

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

**Einfluss genetischer Varianten der
negativ-kostimulierenden T-Zell-
Inhibitoren TIM-3 und LAG-3 auf das
Outcome von Patienten mit Sepsis**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Tessa Anna Alexander

aus

Düsseldorf

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. A. Mansur

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

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. A. Mansur

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

Datum der mündlichen Prüfung: 19. März 2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss genetischer Varianten der negativ-kostimulierenden T-Zell-Inhibitoren TIM-3 und LAG-3 auf das *Outcome* von Patienten mit Sepsis" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Dissertation basiert, wurden teilweise publiziert:

Mewes C, **Alexander T**, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Beißbarth T, Tzvetkov M, Grade M et al. (2020): TIM-3 genetic variants are associated with altered clinical outcome and susceptibility to gram-positive infections in patients with sepsis. *Int J Mol Sci* 21, 8318

Mewes C, **Alexander T**, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Beißbarth T, Tzvetkov M, Grade M, Quintel M et al. (2021): Effect of the Lymphocyte Activation Gene 3 Polymorphism rs951818 on Mortality and Disease Progression in Patients with Sepsis—A Prospective Genetic Association Study. *J Clin Med* 10, 5302

Die Daten, auf denen die vorliegende Dissertation basiert, wurden teilweise im Supplement des Deutschen Anästhesiekongresses (DAC) publiziert:

Alexander T, Mewes C, Hinz J, Ghadimi M, Alpert A, Meissner K, Quintel M, Shen-Orr S, Bergmann I, Mansur A (2020): Genetische Varianten des T-Zell-Rezeptors TIM-3 sind mit einer niedrigeren Mortalität bei septischen Patienten assoziiert. *Anästh Intensivmed* 61, 250

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis.....	1
1.1.1 Historische Entwicklung der Sepsis-Definition.....	1
1.1.2 Aktuelle Sepsis-3 Definition und Diagnose.....	2
1.1.3 Epidemiologischer und ökonomischer Aspekt.....	5
1.1.4 Pathophysiologie.....	6
1.1.5 Therapieansätze.....	11
1.2 T-Zell-Inhibitoren.....	13
1.2.1 TIM-3.....	14
1.2.2 LAG-3.....	18
1.3 Das menschliche Genom und die untersuchten SNPs.....	22
1.3.1 TIM-3 rs1036199	23
1.3.2 TIM-3 rs10515746	23
1.3.3 LAG-3 rs870849	24
1.3.4 LAG-3 rs951818	24
1.4 Zentrale Fragestellung.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Patienteneinschluss.....	26
2.2 Pflege der Patientendaten.....	27
2.2.1 <i>Clinical report form</i> (CRF)	28
2.2.2 Arbeitsgruppe „Personalisierte Medizin“.....	30
2.3 Material.....	31
2.3.1 Substanzen	31
2.3.2 <i>Kits</i> und Genotypisierungs <i>assays</i>	31
2.3.3 Gebrauchswaren	31
2.3.4 Geräte	32
2.3.5 Softwareprogramme	32
2.4 Methoden.....	33
2.4.1 Extraktion und Photometrie genomischer DNA	33
2.4.2 Genotypisierung.....	34
2.5 Statistische Auswertung	38
3 Ergebnisse	40
3.1 Patientenkollektiv.....	40
3.1.1 Genotypenverteilung.....	40
3.1.2 Vorliegende Patientencharakteristika bei TIM-3	42

3.1.3	Vorliegende Patientencharakteristika bei LAG-3	47
3.2	Überlebenszeitanalysen	52
3.3	Krankheitsschwere und -verlauf.....	57
3.4	Mikrobiologische Analyse.....	65
3.5	Multivariate Cox-Regressionsanalyse.....	69
4	Diskussion	75
4.1	Diskussion der zentralen Fragestellung.....	75
4.2	Weitere Besonderheiten	84
4.3	Mögliche Limitationen	88
4.4	Fazit und Ausblick	89
5	Zusammenfassung	90
6	Anhang.....	92
7	Literaturverzeichnis.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pro- und anti-inflammatorische Immunantwort während der Sepsis	8
Abbildung 2: Pathophysiologie des Organversagens während der Sepsis	10
Abbildung 3: TIM-3 - struktureller Aufbau und Ligandeninteraktion	16
Abbildung 4: LAG-3 - struktureller Aufbau und Ligandeninteraktion	20
Abbildung 5: Allelische Diskriminierung - TIM-3 rs1036199, Platte 9 & 10	37
Abbildung 6: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs1036199	52
Abbildung 7: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs1036199	53
Abbildung 8: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs10515746	53
Abbildung 9: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs10515746	54
Abbildung 10: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs870849	55
Abbildung 11: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs870849	55
Abbildung 12: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs951818	56
Abbildung 13: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs951818	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment (SOFA) Score</i>	4
Tabelle 2: TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays zur allelischen Diskriminierung	36
Tabelle 3: Mischungsverhältnis für <i>Real-Time PCR</i>	36
Tabelle 4: TIM-3 Allelverteilung (n = 712).....	40
Tabelle 5: LAG-3 Allelverteilung (n = 707).....	41
Tabelle 6: Patientencharakteristika für TIM-3 rs1036199	42
Tabelle 7: Patientencharakteristika für TIM-3 rs10515746	43
Tabelle 8: Weiterführende Patientencharakteristika für TIM-3 rs1036199.....	44
Tabelle 9: Weiterführende Patientencharakteristika für TIM-3 rs10515746	46
Tabelle 10: Patientencharakteristika für LAG-3 rs870849	47
Tabelle 11: Patientencharakteristika für LAG-3 rs951818	48
Tabelle 12: Weiterführende Patientencharakteristika für LAG-3 rs870849.....	49
Tabelle 13: Weiterführende Patientencharakteristika für LAG-3 rs951818.....	50
Tabelle 14: Schwere der Sepsis und Entzündung für TIM-3 rs1036199.....	57
Tabelle 15: Schwere der Sepsis und Entzündung für TIM-3 rs10515746	58
Tabelle 16: Organspezifische Erkrankungsschwere für TIM-3 rs1036199.....	59
Tabelle 17: Organspezifische Erkrankungsschwere für TIM-3 rs10515746	60
Tabelle 18: Schwere der Sepsis und Entzündung für LAG-3 rs870849.....	61
Tabelle 19: Schwere der Sepsis und Entzündung für LAG-3 rs951818.....	61
Tabelle 20: Organspezifische Erkrankungsschwere für LAG-3 rs870849.....	63
Tabelle 21: Organspezifische Erkrankungsschwere für LAG-3 rs951818.....	64
Tabelle 22: Keime und Erreger für TIM-3 rs1036199	65
Tabelle 23: Keime und Erreger für TIM-3 rs10515746.....	66
Tabelle 24: Keime und Erreger für LAG-3 rs870849	67
Tabelle 25: Keime und Erreger für LAG-3 rs951818	68
Tabelle 26: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs1036199 – 28-Tage-Mortalität. 69	
Tabelle 27: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs1036199 – 90-Tage-Mortalität. 70	
Tabelle 28: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs10515746 – 28-Tage-Mortalität	71
Tabelle 29: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs10515746 – 90-Tage-Mortalität	71
Tabelle 30: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs870849 – 28-Tage-Mortalität .. 72	
Tabelle 31: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs870849 – 90-Tage-Mortalität .. 72	
Tabelle 32: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs951818 – 28-Tage-Mortalität .. 73	
Tabelle 33: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs951818 – 90-Tage-Mortalität .. 73	

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	<i>American College Of Chest Physicians</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
APACHE II	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II</i>
APCs	<i>antigen presenting cells</i>
BE	<i>base excess</i>
BMI	Body-Mass-Index
CEACAM1	<i>carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor
CMV	Zytomegalievirus
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CRF	<i>clinical report form</i>
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNR	<i>do-not-resuscitate</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSG	Deutsche Sepsis Gesellschaft e. V.
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GCS	<i>Glasgow-Coma-Scale</i>
HGP	<i>Human Genome Project</i>
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HMGB1	<i>high mobility group protein B1</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
HR	<i>Hazard Ratio</i>
IDDM	<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
LAG-3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LD	<i>Linkage-Disequilibrium</i>

LSEctin	<i>liver sinusoidal endothelial cell lectin</i>
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MAP	<i>mean arterial pressure</i>
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHC	<i>major-histocompatibility-complex</i>
NIDDM	<i>non-insulin-dependent diabetes mellitus</i>
NLR	NOD-like-Rezeptor
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NYHA	New York Heart Association
NTC	<i>non-template control</i>
PaCO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAR-1	<i>protease-activated receptor 1</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCT	Procalcitonin
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
pDC	plasmazytoiden dendritische Zelle
PIRO	<i>predisposition, insult, response, organ dysfunction</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PtdSer	Phosphatidylserin
qSOFA	<i>quick SOFA</i>
RIG	<i>retinoic acid-inducible gene</i>
RLR	RIG-I-like-Rezeptor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCCM	<i>Society Of Critical Care Medicine</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOFA	<i>Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment</i>
SSC	<i>Surviving Sepsis Campaign</i>
Staph.	<i>Staphylococcus</i>
Th	T-Helferzelle
TIM-3	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TLR	Toll-like-Rezeptor
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Sepsis

Schon in der Antike war die Sepsis ein gefürchtetes Krankheitsbild. Hippokrates beschrieb die Sepsis als eine Art innere Vergiftung mit nachfolgender Körperverwesung. Im Laufe der Zeit und insbesondere mithilfe der Erkenntnisse zur Keimtheorie von u. a. Lister, Pasteur und Koch, konnte das Krankheitsbild der Sepsis weiter spezifiziert werden und ist heutzutage umgangssprachlich als Blutvergiftung bekannt (Funk et al. 2009). 2017 deklarierte die World Health Organization (WHO) Sepsis als globale Gesundheitsbedrohung. Damals ging man basierend auf der Studie von Fleischmann et al. (2015) von ungefähr 32 Mio. Sepsis-Erkrankungen mit dadurch verursachten 5 Mio. Todesfällen pro Jahr aus. Allerdings fehlten genaue Zahlen aus Entwicklungs- und Schwellenländern (Fleischmann et al. 2015). Diese Zahlen wurden 2020 von Rudd et al. auf weltweit rund 49 Mio. Sepsis-Erkrankungen und 11 Mio. Todesfälle korrigiert (Rudd et al. 2020). Jahrhundertlang wurde der Sepsis zu wenig Beachtung geschenkt, sodass Millionen Menschen an ihr verstarben oder unter den entstandenen Langzeitfolgen litten. Die WHO hat sich daher zum Ziel gesetzt, Sepsis-Erkrankungen durch eine verbesserte Prävention, schnellere Diagnose sowie adäquate Behandlung zu bekämpfen (Angus und Bindman 2022). Im Rahmen dessen spielt die grundlegende Erforschung des komplexen Krankheitsbildes der Sepsis eine zentrale Rolle (Reinhart et al. 2017).

1.1.1 Historische Entwicklung der Sepsis-Definition

Die Definition der Sepsis wurde in den letzten 30 Jahren aufgrund des enormen Erkenntnisgewinnes in Bezug auf die Pathologie der Sepsis kontinuierlich überarbeitet. 1992 veröffentlichte das *American College Of Chest Physicians* (ACCP) zusammen mit der *Society Of Critical Care Medicine* (SCCM) erstmalig Empfehlungen in Bezug auf die Diagnostik und Therapie der Sepsis (Bone et al. 1992), heute auch bekannt als Sepsis-1 Definition. Zunächst wurde der Begriff SIRS als *systemic inflammatory response syndrome* etabliert. SIRS lag vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt wurden: eine Körpertemperatur $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, eine Herzfrequenz ≥ 90 Schläge pro Minute, eine Atemfrequenz ≥ 20 pro Minute bzw. eine Hyperventilation entsprechend einem arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdruck (PaCO_2) ≤ 32 mmHg und als letztes Kriterium eine Leukozytenzahl $\geq 12.000/\text{mm}^3$ bzw. $\leq 4.000/\text{mm}^3$ oder das Vorhandensein von mehr als 10 % unreifer neutrophiler Granulozyten im Blut. Sepsis beinhaltete nach dieser Definition das Vorliegen eines SIRS sowie zusätzlich eine bestätigte Infektion. Im selben Konsens wurde grundsätzlich Einigkeit hinsichtlich der Definitionen einer schweren Sepsis und eines septischen Schocks erzielt. Eine schwere Sepsis umfasste demnach eine Sepsis mit daraus

folgender Organdysfunktion, abnormer Minderperfusion oder eine durch die Sepsis induzierte Hypotension. Die Minderperfusion äußerte sich in Form einer Laktatazidose, Oligurie oder einer akuten Bewusstseinsveränderung, während die Hypotension bei einem systolischen Blutdruck unter 90 mmHg bzw. bei einer Reduktion von mehr als 40 mmHg vom Ausgangswert vorlag. Septischer Schock wurde definiert als Sepsis-induzierte Hypotension trotz eines adäquaten Flüssigkeitsmanagements gemeinsam mit Perfusionsanomalien oder zusammen mit einer Organdysfunktion (Bone et al. 1992).

2003 veröffentlichten Levy et al. (2003) eine überarbeitete internationale Sepsisdefinition, heute bekannt als Sepsis-2 Definition. Daraus ging hervor, dass die Definition für Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock in unveränderter Form bestehen bleiben sollte. Bezüglich des SIRS wurden bestimmte Entzündungsparameter wie Interleukin- (IL-) 6, C-reaktives Protein (CRP) oder Procalcitonin (PCT) zu den Diagnosekriterien eines SIRS hinzugenommen. Die Kriterien zur Erkennung einer Sepsis wurden dahingehend erweitert, dass verschiedene unspezifische Parameter wie z. B. ein Kreatininanstieg von über 0,5 mg/dL oder eine Hyperlaktatämie bei einem Laktatwert von über 1 mmol/L zur Liste der Diagnosekriterien hinzugefügt wurden. In Anbetracht des Fehlens eines Staging-Systems zur Einstufung der Sepsis wurde das PIRO-Konzept, entsprechend *predisposition*, *insult*, *response* und *organ dysfunction*, angelehnt an die onkologische TNM-Klassifikation, entwickelt. Das Zusammenspiel von individuellen Prädispositionen wie z. B. Patientenalter oder Komorbiditäten, das Infektionsgeschehen, die körpereigene Immunantwort und eine darauffolgende Organdysfunktion sollten hierbei das jeweilige Stadium der Sepsis genauer klassifizieren (Levy et al. 2003). Es zeigte sich jedoch zum einen, dass die SIRS-Definition zu sensitiv war und zum anderen, dass weiterhin ein einheitlich anerkannter Standard zur schnellen Diagnose einer Sepsis fehlte. Darüber hinaus erkannte man, dass sich eine Sepsis auch ohne vorausgehende Infektion, z. B. infolge einer Verbrennung, entwickeln konnte (Vincent et al. 2013). Außerdem stellte das PIRO-Konzept kein robustes Modell in der Praxis dar. Es diente eher als Anhaltspunkt für nachfolgende Studien, um das Zusammenspiel verschiedener Kriterien bei der komplexen Pathologie der Sepsis zu berücksichtigen (Marshall 2014a).

1.1.2 Aktuelle Sepsis-3 Definition und Diagnose

2016 wurde dann die bis heute weithin akzeptierte Sepsis-3 Definition von Singer et al. publiziert. Zunächst wurde Abstand von den SIRS-Kriterien zur Diagnose einer Sepsis genommen. Sie können jedoch für die generelle Identifizierung einer Infektion in Betracht gezogen werden (Evans et al. 2021). Sepsis wird aktuell definiert als *“life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection.”*, sprich ein lebensbedrohlicher Zustand einer Organdysfunktion ausgehend von einer dysregulierten Immunantwort auf eine Infektion (Singer et al. 2016). Zur objektiven Erfassung einer Organdysfunktion bzw. deren Ausprägungsgrades konnte im stationären Bereich der *Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment (SOFA) Score* überzeugen (Vincent et al. 1998). Die durch ihn erfassten sechs

Organsysteme Respirationstrakt, Gerinnung, Leber, Herz-Kreislaufsystem, zentrales Nervensystem (ZNS) und Niere werden durch organspezifische Parameter abgebildet und können als sogenannte SOFA *Subscores* angesehen werden. Die Funktionalität des Respirationstraktes wird durch den Horowitz-Quotienten, auch Oxygenierungsindex, identifiziert. Dieser stellt das Verhältnis des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (PaO_2) zur inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2) dar. Für die Funktion der Gerinnung dient die Anzahl der Thrombozyten, für die Leberfunktion die Höhe des Bilirubins und für die Nierenfunktion die Höhe des Kreatinins bzw. die ausgeschiedene Urinmenge als organspezifischer Parameter. Rückschlüsse auf das Herz-Kreislaufsystem werden anhand des gemessenen mittleren arteriellen Druckes (*mean arterial pressure*, MAP) und der eventuellen Notwendigkeit von Katecholaminen wie z. B. Dopamin oder Noradrenalin gezogen. Die Funktion des ZNS wird durch die *Glasgow-Coma-Scale* (GCS) erfasst: sie umfasst die drei Kategorien motorische Reaktion, verbale Kommunikation und okuläre Reaktion, welche zusammen eine neurologische Beurteilung des Bewusstseinszustandes ermöglichen (Teasdale und Jennett 1974). Beim SOFA *Score* wird entsprechend den jeweiligen Parametern jedem Organsystem eine Punktzahl von null bis vier zugeordnet, diese miteinander addiert und daraus der SOFA *Score* berechnet. Der physiologische Normalzustand entspricht null Punkten. Je höher der resultierende SOFA *Score*, desto höher der Grad der Organdysfunktion und schließlich auch die Mortalität (Vincent et al. 1996; Vincent et al. 1998). Ab einem SOFA *Score* von zwei oder mehr Punkten zeigte sich bei stationären Patienten mit Verdacht auf eine Infektion eine Mortalität von 10 % (Seymour et al. 2016). Entsprechend der überarbeiteten Sepsis-3 Definition liegt bei einem Anstieg des SOFA *Scores* um zwei oder mehr Punkte eine Organdysfunktion vor (Seymour et al. 2016). Die Berechnung des SOFA *Scores* wurde in dieser Arbeit zur frühen und standardisierten Identifizierung septischer Patienten sowie zu deren kontinuierlicher Beobachtung genutzt (Tabelle 1).

Da das Vorhandensein einer Organdysfunktion bereits in der aktuellen Definition der Sepsis enthalten ist und aufgrund der Zunahme des SOFA *Scores*, wurde der Begriff schwere Sepsis überflüssig und soll heutzutage nicht mehr verwendet werden (Seymour et al. 2016). Außerdem wurde die Definition des septischen Schocks als Untergruppe der Sepsis überarbeitet. Gemäß der Sepsis-3 Definition beinhaltet der septische Schock Abweichungen des Herz-Kreislauf-, des zellulären und des metabolischen Systems. Septischer Schock wurde präzisiert als Zustand der persistierenden Hypotension mit der Notwendigkeit zum Gebrauch von Vasopressoren, um den MAP über 65 mmHg zu halten, bei gleichzeitig vorliegender Hyperlaktatämie mit einem Serum-Laktat von über 2 mmol/L trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr. Patienten mit septischem Schock weisen eine höhere Mortalität, konkret von über 40 %, im Vergleich zu Patienten mit einer Sepsis auf (Shankar-Hari et al. 2016a; Singer et al. 2016).

Tabelle 1: *Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment (SOFA) Score*

Organsystem	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
Respirationstrakt					
PaO ₂ /FiO ₂ [mmHg]	≥ 400	< 400	< 300	< 200 mit Beatmung	< 100 mit Beatmung
Gerinnung					
Thrombozyten [x10 ³ /μL]	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber					
Bilirubin [mg/dL]	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 5,9	6,0 - 11,9	≥ 12,0
Herz-Kreislaufsystem					
	MAP ≥ 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dopamine < 5 oder Dobutamine	Dopamine 5,1 – 15 oder Adrenalin ≤ 0,1 oder Noradrenalin ≤ 0,1	Dopamine > 15 oder Adrenalin > 0,1 oder Noradrenalin > 0,1
Zentrales Nervensystem					
GCS	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Niere					
Kreatinin [mg/dL]	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9	> 5
Urinmenge [mL/Tag]				< 500	< 200

Modifiziert nach (Vincent et al. 1996). PaO₂ steht für den arteriellen Sauerstoffpartialdruck, FiO₂ für die inspiratorische Sauerstoffkonzentration, MAP für den *mean arterial pressure*, GCS für die *Glasgow-Coma-Scale*.

Auch für das Fehlen des einheitlichen Standards zur Erkennung einer Sepsis außerhalb der Intensivstation wurde eine praktikable Lösung gefunden. Äquivalent zum SOFA Score sollte für den ambulanten Bereich bzw. generell außerhalb der Intensivstation, der sogenannte *quick SOFA (qSOFA) Score* für Patienten mit vermuteter Infektion verwendet werden (Singer et al. 2016). Dieser identifiziert Patienten mit erhöhtem Mortalitätsrisiko, welche im Rahmen einer Sepsis-Erkrankung stationär behandelt werden (Seymour et al. 2016). Der qSOFA Score besteht aus den Parametern Atemfrequenz ≥ 22 pro Minute, systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg und Bewusstseinsveränderung. Beim Zutreffen von mindestens zwei Kriterien können Patienten schnell und reproduzierbar als solche mit erhöhtem Mortalitätsrisiko identifiziert werden (Seymour et al. 2016; Singer et al. 2016). Allerdings zeigte sich die alleinige Verwendung des qSOFA Scores als weniger sensitive Screeningmethode im Vergleich zu beispielsweise zwei positiven SIRS-Kriterien (Fernando et al. 2018). Entsprechend der überarbeiteten Empfehlungen der *Surviving Sepsis Campaign (SSC)* von 2021 sollen deshalb sowohl die SIRS-Kriterien als auch der qSOFA Score bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion zur frühzeitigen Erkennung der Sepsis verwendet werden (Evans et al. 2021).

Der englische Begriff *Outcome*, wörtlich übersetzt als „Ergebnis“ oder auch „Auswirkung“, wird im Kontext der Sepsis oftmals zur Beschreibung der Mortalität bzw. für den Verlauf der Erkrankung genutzt (Angus et al. 2001; Fleischmann-Struzek et al. 2018).

1.1.3 Epidemiologischer und ökonomischer Aspekt

Rudd et al. (2020) revidierten die von Fleischmann et al. (2015) geschätzten Zahlen mittels Analyse des *Global Burden of Disease*-Verzeichnisses und zeigten, dass 2017 weltweit weit mehr, nämlich knapp 49 Mio. Erkrankungen und davon 11 Mio. Todesfälle durch die Sepsis erfasst worden waren. Dies entspricht knapp 20 % der weltweiten Todesfälle. Im erfassten Zeitraum von 1990 bis 2017 verringerte sich sowohl die globale Inzidenz von circa 60 auf knapp 49 Mio. Sepsis-Erkrankungen als auch die Mortalität von rund 16 auf 11 Mio. Todesfälle. Trotz dieser positiven Tendenz sind die aktualisierten Zahlen der weltweit an Sepsis erkrankten bzw. verstorbenen Menschen annähernd doppelt so hoch wie bislang geschätzt (Rudd et al. 2020). Bezogen auf Deutschland zeigte sich innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 2007 bis 2013 eine Zunahme der Inzidenz von 5,7 % pro Jahr (279.530 Sepsis-Erkrankungen in 2013) und eine Abnahme der Mortalität um insgesamt 2,7 % im Beobachtungszeitraum von sechs Jahren (auf 24,3 % in 2013) (Fleischmann et al. 2016). Die Deutsche Sepsis Gesellschaft e. V. (DSG) weist allerdings darauf hin, dass genaue Zahlen zu Inzidenz, Letalität und Krankheitsprogression in Deutschland fehlen. Die Dunkelziffer ist demnach hoch. Ferner kommen Sepsis-Erkrankungen zwar regelmäßig in allen Fachrichtungen vor, werden aber von keiner Disziplin als fachspezifischer Schwerpunkt angesehen (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. 2022).

Abgesehen von den medizinischen Herausforderungen, die das komplexe Krankheitsbild mit sich bringt, stellt die Sepsis eine enorme wirtschaftliche Belastung dar. Im Jahr 2013 verursachten Sepsis-Erkrankungen mit mehr als 24 Milliarden Dollar über 13 % der gesamten Krankenhauskosten der USA, während die damit verbundenen Krankenhausaufenthalte mit 3,6 % einen vergleichsweise geringen Anteil ausmachten (Paoli et al. 2018). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Gesamtkosten der stationären sowie nachfolgenden Behandlung für Patienten mit Sepsis in den Jahren 2012 bis 2018 von 27,7 auf 41,5 Milliarden US-Dollar weiter angestiegen sind (Buchman et al. 2020). Chang et al. (2015) beobachteten, dass 20 % der zuvor entlassenen, septischen Patienten innerhalb eines Monats wieder stationär aufgenommen werden mussten. Dies entspricht in etwa der Wiederaufnahmerate von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz oder bei Zustand nach Myokardinfarkt. Die Behandlungskosten sind bei einer Wiederaufnahme nach Sepsis allerdings mehr als doppelt so hoch wie bei den beschriebenen kardiovaskulären Erkrankungen (Chang et al. 2015). Trotz aller Fortschritte in Erforschung, Erkennung und Behandlung, stellt das Krankheitsbild der Sepsis bis zum heutigen Zeitpunkt weltweit eine medizinische, soziale sowie wirtschaftliche Herausforderung dar.

1.1.4 Pathophysiologie

Zentrale Fragestellung beim Krankheitsbild der Sepsis ist, wie es von der initialen Infektion zur lebensbedrohlichen Organdysfunktion kommen kann (van der Poll et al. 2021). Weltweit besteht bei 54 % der auf Intensivstationen betreuten Patienten der Verdacht auf bzw. eine bestätigte Infektion (Vincent et al. 2020). Bis dato werden Blutkulturen als Goldstandard zur Bestätigung einer Infektion sowie Identifizierung der verursachenden Erreger verwendet. Circa die Hälfte der Blutkulturen ergeben jedoch falsch-negative Ergebnisse, bei vorliegender Sepsis sogar über die Hälfte (Candel et al. 2018). Im untersuchten Patientenkollektiv von Vincent et al. (2020) konnte bei 65 % der Patienten eine Infektion durch eine positive Blutkultur bestätigt werden. Untersuchungen zu den auslösenden Mikroorganismen zeigten v. a. gramnegative Erreger (67 %), gefolgt von grampositiven Erregern (37 %) sowie Infektionen durch Pilze (16 %), Viren (4 %) und Parasiten (1 %). Bei Betrachtung des Infektionsfokus konnte in absteigender Reihenfolge der Respirationstrakt (60 %), gefolgt vom Abdomen (18 %), die Blutbahn (15 %) und der Urogenitaltrakt (11 %) beobachtet werden (Vincent et al. 2020). Wie das Immunsystem mit der Erregerbekämpfung zurecht kommt, hängt zum einen von erregerspezifischen Faktoren, zum anderen von der jeweiligen Patientenkonstitution ab. Abhängig von Patientenalter, -geschlecht, bestehenden Vorerkrankungen sowie genetischen Merkmalen, variiert die Anfälligkeit zur Entwicklung einer Sepsis-Erkrankung individuell (Angus und van der Poll 2013). So steigt die Wahrscheinlichkeit eine lebensbedrohliche Infektion und Sepsis zu entwickeln mit zunehmendem Alter ebenso wie mit dem Vorhandensein chronischer Erkrankungen wie beispielsweise einer Leberzirrhose oder einer chronischen Herzinsuffizienz (Vincent et al. 2020).

Neueste Erkenntnisse weisen zudem auf die bedeutende immunologische und protektive Funktion eines intakten Darmmikrobioms im Kontext der Sepsis hin (van der Poll et al. 2021). Ein gestörtes Darmmikrobiom ermöglicht zum einen die Ausbreitung pathogener Bakterien und triggert zum anderen eine überschießende pro-inflammatorische Immunreaktion, sodass die Suszeptibilität für eine Sepsis-Erkrankung steigt (Adelman et al. 2020). Kommt es nachfolgend zur Sepsis-Erkrankung wird das Darmmikrobiom weiterhin geschädigt, die Schutzfunktion bricht zusammen und Erreger breiten sich ungehindert im Körper aus bis es schließlich zur lebensbedrohlichen Organdysfunktion kommt (Adelman et al. 2020; van der Poll et al. 2021).

Durchdringen Erreger die körpereigene erste Abwehrlinie aus anatomischen und chemischen Barrieren, werden die körperfremden Mikroorganismen von körpereigenen Sensorzellen erkannt. Zu diesen Sensorzellen gehören u. a. Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Sie besitzen *pattern recognition receptors* (PRRs), sprich Mustererkennungsrezeptoren, mit denen sie die eindringenden Mikroorganismen anhand ihrer Oberflächenstrukturen erkennen können. Mikroorganismen besitzen auf ihrer Oberfläche wiederum spezifische *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), welche sich aus Oligosacchariden, Peptidoglykanen und Lipopolysacchariden zusammensetzen (Bianchi 2007; van der Poll und Opal 2008). Aufgrund

der enormen Diversität verschiedenster Mikroorganismen weisen auch die körpereigenen PRRs verschiedene Rezeptorklassen auf. Dazu gehören die Toll-*like*-Rezeptoren (TLRs) als Transmembranproteine der Endosomen, welche PAMPs extrazellulärer Bakterien erkennen, die *nucleotide-binding oligomerization domain-* (NOD-) *like*-Rezeptoren (NLRs) zur Erkennung intrazellulärer Bakterien, die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs) und die *retinoic acid-inducible gene-* (RIG-) *I-like*-Rezeptoren (RLRs), welche Kohlenhydrate bzw. virale RNA erkennen (Takeuchi und Akira 2010; van der Poll et al. 2017).

Die Erkennung der PAMPs durch die PRRs löst eine Reihe pro- und anti-inflammatorischer Immunreaktionen aus, die gleichermaßen für die Beseitigung der Infektion bzw. die Entstehung der Sepsis von großer Bedeutung sind (van der Poll und Opal 2008; Angus und van der Poll 2013). Die pro-inflammatorische Immunantwort ist gekennzeichnet durch die Aktivierung der Leukozyten, des Komplement- sowie Gerinnungssystems (Angus und van der Poll 2013; Wiersinga et al. 2014). Kaskadenartig werden pro-inflammatorische Cytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), IL-1 und -6, ebenso wie Typ-1-Interferone, Chemokine und viele weitere antimikrobielle Proteine freigesetzt (Takeuchi und Akira 2010). Gemeinsam sorgen sie über Aktivierung von Zielzellen und weiteren Entzündungsmediatoren für die Steigerung bzw. Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion (van der Poll und Opal 2008). Außerdem kann es im Rahmen der pro-inflammatorischen Immunantwort zu Gewebeschäden und Zelluntergang, sprich Nekrose, kommen. Dies führt zur Freisetzung von *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), welche von den PRRs erkannt werden und zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Sinne eines *Feedbacks* führen (Zhang et al. 2010).

Parallel zur pro-inflammatorischen Immunantwort spielen sich anti-inflammatorische Prozesse zur Eingrenzung einer möglicherweise überschießenden Entzündungsreaktion ab (Angus und van der Poll 2013). Wichtige Komponenten sind hierbei die neuroendokrine Regulation mit nachfolgender Inhibition pro-inflammatorischer Cytokine (Rosas-Ballina et al. 2011), die verringerte Gentranskription pro-inflammatorischer Proteine (Carson et al. 2011) und die Funktionsbeeinträchtigung zahlreicher Immunzellen (Angus und van der Poll 2013). Letzteres führt u. a. zur vermehrten Apoptose, den programmierten Zelltod, von T-, B- und dendritischen Zellen sowie einem Wechsel der Phagozyten hin zu einem anti-inflammatorischen Phänotypen (Hotchkiss et al. 1999; Angus und van der Poll 2013). Darüber hinaus konnte bei septischen Patienten ein Anstieg diverser T-Zell-Inhibitoren, inklusive der in dieser Dissertation genauer untersuchten *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3* (TIM-3) und *lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3) -Proteine beobachtet werden (Boomer et al. 2012).

Während die pro-inflammatorische Immunantwort primär der Erregerbekämpfung dient, kann dies bei überschießender Entzündungsreaktion zu Gewebeschäden und Nekrose führen, wohingegen die anti-inflammatorischen Immunabläufe der Eingrenzung ebenjener Gewebeschäden dienen, gleichzeitig aber das Immunsystem anfälliger für sekundäre Infektionen machen (van der Poll und Opal 2008; van der Poll et al. 2021). In Abbildung 1

werden die genannten Vorgänge der durch Erreger ausgelösten Immunantwort während der Sepsis vereinfacht dargestellt. Die Erkennung und Bekämpfung der Infektion im Sinne einer balancierten pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort ermöglicht die *Restitutio ad integrum*, sprich die Wiederherstellung der physiologischen Körperfunktion. Jede Form der dysregulierten Immunantwort kann hingegen die Entstehung einer Sepsis begünstigen (Angus und van der Poll 2013).

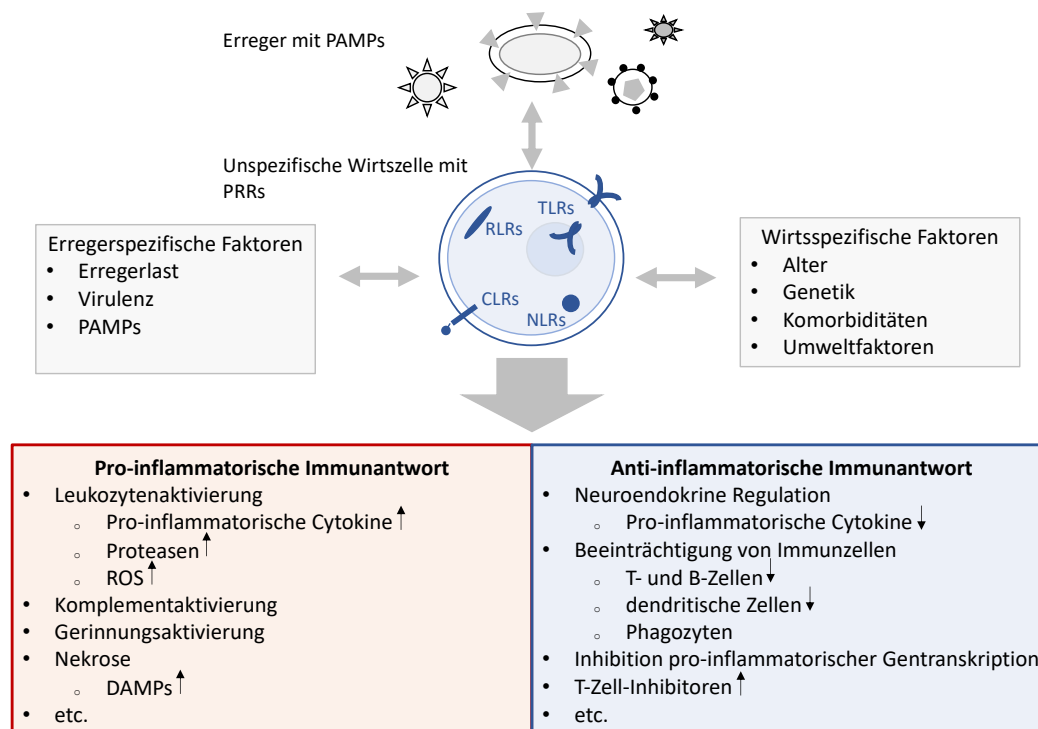


Abbildung 1: Pro- und anti-inflammatorische Immunantwort während der Sepsis

Abbildung modifiziert nach Angus und van der Poll 2013, S. 844. Körperfremde Erreger werden mithilfe von *pattern recognition receptors* (PRRs), welche spezifisch an die auf der Erregeroberfläche vorhandenen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) binden, erkannt. Zu den PRRs gehören Toll-like-Rezeptoren (TLRs), *nucleotide-binding oligomerization domain*-(NOD)-like-Rezeptoren (NLR), C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs) und *retinoic acid-inducible gene*-(RIG)-I-like-Rezeptoren (RLRs) (Takeuchi und Akira 2010). Das Ausmaß der nun folgenden Immunantwort ist abhängig von erreger- und wirtsspezifischen Faktoren. Zu den erregerspezifischen Faktoren gehören u. a. die Erregerlast, Virulenz und vorliegenden PAMPs. Zu den wirtsspezifischen Faktoren gehören z. B. das Alter, genetische Merkmale, Komorbiditäten und Umweltfaktoren (Angus und van der Poll 2013). Die in rot dargestellte pro-inflammatorische Immunantwort beinhaltet die Leukozyten-, Komplement- und Gerinnungsaktivierung. Es kommt zum Anstieg von pro-inflammatorischen Cytokinen, Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Angus und van der Poll 2013; Wiersinga et al. 2014). *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) werden bei Gewebeschädigung freigesetzt und von den PRRs erkannt (Zhang et al. 2010). Gleichzeitig läuft die in blau dargestellte anti-inflammatorische Immunantwort ab. Durch die neuroendokrine Regulation wird die Anzahl pro-inflammatorischer Cytokine reduziert (Rosas-Ballina et al. 2011). Immunzellen werden dahingehend beeinträchtigt, dass es zur vermehrten Apoptose von T-, B- und dendritischen Zellen kommt (Hotchkiss et al. 1999). Phagozyten wechseln zu einem anti-inflammatorischen Phänotypen (Angus und van der Poll 2013). Die Transkription pro-inflammatorischer Cytokine wird inhibiert (Carson et al. 2011) und die Zahl inhibitorischer T-Zell-Inhibitoren steigt an (Boomer et al. 2012).

Cohen et al. (2012) merkten an, dass es sich bei septischen Patienten keineswegs um ein homogenes Patientenkollektiv handele. So falle die Immunantwort eines 18-jährigen Patienten mit Meningokokken-induzierter Sepsis anders aus als jene eines 70-jährigen Patienten mit Beatmungs-assoziiertes Pneumonie. Folglich wird das Krankheitsbild der Sepsis durch einen heterogenen Phänotypen charakterisiert (Cohen et al. 2012). Nachdem initial v. a. die pro-inflammatorische Immunreaktion untersucht wurde, kristallisierte sich etwas verzögert die ebenso entscheidende Rolle der Immunsuppression heraus (Hotchkiss et al. 2013). Aus Studien zu verschiedenen persistierenden Virusinfektionen wie beispielsweise einer chronischen Hepatitis- oder Humanen Immundefizienzvirus- (HIV-) Infektion war bekannt, dass es durch die anhaltende Antigenpersistenz zu einer funktionellen Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung kommt. Dieser Zustand wird auch *T-cell exhaustion* oder T-Zell-Erschöpfung genannt und führt zur Immunsuppression (Yi et al. 2010; Hotchkiss et al. 2013). Ausgehend von diesen Beobachtungen obduzierte Boomer et al. (2011) Milz- und Lungengewebe verstorbener septischer und nicht-septischer Patienten. Im Gewebe der septischen Patienten zeigte sich eine signifikant verringerte Expression pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF- α , Interferon- γ , IL-6 und -10, aber eine erhöhte Expression negativ-kostimulierender T-Zell-Rezeptoren wie *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), *programmed cell death protein 1* (PD-1), TIM-3 und LAG-3 (Boomer et al. 2011; Boomer et al. 2012). Hotchkiss et al. (2013) differenzierte daraufhin drei mögliche Krankheitsverläufe während der Sepsis. Die erste Möglichkeit stellt eine überschießende, hyper-inflammatorische Immunantwort mit sogenanntem *cytokine storm* dar. Der Begriff *cytokine storm* umfasst hierbei die Freisetzung pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF- α . Dadurch ausgelöst entwickelt der Patient hohes Fieber, metabolische Veränderungen und es folgt, falls das Immunsystem die überschießende Entzündungsreaktion nicht eindämmen kann, der septische Schock und das Versterben des Patienten an multiplen Organversagen (Wiersinga et al. 2014). Diese hyper-inflammatorische Immunantwort zeigt sich v. a. bei jungen, nicht vorerkrankten Patienten mit fulminanten Krankheitsverläufen wie z. B. im Rahmen einer Meningokokken-Sepsis (Hotchkiss et al. 2013). Der Großteil der Patienten, nämlich ältere und multimorbide Patienten, präsentiert hingegen eine durch die Immunsuppression geprägte Immunantwort. Nach einer kurzen oder gar ausbleibenden pro-inflammatorischen Immunantwort folgt die T-Zell-Erschöpfung (Hotchkiss et al. 2013). Immunsupprimierte Patienten sind besonders anfällig für nosokomiale Infektionen und eine Reaktivierung latenter Virusinfektionen wie z. B. mit dem Cytomegalievirus (Limaye et al. 2008). Ong et al. (2017) konnten nachweisen, dass es in einem Kollektiv von Patientin im septischen Schock bei 68 % zu einer Reaktivierung einer Herpesvirus-Infektion kam, auch ohne vorherige Immunsuppression. Gleichzeitig war die Reaktivierung von Herpesviren mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Je länger die Sepsis besteht, desto mehr opportunistische Bakterien und Pilze können in Blutkulturen bei septischen Patienten nachgewiesen werden (Otto et al. 2011). Immunsupprimierte Patienten versterben gehäuft infolge sekundärer Infektionen. Zuletzt stellte Hotchkiss et al. (2013) noch die Möglichkeit der stetig wechselnden hyper- und hypo-inflammatorischen Immunantwort

vor. Wichtigste Erkenntnis der Veröffentlichung war, dass Pathogenese und Immunantwort individuell variieren und Patienten sowohl infolge der hyper-, als auch der hypo-inflammatorischen Immunantwort versterben können.

