

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerzmedizin
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktorin: Prof. Dr. med. Grietje Beck
Lehrstuhl: Prof. Dr. med. Manfred Thiel

Über die Rolle von im Plasma gelösten
Immuncheckpoint-Proteinen in der Sepsis

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Noah Schäfer

aus
Büdingen

2024

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Holger Lindner

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2	ZUSAMMENFASSUNG.....	3
3	EINLEITUNG.....	4
3.1	Sepsis.....	6
3.1.1	Definition.....	6
3.1.2	Epidemiologie	7
3.1.3	Pathogenese	8
3.1.4	Immunsystem in der Sepsis.....	9
3.2	Immuncheckpoint-Proteine	10
3.2.1	Immunglobulin-Superfamilie	10
3.2.2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie	11
3.2.3	Lösliche Immuncheckpoint-Proteine	11
3.3	Immuncheckpoint-Proteine in der Sepsis	12
3.4	Immuncheckpoint-Proteine im Speziellen.....	12
3.4.1	BTLA / HVEM	12
3.4.2	PD-1 / PD-L1	14
3.4.3	CTLA-4 / CD28 / CD80 / CD86.....	17
3.4.4	TIM-3 / LAG-3.....	18
3.4.5	Weitere Immuncheckpoint-Proteine.....	20
4	FRAGESTELLUNG	22
5	MATERIAL UND METHODEN.....	24
5.1	Materialien.....	24
5.2	Studienpopulation.....	25
5.3	Studiendesign.....	27

5.4	Längsschnittanalyse (Design)	27
5.5	Querschnittanalyse (Design)	29
5.6	Plasmaproben	29
5.6.1	Probengewinnung	29
5.6.2	Proben für die Messung von Plasmakonzentrationen löslicher Immuncheckpoint-Proteine im zeitlichen Verlauf	30
5.6.3	Proben für ergänzende Konzentrationsmessungen von im Plasma gelösten Immuncheckpoint-Proteinen	30
5.7	Klinische Daten	30
5.8	Laboranalytische Methoden	31
5.8.1	<i>Magnetic Bead Array</i> (homogener Assay zur Multiplex-Bestimmung von Proteinen und cDNA)	31
5.8.2	Genexpressionsanalyse (<i>QuantiGene™ Plex Assay</i>)	32
5.8.3	Isolierung von CD15+ Granulozyten	33
5.8.4	Quantitative real-time PCR	34
5.9	Software	35
5.9.1	GraphPad Prism	35
5.9.2	SAS	36
5.10	Statistische Analyse	36
5.10.1	Mittelwerte	36
5.10.2	Mittelwertvergleich der Plasmakonzentrationen von Immuncheckpoint-Proteinen vor und nach Sepsisdiagnose innerhalb der Fallgruppe	37
5.10.3	Vergleich der Mittelwerte von Sepsis-Fällen und Erkrankten mit persistierendem SIRS	37
5.10.4	Benjamini-Hochberg-Verfahren	37
5.10.5	Hierarchische Modellierung der Plasmakonzentration löslicher Immuncheckpoint-Proteine über die Zeit	38
5.10.6	Interpretation der bei der Zeittrendanalyse geschätzten Parameter	40
5.10.7	Vergleich der Plasmakonzentrationen von löslichen Immuncheckpoint-Proteinen zwischen Patienten mit persistierendem SIRS, einem Übergang von SIRS zur Sepsis und bereits bestehender Sepsis	41
5.11	Ethikvotum	41
6	ERGEBNISSE	43
6.1	Demographische und klinische Charakteristika des Studienkollektives	43
6.2	Konzentrationen von Immuncheckpoint Proteinen im Blutplasma von Polytrauma-Fällen	45

6.2.1 Vorher-Nachher-Vergleich von Immuncheckpoint Proteinen in der Sepsis-Gruppe.....	45
6.2.2 Immuncheckpoint-Proteine in der Sepsis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe	49
6.3 Hierarchisches Modell der Plasmakonzentrationen gelöster Immuncheckpoint-Proteine im Vergleich von Sepsis-Fällen und einer Kontrollgruppe mit persistierendem SIRS.....	58
6.4 Charakteristika der Gruppen für die Messung ausgewählter Immuncheckpoint-Proteine.....	69
6.5 Immuncheckpoint-Proteine im Vergleich von Fällen mit persistierendem SIRS, bestehender Sepsis, Übergang von SIRS zur Sepsis und gesunden Kontrollen sowie der entsprechenden Messwerte aus der Polytrauma-Kohorte	72
6.6 Interleukine im Vergleich von Fällen mit persistierendem SIRS, bestehender Sepsis, Übergang von SIRS zur Sepsis und gesunden Kontrollen sowie der entsprechenden Messwerte aus der Polytrauma-Kohorte.....	76
6.7 Quantitative PCR granulözytärer cDNA.....	79
6.8 QuantigenePlex.....	83
 7 DISKUSSION	 86
7.1 Studiendesign und Rekrutierung	86
7.2 Messung löslicher Checkpointproteine	86
7.3 Immuncheckpoint-Proteine im longitudinalen Vergleich vor und nach der Sepsisdiagnose	87
7.4 Hierarchisches Modell des zeitlichen Konzentrationsverlaufes	89
7.5 Gruppenunterschiede in der HVEM-BTLA-Achse.....	89
7.6 Limitationen	92
 8 LITERATURVERZEICHNIS.....	 94
 9 LEBENS LAUF	 102
 10 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	 103
 11 DANKSAGUNG	 104

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> ; Antigen-präsentierende Zelle
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
B-Zelle	B-Lymphozyt
CAECAM1	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i> ; zökale Ligatur und Punktion
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
CV	Variationskoeffizient
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
dl	Deziliter
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
h	Stunde
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HVEM	<i>herpesvirus entry mediator</i>
ICOS	<i>inducible T-cell costimulator</i>
ICU	<i>intensive-care unit</i> ; Intensivtherapiestation
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQR	Interquartilenabstand
ISS	<i>injury severity score</i>
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
LAG-3	<i>lymphocyte activation gene-4</i>
m	männlich
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAP	Arterieller Mitteldruck
MFI	mediane Fluoreszenz-Intensität
mg	Milligramm
MHC-II	<i>major histocompatibility complex 2</i>

min	Minute
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	<i>messenger-RNA</i> ; Boten-Ribunukleinsäure
n	Stichprobenumfang
NET	<i>neutrophil extra-cellular traps</i>
ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PaO ₂	arterieller Sauerstoff-Partialdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Procalcitonin
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death protein ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PPR	<i>pattern recognition receptor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
s	<i>soluble</i> ; löslich
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TH1-Zelle	T-Helferzelle Typ 1
TH2-Zelle	T-Helferzelle Typ 2
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin domain 3</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
Treg	regulatorischer T-Lymphozyt
T-Zelle	T-Lymphozyt
UMM	Universitätsmedizin Mannheim
w	weiblich
WBC	<i>White blood cell</i> ; Weiße Blutzellen
xg	Vielfaches der Erdanziehung

2 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Rolle von im Plasma gelösten Checkpoint-Proteinen in der Sepsis untersucht sowie deren Eignung als Biomarker mit diagnostischem Potential evaluiert. Hierzu wurden aus einer Studienpopulation von 101 Intensivpatienten verschiedene Untergruppen gebildet und in diesen Untergruppen Konzentrationsmessungen für zunächst 16 Checkpoint-Proteine durchgeführt. Im Vergleich zweier Gruppen von Polytrauma-Patienten, von denen eine im Beobachtungszeitraum eine Sepsis entwickelte und die andere Sepsis-frei blieb. Hier konnte unter anderem HVEM als ein Protein identifiziert werden, das in den beiden Gruppen bereits im Zeitraum vor der Diagnosestellung einer Sepsis in signifikant unterschiedlicher Plasmakonzentration vorlag. Weiterhin wurde in diesen beiden zuvor genannten Studiengruppen eine Längsschnittanalyse der Plasmakonzentrationen mittels hierarchischer Modellierung durchgeführt. Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigte sich hier für BTLA ein unterschiedlicher Zeittrend in den beiden Gruppen.

Im Anschluss wurden für die übrigen Individuen aus der Studienpopulation ebenfalls Gruppen gebildet und die Plasmakonzentration von neun ausgewählten Checkpoint-Proteinen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses gemessen. Es konnte für HVEM auch hier ein Unterschied zwischen Patientinnen und Patienten mit einem Übergang zur Sepsis und solchen, die Sepsis-frei geblieben waren, festgestellt werden. Dieser statistisch signifikante Unterschied verhielt sich jedoch entgegengesetzt zu dem Unterschied in den beiden Gruppen der Polytrauma-Fälle, in denen sie Sepsis-Fälle eine erniedrigte Konzentration von HVEM im Plasma zeigten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass eine potentiell protektive Immunsuppression nach Traumata durch HVEM vermittelt werden könnte.

Weiter wurde in dieser Arbeit die Expression der Checkpoint-Proteine auf mRNA-Ebene in CD15+ Granulozyten bestimmt. Hier schien die Expression von HVEM gleichgerichtet mit der Plasmakonzentration zu verlaufen, was diesen Zelltyp als potentielle Quelle von löslichem HVEM identifiziert.

Durch die parallele Analyse verschiedener Checkpoint-Proteine kommt es zum Problem falsch positiver Ergebnisse durch multiples Testen. Dieses wurde mittels des Benjamini-Hochberg-Verfahrens deutlich verringert.

3 EINLEITUNG

Die Sepsis ist nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen von Patienten auf nicht-kardiologischen Intensivstationen in westlichen Industrienationen. Auch wenn die Mortalität dieser Erkrankung in den vergangenen Jahren leicht rückläufig war, gehen Schätzungen von weltweit bis zu 5,3 Millionen Sepsis-assoziierten Todesfällen aus (Fleischmann et al., 2016; Kaukonen et al., 2014). Neuere Zahlen, die 2020 publiziert wurden sprechen sogar von etwa 11 Millionen Fällen pro Jahr (Rudd et al., 2020). Es gibt zwei Konsensus-Definitionen der Sepsis: Der Sepsis-1/2-Definition nach bedingt ein durch eine Infektion ausgelöstes systemisches inflammatorisches Response-Syndrom die Sepsis (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003). Nach Sepsis-3 ist die Sepsis eine lebensbedrohliche Erkrankung, bei der die Reaktion des Körpers auf eine Infektion zu einer Schädigung der eigenen Gewebe und Organe führt (Singer et al., 2016).

Während die initiale Phase der Sepsis häufig mit einer übersteigerten Antwort des Immunsystems einhergeht - oft ist hier von einem Zytokinsturm die Rede - fallen Patientinnen und Patienten, welche diese Phase zunächst überstanden haben, häufig mit einer temporär vermeintlich geschwächten Immunkompetenz auf (Boomer et al., 2011). In diesem Zusammenhang wird seit einiger Zeit auch die Rolle von Immuncheckpoint-Proteinen diskutiert. Immuncheckpoint-Proteine, wie PD-1, PD-L1, CTLA-4 und BTLA werden auf verschiedenen Immunzellen, aber auch in anderen Geweben exprimiert und sind entscheidend an der Regulation der Aktivität von T-Zellen und anderen Zellen des adaptiven aber auch innaten Immunsystems beteiligt. Sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien konnte für verschiedene Immuncheckpoint-Proteine gezeigt werden, dass sie in der Sepsis differenziell exprimiert werden.

So konnten Huang et al. zeigen, dass PD-1 im murinen Sepsismodell vermehrt auf Makrophagen exprimiert war (Huang, 2009). Boomer et al. zeigten in einer retrospektiven Untersuchung an Verstorbenen eine erhöhte Expression von PD-1 auf CD4+- und CD8+-T-Zellen, sowie erhöhte Expression von PD-L1 in Lunge und Milz (Boomer et al., 2011). In einer prospektiven Studie von Guignant et al. (2011) konnten erhöhte Konzentrationen von PD-1 auf CD4+-T-Zellen über mehrere Tage in Patienten

mit septischem Schock nachgewiesen werden (Guignant et al., 2011). BTLA wurde von Shubin et al. (2013) als ein potentiell vielversprechender Biomarker vorgeschlagen (Shubin et al., 2013). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass BTLA vermehrt auf CD4+-T-Zellen bei Sepsis-Erkrankten exprimiert wurde. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Patientinnen und Patienten mit einem SIRS, welche eine nosokomiale Infektion erwarben, ebenfalls einen erhöhten Anteil von BTLA auf CD4+-T-Zellen hatten, verglichen mit Fällen, die keine Infektion entwickelt hatten (Shubin et al., 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Blockade inhibitorischer Checkpoint Proteine, wie PD-1 und CTLA-4, mittels kommerziell verfügbarer klonaler Antikörper im Tiermodell zu einem verbesserten Überleben der Sepsis führt (Chang et al., 2013).

Interessant ist, dass sich Immuncheckpoint-Proteine nicht nur gebunden auf der Zelloberfläche, sondern auch in löslicher Form im Blut nachweisen lassen. Diese Form der Checkpoint-Proteine wird in der Literatur häufig mit einem kleinen 's' gekennzeichnet, welches für den englischen Begriff soluble steht. In dieser Arbeit wird diese Kennzeichnung für lösliche Checkpoint-Proteinen im Weiteren übernommen. Die genaue Funktion dieser löslichen Checkpoint-Proteine ist derzeit noch unbekannt. Es lässt sich jedoch zeigen, dass einzelne dieser löslichen Immuncheckpoints in Ihrer Konzentration mit dem Auftreten einer Sepsis sowie der Mortalität der Sepsis korreliert. So waren höhere Werte von sBTLA assoziiert mit einer erhöhten 28-Tages-Mortalität von Sepsis-Patienten. Auch konnten die Autoren eine Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von sBTLA und dem SOFA-Score und dem Schweregrad der Sepsis finden. Patienten mit einem septischen Schock hatten eine höhere Plasmakonzentration von sBTLA (Lange et al., 2017). Zudem werden sowohl Checkpoints auf der Zelloberfläche als auch solche, die gelöst im Plasma vorkommen, als potentielle Biomarker für die Sepsis angesehen (Lange et al., 2017; Monaghan, 2016; Sherwood and Hotchkiss, 2013).

Ziel dieser Arbeit war es, das Potential von 16 ausgewählten löslichen Immuncheckpoint-Proteinen als Sepsis-Biomarker zu evaluieren. Hierzu wurden Unterschiede in ihren Konzentrationen im Blut in Abhängigkeit von der Entstehung einer Sepsis im Verlauf einer schweren Erkrankung bestimmt.

3.1 Sepsis

3.1.1 Definition

Ein zentraler Pfeiler von Sepsis-1 (Bone et al., 1992), ist das sogenannte systemische inflammatorische Response-Syndrom, kurz SIRS, welches beim ersten internationalen Konsens zur Definition der Sepsis vorgeschlagen wurde. Nach Bone et al. (1992) liege eine Sepsis vor, wenn das klinische Bild eines SIRS vorliegt und gleichzeitig eine Infektion nachgewiesen wurde oder der klinische Verdacht auf eine Infektion besteht. In diesem Fall ging man davon aus, dass die Infektion das SIRS verursacht. Ein SIRS wird angenommen, wenn zwei oder mehr der folgenden Kriterien zutreffen:

- Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz $>90/\text{min}$
- Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 <32\text{mmHg}$
- Leukozyten $>12.000/\mu\text{l}$ oder $<4000/\mu\text{l}$ oder $>10\%$ unreife Granulozyten.

Diese Definition wurde nach weiterem Experten-Konsensus um klinische Zeichen einer gestörten Homöostase, einschließlich Zeichen gestörter Organfunktion, erweitert (Levy et al., 2003). Diese auch als Sepsis-2 bezeichnete Erweiterung der ursprünglichen Sepsis-Definition (Sepsis-1) um klinische Leitlinien fußt nach wie vor auf dem Konzept von Sepsis-1 (Bone et al., 1992) und wird auch als Sepsis-1/2 bezeichnet. Sepsis-1 bzw. Sepsis-1/2 kennt drei Subtypen: die „einfache“ Sepsis, die schwere Sepsis und den septischen Schock. Eine schwere Sepsis liegt vor, wenn neben eines SIRS zusätzlich eine Organdysfunktion vorliegt. Der septische Schock nach Sepsis-1/2 beinhaltet eine Sepsis-induzierte, volumen-refraktäre arterielle Hypotension.

Wie im vorangegangenen Absatz beschrieben, konzentriert sich die 2016 eingeführte Definition der Sepsis auf die durch die Sepsis ausgelösten Organdysfunktionen.

Diese Organdysfunktion lässt sich mittels des sogenannten SOFA-Score beschreiben, wobei das Akronym SOFA für *Sequential Organ Failure Assessment* steht. Zuerst 1996 vorgeschlagen, erfasst der SOFA-Score Dysfunktion verschiedener Organsysteme und korreliert bei der Aufnahme auf die Intensivstation positiv mit der Intensivmortalität (Vincent et al., 1996).

Die Sepsis nach der Definition von 2016 wird im Folgenden auch als Sepsis-3 bezeichnet.

Organsystem	Parameter	1	2	3	4
Atmung	PaO ₂ /FiO ₂	<400 mmHg	<300 mmHg	<200mmHg und künstliche Beatmung	<100mmHg und künstliche Beatmung
Herz-Kreislauf-System	Dosierungen in µg/kg/min	MAP <70 mmHg	Dopamin <5 oder Dobutamin (beliebige Dosis)	Dopamin >5 oder Adrenalin <0,1 oder Noradrenalin <0,1	Dopamin >15 oder Adrenalin >0,1 oder Noradrenalin >0,1
Nieren	Kreatinin	1,2-1,9 mg/dl	2,0-3,4 mg/dl	3,5-4,9 mg/dl	>5,0 mg/dl
Leber	Bilirubin	1,2-1,9 mg/dl	2,0-5,9 mg/dl	6,0-11,9 mg/dl	>12 mg/dl
Gerinnung	Thrombozyten	<150.000/µl	<100.000/µl	<50.000/µl	<20.000/µl
Nervensystem	Glasgow Coma Scale	13-14	10-12	6-9	<6

Tabelle 1: klinische Features zur Bestimmung des SOFA-Scores

Der SOFA-Score wird bestimmt, indem die anhand der angegebenen Schwellenwertbereiche ermittelten Punktzahlen für jedes der sechs Organsysteme zu einem Gesamtscore aufaddiert werden. Sollten einzelne Features nicht verfügbar sein, fließen sie mit null Punkten in den Score ein.

