singleton P A, Chiang E T, Jacobson J R, Camp S M, Ye S Q, Garcia J G (2005): Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *J Biol Chem* 280, 17286-17293
- Förster T (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 6, 55–75
- Francisco L M, Salinas V H, Brown K E, Vanguri V K, Freeman G J, Kuchroo V K, Sharpe A H (2009): PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 3015-3029
- Fuchs T A, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers D D, Wroblewski S K, Wakefield T W, Hartwig J H, Wagner D D (2010): Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15880-15885
- Galley H F (2011): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth* 107, 57-64
- Gavard J, Hou X, Qu Y, Masedunskas A, Martin D, Weigert R, Li X, Gutkind J S (2009): A Role for a CXCR2/Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  Signaling Axis in Acute and Chronic Vascular Permeability. *Mol Cell Biol* 29, 2469-2480
- Geroulanos S, Douka E T (2006): Historical perspective of the word “sepsis”. *Intensive Care Med* 32, 2077



- Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum J A (2014): A Unified Theory of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: Inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury. *Shock* 41, 1-18
- Gotot J, Gottschalk C, Leopold S, Knolle PA, Yagita H, Kurts C, Ludwig-Portugall I (2012): Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10468-10473
- Griscavage J M, Wilk S, Ignarro L J (1996): Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci* 93, 3308-3312
- Grmek M D: Diseases in the Ancient Greek World. The Johns Hopkins University Press, Baltimore 1991
- Gröger M, Pasteiner W, Ignatyev G, Matt U, Knapp S, Atrasheuskaya A, Bukin E, Friedl P, Zinkl D, Hofer-Warbinek R (2009): Peptide Bb15-42 Preserves Endothelial Barrier Function in Shock. *PLoS One* 4, 1-11
- Gross S S, Jaffe E A, Levi R, Kilbourn RG (1991): Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 823-829
- Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, Malcus C, Chéron A, Allaouchiche B, Gueyffier F (2011): Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* 15, R99
- Guitton C, Gérard N, Sébille V, Bretonnière C, Zambon O, Villers D, Charreau B (2011): Early rise in circulating endothelial protein C receptor correlates with poor outcome in severe sepsis. *Intensive Care Med* 37, 950-956
- Hagel S, Brunkhorst F (2011): Sepsis. *Intensivmed* 48, 57-73
- Haynes N M, Allen C D, Lesley R, Ansel K M, Killeen N, Cyster J G (2007): Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 179, 5099-5108
- Holland P M, Abramson R D, Watson R, Gelfand D H (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280
- Hotchkiss R S, Coopersmith C M, McDunn J E, Ferguson T A (2009): The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 15, 496-497
- Hotchkiss R S, Monneret G, Payen D (2013): Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13, 260-268
- Hu H, Li X, Li Y, Wang L, Mehta S, Feng Q, Chen R, Peng T (2009): Calpain-1 in duces apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells under septic conditions. *Microvasc Res* 78, 33-39
- Huang H, Xu R, Lin F, Bao C, Wang S, Ji C, Li K, Jin L, Mu J, Wang Y (2015): High