Definitionsgemäß löst die inadäquate Immunantwort eine lebensbedrohliche Organdysfunktion im Rahmen der Sepsis-Erkrankung aus (Singer et al. 2016). Zentraler Bestandteil dieser Organdysfunktion ist, wie in Abbildung 2 veranschaulicht, eine unzureichende Gewebeoxygenierung, resultierend aus einer gestörten Blutgerinnung sowie aufgehobenen Barrierefunktion des Endothels (Opal und van der Poll 2015).

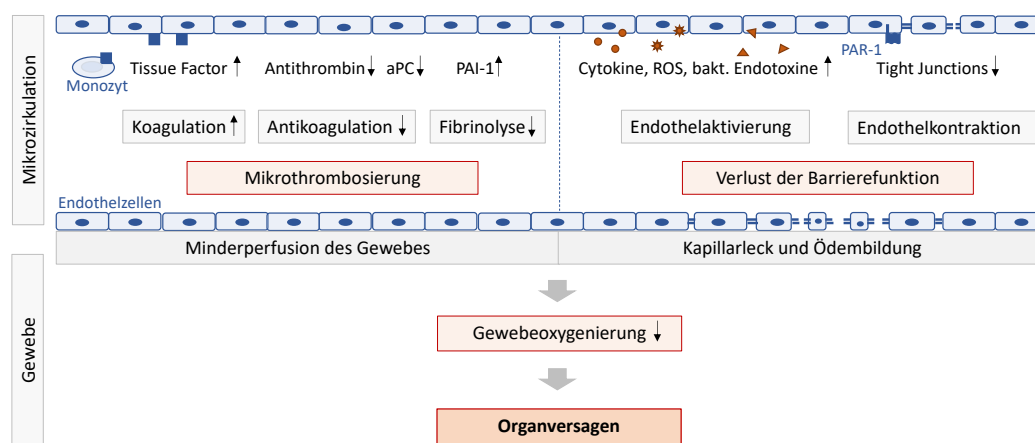


Abbildung 2: Pathophysiologie des Organversagens während der Sepsis

Abbildung modifiziert nach Opal und van der Poll 2015, S. 279. Dargestellt werden die zellulären Effekte der Immunantwort während der Sepsis, welche unbehandelt zum Organversagen führen können. Der Schwerpunkt liegt auf der gestörten Blutgerinnung und Endothelfunktion. Durch die vermehrte Expression von *Tissue Factor* auf Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen wird die Koagulation gefördert (Levi et al. 2006). Parallel dazu ist die anti-koagulatorische Signalkaskade durch das verringerte Vorkommen von Antithrombin und aktiviertem Protein C (aPC) eingeschränkt (Faust et al. 2001; Levi und van der Poll 2010). Infolge des verringerten aPCs fällt außerdem vermehrt Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) an, wodurch die Fibrinolyse in ihrer physiologischen Funktion beeinträchtigt wird (Danese et al. 2010). Das Zusammenspiel aus gesteigerter Koagulation, verringerter Antikoagulation und gestörter Fibrinolyse schafft optimale Bedingungen für eine mikrovaskuläre Thrombosierung (Opal und van der Poll 2015). Auf der rechten Seite wird der Verlust der endothelialen Diffusionsbarriere mit nachfolgendem Kapillarleck und Ödembildung dargestellt. Zum einen lösen zirkulierende Cytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und bakterielle Endotoxine eine generalisierte Endothelaktivierung hervor (Ince et al. 2016). Zum anderen verursacht die Bindung von Thrombin an den *protease-activated receptor 1* (PAR-1) eine Endothelkontraktion, sodass die *Tight Junctions* verloren gehen und zelluläre Blutbestandteile austreten können (Goldenberg et al. 2011; Opal und van der Poll 2015). Minderperfusion des Gewebes und Kapillarleck bzw. Ödembildung verringern gemeinsam die lebenswichtige Oxygenierung des Gewebes und führen unbehandelt zum Organversagen während der Sepsis (Opal und van der Poll 2015).

In puncto Blutgerinnung kommt es zur verstärkten Gerinnungsneigung mit möglicher Mikrothrombosierung (Opal und van der Poll 2015). Einerseits induzieren die zuvor freigesetzten pro-inflammatorischen Cytokine eine gesteigerte Expression des pro-koagulatorischen *Tissue Factors*, Gewebefaktors, auf Monozyten und Endothelzellen und

dadurch eine vermehrte Bildung von Thrombin (Levi et al. 2006). Andererseits sind anti-koagulatorische Signalkaskaden durch ein reduziertes Vorkommen von Antithrombin sowie eine gestörte Aktivierung von Protein C stark eingeschränkt (Faust et al. 2001; Levi und van der Poll 2010). Gleichzeitig führt das Fehlen von aktiviertem Protein C zur Beeinträchtigung der Fibrinolyse (Danese et al. 2010). Eine gesteigerte Koagulation, verringerte Antikoagulation und gestörte Fibrinolyse unterstützen die Ausbildung von Thrombosen. Bei Mikrothrombosierung der Gefäße resultiert eine Minderperfusion des zu versorgenden Gewebes (Opal und van der Poll 2015). Unterstützt wird dieser Prozess durch eine Überexpression von sogenannten *neutrophil extracellular traps*, welche beim Gesunden für eine adäquate Erregerabwehr sorgen, bei septischen Patienten allerdings in zu hohem Ausmaß vorhanden sind und dadurch zur intravaskulären Koagulation führen (Abrams et al. 2019).

Hinsichtlich der endothelialen Barrierefunktion geht diese bei Fortbestand der dysregulierten Immunantwort verloren. Die zirkulierenden pro-inflammatorischen Cytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und bakteriellen Endotoxine führen zu einer generalisierten Endothelaktivierung und -zerstörung (Ince et al. 2016). Ferner löst die Interaktion des *protease-activated receptor 1* (PAR-1) mit Thrombin eine Kontraktion der Endothelzellen mit Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte, v. a. *Tight Junctions*, aus (Riewald et al. 2002; Opal und van der Poll 2015). Es kommt zum sogenannten Kapillarleck. Infolgedessen können Moleküle wie Albumin ungehindert in den interstitiellen Raum gelangen und zur Ausbildung eines interstitiellen Ödems führen (Goldenberg et al. 2011; Opal und van der Poll 2015).

Das Zusammenspiel aus Mikrothrombosierung, Minderperfusion, Kapillarleck und Ödem verursacht eine kritische Gewebeoxygenierung, welche unbehandelt in ein multiples Organversagen und Versterben des Patienten mündet (Opal und van der Poll 2015; van der Poll et al. 2021). Die entscheidenden zellulären Abläufe sind in Abbildung 2 dargestellt.

Das multiple Organversagen betrifft die Organe Lunge, Niere, Leber, Herz-Kreislauf-, Gerinnungs- und zentrales Nervensystem. Zum einen kann die Kombination aus gesteigerter Koagulation, Plättchenaggregation und geschädigtem Endothel eine lebensbedrohliche Thrombozytopenie und dadurch eine lebensbedrohliche Sepsis-assoziierte disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) oder auch Verbrauchskoagulopathie, auslösen (Iba et al. 2019). Zum anderen besteht bei Fortbestehen der Sepsis die Gefahr einer septischen Kardiomyopathie, eines *Acute Respiratory Distress Syndromes* (ARDS), eines akuten Nieren- oder Leberversagens sowie einer septischen Enzephalopathie. Je mehr Organe von der Organdysfunktion betroffen sind, desto letaler verläuft die Sepsis (Caraballo und Jaimes 2019).

1.1.5 Therapieansätze

Der Faktor Zeit spielt bei der Diagnose und Therapie der Sepsis eine entscheidende Rolle. Ausgehend von der SSC-Leitlinie von 2018 wird im klinischen Alltag oft vom *1-Hour-Bundle* gesprochen, welches als Checkliste bzw. Leitfaden für Patienten mit klinischen Zeichen einer Sepsis verstanden werden kann (Levy et al. 2018). Das *1-Hour-Bundle* beinhaltet innerhalb der

ersten Stunde die initiale Laktatmessung bzw. erneute Messung bei einem Laktatwert von über 2 mmol/L, die Abnahme von Blutkulturen vor Therapiebeginn mit einer Breitspektrumantibiose, die intravenöse Volumensubstitution mit 30 mL/kg kristalloider Flüssigkeit bei Hypotension oder einem Laktatwert von ≥ 4 mmol/L und die Gabe von Vasopressoren bei persistierender Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution, um den MAP über 65 mmHg zu halten (Levy et al. 2018). Sowohl die SSC- als auch DSG-Leitlinie von 2018 empfehlen den schnellstmöglichen Beginn mit Breitspektrumantibiotika sowie den nachfolgenden Wechsel auf eine erregerspezifische, sprich kalkulierte, Antibiotikatherapie. In der S3-Leitlinie der DSG (2018) wird zusätzlich eine tägliche Kontrolle von Entzündungszeichen und spezifischen Infektparametern wie z. B. Procalcitonin empfohlen, um über Fortführung, Beendigung oder Änderung der Antibiose zu entscheiden. Darüber hinaus ist im Sinne der Fokussanierung sowohl die Suche als auch die operative bzw. interventionelle Entfernung möglicher Infektionsquellen erforderlich. In puncto organunterstützende Maßnahmen wird u. a. die Verabreichung von Erythrozyten- bzw. Thrombozytenkonzentraten bei einem Hämoglobinwert $\leq 7,0$ g/dL sowie bei einer Thrombozytenzahl $\leq 10.000/\mu\text{L}$ Blut, die Beatmung sowie Bauchlagerung von Patienten mit kritisch reduzierter Ventilation oder auch der Einsatz einer Nierenersatztherapie bei drohendem Nierenversagen empfohlen (DSG 2018). Die 2021 aktualisierten Empfehlungen der SSC weisen insbesondere in Bezug auf die Volumensubstitution und Antibiose Neuerungen auf (Evans et al. 2021). Zum einen soll bei der Volumensubstitution der einzelne Patient mit evtl. vorhandene Komorbiditäten verstärkt berücksichtigt werden und im Zweifel von der 30 mL/kg kristalloider Flüssigkeitstherapie abgewichen werden. Zum anderen soll bei Patienten mit möglicher Sepsis und zugleich fehlenden Schockzeichen an mögliche Differentialdiagnosen gedacht und die Antibiotikatherapie erst bei persistierendem Infektionsverdacht innerhalb von drei Stunden begonnen werden. Darüber hinaus wird u. a. empfohlen spezifische Erreger wie den Methicillin-resistenten *Staph. aureus* oder Pilze nur bei begründetem Verdacht mit dem initialen Breitspektrumantibiotikum abzudecken (Evans et al. 2021).

Trotz der fortlaufenden Aktualisierung bestehender Leitlinien existiert bis dato keine spezifische Therapie zur Behandlung der Sepsis (van der Poll et al. 2021). Wie u. a. Boomer (2011), Hotchkiss (2013) und van der Poll et al. (2021) anmerkten, muss der heterogene Phänotyp septischer Patienten berücksichtigt werden. Das immunologische Profil muss in die Therapie integriert und darauf aufbauend überlegt werden, welche Patienten von einer immunsupprimierenden und welche von einer immunstimulierenden Therapie profitieren würden (Candel et al. 2018). Der aktuelle Forschungsschwerpunkt liegt auf ebenjener Kategorisierung septischer Patienten sowie auf der auf den Patienten zugeschnittenen Therapie (Peters van Ton et al. 2018). Stanski und Wong (2020) schlagen hierfür eine Unterteilung septischer Patientin hinsichtlich einer prognostischen und prädiktiven Therapiebereicherung vor. Prognostisch würde man die Patientin anhand eines niedrigen bzw. hohen Mortalitätsrisikos aufteilen, während prädiktive Kriterien die biologischen und

genetischen Patientencharakteristika beinhalten und Anhaltspunkt für eine spezifische Therapie geben könnten (Stanski und Wong 2020). Man vermutete, dass eine zukünftige Überarbeitung der aktuellen Sepsis-Definition eine Unterteilung septischer Patientin in homogene Kohorten beinhalten wird, damit die aktuell vor allem supportive zur präzisen Therapie wird (van der Poll et al. 2021).

1.2 T-Zell-Inhibitoren

Mit zunehmender Evidenz wird immunregulatorischen *Checkpoint*-Rezeptoren wie CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung der Pathophysiologie der Sepsis zugesprochen (Boomer et al. 2012; Wakeley et al. 2020). *Checkpoint*-Rezeptoren sind spezifische, membrangebundene Proteine, welche sich überwiegend auf T-Zellen befinden und somit Teil des spezifischen, auch erworbenen, Immunsystems sind. Dieses besteht aus den antigenspezifischen T- und B-Lymphozyten, deren primäre Aufgabe die Erregererkennung und das immunologische Gedächtnis ist. Anders als B-Lymphozyten benötigen T-Lymphozyten Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs), welche mit den auf ihrer Oberfläche vorhandenen *major-histocompatibility-complex*- (MHC-) Molekülen, Peptidfragmente des erregerspezifischen Antigens binden und der T-Zelle präsentieren. Zusätzlich besitzen T-Zellen einen CD4- bzw. CD8-Ko-Rezeptor. CD steht für *cluster of differentiation*. CD4-positive (CD4+) T-Zellen binden an MHC-Klasse-II-Proteine, während CD8-positive (CD8+) T-Zellen an MHC-Klasse-I-Proteine binden. Durch diese Bindung werden T-Effektorzellen aktiviert und werden in der Folge zu zytotoxischen T-, T-Helfer-(Th-) oder regulatorischen T-Zellen (Murphy und Weaver 2018). *Checkpoint*-Rezeptoren regulieren die Reaktion nach Antigenbindung an MHC-Klasse-I- oder -II-Proteine im Sinne einer Stimulation oder Inhibition (Wakeley et al. 2020).

Inhibitorische T-Zell-Rezeptoren hemmen die Aktivierung von T-Effektorzellen, fördern die suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen und modulieren die Funktion von APCs (Joller und Kuchroo 2017). Ko-inhibitorischen T-Zell-Rezeptoren wird eine Schlüssel-funktion in der Erhaltung der Immunhomöostase zugesprochen. Ihre inhibitorische Funktion schützt einerseits vor Autoimmunität, während eine übermäßige Inhibition andererseits Tumorprogression und Erregerpersistenz zur Folge haben kann (Joller und Kuchroo 2017). In puncto Sepsis machten Hotchkiss et al. (2013) auf die T-Zell-Erschöpfung infolge der chronischen Antigenpersistenz aufmerksam. Parallel dazu konnten Venet et al. (2013) nachweisen, dass septische Patienten eine reduzierte Diversität an T-Zell-Rezeptoren präsentierten. Während sich die Zahl aktivierender Ko-Rezeptoren reduzierte, nahm die Zahl inhibitorischer T-Zell-Rezeptoren zu. Ferner ging eine verzögerte Wiederherstellung der T-Zell-Rezeptor-Diversität mit vermehrten nosokomialen Infektionen und einer erhöhten Mortalität einher (Venet et al. 2013). T-Zell-Inhibitoren verhindern eine überschießende T-Zell-Reaktion und können für eine balancierte Immunreaktion während der Sepsis sorgen (Hotchkiss et al. 2013). Genetische Varianten der PD-1- sowie CTLA-4-

Gene haben einen nachgewiesenen signifikanten Einfluss auf die Wiedererlangung der Immunhomöostase und den Verlauf der Sepsis (Mansur et al. 2014; Mewes et al. 2019a).

Bis dato sind *Immuncheckpoint*-Proteine in ihrer Funktion und als mögliche therapeutische Angriffspunkte bei einer Sepsis-Erkrankung Bestandteil wissenschaftlicher Forschung. Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass das Verständnis gewisser genetischer Varianten der *Checkpoint*-Proteine der Schlüssel zu individualisierten Therapieansätzen und einer damit verbesserten Krankheitsprognose ist (Lu et al. 2019; McBride et al. 2021).

1.2.1 TIM-3

TIM-3 gehört zur Familie der immunregulatorischen TIM-Proteine. Auf Chromosom 5, genauer in der genomischen Region 5q31-33, befinden sich drei Gene, namentlich *HAVCR1*, *HAVCR2* und *TIMD4*, welche für die Proteine TIM-1, -3 und -4 codieren. Als Typ-1-Transmembranprotein besteht das vom *HAVCR2*-, *hepatitis A virus cellular receptor 2*-, Gen codierte TIM-3-Protein strukturell aus einer N-terminalen IgV- sowie einer transmembranen Domäne, einem Muzin-Stil und einem zytoplasmatischen Schwanz (Wolf et al. 2020).

Zunächst wurde die Expression von TIM-3 auf CD4⁺ T- und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erfasst (Monney et al. 2002). Monney et al. (2002) untersuchten den Krankheitsverlauf der experimentell erzeugten Autoimmun-Enzephalitis im Mausmodell unter in vivo Zugabe von TIM-3-Antikörpern. Infolge der TIM-3-Blockade kam es zu einer überschießenden Immunreaktion mit erhöhtem Entzündungs- und Demyelinisierungsprozess. Damit wurde erstmals die sowohl inhibitorische, als auch regulatorische Funktion von TIM-3 zur Eindämmung einer überschießenden Th1-vermittelten Immunreaktion während gewisser Autoimmunerkrankungen nachgewiesen (Monney et al. 2002). Später zeigte sich, dass TIM-3 auch von regulatorischen T-Zellen, myeloischen Zellen wie Mastzellen, Monozyten und Makrophagen, ebenso wie von Natürlichen Killer- (NK-) und dendritischen Zellen exprimiert wird (Joller und Kuchroo 2017; Wolf et al. 2020). Folglich ist TIM-3 Bestandteil der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Abhängig vom exprimierenden Zelltyp, dem vorherrschenden Liganden sowie dem Immunstatus, wird TIM-3 neben der primär inhibitorischen, auch eine gewisse kostimulierende Funktion zugeschrieben (Avery et al. 2018; Banerjee und Kane 2018).

Bis dato sind vier verschiedene TIM-3-Liganden bekannt; Galectin-9, *carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1* (CEACAM1), Phosphatidylserin (PtdSer) und *high mobility group protein B1* (HMGB1) (Wolf et al. 2020). Zhu et al. (2005) entdeckten Galectin-9 als TIM-3-Liganden und dass deren Interaktion zur Aggregation und Apoptose von Th1-Zellen führt. Durch Zugabe von Galectin-9 kam es bei Mäusen mit experimentell erzeugter Autoimmun-Enzephalitis zu einer Abnahme der Interferon- γ -Produktion, sodass die Reduktion von Th1-Zellen durch die Bindung von TIM-3 an Galectin-9 bestätigt werden konnte. Etwas später wiesen Gleason et al. (2012) TIM-3 auf NK-Zellen nach. Die Bindung von TIM-3 an Galectin-9 induzierte in den NK-Zellen anders als bei den Th1-Zellen eine gesteigerte Interferon- γ -Produktion. Ein

weiterer, auf aktivierten T-Zellen exprimierter TIM-3-Ligand ist CEACAM1. Ebenso wie bei der Bindung an Galectin-9, führt die Interaktion von TIM-3 mit CEACAM1 zu einer T-Zell-Inhibition mit nachfolgender Apoptose jener T-Zellen (Huang et al. 2015). PtdSer fungiert hingegen als Oberflächenmarker apoptotischer Zellen und unterstützt die Antigen-Kreuzpräsentation (DeKruyff et al. 2010). Der letzte bekannte TIM-3-Ligand, HMGB1, interagiert mit TIM-3 exprimierenden dendritischen Zellen (Chiba et al. 2012). HMGB1 bindet zunächst die von apoptotischen Zellen freigesetzte Nukleinsäure und sorgt anschließend bei Bindung an TIM-3 für eine reduzierte Toll-*like*-Rezeptor-Interaktion (Chiba et al. 2012; Wolf et al. 2020). Reguliert wird die TIM-3-Expression durch die Transkriptionsfaktoren NFIL3, T-bet und STAT3 (Banerjee und Kane 2018).

Solange keiner der oben genannten Liganden an TIM-3 gebunden ist, bindet der intrazellulär gelegene zytoplasmatische Schwanz das *HLA-associated transcript 3* (BAT3). Das gebundene BAT3 hemmt den TIM-3-Signalweg über Interaktion mit der Tyrosinkinase LCK und fördert die Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivität bei Antigenpräsentation (Rangachari et al. 2012). Durch Ligandenbindung an die extrazelluläre IgV-Domäne kommt es zum Calciumeinstrom mit nachfolgender Phosphorylierung der zwei intrazellulär gelegenen Tyrosine, Tyr256 und 263, wodurch BAT3 losgelöst und die T-Zell-Inhibition nicht länger verhindert werden kann (Davidson et al. 2007; Rangachari et al. 2012). Es folgt die T-Zell-Inhibierung, welche schlussendlich in die T-Zell-Anergie, sprich Reaktionslosigkeit auf ein Antigen, sowie Apoptose mündet (Rangachari et al. 2012), ebenso wie die Destabilisierung der immunologischen Synapse und Rekrutierung weiterer Phosphatasen (Clayton et al. 2014). Darüber hinaus kommt es zur Verringerung der TLR-Interaktion mit genereller Verringerung der Immunantwort (Wolf et al. 2020).

Abbildung 3 bildet den strukturellen Aufbau sowie die Ligandeninteraktion von TIM-3 schematisch ab.

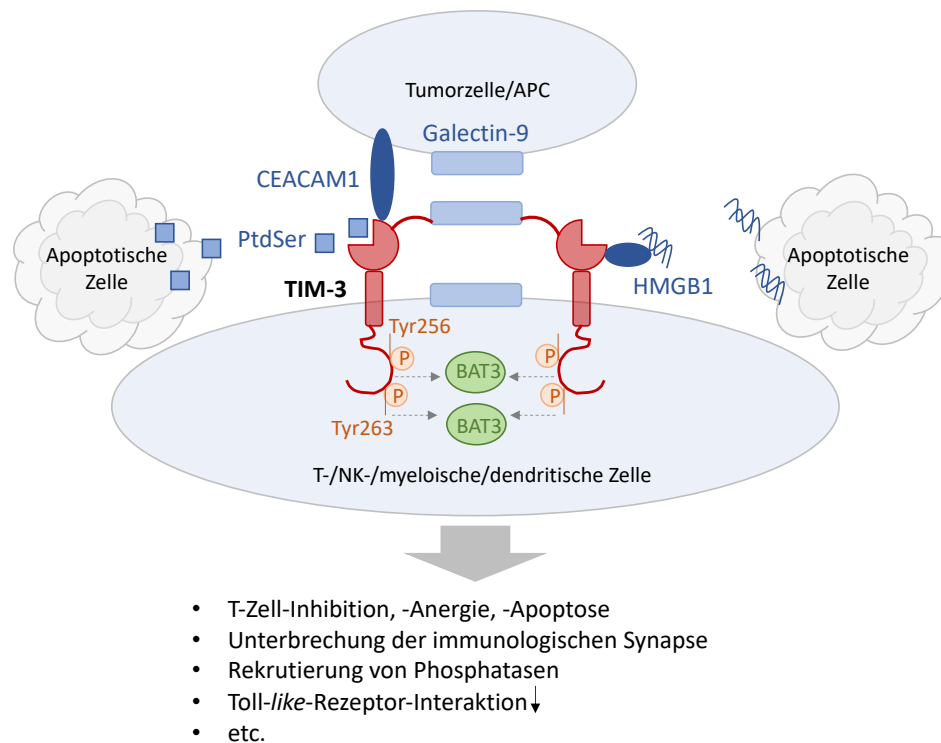


Abbildung 3: TIM-3 - struktureller Aufbau und Ligandeninteraktion

Abbildung modifiziert nach Wolf et al. 2020, S. 174. Dargestellt wird *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3* (TIM-3) in seiner Liganden-gebundenen Form. Die extrazellulär gelegene IgV-Domäne enthält Bindungsstellen für *carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1* (CEACAM1), Galectin-9, Phosphatidylserine (PtdSer) und *high mobility group protein B1* (HMGB1). Es folgen der Muzin-Stil, die transmembrane Domäne sowie der intrazellulär gelegene zytoplasmatische Schwanz (Wolf et al. 2020). An letzterem ist das sogenannte *HLA-associated transcript 3* (BAT3) über die Tyrosine (Tyr) 256 und 263 gebunden (Rangachari et al. 2012). CEACAM1 sowie Galectin-9 werden von Tumorzellen bzw. *antigen presenting cells* (APCs) präsentiert (Zhu et al. 2005; Huang et al. 2015), wohingegen PtdSer und HMGB1 von apoptotischen Zellen freigesetzt werden (DeKruyff et al. 2010; Chiba et al. 2012). Die Ligandenbindung führt zur Phosphorylierung von Tyr256 und 263, wodurch BAT3 losgelöst und die TIM-3-Signalkaskade aktiviert wird. Es folgt die Rekrutierung von Phosphatasen sowie Destabilisierung der für die T-Zell-Aktivierung erforderlichen immunologischen Synapse (Clayton et al. 2014). Durch den erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle werden die T-Zellen zunächst anergisch und schließlich apoptotisch (Davidson et al. 2007; Rangachari et al. 2012). Ferner wird die Toll-like-Rezeptor-Interaktion inhibiert (Chiba et al. 2012). Zusammen führen diese Vorgänge zu einer Inhibition der T-Zell-Aktivität (Wolf et al. 2020).

Als inhibitorischer T-Zell-Rezeptor schützt TIM-3 einerseits vor Autoimmunität und kann andererseits eine Erregerpersistenz oder sogar Tumorprogression begünstigen (Wolf et al. 2020). Bei einer Unterexpression kann TIM-3 seiner inhibitorischen Funktion nicht ausreichend nachkommen. Eine überschießende T-Zell-Aktivität bis hin zur Autoimmunität ist die Folge (Wolf et al. 2020). So konnte eine verringerte bzw. gestörte TIM-3-Expression u. a. bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Multiple Sklerose nachgewiesen werden (Yang et al. 2008; Shi et al. 2012).

Umgekehrt zeigt sich eine Überexpression von TIM-3 bei persistierenden Virusinfektionen und im Gewebe zahlreicher Tumoren (Wolf et al. 2020). Beispielsweise korreliert die Anzahl löslicher TIM-3-Proteine bei chronischer HIV-Infektion mit der Krankheitsprogression und dem damit verbundenen Verlust an CD4⁺ T-Zellen (Clayton et al. 2015). Gerade bei persistierenden Viruserkrankungen mit dem genannten HI- oder dem Hepatitis-C-Virus, kommt es durch die erhöhte TIM-3-Expression zu einer permanenten Inhibition der T-Zell-Aktivität, wobei v. a. die Blockade zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen zur Persistenz der virusinfizierten Zellen führt (McMahan et al. 2010). In Bezug auf Tumoren konnte eine erhöhte TIM-3-Expression auf CD4⁺ T-Zellen beim hepatozellulären, Zervix-, Kolon- und Rektum- sowie Ovarial-Karzinom nachgewiesen werden (Yan et al. 2013). Im Falle des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zeigte sich darüber hinaus, dass die vermehrte TIM-3-Expression mit einer erhöhten Anzahl befallener Lymphknoten und einem fortgeschrittenen Tumorstadium einherging (Gao et al. 2012). Ferner hat TIM-3 Einfluss auf allergische Erkrankungen wie z. B. das allergische Asthma bronchiale (Li et al. 2013). Dieses zeichnet sich durch ein Ungleichgewicht zugunsten einer Th2-vermittelten chronischen Entzündungsreaktion der Atemwege aus. TIM-3 stimulierte Mastzellen zur Sekretion von Th2-Cytokinen und förderte damit die Entzündungsreaktion des Respirationstraktes (Li et al. 2013). Tang et al. (2015) beobachteten eine erhöhte TIM-3-Expression auf CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale, sowie einen Anstieg der Th1-vermittelten Immunantwort durch Blockade von TIM-3. Parallel zur zunehmenden Th1-vermittelten Immunantwort reduzierte sich die Th2-vermittelte Immunantwort durch Blockade von TIM-3, sodass das immunologische Gleichgewicht und damit der Gesundheitszustand der Patienten verbessert werden konnte (Tang et al. 2015).

Abgesehen von den oben genannten Erkrankungen ist TIM-3 mit seinem Einfluss auf die TLR-vermittelte Immunreaktion von enormer Bedeutung für den Krankheitsverlauf der Sepsis (Yang et al. 2013). Yang et al. (2013) konnten zeigen, dass die Herunterregulierung bzw. Blockade von TIM-3 zu einer Zunahme der Schwere der Sepsis führte. Bei Mäusen, die mit monoklonalen TIM-3-Antikörpern behandelt wurden, konnte eine erhöhte Anzahl proinflammatorischer Cytokine wie z. B. IL-6, ebenso wie erhöhte Niveaus von TLR-2 und -4 nachgewiesen werden. Die gesteigerte Makrophagen-Reaktivität rief eine vermehrte Entzündungsreaktion hervor. Die mit TIM-3-Antikörpern behandelten Mäuse hatten eine verringerte Überlebensrate. Umgekehrt konnte nachgewiesen werden, dass eine TIM-3 Überexpression zu einer signifikanten Unterdrückung der TLR-vermittelten Produktion proinflammatorischer Cytokine führte. Ausgehend von diesen Beobachtungen wird davon ausgegangen, dass TIM-3 durch die Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion entscheidend zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase während der Sepsis beiträgt (Yang et al. 2013; Wolf et al. 2020).

Trotz des wachsenden Verständnisses über den Einfluss von T-Zell-Inhibitoren wie TIM-3 auf diverse Erkrankungen, Tumorleiden oder die Sepsis, scheiterten bislang alle Studien mit TIM-3-Antikörpern bzw. in Kombination mit anderen T-Zell-Inhibitoren wie z. B. PD-1 zur

Anwendung dieser als mögliche Therapieansätze. Teilweise verschlechterte sich der Patientenzustand sogar infolgedessen (Zhao et al. 2014; Xia et al. 2018). Ein möglicher Grund dafür stellt die Heterogenität septischer Patienten bzw. die genetische Variabilität dar (Marshall 2014b). Der Einsatz von spezifischen Antikörpern hat das Potenzial für eine auf den Patienten zugeschnittene Therapie. Allerdings ist dafür die vorgeschaltete immunphänotypische Analyse der septischen Patienten und damit die Untersuchung spezieller genetischer Varianten der T-Zell-Inhibitoren unerlässlich (McBride et al. 2021).

1.2.2 LAG-3

LAG-3, auch als CD223 bekannt, befindet sich auf Chromosom 12 (Chr.12 p13) und ist ebenso wie TIM-3 ein Typ-1-Transmembranprotein (Andrews et al. 2017; Maruhashi et al. 2020). Als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) setzt sich LAG-3 aus vier extrazellulär gelegenen IgSF-*like*-Domänen, D1 bis D4, einer transmembranen Domäne sowie einem zytoplasmatischen Schwanz zusammen (Triebel et al. 1990; Mason et al. 2001). Dieser Aufbau ähnelt stark dem des CD4-Ko-Rezeptors, weshalb ein gewisser Verwandtschaftsgrad angenommen wird. Hinzu kommt, dass beide an den MHC-Klasse-II-Liganden auf APCs binden, wobei LAG-3 durch einen zusätzlichen Aminosäure *loop* in der D1-Domäne eine höhere Affinität zu MHC-II aufweist (Huard et al. 1997). Mittlerweile ist bekannt, dass LAG-3 nicht universell an MHC-II bindet, sondern vielmehr an stabile Komplexe aus Peptiden und MHC-II (Maruhashi et al. 2018; Maruhashi et al. 2020).

Triebel et al. (1990) entdeckten das LAG-3-Protein auf aktivierten NK- und T-Zellen. Huard et al. (1994) konnten unter Verwendung LAG-3-spezifischer monoklonaler Antikörper bestätigen, dass LAG-3 sowohl auf CD4+ als auch auf CD8+ T-Zellen exprimiert wird. Die Expression auf den CD8+ T-Zellen war hierbei um etwa das Siebenfache höher als auf den CD4+ T-Zellen (Huard et al. 1994). Später zeigte sich, dass LAG-3 nach vorausgehender T-Zell-Aktivierung auch auf aktivierten B-Zellen zu finden ist (Kisielow et al. 2005). Darüber hinaus konnte LAG-3 auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) nachgewiesen werden, welche als Untergruppe der dendritischen Zellen Interferone freisetzen (Workman et al. 2009). Als letzte, LAG-3 beinhaltende Zellgruppe sind die regulatorischen T-Zellen, genauer die im peripheren Blut nachgewiesenen regulatorischen T-Zellen Typ 1, kurz Tr1, zu nennen. Tr1 Zellen haben eine immunsupprimierende Aktivität und Einfluss auf die Immuntoleranz (Gagliani et al. 2013).

MHC-II war der erste bekannte LAG-3-Ligand. Untersuchungen zur exakten Wirkweise dieses Mechanismus zeigten, dass LAG-3 durch parallele Assoziation mit CD3 Einfluss auf den CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplex hat (Hannier et al. 1998). Durch die Bindung von LAG-3 kommt es zu einer gestörten Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors. Eine reduzierte T-Zell-Proliferation und Cytokin-Produktion sind die Folge (Hannier et al. 1998). Seit jener Beobachtung von Hannier et al. (1998) ist LAG-3 in seiner Funktion als inhibitorischer T-Zell-Rezeptor angesehen. Fast 20 Jahre später kam es zur Entdeckung

zweier weiterer Liganden; LSECtin und Galectin-3 (Xu et al. 2014; Kouo et al. 2015). LSECtin steht für *liver sinusoidal endothelial cell lectin* und ist ein Typ-II-Transmembranprotein, welches zur Familie der C-Typ Lektin-Rezeptoren gehört. LSECtin ist dafür bekannt, die T-Zell-Aktivität in verschiedenen Infektionserkrankungen zu reduzieren. Xu et al. (2014) konnten beweisen, dass LSECtin mit LAG-3 interagiert und die T-Zell-Aktivität in Melanomzellen reduziert. Durch Blockade der LAG-3/LSECtin-Interaktion konnte die Tumorprogression verringert werden. Ungehemmt führte die Interaktion von LAG-3 und LSECtin zur T-Zell-Inhibition, hier gemessen an einer Verringerung der Interferon- γ -Sekretion, woraufhin der Tumor ungehemmt wachsen konnte (Xu et al. 2014). Des Weiteren wurde der zur Familie der Lektine gehörige Ligand Galectin-3 von Kouo et al. (2015) entdeckt. Galectin-3 konnte in vitro eine Regulation der T-Zell-Aktivität hin zu einer induzierten Apoptose, einer T-Zell-Rezeptor-Vernetzung und der allgemeinen Herunterregulierung jener T-Zell-Rezeptoren zeigen. Bei Tumorerkrankungen konnte bei Galectin-3-Mäusen eine gesteigerte CD8⁺ T-Zell-Aktivität, eine Erhöhung pro-inflammatorischer Cytokine sowie vermehrte pDCs gemessen werden. Durch die Interaktion von Galectin-3 mit LAG-3 kam es hingegen zu einer reduzierten CD8⁺ T-Zell-Expression (Kouo et al. 2015).

Schwerpunkt aktueller Forschung ist die intrazelluläre Domäne von LAG-3. Im zytoplasmatischen Schwanz fanden sich, verglichen mit anderen T-Zell-Inhibitoren, neuartige Signalmotive bestehend aus spezifischen Aminosäuresequenzen, welche für die inhibitorische Funktion des LAG-3-Proteins von zentraler Bedeutung zu sein scheinen (Maeda et al. 2019; Chocarro et al. 2021). Bei ihren Untersuchungen zum strukturellen Aufbau von LAG-3 fanden Workman et al. (2002; 2004) charakteristische Aminosäuresequenzen, wie u. a. die sogenannten Sequenzmotive „KIEELE“ und „EP“, welche unabhängig von der Spezies in jedem LAG-3-Protein vorzufinden waren (Workman et al. 2002). Ihre Auswirkungen auf das Immunsystem wurden daraufhin von Workman et al. (2004) im Mausmodell untersucht. U. a. verabreichten sie LAG-3-negativen Mäusen das Superantigen Staphylococcus Enterotoxin B. Infolgedessen entwickelte dieser Mäusestamm zum einen eine Splenomegalie und zum anderen eine erhöhte T-Zell-Expansion. Ein weiterer experimenteller Ansatz untersuchte LAG-3-negative Mäuse mit einer Sendai-Virusinfektion. Bei ihnen konnte eine vermehrte Anzahl von T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass LAG-3 von zentraler Bedeutung für die T-Zell-Entwicklung und die T-Gedächtniszellen ist und hierbei als negativer Immunregulator fungiert (Workman et al. 2004). Bis dato konnten drei Sequenzmotive im zytoplasmatischen Schwanz nachgewiesen werden; das *potentially phosphorylatable serine S484*, das „KIEELE“-Motiv und das *glutamate-proline dipeptide multiple repeats* „EP“-motif (Chocarro et al. 2021). Noch ist die genaue Funktion und Wirkweise dieser Sequenzmotive nicht bekannt, man geht jedoch davon aus, dass sie entscheidend für die inhibitorische Funktion von LAG-3 sind (Maeda et al. 2019; Chocarro et al. 2021).

Abbildung 4 zeigt vereinfacht den strukturellen Aufbau von LAG-3 sowie die Ligandeninteraktionen.

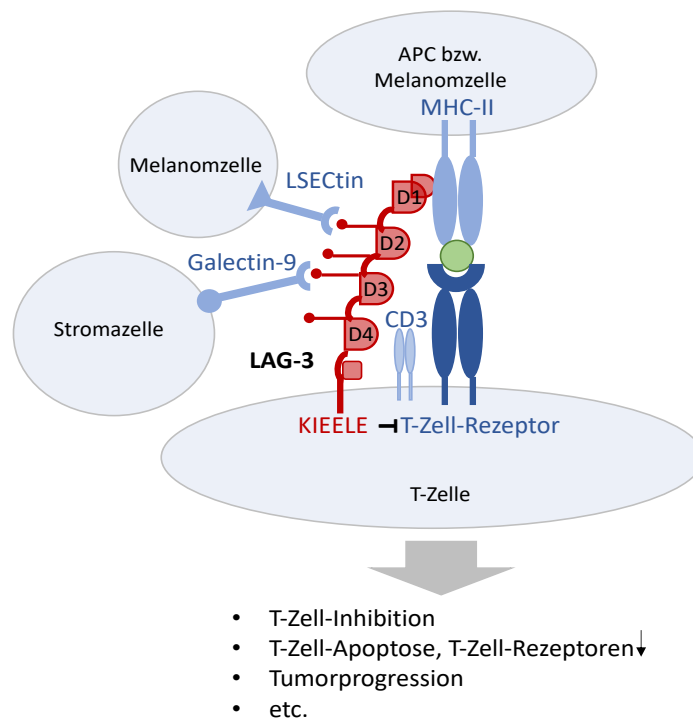


Abbildung 4: LAG-3 - struktureller Aufbau und Ligandeninteraktion

Abbildung modifiziert nach Andrews et al. 2017, S. 28. *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3) setzt sich aus vier extrazellulären Immunglobulin-Superfamilie-(IgSF)-*like*-Domänen (D), einer transmembranären Domäne und einem zyttoplasmatischen Schwanz zusammen (Triebel et al. 1990). In der D1-Domäne besitzt LAG-3 einen zusätzlichen Aminosäure *loop*, welcher die Bindung an den *major-histocompatibility-complex-II* (MHC-II) auf einer *antigen presenting cell* (APC) bzw. Melanomzelle ermöglicht (Huard et al. 1997). Weitere LAG-3-Liganden sind *liver sinusoidal endothelial cell lectin* (LSECtin) auf Melanom- und Galectin-3 auf Stromazellen in Tumorumgebung (Xu et al. 2014; Kouo et al. 2015). LAG-3 ist räumlich und funktionell mit dem CD3-Ko-Rezeptor assoziiert (Hannier et al. 1998). Bindet LAG-3 an seine Liganden kommt es über den CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplex und das intrazellulär gelegene Sequenzmotiv „KIEELE“ zu einer gestörten Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors (Hannier et al. 1998; Workman et al. 2002). Infolgedessen wird u. a. die T-Zell-Aktivität gehemmt (Hannier et al. 1998), die Apoptose von T-Zellen und T-Zell-Rezeptoren induziert (Kouo et al. 2015) und das Tumorwachstum von beispielsweise Melanomzellen gefördert (Xu et al. 2014). In Summe führen die Ligandeninteraktionen von LAG-3 mit MHC-II, LSECtin und Galectin-3 zu einer Inhibition der T-Zell-Aktivität, sodass LAG-3 Einfluss auf die Homöostase des Immunsystems hat (Andrews et al. 2017).