3.1.2 Epidemiologie

Die Sepsis ist nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen von Patientinnen und Patienten auf nicht-kardiologischen Intensivstationen in westlichen Industrienationen. Auch wenn die Mortalität dieser Erkrankung in den vergangenen Jahren leicht rückläufig war, gehen Schätzungen von weltweit bis zu 5,3 Millionen Sepsis-assoziierten Todesfällen aus (Fleischmann et al., 2016; Kaukonen et al., 2014). Neuere Daten von Rudd et al. (Rudd et al., 2020) gehen sogar von einer weltweit noch höheren Fallzahl aus. So werden für das Jahr 2017 48,9 Millionen Fälle von Sepsis geschätzt. Die Sepsis-assoziierten Todesfälle belaufen sich nach dieser Studie auf bis zu 11 Millionen, was 19,7% aller weltweiten Todesfälle entspricht. Die Inzidenz der Sepsis variiert stark von Region zu Region, so liegt diese in Industrienationen, wie Deutschland mit geschätzt 120-200 Fällen pro 100.000 Einwohnern deutlich niedriger als in weniger stark entwickelten Regionen der Erde. Weltweit gesehen sind Durchfallerkrankungen der häufigste Auslöser einer Sepsis mit geschätzt 9,2 Millionen Fällen jährlich (Rudd et al., 2020). Eine aktuelle Metaanalyse geht von einer Inzidenz hospitalisierter Sepsis-Fälle von 189 Fällen pro 100.000 Einwohnern aus

(Fleischmann-Struzek et al., 2020). Die Mortalität dieser Sepsis-Fälle lag bei 26,7%. Betrachtet man die Situation auf Intensivtherapiestationen, so lag die Inzidenz von Sepsis-Erkrankungen auf solchen Stationen bei 58 pro 100.000 Einwohnern. Die Mortalität dieser Gruppe von Erkrankten lag in der gleichen Studie bei 41,9% (Fleischmann-Struzek et al., 2020).

3.1.3 Pathogenese

Bei einer Sepsis finden viele Prozesse simultan statt, die von einer lokalen Infektion über eine zunächst lokale zu einer systemischen Inflammation führen (Sepsis) und bei schweren Verläufen zu Dysfunktionen verschiedener Organsysteme (schwere Sepsis) bis hin zum septischen Schock. So ist in der Sepsis häufig der totale periphere Widerstand reduziert und das Herzzeitvolumen erhöht. Der Laktatgehalt des Blutes erhöht sich im Verlauf. Es kommt zu Veränderungen am Endothel, welche die Leukozyten-Adhäsion fördern. Außerdem sorgen diese für eine Vasodilatation und reduzierte seine Barrierefunktion der Gefäße mit daraus folgenden Ödemen. Es kommt vermehrt zur Bildung von Mikrothromben oder zur sogenannten disseminierten intravasalen Gerinnung, welche mit Ischämien und einem erhöhten Risiko für Blutungen einhergeht. In der Lunge kann eine erhöhte Permeabilität der Kapillaren zu vermehrten Ödemen, bis hin zum *Acute Respiratory Distress Syndrome* führen. Auch im Verdauungstrakt führt die systemische Entzündung zu verstärkter Permeabilität. Dies hat zur Folge, dass Bakterien die Darmwand durchwandern können und dadurch die lokale und systemische Inflammation verstärken. Weitere Sepsis-typische Organdysfunktionen betreffen die Nieren- wie auch die Leberfunktion. So reduziert sich in Hepatozyten die Fähigkeit zur Bilirubin-Clearance und unter septischen Bedingungen kommt es häufig zu akutem Nierenversagen. Auch das zentrale Nervensystem ist von der Sepsis betroffen. Häufig kommt es zu Delir und Enzephalopathien. Es wird vermutet, dass diese durch eine entstehende Störung der Blut-Hirn-Schranke begünstigt werden, da hierdurch Zytokine und auch Immunzellen in das Gehirn einwandern können (Gotts and Matthay, 2016)

3.1.4 Immunsystem in der Sepsis

Bakterielle Infektionen werden vom humanen Immunsystem über verschiedene Rezeptoren auf Immunzellen erkannt, welche sogenannte *pathogen-associated molecular patterns*, kurz PAMPs, erkennen und binden. Die bekannteste und evolutionär älteste Gruppe der sogenannten *pattern recognition receptors*, PPRs, bilden hier die Toll-like-Rezeptoren. Schäden in Geweben werden auf ähnliche Weise über sogenannte *damage-associated molecular patterns*, kurz DAMPs, durch PPRs erkannt. Die durch Bindung von PAMPs oder DAMPs an PPRs angestoßene Signalkaskade hat eine Ausschüttung verschiedenster pro-inflammatorischen Zytokine zur Folge. Dieser, von vielen Autoren auch als Zytokinsturm bezeichnete Vorgang, kann mehrere Tage anhalten und in erheblichem Maße zur Organdysfunktion beitragen (Delano and Ward, 2016).

Bis vor einigen Jahren ging man in der Wissenschaft davon aus, dass die hohe Mortalität in den ersten Tagen der Sepsis der starken hyperinflammatorischen Antwort zuzuschreiben sei (Bone et al., 1997; Delano and Ward, 2016), wohingegen die erhöhte Mortalität und Organdysfunktion im Verlauf und der Zeit nach der Sepsis, durch eine kompensatorisch, antiinflammatorische Antwort des Organismus hervorgerufen wird, welche das Risiko für sekundäre Infektionen erhöht (Hotchkiss et al., 2013). Neuere Erkenntnisse hingegen legen nahe, dass auch bereits in der frühen Phase der Sepsis inflammatorische und antiinflammatorische Prozesse annähernd simultan ablaufen. Deren Treiber sind die dysfunktionale angeborene bzw. die supprimierte erworbene Immunabwehr (Delano and Ward, 2016). In Ihrem Review kommen die Autoren Delano und Ward zu dem Schluss, dass sowohl inflammatorische als auch antiinflammatorische Antworten den Sepsisverlauf beeinflussen und potentielle Ziele für zukünftige Therapien sein können (Delano and Ward, 2016; Hotchkiss et al., 2009).

Die Sepsis beeinflusst das Immunsystem auf vielen verschiedenen Ebenen. Eine Übersichtsarbeit von Bermejo-Martin et al., hat hierzu zehn Merkmale/Charakteristika immunologischer Fehlfunktion (*Features of immunological dysfunction*) in den Fokus gerückt (Bermejo-Martin et al., 2016). Diese beinhalteten die qualitativ und quantitativ reduzierte Präsentation von Antigenen durch Antigen-präsentierende Zellen, kurz APCs, Defekte in der B- und T-Zell-vermittelten Immunantwort sowie die veränderte

Anzahl und Funktion von NK-Zellen. Weitere Merkmale/Charakteristika, die durch die Autoren benannt wurden, sind die eine Erhöhung im Anteil und der Aktivität regulatorischer T-Zellen (Treg), die erhöhte Expression von PD-1, verminderter Konzentrationen von Immunglobulinen im Serum, die Dysregulation der Funktion von neutrophilen Granulozyten, einer Hyperzytokinämie im Rahmen des oben bereits erwähnten Zytokinsturms, eine reduzierte Konzentration von Komplementfaktoren im Serum sowie Defekten in der Fähigkeit Bakterien mittels NETs zu eliminieren (Bermejo-Martin et al., 2016).

3.2 Immuncheckpoint-Proteine

Unter dem Begriff Immuncheckpoint-Proteine werden eine Reihe von Zelloberflächenproteinen zusammengefasst, die sowohl co-inhibitorische als auch co-stimulierende Effekte bei der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten haben. Diese sind gerade für die Regulierung der T-Zell-Aktivierung gut beschrieben. Diese Co-Signalgebenden Moleküle lassen sich in den meisten Fällen in zwei Familien unterteilen (Chen and Flies, 2013). Die Familienzugehörigkeit richtet sich nach der Strukturähnlichkeit. Demnach lassen sich die Immunglobulin-Superfamilie und die Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie unterscheiden. Letztere wird im Weiteren auch als TNFRSF abgekürzt.

3.2.1 Immunglobulin-Superfamilie

Am besten charakterisiert aus dieser Familie ist das Oberflächenmolekül CD28, welches an der Oberfläche von naiven (nicht aktivierten) T-Zellen vorkommt. Dieses Molekül bindet an CD80 (B7-1) und an CD86 (B7-2), welche auf spezialisierten APC-Zellen exprimiert werden. Die durch Bindung von CD28 an einen seiner Liganden angestoßene Signalkaskade unterstützt die antigenabhängige Aktivierung von T-Zellen durch Förderung von Proliferation, Cytokinproduktion und Überleben (Murphy and Weaver, 2018).

Zu den bekanntesten Mitgliedern der CD28-homologen Oberflächenproteine auf naiven T-Zellen gehört das *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4), welches eine deutlich höhere Affinität zu den Liganden B7-1 und B7-2 aufweist als

CD28 (Brunet et al., 1987; Linsley et al., 1991; Sharpe, 2009). Im Gegensatz zu CD28 hat CTLA-4 jedoch vornehmlich co-inhibitorische Eigenschaften (Sharpe, 2009).

Ein weiteres sehr bekanntes Molekül aus dieser Gruppe ist das *programmed cell death protein 1* (PD-1), das ebenso wie der *inducible T-cell costimulator* (ICOS) auf T-Zellen exprimiert wird. Während PD-1 als Co-Inhibitor fungiert (Latchman et al., 2001), ist ICOS an der T-Zell-Aktivierung beziehungsweise -Stimulation beteiligt (Chen et al., 2001).

Eine Ausnahme von der klassischen Interaktion von Mitgliedern der CD28- Familie mit Molekülen aus der B7- Gruppe bildet der *B- and T-lymphocyte attenuator* (BTLA), welches an den *herpesvirus entry mediator* (HVEM) aus der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie (TNFRSF) bindet (Chen and Flies, 2013; Gonzalez et al., 2005; Sedy et al., 2005). Ein weiteres Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ist das *T-cell immunoglobulin and mucin domain 3* (TIM-3), welches die T-Zell-Antwort sowohl hemmen als auch stimulieren kann (Kane, 2010). Das *lymphocyte activation gene-3* (LAG-3) vermittelt wiederum co-inhibitorische Signale in der T-Zell-Aktivierung. Weiterhin bindet LAG3 physiologischerweise mit den MHC-II Molekülen mit einer höheren Affinität als CD4 (Sierro et al., 2011).

3.2.2 Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie

Neben dem im vorherigen Absatz bereits erwähnten BTLA-Bindungspartner HVEM gibt es nur wenige Moleküle dieser Familie mit co-stimulierenden Eigenschaften. Hierzu zählt unter anderem CD40, welches auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird und den Liganden CD40L auf der T-Zelloberfläche bindet (Chen and Flies, 2013).

Andere Moleküle aus dieser Superfamilie haben vornehmlich co-inhibitorische Eigenschaften. Hierzu zählen CD27 und *glucocorticoid-induced TNFR-related protein* (GITR).

3.2.3 Lösliche Immuncheckpoint-Proteine

Auch wenn all die in den vorherigen Abschnitten erwähnten Immuncheckpoint-Proteine regulär auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden, lassen sich diese

Proteine in messbarer Konzentration im Plasma von Patienten nachweisen. Als mögliche Quelle für diese löslichen Immuncheckpoints werden zum Einen die Abspaltung von bereits auf Zellen exprimierten Untereinheiten und zum Anderen auch die Sekretion von solchen Immuncheckpoints diskutiert, die durch alternatives Splicing von mRNA entstanden sind (Gu et al., 2018). Zur biologischen Funktion dieser im Plasma gelösten Immuncheckpoint-Proteine lässt sich sagen, dass viele von diesen eine Bindungsaffinität zu den entsprechenden Liganden der auf Zelloberflächen exprimierten Moleküle haben. Lösliche Immuncheckpoint-Proteine können die reguläre Bindung von den auf der Zelloberfläche gebundenen Liganden kompetitiv hemmen (Song et al., 2011). In anderen Fällen löst die Bindung von gelöstem Immuncheckpoint-Protein mit dem Liganden auf der Zelloberfläche ein ähnliches co-inhibitorisches oder -stimulierendes Signal aus, wie die zellgebundenen Analoga (Gu et al., 2018). Für sCD28 konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass dieses Molekül, wie das oberflächengebundene Analogon, im Zusammenspiel mit den Liganden CD80 und CD86 eine stimulierende Antwort in dendritischen Zellen auslöst, welche in einer gesteigerten Produktion von IL-6 resultierte (Orabona et al., 2004).

3.3 Immuncheckpoint-Proteine in der Sepsis

Als ein möglicher Mechanismus der Sepsis induzierten Immunsuppression wird seit einiger Zeit in der Forschung die veränderte Expression von regulatorischen Immuncheckpoint-Proteinen diskutiert. Insbesondere wird Immuncheckpoint-Proteinen eine Beteiligung an der sogenannten Erschöpfung von T-Zellen, engl. *T cell exhaustion* zugeschrieben (Patil et al., 2016). So konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Expression vieler Immuncheckpoints bei Patienten mit Sepsis verändert ist (Patil et al., 2017).

3.4 Immuncheckpoint-Proteine im Speziellen

3.4.1 BTLA / HVEM

BTLA ist ein co-inhibitorisches Oberflächenmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie, welches neben T-Zellen auch auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird (Murphy and Murphy, 2010). Wie oben bereits

erwähnt ist BTLA eine Besonderheit in dieser Superfamilie von Immuncheckpoints, da sein Ligand HVEM Teil der TNFRSF ist. Gemeinsam sind HVEM und BTLA an der Regulation der T-Zellen-Antwort beteiligt (Sedy et al., 2005).

Im Zusammenhang mit der Sepsis konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Mäuse nach induzierter Sepsis eine erhöhte Expression von BTLA auf T- Zellen hatten. Diese Erhöhung korrelierte mit einer erhöhten Mortalität (Shubin et al., 2012). Die Sepsis wurde hier standardisiert mittels einer zökalen Ligatur und Punktion des Zökums in den Versuchstieren erzeugt. Dieses Verfahren wird in der Literatur auch als CLP bezeichnet. In einer anderen Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe konnte für Patienten auf der Intensivstation gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von BTLA auf CD4+ T-Zellen mit einem erhöhten Aufkommen von nosokomialen Infektionen korreliert (Shubin et al., 2013). In weiteren Arbeiten im murinen Tiermodell konnten die Autoren erhöhte Konzentrationen von BTLA auch auf Makrophagen, dendritischen Zellen sowie in verschiedenen Geweben (Ileum, Niere, Lunge, Leber und Milz) nachweisen (Cheng, 2016). Auch die Expression von HVEM verändert sich bei Sepsis-Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen. So konnten Boomer et al. in einer post-mortem Studie zeigen, dass HVEM bei Sepsis-Erkrankten vermehrt im Lungengewebe nachweisbar ist (Boomer et al., 2011).

Sowohl BTLA als auch HVEM lassen sich als lösliche Form im Plasma nachweisen (Lange et al., 2017). Für sBTLA konnte gezeigt werden, dass alternatives Splicing (Lange et al., 2017) von mRNA und die darauf resultierende Sekretion der Ursprung für dieses Protein in kritisch kranken Patienten sind (Monaghan et al., 2018). Das interessante an den Arbeiten von Lange et al. und Monaghan et al. ist, dass diese sBTLA als einen potentiellen Biomarker der Sepsis beschrieben haben, der sowohl einen diagnostischen, als auch einen prognostischen Wert hat. So korrelierte in der Arbeit von Lange et al. eine erhöhte Plasmakonzentration von sBTLA mit einer erhöhten Krankheitsschwere. Eine Plasmakonzentration über einer Cut-Off-Wert von 21 ng/ml ging in dieser Studie mit einer nahezu fünffach erhöhten Mortalität unter den Sepsis Patienten einher. Verglichen mit den Kontrollgruppen, bestehend aus nicht septischen, jedoch kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation und gesunden Blutspenderinnen und Blutspendern, war die Konzentration von sBTLA in der Sepsis Gruppe am höchsten (Lange et al., 2017). Diese erhöhte Konzentration in der Sepsis Gruppe konnten Monaghan et al. ebenfalls nachweisen. Die Autoren waren hier in der

Lage durch Veränderungen der Plasmakonzentration Patienten zu identifizieren, bei denen sich eine Sepsis abzeichnete. Dies gelang den Autoren vergleichbar zuverlässig, wie mittels des SOFA-Scores (Monaghan et al., 2018; Vincent et al., 1996).

3.4.2 PD-1 / PD-L1

Die Rolle von PD-1 und seinem Liganden PD-L1 im Zusammenhang mit der Sepsis ist vermutlich unter all den Molekülen mit Checkpoint-Eigenschaften am besten untersucht (Patil et al., 2017). PD-1 ist ein Transmembranprotein, was vornehmlich auf T- und B-Zellen exprimiert wird. Es kann aber auch auf Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Keir et al., 2008). PD-L1 (CD274) ist ebenfalls ein Transmembranprotein, das im Gegensatz zu PD-1 nicht permanent auf Immunzellen, wie B- und T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert ist (Collins et al., 2005). Präsentiert wird PD-L1 auch auf nicht zum Immunsystem gehörenden Geweben, wie Lunge, vaskulärem Endothel, Leber, Keratinozyten, Niere und auf der Oberfläche von Tumorzellen (Azuma et al., 2008; Keir et al., 2008; Patil et al., 2017).

Die Interaktion von PD-1 und PD-L1 führt zu einer Co-Inhibition der T-Zellantwort. Zahlreiche Studien, sowohl im Tiermodell als auch in humanen Studienkollektiven wurden bereits durchgeführt um die verschiedenen Aspekte dieser Interaktion von PD-1 und seinem Liganden im Krankheitsgeschehen der Sepsis aufzuklären. Auf aktivierten CD4+- und CD8+- T-Zellen wird PD-1 im Regelfall hochreguliert. Dies verhindert die überschießende Immunreaktion, die hierdurch droht (Araki et al., 2013; Crawford and Wherry, 2009). Eine Überexpression von PD-1, wie sie in der Sepsis vorkommt, führt zu einer verminderten Antwort sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems. Diese Verminderung wird unter anderem über eine verminderte Ausschüttung von Zytokinen vermittelt (Boomer et al., 2011). Auch eine Beteiligung dieses Mechanismus an der Erschöpfung von T-Zellen wird angenommen (Wherry and Kurachi, 2015).

Wie oben bereits erwähnt haben zahlreiche Studien die Veränderung in der PD-1/PD-L1-Achse im Tiermodell untersucht. So konnten Huang et al. eine erhöhte Expression auf Makrophagen im Peritoneum nach zökaler Ligatur und Punktion des Blinddarms (CLP) nachweisen. Diese vermehrte Expression ging in dieser Studie mit einer

verminderten Funktionsfähigkeit hinsichtlich der Phagozytose und Zytokinproduktion dieser Zellen sowie mit einer erhöhten Mortalität einher (Huang, 2009). Eine erhöhte Expression von PD-1 auf Monozyten sowie B- und T-Zellen in der Milz nach CLP wurde in einer anderen Studie gezeigt (Zhang et al., 2010). Auch zeigte sich hier eine erhöhte Expression von PD-L1 auf Monozyten und B-Zellen. Eine Blockade von PD-L1 resultierte hier in einem verbesserten Überleben, sowie einer besseren Bakterien-Clearance.

Eine Arbeit von Hutchins et al. untersuchte im Mausmodell die Expression von PD-1 und PD-L1 in der Leber. Hier fand sich bei den Tieren mit CLP-induzierter Sepsis eine erhöhte Expression von PD-L1 auf Endothelzellen in den Lebersinusoiden sowie eine erhöhte Präsentation von PD-1 auf Kupffer-Zellen. Diese Veränderungen gingen einher mit einer vermehrten Permeabilität der Lebersinusoiden und einer vermehrten Schädigung der Leber (Hutchins et al., 2013). Eine vermehrte Expression von PD-1 auf Kupffer-Zellen unter dem Einfluss einer Sepsis zeigte sich ebenfalls in einer Arbeit von Wang et al. Neben einer eingeschränkten Funktion der Kupffer-Zellen stellten die Autoren in dieser Studie auch noch eine veränderte Expression von anderen Immuncheckpoint-Proteinen sowie der, an der T-Zellaktivierung beteiligten Moleküle fest. So waren CD86 und MHC-II vermindert und CD80 vermehrt exprimiert (Wang et al., 2016).