- circulating CD39(+) regulatory T cells predict poor survival for sepsis patients. *Int J Infect Dis* 30, 57-63
- Huang S, Salituro J, Tang N, Luk K-C, Hackett J Jr, Swanson P, Cloherty G, Mak W B, Robinson J, Abravaya K (2007): Thermodynamically modulated partially double-stranded linear DNA probe design for homogeneous real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 35, e101
- Huang X, Venet F, Wang Y L, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, Swan R, Kherouf H, Monneret G, Chung C S (2009): PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6303-6308
- Huang X, Chen Y, Chung C S, Yuan Z, Monaghan S F, Wang F, Ayala A (2014): Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/ pro-inflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis. *J Immunol* 192, 1091-1099
- Hutchins N A, Unsinger J, Hotchkiss R S, Ayala A (2014): The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med* 20, 224-233
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T (1992): Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11, 3887-3895
- Janssens U, Graf C, Graf J, Radke P W, Königs B, Koch K C, Lepper W, vom Dahl J, Hanrath P (2000): Evaluation of the SOFA score: a single-center experience of a medical intensive care unit in 303 consecutive patients with predominantly cardiovascular disorders. *Intensive Care Med* 26, 1037-1045
- Jaworska K, Ratajczak J, Huang L, Whalen K, Yang M, Stevens B K, Kinsey G R (2015): Both PD-1 ligands protect the kidney from ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 194, 325-333
- Johansson M, Arlestig L, Möller B und Rantapää-Dahlqvist S (2005): Association of a PDCD1 Polymorphism With Renal Manifestations in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 52, 1665-1669
- Johnson S B, Lissauer M, Bochicchio G V, Moore R, Cross A S, Scalea T M (2007): Gene Expression Profiles Differentiate Between Sterile SIRS and Early Sepsis. *Ann Surg* 245, 611-621
- Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, Pettilä V, Parviainen I, Ala-Kokko T I, Kolho E, Rintala E M (2007): Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med* 33, 435-443
- Keir M E, Liang S C, Guleria I, Latchman Y E, Qipo A Albacker L A, Koulmanda M, Freeman G J, Sayegh M H, Sharpe A H (2006): Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203, 883-895
- Keir M E, Butte M J, Freeman G J, Sharpe A H (2008): PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26, 677-704
- Kellum J A, Lameire N (2013): Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care* 17, 1-15
- Keung E C, Li Q (1991): Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *J Clin Invest* 88, 1772-1777

- Kimchi A, Ellrodt A G, Berman D S, Riedinger M S, Swan H J, Murata G H (1984): Right Ventricular Performance in Septic Shock: A Combined Radionuclide and Hemodynamic Study. *J Am Coll Cardiol* 4, 945-951
- Kinter A L, Godbout E J, McNally J P, Sereti I, Roby G A, O'Shea M A, Fauci A S (2008): The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 181, 6738-6746
- Klein D J, Foster D, Schorr C A, Kazempour K, Walker P M, Dellinger R P (2014): The EU PHRATES trial (Evaluating the Use of Polymyxin B Hemoperfusion in a Randomized controlled trial of Adults Treated for Endotoxemia and Septic shock): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 15, 218-232
- Knaus W A, Zimmerman J E, Wagner D P, Draper E A, Lawrence D E (1981): APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 9, 591-597
- Knaus W A, Draper E A, Wagner D P, Zimmerman J E (1985): APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13, 818-829
- Kong E K, Prokunina-Olsson L, Wong W H, Lau C S, Chan T M, Alarcón-Riquelme M, Lau Y L (2005): New Haplotype of PDCD1 Is Associated With Rheumatoid Arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum* 52, 1058-1062
- Königsrainer I, Türck M H, Eisner F, Meile T, Hoffmann J, Küper M, Zieker D, Glatzle J (2011): The Gut is not only the Target but a Source of Inflammatory Mediators Inhibiting Gastrointestinal Motility During Sepsis. *Cell Physiol Biochem* 28, 753-760
- Kristjansdottir H, Steinsson K, Gunnarsson I, Gröndal G, Erlendsson K, Alarcón-Riquelme M E (2010): Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4+CD25+ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62, 1702-1711
- Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka K V, Mäurer M, Wiendl H (2005): A PD-1 Polymorphism Is Associated with Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 58, 50-57
- Kuipers H, Muskens F, Willart M, Hijdra D, van Assema F B, Coyle A J, Hoogsteden H C, Lambrecht B N (2006): Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur J Immunol* 36, 2472-2482
- Lagu T, Rothberg M B, Shieh M S, Pekow P S, Steingrub J S, Lindenauer P K (2012): Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med* 40, 754-761
- Landry D W, Oliver J A (2001): The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 345, 588-595
- Landry D W, Levin H R, Gallant E M, Ashton R C Jr, Seo S, D'Alessandro D, Oz M C, Oliver J A (1997): Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 95, 1122-1125
- Latchman Y, Wood C R, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long A J, Brown J A, Nunes R (2001): PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2, 261-268

