

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

**Assoziation des regulierenden
Polymorphismus rs11536889 im *TLR4*-
Gen mit Organ-spezifischer Morbidität
und Mortalität bei Patienten mit Sepsis**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Luisa von Gruben

aus
Stade

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in Priv.-Doz. Dr. med. A. Mansur
Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel
Drittreferent/in:
Datum der mündlichen Prüfung: 29.09.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Assoziation des regulierenden Polymorphismus rs11536889 im *TLR4*-Gen mit Organ-spezifischer Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Sepsis“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden Publiziert:

Mansur A, von Gruben L, Popov AF, Steinau M, Bergmann I, Ross D, Ghadimi M, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J (2014): The regulatory toll-like receptor 4 genetic polymorphism rs11536889 is associated with renal, coagulation and hepatic organ failure in sepsis patients. *J Transl Med* 12, 177

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis.....	1
1.1.1 Epidemiologie von Sepsis.....	1
1.1.2 Definition von Sepsis und Diagnosekriterien	2
1.1.2.1 Erfassung mittels <i>Sequential Organ Failure Assessment-Score</i>	6
1.1.2.2 Erfassung mittels <i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation-II-Score</i>	8
1.1.3 Pathophysiologische Aspekte der Sepsis-assoziierten Organdysfunktion	11
1.1.4 Ökonomische Aspekte der Sepsis.....	14
1.1.5 Leitliniengerechte Therapie von Sepsis	14
1.2 Die Aktivierung des Immunsystems durch die Sepsis	18
1.2.1 Bakterielle Strukturen zur Erkennung durch das angeborene Immunsystem.....	21
1.2.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zur Pathogen-Erkennung.....	23
1.2.2.1 <i>Toll-like</i> -Rezeptor-4-Lipopolysaccharid-Interaktion	26
1.2.3 Genetischer Polymorphismus TLR4 rs11536889.....	29
1.3 Fragestellung.....	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Patienten.....	31
2.2 Material.....	33
2.2.1 Substanzen	33
2.2.2 Kits und Assays.....	33
2.2.3 Gebrauchswaren	34
2.2.4 Geräte	34
2.3 Methoden.....	36
2.3.1 Isolierung der <i>Periferal Blood Mononuclear Cells</i>	36
2.3.2 Extrahierung genomischer DNA aus PBMC.....	36
2.3.3 Photometrische Messung der DNA-Konzentration und DNA-Integrität.....	37
2.3.4 Genotypisierung mittels allelischer Diskriminierung	37
2.3.4.1 Genotypisierung am SNP rs11536889 (3`-UTR).....	42
2.3.5 Datenerhebung, Auswertung und Statistik	43
3 Ergebnisse	45

3.1	Patienten-Kollektiv	45
3.2	Krankheitsschwere zu Beginn der Sepsis.....	47
3.3	Krankheitsverlauf und Mortalität	48
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung.....	59
6	Literaturverzeichnis	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Beziehung zwischen Infektion und Sepsis.....	11
Abbildung 2 Organversagen bei schwerer Sepsis, Entstehung der Gewebe-Hypoperfusion und Verlust der Diffusionsbarriere.....	13
Abbildung 3 Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens.....	19
Abbildung 4 Verschiedene Immunantworten.....	20
Abbildung 5 Struktur von LPS.....	22
Abbildung 6 TLR-Aufbau.....	24
Abbildung 7 <i>Toll-like</i> -Rezeptoren.....	25
Abbildung 8 TLR4-Signalweg zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen.....	28
Abbildung 9 TLR4 rs11536889.....	29
Abbildung 10 Allelische Diskriminierung.....	40
Abbildung 11 Ergebnisse einer allelischen Diskriminierung.....	41
Abbildung 12 SOFA- <i>Sub-Scores</i> nach Genotypen täglich während der Erfassungszeit.....	50
Abbildung 13 SOFA- <i>Score</i> nach Genotyp in der Nachverfolgungszeit.....	51
Abbildung 14 Korrelation der Überlebensrate in dem <i>TLR4</i> -Gen SNP rs1153889.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Diagnosekriterien für Sepsis	5
Tabelle 2 Weitere Parameter zur Diagnosestellung von Sepsis	6
Tabelle 3 SOFA-Score	7
Tabelle 4 APACHE-II-Score	9
Tabelle 5 <i>Surviving Sepsis Campaign Care Bundles</i>	15
Tabelle 6 Merkmale der Patienten im Zusammenhang mit TLR4 rs11536889	46
Tabelle 7 Krankheitsverlauf im Zusammenhang mit dem TLR4-rs11536889-Genotyp	49

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
ANV	akutes Nierenversagen
APACHE II	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
Asp	Aspartat
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CARS	<i>Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CpG	<i>Cytosin-Phosphate-Guanin</i>
CRF	<i>Clinical report form</i>
CRP	C-reaktives Protein
CVP	<i>Central Venous Pressure</i>
DAMP	<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DIC	<i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dsRNA	Doppelstrang-RNA
FAM	<i>Fluorescein Amidite (Carboxyrhodamin)</i>
FiO ₂	<i>Fraction of Inspired Oxygen</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
gDNA	genomische DNA
GPI	Glycophosphatidylinositol
HCO	Hydrogencarbonat
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
IDDM	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus</i>

IFN- β	<i>Interferon-β</i>
IKK	<i>IκB-Kinase-Komplex</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i>
KDO	<i>3-desoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic Acid</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide-Binding Protein</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
LRR	<i>Leucine Rich Repeats</i>
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MD	<i>Myeloid Differentiation Protein</i>
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular Traps</i>
NF κ B	<i>Tumornekrosefaktor-κB</i>
NIDDM	<i>Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus</i>
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor</i>
NOD	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PS	<i>Polysaccharid</i>
rhAPC	<i>Recombinant Human Activated Protein C</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SIGIRR	<i>Single-Immunoglobulin Interleukin-1-Receptor-Related</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SSC	<i>Surviving Sepsis Campaign</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TAK 1	<i>Transforming Growth Factor β-activated Kinase 1</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1 Receptor</i>
TIRAP	<i>TIR-Domain-Containing Adaptor Protein</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TOLLIP	<i>Toll-Interacting Protein</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor-Molecule</i>
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRIF	<i>TIR-Domain Containing Adaptor Inducing IFN-β</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VIC	6-Carboxyfluorescein
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Sepsis

Der Ursprung des Begriffes „Sepsis“ kommt aus dem Altgriechischen (σῆψις) und bedeutet übersetzt ins Deutsche „Fäulnis“ (Majno 1991). Das Wort „Sepsis“ lässt sich von dem altgriechischen Verb sepo (σηπω) ableiten und bedeutet in der deutschen Übersetzung „Ich verfaule“ (Geroulanos und Douka 2006). Später verwendete Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) das Wort „Sepsis“ im Zusammenhang mit dem Prozess der „Wundfäule“. Mit der Keim-Theorie von Semmelweis (1818-1865) und Pasteur (1822-1895) wurde der Begriff der systemischen Infektion, auch „Blutvergiftung“ genannt, beschrieben und der Ausbreitungsweg von Pathogenen, welche zuvor in den Organismus eingedrungen sind, in die Blutbahn eines Wirtsorganismus angenommen (Angus und van der Poll 2013).

Sepsis ist eine der führenden Todesursachen, wenn sie nicht gleich erkannt und behandelt wird. Daher sollte die Erkennung von Sepsis-Patienten unsere dringende Aufmerksamkeit haben (Singer et al. 2016). Bei kritischen Krankheitssyndromen, wie dem akuten Lungenversagen, Sepsis und Multiorganversagen, handelt es sich um komplexe Krankheitsbilder. Diese können nicht wie HIV durch eine Serologie oder Malaria durch den dicken Tropfen diagnostiziert werden. Die Diagnosekriterien und Diagnosestellung dieser kritischen Krankheits-syndrome werden durch Konsensus-Konferenzen ständig diskutiert, überarbeitet und aktualisiert (Adhikari NK et al. 2010; Bernard et al. 1994; Bone et al. 1992).

1.1.1 Epidemiologie von Sepsis

Weltweit wird eine Zahl von jährlich neuen Sepsis-Fällen auf 17 Millionen geschätzt (Adhikari NK et al. 2010). In den Vereinigten Staaten von Amerika betrug die Inzidenz von Sepsis 3 Fälle pro 1.000 Einwohner, das sind 751.000 Sepsis-Neuerkrankungen pro Jahr (Angus et al. 2001). Die Daten dieser US-amerikanischen Multicenterstudie wurden im Jahr 1995 erhoben. 192.980 Patienten von insgesamt 6.621.559 untersuchten Entlassungsakten erfüllten hierbei die Kriterien für eine schwere Sepsis. Die Mortalität in dieser Studie betrug 28,6 %, das auf die US-amerikanische Bevölkerung gerechnet ca. 215.000 Tote jährlich ergibt (Angus et al. 2001).

In einer Studie von Martin et al. aus dem Jahr 2003 wurden Daten von 700 Millionen Patienten, die in den USA von 1979 bis 2000 stationär behandelt wurden, untersucht. Von diesen

Patienten wurden 10.319.418 Patienten mit Sepsis detektiert. Für das Jahr 1979 ergab sich eine Inzidenz von 82,7 pro 100.000 Einwohner im Jahr, welche bis zum Jahr 2000 auf 240,4 Fälle pro 100.000 Einwohner anstieg. Dagegen sank die Mortalitätsrate dieser Kohorte von 27,8 % (1979-1984) auf 17,9 % in der Zeit von 1995 bis 2000 (Martin et al. 2003). Trotz der sinkenden Mortalitätsrate stieg die Fallzahl von Sepsis-Patienten jährlich um 9 % und somit auch die absolute Zahl an Todesfällen, was eine Folge des demographischen Wandels und der Alterung der US-Bevölkerung sein dürfte (Angus et al. 2001; Martin et al. 2003).

In Deutschland erbrachte die Studie von Engel et al. 2007 bei der Datenerhebung von 454 ICUs aus 310 Krankenhäusern folgende Beobachtungen: Die Prävalenz der Sepsis betrug 12,4 % und 11 % für die schwere Sepsis und den septischen Schock (Engel et al. 2007). Genauer betrachtet konnte eine geringere Prävalenz für kleinere Krankenhäuser (<200 Betten) gezeigt werden. Diese wurde auf 6 % berechnet, wogegen die Prävalenz von größeren Krankenhäusern (alle universitären Krankenhäuser >600 Betten) 19,3 % betrug. Auf der Intensivstation berechneten Engel et al. eine Mortalitätsrate von 48,4 % für Patienten mit schwerer Sepsis unabhängig von der Krankenhausgröße (Engel et al. 2007). Eine Infektion konnte lediglich bei 34,8 % aller Sepsis-Patienten durch eine positive Blutkultur oder andere positive Bakterien-Nachweise erfasst werden (Engel et al. 2007). Aus diesen Daten ergab sich eine Inzidenz für Sepsis und schwere Sepsis in Deutschland von 76-110 pro 100.000 Einwohner (Engel et al. 2007).

1.1.2 Definition von Sepsis und Diagnosekriterien

Sepsis wurde 1992 im Rahmen einer internationalen Konsensus-Konferenz der Gesellschaften *American College of Chest Physicians* (ACCP) und der *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) als eine systemische Reaktion des Organismus auf eine Infektion definiert. Ebenfalls wurden die *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS)-Kriterien (**Tabelle 1**) festgelegt und als klinisch ähnlich ablaufender inflammatorischer Prozess, aber ohne den Nachweis eines infektiösen Triggers definiert (Bone et al. 1992). In der gleichen Konferenz wurde eine Einteilung nach Schweregraden des Krankheitsbildes „Sepsis“ vorgenommen, sodass sich Sepsis nun in Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock gliedert (Bone et al. 1992). Diese Einteilung geschieht anhand der Kombination von klinischen Parametern. Zu diesen Parametern gehören Körpertemperatur, Herzfrequenz und Atemfrequenz sowie die Leukozytenzellzahl oder der Anteil an unreifen neutrophilen Granulozyten (Bone et al. 1992).

2001 erweiterten Levy et al. im Rahmen einer weiteren internationalen Konferenz die Kriterien für Sepsis, um dieses Krankheitsbild präziser und zuverlässiger definieren zu können und um die klinische Nutzbarkeit der Definition zu verbessern (Levy et al. 2003). Zu der

Erweiterung der Diagnosekriterien zählen hämodynamische Instabilität, arterielle Hypoxämie, Oligurie, Veränderungen der Blutgerinnung und Werte der Leberfunktion (**Tabelle 1**) (Levy et al. 2003). SIRS plus das Vorliegen eines nachgewiesenen infektiösen Stimulus bzw. eines klinischen Verdachts auf eine Infektion entsprechen dabei einer Sepsis (Bone et al. 1992). Da ein Erregernachweis nur in bis zu 40 % der Sepsis-Fälle gelingt, kann das Vorhandensein von klinischen Kriterien ebenfalls herangezogen werden (Engel et al. 2007; Levy et al. 2003). Bone et al. gehen in ihrer Arbeit darauf ein, dass generelle Symptome wie Fieber, Störungen der Hämodynamik und Leukozytose auch ohne infektiösen Stimulus entwickelt werden können, wie beispielsweise bei Patienten mit Verbrennungen, Pankreatitis und anderen Traumata oder Krankheiten (Bone et al. 1992). Eine schwere Sepsis zeichnet sich durch das zusätzliche Vorliegen einer Organdysfunktion oder das Vorliegen einer Hypoperfusionsabweichung (wie einer Laktatazidose, Oligurie oder akuten Veränderung des mentalen Status oder einer Sepsis-induzierten Hypotension) aus. Der septische Schock ist definiert als das Eintreten eines Kreislaufversagens trotz angemessener Infusionstherapie (Bone et al. 1992). Um die Einschlusskriterien der Patienten einer klinischen Studie festzulegen, wurde, wie auch bei dieser Studie, auf die Kriterien von 1992 zurückgegriffen (Levy et al. 2003). Die Sepsis gehört zu den führenden Todesursachen weltweit und zählt zudem zu einer der kostenintensivsten Krankheiten der Intensivmedizin (Angus et al. 2001). Sehr entscheidend für die Reduktion dieser hohen Letalität ist der Zeitpunkt der Diagnose und damit die Initiierung angemessener therapeutischer Maßnahmen (Hagel und Brunkhorst 2011). In den Leitlinien von 2013, nach denen diese vorliegende Dissertation ausgelegt wurde, wird im Rahmen der Diagnosestellung die Bestimmung von Procalcitonin (PCT) und anderen Biomarkern (wie C-reaktives Protein) nicht mehr empfohlen, da auch mit Hilfe dieser Kriterien eine Unterscheidung zwischen einem inflammatorischen Geschehen im Rahmen einer Sepsis und einer generellen inflammatorischen Reaktion des Organismus (beispielsweise postoperativ oder bei anderen Formen von Schock) nicht sicher gelang (Dellinger et al. 2013; Pierrakos und Vincent 2010; Williams et al. 2003). Ferner haben die täglich abgenommenen Routine-Laborparameter eine erhebliche Aussagekraft für den Verlauf eines septischen Krankheitsbildes. Hierzu gehören unter anderem die Parameter des Gerinnungssystems, also Quick-Wert, partielle Thromboplastinzeit (PTT) und Thrombozytenzahl sowie Entzündungsparameter wie Leukozyten und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) (Brunkhorst und Reinhart 2009). 2003 auf dem 23. Internationalen Symposium der Intensiv- und Notfallmedizin wurde ein Staging-Konzept diskutiert, welches PIRO-Konzept (P – Prädisposition für Infektionen, I – Infektion, R – Response/Wirtsantwort und O – Organversagen) heißt (Levy et al. 2003). PIRO orientiert sich an der TNM-Klassifikation der Karzinomerkrankungen (Cohen et al.

2004; Levy et al. 2003). Die Idee stammt von Hedwig Gerlach, die in den verschiedenen Sepsis-Formen wie der Meningokokken-Sepsis oder der Langzeit-Sepsis eine Parallele zu den verschiedenen Krebsformen und deren „Krankheitsstratifizierung/-klassifizierung“ sieht (Angus et al. 2003). Mit diesem Konzept soll in Zukunft eine individuellere Prognose und Therapie möglich sein (Rubulotta et al. 2009). Einen wichtigen Aspekt hinsichtlich der Krankheitsprädisposition stellen genetische Faktoren dar. Dies wird vor allem deutlich, wenn man die genetische Epidemiologie, das hohe Risiko für die Bevölkerung und die schlechte Überlebensrate betrachtet, auf die insbesondere David Burgner aufmerksam macht (Angus et al. 2003).

Tabelle 1 Diagnosekriterien für Sepsis

Modifiziert nach Reinhart et al. 2010, S. 6.

I. Nachweis einer Infektion

Diagnose einer Infektion (mikrobiologischer Nachweis oder klinische Kriterien)

II. Systemic inflammatory host response (SIRS) (≥ 2 Kriterien)

Fieber ($>38,3$ °C), oder Hypothermie (Kerntemperatur <36 °C)

Tachykardie (≥ 90 /min)

Tachypnoe (≥ 20 /min) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2^{*1} \leq 4,3$ kPa/ ≤ 33 mmHg)

Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$)

oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

III. Akute Organdysfunktion (mindestens 1 Kriterium)

Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium

Relative oder absolute Thrombozytopenie:

Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 h

oder Thrombozytenzahl $\leq 10^5/\text{mm}^3$

(Thrombozytopenie durch akute Blutung/immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein)

Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa (≥ 75 mmHg) unter Raumluft

oder eine $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Ratio^{*2} von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter O_2 -Applikation

(manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache ausgeschlossen sein)

Renale Dysfunktion:

Diurese von $\leq 0,5$ ml/kg/h für wenigstens 2 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des S-Kreatinins $>2x$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches

Metabolische Azidose: *Base Excess* ≤ 5 mmol/l oder ein Laktat $>1,5$ x oberhalb des üblichen Referenzbereiches

Sepsis: Kriterien I und II

Schwere Sepsis: Kriterien I, II, III

Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 h ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg zu halten

*1 paCO_2 = arterieller Kohlendioxidpartialdruck

*2 $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ = arterieller Sauerstoffpartialdruck/inspiratorische Sauerstoffkonzentration

Einige weitere relevante Parameter, die bei der Diagnosestellung von Sepsis eine Rolle spielen, sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Diese werden in der aktuellen Leitlinie genannt.

Tabelle 2 Weitere Parameter zur Diagnosestellung von Sepsis

Modifiziert nach Dellinger et al. 2013, S. 169.

Allgemeine Parameter	Signifikante Ödeme oder positive Flüssigkeitsbilanz (>20 ml/kg/24 h) Hyperglykämie (BZ >120 mg/dl bzw. 7,7 mmol/l)
Inflammatorische Parameter	C-reaktives Protein (>2-fache DS über Referenzwert) Procalcitonin (>2-fache DS über Referenzwert)
Hämodynamische Parameter	Arterielle Hypotension (RRsys <90 mmHg, MAP <70 mmHg oder einen Abfall des RRsys >40 mmHg)
Parameter der Organdysfunktion	Kreatinin-Anstieg um >0,5 mg/dl Gerinnungsstörung (INR >1,5 oder aPTT >60 sek) Hyperbilirubinämie (Plasma-Bilirubin >4 mg/dl) Ileus (fehlende Darmgeräusche)
Parameter für gestörte Gewebepfusion	Reduzierte venöse Füllung oder Marmorierung

1.1.2.1 Erfassung mittels *Sequential Organ Failure Assessment-Score*

Dieses System wurde erstmals 1994 von der *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) als *Sepsis-related Organ Failure Assessment-Score* herausgebracht (Vincent et al. 1996). Ziel war, mit der Hilfe von möglichst simplen klinischen Parametern den Prozess der Organdysfunktion bzw. des Organversagens bis zum Multiorganversagen objektiv messen zu können. Mit dem System sollte man den Ist-Zustand des Patienten bewerten und eine Aussage zu den Organfunktionen an aufeinanderfolgenden Tagen abgeben. Zudem kann der Effekt von Therapien besser dargestellt werden (Vincent et al. 1996). Da ein Organversagen auch unabhängig von einem septischen und infektiösen Geschehen auftreten kann, wurde der Score in *Sequential Organ Failure Assessment-Score* umbenannt (Vincent et al. 1998). Für sechs Organsysteme werden sogenannte *Sub-Scores* erhoben. Ein jeweiliger repräsentativer Parameter wird bestimmt und je nach Organdysfunktion werden Punkte zwischen 0 und 4 vergeben (**Tabelle 3**) (Vincent et al. 1996). Die *European/Northamerican Study of Severity System* (ENAS)

konnte anhand einer retrospektiven Untersuchung von 1.463 Sepsis-Patienten feststellen, dass eine Korrelation von einem höheren SOFA-Score am Aufnahmetag und einer höheren Mortalität besteht (Vincent et al. 1996). Die Studie von Vincent et al. mit 1.449 ICU-Patienten bestätigte die Relevanz und Korrelation des SOFA-Scores in Zusammenhang mit der Erkennung und Beurteilung von Organdysfunktion und Organversagen (Vincent et al. 1998).

Tabelle 3 SOFA-Score

Modifiziert nach Vincent et al. 1996, S. 708.					
SOFA-Score	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
Lunge				mit Beatmung	
PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg	≥400	<400	<300	<200	<100
Niere					
Kreatinin, mg/dl oder Ausfuhrmenge, ml/d	<1,2	1,2-1,9	2-3,4	3,5-4,9	>5
				200-500	<200
Leber					
Bilirubin, mg/dl	<1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	>12
Herz/Kreislauf					
Blutdruck, mmHg	MAP ≥70	MAP <70			
Dopamin, µg/kg/min			≤5	>5	>15
Dobutamin, µg/kg/min			Jede Dosis		
Epinephrin, µg/kg/min				≤0,1	>0,1
Norepinephrine, µg/kg/min				≤0,1	>0,1
Gerinnung					
Thrombozyten, x10 ³ /mm ³	≥150	<150	<100	<50	<20
Neurologie					
Glasgow Coma Scale (GCS)	15	13-14	10-12	6-9	<6

SOFA = *Sequential Organ Failure Assessment*, MAP = *Mean Arterial Pressure*

1.1.2.2 Erfassung mittels *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation-II-Score*

Der *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE)-II-Score* ist ein Klassifikationssystem zur Einschätzung der aktuellen Krankheitsschwere eines Patienten. Die Erhebung erfolgt innerhalb der ersten 24 Stunden nach ICU-Aufnahme und ergibt einen zu errechnenden Zahlenwert zwischen 0 und 71 Punkten, welcher sich aus drei Eingabe-Bereichen ableitet: dem akuten, zu dem *Acute Physiology-Score (APS)* gehören 12 klinische und laborchemische Werte, die den aktuellen Krankheitsstand des Patienten repräsentieren, dem chronischen Krankheitszustand (*Chronic Health Points, CHP*) und dem Alter. Es wird jeweils der schlechteste Wert der letzten 24 Stunden eingerechnet (**Tabelle 4**) (Knaus et al. 1985). Mit den errechneten Werten des *APACHE-II-Scores* können prognostische Aussagen über die Höhe der Wahrscheinlichkeit, in demselben ICU-Aufenthalt zu sterben, getroffen werden. Darüber hinaus lässt sich der Erfolg von unterschiedlichen Therapieformen auf der ICU beurteilen und im Rahmen von klinischen Studien feststellen, ob z. B. eine Kontrollgruppe ähnlich ist (Knaus et al. 1985). Für ein eher niedriges Sterberisiko steht ein *APACHE*-Wert von unter 25 Punkten (Hagel und Brunkhorst 2011).