Auch auf zirkulierenden Makrophagen, Monozyten, T- und NKT-Zellen und Neutrophilen wird in der Sepsis PD-L1 vermehrt exprimiert (Huang et al., 2014). Hier zeigte sich auch, dass diese vermehrte Expression einhergeht mit einer verminderten Phagozytoseleistung der Makrophagen.

Die Rolle von PD-1 und PD-L1 wurde in klinischen Studien ebenfalls untersucht. So wurde in einer prospektiven Arbeit von Guignant et al. (2011) gezeigt, dass sowohl PD-1 und PD-L1 auf CD4+ T-Zellen als auch PD-L1 auf Monozyten vermehrt exprimiert waren bei Patientinnen und Patienten mit septischem Schock, verglichen mit gesunden Kontrollen (Guignant et al., 2011). Diese Ergebnisse korrelierten mit einer verminderten Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten in vitro. Ebenfalls interessant, war die Korrelation von erhöhten Leveln von PD-1-assoziierten Liganden auf Monozyten und einer gestiegenen Mortalität und Anfälligkeit für nosokomiale Infektionen.

Vergleichbare Ergebnisse bei Patientinnen und Patienten mit septischem Schock zeigten sich in einer Arbeit von Zhang et al., in der die Autoren ebenfalls eine erhöhte

Expression von PD-1 auf CD4+- und CD8+-T-Zellen sowie signifikant höhere Level von PD-L1 auf Monozyten messen konnten. In vitro zeigten, die aus den Proben der Betroffenen isolierte B- und T-Zellen eine vermehrte Apoptose (Zhang et al., 2011). Des Weiteren scheint sich die Expression von PD-L1 auf Neutrophilen auf die Phagozytoseleistung dieser Zellen negativ auszuwirken (Patera et al., 2016). Auch wenn sich in dieser Studie die Level von PD-L1 auf der Oberfläche von Neutrophilen septischer Patientinnen und Patienten nicht signifikant von denen nicht septischer Erkrankter auf der Intensivstation unterschieden, so gab es doch eine negative Korrelation von erhöhter Expression von PD-L1 und verminderter Phagozytose der untersuchten Zellen. In einer prospektiven Multicenter Kohortenstudie konnten Shankar-Hari et al. zeigen, dass eine vermehrte Expression von PD-1 auf CD15+-Granulozyten mit einer durch Sepsis bedingten klinischen Verschlechterung assoziiert ist. Eine verminderte Expression von PD-L1 war mit einer Verbesserung des klinischen Zustandes sowie einer raschen Genesung der Patientinnen und Patienten und der Entlassung aus dem Krankenhaus binnen 72 h assoziiert (Shankar-Hari et al., 2018). Auch PD-1 und PD-L1 sind in löslicher Form im Blut des Menschen nachweisbar (Lange et al., 2017). Inwiefern sich die löslichen Immuncheckpoints sPD-1 und sPD-L1 als diagnostische und prognostische Biomarker eignen ist derzeit noch ungeklärt. So berichten Lange et al. von reduzierten, jedoch nicht signifikant verschiedenen Plasmakonzentrationen der beiden Moleküle in einer longitudinalen Beobachtungsstudie von über 100 Sepsisfällen sowie keiner signifikanten Korrelation von Plasmakonzentration und Krankheits-schwere- und -verlauf (Lange et al., 2017). Im Gegensatz hierzu publizierten Liu et al. im gleichen Jahr eine Arbeit, deren Ergebnisse darauf hindeuten, dass dieser Zusammenhang womöglich doch besteht (Liu et al., 2017). In dieser Arbeit zeigte das Studienkollektiv mit Sepsis erhöhte Plasmakonzentrationen von PD-1 und PD-L1 verglichen mit der Kontrollgruppe. Ebenfalls interessant war, dass Sepsis-Patientinnen und -Patienten, die im Laufe des Krankheitsgeschehens verstorben sind verglichen mit den Überlebenden, über den gesamten Beobachtungszeitraum eine konstant höhere Konzentration der beiden Immuncheckpoint-Proteine im Blut hatten. Dies werteten die Autoren als Hinweis für die Eignung von sPD-1 und sPD-L1 als prognostischen Biomarker in der Sepsis. In einer weiteren Publikation eignete sich sPD-1 zur Risikostratifikation von Sepsis-Patienten bereits in der Notaufnahme, ergänzend zu CRP und Procalcitonin (Zhao et al., 2018)

In keiner der zuvor genannten Studien zu sPD-1 und sPD-L1 wurde gemessen inwieweit die Konzentrationen dieser beiden Proteine mit der Expression auf der Oberfläche von Lymphozyten korrelieren. Eine Studie, die sich mit dieser Frage befasste, kam zu dem Ergebnis, dass eine solche Korrelation nicht besteht (Wilson et al., 2018). Interessanterweise konnten die Autoren hier wie zuvor Lange et al. keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakonzentration der beiden Immuncheckpoint-Proteine zwischen Sepsis-Kollektiv und der Kontrollgruppe finden.

3.4.3 CTLA-4 / CD28 / CD80 / CD86

Am Anfang des Kapitels wurde bereits erwähnt, dass sowohl CD28 als auch CTLA-4 Liganden der beiden Rezeptoren CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sind (Brunet et al., 1987; Linsley et al., 1991; Sharpe, 2009), wobei die Bindung von CD28 ein co-stimulierendes Signal in der T-Zelle auslöst, wohingegen die Bindung von CTLA ein co-inhibitorisches Signal auslöst. Darüber hinaus scheint die Interaktion von CTLA-4 mit APCs die dortige Expression von CD80 und CD86 zu vermindern (Cederbom et al., 2000; Oderup et al., 2006; Walker and Sansom, 2011). Als inhibitorischer Rezeptor trägt CTLA-4 bei verstärkter Expression ebenfalls zur T-Zell-Erschöpfung bei (Blackburn et al., 2009; Wherry and Kurachi, 2015).

Im Zusammenhang mit Sepsis konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass CTLA-4 sowohl auf CD4+- als auch auf CD8+- T-Zellen vermehrt exprimiert werden (Inoue et al., 2011). Auch konnte vermehrt CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen in dieser Studie nachgewiesen werden. Des Weiteren war es den Autoren möglich, zu zeigen, dass eine Blockade von CTLA-4 mittels eines geeigneten Antikörpers einen signifikant positiven Effekt auf das Überleben der Versuchstiere hatte und die Sepsis-induzierte Apoptose von Lymphozyten um bis zu 50% reduzieren konnte.

In Studien an humanen Sepsis-Patientinnen und -Patienten konnte gezeigt werden, dass CD28 im Zuge der Sepsis auf T-Zellen vermindert exprimiert wird, was die Autoren jeweils mit einer statthabenden Immunsuppression in Verbindung bringen (Chen et al., 2017; Spec et al., 2016). Die lösliche Form von CD28 lässt sich im Plasma von Sepsis-Erkrankten nachweisen (Nolan et al., 2008). In dieser Studie konnte kein Konzentrationsunterschied zwischen der Kontrollgruppe aus gesunden Teilnehmerinnen und Teilnehmern und der Sepsis-Gruppe festgestellt werden. Betrachtet man jedoch das Überleben in der Sepsis-Gruppe, so zeigten die an der

Sepsis Verstorbenen eine signifikant höhere Plasmakonzentration, verglichen mit sowohl den Überlebenden in der Sepsis-Gruppe, als auch mit den gesunden Kontrollen.

CTLA-4 lässt sich analog zu den bisher besprochenen Immuncheckpoint-Proteinen ebenfalls in löslicher Form im Blut nachweisen (Magistrelli et al., 1999). Für dieses Molekül gab es bislang nur einen Nachweis in einem Sepsis-Kollektiv (Lange et al., 2017). Da die Autoren in dieser Studie jedoch nur in einer der gesammelten Proben sCTLA-4 nachweisen konnten, wurde eine weitere Untersuchung dieses Parameters nicht angestrebt.

3.4.4 TIM-3 / LAG-3

Sowohl TIM-3 als auch LAG-3 gelten als inhibitorische Immuncheckpoint-Proteine auf T-Zellen. TIM-3 wird auf TH-1-Zellen exprimiert und bindet an Galectin-9. Galectin-9 wird neben Lymphozyten auch auf APCs und anderen Zelltypen exprimiert. Durch diese Bindung und die, dadurch ausgelöste Signalkaskade, wird in den TH-1-Zellen ein programmierter Zelltod eingeleitet (Zhu et al., 2005). Ein weiterer Ligand für TIM-3, der an der co-inhibitorischen Wirkung des Moleküls beteiligt ist, ist CAECAM1 (Huang et al., 2015). LAG-3 wirkt ebenfalls als co-inhibitorisches Molekül auf T-Zellen. Es weist strukturelle Ähnlichkeit mit CD4 auf und bindet mit MHC-II auf APCs (Sierro et al., 2011). Im Zusammenspiel mit weiteren inhibitorischen Immuncheckpoint-Proteinen tragen auch TIM-3 und LAG-3 zur T-Zell-Erschöpfung bei (Wherry and Kurachi, 2015). Neben den Zellen des adaptiven Immunsystems lässt sich TIM-3 auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems nachweisen (Anderson et al., 2007). Im Gegensatz zu der Wirkung auf T-Zellen wirkt die Stimulation von TIM-3 hier pro-inflammatorisch durch eine vermehrte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Anderson et al., 2007).

Im Zusammenhang mit Sepsis sind sowohl TIM-3 als auch LAG-3 bislang wenig untersucht. Jedoch konnte eine klinische Studie zeigen, dass die beiden Immuncheckpoints im Zuge der Sepsis differentiell auf verschiedenen T-Zell-Populationen exprimiert werden (Boomer et al., 2012). Hier wurden 24 Patientinnen und Patienten, die mit der Diagnose Sepsis auf die Intensivstation aufgenommen wurden am Aufnahmetag und, wenn möglich, am siebten Tag des Aufenthalts auf der Intensivstation Blut abgenommen und verschiedene Immunzell-Subtypen mittels

Durchflusszytometrie auf verschiedene Oberflächenproteine hin untersucht. Zu Beginn der Sepsis fanden die Autoren einen signifikant erhöhten Anteil von CD8+-T-Zellen, die LAG-3 exprimierten, verglichen mit der Kontrollgruppe. Im Verlauf der Sepsis tendierten auch die CD4+-T-Zellen zu vermehrter Expression von LAG-3 und zusätzlich auch von TIM-3. Die Autoren sehen hier einen Zusammenhang mit einer einsetzenden frühen T-Zell-Erschöpfung und einer hiermit einhergehenden Immunsuppression.

Spec et al. hingegen berichten in ihrer klinischen Studie über Erkrankte mit Candida-Sepsis, welche keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TIM-3 auf den untersuchten T-Zell-Populationen (Spec et al., 2016) aufweisen. Die Blutentnahme fand hier im Unterschied zur vorher zitierten Studie nur einmalig innerhalb von 48h nach dem Erregernachweis statt.

Yang et al. haben in einer Studie nachweisen können, dass die Konzentration von TIM-3-mRNA in PBMCs in einem Sepsis-Kollektiv signifikant höher war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Interessant und auch für die Autoren unerwartet war, dass bei Patientinnen und Patienten mit einer schweren Sepsis, nach Sepsis-2, die Konzentration von TIM-3-mRNA wieder signifikant abgefallen war (Yang et al., 2013). In der gleichen Studie konnten die Autoren ebenfalls zeigen, dass es im Tiermodell eine negative Korrelation zwischen der Konzentration von TIM-3-mRNA und der Sekretion von IL-6 und TNF-alpha in Zellen auf einer peritonealen Lavage gibt, was zu einer pro-inflammatorischen Reaktion führt. Aus der Tatsache, dass eine Blockade von TIM-3 im Mausmodell zu einer Exazerbation der Sepsis mit verminderter Überlebensrate der Versuchstiere führte, leiten die Autoren hier ab, dass TIM-3 eine entscheidende Rolle in der Immunhomöostase der Sepsis spielt.

Eine Blockade des TIM-3 Signals mittels sTIM-3-Ig führte, im murinen Sepsis-Modell, in der Frühphase der Sepsis zu einer signifikant höheren Konzentration von pro-inflammatorischen M1 Makrophagen in der peritonealen Lavage (Zhao et al., 2014). Gleichzeitig zeigte sich eine vermehrte lymphozytäre Apoptose im Thymus der septischen Mäuse, bei denen sTIM-3-Ig injiziert wurde. In der Spätphase der Sepsis, fünf Tage nach CLP wurden die Mäuse erneut untersucht. Hierbei zeigte sich ein vermehrter Anteil von anti-inflammatorischen M2-Makrophagen. Die Untersuchung der T-Zell-Antwort in der Spätphase der Sepsis erfolgte hier mittels einer Messung TH-1- und TH-2-spezifischer Zytokine. Hieraus ergab sich, dass in den Mäusen, in denen der TIM-3-Signalweg blockiert wurde, die TH1-Antwort vermindert war, wohingegen die

erhöhten Konzentrationen TH2-spezifischer Zytokine eine vermehrte TH2-Antwort implizierten.

Die Rolle von im Plasma gelösten sTIM-3 wurde 2015 von Ren et al. untersucht. Hier fanden die Autoren durchgehend niedrigere Plasmakonzentrationen in Erkrankten mit Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock (Ren et al., 2015). Interessant war hier, dass die Plasmakonzentrationen von Patientinnen und Patienten mit septischem Schock im Vergleich zur einfachen und schweren Sepsis wiederum erhöht waren. Die Autoren bringen dieses Ergebnis mit der, im septischen Schock vorliegenden Immunsuppression in Einklang und schreiben einen Teil dieser Wirkung dem im Plasma gelösten sTIM-3 zu. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass TIM-3 auf Monozyten von Betroffenen mit einfacher Sepsis vermehrt exprimiert wird, verglichen mit jenen Patientinnen und Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock oder gesunden Kontrollen.

3.4.5 Weitere Immuncheckpoint-Proteine

Für die übrigen in dieser Studie untersuchten Immuncheckpoint-Proteine finden sich in der Fachliteratur nur einzelne Publikationen. Chen et al. konnten in einer klinischen Arbeit eine verminderte Expression von CD28 und ICOS auf CD4+-T-Zellen von Sepsisfällen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus Gesunden nachweisen (Chen et al., 2017). ICOS ist wie CD28 ein co-stimulierendes Immuncheckpoint-Protein, welches von T-Helferzellen exprimiert wird und an deren Aktivierung beteiligt ist (Chen et al., 2001; Hutloff et al., 1999).

Ähnlich wie Chen et al. (2001) zeigten T-Zellen von humanen Sepsis-Fällen in einer Studie von Möhnle et al. verminderte Expressionslevel von ICOS im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Möhnle et al., 2018). In der Zusammenschau mit anderen Zytokinen und Oberflächenmarkern schien ICOS hier eine Immunparalyse mit anzuzeigen.

Als Teil der TNFRSF ist CD40 auf verschiedenen Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen und B-Zellen exprimiert (Sugimoto et al., 2003). Als Immuncheckpoint-Protein hat CD40 co-stimulierende Eigenschaften auf die T-Zell-Aktivierung (Chen and Flies, 2013).

Im Zusammenhang der Sepsis wurde die Expression von CD40 auf verschiedenen Immunzell-Subtypen untersucht. Sugimoto et al. (2003) konnten zeigen, dass CD40

auf Monozyten von Sepsis-Patientinnen und -Patienten, verglichen mit gesunden Kontrollen signifikant häufiger exprimiert wird. Weiterhin gab es einen Zusammenhang zwischen dem Überleben der Betroffenen mit Bakteriämie und der Expression von CD40 auf Monozyten. So hatten die Patientinnen und Patienten, die im Zuge des Krankheitsgeschehens verstorben sind, signifikant niedrigere Expressionslevel von CD40 (Sugimoto et al., 2003). Eine ähnliche Studie konnte die erhöhte Expression von CD40 auf Monozyten bei Patienten mit Sepsis bestätigen (Jämsä et al., 2017). Hier war die Expression bei Erkrankten mit schwerer Sepsis am höchsten, verglichen mit einfacher Sepsis und nicht-septischen Intensivpatientinnen und -Patienten. Auch zeigte sich über den zeitlichen Verlauf eine Abnahme der Expression von CD40 bei schwerer Sepsis.

Im Tiermodell waren nach CLP ebenfalls erhöhte Expressionslevel von CD40 auf Monozyten im peripheren Blut nachweisbar (Nolan et al., 2008). Zudem konnte die gleiche Arbeitsgruppe in einer vorherigen Studie zeigen, dass CD40 KO-Mäuse nach durchgeführter CLP ein verbessertes Überleben hatten (Gold et al., 2003).

Eine entscheidende Rolle im Krankheitsgeschehen der Sepsis konnte für die vornehmlich co-inhibitorische Interaktion von GITR und GITRL bislang nicht nachgewiesen werden. So gab es in einer klinischen Studie keine Konzentrationsunterschiede von GITRL zwischen septischen und nicht-septischen Intensivpatientinnen und Patienten (Roderburg et al., 2016).

4 FRAGESTELLUNG

Frage 1: Können Konzentrationsunterschiede im Plasma gelöster Checkpoint-Proteine eine Sepsis voraussagen? → Dann kann eine mögliche Rolle als Einflussgrößen diskutiert werden.

Frage 2: Gibt es Unterschiede in der Plasmakonzentration gelöster Checkpoint-Proteine zum Zeitpunkt einer Sepsisdiagnose? → Dann haben sie möglicherweise Markerpotential.

Die Beantwortung dieser beiden Fragen aus der Literatur gestaltet sich schwierig. Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen handelt es sich bei den Checkpoint-Proteinen um eine sehr heterogene Gruppe von Oberflächenproteinen, welche auf verschiedenen Immunzellen und anderen Zellen im menschlichen Organismus exprimiert werden. Auch sind die Funktionen der Checkpoint-Proteine sehr heterogen. So können bestimmte Checkpoint-Proteine, wie HVEM und BTLA durch Bindung an ihre Liganden und die so ausgelösten Signalkaskaden eine Immunreaktion inhibieren. Andere Checkpoint-Proteine, wie CD28 hingegen können co-stimulatorisch auf Immunzellen wirken.

Mitunter liefern die verfügbaren Studien widersprüchliche Ergebnisse. So wird beispielsweise für TIM-3 in einigen Studien berichtet, dass dieses Protein in der Sepsis, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe differentiell exprimiert wird, wohingegen andere Studien einen solchen Unterschied nicht feststellen konnten.

Gründe für solch widersprüchliche Ergebnisse liegen vermutlich in der Heterogenität der verschiedenen Kohorten in den einzelnen Studien. Dies liegt vor allem in den verschiedenen Rekrutierungsstrategien in den einzelnen klinischen Arbeiten. Häufige Strategien zur Rekrutierung von Intensivpatientinnen und -patienten sind der Studieneinschluss bei Aufnahme auf die Intensivstation oder der Einschluss bei Diagnose einer Sepsis. Viele klinische Arbeiten vergleichen die Sepsis-Patienten mit nicht-septischen Intensivpatienten oder gesunden Kontrollen. Andere Studien unterschieden in ihren Kohorten auch den Schweregrad der Sepsis und verglichen diese verschiedenen Krankheitsausprägungen miteinander.