- Lee L G, Connell C R, Bloch W (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761–3766
- Lee W L, Liles W C (2011): Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol* 18, 191-196
- Lei G S, Zhang C, Lee C H (2015): Myeloid-derived suppressor cells impair alveolar macrophages through PD-1 receptor ligation during *Pneumocystis pneumonia*. *Infect Immun* 83, 572-582
- Levi M, van der Poll T (2013): Thrombomodulin in sepsis. *Minerva Anesthesiol* 79, 294-298
- Levy M M, Fink M P, Marshall J C, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal S M, Vincent J-L, Ramsay G (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31, 1250-1256
- Limaye A P, Kirby K A, Rubenfeld G D, Leisenring W M, Bulger E M, Neff M J, Gibran N S, Huang M L, Santo Hayes T K, Corey L (2008): Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 300, 413-422
- Lipson E J, Sharfman W H, Drake C G, Wollner I, Taube J M, Anders R A, Xu H, Yao S, Pons A, Chen L (2013): Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 19, 462-468
- Liu C, Jiang J, Gao L, Hu X, Wang F, Shen Y, Yu G, Zhao Z, Zhang X (2014): Promoter Region Polymorphism in PDCD-1 Gene Is Associated with Risk of Rheumatoid Arthritis in the Han Chinese Population of Southeastern China. *Int J Genomics* Article ID 247637, 8 Seiten
- Macedo E, Bouchard J, Soroko S H, Chertow G M, Himmelfarb J, Ikizler T A, Paganini E P, Mehta R L; Program to Improve Care in Acute Renal Disease Study (2010): Fluid accumulation, recognition and staging of acute kidney injury in critically-ill patients. *Crit Care* 14, R82
- Majno G (1991): The Ancient Riddle of  $\sigma\eta\upsilon\iota\varsigma$  (Sepsis). *J Infect Dis* 163, 937-945
- Makarova-Rusher O V, Medina-Echeverz J, Duffy A G, Greten T F (2015): The yin and yang of evasion and immune activation in HCC. *J Hepatol* 62, 1420-1429
- 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
- Martin G S, Mannino D M, Eaton S, Moss M (2003): The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348, 1546–1554
- Matsuura I, Denissova N G, Wang G, He D, Long J, Liu F (2004): Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 430, 226-231
- McNally B, Ye F, Willette M, Flaño E (2013): Local blockade of epithelial PDL-1 in the airways enhances T cell function and viral clearance during influenza virus infection. *J Virol* 87, 12916-12924
- Moreno R, Vincent J-L, Matos R, Mendonca A, Cantraine F, Thijs L, Takala J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H (1999): The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective multicentre study. *Intensive Care Med* 25, 686-696

- Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K (2005): Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 50, 264-266
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263-273
- Murphy S L, Kochanek K D, Xu J, Heron M (2015): Deaths: Final Data for 2012. *Natl Vital Stat Rep* 63, 1-118
- Newby P R, Roberts-Davies E L, Brand O J, Heward J M, Franklyn J A, Gough S C, Simmonds M J (2007): Tag SNP screening of the PDCD1 gene for association with Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67, 125-128
- Nguyen L T, Ohashi P S (2015): Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol* 15, 45-56
- Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen B B, Lillevang S T (2003): Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62, 492-497
- Nielsen C, Laustrop H, Voss A, Junker P, Husby S, Lillevang S T (2004): A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 13, 510-516
- Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T (1998): Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10, 1563-1572
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T (2001): Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319-322
- Noble R B, Cutts J. H (1967): Separation of Blood Leukocytes by Ficoll Gradient. *Can Vet J.* 8, 110-111
- Oda S, Hirasawa H, Sugai T, Shiga H, Nakanishi K, Kitamura N, Sadahiro T, Hirano T (2000): Comparison of Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score and CIS (cellular injury score) for scoring of severity for patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Intensive Care Med* 26, 1786-1793
- Ognibene F P, Parker M M, Natanson C, Shelhamer J H, Parrillo J E (1988): Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest* 93, 903-910
- Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T (2001): PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13866-13871
- Okazaki T, Iwai Y, Honjo T (2002): New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr Opin Immunol* 14, 779-782
- Opal S M, Dellinger R P, Vincent J-L, Masur H, Angus D C (2014): The Next Generation of Sepsis Clinical Trial Designs: What Is Next After the Demise of Recombinant Human Activated Protein C? *Crit Care Med* 42, 1714-1721