Tabelle 4 APACHE-II-Score

Modifiziert nach Knaus et al. 1985, S. 820.

Physiologische Variable	Hoher abnormaler Bereich				Tiefer abnormaler Bereich				
	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatur, in °C	≥41	39-40,9	110-129	38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤29,9
MAP, mmHg	≥160	130-159	110-129	70-109	70-109	50-69	55-69	40-54	≤49
Herzfrequenz, /min	≥180	140-179	110-139	70-109	70-109	50-69	55-69	40-54	≤39
Atemfrequenz, /min	≥50	35-49	25-34	12-24	12-24	10-11	6-9		≤5
Oxygenation, in mmHg									
a. FiO ₂ ≥0,5, in DaDO ₂	≥500	350-499	200-349	<200					
b. FiO ₂ <0,5, in PaO ₂	≥7,7	7,6-7,69	7,5-7,59	7,33-7,49	>70	61-70	7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15
Arterieller pH	≥180	160-179	155-159	130-149	130-149	120-129	111-119		≤110
Serum-Natrium (mMol/l)	≥7	6-6,9	5,5-5,9	3,5-5,4	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		<2,5
Serum-Kalium (mMol/l)	≥3,5	2-3,4	1,5-1,9	0,6-1,4	0,6-1,4	<0,6			
Serum-Kreatinin (mg/100ml)	≥60	50-59,9	46-49,9	30-45,9	30-45,9	20-29,9			<20
Hämatokrit (%)	≥40	20-39,9	15-19,9	3-14,9	3-14,9	1-2,9			<1
Leukozyten (/mm ³)									
GCS	Score = 15 minus aktueller GCS								
A – APS: Summe der 12 variablen Punkte									
Serum-HCO (mMol/l)	≥52	41-51,9	32-40,9	22-31,9	18-21,9	15-17,9			<15

GCS = Glasgow Coma-Scale, APS = Acute Physiology-Score

B – Punkte fürs Alter	C – Chronische Gesundheitspunkte	APACHE-II-SCORE
Alter (Jahre)	a. Keine Operation oder Notfalloperation	Summe von A + B + C
≤44	b. Elektive Operation	A – APS-Punkte: ___
45-54	Definition: Insuffizienz eines Organs, das vor diesem Krankenhausaufenthalt bestand oder folgende Kriterien erfüllt: Leber: Durch eine Leberbiopsie bestätigte Leberzirrhose und dokumentierte portale Hypertension;	B – Alterspunkte: ___
55-65	obere gastrointestinale Blutung in der Vorgeschichte aufgrund der portalen Hypertension oder vorherige Episoden von Leberversagen. Kardiovaskulär: NYHA IV. Respiratorisch: Chronisch restriktive, obstruktive oder vasculäre Krankheit, welche die Aktivität einschränkt, oder bekannte chronische Hypoxie, Hyperkapnie, sekundäre Polycytämie, schwere pulmonäre Hypertension. Niere: Chronische Dialyse. Immunsuppression durch Chemotherapie, Radiotherapie, Hochdosis-Steroidtherapie, Leukämie, Lymphom, <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (AIDS).	C – Chronische Gesundheitspunkte: ___
65-74		
≥75		

1.1.3 Pathophysiologische Aspekte der Sepsis-assoziierten Organdysfunktion

In der Pathophysiologie des septischen Krankheitsbildes dreht es sich gemäß der Definition um die Interaktion eines Infektionsstimulus mit der systemischen Immunantwort eines Organismus (Cohen 2002). Das Immunsystem kann durch infektiöse und nicht infektiöse Stimuli aktiviert werden (Marshall 2014). Das angeborene Immunsystem erkennt mit Hilfe seiner *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) die *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Janeway 1989). Zu den PRRs gehören unter anderem das Lipopolysaccharid (LPS) der gramnegativen Bakterien (Rietschel et al. 1994), welches im Fokus dieser Arbeit steht (siehe 1.2, S. 18).

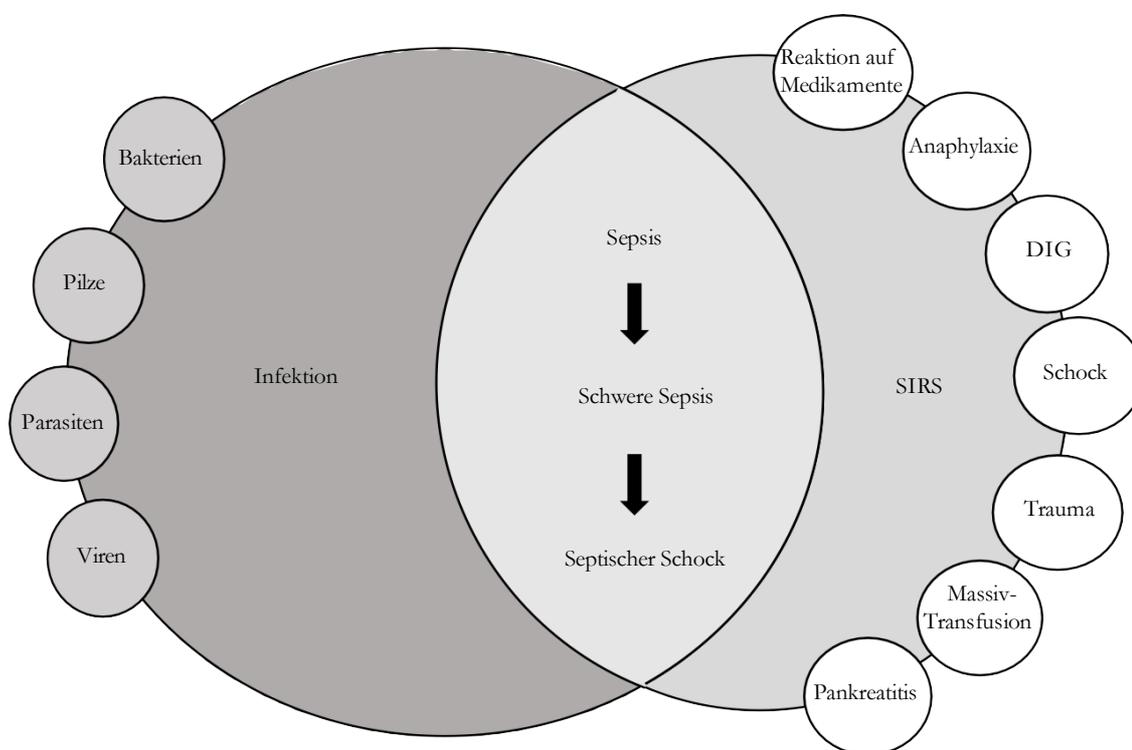


Abbildung 1 Beziehung zwischen Infektion und Sepsis

Modifiziert nach Moerer und Quintel 2009, S. 5.

Die Organdysfunktion eines septischen Patienten kann sehr individuell variieren und ist beeinflusst durch verschiedene Faktoren, wie die Erregerkonstellation, den Gesundheitsstatus des Patienten und den Primärfokus der Infektion (Angus und van der Poll 2013; Levy et al. 2003). Die Sepsis-assoziierte Organdysfunktion der Lunge äußert sich als *Acquired Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) (Rubenfeld et al. 2005). Dieses Sepsis-assoziierte Krankheitsbild wird nach der Berliner Definition eingeteilt und ist somit charakterisiert durch eine innerhalb einer Woche entstandene Verschlechterung der respiratorischen Situation mit bilateralen, pulmonalen Verschattungen im Röntgen-Thorax und Hypoxie, welche jedoch nicht durch

ein kardiales Pumpversagen oder eine Flüssigkeitsüberladung des Kreislaufs verursacht sein darf (Ranieri et al. 2012). Unter den Sepsis-Patienten entwickeln ca. 42,6 % ein akutes Nierenversagen (ANV), diese Patienten haben eine höhere Sterberate (67,3 %) als Sepsis-Patienten, die kein ANV entwickeln (42,8 %) (Engel et al. 2007). Nierenversagen ist charakterisiert als eine Erhöhung des Kreatinin-Wertes und eine Reduktion der Urinproduktion (Kellum et al. 2013). Das Sepsis-assoziierte Leberversagen kann durch einen steigenden Bilirubin-Spiegel detektiert werden (Moreno et al. 1999). Das zentrale Nervensystem ist häufig eins der ersten Organsysteme, welches bei Patienten auf der Intensivstation eingeschränkt ist. Dies kann sich im Sinne einer Sepsis-assoziierten Enzephalopathie klinisch in einem Delir bis hin zum Koma manifestieren (Ebersoldt et al. 2007; Moreno et al. 1999).

Eine weitere Komplikation der Sepsis ist die kardiovaskuläre Beeinträchtigung, welche sich durch die arterielle Hypotension und eine Erhöhung des Serum-Laktats manifestiert. Auch nach adäquater Volumengabe bleibt die Hypotension bestehen, und es werden Vasopressoren zur Stabilisierung benötigt. Gegebenenfalls kommt es zur kardialen Dysfunktion (Dellinger et al. 2013). Hypotension ist ein Zeichen für ein beginnendes funktionelles Defizit des Herz-Kreislauf-Systems. Durch die daraus resultierende Gewebhypoxie und über verschiedene Mediatoren kann sich daraus eine reaktive Vasodilatation ergeben (Landry und Oliver 2001). Zusammen mit der Vasodilatation kann die disseminierte intravasale Gerinnung zu einer relevanten Gewebe-Hypoperfusion führen (**Abbildung 2**). Die sogenannte disseminierte intravaskuläre Gerinnung (DIC) bedeutet die Bildung von Fibrin und einen Verschluss durch thrombotische Ereignisse in kleinen und mittelgroßen Gefäßen (Bone 1992).

Das Organversagen bei Sepsis resultiert aus der Gewebe-Hypoperfusion und dem Verlust der Diffusionsbarriere des Endothels (**Abbildung 2**). Während eines infektiösen Geschehens im Sinne einer entstehenden Sepsis nimmt die pro-koagulatorische Komponente zu, und gleichzeitig kommt es zu der Abnahme von anti-koagulatorischen Faktoren und somit zu einer Koagulopathie. Eine kontinuierliche Aktivierung der Gerinnung (durch den *Tissue Factor*) und ebenfalls eine gesteigerte Produktion des plättchenaktivierenden Faktors (*Platelet Activating Factor*, PAF) führen zu einer durch die Leukozyten-Thrombozyten-Endothel-Interaktion vermehrten Thrombenbildung (Angus und van der Poll 2013; Zimmerman et al. 2002). Ebenfalls zu einer erhöhten Thrombenformation kommt es durch aktivierte Neutrophile, die *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), die Pathogene binden (Brinkmann et al. 2004; Fuchs et al. 2010). Die Beeinträchtigung der Antikoagulationsmechanismen ist das Ergebnis von reduzierter Aktivität der endogenen Antikoagulationswege (wie Antithrombin, aktiviertes Protein C und *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) (Angus und van der Poll 2013).

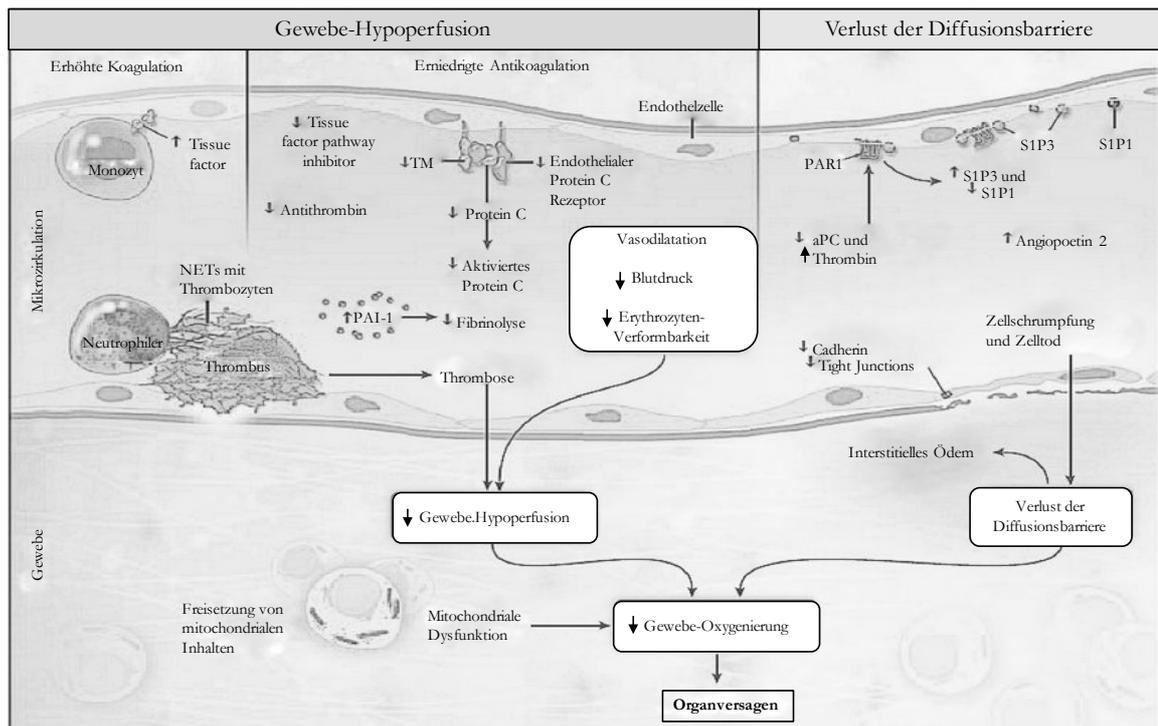


Abbildung 2 Organversagen bei schwerer Sepsis, Entstehung der Gewebe-Hypoperfusion und Verlust der Diffusionsbarriere

Modifiziert nach Angus und van der Poll 2013, S. 845.

Eine gestörte Fibrinolyse entsteht auf aktiviertem Endothel durch die vermehrte Ausschüttung von *Pasminogen Activator Inhibitor Type 1* (PAI 1) (van Deventer et al. 1990). Die Thrombenbildung wird durch Gewebe-Hypoperfusion begünstigt und durch Vasodilatation verstärkt. Zusätzlich spielen die Hypotension und reduzierte Verformbarkeit der roten Blutkörperchen eine relevante Rolle (Angus und van der Poll 2013). Durch ein erniedrigtes *Activated Protein C* (aPC) und einen erhöhten Thrombin-Level kommt es über den *Protease-Activated-Receptor-1* (PAR1) zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen Sphingosin-1-Phosphat-1 (S1P1) und Sphingosin-1-Phosphat-3 (S1P3). Die S1P1 erhöht die Integrität der Zell-Zell-Grenzen und S1P3 erniedrigt diese (van der Poll und Levi 2012). Ein interstitielles Ödem resultiert aus dem Verlust der Diffusionsbarriere, also der Zell-Zell-Kontakte, wie beispielsweise *Tight Junctions* und Cadherine (Angus und van der Poll 2013).

1.1.4 Ökonomische Aspekte der Sepsis

Sepsis stellt eine erhebliche ökonomische Belastung dar (Moerer et al. 2002). In den USA werden jährlich 6,7 Mrd. US-Dollar für die Sepsis-Therapie ausgegeben, pro Fall sind das ca. 22.100 US-Dollar bei einer durchschnittlichen Krankenhausliegedauer von 19,6 Tagen. Die überlebenden Patienten stellten sich als weniger kostenintensiv dar als die Patienten, die verstarben, entsprechend 20.600 US-Dollar vs. 25.900 US-Dollar (Angus et al. 2001). In einer retrospektiven Studie erfassten Schmid et al. die Kosten der Therapie der schweren Sepsis von 1997 bis 2000. Von den Gesamtkosten der deutschen Intensivstationen macht die Sepsis-Therapie 19-42 % jährlich aus (Schmid et al. 2002). Eine gute Aufstellung der entstehenden Kosten in Deutschland geht aus der Arbeit von Moerer et al. 2002 hervor. Die direkten Kosten werden hiernach auf 23.297 ± 18.631 Euro/Patient berechnet. Im Vergleich zu einem nicht septischen Patienten verursacht ein septischer Patient das Fünffache an täglichen Kosten, entsprechend 851 Euro vs. 3.883 Euro (Moerer et al. 2002). Nicht außer Acht zu lassen sind die indirekten Kosten, die durch den zeitlichen oder vollständigen Arbeitsausfall eines Patienten oder gar durch das frühzeitige Versterben des Patienten entstehen (Jegers et al. 2002). Schmid et al. berechneten die Kosten in Deutschland für den temporären Arbeitsausfall von Sepsis-Patienten auf 3.432 Euro/Patient und die Kosten für die permanente Arbeitsunfähigkeit auf 10.159 Euro/Patient (Schmid et al. 2002). Insgesamt betragen alle direkten Kosten in Deutschland und der Schweiz 1-2,2 Mrd. Euro im Jahr, und die indirekten Kosten belaufen sich auf 3,6-7,8 Mrd. Euro im Jahr. Im Ganzen belastet die Sepsis den Gesundheitssektor mit schätzungsweise 3,6-7,8 Mrd. Euro im Jahr (Schmid et al. 2002).

1.1.5 Leitliniengerechte Therapie von Sepsis

Federführend in der Therapie der Sepsis sind die Guidelines der Surviving Sepsis Campaign (SSC), die dritte Auflage der Leitlinien für die therapeutischen Ansätze bei schwerer Sepsis und septischem Schock, welche durch einen Zusammenschluss von internationalen Gesellschaften der Notfall- und Intensivmedizin herausgebracht wurden (Angus und van der Poll 2013). Dellinger et al. aktualisierten diese zuletzt 2012 (Dellinger et al. 2013). Schon 2002 kam das Konzept der „Bundles“ (**Tabelle 5**) zum Management der Sepsis-Therapie auf. Diese „Bundles“ bestehen aus zwei Teilen und enthalten die wichtigsten Elemente der Therapieentscheidung. Der erste Teil beinhaltet die Maßnahmen, welche in den ersten 3 Stunden, und der zweite, welche nach 6 Stunden abgeschlossen sein sollten (**Tabelle 5**) (Dellinger et al. 2013). Mit der Anwendung dieser „Bundles“ ist ein positives Outcome der Patienten vergesellschaftet (Ferrer et al. 2008; Levy et al. 2010).

Tabelle 5 *Surviving Sepsis Campaign Care Bundles*

Modifiziert nach Dellinger et al. 2013, S. 175.

Abgeschlossen in den ersten 3 Stunden:

- 1) Bestimmung des Laktat-Wertes
- 2) Entnahme von Blutkulturen vor der ersten Antibiotika-Gabe
- 3) Gabe eines Breitspektrum-Antibiotikums
- 4) Gabe von 30 ml/kg kristalloider Flüssigkeit bei Hypotension oder Laktat-Wert ≥ 4 mmol/l

Abgeschlossen in den ersten 6 Stunden:

- 5) Gabe von Vasopressoren (bei Hypotension, welche nicht auf die Flüssigkeitsgabe reagiert), um den mittleren arteriellen Druck (MAP) bei ≥ 65 mmHg zu halten
- 6) Bei Fortbestand der arteriellen Hypotension trotz adäquater Volumengabe (septischer Schock) oder initialem Laktat ≥ 4 mmol/l (36 mg/dl):
 - Messung des zentralvenösen Drucks (CVP)*
 - Messung der zentralvenösen Sauerstoffsättigung (ScvO₂)*
- 7) Kontrolle des Laktat-Wertes, wenn er zu Beginn erhöht war

* Normalwerte aus den Guidelines entnommen sind CVP von ≥ 8 mmHg, zentralvenöse Sauerstoffsättigung (ScvO₂) von ≥ 70 %

Patienten profitieren von einer frühen Diagnosestellung und einer frühen Therapieentscheidung, was signifikanten Einfluss auf das kardiovaskuläre, renale und respiratorische Krankheitsergebnis hat, gemessen am SOFA-Score (Levy et al. 2005).

Liegt eine Infektion vor, sollten Blutkulturen abgenommen werden. Im Anschluss ist mit einer empirischen antimikrobiellen Therapie zu beginnen (Angus und van der Poll 2013; Dellinger et al. 2013). Die antimikrobielle Therapie sollte nach dem Prinzip *hit early – hit hard* (Hagel und Brunkhorst 2011) angewendet werden, abhängig vom wahrscheinlichsten Entstehungsort der Infektion und angepasst an die Komorbidität des Patienten (Angus und van der Poll 2013). Das Setting, in dem die Infektion entsteht (Alteneinrichtung, zuhause oder im Krankenhaus), die medizinische Krankengeschichte, Allergien, Immunsuppression und die Anfälligkeit der lokalen mikrobiologischen Besiedlung sollten berücksichtigt werden (Angus und van der Poll 2013; Dellinger et al. 2013). Es empfiehlt sich, die Therapie regelmäßig neu zu evaluieren, um diese gegebenenfalls zu deeskalieren, die Bildung von Resistenzen zu vermeiden und die Toxizität zu reduzieren (Dellinger et al. 2013). In der Studie von Kumar et al. von 2004 wurde dargestellt, dass jede verstreichende Stunde, in der nicht die korrekte Antibiotikatherapie eingesetzt wird, die Sterblichkeit um 7,6 % steigert. In der ersten

Stunde nach der Sepsis-Diagnose, der sogenannten „goldenen Stunde“, unterscheiden sich die Überlebensraten der ersten halben Stunde von der zweiten halben Stunde ohne adäquate Therapie bereits erheblich, entsprechend 82,7 % vs. 77,2 % (Kumar et al. 2006). Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Therapie ist die Fokussanierung, eine nicht ausreichende Sanierung des septischen Herdes geht mit einer erhöhten Letalität einher (Hagel und Brunkhorst 2011).

Vasopressoren sollten eingesetzt werden, wenn die Hypotension trotz adäquater Volumentherapie weiterbesteht. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) sollte stets über 65 mmHg liegen (Dellinger et al. 2013). Die ausreichende Zirkulation für die Perfusion des Körpers und aller lebenswichtigen Organe gilt es so zu gewährleisten (Hollenberg et al. 2004; LeDoux et al. 2000).