Studien, welche die Rolle gelöster Checkpoint-Proteine untersucht haben, sind außerdem deutlich weniger häufig als solche, die sich mit der Expression auf Immunzellen beschäftigen. Insbesondere gibt es keine, mit dieser Studie vergleichbaren Studien, deren Rekrutierung, die Patientinnen und Patienten bereits vor dem Auftreten einer Sepsis einschloss.

Um allen diesen Herausforderungen zu begegnen, wurden klare Einschlusskriterien mit dem Vorhandensein eines SIRS über zwei aufeinanderfolgende Tage, im Studiendesign formuliert. Auch wurden diese Zielgrößen eng formuliert. Im ersten Schritt der Analyse sollte hierzu ein Übergang eines SIRS hin zu einer einfachen Sepsis nach Sepsis-1/2 vorliegen. Auch wurde die Kontrollgruppe hinsichtlich des Alters gematcht.

Im Weiteren wurde im Studiendesign darauf geachtet, sich nicht auf ein einzelnes zu untersuchendes Checkpoint-Protein festzulegen. Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet, welches die Messung der Plasmakonzentration von 16 verschiedenen Checkpoint-Proteinen ermöglicht.

Dieses Vorgehen ermöglicht auch weiterführende Aussagen zur Frage, wie sich die Checkpoint-Proteine untereinander in ihrer Plasmakonzentration unterscheiden.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Materialien

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Tabellen zeigen die, für diese Dissertation verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien. Zusätzlich zur Bezeichnung sind im Weiteren auch der Hersteller und die jeweilige Katalognummer angegeben.

Geräte	Hersteller	Katalognummer
2100 Bioanalyzer Instrument	Agilent	G2939BA
Ultraschallbad	Elma	S40
Pipette Research Plus Einkanal 2,5 µL; 10 µL, 100 µL, 1000 µL; 20 µL; 200 µL	Eppendorf	3123000012; 3123000900; 3124000040; 3124000083
Zentrifuge 5804R, 5810R	Eppendorf	5804R, 5810R
Multipipette M4	Eppendorf	4982000012
VorTemp plate shaking incubator	Life Technologies GmbH, Darmstadt	QP0704
MAGPIX® Sytem	Luminex Corporation	MAGPIX
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec	130-042-303
Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec	130-042-302
Mini MACS Separator	Miltenyi Biotec	130-042-102
Thermocycler peqSTAR 2X Universal Gradient	Peqlab Biotechnologie	732-2889
Vortex Genie 2	Scientific Industries	SI-0236

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte

Kits	Hersteller	Katalognummer
DNA-free™ DNA Removal Kit	Applied Biosystems	AM1906
High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit mit RNase Inhibitor	Applied Biosystems	4374966
TaqMan™ Gene Expression Assay	Applied Biosystems	4331182
QuantiGene Temperature Validation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt	QS0517
QuantiGene Sample Processing Kit, Cultured Cells	Life Technologies GmbH, Darmstadt	QS0100
QGP Assay kit-PREMIX-1PLT	Life Technologies GmbH, Darmstadt	QP1013
MILLIPLEX® Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Panel 1 - Immuno-Oncology Multiplex Assay	Merck Millipore	HCKPMAG-11K-016
Custom Premix Cyto/Chemokine MAG13	Merck Millipore	HCYTOMAG-60K-13C
CD15 MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-046-601
Whole Blood Column Kit	Miltenyi Biotec	130-093-545
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific	AM1561

Tabelle 3: Verwendete Kits

Verbrauchsmaterialien + Reagenzien	Hersteller	Katalognummer
Nuclease freies Wasser	Ambion	AM9937
RNAlater®	Ambion	AM7020
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems	4444554
Mikropipetten-Tipps (10, 20, 200 und 1250 µL)	Biozym	VT0200 VT0220 VT0230 VT0240 VT0270
Zentrifugen-Röhrchen Falcon® 15 mL	Corning	352196
Reaktionsgefäß 0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf	0030123.301 0030120.086 00300120.094
Dulbecco`s PBS (Phosphate buffered saline) (1x) ohne Calcium und Magnesium *	GIBCO Life Technologie	14190-094
Univ Hu Reference RNA 10 ug	Life Technologies GmbH, Darmstadt	QS0639
50plex, QGP RNA, Human	Life Technologies GmbH, Darmstadt	QGP-150
LD MACS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-901
LS MACS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-041
MS MACS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-201
Parafilm Verschlussfolie	Parafilm M	PM-996
Monovetten mit EDTA (Ethylendiamintetraacetat) 1,2 mL, 3,4 mL, 4,9 mL und 9 mL	Sarstedt	06.1664.001 04.1914.001 04.1931.001 02.1006.001
Safety Multifly® Kanüle	Sarstedt	851.638.235
Multiwell-Platten Suspension, flacher Grund, 96 Wells	Sarstedt	833.925.500
Antifekt N Liquid Desinfektionslösung	Schülke	23100-A
Nitril ecoSHIELD Einweghandschuhe	Semperguard	743121
Wasser	Sigma	RNBF6963

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

* Zusammensetzung: KCl 2,667 mM; KH₂PO₄ 1,47mM; NaCl 137,7mM; Na₂HPO₄-7H₂O 8,06 mM

5.2 Studienpopulation

Im Rahmen des SEPTOMETER-Projektes wurden Patienten gescreent, die sich in intensivmedizinischer Behandlung der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universitätsmedizin Mannheim befanden. Eingeschlossen wurden hierfür Patienten die an zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach der Intensivaufnahme ein SIRS aufwiesen oder zum Zeitpunkt der Aufnahme das Bild einer Sepsis nach Sepsis-1/2 (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003), also die Kombination aus SIRS und einer gesicherten oder vermuteten Infektion zeigten. Das Screening der Patientinnen und Patienten auf der operativen Intensivstation erfolgte jeweils vormittags. Von der Studie ausgeschlossen waren Frauen im gebärfähigen Alter sowie Patientinnen und Patienten mit bekannter maligner Erkrankung, einer Vorbehandlung mit Glukokortikoiden, Zustand nach Organtransplantation oder einer vorbestehenden

terminalen Niereninsuffizienz. Nachträglich ausgeschlossen wurden Probandinnen und Probanden, die im Laufe des Beobachtungszeitraumes auf eine Normalstation verlegt wurden. Die Rekrutierung erfolgte durch die beiden Studienärzte Dr. S. Centner und Dr. J. Schöttler.

Über einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen wurde den Patientinnen und Patienten, beginnend mit dem Einschlusstag um 15 Uhr im Abstand von acht Stunden Blut abgenommen, so dass insgesamt 15 Blutabnahmen erfolgten, oder weniger im Falle eines früheren Ausscheidens aus der Studie aufgrund von Versterben oder Verlegung von der ICU unserer Klinik auf eine andere Station. Zu allen Entnahmezeitpunkten wurden Plasmaproben gewonnen. Bei den Blutentnahmen um 7 Uhr morgens wurde ein zusätzliches EDTA-Röhrchen zur Isolierung von CD15+ Granulozyten entnommen.

Für die Zeitpunkte der Blutentnahmen d.h. alle acht Stunden, wurden den Patientinnen und Patienten vom Zeitpunkt des Studieneinschlusses für den gesamten Beobachtungszeitraum durch retrospektive Experteneinschätzung (Prof. M. Thiel, Dr. J. Schöttler, Dr. S. Centner) klinische Labels zugewiesen. Diese klinischen Labels beziehen sich darauf, ob das entsprechende Individuum die Diagnosekriterien einer Sepsis nach Sepsis-1/2 erfüllt oder nicht. Folgende Label wurden vergeben: SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock und weder SIRS noch Sepsis.

5.3 Studiendesign

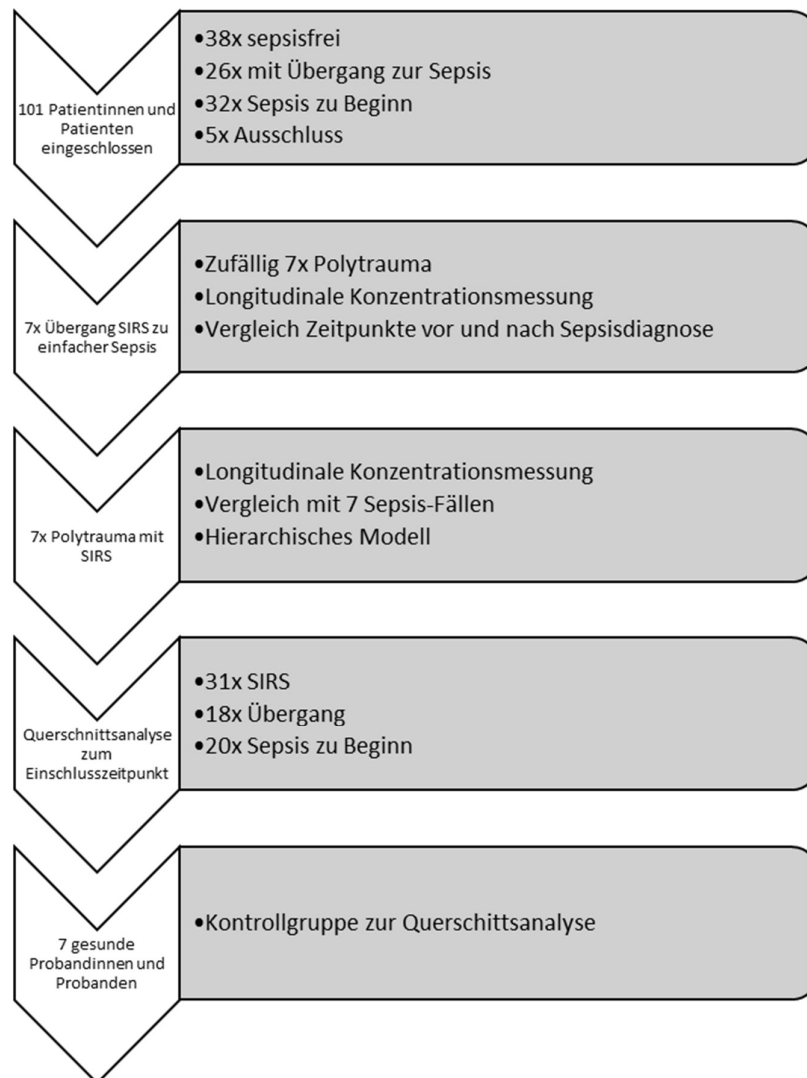


Abbildung 1: Flussdiagramm Studiendesign und Bildung der Gruppen aus der Studienpopulation

5.4 Längsschnittanalyse (Design)

Für die Längsschnittanalyse sollten, aufgrund begrenzter Analysekapazität, zunächst sieben Patientinnen und Patienten aus der Studienpopulation ausgewählt werden, die im Beobachtungszeitraum einen Wechsel im Expertenlabel von SIRS zu einer einfachen Sepsis am darauffolgenden Probennahmezeitpunkt hatten, also acht Stunden später. Da 9 Fälle dieses Kriterium erfüllten, wurden aus diesen sieben zufällig bestimmt. Eine Analyse der Aufnahmediagnosen ergab, dass jeder dieser Fälle aufgrund eines Polytraumas auf der Intensivstation behandelt wurde. Mit diesem Wissen wurde eine altersgematchte Kontrollgruppe aus der Studienpopulation generiert, die ebenfalls aus Polytrauma-Fällen ohne Sepsis-Label, also durchweg mit

dem Label SIRS oder weder SIRS noch Sepsis, im Beobachtungszeitraum bestand (siehe Tabelle 5). Die Kriterien für das Altersmatching beinhalteten die Vorgabe, dass jedem Fall aus der Sepsis-Gruppe ein Fall gegenübergestellt werden sollte, der nicht mehr als zehn Jahre jünger oder älter sein sollte als der korrespondierende Sepsis-Fall. Ein Matching, das sowohl Alter und Geschlecht berücksichtigt, war aufgrund der zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Studienpopulation nicht möglich. Auch hier erfüllten mehr als sieben Fälle die aufgerufenen Kriterien, sodass diejenigen sieben Fälle ausgewählt wurden, bei denen das Alter am besten mit der Sepsis-Gruppe übereinstimmte.

Sepsis		Kontrollen	
Geschlecht	Alter	Geschlecht	Alter
m	46	m	47
m	55	m	49
m	55	m	53
m	26	m	19
w	67	m	78
m	26	m	33
m	56	m	55

Tabelle 5: Alter und Geschlecht von Fällen und Kontrollen mit Polytrauma. Ein Matching nach Geschlecht war aufgrund mangelnder weiblicher Polytrauma-Fälle nicht möglich. Ein m bezeichnet hier jeweils ein männliches Individuum, ein w ein weibliches Individuum.

Alle 14 Patientinnen und Patienten wurden zwischen Juni 2017 und Mai 2018 in die SEPTOMETER-Studie eingeschlossen.

Für die Durchführung dieses Teils dieser Studie wurden für jeden Patienten und jede Patientin Plasmaproben mehrerer Zeitpunkte untersucht. Ausgewählt wurden hierfür die Proben, die bei Studieneinschluss gewonnen wurden, sowie die darauffolgenden um jeweils 7:00 Uhr abgenommenen Blutproben bis hin zur Sepsis-Diagnose. Sobald eine Sepsis-Diagnose innerhalb eines Achtstunden-Intervalls erfolgte, wurden die Plasmaprobe unmittelbar 8 h vor und unmittelbar 8 h nach dem Übergang von SIRS zur Sepsis, sowie je nach Verfügbarkeit ein oder zwei weitere unmittelbar in Acht-Stundenabständen nachfolgende Proben mit in die Analyse eingeschlossen. Für die Kontrollgruppe der SIRS-Fälle wurden die Proben zu den analogen Zeitpunkten, des jeweilig gematchten Sepsis-Falls ausgewählt.

5.5 Querschnittanalyse (Design)

Im zweiten Teil der Studie sollten ergänzende Konzentrationsmessungen für ausgewählte Immuncheckpoint-Proteine an einer größeren Studienpopulation vorgenommen werden. Hierfür wurden die Patientinnen und Patienten aus der finalen SEPTOMETER-Rekrutierung in drei Gruppen aufgeteilt (siehe Abbildung 1). Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand der retrospektiv generierten Expertenlabels. So gab es Fälle, in denen die Betroffenen über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Sepsis entwickelten, sondern im Status des SIRS verblieben. Andere Fälle zeigten zu Beginn der Rekrutierung ein SIRS und entwickelten im Verlauf der Beobachtung eine Sepsis. Die Fälle der dritten Gruppe zeigten hingegen bereits zum ersten Blutabnahmezeitpunkt eine Sepsis. Neben den Patientinnen und Patienten aus der SEPTOMETER-Studie wurden auch sieben gesunde Probanden rekrutiert, welche eine Kontrollgruppe bildeten. Die zwei Gruppen von Polytrauma-Fällen (siehe Kapitel 5.4) wurden hierfür nicht erneut herangezogen, sondern als zwei separate Gruppen behandelt.

Zur Durchführung dieser Querschnittsstudie wurden Plasmaproben aus der SEPTOMETER-Rekrutierung, der drei Gruppen verwendet. Für die Konzentrationsmessungen wurden die Plasmaproben, der jeweils ersten Blutentnahme ausgewählt und verwendet. Und deren Messergebnisse anschließend miteinander verglichen.

5.6 Plasmaproben

5.6.1 Probengewinnung

Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte zentralvenös, in Ausnahmen auch peripher venös, in 4,9 ml EDTA-Monovetten. Anschließend wurde die Probe auf 4°C abgekühlt und für 10 Minuten bei 1000 ×g zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde danach bei -80°C gelagert. Die Abnahmen erfolgten für fünf Tage im Acht-Stunden-Rhythmus, wobei die erste Abnahme am Einschlusstag um 15:00 h durchgeführt wurde.

5.6.2 Proben für die Messung von Plasmakonzentrationen löslicher Immuncheckpoint-Proteine im zeitlichen Verlauf

Für die Durchführung des ersten Teils dieser Studie wurden für jeden Patienten und jede Patientin Plasmaproben mehrerer Zeitpunkte untersucht. Ausgewählt wurden hierfür die Proben, die bei Studieneinschluss gewonnen wurden, sowie die darauffolgenden um jeweils 7:00 Uhr abgenommenen Blutproben bis hin zur Sepsis-Diagnose. Sobald eine Sepsis-Diagnose innerhalb eines Achtstunden-Intervalls erfolgte, wurden die Plasmaprobe unmittelbar 8 h vor und unmittelbar 8 h nach dem Übergang von SIRS zur Sepsis, sowie je nach Verfügbarkeit ein oder zwei weitere unmittelbar in Acht-Stundenabständen nachfolgende Proben mit in die Analyse eingeschlossen. Für die Kontrollgruppe der SIRS-Fälle wurden die Proben zu den analogen Zeitpunkten des jeweilig gematchten Sepsis-Falls ausgewählt.

5.6.3 Proben für ergänzende Konzentrationsmessungen von im Plasma gelösten Immuncheckpoint-Proteinen

Zur Durchführung dieses Studienabschnitts wurden Plasmaproben aus der Septometer-Rekrutierung, der drei Gruppen, welche in Kapitel 5.5 beschrieben wurden, verwendet. Für die Konzentrationsmessungen wurden die Plasmaproben, der jeweils ersten Blutentnahme ausgewählt und verwendet.

5.7 Klinische Daten

Die Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Universitätsmedizin Mannheim verfügt im Bereich der Intensivstationen über eine elektronische Patientenakte (ICCA der Firma Philips), in der zu jedem Patienten und jeder Patientin alle verfügbaren klinischen Daten hinterlegt sind. Zusätzlich zu den aus den Plasmaproben gewonnenen Messdaten, wurden zu allen Zeitpunkten aus dieser elektronischen Patientenakte bestimmte klinische Parameter zu den jeweiligen Patientinnen und Patienten abgefragt. Es wurden neben den Parametern, welche den SOFA-Score (siehe Tabelle 1) definieren (Vincent et al., 1996), auch die Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP), Procalcitonin und die Leukozytenzahl sowie Laktat ausgewertet. Außerdem wurden bestehende Vorerkrankungen abgefragt (siehe Tabelle 8).

5.8 Laboranalytische Methoden

5.8.1 *Magnetic Bead Array* (homogener Assay zur Multiplex-Bestimmung von Proteinen und cDNA)

Diese Methode basiert auf Farbstoff-dotierten magnetischen Beads, die für die Fluoreszenzmessung auf einer zweidimensionalen Fläche immobilisiert werden. Das Mischungsverhältnis zweier Farbstoffe definiert eine von bis zu 50 sogenannten *Bead-Areas*. Diese wiederum sind durch die Koppelung spezifischer Antikörper oder komplementärer Oligonukleotidsequenzen für je einen Protein- bzw. cDNA-Analyten spezifisch. Die Analytenquantifizierung erfolgt durch die spezifische Bindung eines sekundären Antikörpers bzw. einer komplementären Oligonukleotidsonde, die mit Phycoerythrin (PE) gekoppelt ist. Die PE-Fluoreszenz korreliert mit der Menge des gebundenen Analyten.