In seiner Funktion als inhibitorischer T-Zell-Rezeptor kann LAG-3 ebenso wie TIM-3 bei Unterexpression die T-Zell-Antwort nicht ausreichend hemmen und den Organismus somit nicht vor Autoimmunität schützen, während LAG-3 bei Überexpression eine T-Zell-Aktivität soweit verringern kann, dass Tumorprogression und Erregerpersistenz mögliche Folgen sind (Hu et al. 2020).

Eine verringerte LAG-3-Expression zeigte sich beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (Nakachi et al. 2017) oder Psoriasis (Kim et al. 2018). Im Kontext der Autoimmunerkrankungen hat LAG-3 eine protektive Funktion inne (Hu et al.

2020). Eine weitere im Zusammenhang mit LAG-3 an Bedeutung gewonnene Erkrankung ist der Morbus Parkinson. Auf pathologischer Ebene zeigte sich eine Aggregation von α -Synuclein in den Lewy-Körperchen bei Patienten mit Morbus Parkinson, Lewy-Body-Demenz oder Multisystematrophie (Goedert et al. 2012). Guo et al. (2019) fanden bestimmte LAG-3 SNPs, welche mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko an Morbus Parkinson korrelieren. Mittlerweile ist bekannt, dass LAG-3 α -Synuclein-Fibrillen bindet und die Endozytose sowie die intrazelluläre Transmission verändert. Zukünftig sollen LAG-3 SNPs zur Risikostratifizierung und die Messung des löslichen LAG-3s im Liquor und Serum als Biomarker zur Früherkennung der Parkinsonerkrankung eingesetzt werden (Angelopoulou et al. 2020).

Anders verhält es sich bei einer LAG-3-Überexpression. Erhöhte LAG-3 Konzentrationen fanden sich bei persistierenden Virus- und Parasitenerkrankungen wie beispielsweise bei Tuberkulose-, Malaria-, Hepatitis B- bzw. C-Virus-Infektion (Hu et al. 2020). Ebenso wie bei einer persistierenden Infektion, kommt es im Rahmen einer Tumorerkrankung zu einer andauernden Antigen-Exposition und anhaltenden Entzündungssituation, sodass eine T-Zell-Erschöpfung und damit erhöhte Konzentrationen der *Checkpoint*-Inhibitoren einschließlich LAG-3 resultiert (Hu et al. 2020). Der Nachweis von LAG-3 auf Tumor-infiltrierenden Immunzellen ist prognostisch ungünstig. LAG-3 konnte in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen wie beispielsweise beim Multiplen Myelom, Melanom, Magen- oder kolorektalem Karzinom nachgewiesen werden (He et al. 2016; Lecocq et al. 2021). Ein vielversprechender Ansatz bei der Immuntherapie von Tumorerkrankungen ist die alleinige bzw. kombinierte Blockade von LAG-3 mit anderen *Checkpoint*-Inhibitoren. Aktuell befindet sich Relatlimab, ein monoklonaler Antikörper zur Hemmung von LAG-3, zusammen mit dem PD-1-hemmenden Nivolumab in einer Phase-II/III-Studie bei Patienten mit Melanom (Lecocq et al. 2021).

Abgesehen von den genannten Assoziationen mit diversen Erkrankungen, ist LAG-3 von entscheidender Bedeutung für den Krankheitsverlauf der Sepsis. Lou et al. (2020) induzierten durch Blinddarmligatur und -punktion eine Sepsis-Erkrankung in Mäusen. Zunächst konnte durch Messung der LAG-3-Expressionsrate 24 Stunden nach Ligatur und Punktion eine erhöhte LAG-3-Expression auf CD4+ und CD8+ T-, CD19+ B-, NK-, regulatorischen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Anschließend wurde ein Teil der septischen Mäuse mit LAG-3-Antikörpern behandelt. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten sich bei den mit LAG-3-Antikörpern behandelten sowie *Knockout*-Mäusen eine verringerte T-Zell-Apoptose, verringerte pro- und anti-inflammatorische Cytokine, hier IL-6, TNF- α und IL-19, sowie erhöhte Sekretionsraten an Interferon- γ . Von entscheidender Bedeutung war allerdings, dass sich sieben Tage nach Sepsisbeginn eine verringerte Bakterienlast und eine signifikant höhere Überlebensrate bei den LAG-3 *Knockout*- und den mit Antikörpern behandelten Mäusen zeigte. Die Überlebensrate der Wildtyp-Mäuse ergab 13,3 %, während jene der mit LAG-3-Antikörpern behandelten und *Knockout*-Mäusen 53,3 % betrug. Durch

die Blockade von LAG-3 ergab sich bei diesen Mäusen ein wesentlich höheres Gesamtüberleben nach Sepsis-Induktion verglichen mit den septischen Wildtyp-Mäusen (Lou et al. 2020). In Bezug auf den Menschen untersuchten Niu et al. (2019) den Einfluss von LAG-3 und PD-1 ko-exprimierenden T-Zellen auf das Überleben von septischen Patienten. T-Zellen, die zugleich LAG-3 und PD-1 ko-exprimierten, zeigten im Vergleich zu denen, die nur einen der beiden T-Zell-Inhibitoren aufwiesen, eine verstärkte T-Zell-Inhibition bzw. verringerte Anzahl an T-Zellen, einen erhöhten SOFA *Score* und im Verlauf längere Krankenhausaufenthalte sowie eine erhöhte Mortalität (Niu et al. 2019).

1.3 Das menschliche Genom und die untersuchten SNPs

1990 wurde das *Human Genome Project*, kurz HGP, ins Leben gerufen. Ziel war es die komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms, d. h. die Abfolge aller Basenpaare der menschlichen DNA zu entschlüsseln (Cichon et al. 2002). Ferner sollten alle Gene des Menschen und insbesondere jene, welche mit bestimmten Erbkrankheiten assoziiert sind, identifiziert und die gewonnenen Informationen in einer Datenbank gesammelt, analysiert und zugänglich gemacht werden (Carrasco-Ramiro et al. 2017).

Vergleicht man zwei menschliche Genome miteinander, zeigt sich eine Übereinstimmung von 99,9 %. Die übrigen 0,1 % beinhalten etwa drei Millionen Sequenzvarianten, von denen ein Teil für phänotypische Unterschiede und gewisse Krankheitsdispositionen verantwortlich gemacht wird (Cichon et al. 2002). Genetische Sequenzvarianten werden auch Polymorphismen genannt, zu denen die sogenannten SNPs, *single nucleotide polymorphisms*, gehören. SNPs beschreiben die Mutation eines einzelnen Basenpaares, liegen in Proteinkodierenden Abschnitten, den Exons oder in nicht-kodierenden Abschnitten, den Introns, und machen bis zu 90 % aller individuellen genetischen Unterschiede aus (Cichon et al. 2002).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde nach genetischen Polymorphismen im Zusammenhang mit einer erhöhten oder erniedrigten Inzidenz für die Entwicklung einer Sepsis bzw. für mit Sepsis assoziierten Pathophysiologien gesucht (David et al. 2016). Lu et al. (2019) untersuchten in ihrer Metaanalyse häufig untersuchte genetische Varianten, die mit einer erhöhten Suszeptibilität für eine Sepsis-Erkrankung in Verbindung gebracht wurden. Es resultierten 405 genetische Varianten auf 172 Genen, von denen bis zu 95 % SNPs waren und diese vornehmlich im Bereich der Introns, aber auch der Exons, sowie innerhalb der Promotorregion lokalisiert waren. Wie bereits angedeutet, existieren in der *TIM*- und *LAG*-Gen-Familie zahlreiche SNPs, welche mit diversen Autoimmun- und allergischen Erkrankungen assoziiert sind (Lee et al. 2011; Hu et al. 2020). Vier funktionell bedeutende Polymorphismen stellen die auf Chromosom 5 lokalisierten SNPs *TIM*-3 rs1036199 und rs10515746 sowie die auf Chromosom 12 lokalisierten SNPs *LAG*-3 rs870849 und rs951818 dar, welche im Folgenden genauer untersucht werden. Die Varianten werden dabei entsprechend der international gültigen Mutationsnomenklatur der HGVS, *Human Genome Variation Society*, beschrieben.

1.3.1 TIM-3 rs1036199

Der TIM-3 rs1036199 SNP befindet sich beim Menschen auf Chromosom 5 in Position 157104725, Sequenzname ist GRCh38.p13 chr5. Entsprechend der HGVS Nomenklatur wird die Variante als NC_000005.10:g.157104725C>A beschrieben. Demnach ist die *Reference Sequence* NC_000005.10, die Position des betroffenen Nukleotids beträgt 157104725 und es kommt zur Substitution des Cytosins (C) durch Adenin (A). G steht in diesem Kontext für *genomic reference sequence*. TIM-3 rs1036199 codiert für eine *Missense*-Mutation, bei der ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Leucin resultiert. Der TIM-3 rs1036199 SNP kann daher das abgelesene Protein an sich und seine Funktion beeinflussen (dbSNP rs1036199 - NCBI 2022).

Eine Vielzahl von Studien untersuchte daraufhin den Zusammenhang zwischen TIM-3 rs1036199 und dem Vorkommen verschiedener Erkrankungen, mit besonderem Fokus auf Autoimmunerkrankungen. Bei Vorliegen der TIM-3 rs1036199 SNP-Variante mit nachfolgender *Missense*-Mutation konnte eine erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen, sowie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für rheumatoide Arthritis im Speziellen, nachgewiesen werden (Liu et al. 2018; Razi et al. 2019). Bei Patienten mit Morbus Crohn konnte zudem eine erhöhte Penetrationsgefahr bei vorhandenem TIM-3 rs1036199 SNP beobachtet werden (Sun et al. 2017).

1.3.2 TIM-3 rs10515746

Ein weiterer im Zusammenhang mit genetischen Varianten des TIM-3-Proteins funktionell bedeutender SNP ist TIM-3 rs10515746 auf Chromosom 5 in Position 157109557. Sequenzname ist GRCh38.p13 chr5 und die entsprechende Variantenbeschreibung NC_000005.10:g.157109557A>C. Es kommt zu einem Austausch von Adenin (A) gegen Cytosin (C). Damit fungiert TIM-3 rs10515746 als *Upstream Transcript Variant* am 5'Ende des Genes in der Promotorregion. Der Promotor ist von essenzieller Bedeutung für die Initialisierung der Gentranskription. Durch den mit dem SNP verbundenen Basenaustausch kann es schließlich zu Veränderungen in der Gentranskription und folglich beim Protein kommen (dbSNP rs10515746 - NCBI 2022).

Für TIM-3 rs10515746 konnte eine erhöhte Suszeptibilität für die Spondylitis ankylosans nachgewiesen werden (Wang et al. 2014). Parallel zu TIM-3 rs1036199 zeigte sich auch bei TIM-3 rs10515746 ein erhöhtes Penetrationsrisiko bei Patienten mit Morbus Crohn (Sun et al. 2017). Yaghoobi et al. (2016) untersuchten 102 Patienten mit Multipler Sklerose sowie 102 gesunde Studienteilnehmer auf mögliche Korrelationen mit verschiedenen TIM-3 SNPs. Die Studie ergab eine signifikante Häufung des C-Allels sowie des CC-Genotyps von TIM-3 rs10515746 (-574 A>C) bei Patienten mit Multipler Sklerose im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe.

1.3.3 LAG-3 rs870849

Beim Menschen befindet sich LAG-3 rs870849 auf Chromosom 12 in Position 6777854. Der entsprechende Sequenzname lautet GRCh38.p13 chr12 und der zugehörige Austausch wird gemäß HGSV Nomenklatur als NC_000012.12:g.6777854T>C wiedergegeben. Durch den SNP kommt es zu einem Basenaustausch von Thymin (T) zu Cytosin (C). Die beobachteten Codone wechseln von ATC zu ACC, sodass es zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin kommt und der LAG-3 rs870849 SNP ergo zu einer *Missense*-Mutation führt (dbSNP rs870849 - NCBI 2022).

In Bezug auf einen möglichen Einfluss auf Autoimmunerkrankungen zeigte sich für den LAG-3 rs870849 SNP ein Zusammenhang mit Multipler Sklerose und der Primären Immunthrombozytopenie (Zhang et al. 2005; Wang et al. 2021). Zhang et al. (2005) fanden eine signifikante Erhöhung des LAG-3 rs870849 TT-Genotyps bei Patienten mit Multipler Sklerose. Wang et al. (2021) konnten hingegen beobachten, dass das Vorhandensein des LAG-3 rs870849 T-Allels als protektiver Faktor für die Erkrankungsschwere bei der Primären Immunthrombozytopenie fungiert, da das Vorhandensein des T-Allels an dieser Position zu einem geringeren Thrombozytenverlust führte.

1.3.4 LAG-3 rs951818

Der LAG-3 rs951818 SNP findet sich im menschlichen Genom auf Chromosom 12 in Position 6786889. Der zugehörige Sequenzname lautet GRCh38.p13 chr12 und der Allelaustausch wird wie folgt beschrieben: NC_000012.12:g.6786889C>A. Cytosin (C) wird zu Adenin (A) (dbSNP rs951818 - NCBI 2022).

LAG-3 rs951818 befindet sich in einer nicht-codierenden Region *downstream* des LAG-3-Gens und könnte Einfluss auf die Expression von LAG-3 haben (Guo et al. 2019). Die sich aus dem SNP ergebende funktionelle Konsequenz ist bis dato nicht ausreichend gesichert. Allerdings konnte eine Korrelation des LAG-3 rs951818 SNPs mit dem Auftreten von Multipler Sklerose beobachtet werden (Zhang et al. 2005). Des Weiteren wurden in der Fall-Kontroll-Studie von Guo et al. (2019) 646 Patienten mit Morbus Parkinson sowie 536 gesunde Probanden auf ihren LAG-3 rs951818 Genotypen untersucht. Es zeigte sich, dass das Vorliegen des LAG-3 rs951818 CC-Genotyps mit einem erhöhten Auftreten von Morbus Parkinson bei weiblichen Patienten korreliert.

1.4 Zentrale Fragestellung

Sepsis stellt nach wie vor eine globale Gesundheitsbedrohung dar, an der jährlich Millionen von Menschen erkranken, versterben oder unter den Langzeitfolgen leiden (Rudd et al. 2020). Weder ist die Pathophysiologie der Sepsis vollends entschlüsselt, noch existiert eine spezifische Therapie für septische Patienten (van der Poll et al. 2021). Die funktionelle Bedeutung negativ-kostimulierender T-Zell-Inhibitoren wie TIM-3 und LAG-3 zur Wiedererlangung der Immunhomöostase während einer Sepsis-Erkrankung rückt immer mehr ins Zentrum aktueller Forschung (Andrews et al. 2017; Wolf et al. 2020). Die Betrachtung des Einflusses genetischer Varianten wie der SNPs TIM-3 rs1036199 und rs10515746 bzw. LAG-3 rs870849 und rs951818 auf interindividuelle Unterschiede im Zusammenhang mit diversen Erkrankungen und Infektionsgeschehen ist ein vielversprechender Ansatz in Hinblick auf eine stärkere personalisierte bzw. präzisere Medizin. Hierbei geht es um die potenzielle Nutzung des genetischen Phänotyps für ein auf den einzelnen Patienten zugeschnittenes Therapiekonzept unter Berücksichtigung von Vorerkrankungen, Genetik, Umwelt und Lebensstil (Carrasco-Ramiro et al. 2017; Stanski und Wong 2020). In dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass die genannten TIM-3 und LAG-3 SNPs Einfluss auf die Immunpathologie, die Krankheitsschwere und die Mortalität einer Sepsis-Erkrankung haben können. Darauf aufbauend werden drei zentrale Fragen untersucht:

1. Beeinflussen die untersuchten SNPs die 28- bzw. 90-Tage-Mortalität septischer Patienten als *main Outcome-Parameter*?
2. Wirken sich die untersuchten SNPs auf die Schwere der Sepsis-Erkrankung aus?
3. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen den untersuchten SNPs und bestimmten Erregern als Ausgangspunkt der Sepsis erkennen?

2 Material und Methoden

Der vorliegenden Studie liegen die Krankheitsverläufe 712 kaukasischer Patienten zugrunde, die aufgrund einer Sepsis-Erkrankung intensivmedizinisch in der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) behandelt wurden. Im Zuge des GenoSep-Projektes wurden diese Patienten im Zeitraum von April 2012 bis Mai 2019 anhand der jeweils geltenden Sepsis-Leitlinie in die Studie eingeschlossen. Mittels eines studieninternen *clinical report forms* (CRFs) wurden die Patienten für die Dauer ihres intensivmedizinischen Aufenthaltes bzw. max. 28 Tage klinisch beobachtet und ihr Überleben 90 Tage nach Diagnosestellung kontrolliert. Die bei Studieneinschluss entnommene Patientenblutprobe wurde einer DNA-Extraktion sowie Genotypisierung für je zwei Polymorphismen der Proteine TIM-3 und LAG-3 unterzogen und die Ergebnisse ebenso wie die gesammelten Patientendaten statistisch ausgewertet.

Der Antrag auf ethische Prüfung des Vorhabens wurde im Januar 2012 unter dem Aktenzeichen 15/1/12 von der zuständigen Ethikkommission der UMG positiv beschieden und die ethischen Grundsätze der Deklaration von Helsinki zur medizinischen Forschung am Menschen (Version 2008) respektiert und eingehalten.

2.1 Patienteneinschluss

Täglich wurden alle Patienten der anästhesiologisch bzw. chirurgisch geführten Intensivstationen der UMG auf Symptome und klinische Parameter einer Sepsis kontrolliert. Zur Rekrutierung septischer Patienten wurde bei Studienbeginn die damals geltende Sepsis-2 Definition benutzt, anhand der die Patienten (Studiennummer 1 – 672) in die Studie eingeschlossen wurden. Seit Einführung der aktuellen Sepsis-3 Definition kamen Patienten bei einem Anstieg des SOFA *Scores* um zwei oder mehr Punkte als potenzielle Studienteilnehmer in Frage (hier die Patienten 673 – 848).

Alle erforderlichen Patientendaten und klinisch relevanten Parameter wurden im elektronischen Informationssystem *IntelliSpace Critical Care and Anesthesia* (ICCA, ©Koninklijke Philips N. V., Amsterdam, Niederlande) sowie der webbasierten Integrations- und Kommunikationsplattform *Ixserv* (IXSERV.4, ©ixmid Software Technologie GmbH, Köln, Deutschland) aufgezeichnet. Röntgenbilder konnten mit dem speziell für Bildgebung entwickelten Programm *Centricity Enterprise Web V3.0* (1995-2006 GE Medical Systems, Solingen, Deutschland) eingesehen werden. Mithilfe dieser Programme wurden alle Patienten der Intensivstationen kontinuierlich auf Zeichen einer Sepsis geprüft, ihr täglicher SOFA *Score* ermittelt und im Falle eines ansteigenden SOFA *Scores* um zwei oder mehr Punkte in die Studie eingeschlossen.

Von vornherein aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten unter 18 Jahren, schwangere oder stillende Patientinnen, Familienmitglieder der Arbeitsgruppe sowie Patienten, die schon an einer anderen Studie teilnahmen. Patienten, welche in den letzten sechs Monaten eine immunsuppressive Therapie oder Chemotherapie erhalten hatten, wurden ebenso wie

Patienten mit einem sechswöchig zurückliegenden Myokardinfarkt, einer kardiopulmonalen Reanimation, einer gemäß der New York Heart Association (NYHA) klassifizierten Herzinsuffizienz im Stadium NYHA IV oder einer Infektion mit dem HIV- oder Hepatitis-B- bzw. C-Virus, nicht in die vorliegende Studie aufgenommen. Weitere Ausschlusskriterien waren das Vorliegen eines apallischen Syndroms, eine *do-not-resuscitate*-(DNR-)Anordnung und Patienten im Endstadium einer unheilbaren Erkrankung, bei der ein Überleben innerhalb der nächsten 28 Tage höchst unwahrscheinlich war. Letzteres beinhaltet die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) Gold-Stadium IV, Sauerstoffbedarf in der Häuslichkeit und eine chronische Niereninsuffizienz. Schlussendlich wurden nur Patienten mit eigener Einwilligung bzw. mit Einwilligung des gesetzlichen Betreuers in die Studie aufgenommen (siehe auch Mansur et al. 2014).

Patienten, die bei Nichtvorhandensein der genannten Ausschlusskriterien als potenzielle Studienteilnehmende in Frage kamen, wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über Studieninhalte, -durchführung und -zwecke aufgeklärt. Ferner wurden sie über die Verarbeitung personenbezogener Daten und ihr Recht, die Einwilligung jederzeit widerrufen sowie eine Vernichtung der Blutprobe einfordern zu können, belehrt. Im Falle einer Einwilligungsunfähigkeit erfolgte die Einwilligung über den gesetzlich Betreuenden bzw. Vertretenden. Jedem Studienteilnehmenden wurde eine schriftliche Kopie der Einwilligungserklärung mitsamt allen Informationen ausgehändigt. Mit der Unterschrift willigten Patient bzw. gesetzlich Betreuende zugleich einer Blutentnahme von max. 30 mL über einen bereits vorhandenen Gefäßzugang sowie deren Verwendung für anschließende genetische Analysen ein. Innerhalb von 72 Stunden nach Studieneinschluss wurden jedem Studienteilnehmenden drei Ethylendiamintetraacetat- (EDTA-) Blutröhrchen abgenommen: zwei für die genetischen Analysen, eines zur Früherkennung von Herpes-Simplex-, Varizella-Zoster- und Epstein-Barr-Viren, sowie ein Serum-Gel-Röhrchen zum Nachweis einer möglichen Zytomegalievirus- (CMV-) Infektion. Jeder Studienteilnehmende und jede zugehörige Blutprobe wurde mit einer eigenen Identifizierungsnummer versehen, sodass die patientenbezogenen Daten von hier an in verschlüsselter Form vorlagen. Die Blutproben wurden bis zur weiteren Verwendung in den Laboratorien der klinischen Pharmakologie eingefroren.

2.2 Pflege der Patientendaten

Nach erfolgtem Studieneinschluss wurde jeder Patient anhand eines studieninternen Erfassungsbogens, dem CRF, für die Dauer des intensivmedizinischen Aufenthalts bzw. für maximal 28 Tage täglich evaluiert. 90 Tage nach Sepsisbeginn wurde eine Überlebenskontrolle durchgeführt. Dafür wurde der Patient, falls zu diesem Zeitpunkt entlassen, über den hinterlegten Familienkontakt erneut kontaktiert. Im Falle der Nichterreichbarkeit konnte das Standesamt bzgl. einer Überlebenskontrolle kontaktiert werden. Nach Vervollständigung des patienteneigenen CRFs wurden alle erhobenen Daten in eine studieneigene elektronische Datenbank übertragen.

2.2.1 *Clinical report form (CRF)*

Der CRF setzte sich zum einen aus allgemeinen Patientendaten, inklusive solchen zum Gesundheitszustand vor der Sepsis, zum anderen aus den täglich erhobenen Parametern des intensivmedizinischen Aufenthaltes zusammen. Angefangen bei den allgemeinen Patientendaten wurden zuerst die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Beim zu untersuchenden Infektionsfokus (Lunge, Abdomen, etc.) wurde zwischen klinischem Verdacht und mikrobiologischer Bestätigung unterschieden. Ferner wurden die vorliegende Einwilligungserklärung sowie Kontaktdaten von Betreuenden, Verwandten, etc. vermerkt. Zeitpunkt und Ort der Blutentnahme wurden mitsamt den Ergebnissen der serologischen Untersuchung auf eine mögliche CMV-Infektion im CRF eingetragen. Die genetische Abstammung, in dieser Studie nur kaukasische Patienten, das genaue Datum der Krankenhaus- sowie das der intensivmedizinischen Aufnahme wurde zusammen mit Sepsisbeginn, Alter (Jahre), Körpergewicht (kg) und Körpergröße (cm) des Patienten im Rahmen der allgemeinen Patientendaten durch den CRF erfasst (vgl. Liese 2018).

Es folgten Patientendaten zum Gesundheitsstatus vor Beginn der Sepsis. Hierzu gehörte der operative Status, untergliedert in Notfall- und elektive Operationen, Vorerkrankungen des kardiovaskulären, respiratorischen, neurologischen, gastrointestinalen, renalen und immunologischen Systems, sowie die tägliche Medikation des Patienten. Für den Fall weiterer Nachfragen bzgl. der Krankengeschichte wurden zusätzlich die Kontaktdaten des Hausarztes hinterlegt (vgl. Liese 2018).

Anschließend erfasste der CRF relevante Patientendaten für die gesamte Dauer der intensivmedizinischen Versorgung bzw. höchstens 28 Tage. Dazu zählte die Dokumentation der Röntgenbefunde (nur Röntgenthorax), der mikrobiologischen Erreger und ihrer Nachweise, ebenso wie alle in diesem Zeitraum erhaltenen Antibiotika- und Transfusionstherapien. Darüber hinaus wurde die Verlegung nach intern bzw. extern, das Datum der Krankenhausentlassung sowie bei Versterben des Patienten, Todesdatum und -ursache, verzeichnet. Die sich anschließenden circa 30 klinischen Parameter dienten in Form einer Patientenvisite der täglichen Beobachtung des Patienten, seines Gesundheitszustandes und somit des septischen Krankheitsverlaufes. Zuerst wurde die höchste und niedrigste Körpertemperatur (°C) notiert, gefolgt von hämatologischen Parametern, hier Hämoglobin (g/dL), Hämatokrit (%), wie auch Erythrozyten- ($10^6/\mu\text{L}$), Thrombozyten- ($10^3/\text{mm}^3$) und Leukozytenzahl ($10^3/\text{mm}^3$). Parameter des Herz-/Kreislaufsystems umfassten jeweils den höchsten und niedrigsten Wert der Herzfrequenz (min^{-1}), des systolischen und diastolischen Blutdruckes (mmHg) ebenso wie die höchste Dosis verabreichter Katecholamine, genauer Adrenalin ($\mu\text{g}/\text{min}$), Noradrenalin (μ/min) und Dobutamin ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). In der Kategorie Atmung/Säure-Basen-Haushalt wurde die höchste und niedrigste Atemfrequenz (min^{-1}), der niedrigste Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidwert (mmHg) mit der dazugehörigen inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) und die eventuelle Notwendigkeit einer invasiven Beatmung aufgeführt. Hierzu gehörte die Hinzunahme des *continuous positive airway pressures*, kurz

CPAP, bzw. der *non-invasive ventilation*, auch NIV, als beatmungsunterstützende Maßnahmen und zusätzlich die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) als künstliche Beatmung am Einschlussstag. Die Blutgasanalyse gab Auskunft über den arteriellen pH-Wert, die Elektrolyte Kalium und Natrium (mmol/L), den *base excess* (BE) zur Einschätzung des Säure-Basen-Haushaltes und schließlich über Laktat- (mmol/L) und Glukosewerte (mg/dL) bzw. abhängig von letzterem den Insulinbedarf. Anhand der Bilirubin- (mg/dL), AST- (Aspartat-Aminotransferase) und ALT- (Alanin-Aminotransferase) Werte (IU/L) genauso wie der Prothrombinzeit, alias Quick-Wert (%), und der (aktivierten) partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) (s), konnte die Leberzellschädigung abgeschätzt werden. Zur Beobachtung der Nierenfunktion wurden der Kreatinin-Wert (mg/dL), die Urinausscheidung (mL) in 24 Stunden und ein eventuelles Nierenersatzverfahren dokumentiert. Zur Beurteilung des ZNS diente die GCS und abschließend wurden die Entzündungswerte in Form des CRPs (mg/L) und PCTs ($\mu\text{g/L}$) aufgezeigt. Mithilfe der gesammelten Daten konnte für jeden Tag ein eigener SOFA *Score* errechnet werden. Zum Schluss wurde für jeden Patienten der *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) *Score* am Einschlussstag berechnet.

Der APACHE II *Score* klassifiziert schwerkranke, hospitalisierte Patienten anhand ihrer Erkrankungsschwere und gibt ferner eine Prognose zur Überlebenschancen ab (Knaus et al. 1981). Er wird aus zwölf Parametern zum physiologischen Gesundheitsstatus, dem Alter und sechs möglichen chronischen Vorerkrankungen des Patienten berechnet. Zu den physiologischen Parametern zählen die rektale Körpertemperatur ($^{\circ}\text{C}$), der mittlere arterielle Druck (mmHg), die Herz- sowie Atemfrequenz (min^{-1}), die Oxygenierung, der pH-, Natrium- und Kalium- (mmol/L) sowie Kreatinin- (mg/dL) Wert, Hämatokrit (%), Leukozytenzahl und GCS. Hierbei geht jeweils der am weitesten vom physiologischen Normalzustand entfernte Tageswert in die Berechnung ein. Jeder Parameter erhält eine Punktzahl von null bis vier, wobei null den physiologischen Normalzustand und vier einen schwer pathologischen Zustand charakterisiert. Anschließend wird diese Punktzahl mit den Punkten für Alter und jenen für vorliegende chronische Erkrankungen verrechnet. Letztere beinhalten schwere Organerkrankungen wie Leberzirrhose mit portalem Hochdruck, hepatische Insuffizienz, chronische Dialyse, obere gastrointestinale Blutungen in der Anamnese, sowie chronische Hypoxie, chronische Gefäßerkrankungen und eine generelle Immunschwäche wie beispielsweise im Rahmen einer Leukämie oder HIV-Infektion. Bei fehlenden chronischen Vorerkrankungen, jedoch stattgefundenen Operation werden zwei Punkte für eine elektive und fünf Punkte für eine Notfalloperation hinzuaddiert. Anhand dieser Parameter ergibt sich eine Gesamtpunktzahl zwischen 0 und maximal 71 Punkten. Mit steigender Punktzahl nimmt das Mortalitätsrisiko kontinuierlich zu. Patienten mit einer Punktzahl von ≥ 31 Punkten zeigten im Krankenhaus eine Mortalitätswahrscheinlichkeit von 70 % (Knaus et al. 1981; Knaus et al. 1985).

2.2.2 Arbeitsgruppe „Personalisierte Medizin“

Die Arbeitsgruppe „Personalisierte Medizin“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. A. Mansur schließt seit 2012 prospektiv septische Patienten in die GenoSep-Studie ein, um die „Bedeutung genetischer Polymorphismen der angeborenen Immunabwehr bei Sepsis und Organversagen“ zu untersuchen. Jedes Mitglied der Arbeitsgruppe wurde in die Aufgabebereiche des Patienteneinschlusses, der Datenerhebung und -verwaltung, sowie abhängig vom Projekt, in die Laborarbeit und statistische Auswertung eingearbeitet. Diese Aufgaben wurden für einen Zeitraum von mindestens einem Freisemester inklusive Semesterferien eigenständig durchgeführt. Die Dissertationsthemen wurden hierbei klar voneinander abgegrenzt.

Die vorliegende Dissertation gehört zum übergeordneten GenoSep-Projekt mit der Frage, inwieweit genetische Polymorphismen das *Outcome*, sprich die Mortalität und Krankheitschwere septischer Patienten beeinflussen. Die Verfasserin wurde von weiteren Doktoranden der Arbeitsgruppe, namentlich C. Mewes, J. Runzheimer und C. Böhnke, eingearbeitet und arbeitete mit diesen zusammen. Die Verfasserin war im Zeitraum von Februar bis Oktober 2019 für die Anfertigung der Dissertation freigestellt und war für den Patienteneinschluss, die Blutentnahmen und Datenerhebung sowie -verfolgung mithilfe des CRFs, genauso wie für die Überlebenskontrollen und die Pflege der Datenbank verantwortlich. Zusätzlich führte sie die DNA-Extraktion und -Genotypisierung sowie die statistische Auswertung im Labor der klinischen Pharmakologie eigenständig durch.

2.3 Material

2.3.1 Substanzen

Doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Eigenherstellung der UMG (Göttingen)
Ethanol (EtOH) 100 %	Merck (Darmstadt)
Puffer (AL, AW1, AW2, AE)	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAGEN Protease	Qiagen GmbH (Hilden)
Reagenzflaschen (<i>reagent bottles</i>) 6 x 30 mL	Qiagen GmbH (Hilden)
TaqMan® <i>Genotyping Master Mix</i> 10 mL	Life Technologies GmbH (Darmstadt)

2.3.2 Kits und Genotypisierungsassays

QIAamp® DNA <i>Blood Mini Kit</i> (50)	Qiagen GmbH (Hilden)
TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays	
LAG-3 C__8921385_10	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
LAG-3 C__9797874_10	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
TIM-3 C__2082038_1_	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
TIM-3 C__2082054_20	Life Technologies GmbH (Darmstadt)

2.3.3 Gebrauchswaren

384-Well-Platte, <i>PCR Plates, 384-well</i>	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
<i>Absolute qPCR Plate Seals</i> (AB-1170)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
<i>Adhesive PCR Plate Seals</i> (AB-0558)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Eppendorf- <i>Cup</i> (E- <i>Cup</i>) 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
Elutionsröhrchen 1,5 mL	Qiagen GmbH (Hilden)
Filterpipettenspitzen 200 und 1000 µL (<i>disposable filter tips</i>)	Qiagen GmbH (Hilden)
Nanu-Tropf-Küvette	Implen (München)
Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg)

QIAamp-Mini-Spinsäulen (<i>mini spin columns</i>)	Qiagen GmbH (Hilden)
Reagenz Flaschenhalter (<i>reagent bottle rack</i>)	Qiagen GmbH (Hilden)
Rotoradapter (<i>rotor adapter</i>)	Qiagen GmbH (Hilden)
Sammelröhrchen 2 mL (<i>collection tubes</i>)	Qiagen GmbH (Hilden)

2.3.4 Geräte

37 °C Inkubator	Binder GmbH (Tuttlingen)
Applied Biosystems™ 7900 HT <i>Fast Real-Time</i> PCR System (TaqMan®)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
DNA Engine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Eppendorf BioPhotometer®	Eppendorf AG (Hamburg)
Mikrozentrifuge, VWR Mini Star	VWR International GmbH (Darmstadt)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
QIAcube® Roboter	Qiagen GmbH (Hilden)
Multifuge™ X3R Universalzentrifuge	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Vortex-Genie®	VWR International GmbH (Darmstadt)

2.3.5 Softwareprogramme

7900 HT <i>Fast Real-Time</i> PCR System Software SDS v2.4.1 für Windows7	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
<i>Centricity Enterprise Web V3.0</i> (1995-2006 GE Medical Systems)	GE Healthcare GmbH (Solingen)
HaploView® <i>Software</i> (Version 4.2)	Broad Institute of MIT and Harvard (Cambridge, MA, USA)
Hardy-Weinberg <i>Calculator</i>	Michael H. Court (2005-2008)
<i>IntelliSpace Critical Care and Anesthesia</i> (ICCA)	©Koninklijke Philips N. V. (Amsterdam, Niederlande)
Ixserv	IXSERV.4, ©ixmid Software Technologie GmbH (Köln)
STATISTICA 13 <i>Software</i> (Version 13.0)	StatSoft (Tulsa, OK, USA)

2.4 Methoden

Die genetischen Analysen der Patientenblutproben fanden in den Laboratorien der klinischen Pharmakologie der UMG unter Leitung von Prof. Dr. med. J. Brockmüller statt und wurden unter Anleitung der technischen Assistentin K. Jobst durchgeführt.

2.4.1 Extraktion und Photometrie genomischer DNA

Für die folgende genetische Untersuchung musste zuerst aus jeder Patientenblutprobe DNA extrahiert werden. Anfangs geschah dies durch Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) mithilfe des AllPrep DNA Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden). Aus organisatorischen Gründen wurde dieses Verfahren durch den BioRobot EZ1® unter Hinzunahme des EZ1® DNA Blood Kits (Qiagen GmbH, Hilden) abgelöst, sodass nun aus 350 µL EDTA-Blut DNA extrahiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Extraktion aus 200 µL EDTA-Blut mithilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kits unter Verwendung des QIAcube® Roboters (Qiagen GmbH, Hilden) semiautomatisch durchgeführt (siehe dazu auch <https://www.qiagen.com/us/>).

Mithilfe des QIAcube® Roboters wurde aus 200 µL EDTA-Blut insgesamt 100 µL DNA mit einer durchschnittlichen Konzentration von 40 ng/µL extrahiert. Hierbei konnten bis zu zwölf Blutproben gleichzeitig extrahiert werden. Dazu wurden die Blutproben zuerst bei 37 °C für rund 30 min im Inkubator aufgetaut und währenddessen der QIAcube® Roboter für die automatische Extraktion vorbereitet. Nach erfolgreich durchgeführtem Selbsttest des Roboters, wurde unter der Rubrik „DNA“ die Einstellung „QIAamp DNA Blood Mini“ ausgewählt, „blood or body fluid“ als Probenmaterial und 100 µL als Elutionsvolumen eingestellt und die Auswahl des „blood and body fluid spin protocol V3“ bestätigt. Anschließend wurde der Roboter mit den passenden 200 und 1000 µL Filterpipettenspitzen bestückt und der Reagenz Flaschenhalter mit dem Lysepuffer AL (Position 2), 100%igem Ethanol (EtOH) (Position 3), den Waschpuffern AW1 (Position 4) und AW2 (Position 5), sowie dem Elutionspuffer AE (Position 6) versehen. Die Position 1 blieb frei. Danach wurde die QIAGEN Protease je nach Probenanzahl (284 µL Protease bei 12 Blutproben) in ein 1,5 mL Eppendorf-Cup (E-Cup) pipettiert und auf Position A, neben dem Reagenz Flaschenhalter, gestellt. Bei allen Versuchen wurden autoklavierte Pipettenspitzen verwendet. Passend zu den Blutproben wurden zwölf Rotoradapter mit jeweils einer QIAamp-Mini-Spinsäule, auch QIAamp *mini spin column*, und einem etikettierten 1,5 mL Elutionsgefäß bestückt und anschließend in die Zentrifuge des Roboters gestellt. Die nun aufgetauten Blutproben wurden kurz geschwenkt, jeweils 200 µL Blut vorsichtig in zuvor beschriftete 2 mL Sammelröhrchen pipettiert und in den *Shaker Rack* (Schüttelgestell) gesteckt. Nun wurde der QIAcube® Roboter gestartet und begann automatisch mit der DNA-Extraktion in vier Schritten. Die DNA wurde zuerst durch die QIAGEN Protease lysiert, sodass sie anschließend an die QIAamp Silikamembran, auch Kieselgelmembran, der QIAamp-Mini-Spinsäule binden konnte. Danach wurde die DNA sowohl mit dem AW1 als auch mit dem AW2 Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert

und zum Schluss mit dem AE-Elutionspuffer von der Silikamembran herausgelöst. In einer Stunde wurde aus 200 μL EDTA-Blut automatisch 100 μL purifizierte DNA mit einer Länge von bis zu 50 kb extrahiert und konnte später im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) vervielfältigt werden (<https://www.qiagen.com/us/>).