Der Einsatz von Kortison wird von der SSC bei ausreichender Kreislaufstabilisierung durch Flüssigkeitssubstitution und Vasopressor-Therapie nicht empfohlen (Dellinger et al. 2013). Aufgrund hoher Raten von Superinfektionen, Hyperglykämien und Hypernatriämien wird die Kortison-Therapie nur noch bei Therapie-refraktärer Sepsis empfohlen, als Ultima Ratio (Dellinger et al. 2013; Hagel und Brunkhorst 2011).

Viele Studien wurden zum Einsatz von Insulin bei Sepsis-Patienten auf den ICUs durchgeführt, welche alle keine signifikante Reduktion der Mortalität ergaben (Arabi et al. 2008; Brunkhorst et al. 2008; CS Investigators et al. 2010; N-SS Investigators et al. 2009; Preiser et al. 2009). Dennoch besteht die Empfehlung, eine Insulin-Therapie zu beginnen, wenn zwei aufeinanderfolgende Blutglukose-Messungen einen Wert >180 mg/dl ergeben (Dellinger et al. 2013).

Bei einer Verschlechterung der respiratorischen Funktion sollte frühzeitig und der gesamten Situation des Patienten angemessen die Entscheidung zur Intubation eines Patienten gestellt werden. Zu den Entscheidungskriterien gehören vor allem eine erhöhte Atemfrequenz (>35 Atemzüge/min), muskuläre Erschöpfung, eingeschränkte Vigilanz und ein Sauerstoffsättigungsabfall <90 % $tcSaO_2$ (Hagel und Brunkhorst 2011). Ein erhöhter pCO_2 (Kohlensäurepartialdruck) kann bei einem Patienten mit erniedrigtem Tidalvolumen toleriert werden, ohne dass es eine klinische Relevanz hat, vorausgesetzt der pH-Wert bleibt über 7,2 (Hagel und Brunkhorst 2011). Die SSC Guidelines empfehlen eine Beatmung mit 6 ml/kg Idealgewicht und einen PEEP von >5 cmH₂O (Dellinger et al. 2013).

Als supportive Therapie sollten bei jedem Patienten eine Stressulkus-Prophylaxe mit Protonenpumpeninhibitoren oder H₂-Rezeptor-Antagonisten, eine Anpassung der Ernährung sowie eine Thrombose-Prophylaxe mittels niedermolekularen Heparins durchgeführt werden.

Ebenfalls sind eine Gabe von Blutprodukten sowie eine angemessene Analgesie und Sedierung angeraten (Dellinger et al. 2013).

Eine Therapie mit Immunglobulinen wird nicht empfohlen (Dellinger et al. 2013), da die Ergebnisse einer großen Multicenter-Studie keine signifikante Reduktion der Mortalität ergaben (Werdan et al. 2007). Als weiterer Fokus der Sepsis-Therapie galt Selen; auch dieser Therapieansatz wird nicht mehr von den SSC Guidelines empfohlen (Dellinger et al. 2013). Es konnte kein signifikanter Vorteil bei Patienten mit Sepsis in Bezug auf die Länge des Krankenhausaufenthaltes, die Dauer der Antibiotikatherapie oder eine Besserung des *Sequential Organ Failure Assessment-Scores* dargestellt werden, ebenso wenig ließ sich ein Effekt auf die Mortalitätsrate finden (Angstwurm et al. 2007; Z Wang et al. 2009).

Das *Recombinant Human Activated Protein C* (rhAPC) wurde in den SSC Guidelines von 2004 noch zur Therapie der Sepsis empfohlen (Dellinger et al. 2004). 2008 wurde die Therapieempfehlung auf Sepsis-Patienten mit einem APACHE-II-Score ≥ 25 eingegrenzt, da eine Effektivität bei weniger kranken Patienten und Kindern nicht bestätigt werden konnte (Bernard et al. 2001). Das rhAPC steht nun aufgrund fehlender Wirkung nicht länger zu Therapiezwecken zur Verfügung (Dellinger et al. 2013).

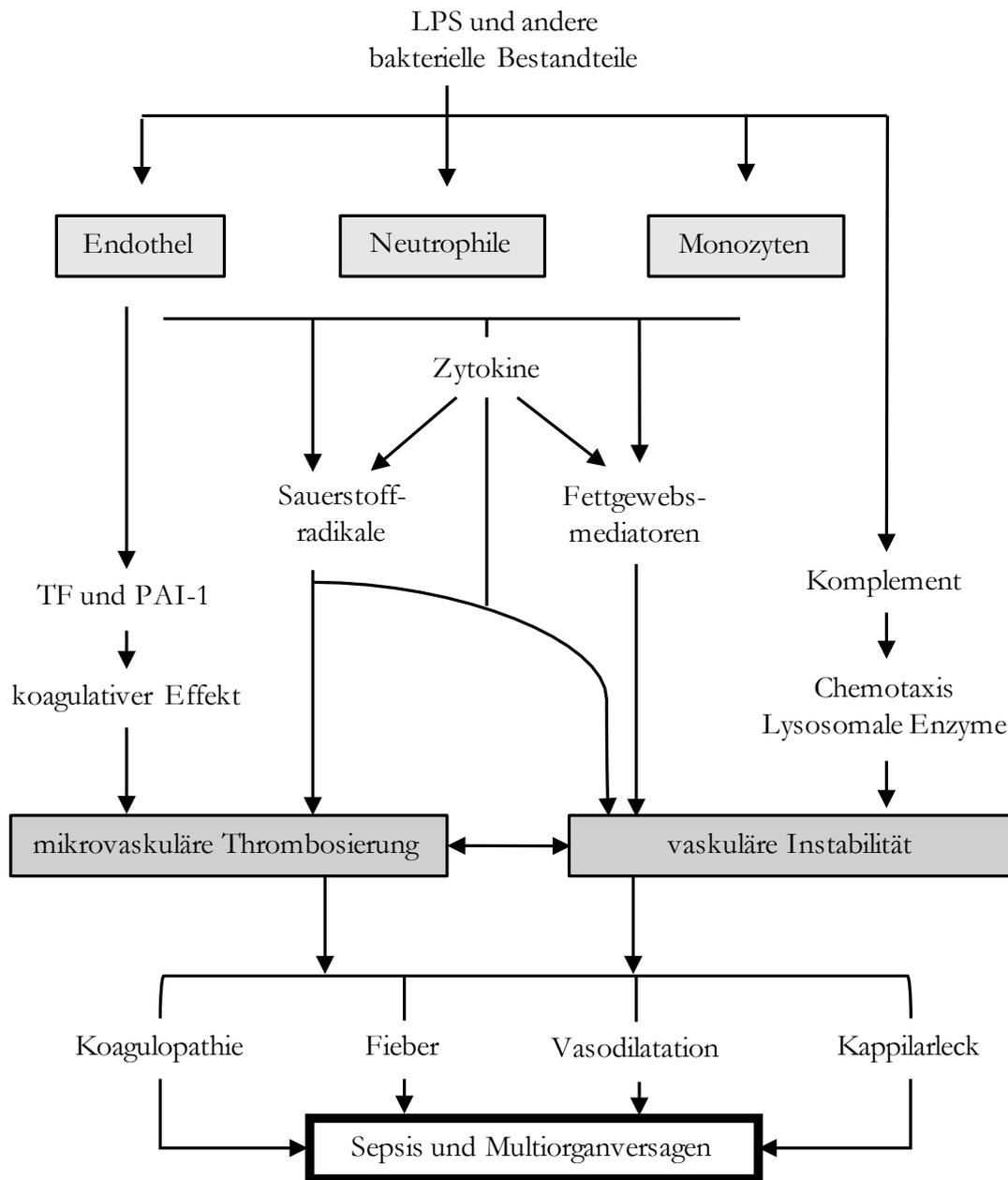
Eritoran wurde in einer Phase-3-Studie von Opal et al. untersucht. Diesem Inhibitor des MD2/TLR4-Signalwegs konnte jedoch in einer Doppelblindstudie kein signifikanter Effekt der Mortalität gegenüber dem Placebo nachgewiesen werden (Opal et al. 2013).

1.2 Die Aktivierung des Immunsystems durch die Sepsis

Das Immunsystem kann in das angeborene und das erworbene Immunsystem eingeteilt werden. Diese beiden Teile haben unterschiedliche Funktionsweisen und Wirkmechanismen, sind jedoch eng vernetzt und dienen der Immunabwehr eines Organismus (Medzhitov und Janeway 2000). Das angeborene Immunsystem besitzt in seiner Funktion Rezeptoren, welche Strukturen der Pathogene erkennen können. Die Voraussetzung zur Aktivierung des Immunsystems besteht darin, körpereigene von pathogenen Strukturen unterscheiden zu können (Medzhitov und Janeway 2000).

Die Sepsis lässt sich in zwei Phasen der Immunreaktion einteilen, einer frühen pro-inflammatorischen und einer späten anti-inflammatorischen Reaktion (Bone et al. 1997). Die Erste ist eine pro-inflammatorische Reaktion, wobei eine lokal begrenzte inflammatorische Reaktion der kontrollierten Eliminierung eines Erregers dient, wohingegen eine unkontrollierte inflammatorische Reaktion (Bone et al. 1992; Stone 1994; Warren 1997) wie bei einer Sepsis in einer Kaskade von Organdysfunktionen bis hin in Multiorganversagen resultieren kann (Cohen 2002).

Diese erste Phase ist charakterisiert durch die Aktivierung von Zytokinen, vor allem Interleukin(IL)-1 und IL-6, die einen Einfluss auf die Gerinnung ausüben, und Tumornekrosefaktor (TNF) α (Cohen 2002; Levi und Ten Cate 1999). Diese initiieren die Ausschüttung von sekundären Mediatoren, welche die inflammatorische Immunantwort des Organismus zur Bekämpfung eines infektiösen Stimulus verstärken (Cohen 2002). Die Reaktion eines Organismus auf einen Infektionsstimulus ist dennoch weitaus komplexer, so sind neben pro- auch anti-inflammatorische Prozesse involviert (van der Poll und Opal 2008). Diese zweite Phase, die anti-inflammatorische Reaktion, auch *Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome* (CARS) genannt, ist ursprünglich beschrieben als die Inkompetenz eines Organismus, einen infektiösen Stimulus zu bekämpfen (Ward et al. 2008). Das Level der steigenden anti-inflammatorischen Zytokine bildet die steigende Zahl der Bakterien im Organismus ab (Ashare et al. 2005). Zu diesen Mediatoren gehören unter anderem das IL-10, der lösliche TNF- α -Rezeptor und das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) (Bone et al. 1997). Durch das Lipopolysaccharid (LPS) und die Endo- und Exotoxine kommt es zur Aktivierung des Gerinnungssystems und zu einer endothelialen Dysfunktion, welche eine disseminierte, intravasale Gerinnung auslöst (Levi und Ten Cate 1999; van der Poll und Opal 2008). Im Verlauf einer Sepsis werden die pro-inflammatorischen Reaktionen für den kollateralen Gewebeschaden verantwortlich gemacht, wohingegen die anti-inflammatorischen Reaktionen für die Anfälligkeit von sekundären Infektionen eine Rolle spielen, so schreibt Angus et al. (Angus und van der Poll 2013).



TF – Tissue Factor, PAI-1 – Plasminogen Activator Inhibitor Type 1

Abbildung 3 Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens

Modifiziert nach Cohen 2002, S. 3.

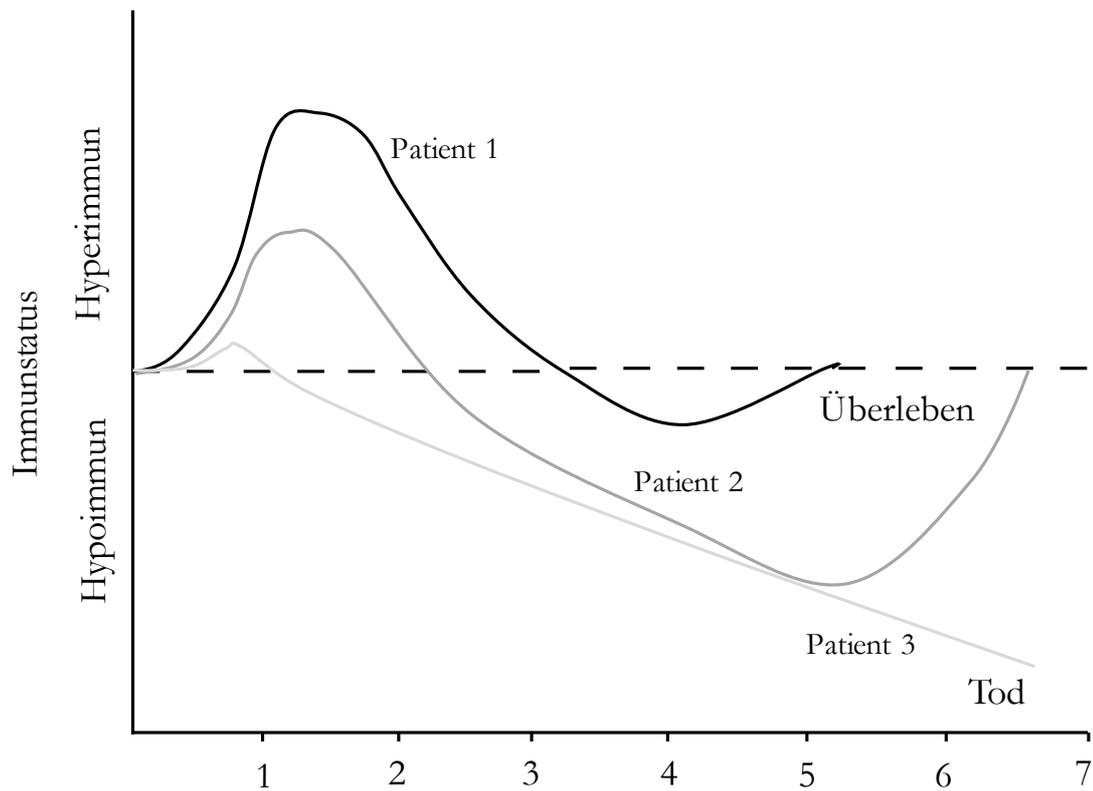


Abbildung 4 Verschiedene Immunantworten

Drei verschiedene immunologische Antworten auf Sepsis von drei hypothetischen Patienten mit unterschiedlichem Vorerkrankungsstatus. Die Schwere der anti-inflammatorischen (CARS) Immunantwort in Relation zu der pro-inflammatorischen (SIRS) Immunantwort bestimmt in vielen Fällen den Krankheitsverlauf.

Modifiziert nach Ward et al. 2008, S. 12.

1.2.1 Bakterielle Strukturen zur Erkennung durch das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem nutzt hier insbesondere die Erkennung von molekularen mikrobiellen Strukturen, den sogenannten *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Janeway 1989). Folgende Eigenschaften sind bezeichnend für die PAMPs (Medzhitov und Janeway 2000):

- PAMPs werden nur von mikrobiellen Pathogenen produziert, nicht aber vom Organismus selbst. Beispielsweise werden LPS von gramnegativen Bakterien produziert. Dadurch kann das angeborene Immunsystem zwischen Organismus „selbst“ und „fremd“ differenzieren.
- PAMPs stellen ein unabdingbares Element für das Überleben der Pathogene dar. Sie können nicht verändert werden und somit einer Immunreaktion nicht entkommen („*Escape Mutants*“). Dies macht die PAMPs zu einem effektiven Angriffsort für das angeborene Immunsystem.
- PAMPs sind größeren Gruppen von Mikroorganismen gemein, so haben beispielsweise alle gramnegativen Bakterien die LPS-Struktur. Dies bedeutet, dass eine große Anzahl von Mikroorganismen durch eine relativ geringe Anzahl von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, unter anderem von den *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), erkannt werden.
- PAMPs sind häufig „molekulare Kennzeichen“ („*Molecular Signatures*“) für eine bestimmte Klasse von Bakterien, wie beispielsweise das LPS für gramnegative Bakterien. PAMPs weisen also nicht nur auf das Vorhandensein einer Infektion hin, sondern auch auf die Herkunft des Pathogens. Dadurch kann das angeborene Immunsystem gezielter gegen die eingedrungenen Mikroben vorgehen.

Die Lipopolysaccharide (LPS) sind PAMPs, welche eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielen. LPS machen den Hauptbestandteil (70 %) der äußeren Membran gramnegativer Bakterien aus; zudem gelten sie als Endotoxin (Morrison und Ulevitch 1978; van der Poll und Opal 2008). Der Unterschied zwischen Endo- und Exotoxinen liegt in ihrem Abwehrmechanismus gegen Pathogene im Organismus. Die Endotoxine bewirken eine aktive Zellantwort des Organismus, wohingegen Exotoxine die Pathogene abtöten oder die Zellfunktionen lähmen (Rietschel et al. 1994). Das LPS (**Abbildung 5**) wird aufgebaut aus phosphoryliertem Lipid A (Lipid A) und einem hydrophilen Polysaccharid (PS). Das Lipid A bildet die äußere Membran der Bakterien. Die PS, welche das innere der bakteriellen Zellwand bilden, sind aufgeteilt in einen Kernoligosaccharid (*Core Oligosaccharide*), bestehend aus 10-12 Zuckern, und einer Serotyp-spezifischen Polysaccharidkette (O-Kette) (Caroff et

al. 2002). Die Lipid-A-Komponente des LPS vermittelt dessen toxischen Effekt durch die Aktivierung verschiedener Zellen des Organismus, wie mononukleäre Zellen, Endothel- und Glattmuskelzellen, polymorphkernige Granulozyten, Thrombozyten (Rietschel et al. 1994).

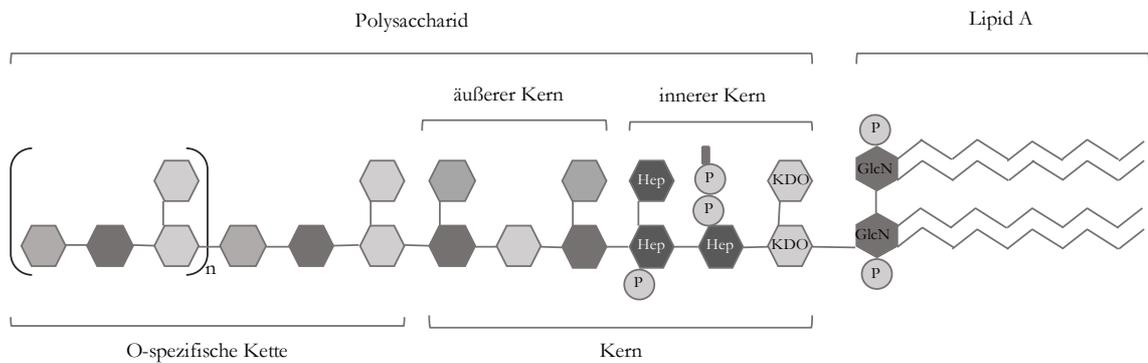


Abbildung 5 Struktur von LPS

Die Struktur des LPS besteht aus dem Lipid A und einem Polysaccharid (PS). Das Bindestück zwischen dem Lipid und dem Kern wird durch das *3-desoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic Acid* (KDO) gebildet. Das PS ist in zwei Regionen geteilt, das Kernoligosaccharid (*Core Oligosaccharide*) und eine O-spezifische Kette. Der Kern besteht aus einem inneren Teil, welcher Heptosereste (Hep) und Phosphat enthält, und einem äußeren Teil, welcher größtenteils aus neutralen Hexosen oder Aminohexosen besteht.

Modifiziert nach Caroff et al. 2002, S. 916.

1.2.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zur Pathogen-Erkennung

Pattern Recognition Receptors (PRRs) sind spezielle Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die für die Erkennung von beispielsweise mikrobiellen Strukturen zuständig sind (Medzhitov und Janeway 2000). Die Keimbahn-kodierten PRRs sind in vier Hauptklassen beschrieben worden – *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), C-Typ-Lectin-Rezeptoren, *Retinoic Acid Inducible Gene 1-like*-Rezeptoren und *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain* (NOD)-*like*-Rezeptoren (NLRs) (Bianchi 2007). Die PRRs sind strukturell und funktionell heterogene Proteine, die in Körperflüssigkeiten sowie auf der Zelloberfläche, vor allem auf Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten, oder im Zellinneren ausgebildet werden (Medzhitov und Janeway 2000; Medzhitov et al. 1997). Neben diesen PAMPs können PRRs zusätzlich Mediatoren erkennen, die von krankem Gewebe, wie Nekrosen, oder ischämischem Gewebe ausgehen, sogenannte *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) (Akira et al. 2006; Bianchi 2007; Mollen et al. 2006). Die für diese Arbeit wichtige Gruppe der PRRs sind die TLRs. Der erste Rezeptor der Toll-Familie wurde 1988 von Hashimoto et al. in der *Drosophila* entdeckt (Hashimoto et al. 1988). Später konnte die Rolle des Toll-Rezeptors in der Immunabwehr der *Drosophila* gegen den *Aspergillus fumigatus* beschrieben werden (Lemaitre et al. 1996). 1997, nur ein Jahr später, wurde erstmals ein homologer Rezeptor des Toll-Rezeptors in Säugetieren und Menschen gefunden, der *Toll-like*-Rezeptor (TLR) genannt wurde. Der erste TLR, der charakterisiert wurde, war der TLR4 (Medzhitov et al. 1997).

Bis heute sind 13 *Toll-like*-Rezeptoren (TLR1-TLR13) in Säugetieren bekannt. Von den 13 Rezeptoren kommt der TLR10 im Menschen, aber nicht in Mäusen vor und TLR11, TLR12 und TLR13 kommen in Mäusen vor, wurden aber im Menschen nicht entdeckt (van der Poll und Opal 2008). Die TLRs sind membranständige und signalleitende Rezeptoren. Alle TLRs sind Typ-I-Transmembranproteine und werden aufgrund ihrer Homologie der intrazellulären Domäne der IL-1-Rezeptor/TLR-Superfamilie zugeordnet. Diese intrazelluläre Domäne besteht hauptsächlich aus der Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, welche essentiell für die Signalübertragung der TLRs ist (Akira und Takeda 2004; Bell et al. 2003; Docke et al. 1997; Dunne und O'Neill 2003; Godowski 2005). Der wesentliche Unterschied der beiden Rezeptortypen besteht in der extrazellulären Domäne, welche bei den IL-1-Rezeptoren aus drei Immunglobulin-Domänen besteht und bei den TLRs aus 18-26 *Leucin Rich Repeats* (LRR) von je 24-29 Aminosäuren Länge (**Abbildung 6**). Diese LRRs dienen den TLRs direkt zur Erkennung der unterschiedlichen pathogenen Molekülstrukturen (Haziot et al. 1988). Die TLRs haben eine wichtige Aufgabe in der frühen Verteidigung des Organismus und werden dem-

entsprechend von Zellen exprimiert, die wesentlich in der Erkennung von Pathogenen involviert sind (beispielsweise neutrophile Granulozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten) (Armant und Fenton 2002).