Bestimmung löslicher Immuncheckpoint-Proteine

Um die Plasmakonzentration der Immuncheckpoint-Proteine zu quantifizieren wurde hier ein Milliplex®-Assay (*Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein magnetic bead panel 96-Well Plate Assay*; Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Dieser Assay beruht auf der Luminex-xMAP®-Technologie, welche ein MAGPIX-Gerät der Firma Luminex als Plattform verwendet. Die Verwendung dieses Assays ermöglicht die gleichzeitige Konzentrationsmessung von bis zu 50 verschiedenen Analyten. Dies wird durch spezielle Antikörper ermöglicht, welche an magnetische *Beads* gekoppelt sind. Diese *Beads* mit gekoppeltem, Analyt-spezifischen Antikörper werden als *capture-Beads* bezeichnet. Jeder dieser *Beads* ist mit einem Farbstoff versehen, welchen die MAGPIX-Software im Nachgang an die Messung eindeutig einem Analyten zuordnen kann. Das Fluoreszenzsignal kommt dadurch zustande, dass an die *Capture Beads* neben den zu untersuchenden Analyten auch biotinylierte Detektionsantikörper sowie daran Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin gebunden werden. Die Fluoreszenzintensität, welche durch das MAGPIX-Gerät bestimmt wird, kann dann durch die Analysesoftware in eine Konzentration des jeweiligen Analyten umgerechnet werden.

Zur Qualitätssicherung der Messungen wurde in diesem Assay die Konzentration der Immun-Checkpoint-Proteine jeder Plasmaprobe in zwei verschiedenen Wells auf der 96-Well-Platte gemessen. Es handelt sich hierbei also um technische

Doppelbestimmungen. Messergebnisse bei denen in der späteren Analyse auffiel, dass der Variationskoeffizient (CV) der beiden Messungen $\geq 10\%$ betrug, wurden von der weiteren Analyse ausgenommen und als fehlerhaft verworfen. Die bei jeder Messung zusätzlich zu den Proben gemessenen Qualitätskontrollen des Herstellers ermöglichen eine spätere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Messungen.

5.8.2 Genexpressionsanalyse (*QuantiGene™ Plex Assay*)

branched DNA signal amplification assay

Die Expressionsanalyse der Gene, die für die verschiedenen Immuncheckpoint-Proteine kodieren wurde mittels eines *QuantiGene™ Plex Assays* durchgeführt. Im Gegensatz zu einer PCR beruht dieses Verfahren nicht auf der Amplifikation der zu untersuchenden Nukleinsäure, sondern auf der Amplifikation eines durch *capture Beads* erzeugten Fluoreszenzsignals (ThermoFisherScientificInc., 2020).

Zur Durchführung des *QuantiGene™ Plex Assays* mussten zunächst die isolierten Granulozyten lysiert werden. Hierfür wurde das *QuantiGene™ Sample Processing Kit* (Affymetrix) verwendet. Zunächst wurden die Zellen in den Eppendorf-Gefäßen bei 1000xg bei 4°C für zehn Minuten pelletiert. Anschließend wurde pro 1000 Zellen 1µl Lysis-Puffer hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren das Pellet resuspendiert. Hiernach wurde die Probe bei 53°C für 30 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Probe für eine Minute gevortext und konnte anschließend für den *QuantiGene™ Plex* verwendet werden.

Nach der Lyse der entsprechenden Patientenproben wurden diese im zweiten Schritt nach Vorgabe durch das Herstellerprotokoll zusammen mit den sogenannten *Capture Beads*, den *Capture Extenders*, den *Label-Extenders* und den *Blocking Probes* zur Hybrisierung über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag der Messung erfolgte die eigentliche Signalamplifikation. Hierfür werden die Proben zusammen mit dem *Pre-Amplifier*, dem *Amplifier* und den *Label Probes* in mehreren Wasch- und Inkubationsschritten hybridisiert.

Durch die Bindung des Zweitantikörpers an den Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (markierte Sonde) entsteht durch Beleuchten ein Signal, welches von einem Luminex-Gerät detektiert werden kann. Das Signal wird als

mediane Fluoreszenz-Intensität (MFI) angegeben. Der MFI-Wert ist proportional zu der Menge an vorhandener RNA in der Probe.

In der Auswertung wurden die medianen Fluoreszenzintensitäten auf ein Referenzgen normiert. Als Referenzgen wurde für diese Messung in Anlehnung an die Ergebnisse aus Kapitel 6.7 und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Coulibaly et al., 2019) *AKIRIN1* ausgewählt. Die Normierung erfolgte durch Division der MFI-Werte der jeweiligen Gene durch den MFI-Wert von *AKIRIN1* in der jeweiligen Probe.

5.8.3 Isolierung von CD15+ Granulozyten

Aus den zusätzlichen Blutproben, die den Patientinnen und Patienten während der Blutabnahmen um sieben Uhr morgens entnommen wurden, wurden anschließend auf Basis der magnetisch aktivierten Zellsortierung-Technologie (MACS®) Granulozyten isoliert. Diese Technologie fußt auf der Bindung von magnetischen *Beads* an Oberflächenantigene auf der gewünschten Zellpopulation. Diese Bindung erfolgt durch einen, an den magnetischen *Bead* gekoppelten, spezifischen Antikörper. Zur Trennung der markierten Zellpopulation von der nicht markierten Fraktion wird eine MACS®-Säule mit dem Zellgemisch in einen magnetischen MACS®-Separator gegeben. Eine positive Selektion der gewünschten Zellen erfolgt, indem die nicht markierten Zellen der Schwerkraft folgend nach unten durch die Säule wandern, während die markierten Zellen im magnetischen Feld in der Säule gehalten werden. Anschließend kann die gewünschte Zellpopulation nach Entfernung aus dem Separator aus der Säule gewaschen werden.

Zur Isolierung von CD15+ Granulozyten aus der Blutprobe wurden die Whole Blood CD15 MicroBeads human (Miltenyi Biotec), sowie das Whole blood column Kit (Miltenyi Biotec) verwendet. Gemäß dem verwendeten Protokoll wurde das EDTA-antikoagulierte Blut zunächst mit den magnetischen Beads für 15 min bei 4°C inkubiert. Das Verhältnis der Beads zu Blut betrug hier 100 µl Whole Blood CD15 MicroBeads pro 2 ml Vollblut. Anschließend wurde die Probe in eine Vollblutsäule im MACS®-Separator gegeben und zweimal mit je 2 ml PBS++-Puffer gewaschen. Hiernach konnte die Säule aus dem Separator entnommen werden und auf ein 15 ml Falcon Röhrchen gegeben werden. Zur Elution der verbliebenen Zellen wurden nun 4 ml *Whole Blood Column Elution Buffer* in die Säule gegeben und anschließend zügig

durch Herunterdrücken des Kolbens in der Säule in das Auffangröhrchen überführt. Zur Erhöhung der Reinheit der markierten Zellfraktion kann die Probe mittels einer neuen Säule erneut angereichert werden. Die Auswahl der Säule erfolgt hier nach der Anzahl der Zellen zwischen der LS- (maximale Anzahl der markierten Zellen = 10^8) und der MS-Säule (maximale Anzahl der markierten Zellen = 10^7). Abschließend wurde die Probe in RNAlater (Ambion) bei -20°C zur späteren Verwendung gelagert.

5.8.4 Quantitative real-time PCR

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den in RNAlater gelagerten Granulozyten-Proben, wurden diese aufgetaut, gevortext und anschließend abzentrifugiert ($7000\times g$ für 7 Minuten). Der Überstand aus RNAlater wurde abpipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Lysis-Binding-Puffers und nach kurzem Vortexen die Zugabe von Additive-miRNA-Homogenat. Es folgte eine zehnminütige Inkubation. Nach Abzentrifugieren und Überführen der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß wurde das 1,25-fache der wässrigen Phase an 96% EtOH hinzugegeben und das Gemisch auf die mirVana-Säule pipettiert. Es folgten drei Waschschriffe mit dem entsprechenden Waschpuffer. Die abschließende Elution erfolgte abhängig von der eingesetzten Zellzahl mit 70-100 μl Nuklease-freiem Wasser, welches zuvor auf 95°C erhitzt wurde. Nach Abschluss der Isolierung wurden die Proben noch einer Behandlung mit DNase (Applied Biosystems) unterzogen und für die weitere Verwendung quantifiziert. Diese Quantifizierung erfolgte mittels eines spektrometrischen Verfahrens in einem 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent).

Für die reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) mit RNase-I-Inhibitor verwendet. Dies diente zur Unterdrückung einer möglichen RNase-Aktivität. In die Röhrchen wurden zunächst je 10 μl des 2x Reverse Transkriptase Master Mix pipettiert und mit der zuvor in 10 μl Nuklease freiem Wasser aufgenommenen RNA, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren, vermischt. Die eigentliche reverse Transkription wurde im Thermocycler (Peqlab Biotechnologie) durchgeführt. Hierfür wurden die Zyklen gemäß dem Herstellerprotokoll programmiert. Im ersten Schritt wurden die Proben für zehn Minuten auf 25°C , anschließend für 120 Minuten auf 37°C und im

dritten Schritt für fünf Minuten auf 85°C erwärmt. Nach Ablauf dieser Zyklen wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Für die abschließende quantitative Real Time-PCR zur Bestimmung möglicher Houskeeping-Gene für spätere Genexpressionsanalysen, wurden cDNA-Proben von vier Patienten ausgewählt, von denen jeweils Proben von fünf verschiedenen Blutabnahmen zur Verfügung standen. Die potentiell als Houskeeping-Gene geeigneten Gene (siehe Tabelle 6) wurden aufgrund von Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe ausgewählt (Coulibaly et al., 2019). Durchgeführt wurde die Amplifizierung der Zielgene auf 96-Well Platten mittels des TaqMan®-Gene-Expression-Assay in einem 7900HT Real-Time PCR System. Pro Well wurden 25 ng cDNA verwendet. Die vom Gerät ausgegebenen Ct-Werte beschreiben die Anzahl der Amplifikationszyklen, die durchgeführt wurden bis die Amplifikationskurve einen vorher festgelegten Schwellenwert überschritten hat. An diesem Punkt beginnt in der PCR die Phase der exponentiellen Amplifikation der cDNA. Die Betrachtung der Ct-Werte ermöglicht Rückschlüsse auf die zu Beginn der PCR vorhandene Menge an cDNA und somit an ursprünglicher RNA, da sich 2^{Ct} umgekehrt proportional zur Konzentration der cDNA verhält.

Relative Konzentrationsunterschiede wurden mittels der Delta-Delta Ct Methode berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

Vollständiger Name	Gen-Symbol	TaqMan-ID
akirin1	<i>AKIRIN1</i>	Hs01047800_g
glucuronidase beta	<i>GUSB</i>	Hs00939627_m1
RNA polymerase II subunit A	<i>POLR2A</i>	Hs00172187_m
tumor necrosis factor	<i>TNF</i>	Hs00174128_m
Beta-2-Microglobulin	<i>B2M</i>	Hs00187842_m1

Tabelle 6: Name, Symbol und Katalognummern, der in der quantitativen RT-PCR verwendeten Gene

5.9 Software

5.9.1 GraphPad Prism

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Konzentrationsmessungen von löslichen Checkpoints im Plasma sowie der quantitativen RT-PCR und des QuantiGene™Plex-Assays erfolgte mittels der Software Prism 8 (Graphpad Software).

5.9.2 SAS

Für die statistische Analyse der Trends in den longitudinalen Daten beider Gruppen aus Polytrauma-Fällen (siehe Kapitel 5.4) und deren Vergleich wurde die Software SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, N.C.) verwendet.

5.10 Statistische Analyse

In allen statistischen Tests dieser Dissertation wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Eine Ausnahme bilden hier die Analysen, in denen die Ergebnisse aufgrund multiplen Testens mittels des Benjamini-Hochberg-Verfahrens angepasst wurden (siehe Kap. 5.10.4)

5.10.1 Mittelwerte

Um einen Vergleich der Zeitpunkte, zu denen die Patientinnen und Patienten sich klinisch im Stadium eines SIRS präsentierten, und der Zeitpunkte, zu denen die Patientinnen und Patienten eine retrospektiv bestehende Sepsis hatten, zu ziehen, mussten die Daten zunächst statistisch vergleichbar gemacht werden. Dies war nötig, da der Zeitpunkt des Übergangs von SIRS zur Sepsis für die Betroffenen individuell verschieden war, sodass ohne eine Zusammenfassung der individuellen Messwerte eine Übergewichtung einiger Individuen in der statistischen Analyse zustande gekommen wäre. Hierfür wurden zunächst die Plasmakonzentrationen der löslichen Immuncheckpoint-Proteine für alle Zeitpunkte vor dem Übergang zur Sepsis individuell für alle Erkrankten zusammengefasst und daraus das arithmetische Mittel gebildet. Analog wurde für die Zeitpunkte nach der Sepsisdiagnose verfahren. Nach diesem Vorgehen stand für jeden Betroffenen und jedes lösliche Immuncheckpoint-Protein ein Wert vor und ein Wert nach Diagnose der Sepsis für einen Vorher-Nachher-Vergleich zur Verfügung.

Um eine Vergleichbarkeit der Sepsisgruppe mit der Kontrollgruppe zu ermöglichen, wurden in dieser Gruppe ebenfalls Mittelwerte von Plasmakonzentrationen gebildet. Die Kontrollmesswerte, welche zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden, wurden analog zu denen der entsprechend gematchten Sepsis-Patientinnen und Patienten gewählt, also zeitlich gematcht.

5.10.2 Mittelwertvergleich der Plasmakonzentrationen von Immuncheckpoint-Proteinen vor und nach Sepsisdiagnose innerhalb der Fallgruppe

Die in 5.10.1 generierten Mittelwerte von Plasmakonzentrationen der Gruppe von Sepsis-Fällen wurden gegenübergestellt, sodass für jeden Patienten und jede Patientin der Mittelwert vor der Sepsis mit dem nach der Diagnosestellung verglichen werden konnten. Die beiden Werte wurden nun mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Dieser non-parametrische Test wurde ausgewählt, da hiermit auch in kleinen Stichproben, für die die Annahme von Normalverteilung nur bedingt möglich ist, statistisch fundierte Ergebnisse generiert werden können (Weiß, 2013). Der hier beschriebene Vorgang wurde für jedes der 16 Immuncheckpoint-Proteine durchgeführt.

5.10.3 Vergleich der Mittelwerte von Sepsis-Fällen und Erkrankten mit persistierendem SIRS

Um einen Vergleich der beiden Gruppen von Sepsis-Fällen und der von Patientinnen und Patienten mit einem persistierenden SIRS im Beobachtungszeitraum zu erreichen, wurden die jeweils analogen Mittelwerte der beiden Gruppen gegenübergestellt und mittels des Wilcoxon-Rangsummentests auf signifikante Unterschiede hin untersucht. So wurden die Mittelwerte der Sepsis-Fälle vor dem Übergang mit den entsprechenden Zeiträumen der gematchten Kontrollen verglichen. Anschließend wurden im gleichen Verfahren die Zeitpunkte nach dem Übergang zur Sepsis miteinander verglichen. Der Wilcoxon-Rangsummentests ist ein nicht-parametrischer Test, welcher zum Vergleich nicht gepaarter Stichproben verwendet werden kann, für die eine Normalverteilung nicht sicher angenommen werden kann (Weiß, 2013).

5.10.4 Benjamini-Hochberg-Verfahren

Das Benjamini-Hochberg-Verfahren beschreibt eine Möglichkeit, eine erhöhte Falscherkennungsrate, die in einer statistischen Analyse durch multiples Testen entsteht, effizient zu senken. Grundlage des von Benjamini und Hochberg 1995 erstmals beschriebenen Verfahrens (Benjamini and Hochberg, 1995) ist es, das

Signifikanzniveau so zu wählen, dass auf der einen Seite die Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*) möglichst niedrig ist, auf der anderen Seite jedoch möglichst wenig richtige positive Ergebnisse aussortiert werden. Hierfür werden zunächst alle p-Werte in aufsteigender Reihenfolge sortiert und anschließend mit einem Rang versehen. Diese Ränge werden ebenfalls in aufsteigender Reihenfolge vergeben, sodass der geringste p-Wert den Rang 1 erhält der nächst größere p-Wert den Rang 2 und so weiter. Daraufhin wird für jeden der einzelnen p-Werte ein individueller *critical value* berechnet. Dieser wird gebildet, indem man den individuellen Rang durch die Gesamtanzahl der Tests teilt und mit einer als realistisch anzusehenden Falscherkennungsrate multipliziert. Diese Falscherkennungsrate wurde in dieser Studie auf 0,3 gesetzt. Der *critical value* stellt eine neue Signifikanzschwelle dar, die nun statt des sonst üblicherweise durchweg verwendeten Wertes von 0,05 auf den jeweiligen Datenwert angewendet wird.

5.10.5 Hierarchische Modellierung der Plasmakonzentration löslicher Immuncheckpoint-Proteine über die Zeit

Ein besonderer Fokus in der Auswertung der gemessenen Plasmakonzentrationen lag darin, deren Änderungen über den Zeitraum der Untersuchung zu erfassen und darüber auf mögliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Sepsis- und Kontrollgruppe) zu schließen. Hierfür wurde eine lineare hierarchische Modellierung angewendet, da die anzunehmende größere Ähnlichkeit der Messwerte desselben Patienten im Vergleich zu denen anderer Patienten berücksichtigt werden sollte. Darüber hinaus sollte, wo möglich, ein individueller Zeittrend sowie die potenziell stärkere Abhängigkeit zeitlich enger beieinanderliegender Messwerte voneinander in das Modell mit aufgenommen werden. Hierfür wurde die Operation *mixed* der Statistiksoftware SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, N.C.) verwendet. Die Modellierung wurde sowohl über den gesamten Beobachtungszeitraum, als auch für den Zeitraum bis zur Statusänderung (Outcome) individuell für jedes Protein durchgeführt. Wegen der niedrigen Zahl an Messwerten und unterschiedlich häufig fehlender Messwerte konnte nicht für jedes Protein eine vergleichbar komplexe Modellierung erfolgen. Neben einem Patientenindikator als Clustervariablen wurden in alle Modelle als Determinanten der jeweiligen

Proteinkonzentration die folgenden Parameter aufgenommen: die Messzeitpunkte in Stunden nach der ersten Messung, die Gruppenzugehörigkeit (Sepsis oder Kontrolle) und die Interaktion von Messzeitpunkt und Gruppe (Interaktionsterm?). Die Annahme individuell unterschiedlicher Achsenabschnitte (*random intercept*), also eines individuellen Baselinewertes für jeden Patienten, konnte bei allen Modellen umgesetzt werden. In der Regel war auch die Annahme einer individuellen Steigung für jeden Patienten möglich (*random slope*).