Zur qualitativen Überprüfung der extrahierten DNA wurde von allen DNA-Proben die Konzentration mithilfe des Eppendorf BioPhotometers® (Eppendorf AG) bestimmt. Die Lichtdurchlässigkeit eines Stoffes, auch Extinktion, gibt hierbei Rückschluss über die jeweilige Stoffkonzentration, z. B. derer von DNA. Das Absorptionsmaximum für reine DNA beträgt 260 nm, während jenes für Proteine, hier als Zeichen potenzieller Verunreinigung der extrahierten DNA, bei 280 nm liegt. Folglich wird die Extinktion durch den Quotienten E_{260}/E_{280} berechnet. Dieser sollte für sauber extrahierte DNA zwischen 1,6 und 2,0 liegen (Armbrecht 2013). Für die Reinheitsüberprüfung der extrahierten DNA wurde das Eppendorf BioPhotometer® zuerst auf „Dilution“, sprich Verdünnung, von 1 μL + 9 μL eingestellt. Vor Messung der DNA-Proben wurde mit 3 μL Wasser ein Leerlauf durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 3 μL DNA-Probe auf die Nano-Tropf-Küvette pipettiert, die Nano-Tropf-Küvette mit dem 10er Deckel verschlossen und die Extinktion gemessen. Nach jeder Probe wurden die Küvettenglaseinbuchtung sowie der Deckel mit Ethanol gereinigt und anschließend die nächste DNA-Probe untersucht. Von den überprüften DNA-Proben wurden je circa 20 μL DNA äquivalent zur Probennummer in die entsprechende Einbuchtung auf einer 384-Well-Platte pipettiert, um die anschließende Genotypisierung zu erleichtern. Die vorbereitete DNA-Platte sowie die restliche DNA in den etikettierten 1,5 mL Elutionsröhrchen wurden vorschriftsgemäß in den Gefrierschränken der klinischen Pharmakologie bei - 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Auf die oben beschriebene Weise wurde die DNA aus den Patientenproben 756 bis 848 eigenständig bzw. im Rahmen der Einarbeitung zusammen mit dem Doktoranden J. Runzheimer extrahiert.

2.4.2 Genotypisierung

Zur Vervielfältigung und Genotypisierung der extrahierten DNA wurde das Prinzip der *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time* PCR) mithilfe des Applied Biosystems™ 7900 HT *Fast Real-Time* PCR Systems (TaqMan®) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und entsprechende TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays (Life Technologies GmbH, Darmstadt) sowie die zugehörige 7900 HT *Fast Real-Time* PCR System Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) genutzt (siehe auch <https://www.thermofisher.com/de/de/home.html>).

Die verwendete *Real-Time* PCR basiert auf dem von Mullis et al. (1986) vorgestellten Prinzip der klassischen PCR zur Vervielfältigung, auch Amplifizierung, von spezifischen DNA-Sequenzen. Pro Zyklus wird die zu amplifizierende DNA-Sequenz verdoppelt. Jeder Zyklus

gliedert sich in drei Phasen. Zuerst wird die Doppelstrang-DNA während der Denaturierung bei 95 °C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. In der folgenden Hybridisierungsphase lagern sich zwei Primer bei 50 - 60 °C komplementär an den jeweiligen DNA-Einzelstrang und flankieren somit die zu vervielfältigende DNA-Sequenz. Im letzten Schritt wird die flankierte DNA-Sequenz bei etwa 70 °C durch eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert (Mullis et al. 1986). Die *Real-Time* PCR ermöglicht darüber hinaus eine kontinuierliche Überwachung der PCR-Zyklen unter Hinzunahme fluorogener Sonden. Wie von Livak et al. (1995) beschrieben, wird die verwendete Oligonukleotidsonde mit einem *reporter*-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem *quencher*-Farbstoff, ein sogenannter Unterdrückungs- bzw. Lösungsfarbstoff, am 3'-Ende versehen. Durch die räumliche Nähe von *reporter* und *quencher* kommt es zur Unterdrückung eines Fluoreszenzsignals im Rahmen des sogenannten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (Livak et al. 1995). Bei Hinzugabe einer hitzestabilen, im Bakterium *Thermus aquaticus* entdeckten Taq- (DNA-) Polymerase (Holland et al. 1991) und bei vorhandener Zielsequenz, wird die Oligonukleotidsonde durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten, die räumliche Entfernung von *reporter* und *quencher* nimmt zu und es entsteht ein Fluoreszenzsignal durch den *reporter*-Farbstoff. Durch die proportional zur Amplifikation zunehmende Fluoreszenzintensität ermöglicht die *Real-Time* PCR somit eine quantitative Überwachung während der Amplifikation.

Jede TaqMan® SNP-Genotypisierungss*assay* setzt sich aus zwei Primern, zwei TaqMan® Sonden mit jeweils einem fluorogenen Farbstoff, FAM und VIC, am 5'- und einem *minor groove binder* (MGB) sowie dem *quencher* am 3'-Ende zusammen. Der MGB erhöht dabei die Schmelztemperatur der Sonde. Durch die Verwendung der zwei fluorogenen Farbstoffe, FAM und VIC, ermöglichen diese Genotypisierungss*assays* nicht nur die Amplifikation während der *Real-Time* PCR, sondern zusätzlich die Detektion und Zuordnung spezifischer Allele, sprich eine allelische Diskriminierung, in genomischer DNA. Nur diejenige Sonde, welche mit der Zielsequenz zwischen den zwei Primern hybridisiert ist, wird von der Taq-Polymerase gespalten und erzeugt ein Fluoreszenzsignal. Die Zunahme des FAM- oder VIC-Fluoreszenzsignals spiegelt damit die sich in der DNA-Sequenz befindenden Allele wider. In der vorliegenden Studie wurden insgesamt vier TaqMan® SNP-Genotypisierungss*assays* verwendet, um je zwei SNPs der Proteine TIM-3 bzw. LAG-3 zu untersuchen; *Assay-ID* C__2082038_1_ für TIM-3 rs1036199, C__2082054_20 für TIM-3 rs10515746 sowie C__9797874_10 für LAG-3 rs870849 und C__8921385_10 für LAG-3 rs951818. Der Hersteller verweist außerdem auf die untersuchte DNA-Sequenz mitsamt der durch VIC bzw. FAM markierten Allele, welche in Tabelle 2 dargestellt sind.

Tabelle 2: TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays zur allelischen Diskriminierung

<i>Assay-ID</i>	DNA-Sequenz [VIC/FAM]
C__2082038_1_	AAAGGCTGCAGTGAAGTCTCTCTGC[A/C]GAGTCGGTGCAGGGGTGCCTTGGC
C__2082054_20	CCTTATCCTCACATTTACAGACCAT[A/C]GCAACTCCCAGCATAAGCCTCACTC
C__9797874_10	GCAGGCCACCTCCTGCTGTTTCTCA[C/T]CCTTGGTGTCCCTTCTCTGCTCCTT
C__8921385_10	CTGGAGTGGTGACCATATCTGTCTT[A/C]TTCAACATCACATCCCCAGCTACCT

Modifiziert nach <https://www.thermofisher.com/de/de/home.html>; abgerufen am 30.03.2020

Zur Genotypisierung der extrahierten DNA-Proben wurden diese zunächst bei 37 °C im Inkubator aufgetaut. Währenddessen wurde der TaqMan® *Genotyping Master Mix*, welcher die erforderliche Taq-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und die vom Hersteller nicht näher bezeichnete optimierende Mischungskomponente beinhaltet, im Vortex-Genie® (VWR International GmbH, Darmstadt) durchmischt. Anschließend wurde die entsprechende TaqMan® SNP-Genotypisierungsassay, sprich Primer und Sonden, nach lichtgeschützter Zentrifugation in der Mikrozentrifuge (VWR Mini Star) sowie doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) nach vorgegebenem Protokoll und abhängig von der Probenzahl hinzugegeben. Tabelle 3 zeigt ein beispielhaftes Mischungsverhältnis für 200 Reaktionen bzw. DNA-Proben.

Tabelle 3: Mischungsverhältnis für Real-Time PCR

Lösungen	Reaktionen [µL]	
	1	200
2 x TaqMan® <i>Genotyping Master Mix</i>	2,5	500
40 x TaqMan® SNP-Genotypisierungsassay	0,13	26
ddH ₂ O	1,4	280
Gesamtvolumen	4,03	806

Die zubereitete Lösung aus *Master Mix*, *Assay* und ddH₂O wurde erneut zentrifugiert und anschließend wurden je 4 µL mit der Multipipette (Eppendorf AG) nach vorgegebenem Pipettierschema in eine 384-Well-Platte (Life Technologies GmbH) pipettiert. Jede 384-Well-Platte besteht aus 24 Spalten (1 bis 24) und 16 Reihen (A bis P), sodass insgesamt 384 Einbuchtungen, engl. *wells*, vorhanden sind. Pipettiert wurden alle 24 Spalten und jede zweite Reihe. Folglich Reihe A 1 – 24, C 1 – 24, usw. Die mittlerweile aufgetauten DNA-Proben wurden in der Multifuge™ X3R Universalzentrifuge (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) zentrifugiert und danach wurden je 1 µL DNA zu den 4 µL Lösung hinzupipettiert. Pro *well* befanden sich schlussendlich 5 µL Lösung. In Spalte 24 wurde 1 µL H₂O, statt 1 µL DNA, für eine spätere Negativkontrolle hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurde die 384-Well-Platte mit der vorgesehenen *Adhesive PCR Plate Seal-Folie* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) luftdicht abgeklebt, in der Universalzentrifuge zentrifugiert und in den

DNA *Engine Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen) eingesetzt. Unter „Einstellungen“ wurden 50 Zyklen mit je 10 min bei 95 °C, 15 s bei 92 °C und 1 min 30 s bei 60 °C eingestellt. Nach etwa zweieinhalb Stunden konnte die 384-Well-Platte herausgeholt und die *Adhesive PCR Plate Seal-Folie* durch die zur folgenden TaqMan® Analyse geeignete *Absolute qPCR Plate Seal-Folie* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ausgewechselt werden. Das 7900 HT *Fast Real-Time* PCR System (TaqMan®) führte nun mithilfe der zugehörigen Software die allelische Diskriminierung für jede DNA-Probe durch. Ein beispielhaftes Ergebnis findet sich in Abbildung 5.

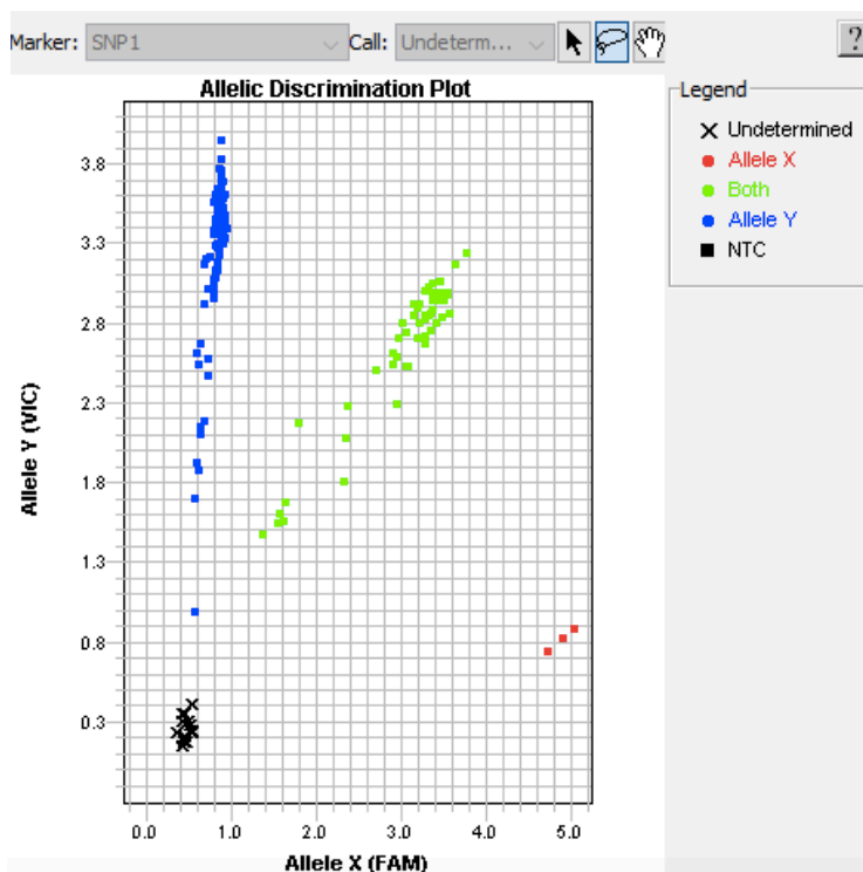


Abbildung 5: Allelische Diskriminierung - TIM-3 rs1036199, Platte 9 & 10

Dargestellt sind die Ergebnisse der Genotypisierung beispielhaft für TIM-3 rs1036199, Platte 9 & 10 (DNA-Proben 560 - 755) nach erfolgter *Real-Time* PCR und allelischer Diskriminierung. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzsignalstärke von FAM, entsprechend für Allel X, auf der y-Achse hingegen jene für VIC, äquivalent für Allel Y, aufgetragen. Die roten Punkte repräsentieren folglich die für Allel X homozygoten DNA-Proben und die blauen Punkte jene für Allel Y homozygoten. Die grünen Punkte emittieren hingegen beide Fluoreszenzsignale und stellen somit die XY- Heterozygoten dar. Die mit H₂O versehenen Proben erzeugen aufgrund des Nichtvorhandenseins von DNA kein messbares Signal und stehen damit äquivalent für die hier als *non-template control* (NTC) bezeichneten Negativkontrollen.

Zur direkten Qualitätsüberprüfung diente sowohl die mit H₂O versehene Spalte 24 mit Negativkontrollen, sowie eine erneute Genotypisierung von 20 % der Proben zur Ergebniskontrolle. Des Weiteren wurde die aus diesem Patientenkollektiv resultierende *minor allele frequency* (MAF) mit der MAF einer europäischen Referenzpopulation des 1000 *Genomes*

Projects verglichen (siehe dazu 3.1.1). Das 1000 *Genomes Project* untersucht häufige genetische Varianten tausender Individuen aus 26 unterschiedlichen Populationen der ganzen Welt. Es kann als qualitatives Kontrollkriterium bei der Untersuchung von SNPs hinzugezogen werden (Auton et al. 2015).

Alle verwertbaren DNA-Proben, insgesamt 707 für LAG-3 sowie 712 für TIM-3, wurden eigenständig mithilfe der vier Genotypisierungsassays auf die SNPs rs870849, rs951818, rs1036199 und rs10515746 untersucht. Die fünf zusätzlichen DNA-Proben bei TIM-3 kommen dadurch zustande, dass zuerst die LAG-3 SNPs genotypisiert wurden und bis zur Genotypisierung der TIM-3 SNPs neue Patienten in die Studie eingeschlossen und deren DNA extrahiert worden ist.

2.5 Statistische Auswertung

Die verwendeten statistischen Verfahren zur Auswertung der in der Datenbank gesammelten Patientendaten sowie der Ergebnisse aus der Genotypisierung wurden in Absprache mit Prof. Dr. rer. nat. T. Beißbarth, Leiter der Bioinformatik der Georg-August-Universität Göttingen, erarbeitet und festgelegt.

Zur statistischen Analyse wurde die STATISTICA 13 Software (Version 13.0, StatSoft) verwendet. Zur Interpretation wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt, sprich ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant gewertet. Für kontinuierliche Variablen, z. B. Alter in Jahren, wurde der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben genutzt und der zugehörige p-Wert mitsamt Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Mittelwerte, bei denen die Standardabweichung den Mittelwert überstieg, wurden als Median zusammen mit dem Interquartilsabstand, entsprechend dem 25%- und 75%-Perzentil, in einer nachfolgenden Klammer angegeben. Bei diskreten, auch kategorialen, Variablen wie z. B. männlich vs. weiblich, wurde hingegen der Pearson-Chi-Quadrat-Test bzw. wenn notwendig der exakte Fisher-Yates-Test verwendet. Der resultierende p-Wert sowie die prozentualen Häufigkeiten konnten dann anhand der gestapelten Tabellen, auch Kontingenztafeln, abgelesen werden. Außerdem wurde für jeden SNP eine 28- und 90-Tage-Überlebenszeitanalyse durchgeführt und in Form einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Der zugehörige p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test berechnet.

Durch die Genotypisierung konnte jedem Patienten ein Genotyp zugeordnet werden. Die aus 2.4.2 resultierende Allelverteilung wurde anschließend mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) verglichen. Das HWE besagt, dass die Allelverteilung in einer idealen Population über Generationen gleich bzw. stabil bleibt. Diese These wurde 1908 von G. H. Hardy und W. Weinberg mitsamt folgender Formel vorgestellt: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Dabei steht p für das dominante Allel A und q für das rezessive Allel a. Somit ergibt die Summe der AA-Homozygoten (p^2), Aa-Heterozygoten ($2pq$) und aa-Homozygoten (q^2) immer eins (Hardy 1908, Weinberg 1908). Die vorausgesetzte ideale Population zeichnet sich

durch das Fehlen jeglicher Einflussfaktoren aus. Einflussfaktoren wären beispielsweise natürliche Selektion, Migration oder auch Mutationen, welche diese ideale zu einer realen Population machen würden (Weir 1996). Um mögliche Fehler der Genotypisierung aufzudecken, können die resultierenden Genotypen mit dem HWE verglichen werden. Dafür wird der Pearson-Chi-Quadrat-Test bzw. exakter Pearsons Test berechnet (Wang und Shete 2012). Die Genotypenverteilung dieses Patientenkollektivs wurde mithilfe des Hardy-Weinberg *Calculator* (Michael H. Court 2005-2008) kontrolliert. Ein p-Wert $\geq 0,05$ entspricht einer Genotypenverteilung im HWE. Um außerdem das *Linkage-Disequilibrium* (LD), also das Kopplungsungleichgewicht der Allelverteilung zu untersuchen, wurde eine LD-Analyse mittels HaploView® Software Version 4.2 (Broad Institute) durchgeführt und mit einer europäischen Referenzpopulation der Phase 3 (503 Individuen) des HapMap-Projektes verglichen.

Abschließend wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, um den Einfluss von unabhängigen Variablen, wie z. B. Alter und Geschlecht auf das Überleben zu untersuchen. Pro Variable wird neben dem 95% Konfidenzintervall und p-Wert, eine *Hazard Ratio* (HR) von $<$ oder $>$ 1 berechnet. Die *Hazard Ratio* beschreibt das Risikoverhältnis zwischen zwei Gruppen, hier das Risiko innerhalb von 28 bzw. 90 Tagen, zu versterben. Eine HR $<$ 1 hat einen reduzierenden, eine HR $>$ 1 einen fördernden Effekt auf die Mortalität. Folglich ist bei einer HR von 1,3 das Mortalitätsrisiko 1,3fach im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Unter gleichzeitiger Beachtung des p-Wertes können so innerhalb des Patientenkollektivs Aussagen bzgl. des Einflusses unabhängiger Variablen auf das Überleben getroffen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Genotypenverteilung

Insgesamt 712 Patienten wurden für TIM-3 rs1036199 und rs10515746 erfolgreich genotypisiert (2.4.2). Die resultierende Allelverteilung betrug hierbei für TIM-3 rs1036199 471:216:25 für die Genotypen AA:AC:CC, während jene für TIM-3 rs10515746 465:220:27 entsprechend den Genotypen CC:AC:AA ergab. Die daraus berechnete *minor allele frequency* (MAF) war mit 0,187 für TIM-3 rs1036199 und 0,195 für TIM-3 rs10515746 fast identisch mit jener der europäischen Referenzpopulation des 1000 *Genomes Projects* mit 0,182 (TIM-3 rs1036199) und 0,194 (TIM-3 rs10515746). Des Weiteren befand sich die beobachtete Allelfrequenz nach Berechnung des Pearson-Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) mit $p = 0,9693$ für TIM-3 rs1036199 und $p = 0,8775$ für TIM-3 rs10515746 entsprechend dem p-Wert von $> 0,05$ im Hardy Weinberg Equilibrium. Bei Durchführung der LD-Analyse ergab sich ein LD-Koeffizient von $D' = 1,0$ (0,98 - 1,0) und ein Korrelationskoeffizient r^2 von 0,925. Daraus folgt eine Korrelation des TIM-3 rs1036199 A-Allels mit dem TIM-3 rs10515746 C-Allel. Die genannten Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4: TIM-3 Allelverteilung (n = 712)

TIM-3	rs1036199	rs10515746
Genotypenverteilung	471 AA 216 AC 25 CC	465 CC 220 AC 27 AA
MAF	0,187	0,195
MAF des 1000 <i>Genomes Projects</i>	0,182	0,194
HWE	0,9693	0,8775
LD-Analyse mit HaploView®	$D' = 1,0$ (0,98 – 1,0) und $r^2 = 0,925$	

MAF steht für *minor allele frequency*, HWE für Hardy-Weinberg-Equilibrium und LD-Analyse für das berechnete *Linkage-Disequilibrium* (LD) mit dem sich daraus ergebenden LD-Koeffizienten (D') und Korrelationskoeffizienten (r^2).

Ausgehend von den u. a. in Kapitel 1.3 genannten Studien zu den SNPs im Zusammenhang mit diversen (Autoimmun-)Erkrankungen sowie den funktionellen Konsequenzen der jeweiligen SNPs auf das Protein, wurden die TIM-3 rs1036199 AC- und CC-Genotypen zusammengelegt (n = 241) und diese mit den AA-Homozygoten (n = 471) verglichen. Parallel dazu wurden bei TIM-3 rs10515746 die AA- und AC-Genotypen (n = 247) den CC-Genotypen (n = 465) gegenübergestellt.

Für LAG-3 konnten 707 Patienten desselben Kollektivs auf die LAG-3 SNPs rs870849 und rs951818 untersucht werden. Dies ergab für LAG-3 rs870849 eine Genotypenverteilung von 256:324:127 entsprechend den Genotypen CC:CT:TT und für LAG-3 rs951818 277 AA-, 338 AC- und 92 CC-Genotypen. Die resultierenden MAFs von 0,424 (LAG-3 rs870849) bzw. 0,361 (LAG-3 rs951818) ähnelten stark jenen vom 1000 *Genomes Project* der europäischen Vergleichspopulation (0,391 für LAG-3 rs870849; 0,383 für LAG-3 rs951818). Darüber hinaus war der Pearson-Chi-Quadrat-Test sowohl für LAG-3 rs870849 mit $p = 0,1677$ als auch für LAG-3 rs951818 mit $p = 0,4822$ nicht signifikant und die Allelverteilungen befanden sich somit im HWE. Bei LAG-3 ergab die LD-Analyse einen LD-Koeffizienten (D') von 0,236 (0,11 – 0,35) und Korrelationskoeffizienten (r^2) von 0,022, sodass die SNPs rs870849 und rs951818 im *Linkage-Disequilibrium* bzw. Kopplungsungleichgewicht standen (Tabelle 5).

Tabelle 5: LAG-3 Allelverteilung (n = 707)

LAG-3	rs870849	rs951818
Genotypenverteilung	256 CC	277 AA
	324 CT	338 AC
	127 TT	92 CC
MAF	0,424	0,361
MAF des 1000 <i>Genomes Projects</i>	0,391	0,383
HWE	0,1677	0,4822
LD-Analyse mit HaploView®	$D' = 0,236$ (0,11-0,35) und $r^2 = 0,022$	

MAF steht für *minor allele frequency*, HWE für Hardy-Weinberg-Equilibrium und LD-Analyse für das berechnete *Linkage-Disequilibrium* (LD) mit dem sich daraus ergebenden LD-Koeffizienten (D') und Korrelationskoeffizienten (r^2).

Zur weiteren statistischen Auswertung wurden basierend auf der aktuellen Literatur (siehe 1.3) die T-Allel-Träger (CT+TT) von LAG-3 rs870849 zusammengefasst (n = 451) und den CC-Homozygoten (n = 256) gegenübergestellt. Bei LAG-3 rs951818 erfolgte die Gruppierung der AC- und CC-Genotypen (n = 430) für den Vergleich mit den AA-Genotypen (n = 277).

3.1.2 Vorliegende Patientencharakteristika bei TIM-3

Zuerst wurden die 712 Patienten bzw. ihre Genotypen für TIM-3 rs1036199 und rs10515746 hinsichtlich Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI) und Krankheitsschwere am Einschlusstag, sprich zu Sepsisbeginn, untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den C-Allel-Trägern und AA-Homozygoten von TIM-3 rs1036199 (Tabelle 6) bzw. zwischen den A-Allel-Trägern und CC-Homozygoten von TIM-3 rs10515746 (Tabelle 7). Allerdings ergab die statistische Analyse bei beiden SNPs ein durchschnittliches Patientenalter von 63 Jahren, mehr männliche als weibliche Patienten (65 % männlich) und einen durchschnittlichen BMI von 28 kg/m². Sowohl der durchschnittliche SOFA *Score* von 10, der APACHE II *Score* von 22, als auch der als Median angegebene Procalcitonin-Wert von 1,3 ng/dL am Einschlusstag, wiesen bei beiden SNPs auf die Notwendigkeit einer organunterstützenden Therapie hin. Dies spiegelt sich auch im Bedarf an Vasopressoren bei rund 70 %, an einer mechanischen Beatmung bei 86 % und in der Notwendigkeit einer Dialysetherapie bei 10 % der Patienten wider. Bzgl. des Procalcitonins zeigt sich ferner, dass seine Bestimmung nur bei 347 der 712 Patienten am Einschlusstag erfolgte. Tendenziell zeigte sich ein höherer Bedarf an einer Dialysetherapie bei den C-Allel-Trägern von TIM-3 rs1036199 (12 % vs. 8 %, Tabelle 6) sowie bei den A-Allel-Trägern von TIM-3 rs10515746 (12 % vs. 9 %, Tabelle 7).

Tabelle 6: Patientencharakteristika für TIM-3 rs1036199

Charakteristika	Alle (n = 712)	AC+CC (n = 241)	AA (n = 471)	p-Wert
Allgemein				
Alter [Jahre]	63 ± 15	63 ± 15	63 ± 15	0,9015
Männliches Geschlecht [%]	65	68	64	0,3231
BMI [kg/m ²]	28 ± 7	28 ± 8	28 ± 6	0,7304
Krankheitsschwere zu Sepsisbeginn (Tag 1)				
SOFA <i>Score</i>	10 ± 4	10 ± 4	10 ± 4	0,9595
APACHE II <i>Score</i>	22 ± 7	21 ± 7	22 ± 7	0,1826
Procalcitonin [ng/dL]	1,3 (0,5 - 4,8) [n = 347]	1,3 (0,5 - 8,7) [n = 115]	1,3 (0,5 - 4,3) [n = 232]	0,5192
Bedarf an Vasopressoren [%]	70	71	70	0,6323
Mechanische Beatmung [%]	86	85	87	0,3360
Dialyse-Therapie [%]	10	12	8	0,0935

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

Tabelle 7: Patientencharakteristika für TIM-3 rs10515746

Charakteristika	Alle (n = 712)	AA + AC (n = 247)	CC (n = 465)	p-Wert
Allgemein				
Alter [Jahre]	63 ± 15	63 ± 15	63 ± 15	0,9536
Männliches Geschlecht [%]	65	68	64	0,2451
BMI [kg/m ²]	28 ± 7	28 ± 8	28 ± 6	0,7976
Krankheitsschwere zu Sepsisbeginn (Tag 1)				
SOFA <i>Score</i>	10 ± 4	10 ± 4	10 ± 4	0,9343
APACHE II <i>Score</i>	22 ± 7	21 ± 7	22 ± 7	0,1738
Procalcitonin [ng/dL]	1,3 (0,5 - 4,8) [n = 347]	1,2 (0,5 - 8,7) [n = 116]	1,3 (0,5 - 4,3) [n = 231]	0,7732
Bedarf an Vasopressoren [%]	70	70	69	0,7857
Mechanische Beatmung [%]	86	85	87	0,3181
Dialyse-Therapie [%]	10	12	9	0,2123

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

Anschließend wurden das Patientenkollektiv und die Genotypen in Hinsicht auf Komorbiditäten, Medikamenteneinnahme, Operationsstatus und Infektionsfokus untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Weiterführende Patientencharakteristika für TIM-3 rs1036199

Charakteristika	Alle (n = 712)	AC + CC (n = 241)	AA (n = 471)	p-Wert
Komorbiditäten [%]				
Arterieller Hypertonus	54	54	53	0,7872
COPD	15	13	16	0,2199
Asthma bronchiale	3	2	3	0,2911
Nierenfunktionsstörung	10	12	9	0,2626
Diabetes mellitus Typ I (IDDM)	10	10	10	0,8687
Diabetes mellitus Typ II (NIDDM)	9	8	9	0,7818
Chronische Lebererkrankung	6	6	6	0,9669
Rheumatoide Arthritis	1	1	1	0,8263
Myokardinfarkt in Anamnese	5	5	6	0,9443
Schlaganfall in Anamnese	6	5	6	0,3825
Tumor in Anamnese	14	16	13	0,2670
Medikation zu Sepsisbeginn (Tag 1) [%]				
Statine	23	24	23	0,5984
β-Blocker	37	38	36	0,5859
ACE-Hemmer	29	31	28	0,4926
Bronchodilatoren	10	6	13	0,0052
Diuretika	33	34	33	0,7649
Antikoagulanzen (≤ 6 Mon.)	25	28	24	0,1974
Chirurgischer Status [%]				
Elektive Operation	27	24	29	
Notfaloperation	52	54	51	0,3330
Keine Operation	21	22	20	
Infektionsfokus [%]				
Lunge	63	61	64	
Abdomen	19	22	17	
Knochen und Weichteile	3	2	4	
Chirurgische Wunde	2	2	1	0,4211
Urogenital	2	2	3	
Primäre Bakteriämie	6	6	6	
Sonstiges	5	5	5	

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten. Signifikanzen sind fett gedruckt.

Die in Tabelle 8 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass es bezüglich der Komorbiditäten keine signifikanten Unterschiede zwischen den C-Allel-Trägern und AA-Homozygoten von TIM-3 rs1036199 gab. Bei genauerer Betrachtung lässt sich erkennen, dass die arterielle Hypertonie mit 54 % die mit Abstand häufigste Vorerkrankung im Patientenkollektiv darstellte. Danach folgte mit 15 % die COPD, ein Tumorleiden in der Krankengeschichte (14 %), sowie eine Nierenfunktionsstörung (10 %) oder Diabetes mellitus. Letzterer wurde darüber hinaus in den insulinabhängigen Typus (*insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM) sprich Diabetes mellitus Typ I, oder den insulinunabhängigen Typus (*non-insulin-dependent diabetes mellitus*, NIDDM) entsprechend Diabetes mellitus Typ II, unterteilt. Im Patientenkollektiv hatten 10 % eine Diabetes mellitus Typ I- und 9 % eine Diabetes mellitus Typ II-Erkrankung. Mit $\leq 6\%$ gehörten eine chronische Lebererkrankung (6 %), ein vorangegangener Schlaganfall (6 %) sowie ein Myokardinfarkt (5 %), ein Asthma bronchiale (3 %) und eine rheumatoide Arthritis (1 %) zu den selteneren Komorbiditäten. Die Auswertung der zu Sepsisbeginn bereits genommenen Medikamente ergab in absteigender Reihenfolge β -Blocker (37 %), Diuretika (33 %), ACE-Hemmer (29 %), eine Antikoagulation innerhalb der letzten sechs Monate (25 %) und Statine (23 %) sowie Bronchodilatoren (10 %). Die Notwendigkeit des Gebrauches von Bronchodilatoren wies einen signifikanten Unterschied dahingehend auf, dass 13 % der AA-Homozygoten und nur 6 % der C-Allel-Träger ($p = 0,0052$) Bronchodilatoren am Einschlussstag erhielten. Des Weiteren wurde rund die Hälfte der septischen Patienten jüngst notfallmäßig operiert, während circa ein Drittel der Gesamtheit eine elektive Operation und die übrigen Patienten keinerlei Operation erhalten hatten. Zum Schluss wurde der Infektionsfokus näher beleuchtet. Bei 63 % fand sich die Lunge als Infektionsfokus, bei 19 % das Abdomen und die übrigen 18 % verteilten sich auf Knochen und Weichteile, chirurgische Wunde, urogenitalen Ursprungs, primäre Bakteriämie und sonstige Infektionsfokuse.

Die Untersuchungsergebnisse für TIM-3 rs10515746 sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Ergebnisse bzw. Aussagen zum Gesamtkollektiv waren nahezu identisch zu jenen von TIM-3 rs1036199 in Tabelle 8. Die arterielle Hypertonie blieb die am häufigsten auftretende Vorerkrankung im Patientenkollektiv, über die Hälfte der Patienten benötigte eine Notfalloperation und als Infektionsfokus trat die Lunge mit über 60 % deutlich hervor. Äquivalent zu TIM-3 rs1036199 ergaben sich in Bezug auf Komorbiditäten, chirurgischen Status und Infektionsfokus auch bei TIM-3 rs10515746 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Medikation zu Sepsisbeginn, dass die CC-Homozygoten signifikant mehr Bedarf an Bronchodilatoren im Vergleich zu den A-Allel-Trägern hatten (12 % vs. 6 %; $p = 0,0155$, Tabelle 9).

Tabelle 9: Weiterführende Patientencharakteristika für TIM-3 rs10515746

Charakteristika	Alle (n = 712)	AA + AC (n = 247)	CC (n = 465)	p-Wert
Komorbiditäten [%]				
Arterieller Hypertonus	54	53	54	0,6908
COPD	15	13	16	0,3269
Asthma bronchiale	3	2	3	0,5325
Nierenfunktionsstörung	10	12	9	0,3401
Diabetes mellitus Typ I (IDDM)	10	10	10	0,9953
Diabetes mellitus Typ II (NIDDM)	9	8	9	0,6736
Chronische Lebererkrankung	6	6	6	0,7929
Rheumatoide Arthritis	1	1	1	0,8667
Myokardinfarkt in Anamnese	5	5	6	0,8546
Schlaganfall in Anamnese	6	5	6	0,5211
Tumor in Anamnese	14	17	12	0,1095
Medikation zu Sepsisbeginn (Tag 1) [%]				
Statine	23	24	23	0,6532
β-Blocker	37	38	36	0,7305
ACE-Hemmer	29	32	28	0,2832
Bronchodilatoren	10	6	12	0,0155
Diuretika	33	34	33	0,8960
Antikoagulanzen (≤ 6 Mon.)	25	28	24	0,3142
Chirurgischer Status [%]				
Elektive Operation	27	25	29	
Notfaloperation	52	54	51	0,5589
Keine Operation	21	21	21	
Infektionsfokus [%]				
Lunge	63	62	64	
Abdomen	19	22	17	
Knochen und Weichteile	3	2	4	
Chirurgische Wunde	2	2	2	0,2890
Urogenital	2	2	3	
Primäre Bakteriämie	6	6	6	
Sonstiges	5	5	5	

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten. Signifikanzen sind fett gedruckt.

Zusammengefasst zeigte sich ein doppelt so hoher Bedarf an Bronchodilatoren für die AA-Genotypen von TIM-3 rs1036199 bzw. CC-Genotypen von TIM-3 rs10515746 gegenüber den Vergleichsgruppen. Ferner stellte sich für das untersuchte Patientenkollektiv bei beiden SNPs die Lunge als führender Infektionsfokus dar, während bei den Komorbiditäten die arterielle Hypertonie (54 %) klar dominierte.

3.1.3 Vorliegende Patientencharakteristika bei LAG-3

Parallel zu den statistischen Untersuchungen der TIM-3 Genotypen in Kapitel 3.1.2 wurden die 707 genotypisierten Patienten von LAG-3 rs870849 und rs951818 in Hinblick auf allgemeine Patientencharakteristika analysiert (Tabelle 10 und Tabelle 11). Dabei zeigten sich in puncto Alter, Geschlecht, BMI und Krankheitsschwere zu Sepsisbeginn keine signifikanten Unterschiede zwischen den T-Allel-Trägern und CC-Homozygoten bei LAG-3 rs870849 bzw. zwischen den C-Allel-Trägern verglichen mit den AA-Homozygoten bei LAG-3 rs951818. Beim Gesamtkollektiv von 707 Patienten konnte äquivalent zu TIM-3 ein durchschnittliches Patientenalter von 63 Jahren und ein mit 65 % zum größten Teil männliches Patientenkollektiv beobachtet werden. Mit einem BMI von 28 kg/m² waren die Patienten im Durchschnitt übergewichtig.

Tabelle 10: Patientencharakteristika für LAG-3 rs870849

Charakteristika	Alle (n = 707)	CT + TT (n = 451)	CC (n = 256)	p-Wert
Allgemein				
Alter [Jahre]	63 ± 15	63 ± 15	63 ± 15	0,9011
Männliches Geschlecht [%]	65	63	69	0,1360
BMI [kg/m ²]	28 ± 7	28 ± 6	28 ± 8	0,3024
Krankheitsschwere zu Sepsisbeginn (Tag 1)				
SOFA <i>Score</i>	10 ± 4	10 ± 4	10 ± 4	0,7428
APACHE II <i>Score</i>	22 ± 7	22 ± 7	21 ± 7	0,1686
Procalcitonin [ng/dL]	1,3 (0,5 - 4,8) [n = 343]	1,3 (0,5 - 4,8) [n = 227]	1,3 (0,5 - 4,7) [n = 116]	0,8997
Bedarf an Vasopressoren [%]	70	70	70	0,8815
Mechanische Beatmung [%]	86	88	83	0,0598
Dialyse-Therapie [%]	10	11	9	0,3806

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

Bei Untersuchung der Krankheitsschwere von LAG-3 rs870849 (Tabelle 10) resultierte im Patientenkollektiv ein durchschnittlicher SOFA *Score* von 10, ein APACHE II *Score* von 22 und ein Medianwert des Procalcitonins von 1,3 ng/dL, wobei letzterer nur bei 343 Patienten

gemessen wurde. Außerdem benötigten 70 % der Patienten den Einsatz von Vasopressoren, 86 % mussten mechanisch beatmet werden und 10 % erhielten eine Dialyse-Therapie. In Bezug auf die mechanische Beatmung wurden die T-Allel-Träger mit 88% im direkten Vergleich öfter beatmungspflichtig als die CC-Homozygoten mit 83 % ($p = 0,0598$).

Tabelle 11: Patientencharakteristika für LAG-3 rs951818

Charakteristika	Alle (n = 707)	AC + CC (n = 430)	AA (n = 277)	p-Wert
Allgemein				
Alter [Jahre]	63 ± 15	64 ± 15	63 ± 15	0,1979
Männliches Geschlecht [%]	65	64	66	0,5844
BMI [kg/m ²]	28 ± 7	28 ± 7	28 ± 6	0,8869
Krankheitsschwere zu Sepsisbeginn (Tag 1)				
SOFA <i>Score</i>	10 ± 4	10 ± 4	10 ± 4	0,4833
APACHE II <i>Score</i>	22 ± 7	22 ± 7	22 ± 7	0,5983
Procalcitonin [ng/dL]	1,3 (0,5 - 4,8) [n = 343]	1,4 (0,5 - 4,8) [n = 218]	1,2 (0,4 - 5,1) [n = 125]	0,6158
Bedarf an Vasopressoren [%]	70	72	67	0,1512
Mechanische Beatmung [%]	86	85	89	0,1370
Dialyse-Therapie [%]	10	9	11	0,5067

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

In Tabelle 11 wurden die Ergebnisse zur Untersuchung von Alter, Geschlechterverteilung, BMI und Krankheitsschwere zu Sepsisbeginn für LAG-3 rs951818 aufgelistet. Wie schon bei LAG-3 rs870849 ergaben sich auch für LAG-3 rs951818 zum physiologischen Normalzustand erhöhte Werte des SOFA *Scores* (10), APACHE II *Scores* (22) und Procalcitonins (Median 1,3 ng/dL, n = 343). 70 % der Patienten mussten mit Vasopressoren versorgt, 86 % beatmet und 10 % dialysiert werden.

Im Anschluss wurden die Genotypen von LAG-3 rs870849 (Tabelle 12) sowie rs951818 (Tabelle 13) in Bezug auf Komorbiditäten, Vormedikation, chirurgischen Status und Infektionsfokus untersucht. Weder die T-Allel-Träger von LAG-3 rs870849 noch die C-Allel-Träger von LAG-3 rs951818 zeigten bei einer der analysierten Kategorien signifikante Unterschiede zu den CC- (LAG-3 rs870849) bzw. AA-Homozygoten (LAG-3 rs951818).