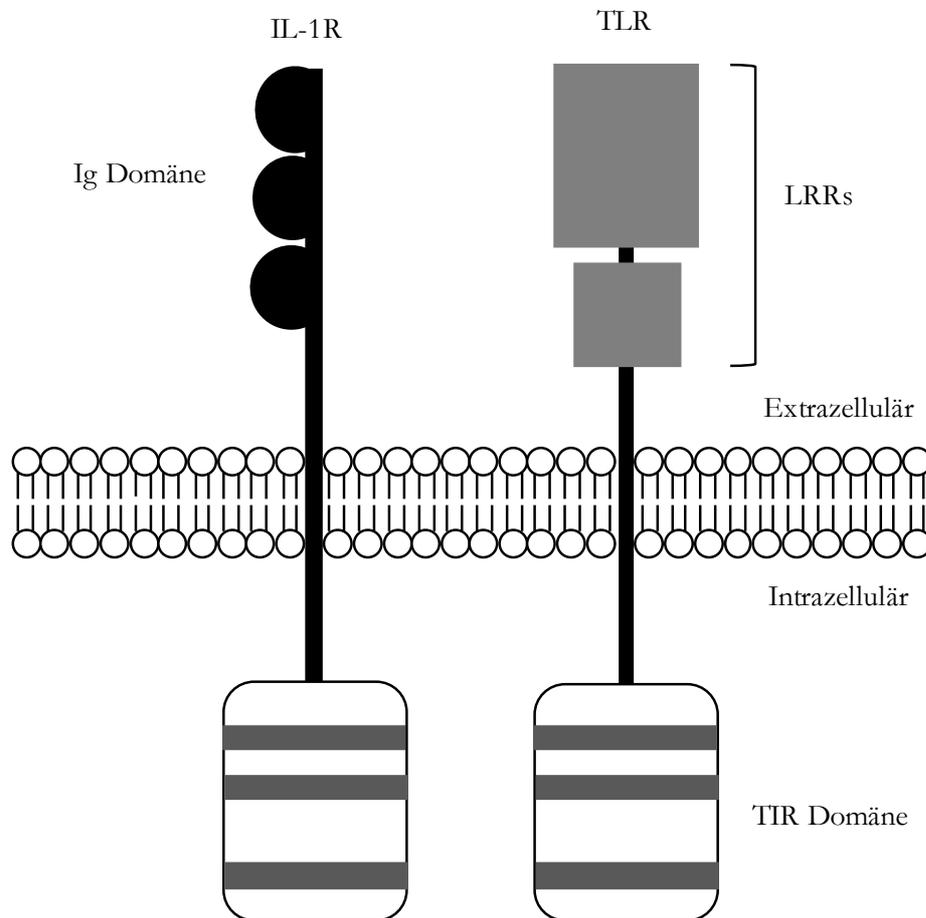


Abbildung 6 TLR-Aufbau

Die zytoplasmatische Domäne haben die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) und die Interleukin-1-Rezeptoren (IL-1Rs) gemein und wird Toll/IL-1R (TIR)-Domäne genannt. In der TIR-Domäne sind drei homologe Regionen typisch. Die extrazelluläre Domäne der beiden Rezeptoren sind jedoch sehr unterschiedlich: Der TLR zeichnet sich durch die *Leucine Rich Repeats* (LRR) aus, wogegen der IL-1R 3 Immunglobulin (Ig)-Domänen besitzt.

Modifiziert nach Akira und Takeda 2004, S. 500.

Durch die unterschiedlichen TLRs wird eine Reihe von mikrobiellen Produkten erkannt (**Abbildung 7**). TLR1 und TLR6 können Triacyl- bzw. Diacyl-Lipopeptide erkennen, indem sie mit TLR2 heterodimerisieren (Akira et al. 2006), des Weiteren werden mikrobielle Lipoproteine und weitere Bestandteile von Pilzen und Protozoen detektiert (Akira und Takeda 2004; Szabo et al. 2006). TLR3 erkennt virale doppelsträngige Ribonukleinsäure (*Ribonucleic Acid* RNA = RNS, *Double Stranded Ribonucleic Acid*, dsRNA) und deren synthetisches Analogon *Polyriboinosinic:polyribocytidilic Acide* (poly(I:C)) (Alexopoulou et al. 2001). TLR4 besitzt *Cluster*

of *Differentiation* (CD) 14 und *Myeloid Differentiation Protein* (MD)-2 als Ko-Rezeptoren und ist damit der wichtigste Rezeptor in der Bildung des LPS-Erkennungskomplexes (Medzhitov und Janeway 2000; Poltorak et al. 1998). Ein Hauptbestandteil von bakteriellen Geißeln ist das Flagellin, welches von dem TLR5 erkannt wird (Hayashi et al. 2001). TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 bilden die Gruppe der intrazellulären TLRs, welche auf den Membranen von Endosomen zum Lumen gerichtet exprimiert sind (Bell et al. 2003). Die *Short Interfering RNA* (siRNA) ist ein Ligand des TLR7 (Hornung et al. 2005). Weitere Liganden des TLR 7 sind synthetische einzelsträngige (*Single Stranded RNA*, ssRNA) und nicht methylierte RNA (Diebold et al. 2004). TLR8 erkennt ebenfalls ssRNA (Heil et al. 2004). TLR9 ist in die Erkennung von DNA-Bestandteilen bakterieller sowie viraler nicht methylierte Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Motive involviert (Hemmi et al. 2000).

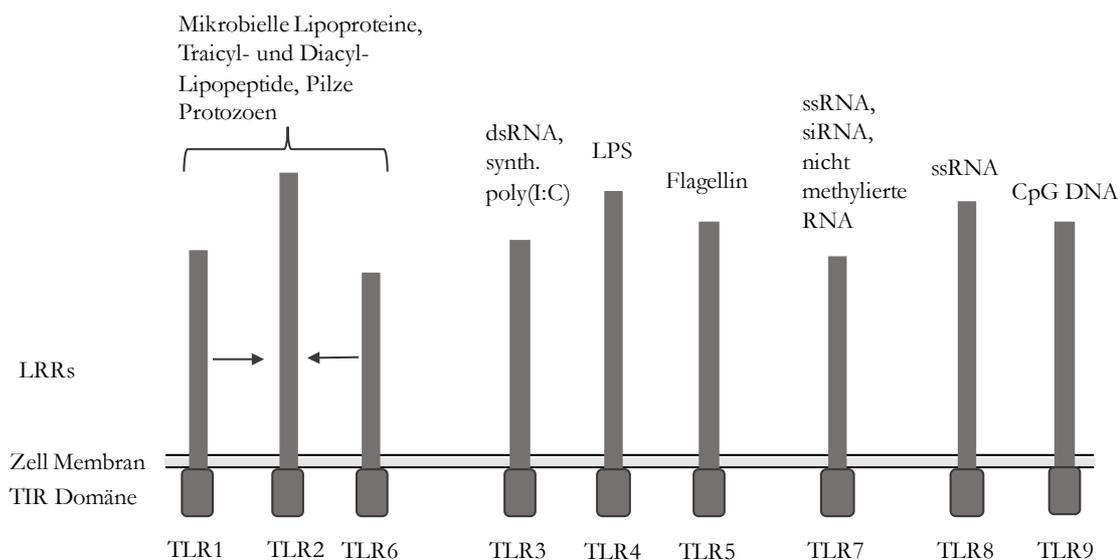


Abbildung 7 Toll-like-Rezeptoren

Strukturelle Darstellung der humanen *Toll-like-Rezeptoren* (TLR1-9). Charakteristisch ist für jeden Rezeptor die extrazelluläre LRR-Domäne, welche in die Ligand-Bindung involviert ist. Die intrazelluläre TIR-Domäne ist bei allen TLRs identisch und in die weitere Signalübertragung involviert. Beispielsweise sind einige Liganden der verschiedenen Rezeptoren aufgeführt. Die Pfeile markieren die mögliche Dimerisierung zwischen TLR1, TLR2 und TLR6. Intrazellulär werden TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 ausgebildet.

Modifiziert nach Armant und Fenton 2002, S. 2.

1.2.2.1 *Toll-like*-Rezeptor-4-Lipopolysaccharid-Interaktion

Lipopolysaccharide (LPS), das Endotoxin, welches aus der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien freigesetzt wird, wird über das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) im Organismus gebunden. Das LBP ist ein Akute-Phase-Protein, das in der Leber synthetisiert wird und im Blutstromkreis präsent ist (Akira et al. 2006; Arbour et al. 2000). Das LPS bildet mit dem LBP einen Komplex und wird von dem Zelloberflächen-Glykoprotein CD14 gebunden (Adamzik et al. 2011; Stanilova 2010). Weder das LBP noch das *Glycosylphosphatidylinositol* (GPI)-verankerte CD14 besitzen eine intrazelluläre Domäne, von der die Signaltransduktion des LPS-LBP-Komplexes ausgehen könnte (Stearns-Kurosawa et al. 2011). Das LPS wird von CD14 auf den TLR4/MD2-Rezeptorkomplex übertragen, wodurch der TLR4 aktiviert wird (Akira und Takeda 2004; van der Poll und Opal 2008). TLR4 reagiert auf eine Vielzahl von mikrobiologischen Bestandteilen und muss deshalb präzise reguliert werden, um eine schädliche Immunreaktion zu vermeiden. Solche negativ beeinflussenden Regulatoren von TLR4 sind *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 short* (MyD88), *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase* (IRAK), ST2, *single-immunoglobulin interleukin-1-receptor-related molecule* (SIGIRR) und *Toll-Interacting Protein* (TOLLIP) (Liew et al. 2005).

Die Aktivierung des TLR4 kann mehrere verschiedene Signalwege auslösen. Einer ist die MyD88-abhängige und ein weiterer die *TIR-Domain Containing Adaptor Inducing IFN- β* (TRIF)-abhängige Signalkaskade. Diese beiden Signalwege können zu unterschiedlichen Phasen Tumornekrosefaktor- α B (NF α B) aktivieren, der MyD88-Signalweg in der frühen Phase und der TRIF-Signalweg in der späten Phase der Signalkaskade (Yamamoto et al. 2002). Der MyD88-abhängige Signalweg ist vom *TIR-Domain-Containing Adaptor Protein* (TRAP) zur Aktivierung des Signalweges abhängig, und *TRIF-Related Adaptor-Molecule* (TRAM) ist essentiell für den TRIF-abhängigen Signalweg (Fitzgerald et al. 2001; Yamamoto et al. 2002).

MyD88 verbindet sich über seine Death Domain (DD) mit IRAK4, welches einen Komplex mit IRAK1 bildet und TNF Receptor Associated Factor 6 (TRAF6) aktiviert (Akira und Takeda 2004; Hayden et al. 2006). TRAF6 aktiviert durch Ubiquitinierung den *Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1* (TAK1)-Komplex und weiter den I α B-Kinase-Komplex (IKK), welcher aus dem IKK α , IKK β und NF α B *essential modifier* (NEMO) besteht (Adhikari A et al. 2007). Daraufhin wird durch die Phosphorylierung des I α B-Proteins NF α B in den Nukleus transloziert. Diese I α B-Proteine sind Inhibitor-Proteine, die im Zytoplasma mit dem NF α B vorliegen. Durch den TLR-Signalweg wird meistens eine Form des NF α B aktiviert, die aus RelA und p50 ein Heterodimer bildet (Hayden et al. 2006).

Zur gleichen Zeit aktiviert der TAK1-Komplex den *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalweg, welcher die Phosphorylierung von AP-1 und die Transkription und Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie IFN β (Kawai und Akira 2007) bewirkt.

Im TRIF-abhängigen Signalweg interagieren TRIF und TRAF3 mit TBK1 und IKK, diese Kinasen aktivieren *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) durch Phosphorylierung (Yamamoto et al. 2002). IRF3 dimerisiert zu einem Homodimer und transloziert in den Nukleus, um die Transkription zu beeinflussen (Kawai und Akira 2007). Das IRF3 aktiviert gemeinsam mit NF κ B die Promoter-Enhancer-Region des *IFN β* -Gens und somit dessen Produktion (Honda et al. 2006).

TRIF kann ebenfalls direkt mit TRAF6 interagieren (Sato et al. 2003) und somit durch Ubiquitinierung von RIP1 über eine späte Phase TAK1 aktiviert werden und somit über den Signalweg, wie der MyD88-abhängige Signalweg, auch NF κ B (Cusson-Hermance et al. 2005; Kawai und Akira 2007).

Sobald dieser Weg über den TLR4/MD2-Komplex ausgelöst wurde, findet eine Transkription des Faktors NF κ B und die Aktivierung von AP-1 statt. Dies wiederum stimuliert die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen und hat hierdurch einen relevanten Einfluss auf die Immunantwort eines infektiösen Geschehens (Kawai und Akira 2007; Mollen et al. 2006).

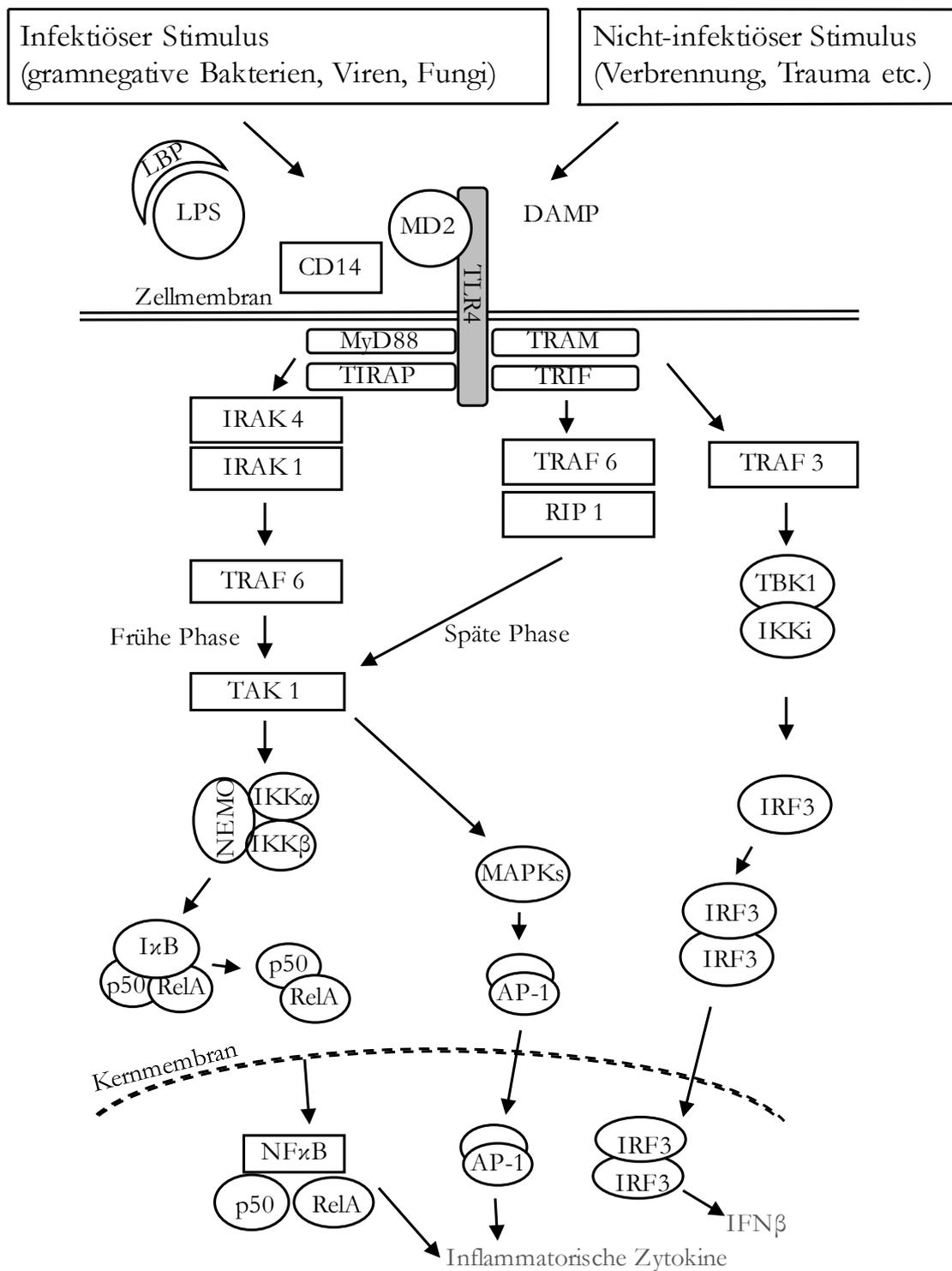


Abbildung 8 TLR4-Signalweg zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen

Modifiziert nach Kawai und Akira 2007, S. 463.

1.2.3 Genetischer Polymorphismus TLR4 rs11536889

Der TLR4 ist der am meisten untersuchte Rezeptor der TLR-Familie. Bei den Menschen ist der TLR4 auf dem Chromosom 9 (9q32-33) kodiert und beinhaltet drei Exons und zwei Introns (*Human Gene Nomenclature*, NCBI). Der *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), welcher in dieser Arbeit untersucht wurde, hat die *Reference SNP* (rs) #11536889. Dieser sitzt auf dem TLR4-Gen in der 3'-untranslatierten Region (UTR) an Position 117.704-117.717.

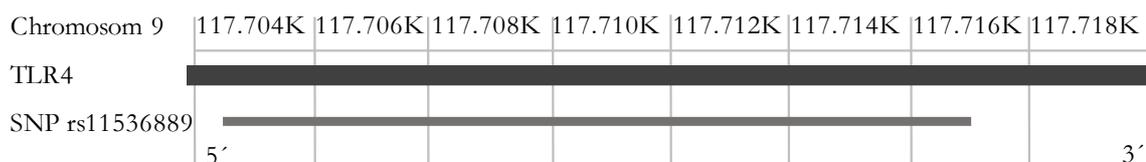


Abbildung 9 TLR4 rs11536889

Das TLR4-Gen mit dem markierten SNP rs11536889.

Modifiziert nach *Human Gene Nomenclature*, NCBI.

In der Arbeit von Sato et al. wurde nachgewiesen, dass der TLR4 rs11536889 einen regulatorischen Effekt auf die Translation von TLR4-Expression hat und somit die Antwort von LPS beeinflusst. Die Bedeutung dieses SNPs liegt wahrscheinlich während der posttranskriptionellen Phase in der Bindung von microRNA (K Sato et al. 2012). In einer großen Studie wurde 2004 eine Assoziation zwischen Prostatakrebs-Patienten und einer altersäquivalenten Kontrollgruppe aus Schweden festgestellt (Zheng et al. 2004). Bei *Helicobacter-pylori*-positiven japanischen Studienteilnehmern mit schwerer Magenatrophie wurde eine Assoziation zu TLR4 11536889 herausgefunden (Hishida et al. 2009). Zhou et al. belegten, dass der TLR4-rs11536889-SNP signifikant mit dem Wiederauftreten einer Hepatitis B nach Lebertransplantation assoziiert ist (Zhou et al. 2011). Des Weiteren beschrieben Miedema et al. den Zusammenhang des SNPs mit einem erhöhten Risiko von Chemotherapie-induzierten Neutropenien bei Kindern mit akuter lymphoblastärer Leukämie (Miedema et al. 2011). Eine Arbeitsgruppe in China hat 2014 die Assoziation des TLR4-Polymorphismus rs11536889 mit der Sepsis-Erkrankung untersucht und diese als signifikant erhöht gewertet (H Wang et al. 2014). All diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der rs11536889-SNP des TLR4-Gens Einfluss auf das menschliche Immunsystem und/oder maligne Krankheiten hat (K Sato et al. 2012).

1.3 Fragestellung

Die Sepsis stellt im intensivmedizinischen und im Krankenhausalltag nach wie vor eine große Herausforderung dar. Die Pathogenese und die Schwere des Krankheitsverlaufes bleiben jedoch teils ungeklärt (Angus und van der Poll 2013; Hotchkiss und Karl 2003). Die Entstehung einer Sepsis über eine unkontrolliert ablaufende Infektion im Organismus mit dem Grad der Organdysfunktion kann durch verschiedene Faktoren wie den Gesundheitsstatus des Patienten und den Primärfokus der Infektion beeinflusst werden (Levy et al. 2003). In verschiedenen Arbeiten wird darauf eingegangen, welche Relevanz TLR4 für Infektionen, vor allem durch gramnegative Bakterien, darstellt (Hishida et al. 2009; K Sato et al. 2012; Zhou et al. 2011). Auf der Grundlage dieser Untersuchungen über den Einfluss des TLR4-rs11536889-Genotyps auf den Verlauf einer Infektionskrankheit stellten wir uns die Frage, ob der regulierende TLR4-rs11536889-Genotyp einen Zusammenhang zu septischem Organversagen von kritisch kranken Patienten mit Sepsis während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation hat. Um eine ausreichend hohe Fallzahl zu erreichen, wurden die Patienten, die die Sepsis-Kriterien erfüllten, konsekutiv in Zusammenarbeit mit weiteren Promovenden in etwas über einem Jahr rekrutiert, das Blut im Labor untersucht und die klinischen Parameter der zu untersuchenden Organsysteme erhoben und mittels des *SOFA-Scores* und *APACHE-Scores* ausgewertet. Wobei unsere Hypothese ist, dass eine Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und der Morbidität und Mortalität einer repräsentativen kaukasischen Kohorte mit SIRS bzw. Sepsis besteht. Der Wildtyp GG wurde mit dem GC/CC verglichen (Mansur et al. 2014b).

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurde ein klinisch prospektives Studienmodell gewählt. Das Projekt „Bedeutung genetischer Polymorphismen der angeborenen Immunabwehr bei Sepsis und Organversagen“ (kurz Genosep) rekrutierte mit der Hilfe einer Arbeitsgruppe die 212 kaukasischen Patienten nach den Sepsis-Leitlinien (Reinhart et al. 2010). Dies fand auf zwei anästhesiologischen Intensivstationen (Station 0117 und 0118) und einer chirurgischen Intensivstation (Station 1014) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) unter der Woche täglich zwischen April 2012 und Mai 2013 statt. Grundsätzlich ausgeschlossen von der Studie waren Patienten:

- unter dem 18. Lebensjahr
- nicht kaukasischer Abstammung
- in Schwangerschaft oder Stillzeit
- mit immunsuppressiver oder Chemotherapie innerhalb der letzten 6 Wochen
- mit dokumentiertem oder mit dem dringenden Verdacht eines akuten Herzinfarkts in den letzten 6 Wochen
- mit der Diagnose einer chronischen Herzinsuffizienz Klasse IV nach der *New York Heart Association* (NYHA)
- mit einer Infektion des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)
- mit Therapielimitierung im palliativen Sinne, also ohne Option weiterer lebenserhaltender Maßnahmen
- mit einer Überlebenschance von unter 28 Tagen aufgrund einer unheilbaren Erkrankung inklusive einer therapierefraktären Krebserkrankung, einer Lungenerkrankung im Endstadium, einer terminalen Nierenerkrankung oder Sauerstoffpflichtigkeit im häuslichen Umfeld
- von neurologisch dauerhaftem vegetativem Status
- mit der Teilnahme an einer anderen klinischen Studie
- ohne Zustimmung zur Teilnahme an der Studie
- die selbst an der Studie mitwirkten oder deren Familienangehörige

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Georg-August-Universität Göttingen im Januar 2012 geprüft (Aktenzeichen 15/1/12) und erfüllt alle ethischen Anforderungen der Deklaration von Helsinki (Seoul 2008).