Für die Abhängigkeit der Messwerte von denen aus vorangehenden Messzeitpunkten wurde eine räumliche Kovarianzstruktur angenommen, um die durch fehlende Messwerte teilweise ungleichen Zeitabstände der Einzelmesspunkte adäquat zu berücksichtigen. Die jeweils maximal mögliche Komplexität der Modellierung für jedes Checkpoint-Protein ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Checkpoint-Protein	Modell vor der Sepsis	Modell alle Zeitpunkte
BTLA	random slope	zeitliche Kovarianzstruktur
CD27	zeitliche Kovarianzstruktur	zeitliche Kovarianzstruktur
CD28	random slope	zeitliche Kovarianzstruktur
CD40	zeitliche Kovarianzstruktur	zeitliche Kovarianzstruktur
CD80	zeitliche Kovarianzstruktur	zeitliche Kovarianzstruktur
CD86	random intercept	random intercept
CTLA-4	random intercept	zeitliche Kovarianzstruktur
GITR	random slope	zeitliche Kovarianzstruktur
GITRL	random intercept	zeitliche Kovarianzstruktur
HVEM	random slope	zeitliche Kovarianzstruktur
ICOS	random intercept	zeitliche Kovarianzstruktur
LAG-3	random intercept	random intercept
PD-1	random intercept	zeitliche Kovarianzstruktur
PD-L1	random intercept	random intercept
TIM-3	zeitliche Kovarianzstruktur	random slope
TLR-2	random intercept	random intercept

Tabelle 7: Modellierungsstrategie der Immuncheckpoint-Proteine

Die genannten Modelle zeigen die jeweils komplexeste Modellierung, welche für die einzelnen Immuncheckpoint-Proteine sowohl für die Zeitpunkte vor der Sepsis als auch für alle Zeitpunkte anwendbar war.

5.10.6 Interpretation der bei der Zeittrendanalyse geschätzten Parameter

Mittels des hierarchischen Modells konnte für jedes Checkpoint-Protein ausgehend von der mittleren Ausgangskonzentration sowohl für die Gruppe der Sepsis-Patienten als auch für die Gruppe der Kontrollpatienten je eine Regressionsgerade erstellt werden. Deren Steigung ist äquivalent zu der mittleren Änderung der Plasmakonzentration des entsprechenden Proteins über den Zeitraum einer Stunde in der jeweiligen Gruppe. Der zur Steigung gehörige p-Wert erlaubt die Evaluation der Hypothese einer nicht von 0 pg/ml/h unterschiedlichen Steigung, also keiner Änderung der Plasmakonzentration. Im Falle einer statistischen Signifikanz kann je nach Vorzeichen der geschätzten Steigung die Annahme einer im Mittel zu- oder abnehmenden Plasmakonzentration gemacht werden. Das 95% Konfidenzintervall gibt darüber hinaus Aufschluss über die Präzision, mit der die Veränderung geschätzt werden konnte und erlaubt eine Einschätzung des tatsächlichen Ausmaßes der Veränderung, die der hier beobachteten zugrunde liegt.

Durch den im Modell enthaltenen Interaktionsterm konnten die Steigungen der Regressionsgeraden der beiden Gruppen auch untereinander verglichen werden. Hierfür wurde die Hypothese, dass der Unterschied zwischen beiden Steigungen 0 pg/ml beträgt, geprüft. Für Checkpointproteine, bei denen diese Hypothese durch einen statistisch signifikanten p-Wert verworfen werden konnte, konnte von einem Unterschied in der Änderung über die Zeit und damit unterschiedlichen Zeitverläufen in beiden Gruppen ausgegangen werden. Der Schätzer für die Interaktion bildet die Differenz der gruppenspezifischen Steigungen der Regressionsgeraden ab. Das 95% Konfidenzintervall informiert hierbei über die tatsächlich zu erwartende Veränderung des Gruppenunterschieds in der Steigung.

Außerdem erlaubt der Schätzer des Parameters, der im Modell die Gruppenzugehörigkeit abbildet, die Quantifizierung des Gruppenunterschiedes zum Einschlusszeitpunkt und die Bewertung seiner statistischen Signifikanz.

Der Achsenabschnitt (*Intercept*) erlaubte einen Vergleich der Ergebnisse für die einzelnen Checkpointproteine aus der hierarchischen Modellierung untereinander.

Hierfür wurden der Gruppenunterschied und der geschätzte Zeittrend jeweils in das Verhältnis zum geschätzten Achsenabschnitt der jeweiligen Gruppe gesetzt.

Somit wurden insgesamt für jedes Checkpoint-Protein in beiden Patientengruppen relative Gruppenunterschiede und relative Trends errechnet.

5.10.7 Vergleich der Plasmakonzentrationen von löslichen Immuncheckpoint-Proteinen zwischen Patienten mit persistierendem SIRS, einem Übergang von SIRS zur Sepsis und bereits bestehender Sepsis

Die statistische Auswertung, der mittels Magpix-Assays ermittelten Plasmakonzentrationen der löslichen Immuncheckpoint-Proteine und dem damit verbundenen Vergleich der Konzentrationen in den verschiedenen Gruppen erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Dieser Rangsummentest ermöglicht den Vergleich der Varianzen in Messwerten von mehr als zwei nicht miteinander verbundenen Stichproben (Weiß, 2013). Schlussendlich wurden sechs verschiedene Gruppen aus dem Kollektiv der Septometer-Rekrutierung hinsichtlich ihrer Plasmakonzentration von verschiedenen Immuncheckpoint-Proteinen miteinander verglichen. Diese waren:

- persistierendes SIRS im Beobachtungszeitraum
- Übergang von SIRS zur Sepsis im Beobachtungszeitraum
- bestehende Sepsis zu Beginn des Beobachtungszeitraumes
- sieben gesunde Probanden
- Sepsis- und Kontrollgruppe aus dem Kollektiv der Polytrauma-Fälle

Zur Korrektur der potentiell durch multiples Testen verzerrt dargestellten Unterschiede in der Plasmakonzentration, wurden die p-Werte anschließend mittels des Benjamini-Hochberg-Verfahrens angeglichen.

5.11 Ethikvotum

Diese Arbeit ist Teil einer Studie, die von der Ethikkommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim begutachtet und für die ein positives Votum erteilt wurde (Ethikvotum 2016-643N-MA und 2016-840R-MA). Dieses Votum erstreckt sich sowohl

auf die Patientenrekrutierung, die Blutabnahmen, die Laboranalysen als auch auf die Nutzung der elektronischen Patientenakte zur Beschreibung der klinischen Merkmale der betrachteten Patientengruppen.

6 ERGEBNISSE

6.1 Demographische und klinische Charakteristika des Studienkollektives

Insgesamt wurden im ersten Teil dieser Studie Plasmaproben von vierzehn Patientinnen und Patienten untersucht, die allesamt aufgrund eines Polytraumas auf der anästhesiologisch geführten, operativen Intensivstation der Universitätsmedizin Mannheim behandelt wurden. Die Sepsis-Gruppe setzte sich aus sechs Männern und einer Frau zusammen, die Kontrollgruppe aus 7 Männern. Im Beobachtungszeitraum entwickelten alle Fälle eine einfache Sepsis aus dem vorbestehenden SIRS, die Kontrollen blieben Sepsis frei. Für die Diagnose der Sepsis wurde zunächst die Definition nach Sepsis-1/2 (Levy et al., 2003) verwendet. In der Retrospektive erfüllten alle Betroffenen auch die Sepsis-Kriterien nach Sepsis-3 (Singer et al., 2016). Das mediane Alter betrug hier 53 Jahre (Maximum: 67 Jahre, Minimum: 26 Jahre). Der anhand von klinischen Parametern erhobene SOFA-Score betrug in der Sepsis-Gruppe im Median 10. Das mediane Alter betrug hier 49 Jahre (Maximum: 78 Jahre; Minimum: 19 Jahre) und der ebenfalls erhobene SOFA-Score lag im Median ebenfalls bei 10 (siehe Tabelle 8). Im Wesentlichen lässt sich sagen, dass sich die beiden Gruppen in keinem, der in Tabelle 7 erfassten Charakteristika signifikant voneinander unterscheiden. Somit ist es gelungen, zwei bezüglich ihrer klinischen Merkmale sehr ähnliche Vergleichsgruppen durch das Matching zu erzeugen.

		Kontrollgruppe	Sepsis-Gruppe	
		Median (IQR)	Median (IQR)	p-Wert
		N (%)	N (%)	
Allgemein				
	Gruppe	7 (50,0%)	7 (50,0%)	
	Alter [Jahre]	49 (33-55)	53 (26-56)	0,927
	Männer	7 (100%)	6 (85,7%)	1,0~
	Hospitalisierungsdauer [Tage]	29,2 (22,8-86,8)	47,2 (20,9-65,7)	0,616
	Krankenhausmortalität	0 (0%)	0 (0%)	
Fachabteilung				
	Neurochirurgie	1 (14,3%)	1 (14,3%)	1,0~
	Unfallchirurgie	3 (42,9%)	4 (57,1%)	1,0~
	HNO	1 (14,3%)		
	Allgemeinchirurgie	4 (57,1%)	2 (28,6%)	0,592~
Vorerkrankungen				
	Diabetes	0 (0%)	0 (0%)	
	Herz-, Kreislauferkrankungen	2 (28,6%)	1 (14,3%)	1,0~
	Lungenerkrankungen	0 (0%)	0 (0%)	
	Alkoholabusus	2 (28,6%)	1 (14,3%)	1,0~
Laborparameter				
	Hb [g/dL]	9 (8,4-10,2)	8,7 (7,6-10,8)	0,673
	WBC [10E9/L]	9,03 (5,59-12,45)	12,14 (10,72-13,95)	0,151
	Thrombozyten [10E9/L]	156 (90-213)	157 (106-213)	0,782
	Creatinin [mg/dL]	1,09 (0,79-1,71)	0,88 (0,58-2,58)	0,753
	Bilirubin [mg/dL]	0,79 (0,66-1,95)	0,97 (0,46-1,24)	0,897
	Glucose [mg/dL]	124 (110-139)	111 (107-129)	0,445
	CRP [mg/L]	164 (102-223)	189 (130-253)	0,411
	PCT* [µg/L]	11,77 (0,79-41,625)	0,27 (0,26-0,98)	0,25
	Laktat [mmol/l]	0,8 (0,8-2,7)	0,7 (0,5-1,5)	0,293
Vitalparameter				
	Temperatur [°C]	37,3 (37-37,7)	37,7 (37,1-37,8)	0,253
	Atemfrequenz [1/min]	20 (17-22)	22 (20-24)	0,137
	Herzfrequenz [1/min]	92 (84-94)	99 (77-111)	0,382
	MAP [mmHg]	77 (70-90)	84 (78-90)	0,372
	Horovitz Index [mmHg]	291,7 (275,0-343,3)	226,9 (177,3-366,7)	0,281
Interventionen				
	Beatmung	7 (100%)	7 (100%)	
	Katecholamine	5 (71,4%)	5 (71,4%)	1,0~
Scores				
	SOFA	10 (9-13)	10 (7-13)	1
	ISS	34 (18-57)	34 (22-41)	0,942

pvalue: t-test (method Satterthwaite) for continuous parameters

#: Mann-Whitney-Wilcoxon test (U test)

Chi² test for categorical parameters

~: Fisher's exact test

* in der Kontrollgruppe nur bei 4 und in der Sepsis-Gruppe bei 5 Patienten bestimmt

Tabelle 8: Charakteristika der Sepsis- und Kontrollgruppe bei Einschluss

6.2 Konzentrationen von Immuncheckpoint Proteinen im Blutplasma von Polytrauma-Fällen

Die im ersten Schritt dieser Studie durchgeführte Messung von Konzentrationen gelöster Immuncheckpoint Proteine im Plasma von Sepsis-Erkrankten zeigte, dass alle gewählten Proteine mittels des verwendeten Magpix-Assays in messbaren Konzentrationen im Plasma der Patientin und der Patienten nachweisbar waren. Die Konzentrationsbereiche der verschiedenen Immuncheckpoint Proteine lagen mitunter mehrere Größenordnungen auseinander.

So betrug die mediane Konzentration von PD-L1 vor der Sepsis-Diagnose 115,1 pg/ml, beziehungsweise 115,5 pg/ml nach der Sepsis-Diagnose, während die Konzentrationen von LAG-3 vor und nach der Diagnosestellung im Median bei 25256 pg/ml, beziehungsweise bei 21853 pg/ml lagen. Auch die Bereiche, über die die intraindividuellen Mittelwerte für die einzelnen Analyten streuten, waren unterschiedlich breit. So befanden sich die Messwerte von TLR-2 vor dem Übergang hin zur Sepsis im Bereich von [1826 - 2831 pg/ml] mit einem Variationskoeffizienten von 15,6 % (siehe Tabelle 9), während der entsprechende Wertebereich für CTLA-4 nach Beginn der Sepsis im Bereich von [30,4 - 359,1 pg/ml] mit einem Variationskoeffizienten von 59,7% um eine Größenordnung niedriger waren.

6.2.1 Vorher-Nachher-Vergleich von Immuncheckpoint Proteinen in der Sepsis-Gruppe

Der statistische Vergleich der Konzentrationen von Immuncheckpoint-Proteinen im Plasma vor und nach dem Übergang zur Sepsis zeigte für einen der 16 löslichen Immuncheckpoint-Protein-Analyten einen signifikanten Unterschied (Tabelle 11). Die Konzentration von sTIM-3 lag in den Zeitpunkten nach dem Übergang von SIRS hin zur Sepsis im Median bei 7168 pg/ml, während der Median vor der Sepsis bei 4638 pg/ml lag. Die Mittelwerte lagen für den Zeitraum vor der Sepsis im Bereich von [2482 - 8549 pg/ml] (Variationskoeffizient: 40,0%) und für den Zeitraum nach dem Übergang hin zur Sepsis im Bereich von [2769 - 9397 pg/ml]. Der p-Wert lag in diesem Vergleich bei 0,0313. Für die restlichen Analyten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zeiträumen festgestellt werden (siehe Tab. 11, Abbildung 2).

Nach Korrektur für multiples Testen mittels des Benjamini-Hochberg-Verfahrens kann eine Signifikanz bei einem critical value von 0,0188 für sTIM-3 nicht sicher angenommen werden.

Immuncheckpoint	Median vor Sepsis [pg/ml]	Minimum vor Sepsis [pg/ml]	Maximum vor Sepsis [pg/ml]	Variationskoeffizient [%]
TIM-3	4638	2482	8549	40,0
CD28	5837	2651	12955	47,0
TLR-2	2070	1826	2831	15,6
GITR	156	66	305	45,6
LAG-3	25256	12479	31735	29,4
BTLA	745	519	1419	35,6
CD27	2487	1944	3215	16,4
CD40	579	413	1151	37,7
CTLA-4	158	31	291	51,6
PD-1	1025	312	1689	41,8
GITRL	628	205	893	35,8
PD-L1	115	23	158	44,0
ICOS	883	143	1149	45,4
HVEM	2441	1827	3232	20,9
CD80	180	69	228	29,8
CD86	1311	303	1398	37,0

Tabelle 9: Median und Spannweite der Mittelwerte in der Sepsis-Gruppe vor der Sepsis-Diagnose

Die in dieser Tabelle dargestellten Werte entstammen den in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerten der entsprechenden Plasmakonzentrationen der einzelnen Immuncheckpoint-Proteine. Der Variationskoeffizient berechnet sich wie folgt: $\frac{\text{Standardabweichung} \times 100}{\text{Mittelwert}}$ [%]. n=7

Immuncheckpoint	Median nach Sepsis [pg/ml]	Minimum nach Sepsis [pg/ml]	Maximum nach Sepsis [pg/ml]	Variationskoeffizient [%]
TIM-3	7168	2769	9397	39,3
CD28	6538	3273	12348	41,3
TLR-2	2190	1676	3587	26,9
GITR	184	100	398	49,8
LAG-3	21853	7780	34130	42,4
BTLA	800	521	1737	44,7
CD27	2704	1778	3600	22,0
CD40	713	421	1259	37,2
CTLA-4	166	30	359	59,7
PD-1	1056	267	2050	50,3
GITRL	638	186	1036	39,8
PD-L1	116	18	221	49,7
ICOS	798	112	1405	48,1
HVEM	1614	1614	3650	32,7
CD80	190	50	282	39,1
CD86	1153	173	1644	44,3

Tabelle 10: Median und Spannweite der Mittelwerte in der Sepsis-Gruppe nach der Sepsis-Diagnose

Die in dieser Tabelle dargestellten Werte entstammen den in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerten der entsprechenden Plasmakonzentrationen der einzelnen Immuncheckpoint-Proteine. Der Variationskoeffizient berechnet sich wie folgt: $\frac{\text{Standardabweichung} \times 100}{\text{Mittelwert}}$ [%]. n=7

Immunchekpoint	p-Wert	critical value nach Benjamini-Hochberg
TIM-3	0,031	0,019
CD28	0,219	0,038
TLR-2	0,219	0,056
GITR	0,219	0,075
LAG-3	0,297	0,094
BTLA	0,375	0,113
CD27	0,375	0,131
CD40	0,375	0,150
CTLA-4	0,375	0,169
PD-1	0,469	0,188
GITRL	0,578	0,206
PD-L1	0,578	0,225
ICOS	0,578	0,244
HVEM	0,813	0,263
CD80	0,813	0,281
CD86	1,000	0,300

Tabelle 11: Vergleich der Mittelwerte von Konzentrationen im Plasma gelöster Immunchekpoint-Proteine vor Beginn der Sepsis und nach Diagnosestellung in einer Gruppe von Sepsis-Fällen nach Trauma. Die Grundlage für die Berechnung der p-Werte mittels des Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Tests bilden die in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerte der jeweiligen Plasmakonzentration im Zeitraum vor der Sepsis-Diagnose und nach der Diagnosestellung. Die critical values wurden nach Benjamini and Hochberg (1995) berechnet, wobei die Falscherkennungsrate auf 0,3 gesetzt wurde. n=7

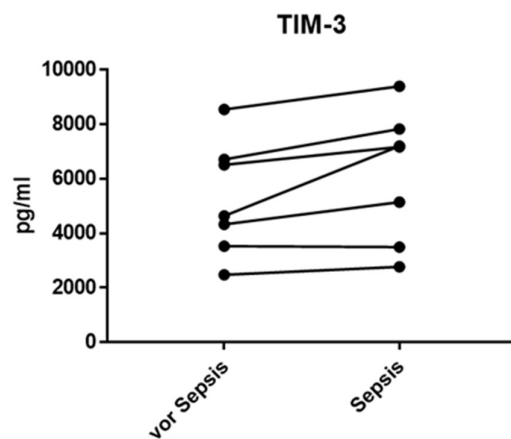


Abbildung 2: Vergleich der Mittelwerte von Konzentrationen des im Plasma gelösten TIM-3 vor Beginn der Sepsis und nach Diagnosestellung in einer Gruppe von Sepsis-Fällen nach Trauma.