Tabelle 12: Weiterführende Patientencharakteristika für LAG-3 rs870849

Charakteristika	Alle (n = 707)	CT + TT (n = 451)	CC (n = 256)	p-Wert
Komorbiditäten [%]				
Arterieller Hypertonus	54	54	54	0,9494
COPD	15	17	13	0,1409
Asthma bronchiale	3	2	4	0,2175
Nierenfunktionsstörung	10	10	11	0,8100
Diabetes mellitus Typ I (IDDM)	10	11	9	0,5316
Diabetes mellitus Typ II (NIDDM)	9	8	9	0,5941
Chronische Lebererkrankung	6	5	7	0,3553
Rheumatoide Arthritis	1	1	2	0,4144
Myokardinfarkt in Anamnese	6	4	7	0,0945
Schlaganfall in Anamnese	6	6	5	0,6153
Tumor in Anamnese	14	14	14	0,9565
Medikation zu Sepsisbeginn (Tag 1) [%]				
Statine	23	23	25	0,5933
β-Blocker	37	35	41	0,0713
ACE-Hemmer	29	27	32	0,1664
Bronchodilatoren	10	11	9	0,4750
Diuretika	34	33	35	0,4880
Antikoagulanzen (≤ 6 Mon.)	26	26	25	0,6036
Chirurgischer Status [%]				
Elektive Operation	27	27	28	
Notfaloperation	52	51	52	0,8178
Keine Operation	21	22	20	
Infektionsfokus [%]				
Lunge	63	63	63	
Abdomen	19	20	17	
Knochen und Weichteile	4	4	4	
Chirurgische Wunde	2	1	2	0,6982
Urogenital	2	2	2	
Primäre Bakteriämie	6	5	8	
Sonstiges	5	5	5	

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten.

Tabelle 13: Weiterführende Patientencharakteristika für LAG-3 rs951818

Charakteristika	Alle (n = 707)	AC + CC (n = 430)	AA (n = 277)	p-Wert
Komorbiditäten [%]				
Arterieller Hypertonus	54	54	53	0,6560
COPD	15	16	14	0,5299
Asthma bronchiale	3	3	2	0,6068
Nierenfunktionsstörung	10	10	10	0,7580
Diabetes mellitus Typ I (IDDM)	10	11	10	0,6852
Diabetes mellitus Typ II (NIDDM)	9	8	10	0,3949
Chronische Lebererkrankung	6	6	5	0,6352
Rheumatoide Arthritis	1	2	0	0,1200
Myokardinfarkt in Anamnese	6	6	5	0,9247
Schlaganfall in Anamnese	6	6	5	0,3729
Tumor in Anamnese	14	12	16	0,1508
Medikation zu Sepsisbeginn (Tag 1) [%]				
Statine	23	23	24	0,7214
β-Blocker	37	40	33	0,0631
ACE-Hemmer	29	30	29	0,7219
Bronchodilatoren	10	11	9	0,3149
Diuretika	34	35	31	0,2632
Antikoagulanzen (≤ 6 Mon.)	26	27	24	0,4479
Chirurgischer Status [%]				
Elektive Operation	27	27	28	
Notfaloperation	52	50	54	0,2535
Keine Operation	21	23	18	
Infektionsfokus [%]				
Lunge	63	62	64	
Abdomen	19	19	18	
Knochen und Weichteile	4	4	3	
Chirurgische Wunde	2	2	2	0,8131
Urogenital	2	2	3	
Primäre Bakteriämie	6	7	5	
Sonstiges	5	4	6	

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten.

Betrachtet man das gesamte Patientenkollektiv zeigen sich Parallelen zu den TIM-3 SNPs. Die mit Abstand führende Komorbidität war mit 54 % der arterielle Hypertonus. Die restlichen Vorerkrankungen traten mit Häufigkeiten zwischen 1 bis 15 % vergleichsweise seltener auf. Hier fanden sich die COPD (15 %), ein vorangegangenes Tumorleiden (14 %), eine Nierenfunktionsstörung (10 %) sowie Diabetes mellitus Typ 1 (10 %) und Typ 2 (9 %). Mit sechs oder weniger Prozent kamen Vorerkrankungen wie eine chronische Lebererkrankung (6 %), ein Myokardinfarkt (6 %) bzw. Schlaganfall in der Anamnese (6 %), genauso wie Asthma bronchiale (3 %) und rheumatoide Arthritis (1 %) im Patientenkollektiv noch seltener vor (Tabelle 12 und Tabelle 13). Ordnet man die zu Sepsisbeginn eingenommenen Medikamente nach ihrer Häufigkeit, zeigte sich, dass 37 % der Patienten β -Blocker, 34 % Diuretika, 29 % ACE-Hemmer, 26 % Antikoagulanzen, 23 % Statine und 10 % Bronchodilatoren einnahmen. In puncto chirurgischer Status fiel v. a. die Notfalloperation bei über der Hälfte des Patientenkollektivs auf. In Bezug auf den Infektionsfokus stach die Lunge als pulmonaler Fokus bei über 60 % der septischen Patienten deutlich hervor. Mit großem Abstand konnte danach das Abdomen (19 %) bzw. auch die primäre Bakteriämie (6 %), sonstige Infektionsfokuse (5 %), Knochen und Weichteile (4 %), chirurgische Wunden (2 %) und urogenitale Ursprungsorte (2 %) als Infektionsfokuse ausgemacht werden (Tabelle 12 und Tabelle 13).

Obwohl sich bei LAG-3 rs870849 (Tabelle 12) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen finden konnten, war die fast doppelt so hohe Fallzahl an vorangegangenen Myokardinfarkten bei den CC-Homozygoten mit 7 % im Vergleich zu den T-Allel-Trägern mit 4 % ($p = 0,0945$) sowie ebenfalls bei den CC-Homozygoten ein erhöhter Gebrauch von β -Blockern (41 % vs. 35 %, $p = 0,0713$) auffällig. Ebenso zeigte sich bei LAG-3 rs951818 (Tabelle 13) ein vermehrter Gebrauch von β -Blockern bei den C-Allel-Träger verglichen mit den AA-Homozygoten (40 % vs. 33 %; $p = 0,0631$).

3.2 Überlebenszeitanalysen

Um einen möglichen Einfluss der genetischen Varianten von TIM-3 und LAG-3 auf das Überleben zu untersuchen, wurden Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen für alle vier SNPs durchgeführt. Angefangen mit TIM-3 zeigten die Genotypen sowohl bei TIM-3 rs1036199 (Abbildung 6 und Abbildung 7) als auch bei TIM-3 rs10515746 (Abbildung 8 und Abbildung 9) signifikante Unterschiede in Bezug auf die 28-Tage-Überlebenszeit. Nach 28 Tagen war die Überlebensrate der TIM-3 rs1036199 AA-Homozygoten mit 82 % signifikant höher als jene der C-Allel-Träger mit 73 % ($p = 0,0099$). Anders ausgedrückt waren 18 % der AA-Homozygoten und 27 % der C-Allel-Träger nach 28 Tagen verstorben. Ebenso waren 28 Tage nach Sepsisbeginn signifikant weniger CC-Homozygote (Mortalitätsrate von 18 %) im Vergleich zu den A-Allel-Trägern von TIM-3 rs10515746 (Mortalitätsrate von 26 %) verstorben ($p = 0,0202$). Bei der Überlebenskontrolle nach 90 Tagen zeigten die Genotypen weder bei TIM-3 rs1036199 noch bei TIM-3 rs10515746 signifikante Unterschiede (Abbildung 7 und Abbildung 9).

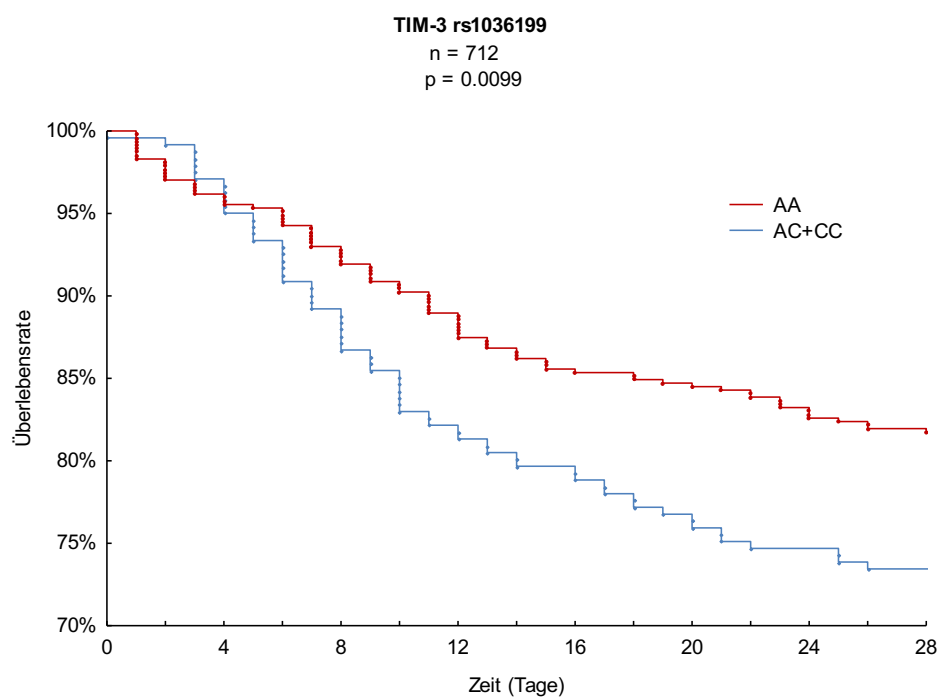


Abbildung 6: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs1036199

Dargestellt ist eine Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für 28 Tage. Auf der x-Achse wird die Zeit in Tagen von Sepsisbeginn bis 28 Tage später dargestellt. Die y-Achse gibt den Anteil überlebender Patienten in Prozent wieder. Bei 100 % leben demnach alle Patienten, während bei einer Überlebensrate von 70 %, 30 % bereits verstorben sind. Von den für TIM-3 rs1036199 untersuchten 712 Patienten lebten nach 28 Tagen 82 % der AA-Homozygoten, während es bei den C-Allel-Trägern 73 % waren. Im Log-Rank-Test resultierte ein signifikanter p-Wert von 0,0099.

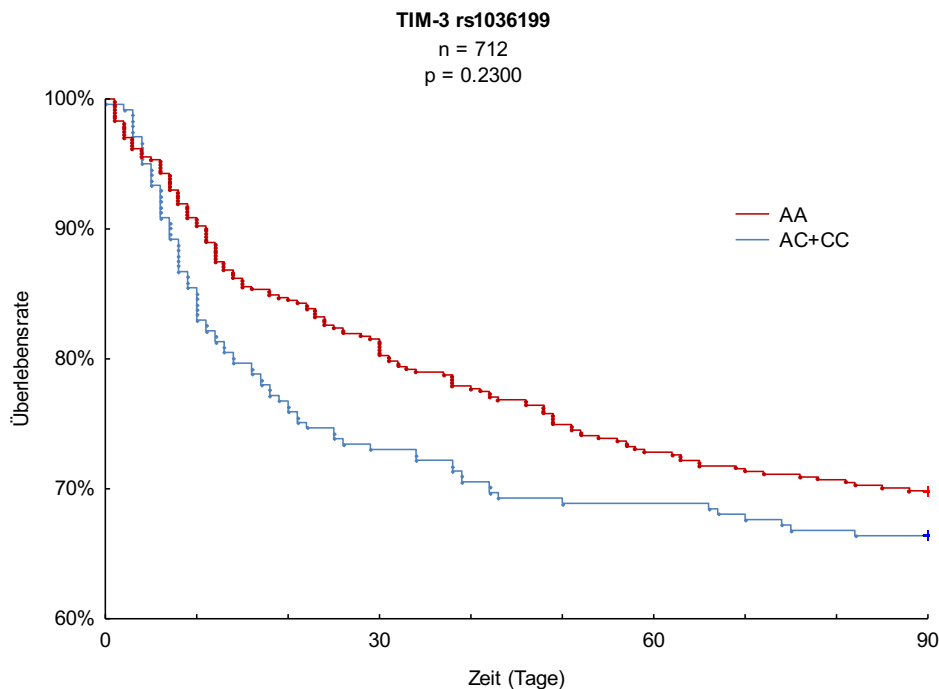


Abbildung 7: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs1036199

Die hier dargestellte 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs1036199 zeigt die Zeit in Tagen (x-Achse) gegen die Überlebensrate in Prozent (y-Achse). Nach 90 Tagen lebten 66% der C-Allel-Träger, wohingegen es bei den AA-Genotypen 70% waren. Der p-Wert zeigte mit einem Wert von 0,2300 keine Signifikanz.

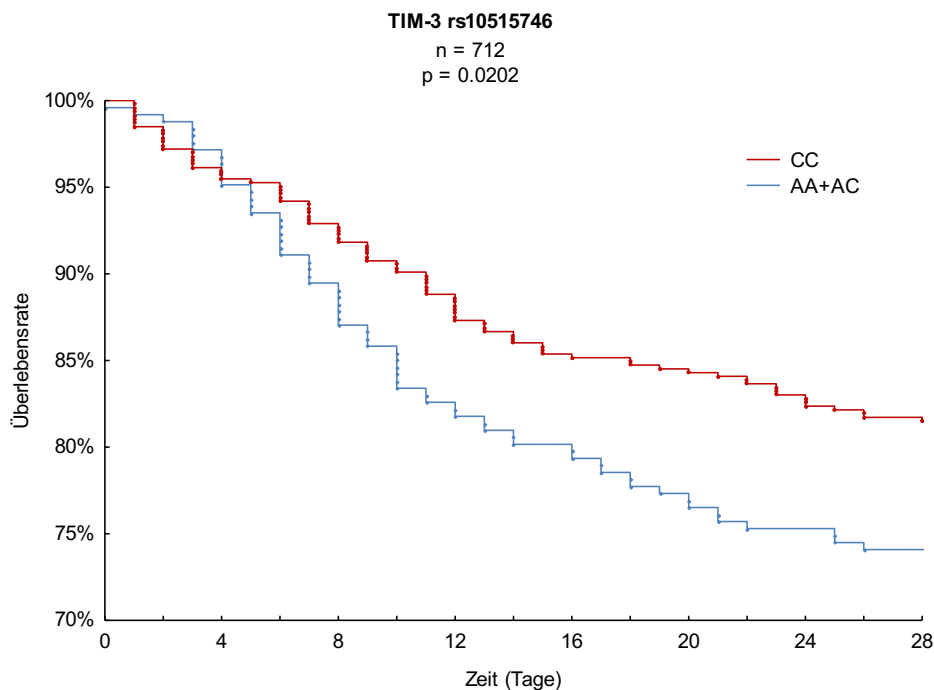


Abbildung 8: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs10515746

Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für 28 Tage nach Sepsisbeginn stellt auf der x-Achse die Zeit in Tagen und auf der y-Achse das Überleben der 712 Patienten (n) in Prozent dar. Bei TIM-3 rs10515746 lebten nach 28 Tagen 74 % der A-Allel-Träger und 82 % der CC-Homozygoten. Im Log-Rank-Test zeigte sich mit $p = 0,0202$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen in Bezug auf das 28-Tage-Überleben.

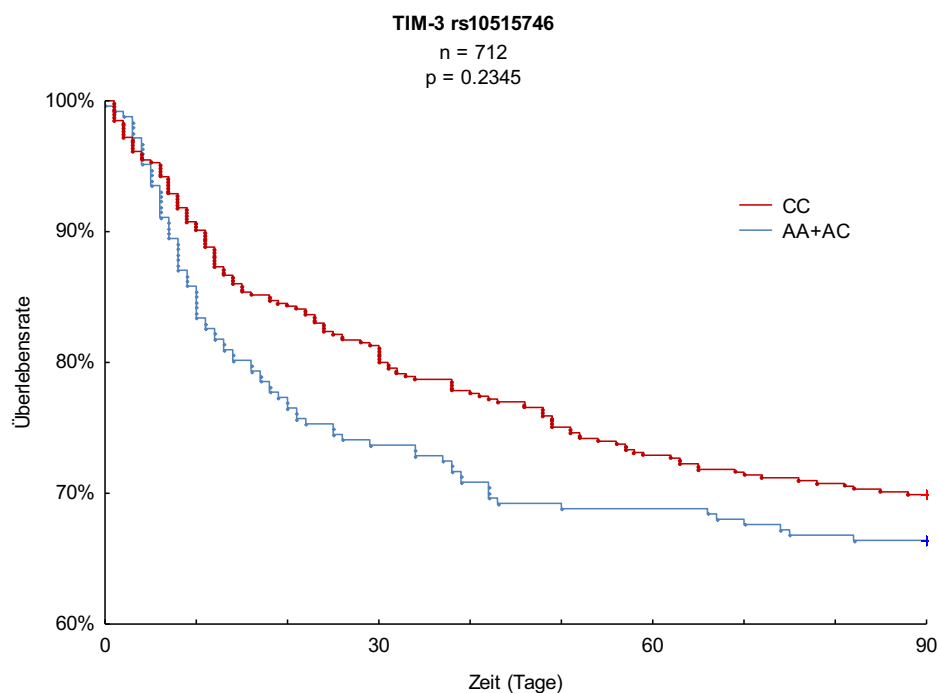


Abbildung 9: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs10515746

90 Tage nach Sepsisbeginn konnte sich in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für TIM-3 rs10515746 kein signifikanter Unterschied zwischen den AA- und AC-Genotypen verglichen mit den CC-Genotypen zeigen ($p = 0,2345$). Dargestellt wird die Zeit in Tagen (x-Achse) gegen die Überlebensrate in Prozent (y-Achse). Nach 90 Tagen lebten 66 % der A-Allel-Träger und 70 % der CC-Homozygoten.

Analog zu den Überlebenszeitanalysen von TIM-3 wurden auch für LAG-3 rs870849 und LAG-3 rs951818 Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen jeweils für 28 und 90 Tage nach Sepsisbeginn durchgeführt. Bei einer Gesamtzahl von 707 untersuchten Patienten zeigten sich bei LAG-3 rs870849 weder nach 28 (Abbildung 10) noch nach 90 Tagen (Abbildung 11) signifikante Unterschiede zwischen den T-Allel-Trägern und den homozygoten CC-Genotypen. Anders verhielt es sich hingegen bei LAG-3 rs951818. 28 Tage nach Sepsisbeginn ergab sich bei den AA-Homozygoten ein Überleben von 83 %, wohingegen es bei den C-Allel-Trägern 76 % waren. Im Umkehrschluss heißt dies, dass 17 % der AA-Homozygoten im Vergleich zu 24 % der C-Allel-Träger verstorben waren. Somit überlebten in der Zeitspanne von 28 Tagen signifikant mehr Patienten des AA-Genotyps. Im Log-Rank-Test resultierte ein signifikanter p-Wert von 0,0476 (Abbildung 12). 90 Tage nach Sepsisbeginn konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen von LAG-3 rs951818 gezeigt werden ($p = 0,1069$, Abbildung 13).

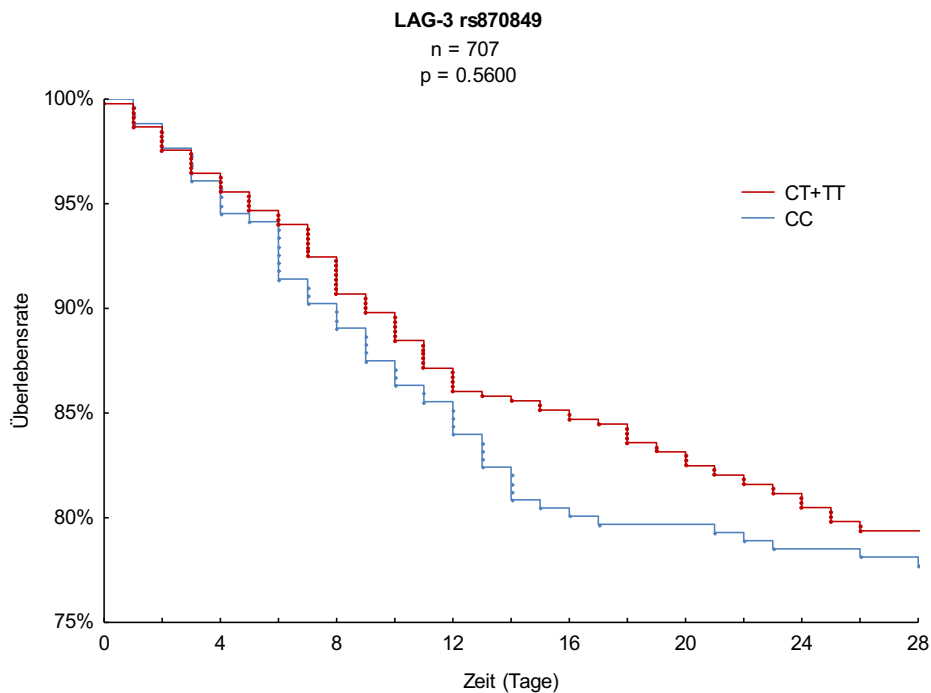


Abbildung 10: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs870849

Die abgebildete Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse veranschaulicht die Zeit bis zu 28 Tage nach Sepsisbeginn auf der x-Achse und die Überlebensrate in Prozent auf der y-Achse. Bei LAG-3 rs870849 lebten nach 28 Tagen 79 % der T-Allel-Träger, während es bei den homozygoten CC-Genotypen 78 % waren. Im Log-Rank-Test zeigte sich 28 Tage nach Sepsisbeginn kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p = 0,5600$).

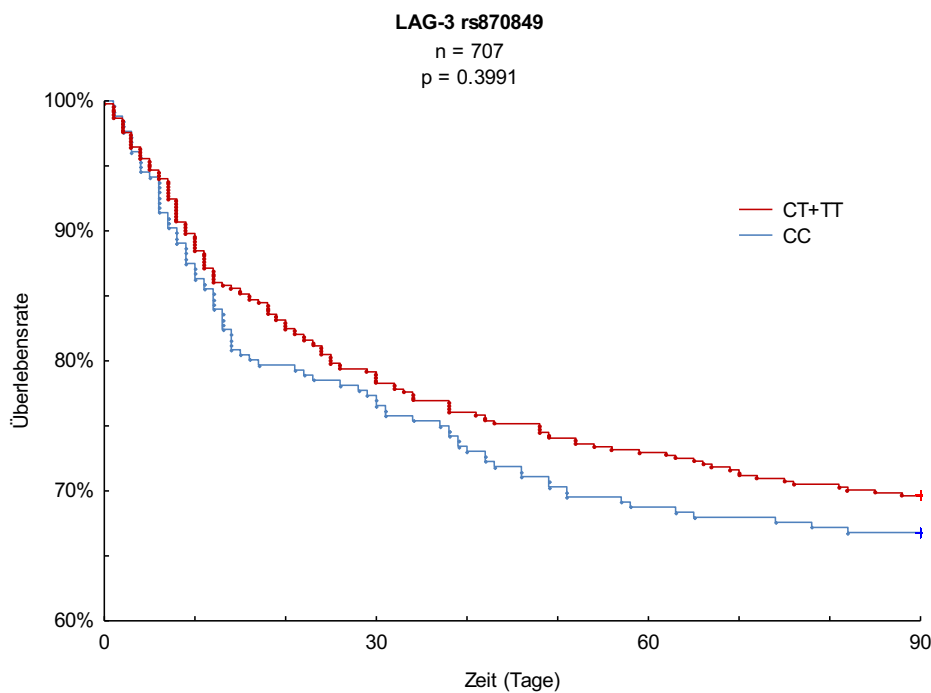


Abbildung 11: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs870849

Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse bildet die Zeit in Tagen gegen die Überlebensrate in Prozent ab. Für LAG-3 rs870849 konnte 90 Tage nach Sepsisbeginn kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Überleben der CC-Homozygoten (67 %) und der T-Allel-Trägern (70 %) gefunden werden ($p = 0,3991$).

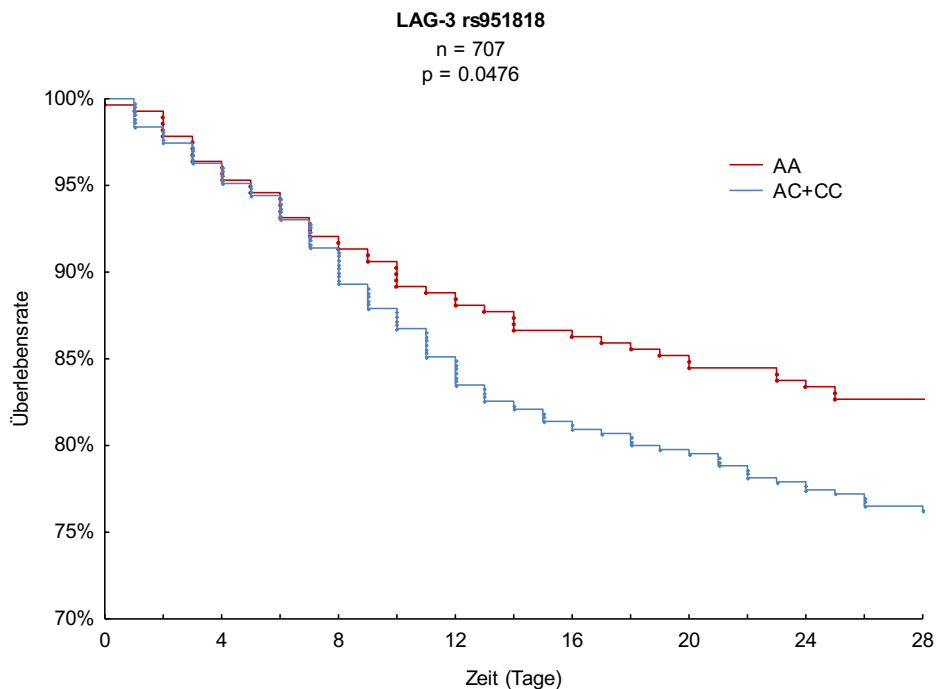


Abbildung 12: 28-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs951818

Bei LAG-3 rs951818 ergab die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse 28 Tage nach Sepsisbeginn (x-Achse) einen signifikanten Unterschied zwischen den AA-Homozygoten und C-Allel-Trägern in Bezug auf die Überlebensrate (y-Achse). Während 83 % der AA-Homozygoten nach 28 Tagen lebten, zeigte sich bei den C-Allel-Trägern im Vergleich dazu eine signifikant niedrigere Überlebensrate von 76 % ($p = 0,0476$).

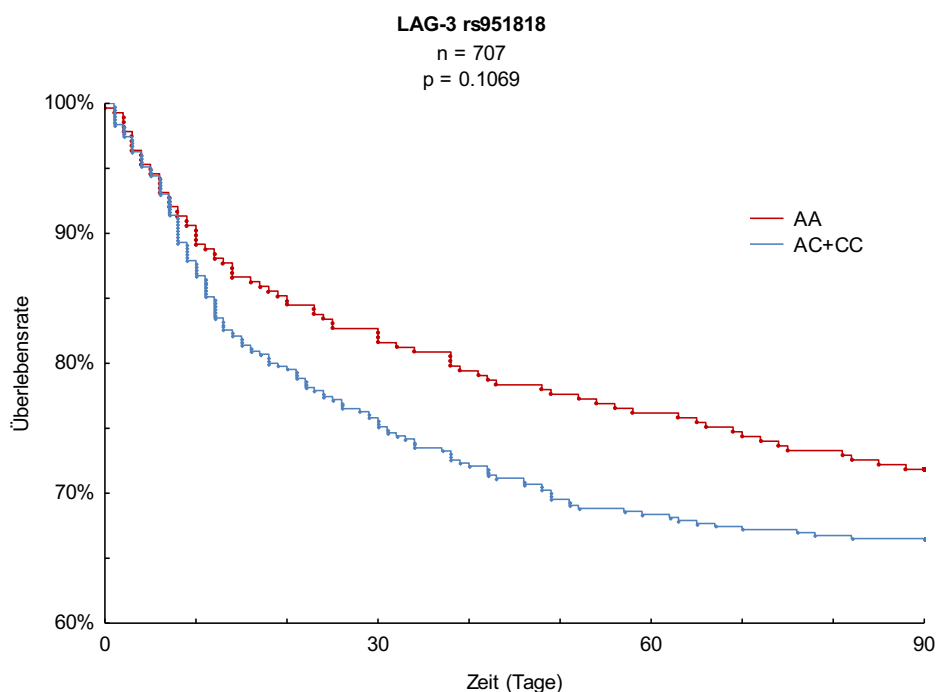


Abbildung 13: 90-Tage-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs951818

In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für LAG-3 rs951818 ist die Zeit in Tagen (x-Achse) gegen die Überlebensrate in Prozent (y-Achse) aufgezeigt. 90 Tage nach Sepsisbeginn resultierte kein signifikanter Unterschied zwischen den AA-Homozygoten im Vergleich zu den C-Allel-Trägern ($p = 0,1069$).

3.3 Krankheitsschwere und -verlauf

Jeder SNP wurde im Folgenden in Bezug auf Krankheitsschwere und -verlauf analysiert. Für die Auswertung dienten die täglich erhobenen CRFs bzw. die darin gesammelten klinischen Daten, sodass die dargestellten Ergebnisse allesamt durchschnittliche Werte des Beobachtungszeitraumes von maximal 28 Tagen darstellen (2.2.1). Der Übersicht halber wurden die Kategorien Schwere der Sepsis und Entzündungsparameter sowie die jeweiligen Untergruppen entsprechend der im SOFA *Score* (Tabelle 1) enthaltenen Organsysteme Respirationstrakt, Gerinnung, Leber, Herz-Kreislaufsystem, ZNS und Niere mit den dazugehörigen Parametern gebildet.

Begonnen mit TIM-3 konnten sich weder bei TIM-3 rs1036199 noch bei TIM-3 rs10515746 signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen bzgl. der Schwere der Sepsis bzw. der Entzündung finden (Tabelle 14 und Tabelle 15). Im Gesamtkollektiv zeigte sich bei beiden TIM-3 SNPs ein SOFA-Gesamt *Score* von 7,2. Rund die Hälfte der 712 untersuchten Patienten befand sich zusätzlich im septischen Schock, wobei sich hinsichtlich der Dauer ein Median von einem Tag bei einem Interquartilsabstand von keinem bis zwei Tagen im septischen Schock ergab. Bei Betrachtung der Entzündungsparameter waren diese bei beiden TIM-3 SNPs stark erhöht. Es zeigte sich eine Leukozytenzahl von rund 13.200/ μL , ein CRP um 150 mg/L sowie ein als Median angegebener Procalcitonin-Wert von 1,0 ng/dL. Letzterer wurde bei 634 der 712 Patienten bestimmt. 88 % der Patienten entwickelte Fieber. Bei der Leukozytenzahl fiel auf, dass die C-Allel-Träger von TIM-3 rs1036199 und die A-Allel-Träger von TIM-3 rs10515746 mit 13.700/ μL eine tendenziell erhöhte Leukozytenzahl im Vergleich zu den AA- bzw. CC-Homozygoten mit 13.000/ μL aufwiesen.

Tabelle 14: Schwere der Sepsis und Entzündung für TIM-3 rs1036199

Charakteristika	Alle (n = 712)	AC + CC (n = 241)	AA (n = 471)	p-Wert
Schwere der Sepsis				
SOFA-Gesamt	7,2 \pm 3,7	7,3 \pm 3,8	7,2 \pm 3,6	0,9064
Patienten im septischen Schock [%]	50	53	49	0,3291
Tage im septischen Schock	1 (0 - 2)	1 (0 - 2)	0 (0 - 2)	0,5047
Entzündungsparameter				
Leukozyten [1000/ μL]	13,2 \pm 5,0	13,7 \pm 5,2	13,0 \pm 4,9	0,0619
C-reaktives Protein [mg/L]	150,6 \pm 85,9	148,0 \pm 81,3	152,1 \pm 88,5	0,7630
Procalcitonin [ng/dL]	1,0 (0,3 - 3,4) [n = 634]	1,1 (0,3 - 4,6) [n = 210]	0,8 (0,3 - 2,8) [n = 424]	0,1922
Fieber [%]	88	88	87	0,7188

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

Tabelle 15: Schwere der Sepsis und Entzündung für TIM-3 rs10515746

Charakteristika	Alle (n = 712)	AA + AC (n = 247)	CC (n = 465)	p-Wert
Schwere der Sepsis				
SOFA-Gesamt	7,2 ± 3,7	7,2 ± 3,7	7,3 ± 3,7	0,7846
Patienten im septischen Schock [%]	50	53	49	0,3326
Tage im septischen Schock	1 (0 - 2)	1 (0 - 2)	0 (0 - 2)	0,5087
Entzündungsparameter				
Leukozyten [1000/μL]	13,2 ± 5,0	13,7 ± 5,2	13,0 ± 4,9	0,0550
C-reaktives Protein [mg/L]	150,6 ± 85,9	149,5 ± 82,1	151,2 ± 88,2	0,9759
Procalcitonin [ng/dL]	1,0 (0,3 - 3,4) [n = 634]	1,1 (0,3 - 4,5) [n = 215]	0,8 (0,3 - 2,8) [n = 419]	0,2529
Fieber [%]	88	88	88	0,7687

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

Nachfolgend wurden die Parameter der einzelnen Organsysteme untersucht (Tabelle 16 und Tabelle 17). In Bezug auf den Respirationstrakt zeigte sich bei beiden TIM-3 SNPs ein SOFA-Lungen *Score* von zwei. 94 % der Patienten mussten mechanisch beatmet werden, wobei die Beatmungstage mit 68 % gleichzeitig rund ²/₃ der Beobachtungstage ausmachten. Der SOFA *Score* für die Gerinnung ergab einen Median von null. Die durchschnittliche Thrombozytenzahl betrug aufgerundet 300.000/μL. Aufgrund der den Mittelwert übersteigenden Standardabweichungen, wurden alle Parameter des Organsystems Leber in Medianen und Interquartilsabständen angegeben. Im Gesamtkollektiv resultierte demnach ein medianer SOFA-Leber *Score* von 0, ein Bilirubin von 0,6 mg/dL, eine AST von 57 IU/L sowie eine ALT von 46 IU/L. Gemessen wurde die AST bei 467 und die ALT bei 688 Patienten. Der SOFA *Score* des Herz-Kreislaufsystems ergab im Durchschnitt 1,6. 80 % der Patienten benötigten Vasopressoren während ihres intensivmedizinischen Aufenthaltes, wobei die Behandlungstage mit Vasopressoren rund 40 % der Beobachtungstage ausmachten. Für den neurologischen Status stand der Parameter SOFA-ZNS, hier mit einem gemessenen Durchschnitt von 2,1 und der GCS mit knapp 10. Schließlich wurden noch die Parameter der Nierenfunktion genauer analysiert. Hier zeigte sich ein medianer SOFA *Score* von 0,2, ein Kreatinin von 1,2 mg/dL, eine Urinmenge von knapp drei Litern pro Tag sowie 1,5 mL/kg/Tag. 22 % des Patientenkollektivs erhielten während ihrer Behandlung eine Dialysetherapie.

Tabelle 16: Organspezifische Erkrankungsschwere für TIM-3 rs1036199

Charakteristika	Alle (n = 712)	AC + CC (n = 241)	AA (n = 471)	p-Wert
Parameter des Respirationstraktes				
SOFA-Lunge	2,0 ± 0,8	1,9 ± 0,8	2,0 ± 0,8	0,2940
Patienten mit mechanischer Beatmung [%]	94	95	93	0,5335
Beatmungs-/Beobachtungstage [%]	68 ± 32	66 ± 32	69 ± 32	0,3608
Parameter der Gerinnung				
SOFA-Gerinnung	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,5)	0,7182
Thrombozyten [1000/μL]	292 ± 151	292 ± 150	292 ± 151	0,6663
Parameter der Leber				
SOFA-Leber	0 (0 - 0,4)	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,4)	0,2591
Bilirubin [mg/dL]	0,6 (0,4 - 1,1)	0,7 (0,4 - 1,2)	0,6 (0,4 - 1,1)	0,7229
AST (GOT) [IU/L]	57 (34 - 111) [n = 467]	53 (33 - 112) [n = 157]	57 (35 - 110) [n = 310]	0,8124
ALT (GPT) [IU/L]	46 (23 - 92) [n = 688]	44 (22 - 93) [n = 233]	47 (23 - 91) [n = 455]	0,4376
Parameter des Herz-/Kreislaufsystems				
SOFA-Herz-/Kreislaufsystem	1,6 ± 1,0	1,6 ± 1,1	1,6 ± 1,0	0,9143
Patienten mit Vasopressoren [%]	81	81	81	0,8456
Vasopressoren-/Beobachtungstage [%]	37 ± 32	37 ± 33	36 ± 31	0,8398
Parameter des ZNS				
SOFA-ZNS	2,1 ± 1,1	2,0 ± 1,1	2,1 ± 1,1	0,1701
Glasgow Coma Scale (GCS)	9,8 ± 3,2	10,0 ± 3,3	9,7 ± 3,2	0,2311
Parameter der Niere				
SOFA-Niere	0,2 (0 - 1,2)	0,2 (0 - 1,4)	0,2 (0 - 1,0)	0,2780
Kreatinin [mg/dL]	1,2 ± 0,9	1,3 ± 0,9	1,2 ± 0,9	0,2977
Urinmenge [mL/Tag]	2906 ± 1345	2915 ± 1420	2901 ± 1307	0,7551
Urinmenge [mL/kg/Tag]	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	0,9251
Patienten mit Dialyse [%]	22	23	22	0,7266
Dialysetage/Beobachtungstage [%]	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,7023

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

Tabelle 17: Organspezifische Erkrankungsschwere für TIM-3 rs10515746

Charakteristika	Alle (n = 712)	AA + AC (n = 247)	CC (n = 465)	p-Wert
Parameter des Respirationstraktes				
SOFA-Lunge	2,0 ± 0,8	1,9 ± 0,8	2,0 ± 0,8	0,3020
Patienten mit mechanischer Beatmung [%]	94	94	94	0,6794
Beatmungs-/Beobachtungstage [%]	68 ± 32	66 ± 32	69 ± 31	0,3060
Parameter der Gerinnung				
SOFA-Gerinnung	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,5)	0,5976
Thrombozyten [1000/μL]	292 ± 151	296 ± 155	290 ± 149	0,4882
Parameter der Leber				
SOFA-Leber	0 (0 - 0,4)	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,3)	0,2398
Bilirubin [mg/dL]	0,6 (0,4 - 1,1)	0,7 (0,4 - 1,2)	0,6 (0,4 - 1,1)	0,5271
AST (GOT) [IU/L]	57 (34 - 111) [n = 467]	53 (33 - 116) [n = 162]	57 (36 - 108) [n = 305]	0,8599
ALT (GPT) [IU/L]	46 (23 - 92) [n = 688]	45 (22 - 95) [n = 239]	46 (23 - 91) [n = 449]	0,4824
Parameter des Herz-/Kreislaufsystems				
SOFA-Herz-/Kreislaufsystem	1,6 ± 1,0	1,6 ± 1,1	1,6 ± 1,0	0,6821
Patienten mit Vasopressoren [%]	81	80	81	0,7154
Vasopressoren-/Beobachtungstage [%]	37 ± 32	36 ± 33	37 ± 31	0,6091
Parameter des ZNS				
SOFA-ZNS	2,1 ± 1,1	2,0 ± 1,1	2,1 ± 1,1	0,1644
Glasgow Coma Scale (GCS)	9,8 ± 3,2	10,0 ± 3,3	9,7 ± 3,2	0,1946
Parameter der Niere				
SOFA-Niere	0,2 (0 - 1,2)	0,2 (0 - 1,3)	0,2 (0 - 1,0)	0,4042
Kreatinin [mg/dL]	1,2 ± 0,9	1,3 ± 0,9	1,2 ± 1,0	0,3852
Urinmenge [mL/Tag]	2906 ± 1345	2923 ± 1404	2896 ± 1314	0,6595
Urinmenge [mL/kg/Tag]	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,0000
Patienten mit Dialyse [%]	22	23	22	0,9257
Dialysetage/Beobachtungstage [%]	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,8644

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt.

In Tabelle 18 und Tabelle 19 werden die Ergebnisse zur Beurteilung der Schwere der Sepsis bzw. der Entzündung für die LAG-3 SNPs dargestellt. Parallel zu den TIM-3 SNPs ergab sich bei LAG-3 rs870849 und rs951818 ein SOFA-Gesamt *Score* von 7,2, das Auftreten eines septischen Schocks bei 50 % der Patienten und ein CRP von knapp 150 mg/L.

Tabelle 18: Schwere der Sepsis und Entzündung für LAG-3 rs870849

Charakteristika	Alle (n = 707)	CT + TT (n = 451)	CC (n = 256)	p-Wert
Schwere der Sepsis				
SOFA-Gesamt	7,2 ± 3,7	7,2 ± 3,7	7,3 ± 3,6	0,6530
Patienten im septischen Schock [%]	50	51	49	0,6906
Tage im septischen Schock	1 (0 - 2)	1 (0 - 2)	0 (0 - 2)	0,4725
Entzündungsparameter				
Leukozyten [1000/ μ L]	13,3 ± 5,1	13,2 ± 4,8	13,3 ± 5,4	0,9507
C-reaktives Protein [mg/L]	149,9 ± 85,9	154,6 ± 86,4	140,9 ± 84,7	0,1552
Procalcitonin [ng/dL]	1,0 (0,3 - 3,4) [n = 628]	0,9 (0,3 - 3,3) [n = 403]	1,0 (0,3 - 3,5) [n = 225]	0,4000
Fieber [%]	88	88	88	0,9140

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt. Signifikanzen sind fett gedruckt.