Eine Einverständniserklärung zur Teilnahme wurde von jedem Patienten oder dessen gesetzlichem Betreuer unterschrieben. Insgesamt wurden von der Doktorandengruppe 212 kaukasische Patienten mit septischem Krankheitsbild rekrutiert, zwei erfüllten die Ausschlusskriterien und wurden wieder herausgenommen (76 weiblich, 134 männlich; mittleres Alter 65, Spanne 19-91). Jedem Patienten wurden ca. 25 ml Blut in heparinhaltigen Monovetten und ca. 10 ml Blut in einer silikathaltigen Monovette entnommen. Das Blut in den Heparinmonovetten wurde zur Isolierung von mononukleären Zellen (*Periferal Blood Mononuclear Cells*, PBMC) verwendet und das Blut der silikathaltigen Monovette für die Herstellung einer Serumprobe. Dies geschah über einen vorhandenen zentralvenösen oder arteriellen Zugang. Die gewonnenen Proben wurden hinsichtlich des klinischen Verlaufes und des TLR4-rs11536889-Genotyps ausgewertet.

2.2 Material

2.2.1 Substanzen

Ampuwa®	Fresenius (Bad Homburg)
Bidestilliertes Wasser	Eigene Herstellung der Universitätsmedizin Göttingen
Buffer RLT-Plus <i>lysis buffer</i>	Qiagen (Hilden)
Ethanol 80 % (V/V)	B. Braun (Melsungen)
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare (Sweden)
Formaldehyde Solution 36,5-38 %	Sigma-Aldrich (USA)
Glycine (10x)	Qiagen (Hilden)
<i>hex</i> Primer random p(dN) ₆ 50 A ₂₆₀ units	Roche (Mannheim)
PBS (10x)	Qiagen (Hilden)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 100 mM	Active Motif (La Hulpe/Belgien)
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (PIC)	Active Motif (La Hulpe/Belgien)
TaqMan® Genotyping Master Mix 10 ml	Applied Biosystems (USA)
TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x	Roche (New Jersey, USA)
Tryptan-Blau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich (USA)
PCR = <i>Polymerase Chain Reaction</i>	

2.2.2 Kits und Assays

AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50)	Qiagen (Hilden)
QuantiFect® Reverse Transcription Kit 50 x 20 µl	Qiagen (Hilden)
TaqMan® Gene Expression Assays TLR4 Hs00152939_m1 GAPDH Hs99999905_m1	Applied Biosystems (Darmstadt)
TaqMan® SNP Genotyping Assays TLR4UTR C_31784034_10 TLR4cod C_11722238_20	Applied Biosystems (Darmstadt)

2.2.3 Gebrauchswaren

Deckgläser für Haemocytometer 20 x 26 mm	Menzel GmbH & Co KG (Braunschweig)
Disposable single sealed cuvettes 50-2.000 µl	Eppendorf (Hamburg)
<i>Gentle Skin sensitive</i> REF 1221	Rösner-Mautby Meditrade (Kiefersfelden)
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Darmstadt)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film PCR compatible	Applied Biosystems (Darmstadt)
Pipettenspitzen	
Premium Tips 10 µl	Biozym (Oldendorf)
TipOne 100 µl <i>Bevelled</i> , Filter Tip (<i>sterile</i>)	Starlab (Hamburg)
TipOne RPT 1.000 µl <i>Graduated</i> , Filter Tip (<i>sterile</i>)	Starlab (Hamburg)
Reaktionsgefäße	
Leucosep™ Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
BD Falcon <i>Polypropylene Conical</i> Tube 50 ml	BD Biosciences (USA)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhre 57 x 15,3 mm 5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)

2.2.4 Geräte

Bio Photometer 8,5 mm	Eppendorf (Hamburg)
Elektrophorese Gerät Model H5	Life Technologies (USA)
Eppendorf Reference® Pipette 1.000, 100, 10	Eppendorf (Hamburg)
Gilson PIPETMAN 200	Gilson (Frankreich)
IVO Handzähler	Blaumer IVO (Villingen-Schwenningen)
Mikroskop ID03	Zeiss (Jena)
PHILIPS Whirlpool M611 Mikrowelle	Whirlpool Benton Harbor (USA)
Multipipette® plus	Eppendorf (Hamburg)
Neubauer <i>Improved</i>	Laboroptik Friedrichsdorf
neoLab® Eisbad 1-6030	neoLab Migge (Heidelberg)
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Sicherheitswerkbank Lamin Air® LB-48-C	Herarus Instruments (Hamburg)
Spannungsquelle POWER PAC 300	Bio-Rad (München)

StepOne Plus Real-Time PCR Incl. Software Version 2.1	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)
Vortexmischer REXA 1R	Heidolph (Schwabach)
Zentrifugen	
Centrifuge 3K30	Sigma (Osterode am Harz)
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
Rotanta 96R	Hettich (Lauenau)
Rotaxa/A	Hettich (Lauenau)

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung der *Periferal Blood Mononuclear Cells*

Zur Isolierung der *Periferal Blood Mononuclear Cells* (PBMC) wurden 15 ml Ficoll als Separationsmedium in einem 50-ml-Leukosep™-Röhrchen (mit Trennscheibe) für 30 Sekunden bei Raumtemperatur und 916 x g zentrifugiert, durch die Drehkraft wurde das Ficoll unter die Trennscheibe gedrückt. Dann wurden 25 ml Heparin-Blut darauf pipettiert, nachdem es von dem Lithium-Heparinat-Granulat getrennt wurde. Die Leukosep™-Röhrchen wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 916 x g ohne Bremse zentrifugiert, wobei sich ein Dichtegrad ausbildete, von oben nach unten Plasma, PBMC und Erythrozyten/Granulozyten bildeten das Sediment. Alles, was sich oberhalb der Trennscheibe befand, wurde in ein neues 50-ml-Falconröhrchen überführt und danach dreimal mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS)-Lösung für 10 Minuten bei 4 °C und 292 x g mit Bremse zentrifugiert. Dieses Waschen entfernte das Plasma und die Reste an Ficoll. Bevor der 3. Waschgang durchgeführt wurde, fand die Zellzählung statt: Die Zellen wurden in 10 ml PBS suspendiert, davon wurden 20 µl mit 20 µl Trypan-Blau gemischt. Die Errechnung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch durch eine Neubauer-Zählkammer. Nach Durchführung des 3. Waschganges wurden die Zellen auf 1,5-ml-Eppendorfgefäße aufgeteilt, sodass mindestens 2 Eppendorfgefäße mit mindestens 2×10^6 Zellen entstanden. Die Eppendorfgefäße wurden dann bei 4 °C und 128 x g 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Rest PBS-Lösung entfernt. Zu diesen Zellen wurde 350 µl *Buffer RLT plus/Mercaptoethanol* (Verhältnis 100:1) beigelegt. Die Zellen wurden durch 30 Sekunden Vortexen lysiert und homogenisiert und zu weiteren Verarbeitungszwecken bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2 Extrahierung genomischer DNA aus PBMC

Für die Extraktion von genomischer (g)DNA aus PBMC wurde das AllPrep DNA/RNA Mini Kit verwendet. Die Extrahierung wurde nach dem Protokoll „*Simultaneous Purification of Genomic DNA and Total RNA from Animals Cells*“ durchgeführt.

Vorbereitung und Homogenisierung:

Das Lysat der PBMC, das bei -20 °C aufbewahrt wurde, wurde kurz auf RT gebracht und durch kurzes Vortexen homogenisiert. Dann wurde das Lysat auf die QIAshredder-Säule pipettiert und für 2 Minuten bei 13.000 Umdrehung pro Minute (*revolutions per minute* = rpm) zentrifugiert.

Bindung von DNA an eine Matrix:

Dieses homogenisierte Lysat wurde auf die AllPrep-DNA-Säule gebracht und für 30 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Hierbei wurde die DNA durch die Membran adsorbiert.

Reinigung der genomischen (g)DNA:

Um die gDNA zu reinigen, wurden für AllPrep-DNA-Säule zwei Waschschriffe durchgeführt: 1) mit 500 µl AW1-Puffer (Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm); 2) mit 500 µl Puffer AW2 (Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm). Um die gDNA freizusetzen, wurde dann die AllPrep-DNA-Säule in ein neues 1,5-ml-Gefäß überführt und 50 µl EB-Puffer hinzugefügt. Nach 1 Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurde das 1,5-ml-Gefäß zur Eluierung der gDNA für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Eingelagert wurde das DNA-Eluat bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Photometrische Messung der DNA-Konzentration und DNA-Integrität

Die Messung der Konzentration und Integrität von DNA-Proben erfolgte am Photometer. Die Amplifizierung von genetischem Material wurde mittels *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) durchgeführt. Hierbei ist eine sehr genaue gDNA-Menge pro Well nötig. Die Konzentration von gDNA pro Probe musste also zuerst bestimmt werden, und dann wurde diese auf die vorgegebene Menge an gDNA verdünnt. Zur Messung der Absorption wurden 4 µl der extrahierten DNA mit 96µl Ampuwa verdünnt. Die DNA-Integrität wurde aus dem Quotienten der 260-nm-Extinktion und 280-nm-Extinktion in einer photometrischen Messung bestimmt. Die Nukleinsäuren-Konzentration wurde bei 260 nm errechnet (1 unit bei 260 nm sind 40 µl DNA pro ml). Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm, daher konnte eine Annäherung der Reinheit der DNA-Proben durch das Verhältnis aus den Werten von 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Der Wert für reine DNA-Lösung lag zwischen 1,9 und 2,1. Je mehr DNA in der Probe vorhanden war und je weniger Proteinverunreinigungen, desto größer war die gemessene Extinktion.

2.3.4 Genotypisierung mittels allelischer Diskriminierung

Anhand von allelischer Diskriminierung während der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde der Genotyp der Proben bestimmt. Durch die PCR wird die DNA vervielfältigt. Der Ansatz der PCR enthält die zu reproduzierende DNA-Sequenz (*Template*), eine DNA-Polymerase und zwei Primer. Diese Primer flankieren die gefragte SNP-Stelle und somit den Startpunkt der DNA-Polymerase am *Template*. Die DNA-Polymerase (durch ihre 5' → 3'-Exonukleaseaktivität) erstellt einen neuen, komplementären

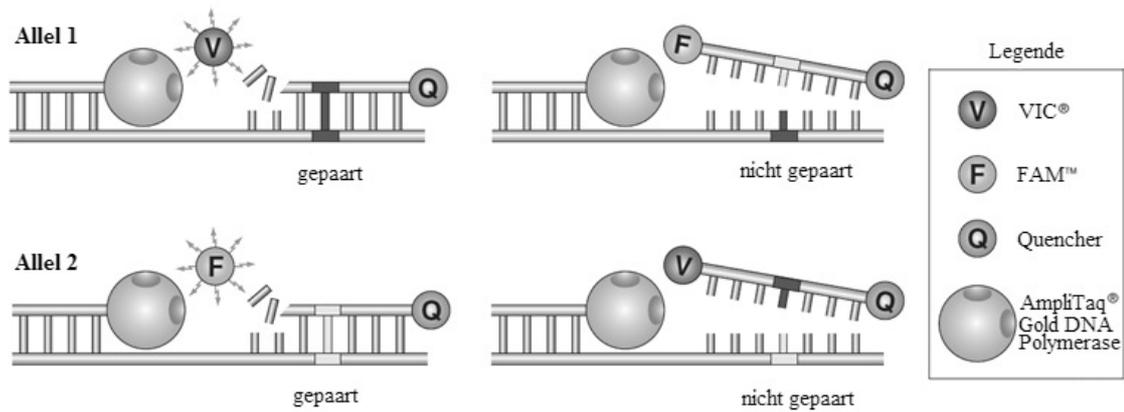
DNA-Strang nach der Vorlage der *Template*-DNA (Holland et al. 1991). Zusätzlich sind noch die Basen, Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin, aus welchen die komplementäre DNA entstehen soll, notwendig. Eine PCR durchläuft 40-50 Wiederholungen eines Zyklus, der in 3 Phasen eingeteilt werden kann: 1. Die Denaturierung, in der die Wasserstoffbrücken der dsDNA (doppelsträngige DNA) gelöst werden und somit die DNA-Polymerase und Primer an die DNA binden können. 2. Primerhybridisierung. Bei einer präzisen Temperatur (um die 60 °C) lagern sich die Primer an die Zielsequenz der DNA-*Templates*. Eine Temperatur von ca. 3 °C unter dem Schmelzpunkt ist angemessen, um eine effiziente Anlagerung zu gewährleisten. 3. Elongation. Hierbei wird nun am 3`-Ende der Primer die DNA-Synthese (5`- → 3`-Synthese) katalysiert. Dies führt zu dem exponentiellen Anstieg der DNA-Mengen, welche aus Mutter- und Töchtersträngen bestehen.

Mit der *Real Time* PCR wurde eine Methode entwickelt, mit der sich gleichzeitig die gebildete DNA quantifizieren lässt. Dies gelingt durch das Hinzufügen von komplexen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden. Zur Unterscheidung beider Allele (allelische Diskriminierung) ist zudem eine *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)-Sonde notwendig, welche für die korrekte Anlagerung der Nukleotid-Sequenzen sorgt. Dank der Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich die beiden Allele voneinander unterscheiden (Lee et al. 1993).

In dieser Arbeit wurden die TaqMan™-Sonden genutzt. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie ein nicht fluoreszierendes *Quencher* (*to quench* engl. – abfangen) hatten und ein fluorogenes Farbstoffmolekül (*Reporter*), entsprechend am 3`-Terminus und am 5`-Terminus. Der fluoreszierende Effekt wurde durch den *Quencher* unterdrückt, solange dieser eng an dem *reporter*-Farbstoff lag und die Sonde in unverändertem Zustand war (Cardullo et al. 1988). Die Taq-Polymerase synthetisierte einen komplementären DNA-Strang ausgehend vom Vorwärtsprimer und spaltete mit der 5`-3`-Exonukleaseaktivität die gebundene Taq-Sonde ab. Durch die Abspaltung entzog sich die Sonde dem Einfluss des *Quencher*-Moleküls und der fluoreszierende Farbstoff wurde freigesetzt (**Abbildung 10**). Die Fluoreszenz stieg exponentiell bei jedem PCR-Zyklus in der linearen Phase der Reaktion und war direkt proportional mit der Menge des freigesetzten *Reporter*-Farbstoffes bzw. der vorhandenen DNA-Menge. Diese Art von gepaarten komplett komplementären Sonden nennt man *Matched*. Als sequenzspezifische Hydrolisierungs sonden wurden die Sonden bezeichnet, die sich nicht vollständig und komplementär paarten, also ein *Mismatch* bildeten. Diese Sonden lösten sich während des „Voranschreitens“ der DNA-Polymerase von der DNA-Sequenz, dabei kam es nicht zu einer Spaltung und somit auch nicht zur Freisetzung von fluoreszierendem Farbstoff. Die beiden Sonden hatten zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe an ihrem 5`-Ende, VIC (6-Carboxyfluorescein) und FAM (Carboxyrhodamin), anhand dieser konnte zwischen

den beiden Allelen unterschieden werden. Zwei Vorteile, die sich daraus ergaben, waren auf der einen Seite das größere T_m -Fenster zwischen gepaart und fehlgepaarten Sonden/*Template*-Komplexen. Dies führte zu einer besseren Allel-Differenzierung. Auf der anderen Seite waren kürzere Sonden sensibler für Fehlpaarungen. In diesem Versuchsaufbau sollte das Ergebnis der allelischen Diskriminierung die Proben nach homozygot für Allel 1, homozygot für Allel 2 und heterozygot klassifizieren. Die PCR ist in drei Schritte eingeteilt, welchen ein *Pre-Read Run* vorausgeht. In diesem werden die Hintergrundfluoreszenzen detektiert. In der Denaturierungsphase werden die Wasserstoffbrücken der Doppelstrang-DNA bei 95 °C getrennt und in 45 Zyklen sichergestellt, sodass lediglich noch DNA-Einzelstränge vorliegen. Darauf folgt die Amplifizierungsphase, in der die Primer- und Sondenanlagerung sowie die Kettenverlängerung stattfinden, hierzu werden ebenfalls 45 Zyklen durchlaufen, die Temperatur beträgt 60 °C. Den drei Phasen ist noch ein *Post-Read Run* nachgeschaltet, in dem erneut die Hintergrundfluoreszenz bestimmt wird, um diese dann gegen die Hintergrundfluoreszenz des *Pre-Read Runs* zu rechnen und ein möglichst genaues Ergebnis zu erzielen.

Für eine graphische Darstellung (**Abbildung 11**) wurden die Ergebnisse des *Post-Read Runs* auf ein Koordinatensystem – Allel X und Allel Y – aufgetragen. Nach einer erfolgreichen Reaktion waren drei Gruppen (*Cluster*) erkennbar. Homozygote für das Allel Y bildeten ein *Cluster* an der vertikalen Achse und homozygote für das Allel X bildeten ein *Cluster* an der horizontalen Achse. Heterozygote Proben erzeugten ein *Cluster* auf der diagonalen Achse. Vor dem Starten der PCR wurden Allel X und Y den tatsächlichen Allelen zugeordnet.

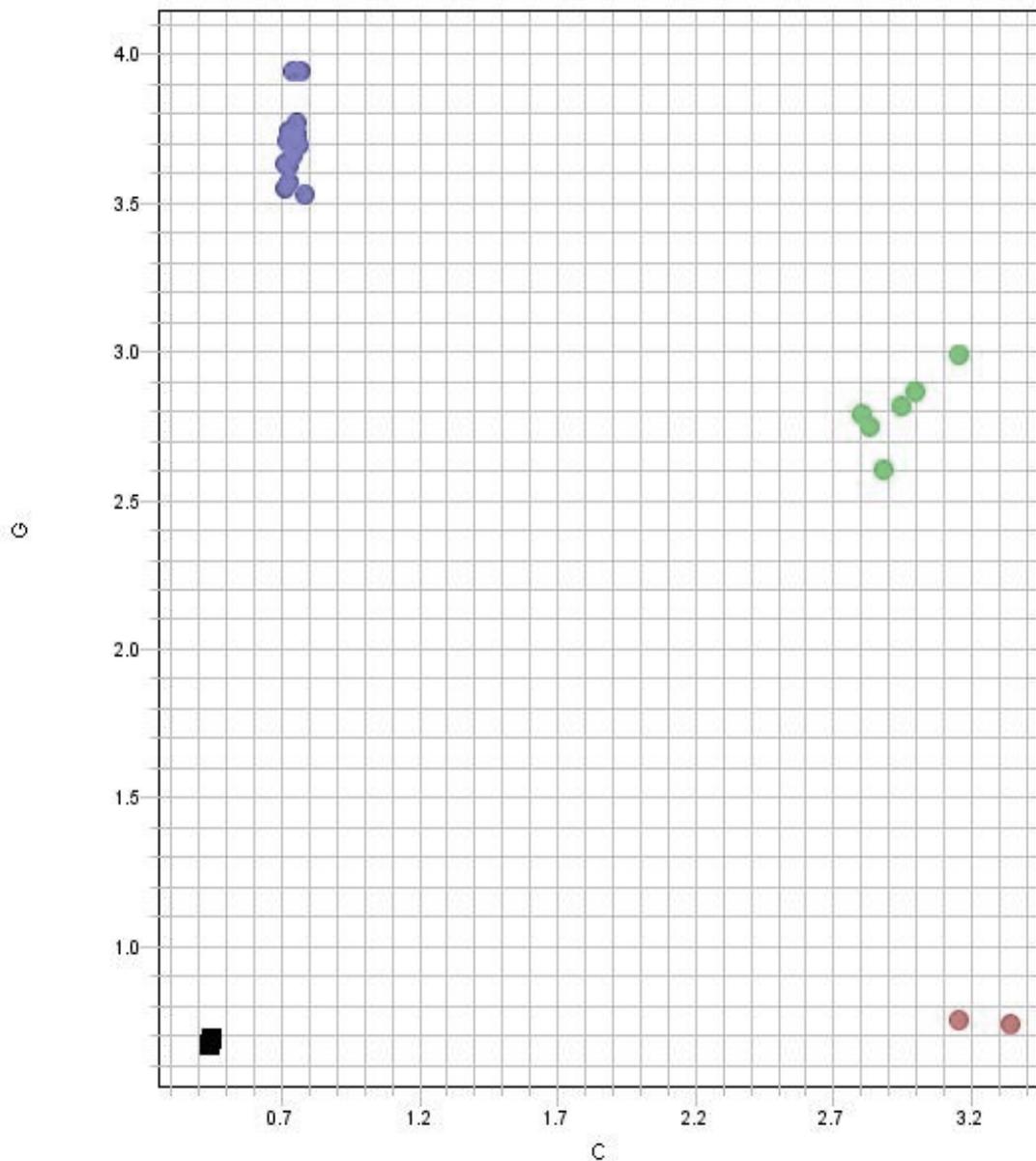


Fluoreszenz-Messung	Bedeutung
Nur VIC-Fluoreszenz	Homozygot für Allel 1
Nur FAM-Fluoreszenz	Homozygot für Allel 2
Beide Fluoreszenz Signale	Heterozygot

Abbildung 10 Allelische Diskriminierung

Darstellung der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes bei korrekter Paarung von der DNA und Sonde durch die DNA-Polymerase. Konnten DNA und Sonde nicht korrekt paaren, wurde der fluoreszierende Farbstoff nicht freigesetzt.

Modifiziert nach Thermo Fisher Scientific, TaqMan Gene Expression Assay solutions, S. 4.



Legende

- Homozygot C/C
- Homozygot G/G
- Heterozygot C/G
- Unbestimmt

Abbildung 11 Ergebnisse einer allelischen Diskriminierung

Diese Graphik spiegelt die Ergebnisse der in der PCR detektierten Floreszenzen der DNA-Proben wider. Als blaue Punkte sind die Proben repräsentiert, welche nur einen Fluoreszenzfarbstoff abgaben und somit homozygot für Allel 1 (in diesem Fall Allel G) sind. In Braun sind die homozygot für Allel 2 (in diesem Fall Allel C) detektierten Proben dargestellt. Die Proben mit gleichen Anteilen an beiden Fluoreszenzfarbstoffen sind die heterozygoten und hier in Grün auf der diagonalen Achse dargestellt. Die schwarzen Quadrate repräsentieren die Kontrollen (NTC-Proben), die keine gDNA enthielten und somit nah am Nullpunkt erscheinen.