Die hier dargestellten Plasmakonzentrationen von sTIM-3 zeigen die in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerte. Die jeweiligen Werte für den gleichen Fall sind in dieser Grafik durch eine Linie verbunden. Zur statistischen Analyse wurde hier der Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test verwendet. Dieser ergab für sTIM-3 einen p-Wert von 0,0313, was unter dem gewählten Signifikanzniveau lag, jedoch nach Korrektur nach Benjamini und Hochberg nicht mehr als signifikant unterschiedlich zu werten war. n=7

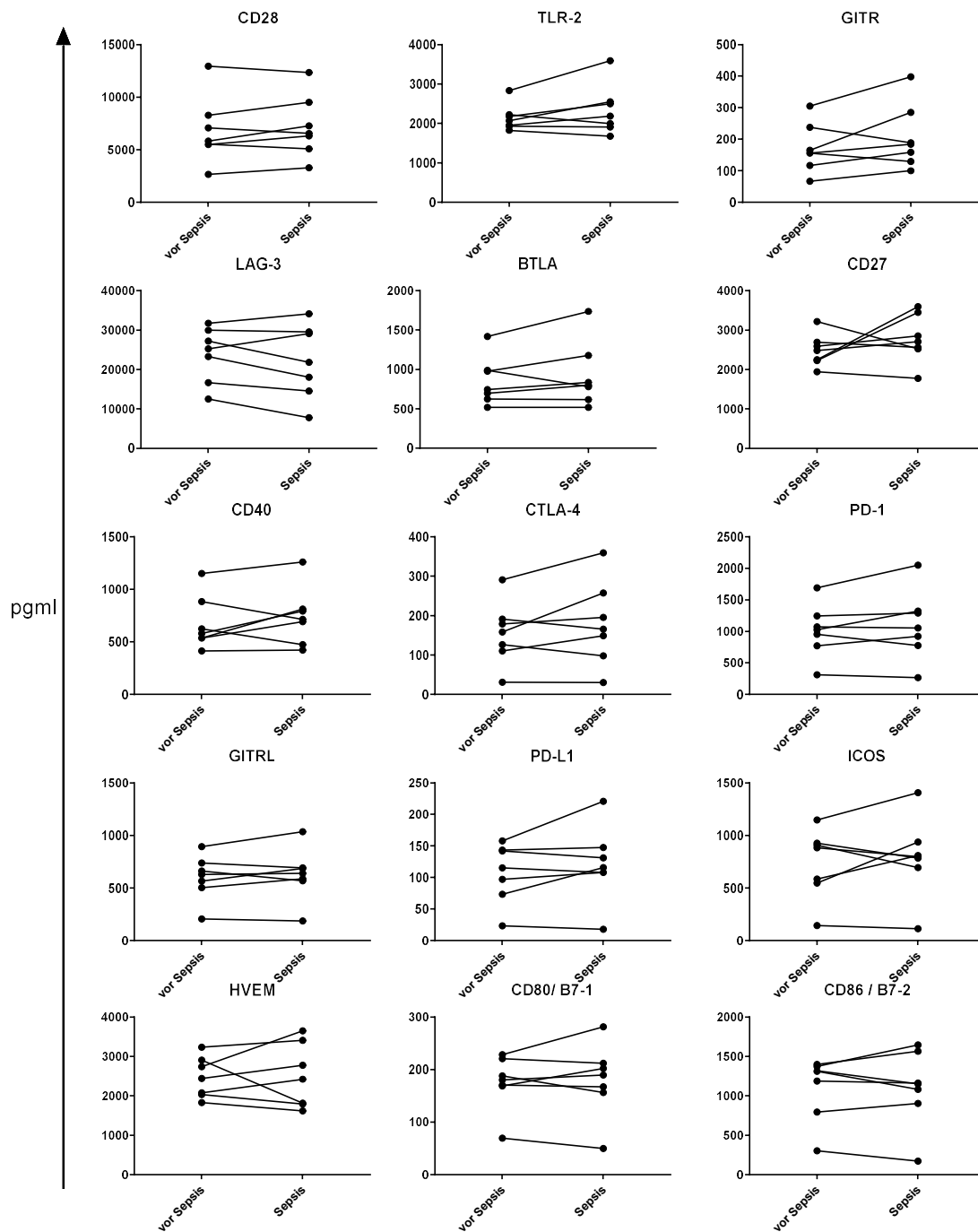


Abbildung 3: Vergleich der Mittelwerte von Konzentrationen im Plasma gelöster Immuncheckpoint-Proteine vor Beginn der Sepsis und nach Diagnosestellung in einer Gruppe von Sepsis-Fällen nach Trauma.

Die hier dargestellten Plasmakonzentrationen der verschiedenen Immuncheckpoint-Proteine zeigen die in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerte. Die jeweiligen Werte für den gleichen Patienten sind in dieser Grafik durch eine Linie verbunden. Zur statistischen Analyse wurde hier der Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test verwendet. Die p-Werte der hier gezeigten Vergleiche lagen allesamt über dem gewählten Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ und waren somit nicht als signifikant verschieden anzusehen. $n=7$

6.2.2 Immuncheckpoint-Proteine in der Sepsis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

Der Vergleich zwischen der Sepsis-Gruppe und der Kontrollgruppe wurde wie in Kapitel 5.10.3 beschrieben durchgeführt. Für die Zeiträume in denen die Patientinnen und Patienten der Sepsis-Gruppe ein SIRS präsentierten, konnten für folgende Immuncheckpoint-Proteine signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden.

So war die Plasmakonzentration in der Sepsis-Gruppe von löslichem HVEM mit im Median 2441 pg/ml deutlich niedriger als die entsprechende Konzentration der Gruppen von Patienten mit persistierendem SIRS (Median 4090 pg/ml; $p = 0,0041$ Siehe Tabelle 13). Die Spanne der Mittelwerte in der Kontrollgruppe lag hier zwischen 2618 und 4295 pg/ml mit einem Variationskoeffizienten von 15% (siehe Tabelle 13). In der Sepsis-Gruppe lag die Spanne im Bereich von 1827 bis 3232 pg/ml mit einem Variationskoeffizienten von 20,9% (siehe Tabelle 12).

Für sICOS konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen gezeigt werden. Mit im Median 883,3 pg/ml war die Plasmakonzentration von sICOS in der Gruppe der Sepsis-Patientinnen und -Patienten deutlich niedriger (Spanne: [143,4 – 1149 pg/ml], Variationskoeffizient: 45,4%, siehe Tabelle 12) als in der Kontrollgruppe, mit im Median 1408 pg/ml (Spanne: [859,1 – 2407 pg/ml], Variationskoeffizient: 44,9%, siehe Tabelle 13). Der p-Wert lag in diesem Vergleich bei $p = 0,0175$ (siehe Tabelle 14).

Ebenfalls unterschiedliche Plasmakonzentrationen konnten für sGITRL festgestellt werden. Hier war die Plasmakonzentration in der Gruppe der Sepsis-Patientinnen und -Patienten mit im Median 628,2 pg/ml (siehe Tabelle 12) deutlich erhöht gegenüber der Kontrollgruppe mit im Median 367,5 pg/ml (siehe Tabelle 13). Der p-Wert lag hier bei 0,0262 (siehe Tabelle 14). Auch nach der Korrektur der p-Werte mittels des Verfahrens nach Benjamini-Hochberg sind die Unterschiede der drei genannten Immuncheckpoint-Proteine als signifikant anzusehen.

Ein weiterer Analyt, welcher eine deutliche Tendenz hin zu einem Unterschied der beiden Gruppen zeigte, war in diesem Vergleich der Zeitpunkte vor Beginn der Sepsis sGITR. Für dieses Immuncheckpoint-Protein lag die Plasmakonzentration für die

Patienten aus der Sepsis-Gruppe bei im Median 156,1 pg/ml (Spanne: [66,45 - 305,3 pg/ml], Variationskoeffizient: 45,6%, siehe Tabelle 12) und in der Kontrollgruppe bei 82,73 pg/ml (Spanne: [8,283 - 206,2 pg/ml], Variationskoeffizient: 91,3%, siehe Tabelle 13). Der mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test generierte p-Wert lag mit 0,053 (siehe Tabelle 14) über dem gewählten Signifikanzniveau von 0,05. Alle anderen untersuchten Analyten wiesen in dieser Untersuchung deutlich höhere p-Werte auf.

Immuneckpoint	Median Sepsis-Gruppe [pg/ml]	Minimum Sepsis-Gruppe [pg/ml]	Maximum Sepsis-Gruppe [pg/ml]	Variationskoeffizient [%]
HVEM	2441	1827	3232	20,9
ICOS	883	143	1149	45,4
GITRL	628	205	893	35,8
GITR	156	66	305	45,6
CD27	2487	1944	3215	16,4
CD40	579	413	1151	37,7
CTLA-4	158	31	291	51,6
CD28	5837	2651	12955	47,0
PD-1	1025	312	1689	41,8
CD80	180	69	228	29,8
PD-L1	115	23	158	44,0
LAG-3	25256	12479	31735	29,4
TIM-3	4638	2482	8549	40,0
BTLA	745	519	1419	35,6
TLR-2	2070	1826	2831	15,6
CD86	1311	303	1398	37,0

Tabelle 12: Median und Spannweite der Mittelwerte in der Sepsis-Gruppe vor der Sepsis-Diagnose. Die in dieser Tabelle dargestellten Werte entstammen den in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerte der entsprechenden Plasmakonzentrationen der einzelnen Immuneckpoint-Proteine. Der Variationskoeffizient berechnet sich wie folgt: $\frac{\text{Standardabweichung} \times 100}{\text{Mittelwert}}$ [%]. Sepsis-Gruppe: n=7.

Immuneckpoint	Median SIRS-Gruppe [pg/ml]	Minimum SIRS-Gruppe [pg/ml]	Maximum SIRS-Gruppe [pg/ml]	Variationskoeffizient [%]
HVEM	4090	2618	4295	15,0
ICOS	1408	859	2407	44,9
GITRL	368	161	538	35,4
GITR	83	8	206	91,3
CD27	3797	2157	6801	42,3
CD40	855	474	1177	26,0
CTLA-4	117	54	169	40,2
CD28	4624	2941	6906	30,1
PD-1	742	470	1163	34,9
CD80	149	61	199	38,6
PD-L1	129	44	201	41,0
LAG-3	34161	16284	49742	47,5
TIM-3	5923	3710	7889	24,9
BTLA	495	280	1875	77,7
TLR-2	2032	1569	2750	23,6
CD86	859	215	1718	55,8

Tabelle 13: Median und Spannweite der Mittelwerte in der Kontrollgruppe der korrespondierenden Zeitpunkte vor der Sepsis-Diagnose.

Die in dieser Tabelle dargestellten Werte entstammen den in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerte der entsprechenden Plasmakonzentrationen der einzelnen Immuneckpoint-Proteine. Der Variationskoeffizient berechnet sich wie folgt: $\frac{\text{Standardabweichung} \times 100}{\text{Mittelwert}}$ [%]. SIRS-Gruppe: n=7.

Immunchekpoint	p-Wert	critical value nach Benjamini-Hochberg
HVEM	0,004	0,019
ICOS	0,018	0,038
GITRL	0,026	0,056
GITR	0,053	0,075
CD27	0,128	0,094
CD40	0,259	0,113
CTLA-4	0,259	0,131
CD28	0,318	0,150
PD-1	0,318	0,169
CD80	0,318	0,188
PD-L1	0,456	0,206
LAG-3	0,534	0,225
TIM-3	0,620	0,244
BTLA	0,708	0,263
TLR-2	0,710	0,281
CD86	>0,999	0,3

Tabelle 14: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Immunchekpoint-Proteinen zwischen der Sepsis- und der Kontrollgruppe für den Zeitraum vor Beginn der Sepsis.

Die Grundlage für die Berechnung der p-Werte mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests bilden die in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerte der jeweiligen Plasmakonzentration im Zeitraum vor der Sepsis-Diagnose in der Sepsis-Gruppe und den korrespondierenden Zeitpunkten der Kontrollgruppe. Die critical values wurden nach Benjamini and Hochberg (1995) berechnet, wobei die Falscherkennungsrate auf 0,3 gesetzt wurde.

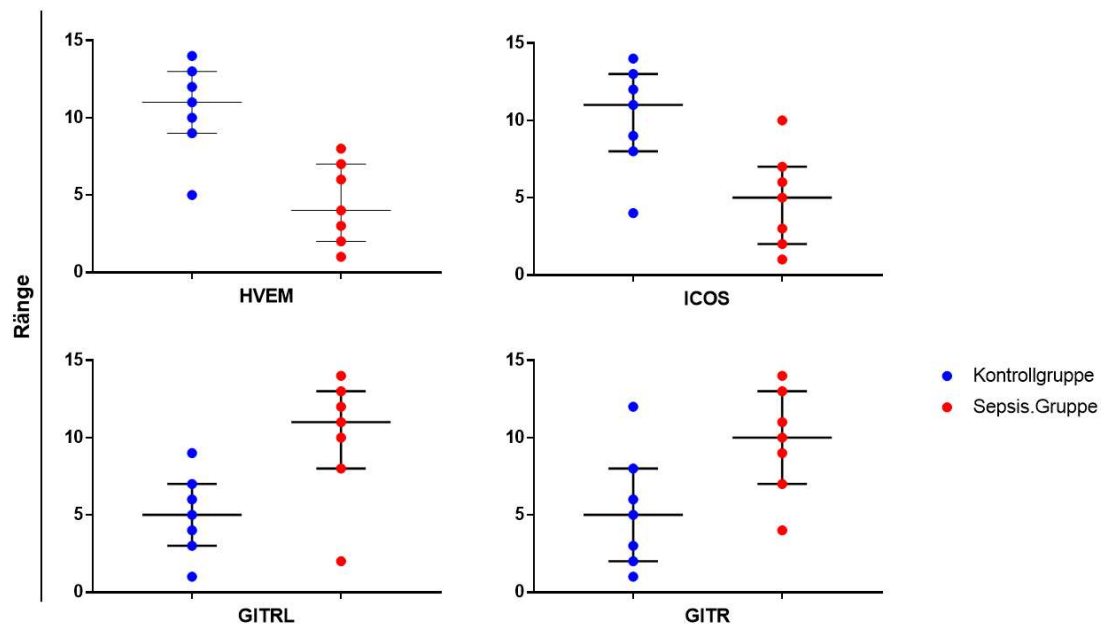


Abbildung 4: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Immunchekpoint-Proteinen zwischen der Sepsis- und der Kontrollgruppe für den Zeitraum vor Beginn der Sepsis.

Hier dargestellt sind die mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test generierten Ränge der einzelnen Immunchekpoint-Proteine, welche auch nach der Korrektur für multiples Testen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden Gruppen zeigten. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen dem jeweiligen Rang und die horizontalen Markierungen entsprechen dem jeweiligen Median sowie der 25. und 75. Perzentile. SIRS-Gruppe: $n=7$, Sepsis-Gruppe $n=7$.

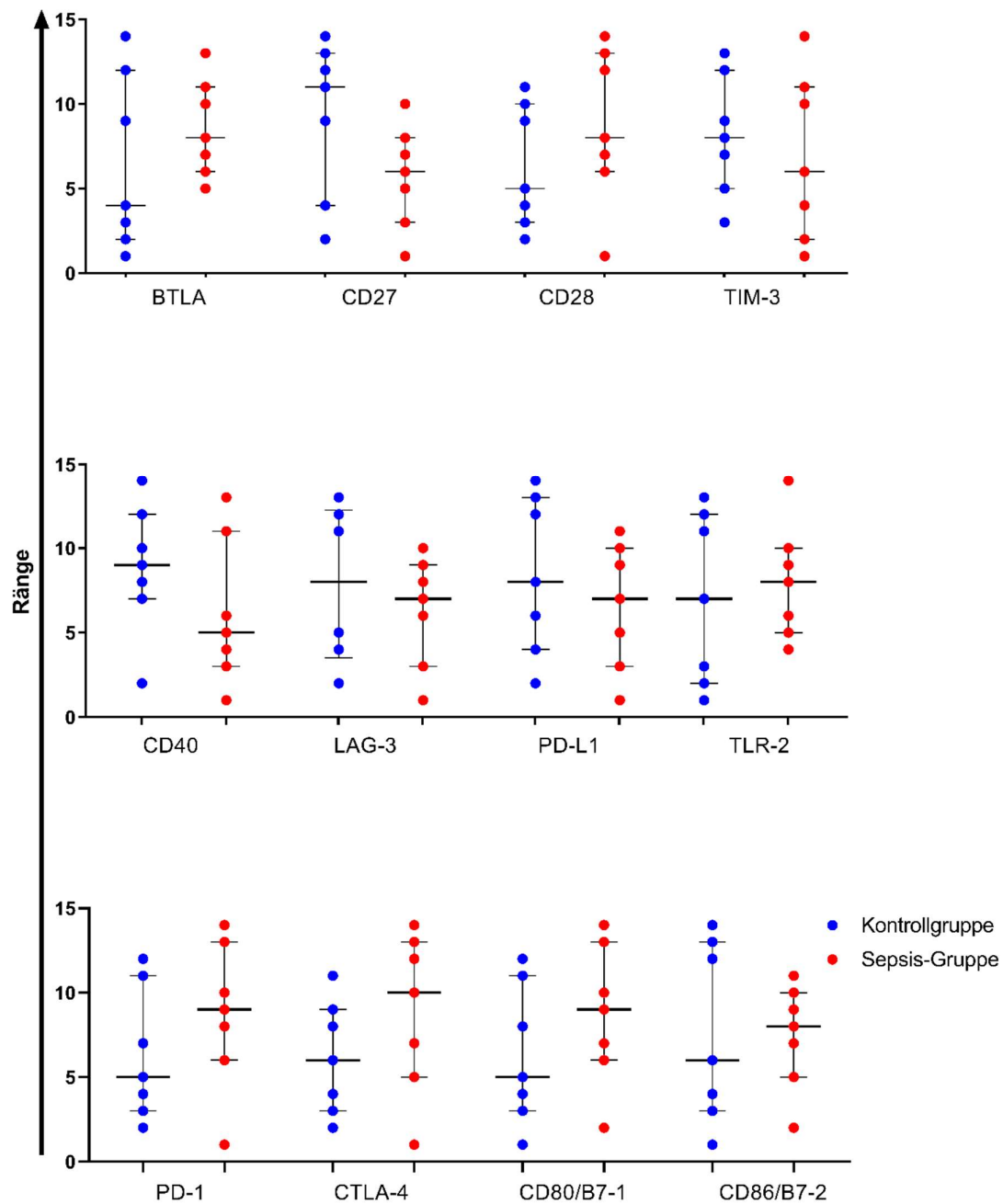


Abbildung 5: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Immuncheckpoint-Proteinen zwischen der Sepsis- und der Kontrollgruppe für den Zeitraum vor Beginn der Sepsis.

Hier dargestellt sind die mittels Wilcoxon-Mann-Whitney generierten Ränge der einzelnen Immuncheckpoint-Proteine, welche auch nach der Korrektur für multiples Testen keinen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden Gruppen zeigten. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen dem jeweiligen Rang und die horizontalen Markierungen entsprechen dem jeweiligen Median sowie der 25. und 75. Perzentile. Die blauen Datenpunkte entsprechen der Kontrollgruppe, die roten Punkte der Sepsis-Gruppe. SIRS-Gruppe: $n=7$, Sepsis-Gruppe $n=7$.

Im zweiten Schritt wurden die Zeiträume analysiert, in denen in der Sepsis-Gruppe eine Sepsis bestand.

Mit 184,4 pg/ml lag der Median von sGfTR in der Sepsis-Gruppe mehr als viermal höher als der entsprechende Median der Kontrollgruppe (Median: 43,92; $p = 0,0012$, siehe Tabelle 15). Auch die Spannweite der Mittelwerte unterschied sich hier deutlich, so lag diese in der Sepsis-Gruppe zwischen 99,87 und 398 pg/ml, während die Werte in der SIRS-Kontrollgruppe im Bereich zwischen 6,62 und 120,5 pg/ml lagen (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16).