Tabelle 19: Schwere der Sepsis und Entzündung für LAG-3 rs951818

Charakteristika	Alle (n = 707)	AC + CC (n = 430)	AA (n = 277)	p-Wert
Schwere der Sepsis				
SOFA-Gesamt	7,2 ± 3,7	7,3 ± 3,6	7,1 ± 3,8	0,2891
Patienten im septischen Schock [%]	50	53	46	0,0876
Tage im septischen Schock	1 (0 - 2)	1 (0 - 2)	0 (0 - 2)	0,1912
Entzündungsparameter				
Leukozyten [1000/ μ L]	13,3 ± 5,1	13,5 ± 5,2	12,9 ± 4,9	0,0991
C-reaktives Protein [mg/L]	149,9 ± 85,9	154,0 ± 91,6	143,4 ± 76,0	0,5112
Procalcitonin [ng/dL]	1,0 (0,3 - 3,4) [n = 628]	1,0 (0,4 - 3,3) [n = 380]	0,8 (0,3 - 3,5) [n = 248]	0,2249
Fieber [%]	88	86	90	0,1584

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt. Signifikanzen sind fett gedruckt.

Anders als bei den Ergebnissen des Gesamtkollektivs, zeigten sich bei LAG-3 im Gegensatz zu TIM-3 signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen der untersuchten SNPs (Tabelle 20 und Tabelle 21).

Für LAG-3 rs870849 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen in Bezug auf den Anteil an Patienten mit mechanischer Beatmung und den Kreatininwert (Tabelle 20). Während 96 % der T-Allel-Träger im Beobachtungszeitraum beatmet werden mussten, waren es bei den CC-Homozygoten mit 91 % signifikant weniger ($p = 0,0090$). Der durchschnittliche Kreatininwert betrug bei den T-Allel-Trägern $1,2 \pm 0,9$ mg/dL, demgegenüber derjenige der CC-Homozygoten durchschnittlich $1,3 \pm 1,0$ mg/dL ($p = 0,0475$).

Der Anteil mechanisch beatmeter Patienten wies auch bei LAG-3 rs951818 einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen auf (Tabelle 21). Während bei den C-Allel-Trägern 92 % mechanisch beatmet wurden, waren es bei den homozygoten AA-Genotypen 96 % ($p = 0,0466$).

Tabelle 20: Organspezifische Erkrankungsschwere für LAG-3 rs870849

Charakteristika	Alle (n = 707)	CT + TT (n = 451)	CC (n = 256)	p-Wert
Parameter des Respirationstraktes				
SOFA-Lunge	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,8	1,9 ± 0,8	0,2419
Patienten mit mechanischer Beatmung [%]	94	96	91	0,0090
Beatmungs-/Beobachtungstage [%]	68 ± 32	69 ± 30	65 ± 34	0,3645
Parameter der Gerinnung				
SOFA-Gerinnung	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,5)	0,1 (0 - 0,4)	0,5481
Thrombozyten [1000/μL]	291 ± 150	295 ± 157	284 ± 137	0,6537
Parameter der Leber				
SOFA-Leber	0 (0 - 0,4)	0 (0 - 0,4)	0 (0 - 0,4)	0,3186
Bilirubin [mg/dL]	0,6 (0,4 - 1,1)	0,6 (0,4 - 1,1)	0,6 (0,4 - 1,1)	0,8121
AST (GOT) [IU/L]	57 (35 - 112) [n = 462]	61 (35 - 124) [n = 300]	54 (33 - 89) [n = 162]	0,0698
ALT (GPT) [IU/L]	46 (23 - 92) [n = 683]	48 (23 - 105) [n = 436]	41 (22 - 83) [n = 247]	0,0512
Parameter des Herz-/Kreislaufsystems				
SOFA-Herz-/Kreislaufsystem	1,6 ± 1,0	1,6 ± 1,0	1,7 ± 1,1	0,1416
Patienten mit Vasopressoren [%]	81	80	82	0,4395
Vasopressoren-/Beobachtungstage [%]	36 ± 31	35 ± 31	39 ± 33	0,1115
Parameter des ZNS				
SOFA-ZNS	2,1 ± 1,1	2,1 ± 1,1	2,0 ± 1,1	0,6616
Glasgow Coma Scale (GCS)	9,8 ± 3,2	9,8 ± 3,2	9,8 ± 3,3	0,7665
Parameter der Niere				
SOFA-Niere	0,2 (0 - 1,2)	0,2 (0 - 1,1)	0,3 (0 - 1,3)	0,1632
Kreatinin [mg/dL]	1,2 ± 0,9	1,2 ± 0,9	1,3 ± 1,0	0,0475
Urinmenge [mL/Tag]	2893 ± 1339	2887 ± 1346	2903 ± 1331	0,9833
Urinmenge [mL/kg/Tag]	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	0,2532
Patienten mit Dialyse [%]	23	24	21	0,4618
Dialysetage/Beobachtungstage [%]	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,6014

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt. Signifikanzen sind fett gedruckt.

Tabelle 21: Organspezifische Erkrankungsschwere für LAG-3 rs951818

Charakteristika	Alle (n = 707)	AC + CC (n = 430)	AA (n = 277)	p-Wert
Parameter des Respirationstraktes				
SOFA-Lunge	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,8	0,8359
Patienten mit mechanischer Beatmung [%]	94	92	96	0,0466
Beatmungs-/Beobachtungstage [%]	68 ± 32	68 ± 33	68 ± 30	0,3147
Parameter der Gerinnung				
SOFA-Gerinnung	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,5)	0,6427
Thrombozyten [1000/μL]	291 ± 150	287 ± 144	297 ± 160	0,4988
Parameter der Leber				
SOFA-Leber	0 (0 - 0,4)	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 0,4)	0,9448
Bilirubin [mg/dL]	0,6 (0,4 - 1,1)	0,6 (0,4 - 1,1)	0,6 (0,4 - 1,1)	0,8242
AST (GOT) [IU/L]	57 (35 - 112) [n = 462]	58 (35 - 119) [n = 288]	54 (32 - 106) [n = 174]	0,4947
ALT (GPT) [IU/L]	46 (23 - 92) [n = 683]	46 (22 - 92) [n = 417]	46 (25 - 91) [n = 266]	0,6155
Parameter des Herz-/Kreislaufsystems				
SOFA-Herz-/Kreislaufsystem	1,6 ± 1,0	1,7 ± 1,0	1,5 ± 1,0	0,0740
Patienten mit Vasopressoren [%]	81	83	78	0,1120
Vasopressoren-/Beobachtungstage [%]	36 ± 31	38 ± 31	34 ± 32	0,1117
Parameter des ZNS				
SOFA-ZNS	2,1 ± 1,1	2,1 ± 1,1	2,0 ± 1,1	0,3201
Glasgow Coma Scale (GCS)	9,8 ± 3,2	9,7 ± 3,3	9,9 ± 3,2	0,3606
Parameter der Niere				
SOFA-Niere	0,2 (0 - 1,2)	0,2 (0 - 1,1)	0,2 (0 - 1,3)	0,3936
Kreatinin [mg/dL]	1,2 ± 0,9	1,3 ± 1,0	1,2 ± 0,9	0,2136
Urinmenge [mL/Tag]	2893 ± 1339	2872 ± 1333	2924 ± 1350	0,4172
Urinmenge [mL/kg/Tag]	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	0,6968
Patienten mit Dialyse [%]	23	23	21	0,4972
Dialysetage/Beobachtungstage [%]	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,6725

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit in Klammern gesetztem Interquartilsabstand angegeben. Diskrete Variablen werden als prozentuale Häufigkeit dargestellt. Signifikanzen sind fett gedruckt.

3.4 Mikrobiologische Analyse

Anhand der im CRF festgehaltenen mikrobiologischen Erregernachweise (2.2.1) konnten das Patientenkollektiv sowie die jeweiligen Genotypen der vier SNPs von TIM-3 und LAG-3 auf Keime und Erreger hin untersucht werden. Zunächst wurden die dokumentierten Infektionen den Bakterien, Pilzen oder Viren zugeordnet. Bakterien wurden zudem abhängig von ihrem Gramverhalten in grampositive oder -negative Erreger aufgeteilt. Anschließend beinhaltet jede der genannten Kategorien die typischen nosokomialen Erreger, welche während des Beobachtungszeitraumes erfasst wurden.

Tabelle 22 und Tabelle 23 stellt die Ergebnisse der mikrobiologischen Analyse für TIM-3 rs1036199 bzw. rs10515746 dar.

Tabelle 22: Keime und Erreger für TIM-3 rs1036199

Charakteristika	Alle (n = 712)	AC + CC (n = 241)	AA (n = 471)	p-Wert
Infektionstyp [%]				
Grampositive Bakterien	76	72	79	0,0445
Gramnegative Bakterien	64	61	66	0,2454
Pilze	52	51	53	0,4999
Viren	11	10	12	0,4401
Grampositive Bakterien [%]				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	27	35	0,0295
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	18	24	0,0792
<i>Enterococcus faecalis</i>	18	15	19	0,1920
<i>Enterococcus faecium</i>	15	17	14	0,2892
Gramnegative Bakterien [%]				
<i>Escherichia coli</i>	27	25	28	0,4066
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	12	12	0,9590
<i>Klebsiella pneumonia</i>	10	8	11	0,2436
<i>Proteus mirabilis</i>	9	7	10	0,1376
Pilze [%]				
<i>Candida albicans</i>	30	29	31	0,7596
<i>Candida glabrata</i>	11	10	12	0,4896

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten. Signifikanzen sind fett gedruckt.

Tabelle 23: Keime und Erreger für TIM-3 rs10515746

Charakteristika	Alle (n = 712)	AA + AC (n = 247)	CC (n = 465)	p-Wert
Infektionstyp [%]				
Grampositive Bakterien	76	72	78	0,0829
Gramnegative Bakterien	64	62	66	0,3334
Pilze	52	51	53	0,7055
Viren	11	10	12	0,3495
Grampositive Bakterien [%]				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	27	35	0,0313
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	18	23	0,1072
<i>Enterococcus faecalis</i>	18	16	19	0,2678
<i>Enterococcus faecium</i>	15	17	14	0,2822
Gramnegative Bakterien [%]				
<i>Escherichia coli</i>	27	26	28	0,4470
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	13	12	0,9101
<i>Klebsiella pneumonia</i>	10	9	10	0,6062
<i>Proteus mirabilis</i>	9	6	10	0,1045
Pilze [%]				
<i>Candida albicans</i>	30	30	30	0,9200
<i>Candida glabrata</i>	11	11	11	0,7245

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten. Signifikanzen sind fett gedruckt.

Von den 712 septischen Patienten bei TIM-3 rs1036199 (Tabelle 22) und TIM-3 rs10515746 (Tabelle 23) wiesen rund $\frac{3}{4}$ der Patienten eine Infektion mit grampositiven Bakterien auf (76 %). Mit 64 % machten zusätzlich die durch gramnegative Bakterien hervorgerufenen Infektionen einen Großteil der Infektionen aus. Bei rund der Hälfte der Patienten, genauer bei 52 %, konnte eine Pilzinfektion nachgewiesen werden, wohingegen Viren nur zu 11 % eine Infektion auslösten. Bei der darauffolgenden Untersuchung einzelner grampositiver Erreger zeigte sich, dass die meisten Infektionen von *Staph. epidermidis* hervorgerufen wurden (32 %). An zweiter Stelle kamen Infektionen durch *Staph. aureus* (22 %) und schließlich mit 18 % bzw. 15 % jene durch *Enterococcus faecalis* bzw. *faecium*. Von den gramnegativen Bakterien konnte am häufigsten *Escherichia coli* (*E.coli*) nachgewiesen werden (27 %), gefolgt von *Pseudomonas aeruginosa* (12 %), *Klebsiella pneumonia* (10 %) und *Proteus mirabilis* (9 %). Infektionen durch Pilze wurden bei $\frac{1}{3}$ der Patienten durch *Candida albicans* und bei $\frac{1}{10}$ durch *Candida glabrata* ausgelöst.

Die Genotypen des TIM-3 rs1036199 SNPs (Tabelle 22) wiesen zwei signifikante Unterschiede in Bezug auf Infektionen und Erreger auf. Zum einen kamen Infektionen durch grampositive Bakterien signifikant häufiger bei den homozygoten AA-Genotypen im Vergleich zu den AC- und CC-Genotypen vor (79 % vs. 72 %, $p = 0,0445$). Zum anderen zeigten die AA-Homozygoten gleichzeitig eine signifikant erhöhte Anzahl an Infektionen durch das grampositive Bakterium *Staph. epidermidis* (35 % vs. 27 %, $p = 0,0295$) und tendenziell auch durch *Staph. aureus* (24 % vs. 18 %, $p = 0,0792$).

Bei TIM-3 rs10515746 (Tabelle 23) ergab die mikrobiologische Analyse einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Infektionen durch *Staph. epidermidis* ($p = 0,0313$). Hier zeigten sich signifikant mehr Infektionen bei den CC-Homozygoten (35 %) verglichen mit den A-Allel-Trägern (27 %). Außerdem ließ sich eine Tendenz zu mehr grampositiven Infektionen bei den CC-Homozygoten beobachten (78 % vs. 72 %, $p = 0,0829$).

Nachfolgend werden in Tabelle 24 und Tabelle 25 die Ergebnisse für LAG-3 dargestellt.

Tabelle 24: Keime und Erreger für LAG-3 rs870849

Charakteristika	Alle (n = 707)	CT + TT (n = 451)	CC (n = 256)	p-Wert
Infektionstyp [%]				
Grampositive Bakterien	76	75	77	0,5150
Gramnegative Bakterien	64	64	65	0,7927
Pilze	52	54	50	0,3492
Viren	11	11	11	0,9936
Grampositive Bakterien [%]				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	31	34	0,3859
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	24	19	0,1411
<i>Enterococcus faecalis</i>	18	19	17	0,6333
<i>Enterococcus faecium</i>	15	16	14	0,6016
Gramnegative Bakterien [%]				
<i>Escherichia coli</i>	27	28	26	0,5355
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	13	11	0,4522
<i>Klebsiella pneumonia</i>	10	11	8	0,2934
<i>Proteus mirabilis</i>	9	9	9	0,7442
Pilze [%]				
<i>Candida albicans</i>	30	31	29	0,7169
<i>Candida glabrata</i>	11	13	9	0,1405

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten.

Tabelle 25: Keime und Erreger für LAG-3 rs951818

Charakteristika	Alle (n = 707)	AC + CC (n = 430)	AA (n = 277)	p-Wert
Infektionstyp [%]				
Grampositive Bakterien	76	76	76	0,9131
Gramnegative Bakterien	64	63	66	0,3250
Pilze	52	54	49	0,2192
Viren	11	12	10	0,5687
Grampositive Bakterien [%]				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	31	33	0,6852
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	21	23	0,6191
<i>Enterococcus faecalis</i>	18	19	17	0,6671
<i>Enterococcus faecium</i>	15	17	13	0,1587
Gramnegative Bakterien [%]				
<i>Escherichia coli</i>	27	26	29	0,3171
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	12	12	0,8700
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	9	11	0,3032
<i>Proteus mirabilis</i>	9	7	11	0,0876
Pilze [%]				
<i>Candida albicans</i>	30	31	29	0,5621
<i>Candida glabrata</i>	11	11	11	0,9334

Die Tabelle zeigt die resultierenden Werte als prozentuale Häufigkeiten.

Analog zu TIM-3 zeigte das untersuchte Gesamtkollektiv von 707 Patienten bei LAG-3 rs870849 und rs951818 v. a. Infektionen durch grampositive Bakterien (76 %), gramnegative Bakterien (64%) und Pilze (52 %). In absteigender Reihenfolge fanden sich bei den grampositiven Bakterien Infektionen durch *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. Der prozentual größte Anteil an gramnegativen Infektionen wurde durch *E.coli* ausgelöst (27 %). Bei den Pilzinfektionen stand *Candida albicans* mit 30 % an erster Stelle. Anders als bei TIM-3 rs1036199 und rs10515746 zeigten sich weder bei LAG-3 rs870849 noch bei LAG-3 rs951818 signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen und der Häufigkeit an Infektionen durch bestimmte Erreger bzw. Keime (Tabelle 24 und Tabelle 25).

3.5 Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Der Einfluss möglicher Störfaktoren auf die 28- bzw. 90-Tage-Mortalität wurde mithilfe der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für jeden SNP untersucht. Die *Hazard Ratio* (HR) drückt dabei das Risikoverhältnis innerhalb von 28 bzw. 90 Tagen zu versterben aus (vgl. Textziffer 2.5). Als mögliche Störfaktoren wurden die Variablen Alter, Geschlecht, BMI, SOFA und APACHE II *Score* zu Sepsisbeginn, sowie die Anwendung der Sepsis-3 Definition zum Zeitpunkt des Patienteneinschlusses in die Untersuchung aufgenommen. Ferner wurden signifikante Parameter aus den vorangegangenen Analysen der Patientencharakteristika in der Cox-Regressionsanalyse berücksichtigt, ebenso wie der Genotyp des jeweiligen SNPs, welcher in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse nach 28 bzw. 90 Tagen ein höheres Überleben gezeigt hatte.

Tabelle 26 und Tabelle 27 stellen die Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs1036199 hinsichtlich der 28- und 90-Tage-Mortalität dar.

Tabelle 26: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs1036199 – 28-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0432	1,0296-1,0161	<0,0001
Männliches Geschlecht	1,1093	0,7850-1,5676	0,5564
BMI	0,9568	0,9269-0,9877	0,0064
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0845	1,0284-1,1435	0,0027
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0363	1,0029-1,0707	0,0327
Bronchodilatoren zu Sepsisbeginn	0,9759	0,5750-1,6562	0,9279
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,2359	0,8349-1,8297	0,2899
TIM-3 rs1036199 AA-Genotyp	0,6703	0,4818-0,9324	0,0175

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 28-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs1036199 konnten in Bezug auf die 28-Tage-Mortalität mehrere Signifikanzen beobachtet werden (Tabelle 26). Signifikante p-Werte ergaben sich für die Variablen Alter ($p < 0,0001$), BMI ($p = 0,0064$), SOFA sowie APACHE II *Score* zu Sepsisbeginn ($p = 0,0027$ bzw. $p = 0,0327$) und schließlich für den TIM-3 rs1036199 AA-Genotyp ($p = 0,0175$). Während das Alter, der SOFA ebenso wie der APACHE II *Score* eine HR > 1 und damit einen signifikant positiven Effekt auf die 28-Tage-Mortalität aufwiesen, zeigte sich beim BMI und TIM-3 rs1036199 AA-Genotyp eine HR < 1. Ein erhöhter BMI und das Vorliegen des AA-Genotyps konnten somit als protektive Faktoren in Bezug auf das Versterben innerhalb der ersten 28 Tage identifiziert werden. Bei den Variablen männliches Geschlecht, Gebrauch von Bronchodilatoren zu Sepsisbeginn

sowie Anwendung der aktuellen Sepsis-3 Definition konnte hingegen kein signifikanter Einfluss auf die 28-Tage-Mortalität nachgewiesen werden.

Tabelle 27: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs1036199 – 90-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0302	1,0191-1,0415	<0,0001
Männliches Geschlecht	1,0011	0,7586-1,3211	0,9939
BMI	0,9818	0,9600-1,0040	0,1068
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0750	1,0292-1,1228	0,0011
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0324	1,0050-1,0606	0,0203
Bronchodilatoren zu Sepsisbeginn	1,0065	0,6626-1,5290	0,9756
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,0800	0,7724-1,5102	0,6528
TIM-3 rs1036199 AA-Genotyp	0,8199	0,6215-1,0816	0,1600

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 90-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse der 90-Tage-Mortalität für TIM-3 rs1036199 (Tabelle 27) blieben das Alter sowie der SOFA und APACHE II *Score* zu Sepsisbeginn signifikant ($p < 0,0001$; $p = 0,0011$; $p = 0,0203$) und weiterhin durch eine HR > 1 mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.

Bei der Untersuchung von TIM-3 rs10515746 zeigten sich ähnliche Resultate in der Cox-Regressionsanalyse für die 28-Tage-Mortalität (Tabelle 28) wie bei TIM-3 rs1036199. Mit einem p-Wert von < 0,05 hatten die Variablen Alter, BMI, SOFA und APACHE II *Score* am Einschlusstag ebenso wie der TIM-3 rs10515746 CC-Genotyp, welcher sich schon in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse mit einem höheren Überleben dargestellt hatte (Abbildung 8), signifikanten Einfluss auf die 28-Tage-Mortalität. Durch eine HR > 1 konnte sich für das Alter sowie den SOFA und APACHE II *Score* am Einschlusstag ein signifikanter Einfluss hin zu einer erhöhten Sterblichkeit zeigen. Im Gegensatz dazu ergab sich für den BMI und CC-Genotypen eine HR < 1 und somit eine von diesen zwei Variablen abhängige, erniedrigte Sterblichkeit innerhalb eines Zeitraumes von 28 Tagen nach Sepsisbeginn. Darüber hinaus blieben Alter, SOFA und APACHE II *Score* auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für die 90-Tage-Mortalität mit p-Werten von <0,0001 (Alter), $p = 0,0010$ (SOFA *Score*) bzw. $p = 0,0208$ (APACHE II *Score*) signifikant und durch die HR > 1 mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Tabelle 29).

Tabelle 28: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs10515746 – 28-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0298	1,0163-1,0434	<0,0001
Männliches Geschlecht	1,1076	0,7835-1,5657	0,5629
BMI	0,9564	0,9264-0,9874	0,0062
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0863	1,0304-1,1453	0,0021
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0354	1,0022-1,0696	0,0364
Bronchodilatoren zu Sepsisbeginn	0,9689	0,5712-1,6435	0,9066
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,2401	0,8378-1,8354	0,2821
TIM-3 rs10515746 CC-Genotyp	0,6958	0,5005-0,9674	0,0310

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 28-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

Tabelle 29: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für TIM-3 rs10515746 – 90-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0303	1,0192-1,0415	<0,0001
Männliches Geschlecht	0,9994	0,7572-1,3190	0,9964
BMI	0,9818	0,9600-1,0040	0,1076
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0754	1,0297-1,1232	0,0010
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0322	1,0048-1,0603	0,0208
Bronchodilatoren zu Sepsisbeginn	1,0064	0,627-1,5283	0,9763
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,0809	0,7730-1,5113	0,6494
TIM-3 rs10515746 CC-Genotyp	0,8165	0,6200-1,0752	0,1488

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 90-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

Tabelle 30 und Tabelle 31 bilden die Resultate der multivariaten Cox-Regressionsanalysen für LAG-3 rs870849 in Bezug auf die 28- bzw. 90-Tage-Mortalität ab. Zu den möglichen Störfaktoren gehörten Alter, Geschlecht, BMI, SOFA sowie APACHE II *Score* zu Sepsisbeginn sowie der Patienteneinschluss nach Sepsis-3 Definition. Untersucht wurde der LAG-3 rs870849 CT + TT-Genotyp. Angefangen mit der 28-Tage-Mortalität (Tabelle 30) konnte sich ein signifikanter Einfluss von Alter ($p < 0,0001$), BMI ($p = 0,0123$) und SOFA *Score* ($p = 0,0019$) auf die Sterblichkeitsrate zeigen. Sowohl die Variable Alter als auch der SOFA *Score* ergaben in der Analyse eine HR > 1 (HR = 1,0291 für das Alter; HR = 1,0868 für den SOFA *Score*), sodass hier die Mortalität im Gegensatz zum BMI mit einer HR < 1

(HR = 0,9618) erhöht war. Bei den Parametern männliches Geschlecht, APACHE II *Score* zu Sepsisbeginn und Sepsiskriterien nach Sepsis-3-Definition konnte hingegen kein Einfluss gefunden werden. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Einfluss der T-Allel-Träger von LAG-3 rs870849 auf die 28-Tage-Mortalität. Im Vergleich dazu resultierten bei der Cox-Regressionsanalyse für die 90-Tage-Mortalität (Tabelle 31) signifikante p-Werte bei den Variablen Alter ($p < 0,0001$), sowie den SOFA und APACHE II *Scores* zu Sepsisbeginn ($p = 0,0009$; $p = 0,0237$). Alle drei Variablen weisen eine HR > 1 auf und haben damit einen verstärkenden Effekt auf die 90-Tage-Mortalität.

Tabelle 30: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs870849 – 28-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0291	1,0157-1,0427	<0,0001
Männliches Geschlecht	1,1302	0,8007-1,5952	0,4864
BMI	0,9618	0,9330-0,9916	0,0123
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0868	1,0313-1,1453	0,0019
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0311	0,9983-1,0650	0,0630
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,2254	0,8283-1,8130	0,3091
LAG-3 rs870849 CT + TT-Genotyp	0,8534	0,6129-1,1883	0,3480

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 28-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

Tabelle 31: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs870849 – 90-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0299	1,0187-1,0411	<0,0001
Männliches Geschlecht	0,9960	0,7549-1,3141	0,9773
BMI	0,9846	0,9635-1,0061	0,1598
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0758	1,0304-1,1232	0,0009
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0312	1,0041-1,0591	0,0237
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,0656	0,7620-1,4903	0,7103
LAG-3 rs870849 CT + TT-Genotyp	0,8211	0,6254-1,0779	0,1557

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 90-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

Für LAG-3 rs951818 ergab die Cox-Regressionsanalyse Signifikanzen für das Alter ($p < 0,0001$), den BMI ($p = 0,0140$) und schließlich den SOFA *Score* zu Sepsisbeginn ($p = 0,0019$) hinsichtlich der 28-Tage-Mortalität (Tabelle 32). Während Alter und

SOFA *Score* die Mortalität erhöhten ($HR > 1$), stellte sich der BMI als protektive Einflussgröße heraus ($HR = 0,9626$). Trotz signifikant erhöhtem Überleben des AA-Genotyps in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (Abbildung 12), war dieser protektive Effekt in der Cox-Regressionsanalyse nicht reproduzierbar ($p = 0,1091$). In Bezug auf die 90-Tage-Mortalität (Tabelle 33) zeigte sich für das Alter mit $p < 0,0001$ und einer HR von 1,0296, den SOFA *Score* mit $p = 0,0009$ und einer HR von 1,0761 genauso wie für den APACHE II *Score* zu Sepsisbeginn mit $p = 0,0286$ und $HR = 1,0301$ ein signifikanter Einfluss dieser Variablen auf eine erhöhte 90-Tage-Mortalität.

Tabelle 32: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs951818 – 28-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0287	1,0153-1,0422	<0,0001
Männliches Geschlecht	1,1468	0,8123-1,6189	0,4363
BMI	0,9626	0,9338-0,9923	0,0140
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0871	1,0312-1,1461	0,0019
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0303	0,9977-1,0640	0,0692
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,1979	0,8098-1,7721	0,3660
LAG-3 rs951818 AA-Genotyp	0,7546	0,5346-1,0649	0,1091

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 90-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

Tabelle 33: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für LAG-3 rs951818 – 90-Tage-Mortalität

Variable	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	1,0296	1,0185-1,0408	<0,0001
Männliches Geschlecht	1,0113	0,7663-1,3345	0,9369
BMI	0,9850	0,9639-1,0067	0,1734
SOFA <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0761	1,0304-1,1238	0,0009
APACHE II <i>Score</i> zu Sepsisbeginn	1,0301	1,0031-1,0578	0,0286
Sepsiskriterien nach Sepsis-3 Definition	1,0472	0,7490-1,4643	0,7873
LAG-3 rs951818 AA-Genotyp	0,8278	0,6279-1,0914	0,1803

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse untersucht den Einfluss unabhängiger Variablen bzw. möglicher Störfaktoren auf die 90-Tage-Mortalität. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Eine Hazard Ratio < 1 bedeutet einen reduzierenden Effekt der Variable auf die Mortalität, eine Hazard Ratio > 1 einen fördernden Effekt. 95 % KI steht für das 95 % Konfidenzintervall.

Festzuhalten ist, dass sowohl der TIM-3 rs1036199 AA-, als auch der TIM-3 rs10515746 CC-Genotyp einen signifikanten, negativen Effekt auf die 28-Tage-Mortalität zeigen konnten. Mit $p = 0,0175$ und einer HR von 0,6703 (KI = 0,4818-0,9324) demonstrierte der

TIM-3 rs1036199 AA-Genotyp, ebenso wie der TIM-3 rs10515746 CC-Genotyp mit $p = 0,0310$ und $HR = 0,6958$ (KI = 0,5005-0,9674) eine verringerte Mortalität nach 28 Tagen (Tabelle 26 und Tabelle 28). Damit zeigten diese Genotypen zum einen in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (Abbildung 6 und Abbildung 8) und zum anderen in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse auch unter Hinzunahme möglicher Störfaktoren eine erhöhte Überlebensrate bzw. geringere Mortalität für den Zeitraum von 28 Tagen nach Sepsisbeginn. Hervorzuheben ist außerdem, dass die Variable Alter bei jedem der vier SNPs sowohl in Bezug auf die 28- als auch 90-Tage-Mortalität einen signifikanten p -Wert von $< 0,0001$ und eine $HR > 1$ aufwies. Folglich ging das zunehmende Alter unabhängig der berücksichtigten Variablen mit einer erhöhten Mortalität einher. Als weiterer Befund resultierte in den Cox-Regressionsanalysen in Bezug auf die 28-Tage-Mortalität ein signifikanter BMI mit einer $HR < 1$. Ein erhöhter BMI wirkte sich demnach in den ersten 28 Tagen nach Sepsisbeginn protektiv auf das Überleben aus. Abschließend konnten beim SOFA und APACHE II *Score* signifikante p -Werte mit $p \leq 0,05$ und $HRs > 1$ beobachtet werden. Eine Zunahme des jeweiligen *Scores* korreliert positiv mit der Mortalität und mündet in eine erhöhte Sterblichkeit.

4 Diskussion

Ziel dieser Dissertation ist es herauszufinden, ob genetische Varianten der negativ-kostimulierenden T-Zell-Inhibitoren TIM-3 und LAG-3, in diesem Fall die SNPs TIM-3 rs1036199 und rs10515746 bzw. LAG-3 rs870849 und rs951818, Einfluss auf das *Outcome* von Patienten mit Sepsis haben. Insgesamt 712 intensivmedizinisch betreute Patienten mit Sepsis konnten gemäß der jeweils geltenden Sepsis-Leitlinie prospektiv in die Studie aufgenommen, ihr Krankheitsverlauf für die Dauer von max. 28 Tagen klinisch beobachtet und ihr Überleben nach 90 Tagen kontrolliert werden. In dieser Arbeit konnte eine signifikant erhöhte 28-Tage-Überlebensrate der septischen Patienten mit dem TIM-3 rs1036199 AA-, dem TIM-3 rs10515746 CC- bzw. dem LAG-3 rs951818 AA-Genotypen in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse ($p = 0,0099$; $p = 0,0202$; $p = 0,0476$) beobachtet werden. Auch unter Hinzunahme möglicher Störfaktoren wie beispielsweise Alter oder BMI blieb der positive Einfluss des TIM-3 rs1036199 AA-Genotypen in Bezug auf die 28-Tage-Überlebensrate in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse bestehen (HR = 0,6703, $p = 0,0175$). Ebenso konnte die signifikante Assoziation der TIM-3 rs10515746 CC-Genotypen mit einer niedrigeren Mortalität innerhalb eines Zeitraumes von 28 Tagen nach Sepsisbeginn verglichen mit den A-Allel-Trägern in der Cox-Regressionsanalyse reproduziert werden (HR = 0,6958, $p = 0,0310$). Somit kann durch die vorliegenden Studienergebnisse erstmalig eine erhöhte Überlebensrate septischer Patienten mit dem TIM-3 rs1036199 AA- bzw. TIM-3 rs10515746 CC-Genotypen unabhängig von möglichen Störfaktoren nachgewiesen werden. Die klinische Relevanz der Studienergebnisse wird darüber hinaus durch die Publikationen im *International Journal of Molecular Sciences* und *Journal of Clinical Medicine* hervorgehoben (Mewes et al. 2020; Mewes et al. 2021). Nachfolgend wird der Fokus zunächst auf die drei anfangs gestellten zentralen Fragen gelegt, danach wird auf weitere Besonderheiten sowie Stärken und Limitationen der Arbeit eingegangen.

4.1 Diskussion der zentralen Fragestellung

1. *Beeinflussen die untersuchten SNPs die 28- bzw. 90-Tage-Mortalität septischer Patienten als main Outcome-Parameter?*

Die Frage, ob die untersuchten SNPs die Mortalität septischer Patienten beeinflussen, kann in Bezug auf TIM-3 eindeutig und in Bezug auf LAG-3 teilweise bejaht werden. In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (siehe 3.2) fanden sich für TIM-3 rs1036199, TIM-3 rs10515746 und LAG-3 rs951818 signifikante Unterschiede bezogen auf die 28-Tage-Mortalität. Für TIM-3 rs1036199 resultierte mit $p = 0,0099$ 28 Tage nach Sepsisbeginn eine signifikant erhöhte Überlebensrate der AA-Homozygoten mit 82 % verglichen mit jener der C-Allel-Träger mit 73 % (Abbildung 6). Hingegen zeigte sich für die 90-Tage-Mortalität zwar ein tendenziell erhöhtes Überleben der TIM-3 rs1036199 AA-Homozygoten (70 %) verglichen mit dem der C-Allel-Trägern (66 %), mit $p = 0,233$ allerdings kein signifikanter

Unterschied (Abbildung 7). Die anfangs durchgeführte LD-Analyse in Kapitel 3.1.1 ergab eine Korrelation des TIM-3 rs1036199 A-Allels mit dem C-Allel des TIM-3 rs10515746 SNPs. Tatsächlich ergaben die Überlebenszeitanalysen bei TIM-3 rs10515746, dass der CC-Genotyp analog zum TIM-3 rs1036199 AA-Genotypen eine signifikant erhöhte Überlebensrate aufweist. Nach 28 Tagen lebten 82 % der TIM-3 rs10515746 CC-homozygoten Patienten, während es bei den A-Allel-Trägern 74 % waren. Es resultiert ein signifikanter Log-Rank-Test mit $p = 0,0202$ (Abbildung 8). Darüber hinaus ergab sich auch bei TIM-3 rs10515746 bezüglich der 90-Tage-Mortalität kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Lediglich ein verringertes Versterben der CC-Homozygoten konnte beobachtet werden (30 % vs. 34 %, $p = 0,2345$, Abbildung 9).

Die vorliegenden Ergebnisse der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen werden durch die Studie von Yang et al. (2013) gestützt, in der eine Korrelation zwischen TIM-3 und der Schwere der Sepsis nachgewiesen werden konnte. Mäuse, denen TIM-3-Antikörper verabreicht und bei denen die TIM-3-Expression herunterreguliert wurde, wiesen eine erhöhte Makrophagen-Reaktivität, eine Zunahme pro-inflammatorischer Cytokine sowie eine daraus resultierende Zunahme des SIRS-Syndroms entsprechend einer Steigerung der systemischen Entzündungsreaktion auf. Eine Überexpression von TIM-3 führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion pro-inflammatorischer Cytokine (Yang et al. 2013). Lu et al. (2019) konnten zeigen, dass funktionelle SNPs, welche eine *Misense*-Mutation zur Folge haben, entscheidenden Einfluss auf die interindividuellen Unterschiede in puncto Suszeptibilität und Entzündungsreaktion bei der Sepsis haben. Die signifikant erhöhten Überlebensraten der TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Genotypen legen nahe, dass die funktionellen SNPs das TIM-3-Protein bzw. seine Expression so weit verändern, dass die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Immunhomöostase während der Sepsis positiv beeinflusst wird. Möglicherweise kommt es durch die untersuchten TIM-3 SNPs zu einer veränderten Interaktion von TIM-3 mit seinen Liganden, wie Galectin-9 oder CEACAM1 (Zhu et al. 2005; Huang et al. 2015), und nachfolgend zu einer verringerten T-Zell-Inhibition bzw. -Apoptose. Eine erhöhte T-Zell-Aktivität könnte den Überlebensvorteil während der Sepsis und gleichzeitig die erhöhte Inzidenz für Autoimmunerkrankungen erklären. Durch das Vorkommen von TIM-3 auf diversen weiteren Immunzellen wie u. a. Mastzellen, Makrophagen, NK- und dendritischen Zellen, könnte eine veränderte TIM-3-Expression außerdem zu einer gesteigerten Makrophagen-Reaktivität sowie einer TLR-vermittelten pro-inflammatorischen Cytokinproduktion führen und eine gesteigerte Immunantwort fördern (Joller und Kuchroo 2017; Wolf et al. 2020).

Die erhaltenen Studienergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die funktionellen SNPs TIM-3 rs1036199 und rs10515746 die 28-Tage-Mortalität septischer Patienten auch unter Hinzunahme möglicher Störfaktoren in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse signifikant beeinflussen (siehe 3.5). Für den TIM-3 rs1036199 AA-Genotypen resultierte ein signifikanter p -Wert von 0,0175 und eine HR von 0,6703 (95 % KI 0,4818-0,9324), sodass das Vorliegen des AA-Genotypen bei septischen Patienten als unabhängiger, protektiver Faktor in Bezug

auf die 28-Tage-Mortalität identifiziert werden konnte (Tabelle 26). Auch der TIM-3 rs10515746 CC-Genotyp zeigte mit $p = 0,0310$ einen signifikanten und mit einer HR von 0,6958 (95 % KI 0,5005-0,9674) einen reduzierenden Effekt des CC-Genotypen auf die 28-Tage-Mortalität, sprich er bewirkte eine erhöhte Überlebensrate (Tabelle 28). Die untersuchten Störfaktoren wie beispielsweise ein steigendes Alter oder das Vorliegen des männlichen Geschlechts erhöhen die Mortalität septischer Patienten signifikant (Shankar-Hari et al. 2016b). Dass der TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Genotyp sowohl in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse als auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse eine erhöhte Überlebensrate bzw. eine verringerte Mortalität für den Zeitraum von 28 Tagen nach Sepsisbeginn aufwiesen, untermauert ihre Bedeutung für die Mortalität als *main Outcome*-Parameter. Folglich kann in der Zusammenschau der Ergebnisse beiden TIM-3 SNPs eine definitive prognostische Bedeutung bei einer Sepsis-Erkrankung zugesprochen werden. Stanski und Wang (2020) sehen die Unterteilung septischer Patienten anhand ihres immunologischen Profils als Ansatz für eine präzise Therapie der Sepsis (Stanski und Wong 2020; van der Poll et al. 2021). Die Kategorisierung septischer Patienten anhand des TIM-3 rs1036199 und rs10515746-Genotypen könnte zukünftig einen möglichen Therapieansatz darstellen.

Die Auswirkungen der funktionellen SNPs LAG-3 rs870849 und rs951818 konnten hingegen keine eindeutigen Ergebnisse bzgl. der Mortalität erzielen. In den Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen für LAG-3 rs870849 zeigte sich mit 79 zu 78 % (28-Tage-Überlebenszeitanalyse) bzw. 70 zu 67 % (90-Tage-Überlebenszeitanalyse) ein nur tendenziell erhöhtes Überleben der T-Allel-Träger verglichen mit dem der CC-Homozygoten 28 bzw. 90 Tage nach Sepsisbeginn, jedoch keine signifikanten p-Werte ($p = 0,5600$, Abbildung 10; $p = 0,3991$, Abbildung 11). Wang et al. (2021) identifizierten das Vorhandensein des LAG-3 rs870849 T-Allels als protektiven Faktor bei der Primären Immunthrombozytopenie im Sinne eines reduzierten Thrombozytenverlustes. Ein signifikanter Zusammenhang des T-Allels mit einer erhöhten Überlebensrate bei der Sepsis konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist der Einfluss des T-Allels auf Thrombozyten stärker ausgeprägt als jener auf die T-Zellen, weshalb sich bei der Sepsis, bei der v. a. die T-Zell-Antwort eine entscheidende Rolle spielt, keine signifikanten Differenzen zeigen lassen konnten.