2.3.4.1 Genotypisierung am SNP rs11536889 (3'-UTR)

Zur Diskriminierung der Allele des SNPs rs11536889 (3'-untranslatierte Region, *Untranslated Region* = UTR) wurde ein Assay aus Primern und Sonden eingesetzt. Der Single-Nukleotid-Polymorphismus rs11536889 setzt in der 3'-UTR des *TLR4*-Gens an, welches die *TLR4*-Translation beeinflusst.

Reaktionsansatz für die Amplifikation aus PBMC extrahierter gDNA:

5 µl	2x TaqMan Universal PCR Master Mix
0,25 µl	40x SNP <i>Genotyping Assay by Design</i> (Primer und Sonden)
2,75 µl	Ampuwa
2 µl	gDNA (Konzentration 10 ng/5 µl)
Gesamt: 10 µl	

Die Reaktionsgemische wurden in Duplikaten auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Vermeidung von Fehlern wurden auf jede Platte zwei Negativkontrollen pipettiert (engl. *non-template control*, NTC) (Ampuwa statt DNA). Zur Eliminierung von Luftbläschen am Boden der Wells wurde die Well-Platte einige Sekunden bei 2.000 rpm zentrifugiert. Die PCR wurde mit einem StepOnePlus™ Thermozykler durchgeführt.

Thermoprofil:

-	95 °C	10 min	Vordenaturierung (Holding Stage)	(1 Zyklus)
-	95 °C	15 sek	Denaturierung	(45 Zyklen)
-	60 °C	1 min	Primer-/Sonden-Anlagerung, Kettenverlängerung	(45 Zyklen)
-	60 °C	30 sek	<i>post-PCR read</i>	(1 Zyklus)

Im Anschluss an die PCR wurde die freigewordene Fluoreszenz im Modus „*plate read*“ bei 60 °C gemessen. Bei einem homozygoten Genotyp zeigte sich nur ein Fluoreszenzsignal (FAM oder VIC), bei heterozygoten Genotypen zeigten sich parallele Fluoreszenzsignale von FAM und VIC.

2.3.5 Datenerhebung, Auswertung und Statistik

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden klinischen und experimentellen Daten wurden durch die Arbeitsgruppe „GenoSep“ erhoben. Das Projekt ist ein Zusammenschluss aus der Klinik für Gastroenterologie und der Klinik für Anästhesiologie. Die Mitarbeit in der Arbeitsgruppe erfolgte durch die Promovierenden Bronja Hillebrecht, Benjamin Liese, Sebastian Gerber, Yvonne Klee, Chang Ho Hong, Maximilian Steinau und Evelyn Mulwande und mich. Seit März 2012 wurden zum Teil täglich die erhobenen Daten in *Clinical Report Forms* (CRF) erfasst und dann in die Datenbank eingepflegt. Die CRF-Bögen umfassten Informationen der Einschlusskriterien sowie Ausschlusskriterien, Grund und Zeit der Aufnahme und Entlassung auf die Intensivstation. Weiter wurde der Sepsis-Beginn dokumentiert, Vorerkrankungen und die vorbestehende Medikation. Dann folgten die einzelnen *Follow-up*-Tage, an denen die Vitalparameter, die Laborparameter, respiratorische Parameter und kreislaufunterstützende Medikamente (Katecholamine) dokumentiert wurden. Zudem wurden die mikrobiellen Ergebnisse und die antibiotische Therapie erfasst. Die generierten experimentellen Daten wurden in einer Excel-Datei gespeichert. Unter klar abzugrenzenden Fragestellungen und Auswertungen wurden die Daten rein klinisch oder klinisch-experimentell für die jeweiligen Dissertationen verwendet. Jeden Tag beanspruchte das Projekt etwa 8 Stunden, die für das Screening der Patienten und deren Nachverfolgung, die Entnahme der Blut- und Serumproben, ihre Analyse im Labor und die Datenerhebung der klinischen Parameter aufgebracht wurden. Die vorlesungsfreie Zeit eines klinischen Semesters und das darauffolgende klinische Semester verbrachte ich mit den oben beschriebenen Arbeiten. Die Arbeiten wurden meist im Team zu zweit ausgeführt. Ein Tag begann mit dem Screening der elektronischen Patientenkurven der oben genannten Intensivstationen auf Patienten mit einem septischen Krankheitsbild. Nach der Rücksprache mit einer *Study Nurse* und den Stationsärzten wurden den Patienten unter Aufsicht der Stationsärzte die nötigen Blutproben entnommen. Zuvor wurde sichergestellt, dass die Patienten bzw. gesetzlichen Betreuer mit dem Vorgehen einverstanden sind. Ein Promovend führte dann die oben beschriebenen Versuchsanleitungen mit den entnommenen Blutproben in den Laboren der Klinik für Gastroenterologie durch (DNA-/RNA-Extraktion, Genotypisierung und quantitative Genexpressionsanalysen). Der andere Promovend war für die Erhebung und Übertragung der klinischen Daten in den CRF-Bogen zuständig und pflegte diese dann weiter in die Datenbank ein. Der CRF-Bogen beinhaltete die klinischen Daten der ersten 28 Tage seit Sepsis-Beginn. Zu Beginn der Sepsis wurden SOFA und der APACHE II erhoben. Diese CRF-Bögen wurden in einem zeitlichen Abstand geprüft und nach 90 Tagen wurde eine Überlebenskontrolle der eingeschlossenen Patienten, meist telefonisch, durchgeführt und ebenfalls in der Datenbank dokumentiert.

Die statistischen Analysen und Darstellungen der Boxplot-Graphiken wurden mit der Software Statistica (StatSoft, Oklahoma, USA, Version 10) oder R (*The R Foundation for Statistical Computing*, Version 3.0.0) durchgeführt. Die Signifikanz, basierend auf Eventualitäts-Tabellen, wurde mittels des Exakt-Fisher- oder des Chi-Square-Tests bestimmt und damit adäquat berechnet. Hierbei wurde der p-Wert $>0,05$ als „nicht signifikant“ gewertet, der p-Wert $\leq 0,05$ als „signifikant“ und ein p-Wert $<0,01$ als „sehr signifikant“. Ob die Patientengruppe dieser Arbeit in der Genotyp-Häufigkeitsverteilung dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*Hardy-Weinberg Equilibrium* = HWE) entspricht, wurde mit dem Exakt-Test über den Online-Rechner ausgeführt, den das Institut für Genetische Epidemiologie, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung stellt. Mit $p \geq 0,05$ wurde die Entsprechung bestätigt. Um die Signifikanz der klinischen Analysen zur Morbidität, gemessen am SOFA-Score und SOFA-Sub-Scores an den einzelnen *Follow-up*-Tagen zu bewerten, wurde ein lineares Regressions-Modell in Form einer ANOVA erstellt. Bei den einbezogenen Scores handelte es sich um abhängige Werte, die zu mehreren Zeitpunkten im Krankheitsverlauf erhoben wurden.

Mittels des Mann-Whitney-Tests wurde die Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen verglichen. Um die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis in einem bestimmten Zeitraum stattfindet, darzustellen, wurde eine Kaplan-Meyer-Kurve angewendet. In diesem Fall ließ sich die Mortalitätsanalyse erstellen. Mit dem Log-rank-Test des Statistica-Überlebens-Pakets konnten die beiden Allel-Gruppen dieser Arbeit (G-homozygote Patienten und C-Allel-Träger) verglichen werden.

Die korrekte Durchführung der statistischen Auswertungen sowie beim Erstellen der Tabellen und Abbildungen überprüften und betreuten die Mitarbeiter der „Zentralen Serviceeinheit Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik“ des Instituts für Medizinische Statistik, insbesondere Herr Prof. Dr. T. Beissbarth, der Universität Göttingen.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten-Kollektiv

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 212 kaukasische Patienten mit einem septischen Krankheitsbild eingeschlossen (Mansur et al. 2014e). Von diesen Patienten mussten zwei aus der Studie genommen werden, da sie ein Ausschlusskriterium erfüllten. Bei dem einen Patienten wurde im Verlauf bekannt, dass er an einem B-Zell-Lymphom litt. Bei dem anderen Patienten nahmen die gesetzlichen Betreuer ihr Einverständnis zurück. Die Anzahl der Patienten belief sich dementsprechend auf 210 Patienten, wovon 134 Patienten männlich (64 %) und 76 Patienten weiblich (36 %) waren (**Tabelle 6**). Das Alter der Patienten reichte von 19 bis 91 Jahren, damit errechnete sich ein Altersmedian von 65 Jahren. Die dokumentierten Komorbiditäten, wie Bluthochdruck, kardiovaskuläre Ereignisse, COPD, renale Insuffizienz, Diabetes mellitus, chronische Lebererkrankungen, Krebserkrankungen und Schlaganfall-Ereignisse (**Tabelle 6**), stellten keinen signifikanten Unterschied zum TLR4-rs11536889-Genotyp dar.

Die Verteilung der TLR4-rs11536889-Genotypen (GG/GC/CC) unterschied sich nicht von der Datenlage von gesunden Kaukasiern und folgte dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bestimmt mit einer mathematischen Gleichung in einem diploiden Chromosomensatz die Häufigkeit unterschiedlicher Allele (Schaaf und Zschocke 2013). Zudem bestand kein Zusammenhang zwischen den dokumentierten *Baseline*-Charakteristika und den TLR4-rs11536889-Genotypen (**Tabelle 5**). Mittels des SOFA-Scores, eines spezifischen klinischen Markers für kritisch kranke Patienten, wurde das Organversagen der Patienten beziffert. Im Vergleich der TLR4-rs11536889-GG-Patienten mit den TLR4-rs11536889-GC- und -CC-Patienten hatten die homozygoten GG-Patienten einen signifikant höheren SOFA-Score-Wert (**Tabelle 7**). Betrachtet man den Sepsis-Typ (Sepsis und schwere Sepsis vs. septischen Schock), den SOFA-Score und den APACHE-II-Score, so wurde kein Zusammenhang zwischen dem TLR4-rs11536889-Genotyp und dem Schweregrad der Sepsis zu Krankheitsbeginn festgestellt (**Tabelle 7**).

Tabelle 6 Merkmale der Patienten im Zusammenhang mit TLR4 rs11536889

	Alle n=210	GG n=146	GC/CC n=64	p-Wert
Alter [Jahre]	63±15	63±15	63±15	0,9116
Männlich %	64 %	46 %	58 %	0,2752
Body-Mass-Index, mean ± SD	28±9	28±7	30±13	0,1507
Schwere der Sepsis				
Sepsis/schwere Sepsis, %	48 %	46 %	52 %	0,4576
SOFA-Score, mean ± SD	8,6±4,1	8,9±4,3	8,0±3,7	0,2449
APACHE-II-Score, mean ± SD	21,3±7,4	21,6±7,4	20,6±7,6	0,4053
Komorbidität, %				
Hypertonus		58	59	1,0000
Früherer Myokardinfarkt		5	6	0,7586
COPD		18	17	1,0000
Niereninsuffizienz		11	20	0,0834
Diabetes mellitus (NIDDM)		11	8	0,6202
Diabetes mellitus (IDDM)		11	5	0,1938
Chronische Leberinsuffizienz		7	9	0,7839
Früheres Karzinomleiden		18	19	0,8481
Früherer Apoplex		6	8	0,7647
Kürzliche OP, %				0,0631
Elektive OP	28	31	19	
Notfall-OP	44	44	44	
Keine OP	28	24	37	
Infekt-Fokus, %				0,1516
Lunge	50	46	56	
Abdomen	30	31	28	
Knochen oder Weichteile	7	7	6	
Chirurgische Wunde	2	3	0	
Urogenital	1	0	3	
Primäre Bakteriämie	6	7	3	
Andere	4	5	3	
Organunterstützung, %				
Beatmung	83	83	83	0,8933
Gebrauch von Vasopressoren	52	54	48	0,4576
Dialyse	10	11	9	0,7300

SD = Standardabweichung, *Standard Deviation*

3.2 Krankheitsschwere zu Beginn der Sepsis

Die Genotypisierung des TLR4 rs1153889 wurde bei allen Probanden erfolgreich durchgeführt. Es ergab sich eine Verteilung von 146:62:2 (GG:GC:CC). Sie stimmte somit mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) ($p=0,12$) überein. Aus der Verteilung ergab sich eine *Minor Allel Frequency* (MAF) von 0,16. Dieser Wert entsprach in etwa der aktuellen Datenlage für Kaukasier.

Da nur 2 Probanden mit dem Genotyp CC des TLR4 rs11536889 typisiert wurden, sind diese unter dem Genotyp GC eingruppiert worden. Diese Gruppe GC/CC konnte dann mit der Patientengruppe des Genotyps GG verglichen werden (Mansur et al. 2014e).

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen des TLR4 rs11536889 hinsichtlich des Alters, Geschlechts oder Body-Mass-Indexes. Ebenfalls lag bei Studieneinschluss kein signifikanter Unterschied zwischen den G-homozygoten Patienten und den C-Allel-Trägern hinsichtlich der Schwere der Sepsis vor (Sepsis/schwere Sepsis und septischer Schock; Tag 1 der Sepsis; $p=0,4576$). Des Weiteren bestand bei den TLR4-rs11536889-Genotypen zu Beginn der Sepsis kein signifikanter Unterschied im SOFA- und APACHE-II-Score (**Tabelle 6**). Darüber hinaus zeigten die letzten chirurgischen Eingriffe und der primäre Infektionsfokus keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Genotyp-Verteilung (**Tabelle 6**).

3.3 Krankheitsverlauf und Mortalität

Der Krankheitsverlauf der Patienten wurde während ihres intensivmedizinischen Stationsaufenthaltes anhand des SOFA-Scores dokumentiert. Die Dokumentation wurde an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 und 28 durchgeführt (**Abbildung 12**). Zusätzlich wurde die Notwendigkeit von organunterstützenden Maßnahmen erfasst. Zu Beginn der Sepsis-Erkrankung der Patienten bestand kein signifikanter Unterschied im Krankheits-Score, dennoch zeigten die TLR4-rs11536889-GG-Patienten einen höheren SOFA-Score im Krankheitsverlauf ($p=0,0005$) im Vergleich zu den C-Allel-Trägern (**Tabelle 7**). In der Auswertung der SOFA-Sub-Scores zeichnete sich ein signifikanter Unterschied in dreien dieser Bereiche ab; im SOFA-Nieren-Score hatten die GG-homozygoten Patienten einen höheren Wert ($p=0,0005$), ebenso wie im SOFA-Gerinnungs-Score ($p=0,0245$) und im SOFA-Leber-Score ($p<0,0001$) (**Tabelle 7, Abbildung 12**).

Die Werte des SOFA-Scores zu den dokumentierten Zeitpunkten wurden in ein lineares Modell eingefügt. Das lineare Modell diente der Analyse des Zusammenhangs von einer oder mehreren unabhängigen Variablen beliebigen Messniveaus. Beispielsweise konnten sich auf der einen Seite, der unabhängigen Variable, nominale, ordinale oder quantitative befinden, während auf der anderen, der abhängigen Variable, eine nominal-polytome Variable war (Holm 1979). Dieses Modell zeigte einen signifikanten Genotyp-Effekt; das bedeutete, dass hier die GG-Patienten mit einem höheren SOFA-Score dargestellt wurden als die GC/CC-Allel-Träger ($p=0,015$; **Abbildung 13**). In der Analyse der 28-Tage- und der 90-Tage-Mortalität stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden TLR4-rs11536889-GC/CC- und -GG-Allel-Trägern heraus (entsprechend $p=1,0000$ und $p=0,8698$) (**Tabelle 7, Abbildung 13**). Hinsichtlich der Notwendigkeit einer Organ-Ersatz-Therapie (Beatmung, Gebrauch von Vasopressoren und Dialysepflichtigkeit) ergab sich kein Unterschied zwischen den GG-homozygoten Patienten und den C-Allel-Trägern bei Beginn der Sepsis-Erkrankung und über die dokumentierte Zeit (**Tabelle 6 und 7**). Weiterhin war hinsichtlich der durchschnittlichen ICU-Aufenthaltsdauer der GG-homozygoten Überlebenden und der GC/CC-Überlebenden kein signifikanter Unterschied zu beobachten (**Tabelle 7**). Dennoch konnte festgestellt werden, dass es ein signifikant höheres Vorkommen von gramnegativen Infektionen bei C-Allel-Trägern (81 %) als bei den GG-homozygoten Patienten (62 %) ($p=0,0062$) vorlag.

Tabelle 7 Krankheitsverlauf im Zusammenhang mit dem TLR4-rs11536889-Genotyp

Erstellt in Kooperation mit Prof. Dr. T. Beissbarth.

	Alle (n=210)	GG n=146	GC/CC n=64	<i>p</i> -Wert
SOFA:	7,6±4,5	7,9±4,5	6,8±4,2	0,0005
Lungen- <i>Score</i>	2,1±1,1	2,1±1,1	2,0±1,1	0,1950
Herz-Kreislauf- <i>Score</i>	1,6±1,5	1,7±1,5	1,4±1,4	0,1296
Neurologischer <i>Score</i>	2,0±1,5	2,1±1,5	1,9±1,4	0,0802
Nieren- <i>Score</i>	0,9±1,4	1,0±1,4	0,7±1,2	0,0005
Gerinnungs- <i>Score</i>	0,3±0,8	0,4±0,8	0,3±0,7	0,0245
Leber- <i>Score</i>	0,3±0,7	0,4±0,8	0,2±0,5	<0,0001
Mortalitätsanalyse, %:				
Versterben bis Tag 28	18	18	17	1,0000
Versterben bis Tag 90	30	30	28	0,8698
Aufenthalt Intensivstation (Tage)	18±16	18±17	20±14	0,0720
Organunterstützung*, %:				
Beatmung		75	74	0,6286
Gebrauch von Vasopressoren		38	37	0,8426
Dialyse		14	9	0,4486

Daten sind angegeben als *Means* ± SD oder Prozent, ZNS = zentrales Nervensystem, * basierend auf observierten *Follow-up*-Tagen

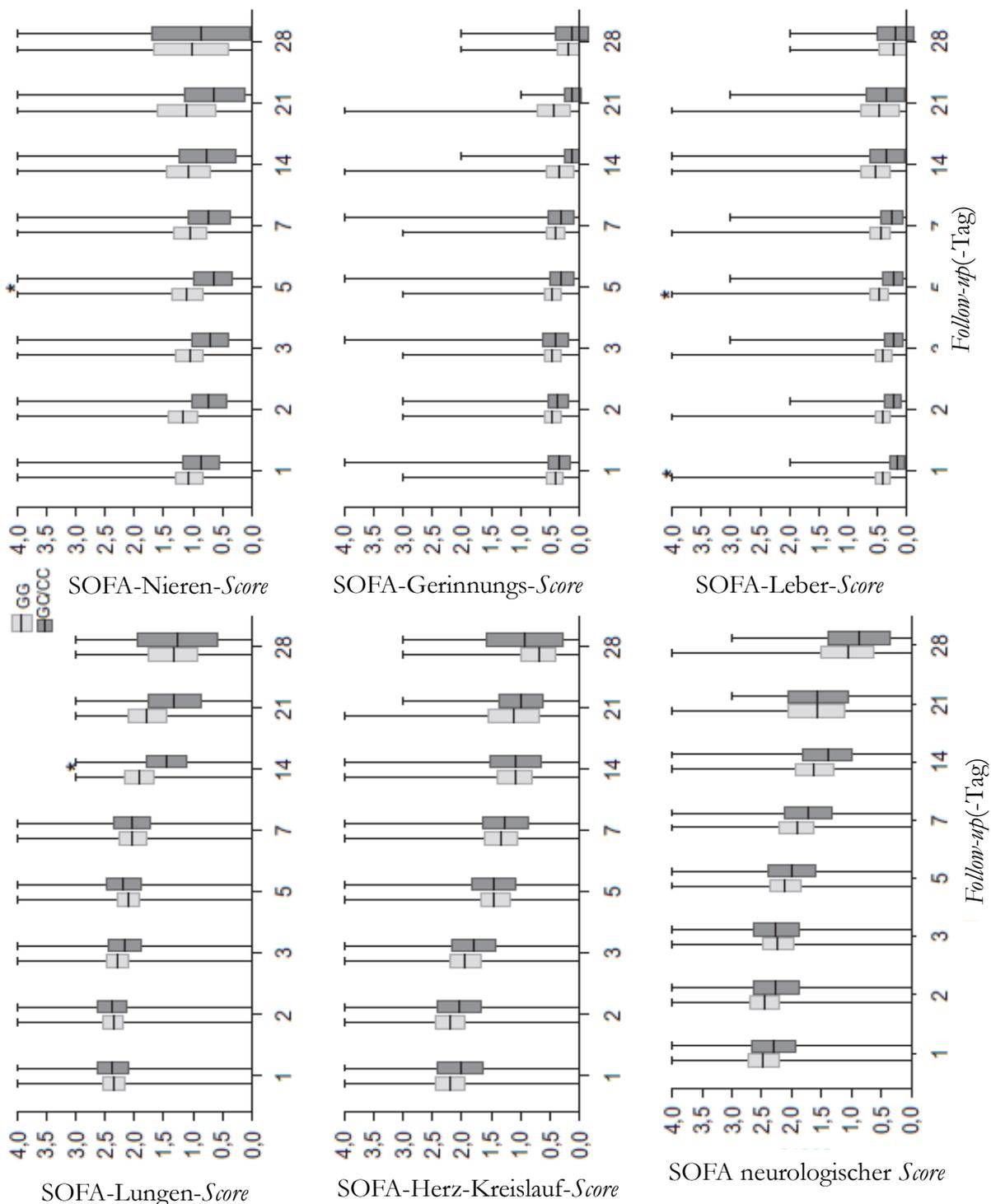


Abbildung 12 SOFA-Sub-Scores nach Genotypen täglich während der Erfassungszeit

Der *Mean* ist an der x-Achse bezeichnet. Die Boxen sind an der 25. und 75. Perzentile limitiert. Die Whisker zeichnen das Minimum und das Maximum ab. Die Unterschiede sind nur signifikant, wo die Whiskers mit * gekennzeichnet sind.