- Otto G P, Sossdorf M, Claus R A, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann N C (2011): The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 15, R183
- Parker M M, Shelhamer J H, Bacharach S L, Green M V, Natanson C, Frederick T M, Damske B A, Parrillo J E (1984): Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 100, 483-490
- Parker M M, McCarthy K E, Ognibene F P, Parrillo J E (1990): Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest* 97, 126-131
- Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis V A (2012): Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal* 5, ra46
- Paugam-Burtz C, Albuquerque M, Baron G, Bert F, Voitot H, Delefosse D, Dondero F, Sommacale D, Francoz C, Hanna N (2010): Plasma Proteome to Look for Diagnostic Biomarkers of Early Bacterial Sepsis after Liver Transplantation. *Anesthesiology* 112, 926-935
- Pawlinski R, Mackman N (2010): Cellular Sources of Tissue Factor in Endotoxemia and Sepsis. *Thromb Res* 125, 70-73
- Peng X, Chen H, Draney D R, Volcheck W, Schutz-Geschwender A, Olive D M (2009): A nonfluorescent, broad-range quencher dye for Förster resonance energy transfer assays. *Anal Biochem* 388, 220-228
- Pettilä V, Pettilä M, Sarna S, Voutilainen P, Takkunen O (2002): Comparison of multiple organ dysfunction scores in the prediction of hospital mortality in the critically ill. *Crit Care Med* 30, 1705-1711
- Pinsky M R, Vincent J L, Deviere J, Alegre M, Kahn R J, Dupont E (1993): Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 103, 565-575
- Pittet C L, Newcombe J, Antel J P, Arbour N (2011 a): The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. *Glia* 59, 841-856
- Pittet C L, Newcombe J, Prat A, Arbour N (2011 b): Human brain endothelial cells endeavor to immunoregulate CD8 T cells via PD-1 ligand expression in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 8, 155
- Probst H C, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M (2005): Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6, 280-286
- Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes A J, Tentler D, Kristjansdóttir H, Gröndal G (2002): A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 32, 666-669
- Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman V A, Olson J L, Seldin M F, Criswell L A, Alarcón-Riquelme M E (2004 a): The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 50, 327-328

- Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J, Alfredsson L, Klareskog L, Alarcón-Riquelme M (2004 b): Association of the PD-1.3A Allele of the PDCD1 Gene in Patients With Rheumatoid Arthritis Negative for Rheumatoid Factor and the Shared Epitope. *Arthritis Rheum* 50, 1770-1773
- Quayle J M, Nelson M T, Standen N B (1997): ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77, 1165-1232
- Ranieri V M, Thompson B T, Barie P S, Dhainaut J-F, Douglas I V, Finfer S, Gardlund B, Marshall J C, Rhodes A, Artigas A (2012): Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *N Engl J Med* 366, 2055-2064
- Reinhart K, Brunkhorst F M, Bone H-G, Bardutzky J, Dempfle C-E, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S (2010): Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Anaesthesist* 59, 347-370
- Rittirsch D, Flierl M A, Ward P A (2008): Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8, 776-787
- Robert C, Schachter J, Long G V, Arance A, Grob J J, Mortier L, Daud A, Carlino M S, McNeil C, Lotem M (2015): Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 372, 2521-2532
- Rodig N, Ryan T, Allen J A, Pang H, Grabie N, Chernova T, Greenfield E A, Liang S C, Sharpe A H, Lichtman A H (2003): Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol* 33, 3117-3126
- Roger P M, Hyvernat H, Breittmayer J P, Dunais B, Dellamonica J, Bernardin G, Bernard A (2009): Enhanced T-cell apoptosis in human septic shock is associated with alteration of the costimulatory pathway. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 575-584
- Rubinfeld G D, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin D P, Neff M, Stern E J, Hudson L D (2005): Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *N Engl J Med* 353, 1685-1693
- Sanghera D K, Manzi S, Bontempo F, Nestlerode C, Kamboh M I (2004): Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. *Hum Genet* 115, 393-398
- Schottmüller H: Wesen und Behandlung der Sepsis. In: Weintraud W (Hrsg.): *Verhandlungen des Deutschen Kongresses für Innere Medizin*. Band 31; Verlag von J. F. Bergmann, Wiesbaden 1914, 257-280
- Seko Y, Yagita H, Okumura K, Azuma M, Nagai R (2007): Roles of programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligands pathway in the development of murine acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Cardiovasc Res* 75, 158-167
- Semeraro N, Ammollo C T, Semeraro F, Colucci M (2012): Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res* 129, 290-195
- Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T (1994): Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 23, 704-706
- Simmons J, Pittet J-F (2015): The coagulopathy of acute sepsis. *Curr Opin Anesthesiol* 28, 227-236