Hingegen zeigte der LAG-3 rs951818 SNP 28 Tage nach Sepsisbeginn mit einem p-Wert von 0,0476 ein signifikant erhöhtes Überleben der AA-Homozygoten mit 83 % entgegen jenem der C-Allel-Träger mit 76 % (Abbildung 12). Nach 90 Tagen wiesen die AA-Homozygoten jedoch nur noch eine tendenziell höhere Überlebensrate auf (72 % vs. 67 %, $p = 0,1069$, Abbildung 13). Die Studien von Guo et al. (2019) und Zhang et al. (2005) belegen, dass LAG-3 rs951818 mit dem Auftreten von Morbus Parkinson bzw. Multipler Sklerose korreliert. Die Annahme, dass LAG-3 rs951818 ebenfalls Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Sepsis hat, wird durch die Studie von Lou et al. (2020) untermauert. Zum einen konnten Lou et al. (2020) eine erhöhte LAG-3-Expression bei Mäusen mit Sepsis nachweisen. Zum anderen verglichen sie Wildtyp-Mäuse mit *Knockout*-Mäusen bzw. solchen, die

mit Antikörpern behandelt wurden. Sieben Tage nach Sepsisinduktion wurde eine verringerte Bakterienlast und eine signifikant erhöhte Überlebensrate bei den LAG-3 *Knockout*-Mäusen bzw. den mit Antikörpern behandelten Mäusen mit 53% beobachtet, wohingegen die Überlebensrate der Wildtyp-Mäuse 13% betrug (Lou et al. 2020). Darauf aufbauend wird vermutet, dass die Blockade von LAG-3 auch beim Menschen zu einer Eindämmung der Primärinfektion, einer reduzierten Inzidenz nosokomialer Infektionen durch opportunistische Erreger und schlussendlich zu einer verbesserten Überlebensrate bei septischen Patienten führen könnte. Niu et al. (2019) untersuchten den Einfluss von LAG-3 und PD-1 ko-exprimierender T-Zellen in Bezug auf das Überleben septischer Patienten. Bei den ko-exprimierenden T-Zellen konnte eine verringerte Anzahl an T-Zellen, ein durchschnittlich erhöhter SOFA *Score* sowie im Verlauf längere Krankenhausaufenthalte und schlussendlich eine erhöhte Mortalität beobachtet werden (Niu et al. 2019). Obwohl in der hier vorliegenden Arbeit die 28-Tage-Überlebenszeitanalyse zeigen konnte, dass der LAG-3 rs951818 AA-Genotyp signifikanten Einfluss auf eine verringerte 28-Tage-Mortalität bei septischen Patienten hat, konnte diese Korrelation in der Cox-Regressionsanalyse unter Einwirkung von Störfaktoren nicht reproduziert werden (Tabelle 32). Dies lässt vermuten, dass der Einfluss anderer Faktoren wie beispielsweise der des Alters, dem des LAG-3 rs951818 AA-Genotypen überlegen ist. Zukünftig sind weitere Studien zu den bislang unbekanntenen Komponenten des LAG-3-Signalweges bzw. zur Interaktion von LAG-3 mit anderen T-Zell-Inhibitoren erforderlich, um die erhobenen Studienergebnisse im Kontext der multifaktoriellen Pathogenese der Sepsis konkreter einordnen zu können (Andrews et al. 2017).

2. *Wirken sich die untersuchten SNPs auf die Schwere der Sepsis-Erkrankung aus?*

Um Rückschlüsse auf die Schwere der Sepsis-Erkrankung ziehen zu können, wurden die Patientendaten aus den täglich erhobenen CRFs analysiert. Zunächst beinhaltete dieser die Patientencharakteristika inkl. Vorerkrankungen zu Sepsisbeginn. Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich sowohl beim TIM-3 rs1036199 als auch beim TIM-3 rs10515746 SNP ein signifikanter Unterschied bezüglich des Gebrauchs von Bronchodilatoren zu Sepsisbeginn. Während 13 % der TIM-3 rs1036199 AA-homozygoten Patienten Bronchodilatoren erhielten, waren es bei den C-Allel-Trägern nur 6 % ($p = 0,0052$, Tabelle 8). Parallel dazu benötigten auch die TIM-3 rs10515746 CC-Homozygoten signifikant mehr Bronchodilatoren zu Sepsisbeginn (12 % vs. 6 %, $p = 0,0155$, Tabelle 9). Die Korrelation des A-Allels von TIM-3 rs1036199 mit dem C-Allel von TIM-3 rs10515746 aus der LD-Analyse konnte demnach erneut bestätigt werden. Die TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Genotypen wiesen zu Sepsisbeginn signifikant mehr Bedarf an Bronchodilatoren und gleichzeitig eine erhöhte 28-Tage-Überlebensrate auf. Die Assoziation des TIM-3-Proteins mit einer erhöhten Anfälligkeit für diverse Autoimmunerkrankungen, Asthma und Allergien konnte bereits in mehreren Studien belegt werden (Li et al. 2013; Tang et al. 2015). Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der TIM-3 rs1036199 AA- bzw. rs10515746 CC-Genotyp zu einer verringerten T-Zell-Inhibition, also einer verstärkten T-Zell-Antwort führt. Eine verstärkte T-Zell-Antwort wirkt sich wiederum negativ auf

gewisse (Autoimmun-)Erkrankungen, insbesondere auf solche des Respirationstraktes mit erhöhter Notwendigkeit für Bronchodilatoren aus; aber auch positiv auf den Krankheitsverlauf der Sepsis insgesamt. Allerdings konnten die signifikanten Differenzen in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse nicht reproduziert werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Einfluss der berücksichtigten Störfaktoren überwiegt. Im Gegensatz zu den Studienergebnissen von Liu et al. (2018) und Razi et al. (2019) konnte in dieser Arbeit keine Differenz zwischen den TIM-3 rs1036199 Genotypen bzgl. des Vorkommens der rheumatoiden Arthritis beobachtet werden. Andererseits untersuchten Razi et al. (2019) ebenfalls den TIM-3 rs10515746 SNP und fanden in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, keine Assoziation des TIM-3 rs10515746 SNPs mit der Inzidenz für rheumatoide Arthritis. So oder so ist eine höhere Fallzahl von septischen Patienten mit rheumatoider Arthritis in zukünftigen Studien erforderlich, da diese Erkrankung im Patientenkollektiv dieser Untersuchung bei nur 1 % vorkam und somit möglicherweise nicht repräsentativ ist.

In Bezug auf das LAG-3-Protein konnten verschiedene Studien verdeutlichen, dass LAG-3 bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis, koronarer Herzkrankheit oder chronischen Virus- und Tumorerkrankungen einen entscheidenden Einfluss auf die Immunreaktion und Immunhomöostase hat (Golden et al. 2016; Hu et al. 2020). Zudem kann die Annahme, dass genetische Varianten des LAG-3-Proteins Einfluss auf die Patientenkonstitution und vorhandenen Vorerkrankungen haben bzw. hatten, bekräftigt werden. So konnten beispielsweise Zhang et al. (2005) die Assoziation von LAG-3 rs870849 und rs951818 mit Multipler Sklerose nachweisen und Guo et al. (2019) diejenige von LAG-3 rs951818 mit Morbus Parkinson. Guo et al. (2019) stellten eine signifikant erhöhte Inzidenz für Morbus Parkinson bei Chinesinnen mit dem LAG-3 951818 CC-Genotypen fest. Für LAG-3 rs870849 konnte hingegen kein Zusammenhang mit Morbus Parkinson beobachtet werden (Guo et al. 2019). Bei den bei dieser Studie erfassten Vorerkrankungen und Patientencharakteristika konnten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den CC-Homozygoten und T-Allel-Trägern von LAG-3 rs870849 bzw. den AA-Homozygoten und C-Allel-Trägern von LAG-3 rs951818 nachweisen lassen (Tabelle 12 und Tabelle 13). Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass Morbus Parkinson oder andere neurologische Erkrankungen in dieser Arbeit nicht explizit untersucht wurden, da alle Patienten von chirurgischen Intensivstationen stammen. Jedoch bestärkt die vorliegende Literatur die Ergebnisse der durchgeführten Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, in der zumindest für die LAG-3 rs951818 AA-Homozygoten eine signifikant erhöhte 28-Tage-Überlebensrate der betroffenen Patienten nachgewiesen wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass der LAG-3 rs951818 SNP die Expression bzw. Funktion des LAG-3-Proteins so weit verändert, dass es zu interindividuellen Unterschieden in der Immunreaktion bei verschiedenen Erkrankungen, inkl. der Sepsis, kommt.

In Hinsicht auf den Krankheitsverlauf deuten die im Gesamtkollektiv deutlich erhöhten Werte in den Kategorien Schwere der Sepsis, Entzündungsparameter und bei den zu den

SOFA *Subscores* zugehörigen Parametern auf ein aktives, systemisches Krankheitsgeschehen hin. Weder bei TIM-3 rs1036199 noch bei TIM-3 rs10515746 konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Möglicherweise spiegelte sich die durch die Genotypen veränderte Immunantwort nicht in den erfassten Parametern zu den verschiedenen Organsystemen wider. Hingegen resultierten bei LAG-3 rs870849 signifikante Unterschiede in Bezug auf den Anteil an Patienten mit notwendiger mechanischer Beatmung und der Nierenfunktion gemessen am Kreatininwert (Tabelle 18). Mit 96 % mussten signifikant mehr T-Allel-Träger als CC-Homozygote mit 91 % im Beobachtungszeitraum mechanisch beatmet werden ($p = 0,0090$). Schon am Einschlusstag zeigte sich tendenziell eine erhöhte Notwendigkeit für die mechanische Beatmung bei den T-Allel-Trägern (88 % vs. 83 %, $p = 0,0598$, Tabelle 10). Das Vorhandensein des T-Allels könnte demnach einen relevanten Einfluss auf die Lungenfunktion bzw. Sauerstoffversorgung des Körpers während der Sepsis haben. Bislang existieren in Bezug auf LAG-3 und diverse Lungenerkrankungen hauptsächlich Studien zur Tuberkulose. In diesem Zuge ist bestätigt, dass die durch LAG-3 ausgelöste Hemmung der Th1-Zellen die Ausbreitung und Persistenz des primär die Lunge befallenden *Mycobacterium tuberculosis* begünstigt (Phillips et al. 2017; Hu et al. 2020). Außerdem zeigten die LAG-3 rs870849 T-Allel-Träger mit 1,2 mg/dL einen niedrigeren bzw. physiologisch normalen Kreatininwert verglichen mit dem der CC-Homozygoten von 1,3 mg/dL. Dabei ergab sich ein signifikanter p-Wert von 0,0475 (Tabelle 18). Der erhöhte Anteil an beatmeten Patienten, sowie der physiologisch normale Kreatininwert deuten darauf hin, dass das Vorhandensein des LAG-3 rs870849 T-Allels sich negativ auf die Lungen- und positiv auf die Nierenfunktion auswirkt. Hinsichtlich der Organsysteme Lunge und Niere existieren Studien, welche den negativen Einfluss einer erhöhten LAG-3 Expression auf die Tumorprogression von u. a. dem Nierenzell- und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom darstellen konnten (Lecocq et al. 2021). Wang et al. (2021) konnten in ihrer Studie zur Primären Immunthrombozytopenie zeigen, dass das Vorhandensein des LAG-3 rs870849 T-Allels zu einer mildereren Erkrankungsschwere im Sinne eines reduzierten Thrombozytenverlustes führt. Auch wenn sich in den Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen keine relevanten Differenzen zwischen den Genotypen von LAG-3 rs870849 zeigten, hat das Vorhandensein des T-Allels allem Anschein nach Einfluss auf die Organe Lunge und Niere sowie übergeordnet auf Autoimmun- und Tumorerkrankungen. Im Hinblick auf die mechanische Beatmung wiesen auch die Genotypen des LAG-3 rs951818 SNPs signifikante Differenzen auf. Im Rahmen der organunterstützenden Therapie wurden 96 % der AA-homozygoten Träger im Vergleich zu 92 % der C-Allel-Träger mechanisch beatmet ($p = 0,0466$, Tabelle 19). Es ist bekannt, dass negativ-kostimulierende T-Zell-Inhibitoren wie TIM-3 und LAG-3 relevanten Einfluss auf die Pathophysiologie der Sepsis haben, indem sie die dysbalancierte Immunhomöostase wiederherstellen können und potenzielle Therapeutika darstellen (McBride et al. 2021). Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass genetische Varianten den Krankheitsverlauf der Sepsis-Erkrankung dahingehend verändern, dass bestimmte Genotypen ein unterschiedliches Maß an organunterstützenden

Maßnahmen benötigen. Allerdings ist bislang weder geklärt inwieweit TIM-3 bzw. LAG-3 die einzelnen Organsysteme während der Sepsis beeinflussen noch wodurch genau die untersuchten Varianten den Krankheitsverlauf verändern. Hieran sollten zukünftige Studien anknüpfen.

3. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen den untersuchten SNPs und bestimmten Erregern als Ausgangspunkt der Sepsis erkennen?

Gemäß der aktuellen Sepsis-3 Definition ist eine zugrundeliegende Infektion der Ausgangspunkt für eine dysregulierte Immunreaktion und Organdysfunktion im Sinne einer Sepsis (Singer et al. 2016). Bei genauerer Untersuchung der am Einschlusstag erhobenen Infektionsfokuse kristallisierte sich die Lunge (63 %) als führender Infektionsfokus heraus. Es folgte das Abdomen (19 %) und mit jeweils ≤ 6 % die Primäre Bakteriämie, Knochen und Weichteile, chirurgische Wunden und der Urogenitaltrakt bzw. sonstige, nicht näher kategorisierte Infektionsfokuse (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). Dieses Verteilungsmuster befindet sich in Übereinstimmung mit der internationalen Studie von Vincent et al. (2020). In dieser konnten bei weltweit über 8000 intensivmedizinisch behandelten Patienten mit bestätigter Infektion der Respirationstrakt mit 60 %, das Abdomen mit 18 %, die Blutbahn mit 15 % sowie der Urogenitaltrakt mit weiteren 11 % als Infektionsfokuse identifiziert werden.

Nachdem hinsichtlich des Infektionsfokus zu Sepsisbeginn kein Unterschied zwischen den Genotypen der untersuchten SNPs gefunden werden konnte, wurde weiter untersucht, ob die genetischen Varianten während des intensivmedizinischen Aufenthaltes mit speziellen nosokomialen Erregern assoziiert sind. Gestützt wurde diese Überlegung u. a. von den Ausführungen von Angus und van der Poll (2013), gemäß denen erregerspezifische Faktoren inklusive genetischer Merkmale die individuelle Immunreaktion entscheidend beeinflussen und damit den klinischen Verlauf der Sepsis mitbestimmen. Die statistische Auswertung ergab, dass bei TIM-3 rs1036199 signifikant mehr Infektionen durch grampositive Bakterien bei den AA-Homozygoten mit 79 % verglichen mit denen der C-Allel-Träger mit 72 % vorkamen ($p = 0,0445$, Tabelle 22). Darüber hinaus resultierten in der Familie grampositiver Erreger bei den AA-Homozygoten signifikant mehr Infektionen mit *Staph. epidermidis* (35 % vs. 27 %, $p = 0,0295$, Tabelle 22). Parallel dazu konnten bei den TIM-3 rs10515746 CC-Homozygoten mit ebenfalls 35 % mehr Infektionen durch *Staph. epidermidis* als bei den A-Allel-Trägern mit 27 % nachgewiesen werden ($p = 0,0313$, Tabelle 23). Hingegen ergab sich bei den Infektionen durch grampositive Erreger nur ein tendenziell höheres Vorkommen bei den TIM-3 rs10515746 CC-Genotypen (78 % vs. 72 %, $p = 0,0829$, Tabelle 23). Epidemiologische Auswertungen für die USA ergaben, dass grampositive Bakterien und Pilze gegenwärtig die Hauptverursacher der im Krankenhaus behandelten Sepsis sind (Martin et al. 2003). Dies spiegelt sich im hier vorliegenden Patientenkollektiv wider (siehe 3.4). In absteigender Reihenfolge wurden Infektionen mit grampositiven Bakterien (76 %), gefolgt von solchen mit gramnegativen Bakterien (64 %), Pilzen (52 %) und Viren (11 %) nachgewiesen. In Bezug auf durch Pilzinfektionen ausgelöste

Sepsis-Erkrankungen befinden sich die Studienergebnisse im Einklang mit jenen von Spec et al. (2016). In ihrer Kohortenstudie wurden T-Zellen und in diesem Zusammenhang auch T-Zell-Inhibitoren septischer Patienten mit im Blut nachgewiesener Pilzinfektion untersucht. Es konnte zwar ein immunsupprimierter T-Zell-Phänotyp beobachtet, allerdings keine Korrelation zwischen der TIM-3-Expression und der Inzidenz für Pilzinfektionen, genauer jener mit *Candida albicans*, nachgewiesen werden (Spec et al. 2016). Auch im hier untersuchten Patientenkollektiv zeigten sich bei den TIM-3 SNPs weder Differenzen zwischen den Genotypen hinsichtlich genereller Pilzinfektionen noch der durch *Candida albicans* ausgelösten Sepsis. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TIM-3 offenbar eine untergeordnete Rolle im Kontext der durch Pilze ausgelösten Sepsis spielt. Dies gilt nicht für die durch *Staph. epidermidis* ausgelösten Sepsis-Erkrankungen. *Staph. epidermidis* ist ein ubiquitär vorkommendes grampositives Bakterium. Dieses gehört zur Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken und ist gefürchteter Auslöser der neonatalen Sepsis (Dong und Speer 2014). Durch seine Fähigkeit einen sogenannten Biofilm und ein Toxin, namentlich *phenol-soluble modulin*, produzieren zu können, stellt es eine Bedrohung für das Immunsystem dar (Kleinschmidt et al. 2015). Ferner ist bekannt, dass *Staph. epidermidis* insbesondere bei vorliegender Immunsuppression ein weit verbreiteter Erreger und Auslöser der Bakteriämie und schließlich nosokomial erworbenen Sepsis ist (Otto 2017). Die genaue Rolle des Toxins, der Einfluss auf pro-inflammatorische Cytokine und die folgende Entzündungsreaktion ist noch immer weitestgehend unklar (Nguyen et al. 2017).

Es ist nachgewiesen, dass sowohl die Sepsis-induzierte Immunsuppression als auch eine verzögerte Wiederherstellung der T-Zell-Rezeptor-Diversität septische Patienten besonders anfällig für opportunistische Erreger macht. Infolgedessen kommt es vermehrt zu nosokomialen Infektionen und einer steigenden Mortalität (Otto et al. 2011; Venet et al. 2013). Diverse Studien konnten belegen, dass die Interaktion von TIM-3 mit Galectin-9 zur Apoptose von T-Zellen führt und damit Einfluss auf den Ausgang von sowohl bakteriellen, als auch viralen Infektionen hat (Zhu et al. 2005; Wolf et al. 2020). Im Kontext der Tuberkulose wurde nachgewiesen, dass die Interaktion von TIM-3 mit Galectin-9 über eine erhöhte Makrophagen-Aktivität zu einer Reduktion des sich intrazellulär vermehrenden *Mycobacterium tuberculosis* führt (Jayaraman et al. 2010). Bei Patienten mit zystischer Fibrose konnte über die TIM-3-Galectin-9-Interaktion eine Verringerung des gramnegativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet werden (Vega-Carrascal et al. 2014). Bei chronischen Infektionsgeschehen kann ein erhöhtes Vorkommen von TIM-3 demnach als protektiv angesehen werden, da es durch die vermehrte T-Zell-Apoptose zu einer reduzierten Erregerausbreitung kommt. Im Gegensatz dazu ist eine vermehrte TIM-3-Expression bei akuten Infektionen eher nachteilig. Durch die T-Zell-Inhibition bzw. Apoptose können Erreger die körpereigene Immunabwehr überwinden und die Infektionsentstehung wird erleichtert. Wang et al. (2011) wiesen im Mausmodell nach, dass es durch die TIM-3-Galectin-9-Interaktion zu einer verringerten IL-17-Aktivität mit nachfolgender Ausbreitung des gramnegativen Bakteriums *Klebsiella pneumonia* kommt und dadurch letztendlich die

Mortalität ansteigt. Vor kurzem konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Expression von negativ-kostimulierenden T-Zell-Inhibitoren, TIM-3 und LAG-3 eingeschlossen, bei akuten Infektionen mit dem SARS-CoV-2 Virus sowie *Plasmodium falciparum* erhöht ist. Sowohl die resultierende COVID-19- als auch Malaria-Erkrankung gehen mit einer unbalancierten Immunantwort einher. Es konnte beobachtet werden, dass die Expressionsrate von TIM-3 und LAG-3 parallel zur Erkrankungsschwere der COVID-19-Infektion ansteigt (Herrmann et al. 2020). Aktuell ist die Messung von TIM-3 und Galectin-9 im Serum von Patienten nach Nierentransplantation bis zu 12 Monate post-Transplantation ein vielversprechender Prädiktor für lebensbedrohliche Infektionen (Li et al. 2019). Bislang existierten keine Daten zu einer möglichen Assoziation von TIM-3 SNPs mit speziellen nosokomialen Erregern bei der Sepsis. Die vorliegende Studie konnte erstmalig signifikant mehr Infektionen mit grampositiven Bakterien und *Staph. epidermidis* bei septischen Patienten mit dem TIM-3 rs1036199 AA-Genotypen sowie mit *Staph. epidermidis* bei den TIM-3 rs10515746 CC-Homozygoten nachweisen. Ebenjene Genotypen zeigten ein tendenziell vermehrtes Vorkommen von Infektionen mit Bakterien, Viren und Pilzen während des intensivmedizinischen Aufenthaltes. In den Kaplan-Meier-Überlebenszeit- und Cox-Regressionsanalysen wurde nachgewiesen, dass die TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Homozygoten unabhängige Prädiktoren für eine signifikant erhöhte 28-Tage-Überlebensrate sind. Wie zuvor beschrieben würde eine durch die AA- bzw. CC-Homozygoten ausgelöste erhöhte T-Zell-Aktivität den Überlebensvorteil während der Sepsis und die erhöhte Inzidenz für Autoimmunerkrankungen erklären. Eine erhöhte T-Zell-Aktivität würde jedoch gleichzeitig zu einer vermehrten Erregerbekämpfung führen. Weshalb mehr Infektionen mit grampositiven Erregern und *Staph. epidermidis* bei ebenjenen Genotypen auftauchten, kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Dass es trotz vermehrter Infektionen zu einer verringerten Mortalität kam, lässt jedoch schlussfolgern, dass der TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Genotyp zu einer balancierteren Immunantwort und schnellen Wiederherstellung der Immunhomöostase führt.

Parallel zu den TIM-3 SNPs wurden die LAG-3 SNPs rs870849 bzw. rs951818 hinsichtlich nosokomialer Keime und Erreger untersucht. Hierbei konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen festgestellt werden (Tabelle 24 und Tabelle 25). Gegenwärtige Studien konzentrieren sich hauptsächlich auf den inhibitorischen Effekt von LAG-3 auf die T-Zell-Reaktion im Rahmen chronischer Viruserkrankungen wie beispielsweise dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV), Hepatitis oder HIV (Cook und Whitmire 2016). Richter et al. (2010) konnten zeigen, dass die alleinige Blockade von LAG-3 im Kontext einer LCMV-Infektion keine Auswirkungen auf die Cytokin-Produktion oder den Titer hat. Chronische Viruserkrankungen zeichnen sich durch eine erschöpfte T-Zell-Antwort, wie sie auch bei einer persistierenden Sepsis-Erkrankung resultiert, aus. Während einer anhaltenden Viruserkrankung wird LAG-3 vermehrt exprimiert und inhibiert die Akkumulation virusbefallener T-Zellen und somit indirekt deren Funktion (Richter et al. 2010; Cook und Whitmire 2016). Bei akuten Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*

korreliert eine vermehrte LAG-3-Expression mit der Bakterienlast, da die durch LAG-3 induzierte T-Zell-Inhibition optimale Bedingungen für eine initial ungehinderte Bakterienreplikation bietet. Zurzeit wird untersucht, ob LAG-3 als Biomarker bei Tuberkuloseerkrankungen fungieren könnte (Phillips et al. 2015; Phillips et al. 2017). Ferner werden LAG-3-Antikörper als Therapiesäule bei verschiedenen Tumor- und Viruserkrankungen wie z. B. HIV getestet (Andrews et al. 2017; Graydon et al. 2019). Nichtsdestotrotz fehlen bis dato Studien zu LAG-3 im Kontext nosokomialer Infektionen, welche oftmals Ausgangspunkt der Sepsis sind. Graydon et al. (2019) deuten an, dass die LAG-3-Antikörpertherapie eine vielversprechende Ergänzung zur leitliniengerechten HIV-Therapie bietet, hierfür aber diejenigen Patienten, welche von der LAG-3-Blockade profitieren würden, zuvor herausgefiltert werden müssen. Zukünftige Forschung zu funktionellen LAG-3 SNPs könnte helfen, Patienten zu kategorisieren und ihnen eine personalisierte Therapie zukommen zu lassen. In der vorliegenden Studie lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den AA-Homozygoten und C-Allel-Trägern in Bezug auf die berücksichtigten Keime und Erreger nachweisen. Somit muss davon ausgegangen werden, dass entweder die entscheidenden Erreger nicht nachgewiesen und somit nicht untersucht worden sind oder andere Faktoren, wie die genetischen Varianten, den entscheidenden Einfluss auf die Mortalität ausmachen. Gerade bei den Keimen und Erregern wäre es sinnvoll die TIM-3- bzw. LAG-3-Expression sowie Erregerlast des septischen Patientenkollektivs mit einer gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen, um zunächst den Einfluss von TIM-3 bzw. LAG-3 bei akuten Infektionen genauer betrachten zu können. Es ist zu hoffen, dass zukünftige Studien diesen Aspekt sowie die Rolle verschiedener funktioneller LAG-3 SNPs bei Infektionen und während der Sepsis genauer beleuchtet werden.

4.2 Weitere Besonderheiten

In den multivariaten Cox-Regressionsanalysen (siehe 3.5) konnte wie zuvor beschrieben gezeigt werden, dass sowohl die TIM-3 rs1036199 AA- als auch die TIM-3 rs10515746 CC-Homozygoten eine erhöhte 28-Tage-Überlebensrate bzw. geringere 28-Tage-Mortalität aufweisen. Darüber hinaus zeigte sich bei allen vier SNPs ein höchst signifikanter Einfluss des Alters mit $p < 0,0001$ sowohl in Bezug auf die 28- als auch 90-Tage-Mortalität. Mit einer durchgehenden HR > 1 steigt die Mortalität demnach parallel zum Alter an. Dieses Ergebnis befindet sich im Einklang mit der Studie von Angus et al. (2001), welche 192.980 US-amerikanische Patienten mit Schwerer Sepsis beinhaltet. Die Studie ergab, dass die Inzidenz für eine schwere Sepsis bei Patienten ≥ 85 Jahren am höchsten war. Erwachsene zwischen 60 und 64 Jahren wiesen eine Inzidenz von 5,3 pro 1.000 auf, wohingegen Patienten mit ≥ 85 Jahren eine Inzidenz von 26,2 auf 1.000 Personen aufzeigten. Somit verfünffachte sich die Inzidenz von den 60- bis 64-Jährigen zu den über 85-Jährigen. Ferner zeigte sich eine Vervielfachung der Mortalität, welche bei Kindern 10 % und bei den über 85-Jährigen 38,4 % betrug (Angus et al. 2001). Später wurden die Parameter Geschlecht, Ethnie und

Genetik zu den individuellen Prädiktoren für das Auftreten bzw. den Verlauf einer (Schweren) Sepsis hinzugefügt (Angus und van der Poll 2013). 2016 führten Shankar-Hari et al. (2016b) eine Metaanalyse mit Fokus auf der Sepsis und Langzeitmortalität durch. 43 Studien erfüllten schlussendlich die Studienkriterien. Als unabhängige Prädiktoren für eine erhöhte 1-Jahres-Mortalität nach überstandener Sepsis-Erkrankung resultierten das steigende Alter, das Vorliegen des männlichen Geschlechts sowie die Anzahl vorhandener Komorbiditäten. Dabei muss erwähnt werden, dass die Variable männliches Geschlecht nur in den Fall-Kontroll-Studien als unabhängiger Prädiktor auftauchte. Jene Studien mit einem homogenen Kollektiv aus septischen Patienten, wie es auch in dieser Dissertation der Fall ist, konnten ausschließlich das Alter als unabhängigen Prädiktor für eine erhöhte Mortalität nachweisen (Shankar-Hari et al. 2016b). Die erzielten Ergebnisse der Cox-Regressionsanalysen stimmen mit der Studie von Shankar-Hari et al. (2016b) überein. Folglich kann das zunehmende Alter als unabhängiger Prädiktor für eine erhöhte Mortalität bei Sepsis-Erkrankung angesehen werden.

Des Weiteren fanden sich in den Cox-Regressionsanalysen signifikante Zusammenhänge zwischen dem SOFA bzw. APACHE II *Score* und der Mortalität. Wie bereits in Kapitel 1.1.1 erläutert, dient der SOFA *Score* zur objektiven Erfassung einer vorliegenden Organdysfunktion. Je höher der resultierende Punktestand, von null bis maximal 24, desto schwerer die Organdysfunktion und desto höher die Mortalität (Vincent et al. 1996; Vincent et al. 1998). Schon bei einem SOFA *Score* von ≥ 2 Punkten beträgt die Mortalität bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion über 10 % (Seymour et al. 2016). Über 85 randomisiert kontrollierte Studien konnten belegen, dass die Mortalität septischer Patienten auf Grundlage des SOFA *Scores* abgeschätzt werden kann (de Grooth et al. 2017; Caraballo und Jaimes 2019). Der SOFA *Score* ist jederzeit reproduzierbar und die aktuellen Leitlinien nach Singer et al. (2016) definieren einen Anstieg von ≥ 2 Punkten im SOFA *Score* eindeutig als Vorliegen einer Sepsis (Liu et al. 2019). Der zu Sepsisbeginn erhobene SOFA *Score* zeigte in den multivariaten Cox-Regressionsanalysen sowohl in Bezug auf die 28- als auch 90-Tage-Mortalität signifikante Werte. Die HR betrug durchgehend > 1 , sodass bestätigt werden kann, dass die Mortalität mit steigendem SOFA *Score* zunimmt. Die Prognose der erhöhten Sterblichkeit bei initial erhöhtem SOFA *Score* kann sowohl für die 28- als auch 90-Tage-Mortalität getroffen werden. Beim vorliegenden Patientenkollektiv betrug der SOFA *Score* zu Sepsisbeginn durchschnittlich 10 ± 4 Punkte. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Genotypen der untersuchten SNPs. Weder die TIM-3 rs1036199 AA- noch die rs10515746 CC-Homozygoten zeigten zu Sepsisbeginn abweichende SOFA *Scores* im Vergleich zu den C- bzw. A-Allel-Trägern. Stattdessen kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mortalitätsdifferenzen erst im Verlauf der Sepsis-Erkrankung durch eine durch die Genotypen ausgelöste veränderte Immunantwort ergeben, da diese in den Kaplan-Meier- und Cox-Regressionsanalysen mit einer verringerten Mortalität einhergingen. Der SOFA *Score* spiegelt die Organfunktion wider, während die genetischen Varianten primär die zelluläre Immunantwort und sekundär die Organfunktion beeinflussen.

Parallel zum SOFA *Score* zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang des zu Sepsisbeginn erhobenen APACHE II *Scores* und der Mortalität. Interessanterweise zeigte der APACHE II *Score* in den multivariaten Cox-Regressionsanalysen der TIM-3 SNPs sowohl in Bezug auf die 28- als auch die 90-Tage-Mortalität einen signifikanten, günstigeren Einfluss ($HR > 1$) auf die Sterblichkeit, wohingegen sich dieser fördernde Einfluss bei den LAG-3 SNPs nur für die 90-Tage-Mortalität beobachten ließ. Anhand der zwölf Parameter zum aktuellen Gesundheitsstatus des Patienten, dessen Alter, sowie anhand der sechs im *Score* enthaltenen chronischen Vorerkrankungen wie beispielsweise einer hepatischen Insuffizienz oder chronischen Hypoxie, kann eine Prognose zur Überlebenschance des einzelnen Patienten getroffen werden. Je schwerer der Erkrankungsgrad, je älter der Patient und je mehr chronische Erkrankungen vorliegen, desto höher der resultierende Punktestand und entsprechend die Mortalität (Knaus et al. 1981; Knaus et al. 1985). Die signifikanten p-Werte sowie $HRs > 1$ bestätigen, dass auch im untersuchten Patientenkollektiv ein steigender APACHE II *Score* mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da sowohl das steigende Patientenalter, die Anzahl an Komorbiditäten sowie der Grad der Organdysfunktion, einzeln und in Summe das Mortalitätsrisiko erhöhen (Alberti et al. 2003; Shankar-Hari et al. 2016b; Caraballo und Jaimes 2019). Zu Sepsisbeginn ergab sich im Patientenkollektiv ein zum physiologischen Normalzustand erhöhter APACHE II *Score* von 22 ± 7 . Allerdings zeigten sich keine relevanten Differenzen zwischen den Genotypen der untersuchten SNPs. Wie schon beim SOFA *Score* überlegt, kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Überlebensrate der TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Homozygoten durch eine veränderte Immunantwort im Verlauf der Erkrankung zustande kommt. SOFA und APACHE II *Score* sind unabhängige Prädiktoren zur Einschätzung des Mortalitätsrisikos hospitalisierter septischer Patienten. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss des SOFA *Scores* bezüglich einer erhöhten 28- und 90-Tage-Mortalität, wohingegen der APACHE II *Score* nur in Bezug auf die 90-Tage-Mortalität einen fördernden Einfluss aufwies. Möglicherweise beeinflusst der durch den SOFA *Score* abgeschätzte Grad der Organdysfunktion sowohl die Kurz-, als auch Langzeitmortalität, während sich der APACHE II *Score* v. a. zur Abschätzung der Langzeitmortalität eignet. Ferner haben die im APACHE II *Score* enthaltenen chronischen Vorerkrankungen und die Dringlichkeit einer Operation evtl. einen überwiegenden Einfluss auf ein verzögertes Versterben. Genetische Varianten werden in beiden *Scores* nicht berücksichtigt. Ein Klassifizierungssystem mit Berücksichtigung des genetischen Phänotyps könnte eine noch präzisere Vorhersage bzgl. des Überlebens septischer Patienten ermöglichen.

Zuletzt konnte in den multivariaten Cox-Regressionsanalysen ein relevanter Einfluss des BMIs auf die 28-Tage-Mortalität beobachtet werden. Die für alle vier untersuchten SNPs signifikanten p-Werte sowie $HRs < 1$ legen eine negative Auswirkung eines erhöhten BMIs auf die 28-Tage-Mortalität dar. Anders ausgedrückt, ein erhöhter BMI wirkt sich in den ersten 28 Tagen nach Sepsisbeginn protektiv auf das Überleben aus. Dieser Zusammenhang zeigte sich ebenfalls in anderen Studien wie in der von Nguyen et al. (2016) und Wang et al.

(2017). In der Kohortenstudie von Nguyen et al. (2016) konnte eine verringerte Mortalität, ein längerer stationärer Aufenthalt sowie damit einhergehend eine kostenintensivere Behandlung für übergewichtige Patienten mit Sepsis in den USA nachgewiesen werden. Die Mortalität adipöser Patienten lag um 16 % unter derjenigen der nicht-adipösen Patienten. Der *Cut-off*-Wert für Adipositas wird bei einem BMI von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ gesetzt. Wang et al. (2017) konnten in ihrer Metaanalyse darlegen, dass übergewichtige, aber nicht adipöse, Patienten mit einem BMI zwischen 25 und 30 kg/m^2 eine verringerte Mortalität während der Sepsis aufweisen. Dieser Überlebensvorteil konnte bei einem BMI < 25 oder $> 30 \text{ kg/m}^2$ nicht mehr beobachtet werden. Beide Studien zeigen, dass ein zum Normalgewicht erhöhter BMI bei Sepsis-Erkrankung einen protektiven Einfluss auf die Mortalität hat. In einer übergreifenden Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe unter Beteiligung der Verfasserin konnte gezeigt werden, dass Übergewicht im septischen Schock sogar zu einer erhöhten 90-Tage-Überlebensrate führen kann und damit die Langzeitmortalität beeinflusst (Mewes et al. 2019b). Dieses Paradoxon wird einerseits durch die mit dem Fettgewebeanteil steigende Energiereserve und andererseits durch die immunregulierende Funktion des Fettgewebes begründet. Aufgrund des Einflusses auf die Sekretion verschiedener Hormone und Immunzellen, kann Fettgewebe über verschiedene, noch nicht gänzlich erforschte Signalwege, zu einem entzündungsgehemmten und eher immunsupprimierten Immunstatus führen (Nguyen et al. 2016; Wang et al. 2019). Im Patientenkollektiv der vorliegenden Studie zeigte sich ein durchschnittlicher BMI von 28 kg/m^2 , der sich zwischen den Genotypen der SNPs nicht unterschied. Da die TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Homozygoten auch nach Adjustierung des BMIs als möglichen Störfaktor eine signifikant erhöhte 28-Tage-Überlebensrate im Vergleich zu den C- bzw. A-Allel-Trägern zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass das Vorliegen des AA- bzw. CC-Genotypen unabhängig vom relevanten Einfluss des BMIs signifikante Auswirkungen auf die Immunantwort septischer Patienten hat. Die erzielten Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalysen spiegeln die Resultate gegenwärtiger Forschung wider. Insbesondere die Zusammenhänge des zunehmenden Alters, des steigenden SOFA bzw. APACHE II *Scores* kontinuierlich zur Mortalität bzw. des BMIs als protektiven Faktor bei Sepsis-Erkrankung stehen im Einklang mit aktueller Literatur (Shankar-Hari et al. 2016b; Wang et al. 2017; Caraballo und Jaimes 2019) und unterstreichen das Hauptergebnis dieser Dissertation. Der signifikante Einfluss der TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Genotypen auf die 28-Tage-Mortalität blieb im Zusammenspiel mit möglichen Störfaktoren bestehen und verdeutlicht seine klinische Relevanz.

4.3 Mögliche Limitationen

Eine mögliche Limitation könnte das monozentrische Studiendesign aus ausschließlich kaukasischen Patienten darstellen. Um globale Aussagen treffen zu können, müssten weitere Ethnien in die Studie aufgenommen werden. Zudem stammen alle septischen Patienten von chirurgischen Intensivstationen, sodass jene von internistischen oder neurologischen Intensivstationen nicht berücksichtigt werden. Beispielsweise konnten Yaghoobi et al. (2016) einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem TIM-3 rs10515746 CC-Genotypen und der Multiplen Sklerose nachweisen. Da die Multiple Sklerose zum fachspezifischen Krankheitsbild der Neurologie gehört, trat dieses Krankheitsbild in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv nicht bzw. nur am Rande auf. Ein möglicher Zusammenhang der TIM-3 rs10515746 CC-Genotypen mit Multipler Sklerose konnte weder bestätigt noch widerlegt werden. In Hinblick auf aktuelle Forschungsergebnisse zu TIM-3 und Multiple Sklerose oder LAG-3 und Morbus Parkinson (siehe Kapitel 1.3) wäre es interessant, Intensivstationen weiterer Fachdisziplinen in eine weiterführende Studie aufzunehmen. Ferner zeigte sich, dass die LAG-3 rs951818 AA-Homozygoten in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse nach 28 Tagen eine erhöhte Überlebensrate aufwiesen, welche in der Cox-Regressionsanalyse jedoch nicht bestehen konnte. In diesem Fall haben vermutlich andere Faktoren, wie beispielsweise das Alter, einen stärkeren Einfluss. Auch unter Hinzunahme von Störfaktoren blieben die p-Werte der TIM-3 SNPs signifikant und unterstreichen damit die Relevanz des TIM-3 rs1036199 AA- bzw. rs10515746 CC-Genotypen während der Sepsis. Es sei daran erinnert, dass sich die Definition und Diagnosekriterien für das Vorliegen einer Sepsis im Jahr 2016 mit Einführung der Sepsis-3 Definition änderten. Vor diesem Hintergrund wurden, um eine korrekte Interpretation der Ergebnisse zu garantieren, die multivariaten Cox-Regressionsanalysen um den Punkt „Sepsis-Kriterien nach Sepsis-3 Definition“ erweitert. Da hierbei durchgehend nicht-signifikante p-Werte resultierten und die TIM-3 rs1036199 AA- bzw. rs10515746 CC-Homozygoten in Bezug auf die 28-Tage-Mortalität weiterhin signifikant blieben, konnte dieser eventuelle Störfaktor berücksichtigt werden. Der Definitionswechsel veränderte das Hauptergebnis nicht. Das prospektive Studiendesign, das große und homogene Patientenkollektiv sowie die Vielzahl an analysierten klinischen Parametern ermöglichten eine präzise Datenanalyse und Einordnung der Ergebnisse in den Kontext aktueller Forschung.