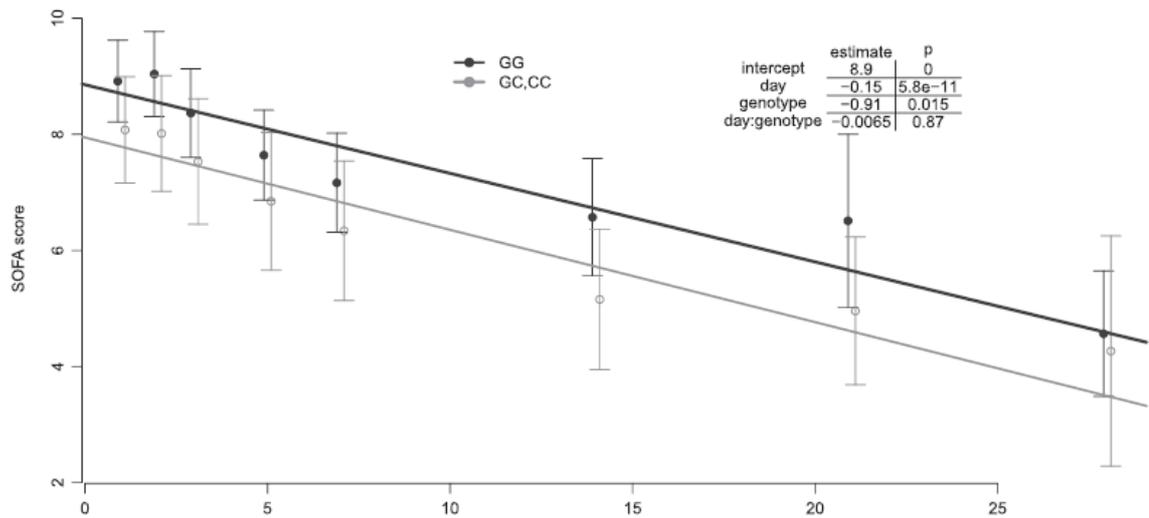


Abbildung 13 SOFA-Score nach Genotyp in der Nachverfolgungszeit

Der *Mean* und 95 % normales CIs mit der Regression sind dargestellt. Die Box zeigt den Koeffizienten und den p -Wert in einem linearen Regressions-Modell. Das Modell zeigt den SOFA-Score als eine Funktion der Nachverfolgungs-Tage und des Genotyps.

Erstellt in Kooperation mit Prof. Dr. T. Beissbarth.

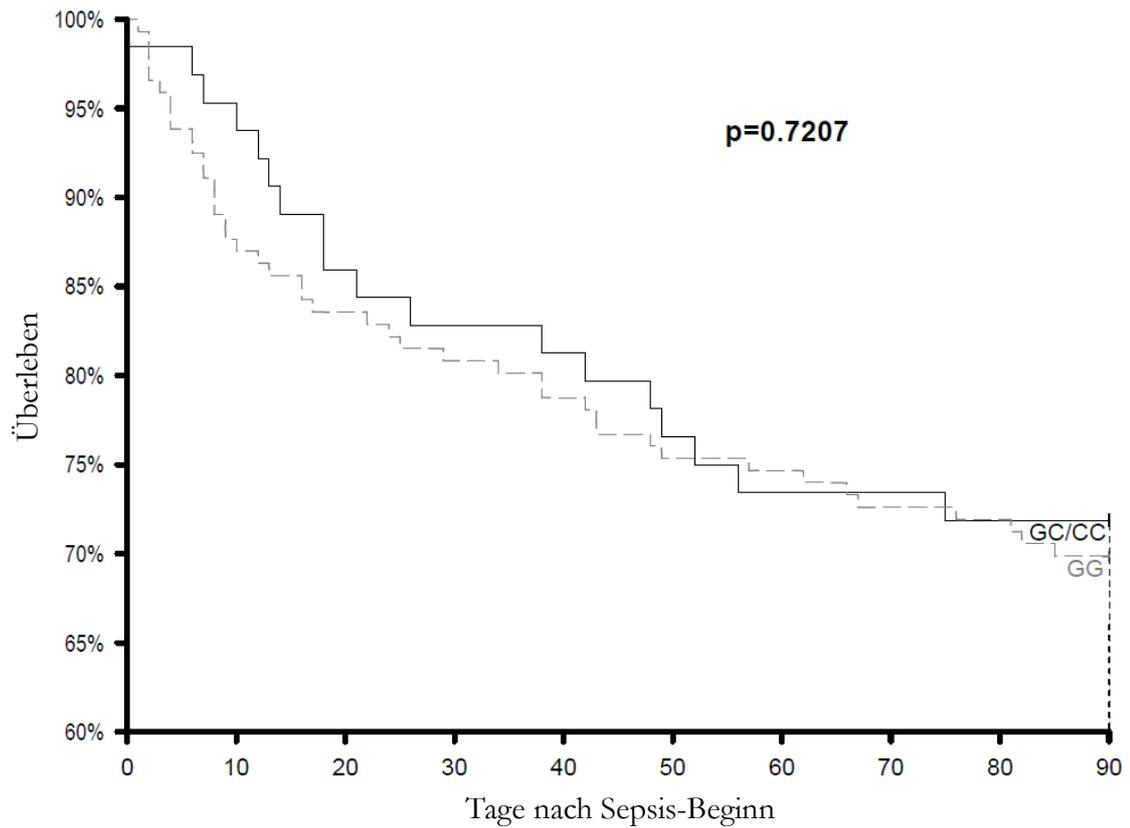


Abbildung 14 Korrelation der Überlebensrate in dem *TLR4*-Gen SNP rs1153889

Die Kaplan-Meyer-Kurve stellt die Überlebensrate der GG-homozygoten Patienten mit den C-Allel-Trägern nach Sepsis-Beginn gegenüber. Hier findet sich kein signifikanter Unterschied.

Erstellt in Kooperation mit Prof. Dr. T. Beissbarth.

4 Diskussion

Die klinische Relevanz des regulativen TLR4-rs11536889-Genotyps wurde bereits in mehreren Studien belegt (siehe 1.2.3 in der Einleitung). Sein Einfluss auf das Organversagen bei kritisch kranken Patienten mit Sepsis war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Es konnte für die hepatische, renale und Gerinnungsfunktion des Organismus ein signifikantes Ergebnis in dieser Untersuchung bestätigt werden. Die Studienergebnisse wurden im *Journal of Translational Medicine* publiziert und ihre Relevanz hervorgehoben (Mansur et al. 2014e). So konnte im Vergleich der Gruppen der TLR4-rs11536889-GG-homozygoten zu den C-Allel-Trägern nicht nur ein höherer SOFA-Score insgesamt dargestellt werden, sondern auch in den SOFA-Sub-Scores ließen signifikant höhere Werte der oben genannten Organfunktionen der TLR4-rs11536889-GG-homozygoten Patienten abbilden. Für die unterschiedlichen Schwereformen der Sepsis kann kein ähnlicher Einfluss festgestellt werden.

Die TLR4-rs11536889-GG-homozygoten Patienten zeigten in drei Organsystemen eine schwerere Dysfunktion als die TLR4-rs11536889-GC- und -CC-Patienten. Die Nierenfunktion gemessen an dem laborchemischen Wert Kreatinin oder der Menge der Urinproduktion ergab für die GG-homozygoten Patienten einen Mittelwert von 1,0 und eine Standarddeviation von 1,4 im Vergleich zu den C-Allel-Trägern, bei denen der Mittelwert 0,7 und die Standarddeviation 1,2 betrug. Nach der Analyse nach Kaplan-Meier berechnete sich ein p-Wert von **0,0005**, der somit als sehr signifikant zu betrachten ist. In dem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen wurde bei 14 % der TLR4-rs11536889-GG-Patienten und bei 9 % der C-Allel-Träger ein Nierenersatzverfahren durchgeführt, welches ein nicht signifikantes Ergebnis erbrachte. Die Untersuchung der Leberfunktion gemessen an dem Serumbilirubin ergab eine sehr signifikante Leberfunktionsstörung der TLR4-rs11536889-GG-Patienten **p= <0,0001**. Das dritte Organsystem war das Gerinnungssystem gemessen an der Zahl der Thrombozyten. Im Vergleich zu den CG- und CC-Patienten ließ sich bei den TLR4-rs11536889-GG-Patienten eine signifikante Dysfunktion mit einem **p=0,0245** errechnen (Mansur et al. 2014e). Der SOFA-Gesamtwert der GG-Allel-Träger konnte gegenüber dem der GC- und CC-Allel-Patienten als signifikant höher errechnet werden. Auffällig war, dass zum Krankheitsbeginn der Patienten kein signifikanter Unterschied in dem Schweregrad der Sepsis (Sepsis und schwere Sepsis vs. septischen Schock) nachzuweisen war. In dem gewählten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen starben 18 % der TLR4-rs11536889-GG-homozygoten Patienten und 17 % der TLR4-rs11536889-CG- und -CC-Allel-Träger. Das Ergebnis ist somit nicht signifikant. Ebenfalls betrachteten wir den Zeitraum von 90 Tagen, in denen 30 % der GG-homozygoten Patienten starben und 28 % der C-Allel-Träger. Dieses Ergebnis ist

ebenfalls nicht signifikant, womit ein Einfluss des TLR4-rs11536889-Polymorphismus auf die Mortalität von Patienten mit Sepsis ausgeschlossen werden konnte. Eine signifikant häufigere Infektion durch gramnegative Bakterien konnte bei TLR4-rs11536889-CG- und -CC-Allel-Trägern mit 81 % festgestellt werden, bei TLR4-rs11536889-homozygoten Patienten nur mit 62 %. Die Untersuchung ergab einen Wert von **p=0,0062** und ist sehr signifikant (Mansur et al. 2014e).

In zwei Arbeiten, einer japanischen (K Sato et al. 2012) und einer amerikanischen (Anand et al. 2007) Studie, wurde bereits der direkte Einfluss der TLR4-Expression als Antwort auf LPS untersucht. In der Arbeit von Sato et al. wird dargestellt, dass Monozyten vom TLR4-rs11536889-CC-Genotyp höhere TLR4-Level exprimieren als TLR4-rs11536889-GG- und -GC-Genotypen (K Sato et al. 2012). Es wurden PBMCs mit LPS stimuliert und es ließen sich signifikant höhere Level von pro-inflammatorischem Zytokin IL-8 bei Zellen des TLR4-rs11536889 CC und GC darstellen im Vergleich zu den TLR4-rs11536889-GG-homozygoten Zellen. Auf der Ebene der mRNA-Produktion von Monozyten der GG-, GC- und CC-Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Dennoch lässt das Ergebnis des erhöhten TLR4-Levels bei TLR4-rs11536889-CC-homozygoten Patienten vermuten, dass die TLR4-Proteinexpression mit der Antwort auf LPS assoziiert ist (K Sato et al. 2012). In der zweiten Arbeit von Anand et al. wurde der Einfluss von TLR4 auf die Makrophagen während abdomineller Sepsis auf die bakterielle Phagozytose untersucht. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Zunahme der Phagozytose von Bakterien durch TLR4 auf Makrophagen, welche insbesondere unter den Konditionen einer polymikrobiellen Sepsis verstärkt wird (Anand et al. 2007). Zusammenfassend drücken diese Studien aus, dass der Signalweg der bakteriellen Erkennung durch LPS und die Signalweiterleitung durch TLR4 einen Einfluss auf die Schwere der Infektion und des Krankheitsverlaufs haben. Diese Tatsache könnte auf den gedämpften TLR4-Signalweg der GG/GC-Allel-Träger verglichen mit den C-Allel-Trägern zurückgeführt werden und ließe sich daher so in dieser vorliegenden Arbeit widerspiegeln. Die Erkenntnis, dass GG-Patienten eine gedämpfte TLR4-Expression aufweisen (K Sato et al. 2012), könnte die Ursache dafür sein, warum synthetische TLR4-Antagonisten keinen klinischen Erfolg bei Patienten mit schwerer Sepsis brachten (Opal et al. 2013; Tidswell und LaRosa 2011).

Die grundlegende Einschätzung und richtungsweisend für die Organfunktion ist die Einteilung mittels des SOFA-Scores. Die Werte des SOFA-Scores in dieser Arbeit, die am Follow-up-

Tag 1 erhoben wurden, lassen sich mit den Ergebnissen einer Studie an Patienten mit schwerer Sepsis/septischem Schock vergleichen (**Tabelle 7**) (Blanco et al. 2008). Es ergab sich bei uns ein durchschnittlicher SOFA-*Score* von $8,6 \pm 4,1$ ($9,6 \pm 3,7$ für Blanco et al.) und ein APACHE-II-*Score* von $21,3 \pm 7,4$ ($25,5 \pm 7,1$ für Blanco et al. 2008). Die Differenz in den *Scores* kann daran erklärt werden, dass die Patienten unserer Studie ebenfalls mit Sepsis rekrutiert wurden und somit weniger schwerwiegende Symptome zeigten.

In dieser Arbeit konnten signifikant höhere Werte für drei Organsysteme von TLR4-rs11536889-GG-homozygoten im Vergleich zu den C-Allel-Trägern dargestellt werden.

Im Lungen-SOFA-*Sub-Score* wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der TLR4-rs11536889-GG-Patienten und den C-Allel-Trägern gefunden (**Tabelle 8**). Die Studie von Russell et al. beschreibt das signifikante Lungenversagen als das häufigste Organversagen zu Beginn der Sepsis. Das Lungenversagen stellt ein häufiges und gut identifizierbares Problem auf der ICU dar, das anhand regelmäßiger BGAs und radiologischer Kontrollen erkannt werden könnte (Russell et al. 2000). Aufgrund der guten Ressourcen auf der ICU und der frühen Identifizierung des Lungenversagens kommt es wahrscheinlich zu einem nicht signifikanten Unterschied zwischen den beiden Allel-Gruppen. Evaluiert wurde ebenfalls die Notwendigkeit der Beatmung (nicht invasiv und invasiv), welche bei den TLR4-rs11536889-GG-homozygoten zu 75 % notwendig und bei den TLR4-rs11536889-GC- und -CC-Patienten zu 74 % notwendig war (**Tabelle 8**) und somit als nicht signifikant zu betrachten ist (Mansur et al. 2014e).

Der Herz-Kreislauf-SOFA-*Sub-Score*, der den Blutdruck sowie den Gebrauch von vasoaktiven Medikamenten einschließt, zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den TLR4-rs11536889-Genotypen (**Tabelle 8**). In der Arbeit von Moreno et al. wurde beschrieben, dass der Herz-Kreislauf-SOFA-*Sub-Score* den höchsten Einfluss auf das Krankheitsergebnis der Patienten bei ICU-Entlassung hat (Moreno et al. 1999). Diese Aussage ist limitierend, da sie sich auf die ICU-Patienten im Allgemeinen und nicht direkt auf die Patienten mit einem septischen Krankheitsgeschehen bezieht. In einer chinesischen Studie wurde die Interaktion zwischen einem TLR4-rs11536889-SNP und einem MyD88-SNP untersucht, um das Risiko für eine koronare Herzkrankheit (KHK) zu erörtern (Sun et al. 2016). Der TLR4-MyD88-anhängige Signalweg ist in der Entstehung und der Progression von Arteriosklerose beteiligt (He et al. 2010). Es zeigte sich kein genetischer Effekt des TLR4 rs11536889 auf die Entstehung einer KHK, wobei die Kombination der beiden Gen-Polymorphismen ein signifikant höheres Risiko darstellt, eine KHK zu entwickeln (Sun et al. 2016). Hieraus kann gefolgert werden, dass die Kombination der beiden Polymorphismen ein signifikant höheres Risiko

ergibt sowie eine relevante KHK. Der SOFA-Score hat wertvolle prognostische Aussagekraft zur Krankenhausmortalität bei schwer kranken Patienten mit Sepsis und nachgewiesener Hypotension von <90 mmHg (Jones et al. 2009). Der Gebrauch von Vasopressoren (wie Norepinephrine oder Epinephrine) ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotyp-Gruppen während des gewählten Beobachtungszeitraums (**Tabelle 8**).

TLR4-rs11536889-GG-Patienten hatten einen höheren Nieren-SOFA-Sub-Score, folglich trat in dieser Gruppe signifikant häufiger eine schwere renale Dysfunktion auf. In vorangegangenen Studien wurde bereits dargestellt, dass ein höherer SOFA-Sub-Score mit einem akuten Nierenversagen einhergeht (Hoste et al. 2003; Oppert et al. 2008). Da TLR4-rs11536889-GG-Patienten eine geringere TLR4-Expression aufzeigen können, sind unsere Ergebnisse vereinbar mit den vorangegangenen Beobachtungen und zeigen, dass die reduzierte TLR4-Expression bei chronischer Nierenerkrankung mit verringerter pro-inflammatorischer Zytokinproduktion während einer Infektion einhergeht (Ando et al. 2006).

Einen signifikant höheren Gerinnungs-SOFA-Sub-Score hatten die TLR4-rs11536889-GG-Patienten gegenüber den C-Allel-Trägern. Die TLR4-rs11536889-GG-Patienten hatten somit eine stärkere Einschränkung des Gerinnungssystems. Da die Gerinnung über ihre Mediatoren mit dem inflammatorischen System verknüpft ist, decken sich unsere Daten mit vorangegangenen Beschreibungen (Okabayashi et al. 2004).

Es lag eine signifikant schwerere hepatische Dysfunktion bei TLR4-rs11536889-GG-Patienten vor, die mittels des Leber-SOFA-Sub-Score detektiert wurde, indiziert durch eine schwere direkte Hyperbilirubinämie. Dies wurde bereits in einer Veröffentlichung von Deng et al. beschrieben (Deng et al. 2013). Hier wird hervorgehoben, dass während einer Sepsis der TLR4-Signalweg wichtig für die LPS-Clearance in Hepatozyten ist. Zudem könnte die hepatische Dysfunktion durch hepatotoxische pro-inflammatorische Zytokine verursacht werden, welche von den lebereigenen Kupfferzellen während einer frühen Sepsis-Phase gebildet werden (Koo et al. 1999).

Bei der Analyse der 28-Tage- und 90-Tage-Mortalität bestand keine signifikante Differenz zwischen den TLR4-rs11536889-Genotypen. Das schwere Organversagen, das bei G-homozygoten Patienten beobachtet wurde, führte wahrscheinlich nicht zu einer erhöhten Mortalität, da die Patienten ausreichend intensivmedizinisch versorgt wurden und somit die Organdysfunktion angemessen therapiert wurde. Die Patienten wurden gemäß den aktuellen Guidelines der Sepsis-Therapie behandelt (Surviving Sepsis Campaign) (Dellinger et al. 2013). Des Weiteren wurde bei C-Allel-Trägern eine signifikant höhere Rate an gramnegativen Infektionen (81 %) im Vergleich zu GG-Patienten (62 %; $p=0,0062$) dokumentiert. Daraus

ergibt sich, dass TLR4 das LPS von gramnegativen Bakterien erkennt und dass aufgrund ihrer Rolle im angeborenen Immunsystem die höhere Anfälligkeit von C-Allel-Trägern gegenüber gramnegativen Infektionen mit dem Polymorphismus assoziiert ist. Mögliche Erklärungen hierfür könnten die Hochregulierung der TLR4-Expression in C-Allel-Trägern sein und die hieraus folgende unmittelbare Erkennung des LPS der gramnegativen Bakterien in septischen Patienten. Die Beschleunigung der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen führt letztlich zu dem klinischen Bild der gramnegativen Sepsis. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten vorhergehender Arbeiten, die diesen Polymorphismus mit einer erhöhten Prädisposition für Infektionen beschreiben (Hishida et al. 2009; K Sato et al. 2012; Zhou et al. 2011), überein.

Für die Bewertung der Morbidität wurde zum Studieneinschluss am Tag 1 der Sepsis der APACHE-II-Score erhoben. Dieser gilt für die Objektivierung des Gesundheitszustandes zum Aufnahmezeitpunkt (Knaus et al. 1985). Im Patientenkollektiv dieser Arbeit konnte bei den TLR-rs11536889-GG-homozygoten Patienten ein Mittelwert von 21,6 und eine Standarddeviation von 7,4 und bei den C-Allel-Trägern ein Mittelwert von $20,6 \pm 7,6$ ermittelt werden. Diese Werte erweisen sich als nicht signifikant (Mansur et al. 2014e). Hierbei kann sich ableiten lassen, dass das Patientenkollektiv unserer Studie zu Beginn der Sepsis nicht signifikant unterschiedlich vorerkrankt war und eine ähnliche Krankheitsprognose hatte. Zu Beginn des gewählten Beobachtungszeitraums konnte im SOFA-Score ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotyp-Gruppen dargestellt werden (**Tabelle 7**). Dies lässt sich auf die unterschiedliche Präsentation der Sepsis zu Erkrankungsbeginn und die diversen Einflüsse wie Infektionserreger, die Genetik und die Komorbidität zurückführen (Mansur et al. 2015b).

Zusammenfassend bleibt die Erkrankung Sepsis eine Belastung des Gesundheitssystems, da sie mit einer hohen Sterblichkeit und langen Behandlungszeit einhergeht. Um die Diagnosestellung, den Krankheitsverlauf und die Prognose verlässlich zu steuern, wird es in Zukunft nicht ausreichen, sich nur auf einen einzelnen Fokus einer Infektionsquelle zu konzentrieren. Hierzu wurde im Jahr 2001 von der *International Sepsis Definition Conference* die *Predisposition, Infection type, Response, Organ Dysfunction* (PIRO)-Klassifikation entwickelt (siehe Kapitel 1.1.2, Seite 2 (Marshall 2014)). Dies Staging-Modell für Sepsis-Patienten ist angelehnt an das TNM-Modell für Krebserkrankungen und wurde in der Annahme entworfen, den Patientenphänotyp besser zu charakterisieren und somit eine Verbesserung der Gestaltung und Planung von Studien, die zu einem größeren Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis beitragen, zu erreichen (Howell et al. 2011). In der Studie von Howell et al. wurden die Patientendaten wie

Alter, Vorerkrankungen, Infektionsherd sowie organspezifische Parameter in Form eines Punkte-Scoring-Systems im Sinne eines Stagings von Sepsis-Patienten untersucht. Gleichzeitig kam die Idee, dieses System mit weiteren Parametern wie genetischen und biochemischen Markern zu ergänzen, zum Ausdruck (Howell et al. 2011). Mit der Frage der Prädisposition für einen schweren Krankheitsverlauf und eine erhöhte Mortalität bei Sepsis-Patienten haben sich einige aktuelle Studien befasst. Der Einfluss von drei genetischen Polymorphismen auf den Verlauf und die Prognose stellt besonders in unserer Arbeitsgruppe einen Schwerpunkt dar. So konnte eine Assoziation der genetischen Variation des *Programmed Cell Death 1 Protein (PD-1)* mit einer erhöhten Morbidität und einer erhöhten 90-Tage-Mortalität durch Mansur et al. nachgewiesen werden (Mansur et al. 2014c). Mansur et al. bestätigten ebenfalls den Einfluss einer chronischen Niereninsuffizienz im Vergleich zu anderen chronischen Erkrankungen auf eine signifikant erhöhte 90-Tage-Mortalität (Mansur et al. 2015d). Bei Patienten mit der genetischen Variation im *CD14*-Genlocus wurde ein Überlebensvorteil belegt (Mansur et al. 2015f). Diese Erkenntnisse zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation ergeben einige prognostisch relevante Einflussfaktoren für den Krankheitsverlauf und die Mortalität von Sepsis-Patienten. Unabhängig vom Einfluss genetischer Polymorphismen auf den Krankheitsverlauf von Sepsis-Patienten konnte in weiteren Forschungsarbeiten von Mansur et al. eine erhöhte Mortalitätsrate bei Sepsis-Patienten mit einer primären Bakteriämie im Vergleich zu Patienten mit pulmonalem oder abdominellem Infektionsfokus belegt werden (Mansur et al. 2015b). Ebenfalls wurden der positive Effekt von kontinuierlicher Statin-Therapie bei Patienten mit schwerer *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*-assoziierter Sepsis und der positive Effekt von bestehender Statin-Therapie vor der Sepsis-Erkrankung bestätigt (Mansur et al. 2015a).