- Staples K J, Nicholas B, McKendry R T, Spalluto C M, Wallington J C, Bragg C W, Robinson E C, Martin K, Djukanović R, Wilkinson T M (2015): Viral infection of human lung macrophages increases PDL1 expression via IFN $\beta$ . *PLoS One* 10, e0121527
- Su L, Cao L, Zhou R, Jiang Z, Xiao K, Kong W, Wang H, Deng J, Wen B, Tan F (2013): Identification of Novel Biomarkers for Sepsis Prognosis via Urinary Proteomic Analysis Using iTRAQ Labeling and 2D-LC-MS/MS. *PLoS One* 8, 1-9
- Suffredini A F, Fromm R E, Parker M M, Brenner M, Kovacs J A, Wesley R A, Parrillo J E (1989): The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 321, 280-287
- Sullivan R (1996): Thales to Galen: a brief journey through rational medical philosophy in ancient Greece. Part I: pre-Hippocratic medicine. *Proc R Coll Physicians Edinb* 26, 135–142
- Takazono T, Nakamura S, Imamura Y, Yoshioka S, Miyazaki T, Izumikawa K, Sawai T, Matsuo N, Yanagihara K, Suyama N (2014): A retrospective comparative study of recombinant human thrombomodulin and gabexate mesilate in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation patients. *J Infect Chemother* 20, 484-488
- Takeuchi O, Akira S (2010): Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805-820
- Telcian A G, Laza-Stanca V, Edwards M R, Harker J A, Wang H, Bartlett N W, Mallia P, Zdrenghea M T, Keadze T, Coyle A J (2011): RSV-induced bronchial epithelial cell PD-L1 expression inhibits CD8<sup>+</sup> T cell nonspecific antiviral activity. *J Infect Dis* 203, 85-94
- Topalian S L, Sznol M, McDermott D F, Kluger H M, Carvajal R D, Sharfman W H, Brahmer J R, Lawrence D P, Atkins M B, Powderly J D (2014): Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 32, 1020-1030
- Tseng S Y, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky J E, Pai S I, Shalabi A, Shin T, Pardoll D M, Tsuchiya H (2001): B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193, 839-846
- The ARDS Definition Task Force (2012): Acute Respiratory Distress Syndrome. The Berlin Definition. *JAMA* 307, 2526-2533
- The EPISEPSIS Study Group (2004): EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 30, 580–588
- Thibault M L, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, Chevalier B, Olive D (2013): PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* 25, 129-137
- van der Poll T, Levi M (2012): Crosstalk between inflammation and coagulation: the lessons of sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 10, 632-638
- van Deventer S J, Büller H R, ten Cate J W, Aarden L A, Hack C E, Sturk A (1990): Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 76, 2520-2526
- van Gestel A, Bakker J, Veraart CP, van Hout BA (2004): Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Crit Care* 8, R153-R162



- Velázquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreño-Manjarrez R, Solís-Vallejo E, López-Lara N D, Ruiz-López I K, Rodríguez-Lozano A L, Estrada-Gil J K, Jiménez-Sánchez G (2007): Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 15, 336-341
- Vincent J-L, Abraham E (2006): The Last 100 Years of Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 256-263
- Vincent J-L, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart C K, Suter P M, Thijs L G (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 22, 707-710
- Vincent J-L, De Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter P, Sprung C L, Colardyn F, Blecher S (1998): Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 26, 1793-1800
- Vincent J-L, Sakr Y, Sprung C L, Ranieri V M, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Gall J-R, Payen D (2006): Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study\*. *Crit Care Med* 34, 344-353
- Waage A, Halstensen A, Espevik T (1987): Association between Tumor Necrosis Factor in Serum and Fatal Outcome in Patients with Meningococcal Disease. *Lancet* 329, 355-357
- Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T (1989): The Complex Pattern of Cytokines in Serum from Patients with Meningococcal Septic Shock. *J Exp Med* 169, 333-338
- Wacker C, Prkno A, Brunkhorst F M, Schlattmann P (2013): Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 13, 426-435
- Waeckerle-Men Y, Starke A, Wahl P R, Wüthrich R P (2007): Limited costimulatory molecule expression on renal tubular epithelial cells impairs T cell activation. *Kidney Blood Press Res* 30, 421-429
- Weber G F, Chousterman B G, He S, Fenn A M, Nairz M, Anzai A, Brenner T, Uhle F, Iwamoto Y, Robbins C S (2015): Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 347, 1260-1265
- Weisel R D, Vito L, Dennis R C, Valeri C R, Hechtman H B (1977): Myocardial depression during sepsis. *Am J Surg* 133, 512-521
- Wherry E J, Ha S J, Kaeck S M, Haining W N, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman J N, Barber D L, Ahmed R (2007): Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27, 670-684
- Williams S C P (2012): After Xigris, researchers look to new targets to combat sepsis. *Nat Med* 18, 1001
- Xie Q-w, Nathan C (1994): The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* 56, 576-582
- Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo C T, Semeraro F, Taylor F B, Esmon N L, Lupu F, Esmon C T (2009): Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15, 1318-1321