4.4 Fazit und Ausblick

Jährlich versterben weiterhin Millionen von Menschen an der Sepsis bzw. ihren Folgen, sodass es von hoher internationaler Bedeutung ist, die Pathophysiologie dieses lebensbedrohlichen Krankheitsbildes zu erforschen und dessen Diagnostik und Therapie zu verbessern (Rudd et al. 2020; van der Poll et al. 2021). Negativ-kostimulierende T-Zell-Inhibitoren wie TIM-3 und LAG-3 verhindern eine überschießende Immunreaktion während der Sepsis. Sie sorgen für ein balanciertes Gleichgewicht zwischen Immunkompetenz und -suppression (Hotchkiss et al. 2013; Joller und Kuchroo 2017). Die klinische Relevanz funktioneller Varianten konnte in übergreifenden Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe bereits für andere T-Zell-Inhibitoren wie z. B. PD-1 und CTLA-4 nachgewiesen werden (Mansur et al. 2014; Mewes et al. 2019a). Nach bestem Wissen weist die vorliegende Studie erstmalig einen signifikanten Einfluss des TIM-3 rs1036199 und rs10515746 SNPs auf die 28-Tage-Mortalität septischer Patienten sowie ihre Anfälligkeit für Infektionen mit grampositiven Erregern nach. Für LAG-3 rs951818 zeigte sich eine signifikante Differenz bzgl. der 28-Tage-Überlebensrate in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse. Da dieses Ergebnis in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse nicht reproduzierbar war, sind weitere Untersuchungen hinsichtlich bislang unbekannter Störfaktoren sowie der genauen pathophysiologischen Funktion des LAG-3-Proteins notwendig. Die TIM-3 rs1036199 AA- bzw. rs10515746 CC-Homozygoten zeigten hingegen auch unter Hinzunahme möglicher Störfaktoren eine signifikant erniedrigte 28-Tage-Mortalität auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Vorliegen dieser genetischen Varianten zu einer relevanten Veränderung des TIM-3-Proteins bzw. seiner Expression führt, welche die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Immunhomöostase während der Sepsis positiv beeinflusst. In den letzten Jahren hat man damit begonnen sich die Funktion negativ-kostimulierender T-Zell-Inhibitoren im Rahmen verschiedener Erkrankungen sowie deren Therapie zunutze zu machen. Zunächst geschah dies bei Autoimmunerkrankungen, dann im Kontext von Tumoren und mittlerweile bei der Sepsis (Okamura et al. 2018; Angelopoulou et al. 2020; McBride et al. 2021). Die hier untersuchten SNPs könnten zukünftig bei der Identifikation sogenannter Hochrisikopatienten anhand ihres genetischen Profils helfen und ferner zu einer generell verbesserten Prognose des Krankheitsverlaufs bei Sepsis führen. Ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen der TIM-3- und LAG-3-Proteine sowie spezieller genetischer Varianten könnte speziell bei septischen Patienten den Weg zu präziser Diagnostik und innovativen Therapieansätzen im Sinne der personalisierten Medizin ebnen.

5 Zusammenfassung

Bis heute versterben jährlich Millionen Menschen weltweit an einer Sepsis. Gemäß der aktuellen Sepsis-3 Definition ist die dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion der lebensbedrohliche Faktor, welche bei zu später Diagnose bzw. fehlender oder falscher Therapie zum multiplen Organversagen und schließlich zum Tode führt. Zur Diagnosestellung wird der Anstieg um mehr als zwei Punkte im *Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment (SOFA) Score* verwendet. Die dysregulierte Immunantwort beinhaltet sowohl eine überschießende als auch eine immunsupprimierte Immunreaktion. Dabei ist die Inzidenz abhängig von erreger- und wirtsspezifischen Faktoren, wobei letztere auch genetische Merkmale beinhalten. Hier kommen die ko-stimulierenden T-Zell-Inhibitoren wie das *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM-3)* und *lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3)* ins Spiel. Es handelt sich um spezifische Membranproteine, welche sich größtenteils auf der Oberfläche von T-Zellen befinden. Durch Interaktion mit ihren Liganden kommt es zur T-Zell-Inhibition, sodass es zur Wiederherstellung der Immunhomöostase während der Sepsis kommt. *Single nucleotide polymorphisms (SNPs)* beschreiben die Mutation eines einzelnen Basenpaares und machen bis zu 90 % aller interindividuellen genetischen Unterschiede aus. Funktionelle SNPs verändern darüber hinaus das Protein und haben somit Einfluss auf die Inzidenz bzw. den Verlauf bestimmter Erkrankungen. Die funktionellen SNPs TIM-3 rs1036199 und rs10515746 bzw. LAG-3 rs870849 und rs951818 korrelieren mit einer erhöhten Inzidenz für Autoimmunerkrankungen.

Zentrale Fragestellung dieser Dissertation ist, ob die genannten SNPs das *Outcome* der Sepsis beeinflussen. Insgesamt konnten 712 intensivmedizinisch betreute, kaukasische Patienten nach erfolgter Einwilligung in die Studie aufgenommen und ihre DNA aus den entnommenen Blutproben extrahiert und genotypisiert werden. Dabei betrug die Zahl erfolgreich genotypisierter Patienten bei den TIM-3 SNPs 712 bzw. 707 bei den LAG-3 SNPs. Unter Verwendung eines studieneigenen *clinical report forms* wurden alle Patienten max. 28 Tage klinisch beobachtet und ihr Überleben 90 Tage nach Sepsisbeginn kontrolliert. In den Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen zeigten sich signifikante Differenzen zwischen den Genotypen. 28 Tage nach Sepsisbeginn lebten bei TIM-3 rs1036199 mit 82 % signifikant mehr AA-Homozygote als C-Allel-Träger mit 73 % ($p = 0,0099$). Parallel dazu zeigten auch die TIM-3 rs10515746 CC-Homozygoten ein signifikant erhöhtes Überleben (82 % vs. 74 %, $p = 0,0202$). Ferner resultierte bei LAG-3 rs951818 eine relevant erhöhte Überlebensrate der AA-Homozygoten mit 83 % verglichen mit jener der C-Allel-Träger von 76 % ($p = 0,0476$).

Da es sich bei der Sepsis um ein multifaktorielles Erkrankungsbild handelt, wurde der Einfluss verschiedener Störfaktoren wie z. B. Alter und Geschlecht mit Durchführung der multivariaten Cox-Regressionsanalyse berücksichtigt. Hierbei konnte in Einklang mit aktueller Literatur bestätigt werden, dass sowohl das zunehmende Alter als auch ein erhöhter SOFA bzw. APACHE II *Score* unabhängige Prädiktoren für eine ansteigende Mortalität bei Sepsis-Erkrankung sind. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass ein erhöhter BMI mit einem

erhöhten Überleben in den ersten 28 Tagen nach Sepsisbeginn einhergeht. In der vorliegenden Dissertation konnte der signifikante Einfluss des TIM-3 rs1036199 AA- und rs10515746 CC-Genotypen auf eine verringerte 28-Tage-Mortalität in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse nachgewiesen werden ($p = 0,0175$, HR = 0,6703; $p = 0,0310$, HR = 0,6958). Die klinische Relevanz wird durch die bestehende Signifikanz sowohl in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse als auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse unterstrichen. Möglicherweise führen die funktionellen SNPs zu einer veränderten Liganden-Interaktion, wodurch es zu einer erhöhten T-Zell- und Makrophagen-Aktivität kommt. Anhand der erzielten Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass das Vorliegen des TIM-3 rs1036199 AA- bzw. rs10515746 CC-Genotypen zu einer verbesserten Immunhomöostase und damit einer erhöhten Überlebensrate unabhängig von weiteren relevanten Faktoren während der Sepsis führt. Während der ersten 28 Tage zeigte sich ferner, dass die LAG-3 rs870849 T-Allel-Träger und die LAG-3 rs951818 AA-homozygoten Patienten öfter beatmungspflichtig wurden. Zusätzlich wiesen die LAG-3 rs870849 T-Allel-Trägern eine verbesserte Nierenfunktion gemessen an den erniedrigten Kreatininwerte auf.

Bis dato fehlen Studien zu den untersuchten LAG-3 SNPs und ihrer Relevanz beim Krankheitsverlauf der Sepsis-Erkrankung. Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass genetische Varianten ein unterschiedliches Maß an organunterstützender Therapie während der Sepsis benötigen, die genauen Mechanismen bzw. Konsequenzen müssen jedoch in zukünftigen Studien untersucht werden. Interessanterweise zeigte sich, dass die TIM-3 rs1036199 AA-Homozygoten trotz erhöhter Überlebensrate vermehrt Infektionen mit grampositiven Bakterien und im Speziellen mit *Staph. epidermidis* aufwiesen ($p = 0,0445$, $p = 0,0295$). Parallel dazu konnten auch bei Vorliegen der TIM-3 rs10515746 CC-Homozygoten mehr Infektionen mit *Staph. epidermidis* nachgewiesen werden ($p = 0,0313$). *Staph. epidermidis* ist Hauptverursacher der nosokomial erworbenen Sepsis. Dass es trotz vermehrter Infektionen zu einer verringerten 28-Tage-Mortalität kommt, unterstützt die Vermutung, dass das Vorliegen des TIM-3 rs1036199 AA- bzw. rs10515746 CC-Genotypen das TIM-3-Protein und seine Expression entscheidend verändert, sodass es zu einer schnelleren Wiederherstellung der Immunhomöostase und dadurch zur erhöhten Überlebensrate kommt.

Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass genetische Varianten der ko-stimulierenden T-Zell-Inhibitoren TIM-3 und LAG-3 das *Outcome* der Sepsis relevant beeinflussen. Weiterführende Forschung zu den pathophysiologischen Mechanismen könnte der Schlüssel zur frühzeitigen Identifizierung von Risikopatienten und einer mehr als bisher auf den einzelnen Patienten zugeschnittenen Therapie bei der Sepsis sein.

6 Anhang

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Anhang 1: Patienteneinschluss - täglich erhobener SOFA Score zur Identifizierung septischer Patienten

Patientennummer:

Tag 1 ICU – Beginn Sepsis

durch: _____

Datum: = Beginn Sepsis
 Von : Uhr bis 23:59 Uhr

SOFA
 APACHE II

Temperatur (°C) Höchste 3 ,
 Hämoglobin (g/dl) ,
 Hämatokrit (%) ,
 Erythrozytenzahl (10⁶/μl) ,
 Thrombozytenzahl (10³/mm³)
 Leukozytenzahl (10³/mm³)

Niedrigste 3

Herz-Kreislaufsystem

Herzfrequenz (min⁻¹) Höchste
 Systolischer Blutdruck (mmHg) Höchster
 Mittlerer Blutdruck (mmHg) Höchster
 Adrenalin (μg/min) Höchste Dosis ,
 Noradrenalin (μg/min) Höchste Dosis ,
 Dobutamin (μg/kg/min) Höchste Dosis ,

Niedrigste
 Niedrigster
 Niedrigster

Atmung / Säure-Basen Haushalt

Atemfrequenz (min⁻¹) Höchste
 PaO₂ (mmHg)
 Entsprechender PaCO₂ (mmHg)
 Entsprechende FIO₂
 Beatmung* Ja Nein

Niedrigste
 Niedrigste
 (O₂-Flow l) 0,

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

ECMO Ja Nein

BGA

Arterieller pH Höchster 7,
 Kalium (mmol/l) Höchster
 Natrium (mmol/l) Höchster 1
 Laktat (mmol/l) Höchster ,
 Base Excess Höchster ,
 Glucose (mg/dl) Mittelwert
 Insulin ja nein

Niedrigster 7,
 Niedrigster
 Niedrigster 1
 Niedrigster ,
 Niedrigster ,

Leber

Bilirubin (mg/dl) ,
 AST / ALT (IU/l) AST
 Quick (%) / aPTT (sec) Quick
 Systemische Antikoagulation Ja Nein

ALT
 aPTT

Niere

Kreatinin (mg/dl) ,
 Urinausscheidung (ml) / 24 h
 Dialyse* Ja Nein

Entzündungswerte
 CRP (mg/l)
 Procalcitonin (μg/l)

*CVVHF, Hämodialyse, Peritonealdialyse

ZNS Glasgow Coma Scale Höchster

Visite kontrolliert
 Eingabe kontrolliert

Anhang 2: CRF - Beispiel für die täglich erfassten Parameter während des intensivmedizinischen Aufenthaltes

7 Literaturverzeichnis

- Abrams ST, Morton B, Alhamdi Y, Alsabani M, Lane S, Welters ID, Wang G, Toh CH (2019): A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Trap Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 200, 869–880
- Adelman MW, Woodworth MH, Langelier C, Busch LM, Kempker JA, Kraft CS, Martin GS (2020): The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis. *Crit Care* 24, 278
- Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall JR (2003): Influence of Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis on Outcome of Critically Ill Infected Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 77–84
- Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA (2017): LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev* 276, 80–96
- Angelopoulou E, Paudel YN, Villa C, Shaikh MohdF, Piperi C (2020): Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) Protein as a Possible Therapeutic Target for Parkinson's Disease: Molecular Mechanisms Connecting Neuroinflammation to α -Synuclein Spreading Pathology. *Biology (Basel)* 9, 86
- Angus DC, van der Poll T (2013): Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 369, 840–851
- Angus DC, Bindman AB (2022): Achieving Diagnostic Excellence for Sepsis. *JAMA* 327, 117–118
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29, 1303–1310
- Armbrecht M (2013): Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. Eppendorf AG Application Note, 6
- Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, Donnelly P, Eichler EE et al. (2015): A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68–74
- Avery L, Filderman J, Szymczak-Workman AL, Kane LP (2018): Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 2455–2460
- Banerjee H, Kane LP (2018): Immune regulation by Tim-3. *F1000Res* 7, 1–9
- Bianchi ME (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1–5
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644–1655

- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, Kreisel D, Krupnick AS et al. (2011): Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA* 306, 2594–2605
- Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM (2012): A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 16, R112
- Buchman TG, Simpson SQ, Sciarretta KL, Finne KP, Sowers N, Collier M, Chavan S, Oke I, Pennini ME, Santhosh A, et al. (2020): Sepsis Among Medicare Beneficiaries: 1. The Burdens of Sepsis, 2012–2018. *Crit Care Med* 48, 276–288
- Candel FJ, Borges Sá M, Belda S, Bou G, Del Pozo JL, Estrada O, Ferrer R, González del Castillo J, Julián-Jiménez A, Martín-Loeches I, et al. (2018): Current aspects in sepsis approach. Turning things around. *Rev Esp Quimioter* 31, 298–315
- Caraballo C, Jaimes F (2019): Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death. *Yale J Biol Med* 92, 629–640
- Carrasco-Ramiro F, Peiró-Pastor R, Aguado B (2017): Human genomics projects and precision medicine. *Gene Ther* 24, 551–561
- Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL (2011): Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* 6, 273–283
- Chang DW, Tseng C-H, Shapiro MF (2015): Rehospitalizations Following Sepsis: Common and Costly. *Crit Care Med* 43, 2085–2093
- Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Fujioka Y, Ohba Y, Gorman JV, Colgan JD et al. (2012): Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* 13, 832–842
- Chocarro L, Blanco E, Zuazo M, Arasanz H, Bocanegra A, Fernández-Rubio L, Morente P, Fernández-Hinojal G, Echaide M, Garnica M, et al. (2021): Understanding LAG-3 Signaling. *Int J Mol Sci* 22, 5282
- Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM (2002): Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Dtsch Arztebl* 46, 3091–3101
- Clayton KL, Haaland MS, Douglas-Vail MB, Mujib S, Chew GM, Ndhlovu LC, Ostrowski MA (2014): T Cell Ig and Mucin Domain–Containing Protein 3 Is Recruited to the Immune Synapse, Disrupts Stable Synapse Formation, and Associates with Receptor Phosphatases. *J Immunol* 192, 782–791
- Clayton KL, Douglas-Vail MB, Rahman AKMN, Medcalf KE, Xie IY, Chew GM, Tandon R, Lanteri MC, Norris PJ, Deeks SG et al. (2015): Soluble T Cell Immunoglobulin Mucin Domain 3 Is Shed from CD8+ T Cells by the Sheddase ADAM10, Is Increased in Plasma during Untreated HIV Infection, and Correlates with HIV Disease Progression. *J Virol* 89, 3723–3736
- Cohen J, Opal S, Calandra T (2012): Sepsis studies need new direction. *Lancet Infect Dis* 12, 503–505

- Cook KD, Whitmire JK (2016): LAG-3 confers a competitive disadvantage upon antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol* 197, 119–127
- Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ (2010): The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 115, 1121–1130
- David VL, Ercisli MF, Rogobete AF, Boia ES, Horhat R, Nitu R, Diaconu MM, Pirtea L, Ciuca I, Horhat D, et al. (2016): Early Prediction of Sepsis Incidence in Critically Ill Patients Using Specific Genetic Polymorphisms. *Biochem Genet* 55, 193–203
- Davidson D, Schraven B, Veillette A (2007): PAG-Associated FynT Regulates Calcium Signaling and Promotes Anergy in T Lymphocytes. *Mol Cell Biol* 27, 1960–1973
- dbSNP rs870849 - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs870849>; abgerufen am 09.04.2022
- dbSNP rs951818 - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs951818>; abgerufen am 09.04.2022
- dbSNP rs1036199 - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1036199>; abgerufen am 09.04.2022
- dbSNP rs10515746 - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs10515746>; abgerufen am 09.04.2022
- de Grooth H-J, Geenen IL, Girbes AR, Vincent J-L, Parienti J-J, Oudemans-van Straaten HM (2017): SOFA and mortality endpoints in randomized controlled trials: a systematic review and meta-regression analysis. *Crit Care* 21, 38
- DeKruyff RH, Bu X, Ballesteros A, Santiago C, Chim Y-LE, Lee H-H, Karisola P, Pichavant M, Kaplan GG, Umetsu DT et al. (2010): T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 Allelic Variants Differentially Recognize Phosphatidylserine and Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J Immunol* 184, 1918–1930
- Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. <https://www.sepsis-gesellschaft.de/hintergrund/>; abgerufen am 09.04.2022
- Dong Y, Speer CP (2014): The role of Staphylococcus epidermidis in neonatal sepsis: Guarding angel or pathogenic devil? *Int J Med Microbiol* 304, 513–520
- Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, Machado FR, Mcintyre L, Ostermann M, Prescott HC et al. (2021): Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 47, 1181–1247
- Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS (2001): Dysfunction of Endothelial Protein C Activation in Severe Meningococcal Sepsis. *N Engl J Med* 345, 408–416
- Fernando SM, Tran A, Taljaard M, Cheng W, Rochweg B, Seely AJE, Perry JJ (2018): Prognostic Accuracy of the Quick Sequential Organ Failure Assessment for Mortality in Patients With Suspected Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med* 168, 266–276

- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K (2015): Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193, 259–272
- Fleischmann C, Thomas–Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K (2016): Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 113, 159–166
- Fleischmann-Struzek C, Mikolajetz A, Schwarzkopf D, Cohen J, Hartog CS, Pletz M, Gastmeier P, Reinhart K (2018): Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med* 44, 1826–1835
- Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A (2009): Sepsis and Septic Shock: A History. *Crit Care Clin* 25, 83–101
- Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, Herbert DR, Bulfone A, Trentini F, et al. (2013): Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 19, 739–746
- Gao X, Zhu Y, Li G, Huang H, Zhang G, Wang F, Sun J, Yang Q, Zhang X, Lu B (2012): TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. *PLoS One* 7, e30676
- Gleason MK, Lenvik TR, McCullar V, Felices M, O'Brien MS, Cooley SA, Verneris MR, Cichocki F, Holman CJ, Panoskaltsis-Mortari A, et al. (2012): Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood* 119, 3064–3072
- Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H (2012): 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 9, 13–24
- Golden D, Kolmakova A, Sura S, Vella AT, Manichaikul A, Wang XQ, Bielinski SJ, Taylor KD, Chen YDI, Rich SS, Rodriguez A (2016): Lymphocyte activation gene 3 and coronary artery disease. *JCI Insight* 1, 1–15
- Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL (2011): Broken Barriers: A New Take on Sepsis Pathogenesis. *Sci Transl Med* 3, 1–6
- Graydon CG, Balasko AL, Fowke KR (2019): Roles, function and relevance of LAG3 in HIV infection. *PLoS Pathog* 15, e1007429
- Guo W, Zhou M, Qiu J, Lin Y, Chen X, Huang S, Mo M, Liu H, Peng G, Zhu X, Xu P (2019): Association of LAG3 genetic variation with an increased risk of PD in Chinese female population. *J Neuroinflammation* 16, 270
- Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F (1998): CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling. *J Immunol* 161, 4058–4065
- He Y, Rivard CJ, Rozeboom L, Yu H, Ellison K, Kowalewski A, Zhou C, Hirsch FR (2016): Lymphocyte-activation gene-3, an important immune checkpoint in cancer. *Cancer Sci* 107, 1193–1197

- Herrmann M, Schulte S, Wildner NH, Wittner M, Brehm TT, Ramharter M, Woost R, Lohse AW, Jacobs T, Schulze zur Wiesch J (2020): Analysis of Co-inhibitory Receptor Expression in COVID-19 Infection Compared to Acute Plasmodium falciparum Malaria: LAG-3 and TIM-3 Correlate With T Cell Activation and Course of Disease. *Front Immunol* 11, 1870
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (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 RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE (1999): Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27, 1230–1251
- Hotchkiss RS, 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 S, Liu X, Li T, Li Z, Hu F (2020): LAG3 (CD223) and autoimmunity: Emerging evidence. *J Autoimmun* 112, 102504
- Huang YH, Zhu C, Kondo Y, Anderson AC, Gandhi A, Russell A, Dougan SK, Petersen BS, Melum E, Pertel T, et al. (2015): CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* 517, 386–390
- Huard B, Gaulard P, Faure F, Hercend T, Triebel F (1994): Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics* 39, 213–217
- Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, Bruniquel D, Donini S, El-Tayar N, Maigret B, Dréano M, Triebel F (1997): Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5744–5749
- Iba T, Watanabe E, Umemura Y, Wada T, Hayashida K, Kushimoto S, Wada H, Japanese Surviving Sepsis Campaign Guideline Working Group for disseminated intravascular coagulation (2019): Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and its differential diagnoses. *J Intensive Care* 7, 32
- Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, Hernandez G, Murray P, De Backer D (2016): The Endothelium in Sepsis. *Shock* 45, 259–270
- Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Beladi S, Anderson AC, Dardalhon V, Hotta C, Kuchroo VK, Behar SM (2010): Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med* 207, 2343–2354
- Joller N, Kuchroo VK (2017): Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol* 410, 127–156
- Kim J, Lee J, Gonzalez J, Fuentes-Duculan J, Garcet S, Krueger JG (2018): Proportion of CD4+CD49b+LAG-3+ Type 1 Regulatory T Cells in the Blood of Psoriasis Patients Inversely Correlates with Psoriasis Area and Severity Index. *J Invest Dermatol* 138, 2669–2672
- Kisielow M, Kisielow J, Capoferri-Sollami G, Karjalainen K (2005): Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol* 35, 2081–2088

- Kleinschmidt S, Huygens F, Faoagali J, Rathnayake IU, Hafner LM (2015): Staphylococcus epidermidis as a cause of bacteremia. *Future Microbiol* 10, 1859–1879
- Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE (1981): APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 9, 591–597
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985): APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13, 818–829
- Kouo T, Huang L, Pucsek AB, Cao M, Solt S, Armstrong T, Jaffee E (2015): Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8+ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol Res* 3, 412–423
- Lecocq Q, Keyaerts M, Devoogdt N, Breckpot K (2021): The Next-Generation Immune Checkpoint LAG-3 and Its Therapeutic Potential in Oncology: Third Time's a Charm. *Int J Mol Sci* 22, 75
- Lee J, Phong B, Egloff AM, Kane LP (2011): TIM polymorphisms - genetics and function. *Genes Immun* 12, 595–604
- Levi M, van der Poll T (2010): Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 38, 26–34
- Levi M, van der Poll T, ten Cate H (2006): Tissue Factor in Infection and Severe Inflammation. *Semin Thromb Hemost* 32, 33–39
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference: *Crit Care Med* 31, 1250–1256
- Levy MM, Evans LE, Rhodes A (2018): The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med* 44, 925–928
- Li YM, Li Y, Yan L, Tang JT, Wu XJ, Bai YJ, An YF, Dai B, Yang CL, Wang LL, Shi YY (2019): Assessment of serum Tim-3 and Gal-9 levels in predicting the risk of infection after kidney transplantation. *Int Immunopharmacol* 75, 105803
- Li Z, Ju Z, Frieri M (2013): The T-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim) gene family in asthma, allergy, and autoimmunity. *Allergy Asthma Proc* 34, 21–26
- Liese BW (2018): Der Einfluss des CD14 SNP rs2569190 auf den Krankheitsverlauf von an Sepsis erkrankten Patienten. *Med Diss Göttingen*
- Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, Gibran NS, Huang ML, Santo TK, Corey L, Boeckh M (2008): Cytomegalovirus Reactivation in Critically-Ill Immunocompetent Patients. *JAMA* 300, 413–422
- Liu R, Wang X, Chen X, Wang S, Zhang H (2018): TIM-3 rs1036199 polymorphism increases susceptibility to autoimmune diseases: evidence based on 4200 subjects. *Biosci Rep* 38, BSR20181235

- Liu Z, Meng Z, Li Y, Zhao J, Wu S, Gou S, Wu H (2019): Prognostic accuracy of the serum lactate level, the SOFA score and the qSOFA score for mortality among adults with Sepsis. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 27, 51
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res* 4, 357–362
- Lou JS, Wang JF, Fei MM, Zhang Y, Wang J, Guo Y, Bian JJ, Deng XM (2020): Targeting Lymphocyte Activation Gene 3 to Reverse T-Lymphocyte Dysfunction and Improve Survival in Murine Polymicrobial Sepsis. *J Infect Dis* 222, 1051–1061
- Lu H, Wen D, Wang X, Gan L, Du J, Sun J, Zeng L, Jiang J, Zhang A (2019): Host genetic variants in sepsis risk: a field synopsis and meta-analysis. *Crit Care* 23, 1–13
- Maeda TK, Sugiura D, Okazaki I, Maruhashi T, Okazaki T (2019): Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. *J Biol Chem* 294, 6017–6026
- 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
- Marshall J (2014a): The PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) model. *Virulence* 5, 27–35
- Marshall J (2014b): Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med* 20, 195–203
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348, 1546–1554
- Maruhashi T, Okazaki I-M, Sugiura D, Takahashi S, Maeda TK, Shimizu K, Okazaki T (2018): LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat Immunol* 19, 1415–1426
- Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki I, Okazaki T (2020): LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer* 8, e001014
- Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, et al. (2001): CD antigens 2001. *J Leukoc Biol* 70, 685–690
- McBride MA, Patil TK, Bohannon JK, Hernandez A, Sherwood ER, Patil NK (2021): Immune Checkpoints: Novel Therapeutic Targets to Attenuate Sepsis-Induced Immunosuppression. *Front Immunol* 11, 624272
- McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahan BJ, Kemper M, Allen TM, Gretch DR, Rosen HR (2010): Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 120, 4546–4557
- Mewes C, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Tzvetkov M, Jensen O, Runzheimer J, et al. (2019a): CTLA-4 Genetic Variants Predict Survival in Patients with Sepsis. *J Clin Med* 8, 70

- Mewes C, Böhnke C, Alexander T, Büttner B, Hinz J, Popov AF, Ghadimi M, Beißbarth T, Raddatz D, Meissner K, et al. (2019b): Favorable 90-Day Mortality in Obese Caucasian Patients with Septic Shock According to the Sepsis-3 Definition. *J Clin Med* **2**, 46
- Mewes C, Alexander T, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Ghadimi M, Beißbarth T, Tzvetkov M, Grade M, et al. (2020): TIM-3 Genetic Variants Are Associated with Altered Clinical Outcome and Susceptibility to Gram-Positive Infections in Patients with Sepsis. *Int J Mol Sci* **21**, 8318
- Mewes C, Alexander T, Büttner B, Hinz J, Alpert A, Popov AF, Beißbarth T, Tzvetkov M, Grade M, Quintel M, et al. (2021): Effect of the Lymphocyte Activation Gene 3 Polymorphism rs951818 on Mortality and Disease Progression in Patients with Sepsis - A Prospective Genetic Association Study. *J Clin Med* **10**, 5302
- Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA et al. (2002): Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–541
- 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 K, Weaver C: *Janeway Immunologie*. 9. Auflage; Springer-Verlag GmbH Deutschland, Heidelberg 2018
- Nakachi S, Sumitomo S, Tsuchida Y, Tsuchiya H, Kono M, Kato R, Sakurai K, Hanata N, Nagafuchi Y, Tateishi S, et al. (2017): Interleukin-10-producing LAG3+ regulatory T cells are associated with disease activity and abatacept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **19**, 97
- Nguyen AT, Tsai CL, Hwang LY, Lai D, Markham C, Patel B (2016): Obesity and Mortality, Length of Stay and Hospital Cost among Patients with Sepsis: A Nationwide Inpatient Retrospective Cohort Study. *PLoS One* **11**, e0154599
- Nguyen TH, Park MD, Otto M (2017): Host Response to Staphylococcus epidermidis Colonization and Infections. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 90
- Niu B, Zhou F, Su Y, Wang L, Xu Y, Yi Z, Wu Y, Du H, Ren G (2019): Different Expression Characteristics of LAG3 and PD-1 in Sepsis and Their Synergistic Effect on T Cell Exhaustion: A New Strategy for Immune Checkpoint Blockade. *Front Immunol* **10**, 1888
- Okamura T, Yamamoto K, Fujio K (2018): Early Growth Response Gene 2-Expressing CD4+LAG3+ Regulatory T Cells: The Therapeutic Potential for Treating Autoimmune Diseases. *Front Immunol* **9**, 340
- Ong DSY, Bonten MJM, Spitoni C, Verduyn Lunel FM, Frencken JF, Horn J, Schultz MJ, van der Poll T, Klein Klouwenberg PMC, Cremer OL, Molecular Diagnosis and Risk Stratification of Sepsis Consortium (2017): Epidemiology of Multiple Herpes Viremia in Previously Immunocompetent Patients With Septic Shock. *Clin Infect Dis* **64**, 1204–1210

- Opal SM, van der Poll T (2015): Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med* 277, 277–293
- Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC (2011): The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 15, R183
- Otto M (2017): Staphylococcus epidermidis: a major player in bacterial sepsis? *Future Microbiol* 12, 1031–1033
- Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E (2018): Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States - An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. *Crit Care Med* 46, 1889–1897
- Peters van Ton AM, Kox M, Abdo WF, Pickkers P (2018): Precision Immunotherapy for Sepsis. *Front Immunol* 9, 1926
- Phillips BL, Mehra S, Ahsan MH, Selman M, Khader SA, Kaushal D (2015): LAG3 Expression in Active Mycobacterium tuberculosis Infections. *Am J Pathol* 185, 820–833
- Phillips BL, Gautam US, Bucsan AN, Foreman TW, Golden NA, Niu T, Kaushal D, Mehra S (2017): LAG-3 potentiates the survival of Mycobacterium tuberculosis in host phagocytes by modulating mitochondrial signaling in an in-vitro granuloma model. *PLoS One* 12, e0180413
- Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Karman J, Chen A, Angin M, Wakeham A, Greenfield EA, Sobel RA et al. (2012): Bat3 Protects T cell Responses by Repressing Tim-3-Mediated Exhaustion and Death. *Nat Med* 18, 1394–1400
- Razi B, Reykandeh SE, Alizadeh S, Amirzargar A, Saghazadeh A, Rezaei N (2019): TIM family gene polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 14, e0211146
- Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S (2017): Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 377, 414–417
- Richter K, Agnellini P, Oxenius A (2010): On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol* 22, 13–23
- Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W (2002): Activation of Endothelial Cell Protease Activated Receptor 1 by the Protein C Pathway. *Science* 296, 1880–1882
- Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, et al. (2011): Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* 334, 98–101
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, et al. (2020): Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 395, 200–211
- Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, et al. (2016): Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. *JAMA* 315, 762–774

- Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M (2016a): Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. *JAMA* 315, 775–787
- Shankar-Hari M, Ambler M, Mahalingasivam V, Jones A, Rowan K, Rubenfeld GD (2016b): Evidence for a causal link between sepsis and long-term mortality: a systematic review of epidemiologic studies. *Crit Care* 20, 101
- Shi F, Guo X, Jiang X, Zhou P, Xiao Y, Zhou T, Chen G, Zhao Z, Xiao H, Hou C, et al. (2012): Dysregulated Tim-3 expression and its correlation with imbalanced CD4 helper T cell function in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 145, 230–240
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810
- Spec A, Shindo Y, Burnham CAD, Wilson S, Ablordeppey EA, Beiter ER, Chang K, Drewry AM, Hotchkiss RS (2016): T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype. *Crit Care* 20, 15
- Stanski NL, Wong HR (2020): Prognostic and predictive enrichment in sepsis. *Nat Rev Nephrol* 16, 20–31
- Sun L, Wu H, Cao SG, Xia XP, Lin XQ, Jin J, Ding R, Jiang Y (2017): Association of Crohn's disease with T cell immunoglobulin and mucin domain 3 gene polymorphisms in Chinese patients. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 56, 667–672
- Takeuchi O, Akira S (2010): Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820
- Tang F, Wang F, An L, Wang X (2015): Upregulation of Tim-3 on CD4+ T cells is associated with Th1/Th2 imbalance in patients with allergic asthma. *Int J Clin Exp Med* 8, 3809–3816
- Teasdale G, Jennett B (1974): Assessment of coma and impaired consciousness. A Practical Scale. *Lancet* 304, 81–84
- Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T (1990): LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 171, 1393–1405
- van der Poll T, Opal SM (2008): Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 8, 32–43
- van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG (2017): The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 17, 407–420
- van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ (2021): The immunology of sepsis. *Immunity* 54, 2450–2464
- Vega-Carrascal I, Bergin DA, McElvaney OJ, McCarthy C, Banville N, Pohl K, Hirashima M, Kuchroo VK, Reeves EP, McElvaney NG (2014): Galectin-9 Signaling through TIM-3 Is Involved in Neutrophil-Mediated Gram-Negative Bacterial Killing: An Effect Abrogated within the Cystic Fibrosis Lung. *J Immunol* 192, 2418–2431

- Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, Plantier N, Pasqual N, Monneret G (2013): Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis: A Preliminary Study. *Crit Care Med* 41, 111–119
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22, 707–710
- Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, 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 JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ (2013): Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381, 774–775
- Vincent JL, Sakr Y, Singer M, Martin-Loeches I, Machado FR, Marshall JC, Finfer S, Pelosi P, Brazzi L, Aditiansih D, et al. (2020): Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* 323, 1478–1487
- Wakeley ME, Gray CC, Monaghan SF, Heffernan DS, Ayala A (2020): Check Point Inhibitors and Their Role In Immunosuppression In Sepsis. *Crit Care Clin* 36, 69–88
- Wang F, Xu J, Liao Y, Wang Y, Liu C, Zhu X, Chen ZK, Sun Z (2011): Tim-3 ligand galectin-9 reduces IL-17 level and accelerates *Klebsiella pneumoniae* infection. *Cell Immunol* 269, 22–28
- Wang J, Li C, Fu J, Wang X, Feng X, Pan X (2019): Tim-3 regulates inflammatory cytokine expression and Th17 cell response induced by monocytes from patients with chronic hepatitis B. *Scand J Immunol* 89, e12755
- Wang M, Ji B, Wang J, Cheng X, Zhou Q, Zhou J, Cao C, Guo Q (2014): Tim-3 Polymorphism Downregulates Gene Expression and Is Involved in the Susceptibility to Ankylosing Spondylitis. *DNA Cell Biol* 33, 723–728
- Wang S, Liu X, Chen Q, Liu C, Huang C, Fang X (2017): The role of increased body mass index in outcomes of sepsis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Anesthesiol* 17, 118
- Wang S, Zhang X, Leng S, Xu Q, Sheng Z, Zhang Y, Yu J, Feng Q, Hou M, Peng J, Hu X (2021): Immune Checkpoint-Related Gene Polymorphisms Are Associated With Primary Immune Thrombocytopenia. *Front Immunol* 11, 615941
- Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T (2014): Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 5, 36–44
- Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK (2020): TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol* 20, 173–185
- Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DAA (2002): Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-3. *J Immunol* 169, 5392–5395

- Workman CJ, Cauley LS, Kim IJ, Blackman MA, Woodland DL, Vignali DAA (2004): Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. *J Immunol* 172, 5450–5455
- Workman CJ, Wang Y, El Kasmi KC, Pardoll DM, Murray PJ, Drake CG, Vignali DAA (2009): LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis. *J Immunol* 182, 1885–1891
- Xia Q, Wei L, Zhang Yuntao, Sheng J, Wu W, Zhang Yi (2018): Immune Checkpoint Receptors Tim-3 and PD-1 Regulate Monocyte and T Lymphocyte Function in Septic Patients. *Mediators Inflamm* 2018, 1632902
- Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z, Du X, Tang L, He F (2014): LSECtin Expressed on Melanoma Cells Promotes Tumor Progression by Inhibiting Antitumor T-cell Responses. *Cancer Res* 74, 3418–3428
- Yaghoobi E, Abedian S, Babani O, Izad M (2016): TIM-3 Rs10515746 (A/C) and Rs10053538 (C/A) Gene Polymorphisms and Risk of Multiple Sclerosis. *Iran J Public Health* 45, 644–649
- Yan J, Zhang Y, Zhang JP, Liang J, Li L, Zheng L (2013): Tim-3 Expression Defines Regulatory T Cells in Human Tumors. *PLoS One* 8, e58006
- Yang L, Anderson DE, Kuchroo J, Hafler DA (2008): Lack of TIM-3 Immunoregulation in Multiple Sclerosis. *J Immunol* 180, 4409–4414
- Yang X, Jiang X, Chen G, Xiao Y, Geng S, Kang C, Zhou T, Li Yurong, Guo X, Xiao H, et al. (2013): T Cell Ig Mucin-3 Promotes Homeostasis of Sepsis by Negatively Regulating the TLR Response. *J Immunol* 190, 2068–2079
- Yi JS, Cox MA, Zajac AJ (2010): T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 129, 474–481
- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010): Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464, 104–107
- Zhang Z, Duvefelt K, Svensson F, Masterman T, Jonasdottir G, Salter H, Emahazion T, Hellgren D, Falk G, Olsson T, et al. (2005): Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis. *Genes Immun* 6, 145–152
- Zhao Z, Jiang X, Kang C, Xiao Y, Hou C, Yu J, Wang R, Xiao H, Zhou T, Wen Z, et al. (2014): Blockade of the T cell immunoglobulin and mucin domain protein 3 pathway exacerbates sepsis-induced immune deviation and immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 178, 279–291
- Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK (2005): The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6, 1245–1252

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung und Vollendung meiner Dissertation unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. Ashham Mansur gilt mein besonderer Dank, ohne den die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Für die Bereitstellung der spannenden Promotions-Thematik, die ausgezeichnete Betreuung und fachliche Unterstützung möchte ich mich von Herzen bedanken.

Herrn PD Dr. med. Marian Grade möchte ich für die Ko-Betreuung und fachkundigen Anregungen danken.

Ein großes Dankeschön gilt außerdem allen Mitwirkenden der Arbeitsgruppe „Personalisierte Medizin“. Hier möchte ich mich insbesondere bei Dr. med. Caspar Mewes, Julius Runzheimer und Carolin Böhnke für die erfolgreiche Zusammenarbeit, kontinuierliche Hilfestellung und schöne Zeit bedanken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller und den Mitarbeitenden des Instituts für Klinische Pharmakologie, in deren Räumlichkeiten die DNA-Extraktion und die Genotypisierung durchgeführt werden durften. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Karolin Jobst und Herrn Dr. rer. nat. Ole Jensen, die mir bei technischen Problemstellungen und fachlichen Fragen stets zur Seite gestanden haben.

Herrn Prof. Dr. med. Uwe Groß möchte ich für seinen Rat bei der Auswertung und Interpretation der mikrobiologischen Analysen danken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Tim Reißbarth und den Mitarbeitenden des Instituts für Medizinische Bioinformatik für die Beratung bei den statistischen Analysen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitarbeitenden der Intensivstationen 0119, 1012 und 1014 für ihre Hilfestellung beim Patienteneinschluss und der Probengewinnung bedanken.