Eine mögliche Beschränkung dieser Arbeit könnte sein, dass der untersuchte TLR4-rs11536889-SNP durch die Kopplung zu einem anderen SNP in einem anderen nahen Gen in Kombination zu dem beobachteten Phänotyp führt.

Unserem Wissen nach ist dies die erste Studie, die diesen möglicherweise regulierenden Polymorphismus in Bezug auf einen Rezeptor im angeborenen Immunsystem erwachsener Kaukasier, die an Sepsis erkrankt sind, auswertet und eine signifikante Assoziation zwischen dem TLR4-rs11536889-GG-Genotyp und der Schwere der Organdysfunktion aufzeigt (Renal, Koagulativ, Hepatisch). Aufgrund dieser Ergebnisse ist zu empfehlen, weitere Messungen am TLR4-rs1536889-Polymorphismus auf Relevanz hinsichtlich des Krankheitsbildes Sepsis in größeren, unabhängigen Kohorten durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Die Untersuchungen dieser Arbeit galten der Erfassung des Zusammenhangs zwischen dem Genotyp des TLR4 rs11536889 GG, CG/CC und der Organfunktion (gemessen an dem SOFA-Score) in Sepsis-Patienten. Der im Fokus stehende SNP rs11536889 im TLR4-Rezeptorgen als Teil der Erkennungskaskade des bakteriellen LPS im Organismus lässt vermuten, dass die TLR4-Proteinexpression von der LPS-Präsenz abhängig ist und einen Einfluss auf die Organdysfunktion in kritisch kranken Patienten mit septischem Krankheitsbild hat. Es wurden zu der Zeit der Auswertung des Datensatzes für diese Arbeit 212 Patienten in einer Datenbank rekrutiert. Die eingeschlossenen Patienten wurden nach den Sepsis-Kriterien für die Studie ausgewählt. Die Ergebnisse der Genotypisierung und der Genexpression des TLR4 SNP rs11536889 wurden ebenso wie die Werte der Organfunktion über einen Zeitraum von 28 Tagen in eine Datenbank eingepflegt. Die Beurteilung der Organfunktion erfolgte mittels des SOFA-Scores und des APACHE-II-Scores. Zudem wurde 90 Tage nach Einschluss in die Studie eine Überlebenskontrolle durchgeführt.

In unseren Untersuchungen ergaben sich signifikant höhere SOFA-Werte für die TLR4-rs11536889-GG-Patienten verglichen mit den Werten der TLR4-rs11536889-GC- und -CC-Patienten. Anhand der SOFA-Sub-Scores wurden ebenfalls signifikante Unterschiede beobachtet, zum einen war der Nieren-SOFA-Sub-Score signifikant erhöht in TLR4-rs11536889-GG-Patienten gegenüber dem der C-Allel-Träger, das heißt, diese Gruppe von Sepsis-Patienten neigte eher zu einer renalen Dysfunktion in den 28 ausgewerteten Tagen. Zum anderen trat eine schwerere hepatische Dysfunktion bei TLR4-rs11536889-GG-Patienten auf. Darüber hinaus war ein signifikant erhöhter Sofa-Sub-Score der Gerinnung bei TLR4-rs11536889-GG-Patienten zu verzeichnen. Betrachtet man die Mortalität nach 28 Tagen sowie nach 90 Tagen, zeigt sich jedoch kein signifikantes Ergebnis. Zusammenfassend hat sich unsere Vermutung, dass der TLR4-rs11536889-Genotyp Einfluss auf den Krankheitsverlauf von septischen Patienten hat, passend zu den vorbekannten Daten bestätigt.

6 Literaturverzeichnis

Adamzik M, Frey UH, Mohlenkamp S, Scherag A, Waydhas C, Marggraf G, Dammann M, Steinmann J, Siffert W, Peters J (2011): Aquaporin 5 gene promoter-1364A/C polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. *Anesthesiology* 114, 912-917

Adhikari A, Xu M, Chen ZJ (2007): Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26, 3214-3226

Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD (2010): Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 376, 1339-1346

Akira S, Takeda K (2004): Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738

Anand RJ, Kohler JW, Cavallo JA, Li J, Dubowski T, Hackam DJ (2007): Toll-like receptor 4 plays a role in macrophage phagocytosis during peritoneal sepsis. *J Pediatr Surg* 42, 927-932; discussion 933

Ando M, Shibuya A, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K (2006): Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients. *Kidney Int* 70, 358-362

Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauss R, Meier-Hellmann A, Insel R, Radke J, et al. (2007): Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med* 35, 118-126

Angus DC, van der Poll T (2013): Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369, 840-851

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

Angus DC, Burgner D, Wunderink R, Mira JP, Gerlach H, Wiedermann CJ, Vincent JL (2003): The PIRO concept: P is for predisposition. *Crit Care* 7, 248-251

Arabi YM, Dabbagh OC, Tamim HM, Al-Shimemeri AA, Memish ZA, Haddad SH, Syed SJ, Giridhar HR, Rishu AH, Al-Daker MO, et al. (2008): Intensive versus conventional insulin therapy: a randomized controlled trial in medical and surgical critically ill patients. *Crit Care Med* 36, 3190-3197

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA (2000): TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25, 187-191

Armant MA, Fenton MJ (2002): Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 3, reviews3011.1-reviews3011.6

Ashare A, Powers LS, Butler NS, Doerschug KC, Monick MM, Hunninghake GW (2005): Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L633-L640

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM (2003): Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24, 528-533

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R (1994): The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 818-824

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, et al. (2001): Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344, 699-709

Bianchi ME (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5

Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, Collado J, Garcia-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, et al. (2008): Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 12, R158

Bone RC (1992): Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Arch Intern Med* 152, 1381-1389

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA (1997): Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112, 235-243

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. *Chest* 101, 1644-1655

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535

Brunkhorst FM, Reinhart K (2009): Diagnosis and causal treatment of sepsis. *Internist (Berl)* 50, 810-816

Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, et al. (2008): Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med* 358, 125-139

Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8790-8794

Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N (2002): Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 4, 915-926

Cohen J (2002): The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891

Cohen J, Cristofaro P, Carlet J, Opal S (2004): New method of classifying infections in critically ill patients. *Crit Care Med* 32, 1510-1526

COITSS Study Investigators, Annane D, Cariou A, Maxime V, Azoulay E, D'Honneur G, Timsit JF, Cohen Y, Wolf M, Fartoukh M, et al. (2010): Corticosteroid treatment and intensive insulin therapy for septic shock in adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 303, 341-348

Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA (2005): Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* 280, 36560-36566

Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, et al. (2004): Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 32, 858-873

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, et al. (2013): Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 39, 165-228

Deng M, Scott MJ, Loughran P, Gibson G, Sodhi C, Watkins S, Hackam D, Billiar TR (2013): Lipopolysaccharide clearance, bacterial clearance, and systemic inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of TLR4 during sepsis. *J Immunol* 190, 5152-5160

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531

Docke WD, Radow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W (1997): Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3, 678-681

Dunne A, O'Neill LA (2003): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003, re3

Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D (2007): Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med* 33, 941-950

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, et al. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33, 606-618

Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, Gonzalez-Diaz G, Garnacho-Montero J, Ibanez J, Palencia E, Quintana M, de la Torre-Prados MV, et al. (2008): Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA* 299, 2294-2303

Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, et al. (2001): Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78-83

Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD (2010): Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15880-15885

Geroulanos S, Douka ET (2006): Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med* 32, 2077

Godowski PJ (2005): A smooth operator for LPS responses. *Nat Immunol* 6, 544-546

Hagel S, Brunkhorst F (2011): Sepsis. *Intensivmed und Notfallmed* 48, 57-73

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988): The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103

Hayden MS, West AP, Ghosh S (2006): NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780

Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM (1988): The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 141, 547-552

He J, Xiao Z, Chen X, Chen M, Fang L, Yang M, Lv Q, Li Y, Li G, Hu J, et al. (2010): The expression of functional Toll-like receptor 4 is associated with proliferation and maintenance of stem cell phenotype in endothelial progenitor cells (EPCs). *J Cell Biochem* 111, 179-186

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745

Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Mitsuda Y, Hiraki A, Naito M, Wakai K, Tajima K, Hamajima N (2009): Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism, *Helicobacter pylori* seropositivity, and the risk of gastric atrophy and gastric cancer in Japanese. *Helicobacter* 14, 47-53

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

Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, Astiz ME, Chalfin DB, Dasta JF, Heard SO, Martin C, Napolitano LM, Susla GM, et al. (2004): Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit Care Med* 32, 1928-1948

Holm K: Das allgemeine lineare Modell. In: Holm K (Hrsg.): Die Befragung 6. Francke, München 1979

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T (2006): Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25, 349-360

Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, et al. (2005): Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263-270

Hoste EA, Lameire NH, Vanholder RC, Benoit DD, Decruyenaere JM, Colardyn FA (2003): Acute renal failure in patients with sepsis in a surgical ICU: predictive factors, incidence, comorbidity, and outcome. *J Am Soc Nephrol* 14, 1022-1030

Hotchkiss RS, Karl IE (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348, 138-150

Howell MD, Talmor D, Schuetz P, Hunziker S, Jones AE, Shapiro NI (2011): Proof of principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Crit Care Med* 39, 322-327

Human Gene Nomenclature. Gene TLR4. NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7099#general-gene-info>. (29.11.2017)

Institut für Genetische Epidemiologie. Exakt-Test Online-Rechner. Helmholtz Zentrum München: <http://www.ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. (20.07.2013)

Janeway CA, Jr. (1989): Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54, 1-13

Jegers M, Edbrooke DL, Hibbert CL, Chalfin DB, Burchardi H (2002): Definitions and methods of cost assessment: an intensivist's guide. ESICM section on health research and outcome working group on cost effectiveness. *Intensive Care Med* 28, 680-685

Jones DG, Taylor AM, Enkiri SA, Lobo P, Brayman KL, Keeley EC, Lipson LC, Gimple LW, Ragosta M (2009): Extent and severity of coronary disease and mortality in patients with end-stage renal failure evaluated for renal transplantation. *Am J Transplant* 9, 1846-1852

Kawai T, Akira S (2007): Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13, 460-469

Kellum JA, Lameire N, Group KAGW (2013): Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care* 17, 204

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985): APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13, 818-829

Koo DJ, Chaudry IH, Wang P (1999): Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. *J Surg Res* 83, 151-157

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, et al. (2006): Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 34, 1589-1596

Landry DW, Oliver JA (2001): The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 345, 588-595

LeDoux D, Astiz ME, Carpati CM, Rackow EC (2000): Effects of perfusion pressure on tissue perfusion in septic shock. *Crit Care Med* 28, 2729-2732

Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761-3766

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983

Levi M, Ten Cate H (1999): Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 341, 586-592

Levy MM, Macias WL, Vincent JL, Russell JA, Silva E, Trzaskoma B, Williams MD (2005): Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. *Crit Care Med* 33, 2194-2201

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, et al. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29, 530-538

Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, et al. (2010): The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med* 36, 222-231

Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA (2005): Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5, 446-458

Majno G (1991): The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis* 163, 937-945

Mansur A, Steinau M, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J (2015a): Impact of statin therapy on mortality in patients with sepsis-associated acute respiratory distress syndrome (ARDS) depends on ARDS severity: a prospective observational cohort study. *BMC Med* 13, 128

Mansur A, Klee Y, Popov AF, Erlenwein J, Ghadimi M, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J (2015b): Primary bacteraemia is associated with a higher mortality risk compared with pulmonary and intra-abdominal infections in patients with sepsis: a prospective observational cohort study. *BMJ Open* 5, e006616

Mansur A, Hinz J, Hillebrecht B, Bergmann I, Popov AF, Ghadimi M, Bauer M, Beissbarth T, Mihm S (2014c): Ninety-day survival rate of patients with sepsis relates to programmed cell death 1 genetic polymorphism rs11568821. *J Investig Med* 62, 638-643

Mansur A, Mulwande E, Steinau M, Bergmann I, Popov AF, Ghadimi M, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J (2015d): Chronic kidney disease is associated with a higher 90-day mortality than other chronic medical conditions in patients with sepsis. *Sci Rep* 5, 10539

Mansur A, von Gruben L, Popov AF, Steinau M, Bergmann I, Ross D, Ghadimi M, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J (2014e): The regulatory toll-like receptor 4 genetic polymorphism rs11536889 is associated with renal, coagulation and hepatic organ failure in sepsis patients. *J Transl Med* 12, 177

Mansur A, Liese B, Steinau M, Ghadimi M, Bergmann I, Tzvetkov M, Popov AF, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J (2015f): The CD14 rs2569190 TT Genotype Is Associated with an Improved 30-Day Survival in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Cohort Study. *PLoS One* 10, e0127761

Marshall JC (2014): 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

Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000): Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397

Miedema KG, te Poele EM, Tissing WJ, Postma DS, Koppelman GH, de Pagter AP, Kamps WA, Alizadeh BZ, Boezen HM, de Bont ES (2011): Association of polymorphisms in the TLR4 gene with the risk of developing neutropenia in children with leukemia. *Leukemia* 25, 995-1000

Moerer O, Quintel M (2009): Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis bei Erwachsenen. *Internist (Berl)* 50, 788, 790-784, 796-788

Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H (2002): Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 28, 1440-1446

Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR (2006): Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* 26, 430-437

Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonca A, Cantraine F, Thijs L, Takala J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H, et al. (1999): The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med* 25, 686-696

Morrison DC, Ulevitch RJ (1978): The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am J Pathol* 93, 526-618

NICE-SUGAR Study Investigators, Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, Dhingra V, Bellomo R, Cook D, Dodek P, et al. (2009): Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* 360, 1283-1297

Okabayashi K, Wada H, Ohta S, Shiku H, Nobori T, Maruyama K (2004): Hemostatic markers and the sepsis-related organ failure assessment score in patients with disseminated intravascular coagulation in an intensive care unit. *Am J Hematol* 76, 225-229

Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, et al. (2013): Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 309, 1154-1162

Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, Reinhart K, Frei U, Eckardt KU, Loeffler M, John S, German Competence Network S (2008): Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant* 23, 904-909

Pierrakos C, Vincent JL (2010): Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 14, R15

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, et al. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088

Preiser JC, Devos P, Ruiz-Santana S, Melot C, Annane D, Groeneveld J, Iapichino G, Leverve X, Nitenberg G, Singer P, et al. (2009): A prospective randomised multi-centre controlled trial on tight glucose control by intensive insulin therapy in adult intensive care units: the Glucontrol study. *Intensive Care Med* 35, 1738-1748

Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A, et al. (2012): Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 366, 2055-2064

Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, et al. (2010): Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis: 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Ger Med Sci* 8, Doc14

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, et al. (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8, 217-225

Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD (2005): Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353, 1685-1693

Rubulotta F, Marshall JC, Ramsay G, Nelson D, Levy M, Williams M (2009): Predisposition, insult/infection, response, and organ dysfunction: A new model for staging severe sepsis. *Crit Care Med* 37, 1329-1335

Russell JA, Singer J, Bernard GR, Wheeler A, Fulkerson W, Hudson L, Schein R, Summer W, Wright P, Walley KR (2000): Changing pattern of organ dysfunction in early human sepsis is related to mortality. *Crit Care Med* 28, 3405-3411

Sato K, Yoshimura A, Kaneko T, Ukai T, Ozaki Y, Nakamura H, Li X, Matsumura H, Hara Y, Ogata Y (2012): A single nucleotide polymorphism in 3'-untranslated region contributes to the regulation of Toll-like receptor 4 translation. *J Biol Chem* 287, 25163-25172

Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S (2003): Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with

TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171, 4304-4310

Schaaf CP, Zschocke J: *Basiswissen Humangenetik*. 2. Auflage; Springer, Berlin, Heidelberg 2013

Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H (2002): Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econ* 3, 77-82

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

Stanilova SA (2010): Functional relevance of IL-10 promoter polymorphisms for sepsis development. *Crit Care* 14, 119

Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG (2011): The pathogenesis of sepsis *Annu Rev Pathol* 6, 19-48

Stone R (1994): Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 264, 365-367

Sun D, Sun L, Xu Q, Gong Y, Wang H, Yang J, Yuan Y (2016): SNP-SNP Interaction between TLR4 and MyD88 in Susceptibility to Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population. *Int J Environ Res Public Health* 13, e278

Szabo G, Dolganiuc A, Mandrekar P (2006): Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases. *Hepatology* 44, 287-298

Thermo Fisher Scientific. TaqMan Gene Expression Assay solutions: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Specification-Sheets/cms_085696.pdf (04.06.2018)

Tidswell M, LaRosa SP (2011): Toll-like receptor-4 antagonist eritoran tetrasodium for severe sepsis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9, 507-520

van der Poll T, Opal SM (2008): Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 8, 32-43

van der Poll T, Levi M (2012): Crosstalk between inflammation and coagulation: the lessons of sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 10, 632-638

van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A (1990): Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 76, 2520-2526

Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca 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. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 26, 1793-1800

Wang H, Wei Y, Zeng Y, Qin Y, Xiong B, Qin G, Li J, Hu D, Qiu X, Sooranna SR, et al. (2014): The association of polymorphisms of TLR4 and CD14 genes with susceptibility to sepsis in a Chinese population. *BMC Med Genet* 15, 123

Wang Z, Forceville X, Van Antwerpen P, Piagnerelli M, Ahishakiye D, Macours P, De Backer D, Neve J, Vincent JL (2009): A large-bolus injection, but not continuous infusion of sodium selenite improves outcome in peritonitis. *Shock* 32, 140-146

Ward NS, Casserly B, Ayala A (2008): The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 29, 617-625

Warren HS (1997): Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med* 336, 952-953

Werdan K, Pilz G, Bujdoso O, Fraunberger P, Neeser G, Schmieder RE, Viell B, Marget W, Seewald M, Walger P, et al. (2007): Score-based immunoglobulin G therapy of patients with sepsis: the SBITs study. *Crit Care Med* 35, 2693-2701

Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Schweitzer J, Vogt W, Browder IW (2003): Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 31, 1808-1818

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, et al. (2002): Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329

Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, Hedelin M, Li L, Adami HO, Bensen J, Li G, Johnsson JE, Turner AR, et al. (2004): Sequence variants of toll-like receptor 4 are

associated with prostate cancer risk: results from the CAncer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res* 64, 2918-2922

Zhou L, Wei B, Xing C, Xie H, Yu X, Wu L, Zheng S (2011): Polymorphism in 3'-untranslated region of toll-like receptor 4 gene is associated with protection from hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Transpl Infect Dis* 13, 250-258

Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM (2002): The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 30, S294-301

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen meine tiefste Dankbarkeit für die Unterstützung bei der Erstellung der Doktorarbeit aussprechen:

Mein Dank gilt zunächst Herrn PD Dr. Ashham Mansur, meinem Doktorvater und Studienarzt, für seine Betreuung, seine ständige Ansprechbarkeit in klinischen Aspekten und der statistischen Berechnung dieser Arbeit. Seine Kritik war stets hilfreich und er ist maßgeblich an der Prozessierung dieser Arbeit in der vorliegenden Form mit verantwortlich. Ebenfalls verdanke ich Herrn Mansur die Publikation meines Dissertationsthemas.

Mein Dank gilt ebenfalls in hohem Maße Herrn Prof. Dr. Hinz, der als mein initialer Doktorvater genauso an der Fertigstellung meiner Arbeit beteiligt war. Seine geduldige und sachliche Art wirkten ermutigend und motivierend.

Mein besonderer Dank gilt Frau Waltraut Kopp, die als medizinisch-technische Angestellte die Laborarbeit der Promovierenden stets gewissenhaft begleitet hat und hilfsbereit zur Seite stand. Sie hatte immer ein offenes Ohr und wusste Rat zur Ausführung der Laborarbeiten.

Für die Hilfe bei der Erstellung der statistischen Abbildungen und Tabellen geht mein Dank an Prof. Dr. T. Beissbarth aus der Einrichtung „Zentrale Serviceeinheit medizinische Biometrie und statistische Bioinformatik“.

Mein Dank gilt ebenfalls Thomas Schulze (Klinik für Anästhesiologie), der auf informationstechnische Fragen jederzeit kompetent eine Antwort wusste.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei den Promovenden, die vor und mit mir bei der Erstellung der Datenbank tatkräftig mitgeholfen haben: Benjamin Liese, Bronja Hillebrecht, Simon Wilmers.

Lebenslauf

Als drittes Kind von Dietrich und Verena von Gruben (geb. Kolster) bin ich am 17. Februar 1990 in Stade geboren.

Bis zum Sommer 2006 besuchte ich das Gymnasium in Lüchow (Wendland) und schloss 2008 das Wesley College in Dublin, Irland, mit dem *Leaving Certificate* (Allgemeine Hochschulreife) ab.

Nach der Rettungssanitäter-Ausbildung in Berlin begann ich zum Sommersemester 2009 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Anschluss an das Physikum 2011 und zwei klinische Semester legte ich im Wintersemester 2012 ein Forschungssemester für die Bearbeitung der vorliegenden Dissertation ein. In der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie der Universitätsmedizin Göttingen arbeitete ich während der klinischen Semester als studentische Hilfskraft.

In meinen Semesterferien 2014 begleitete ich das Team von Interplast Germany e.V. nach Kodaikanal, Indien, um zwei Wochen den Menschen vor Ort eine medizinische Versorgung zukommen zu lassen.

Nach Absolvierung des schriftlichen Staatsexamens machte ich Auslandsstationen in Barcelona, Spanien, für das Tertial Innere Medizin und in Kapstadt, Südafrika, und Zürich, Schweiz, das Tertial Chirurgie für mein Praktisches Jahr. Mein Wahltertial verbrachte ich in der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Göttingen. Im Mai 2016 bestand ich das Staatsexamen der Humanmedizin mit der mündlichen Prüfung.

In dem Sommer begleitete ich als ärztliche Aufsichtsperson eine Gruppe junger Malteser nach Rumänien, die sich dort um geistig schwer erkrankte Menschen kümmerte.

September 2016 bis 2018 arbeitete ich in der Klinik für vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie Mitte von Dr. med. P. Dollinger der DRK Kliniken Berlin Mitte. Von November 2017 bis zum Mai 2018 habe ich eine Rotation auf der Intensivstation unter Prof. Dr. med. A. Timmermann durchgeführt. Seit November 2018 bin ich in der Allgemein, Viszeral- und Onkologische Chirurgie von Prof. Dr. med. M. Strik des Helios Klinikum Berlin-Buch tätig.