- Yamakawa K, Ogura H, Fujimi S, Morikawa M, Ogawa Y, Mohri T, Nakamori Y, Inoue Y, Kuwagata Y, Tanaka H (2013): Recombinant human soluble thrombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis. *Intensive Care Med* 39, 644-652
- Yang M, Zou Y, Bai Y, Li M (2015): The programmed cell death 1 gene polymorphisms (PD 1.3 G/A, PD 1.5 C/T and PD 1.9 C/T) and susceptibility to ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *J Orthop Sci* 20, 55-63
- Young G B (2013): Encephalopathy of Infection and Systemic Inflammation. *J Clin Neurophysiol* 30, 454-461
- Youngblood B, Oestreich K J, Ha S J, Duraiswamy J, Akondy R S, West E E, Wei Z, Lu P, Austin J W, Riley J L (2011): Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 35, 400-412
- Zhang Q H, Sheng Z Y, Yao Y M (2014): Septic encephalopathy: when cytokines interact with acetylcholine in the brain. *Mil Med Res* 1, 20-28
- Zhang Y, Zhou Y, Lou J, Li J, Bo L, Zhu K, Wan X, Deng X, Cai Z (2010): PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care* 14, R220
- 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
- Zhao S, Li F, Leak R K, Chen J, Hu X (2014): Regulation of Neuroinflammation through Programmed Death-1/Programmed Death Ligand Signaling in Neurological Disorders. *Front Cell Neurosci* 8, 271
- Zhao Y, Encinosa W: The Costs of End-of-Life Hospitalizations, 2007: Statistical Brief #81. Healthcare Cost and Utilization Project, Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD) 2010
- Zimmerman G A, McIntyre T M, Prescott S M, Stafforini D M (2002): The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 30, 294-301
- Zinselmeyer B H, Heydari S, Sacristán C, Nayak D, Cammer M, Herz J, Cheng X, Davis S J, Dustin M L, McGavern D B (2013): PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *J Exp Med* 210, 757-774

## 6.1 Internetquellen

[http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr63/nvsr63\\_09.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr63/nvsr63_09.pdf); Zugriff am 20.10.2015

<http://www.gbe-bund.de/> Suchbegriff „Sterbefälle, Sterbeziffer, Ränge, Anteile der 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998); Zugriff am 15.10.2015

<http://www.ema.europa.eu/ema/> Suchbegriffe „Nivolumab“ und „Pembrolizumab“; Zugriff am 15.10.2015

<http://www.1000genomes.org/home>; Zugriff am 21.04.2014

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF363458>; Zugriff am 23.10.2015

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5133>; Zugriff am 28.10.2015

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11568821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11568821); Zugriff am 28.10.2015

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11568821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=11568821); Zugriff am 21.04.2014

[https://www.gbo.com/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Product\\_Flyers/Product\\_Flyers\\_BioScience/F071043\\_Leucosep\\_Manual.pdf](https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Product_Flyers/Product_Flyers_BioScience/F071043_Leucosep_Manual.pdf); Zugriff am 22.10.2015

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/general-documents/cms\\_042315.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general-documents/cms_042315.pdf); Zugriff am 22.10.2015

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/general-documents/cms\\_050341.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general-documents/cms_050341.pdf); Zugriff am 22.10.2015

<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>; Zugriff am 22.10.2015

## Danksagung

Mein ganzer Dank gebührt Frau Prof. Dr. rer. nat. Sabine Mihm: Unter ihrer exzellenten Betreuung entstand diese Dissertationsschrift. Ihre große wissenschaftliche Kompetenz sowie ihre kritische Betrachtung waren für mich immer wieder ein Vorbild, diese Arbeit bestmöglich zu durchdenken und zu verfassen. Bei unseren Treffen war sie allzeit darauf bedacht, mir wissenschaftliche Vorgehensweisen und aktuelle Entwicklungen nahezubringen. Ohne das Engagement von Frau Prof. Dr. Mihm würde die vorliegende Arbeit nicht wie in der aktuellen Form bestehen. Dafür, dass sie sich unentwegt Zeit für meine Anliegen nahm, kann ich ihr kaum in ausreichendem Maße danken.

Herrn Dr. med. Ashham Mansur (Klinik für Anaesthesiologie) möchte ich ein großes Dankeschön aussprechen: Als Studienarzt war er jederzeit kontaktierbar und stets bemüht, eine geeignete Lösung zu finden. Von ihm habe ich sehr viel gelernt, was den Umgang sowohl mit ärztlichen Kollegen und Pflegepersonal als auch mit Patienten und deren Angehörigen im besonderen Umfeld einer Intensivstation betrifft. Auch bekam ich durch ihn einen Einblick in Vorgänge innerhalb einer wissenschaftlichen Studie. Für das Korrekturlesen betreffend die klinischen Anteile meiner Arbeit möchte ich ihm ebenfalls danken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Waltraut Kopp, MTLA in der Klinik für Gastroenterologie. Geduldig vermittelte sie mir Fähigkeiten und Kenntnisse der Laborarbeit. Ihre offene, freundliche und ungezwungene Art schuf eine gänzlich angenehme Arbeitsatmosphäre und bei technischen Fragen stand sie mir selbstlos mit Rat und Tat zur Seite.

Frau Xenia Schulz und Herrn PD Dr. Klaus Jung aus der Einrichtung „Zentrale Serviceeinheit Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik“ möchte ich vielmals für ihre Beratung zu den statistischen Untersuchungen danken. Insbesondere für den Einblick in die Transformation einer zu eruiierenden Hypothese hin zu der Anwendung eines statistischen Tests und für die Analyse und Lösung STATISTICA-bezogener Problematiken möchte ich mich bedanken. Frau Schulz gebührt darüber hinaus der Dank, mir eine Beratung per E-Mail ermöglicht zu haben.

---

Gleichfalls möchte ich mich für das Korrekturlesen der klinischen Anteile dieser Arbeit bei Herrn Prof. Dr. med. José Hinz (Geschäftsfeldleiter Anästhesie) bedanken.

Da ich 9 Monate an dem GenoSep-Projekt mitgewirkt habe, möchte ich folgenden - direkt oder indirekt - involvierten Personen für die tagtäglich angenehme Zusammenarbeit in diesem Zeitraum danken:

- Den *study nurses* Andrea Kernchen und Claudia Ottersbach
- Allen Oberärzten der Intensivstationen 0117, 0118 und 1014 der UMG, hier besonders Dr. med. Dr. rer. nat. Joachim Martell, der, kurz vor dem Eintritt in seinen Ruhestand, immerzu ein interessanter Gesprächspartner war.
- Den Stationsärzten und dem Pflegepersonal der genannten Stationen
- Thomas Schulze (Klinik für Anaesthesiologie) für die Lösung informationstechnischer Probleme

Ein Dankeschön geht auch an die Promovenden, die vor mir an der Erstellung der Datenbank mitgewirkt haben: Yvonne Klee, Chang-Ho Hong, Simon Wilmers, Luisa von Gruben und Bronja Hillebrecht. Ein besonderer Dank geht dabei an Yvonne Klee für die Einarbeitung in die Patientenrekrutierung und -nachverfolgung und an Chang-Ho Hong für die Einführung in das Gewinnen und Asservieren von Vollblut- und Serumproben. Für die kurzweilige Zusammenarbeit bei der tagtäglichen Patientenrekrutierung, -nachverfolgung und dem Gewinnen und Asservieren von Vollblut- und Serumproben möchte ich dem Promovenden Maximilian Steinau danken.