Für sCD27 konnte ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. In der Sepsis-Gruppe lag die Konzentration von sCD27 mit im Median 2704 pg/ml (Spanne: [1778 - 3600 pg/ml], Variationskoeffizient: 22%, siehe Tabelle 15) deutlich unter der Konzentration in der Kontrollgruppe. Hier lag die mediane Konzentration bei 4392 pg/ml (Spanne: [2949 – 7648 pg/ml], Variationskoeffizient: 35,4%, siehe Tabelle 16). Mit einem p-Wert von $p = 0,0023$ ist dieser Konzentrationsunterschied auch nach Korrektur nach Benjamini Hochberg als signifikant anzusehen.

Analog zu den Zeitpunkten vor dem Beginn der Sepsis konnte auch während der Sepsis ein signifikanter Unterschied in den Plasmakonzentrationen von sHVEM in den beiden Gruppen festgestellt werden. In der Gruppe der Sepsis-Patienten lag der Median der Plasmakonzentration bei 2421 pg/ml (Spanne: [1641 - 3650 pg/ml], Variationskoeffizient: 32,7%, siehe Tabelle 15), wohingegen sich in der Kontrollgruppe eine mediane Plasmakonzentration von 4167 pg/ml (Spanne: [2987 - 5170 pg/ml], Variationskoeffizient: 21,4%, siehe Tabelle 16) ergab. Der p-Wert lag hier bei $p = 0,0175$ (siehe Tabelle 17). Alle der hier genannten signifikanten Unterschiede sind auch nach der Korrektur nach Benjamini-Hochberg noch als signifikant zu betrachten.

Lösliches BTLA zeigte, wie auch sCD28, eine Tendenz hin zu einem Unterschied der beiden Gruppen. Für sBTLA lagen die Plasmakonzentrationen für die Gruppe der Sepsis-Patienten im Median bei 799,7 pg/ml und für die Kontrollgruppe bei 433,4 pg/ml. Für sCD28 lagen die entsprechenden medianen Konzentrationen bei 6538 pg/ml für die Sepsis-Patienten und bei 4325 pg/ml für die Kontrollgruppe. Sowohl für sBTLA und sCD28 lag der p-Wert bei 0,053 und somit knapp über dem gewählten Signifikanzniveau von 0,05.

Immunchekpoint	Median Sepsis-Gruppe [pg/ml]	Minimum Sepsis-Gruppe [pg/ml]	Maximum Sepsis-Gruppe [pg/ml]	Variationskoeffizient [%]
GITR	184	100	398	49,8
CD27	2704	1778	3600	22,0
HVEM	2421	1614	3650	32,7
BTLA	800	521	1737	44,7
CD28	6538	3273	12348	41,3
ICOS	797	112	1405	48,1
LAG-3	21853	7780	34130	42,4
GITRL	638	186	1036	39,8
CTLA-4	166	30	359	59,7
CD80	190	50	282	39,1
CD86	1153	173	1644	44,3
PD-1	1056	267	2050	50,3
CD40	713	421	1259	37,2
PD-L1	116	18	221	49,7
TIM-3	7168	2769	9397	39,3
TLR-2	2190	1676	3587	26,9

Tabelle 15 Median und Spannweite der Mittelwerte in der Sepsis-Gruppe nach der Sepsis-Diagnose.
 Die in dieser Tabelle dargestellten Werte entstammen den in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerten der entsprechenden Plasmakonzentrationen der einzelnen Immunchekpoint-Proteine. Der Variationskoeffizient berechnet sich wie folgt: $\frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100$ [%]. Sepsis-Gruppe n=7.

Immunchekpoint	Median SIRS-Gruppe [pg/ml]	Minimum SIRS-Gruppe [pg/ml]	Maximum SIRS-Gruppe [pg/ml]	Variationskoeffizient [%]
GITR	44	7	121	84,5
CD27	4392	2949	7648	35,4
HVEM	4167	2987	5170	21,4
BTLA	433	261	875	51,5
CD28	4325	3094	8886	41,9
ICOS	1276	732	3048	56,6
LAG-3	34600	17035	55499	38,3
GITRL	291	155	743	57,4
CTLA-4	73	41	202	63,2
CD80	85	55	287	67,7
CD86	723	279	2641	82,7
PD-1	605	378	1663	61,9
CD40	886	513	1422	34,7
PD-L1	84	44	316	78,2
TIM-3	7398	4637	9192	24,1
TLR-2	1612	1311	2926	45,5

Tabelle 16: Median und Spannweite der Mittelwerte in der Kontrollgruppe der korrespondierenden Zeitpunkte nach der Sepsis-Diagnose.
 Die in dieser Tabelle dargestellten Werte entstammen den in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerten der entsprechenden Plasmakonzentrationen der einzelnen Immunchekpoint-Proteine. Der Variationskoeffizient berechnet sich wie folgt: $\frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100$ [%]. SIRS-Gruppe: n=7.

Immunecheckpoint	p-Wert	critical value nach Benjamini-Hochberg
GITR	0,001	0,019
CD27	0,002	0,038
HVEM	0,018	0,056
BTLA	0,053	0,075
CD28	0,053	0,094
ICOS	0,073	0,113
LAG-3	0,097	0,131
GITRL	0,097	0,150
CTLA-4	0,128	0,169
CD80	0,165	0,188
CD86	0,209	0,206
PD-1	0,234	0,225
CD40	0,318	0,244
PD-L1	0,318	0,263
TIM-3	0,456	0,281
TLR-2	0,456	0,3

Tabelle 17: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Immunecheckpoint-Proteinen zwischen der Sepsis- und der Kontrollgruppe für den Zeitraum nach Diagnose der Sepsis.

Die Grundlage für die Berechnung der p-Werte mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests bilden die in Kapitel 5.10.1 beschriebenen Mittelwerte der jeweiligen Plasmakonzentration im Zeitraum nach der Sepsis-Diagnose in der Sepsis-Gruppe und den korrespondierenden Zeitpunkten der Kontrollgruppe. Die critical values wurden nach (Benjamini and Hochberg, 1995) berechnet, wobei die Falscherkennungsrate auf 0,3 gesetzt wurde.

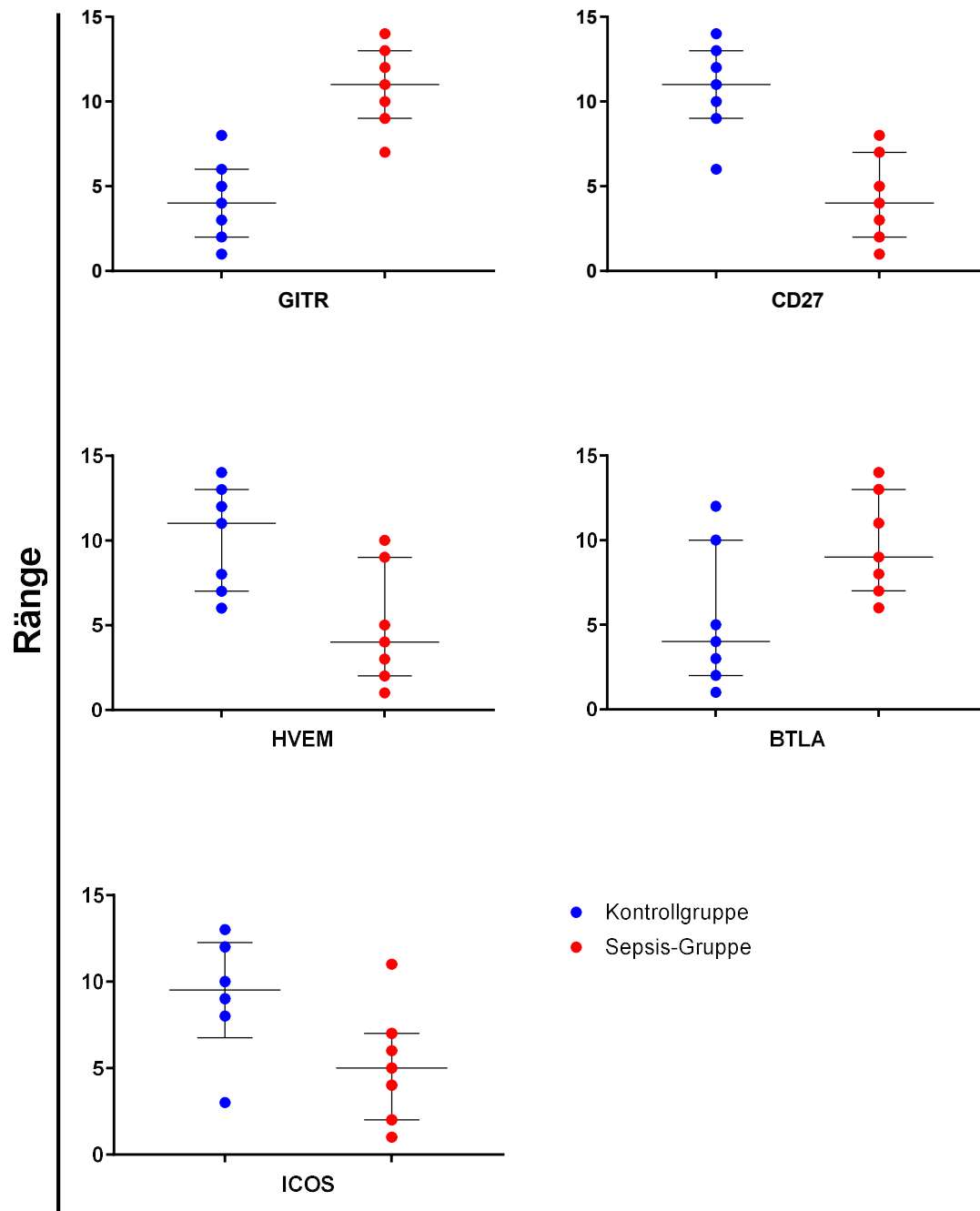


Abbildung 6: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Immuneckpoint-Proteinen zwischen der Sepsis- und der Kontrollgruppe für den Zeitraum nach Diagnose der Sepsis.

Hier dargestellt sind die mittels Wilcoxon-Mann-Whitney generierten Ränge aller gemessenen Konzentrationen in den beiden Gruppen, beginnend mit dem niedrigsten Messwert bei 1 und dem höchsten Messwert bei 14. Für die hier aufgeführten Immuneckpoint-Proteine konnte auch nach der Korrektur für multiples Testen ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen dem jeweiligen Rang und die horizontalen Markierungen entsprechen dem jeweiligen Median sowie der 25. und 75. Perzentile. SIRS-Gruppe: $n=7$, Sepsis-Gruppe $n=7$.

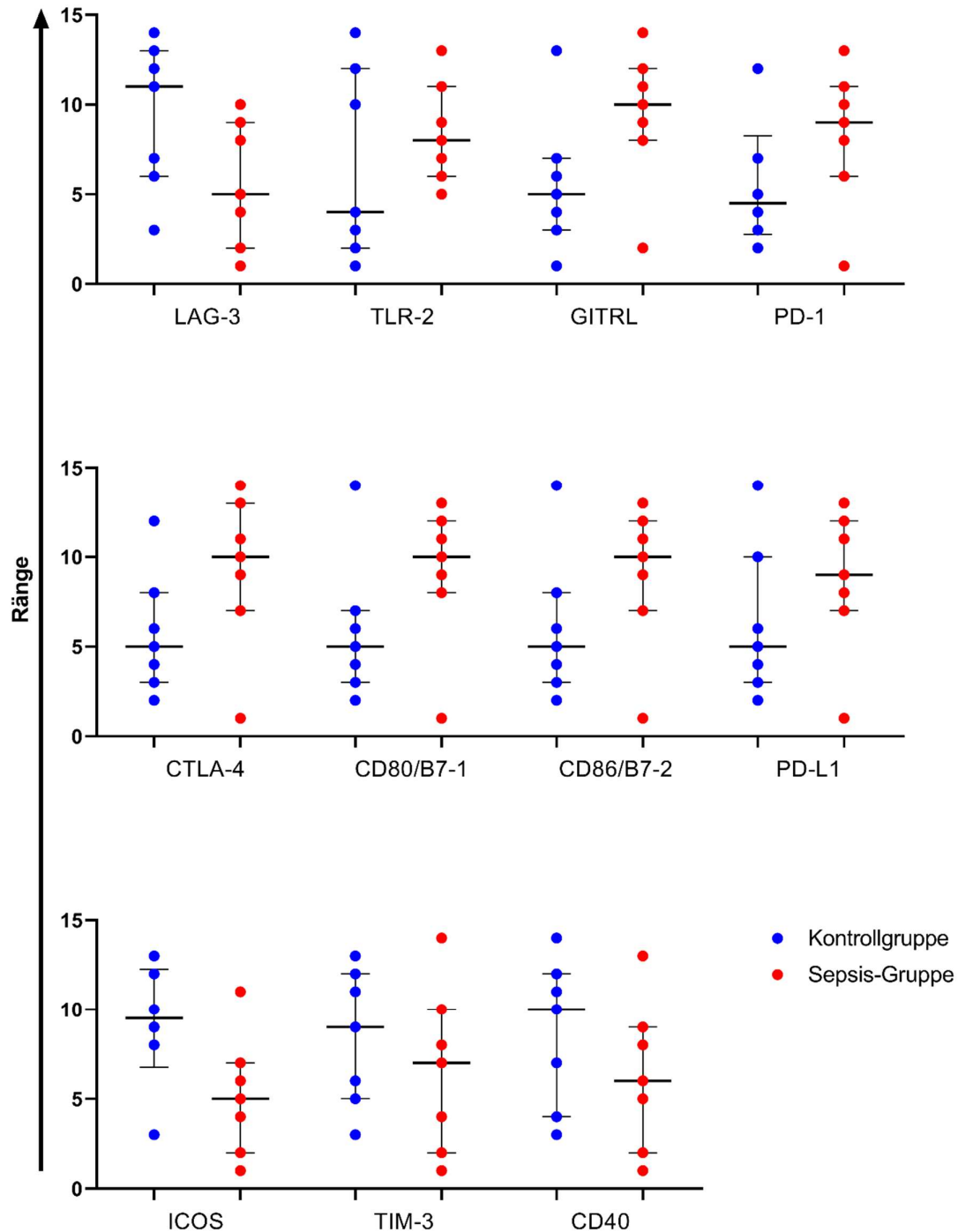


Abbildung 7: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Immuncheckpoint-Proteinen zwischen der Sepsis- und der Kontrollgruppe für den Zeitraum nach Diagnose der Sepsis.

Hier dargestellt sind die mittels Wilcoxon-Mann-Whitney generierten Ränge der einzelnen Immuncheckpoint-Proteine, welche auch nach der Korrektur für multiples Testen keinen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden Gruppen zeigten. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen dem jeweiligen Rang und die Balken entsprechen dem jeweiligen Median sowie der 25. und 75. Perzentile. Die blauen Datenpunkte repräsentieren die Kontrollgruppe aus Patientinnen und Patienten mit persistierendem SIRS, die roten Datenpunkte die Sepsis-Gruppe. SIRS-Gruppe: $n=7$, Sepsis-Gruppe $n=7$.

6.3 Hierarchisches Modell der Plasmakonzentrationen gelöster Immuncheckpoint-Proteine im Vergleich von Sepsis-Fällen und einer Kontrollgruppe mit persistierendem SIRS

Die Analyse aller Messwerte von sBTLA mit einem hierarchischen Modell (siehe Kapitel 5.10.6 und 5.10.7) ergab für die Kontrollgruppe eine über die Beobachtungszeit um 6,51 pg/ml pro Stunde abnehmende Plasmakonzentration (95% Konfidenzintervall: [-12,4 – (-0,62)]; $p = 0,003$), während für die Änderung in der Sepsis-Gruppe eine Zunahme um 1,21 pg/ml geschätzt wurde (siehe Tabelle 18). Diese kann jedoch aufgrund des 95% Konfidenzintervalls von -4,58 bis 7,00 nicht eindeutig als steigend oder fallend bezeichnet werden ($p = 0,658$). Der Vergleich der Zeitverläufe beider Gruppen ergab einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,048$), damit konnte gezeigt werden, dass sich die Zeitverläufe von sBTLA in beiden Gruppen unterscheiden. In Übereinstimmung mit den Zeitverläufen in beiden Gruppen lag die geschätzte stündliche Änderung in der Sepsis-Gruppe um 7,72 pg/ml (95% KI) höher als die in der Kontrollgruppe. Bei Betrachtung der Messzeitpunkte vor Diagnosestellung konnte ebenfalls keine Änderung der Plasmakonzentration über die Zeit in der Gruppe der Sepsis-Fälle festgestellt werden, wohingegen die Plasmakonzentration in der Gruppe der Kontrollen um 5,69 pg/ml pro Stunde abnahm (95% KI: [-10,83 – (-0,55)]; $p = 0,033$). Im Vergleich der beiden Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in den zeitlichen Verläufen gefunden werden ($p = 0,074$). Betrachtet man die Ergebnisse der Modellierung für sPD-1 und sPD-L1, so fällt auf, dass auch bei diesen beiden Proteinen die Plasmakonzentration in der Kontrollgruppe über die Zeit abnahm und ein signifikanter Unterschied in den Verläufen der Sepsis- und der Kontrollgruppe bestand. Auch in der Betrachtung der Zeitpunkte vor der Diagnosestellung zeigte die Modellierung eine abnehmende Plasmakonzentration in der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen bestand zwischen den beiden Gruppen für den Zeitraum vor der Diagnosestellung nicht (siehe Tabelle 19).

Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Analyse von sCD28, für welches in der Gruppe der Sepsis-Fälle eine mittlere stündlichen Zunahme um 7,68 pg/ml, aber ebenfalls aufgrund des 95% Konfidenzintervalls keine eindeutige Tendenz hin zur Zu- oder Abnahme ermittelt werden konnte (95% KI: [-8,49 - 23,85]; $p = 0,321$). Für die Kontrollgruppe hingegen ergab die Analyse eine Änderung um -19,55 pg/ml (95% KI:

[-35,99 - -3,10]; $p = 0,024$) und somit eine über die Zeit fallende Konzentration von sCD28. Auch hier war der Vergleich der Zeittrends in beiden Gruppen als signifikant unterschiedlich anzusehen ($p = 0,013$) mit einem Gruppenunterschied von 27,23 pg/ml (95% KI) pro Stunde (siehe Tabelle 19, Abbildung 8). Betrachtet man in der Sepsis-Gruppe lediglich die Messzeitpunkte vor der Diagnosestellung der Sepsis, so kann man für sCD28 auch hier keine Konzentrationsänderung im Zeitverlauf nachweisen (9,39 Einheit/Stunde KI: [-14,78 - 33,57]; $p = 0,41$), während dies in der Kontrollgruppe möglich war und die Änderung weitestgehend mit der aus der Analyse aller Messzeitpunkte resultierenden übereinstimmt (-19,97 (KI: [-38,51 - (-1,43)]; $p = 0,037$). Folglich konnte auch erneut ein signifikanter Unterschied in den Konzentrationsänderungen zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ($p = 0,044$) (siehe Tabellen 20, 21 sowie Abbildung 9).

Ein analoges Muster der Ergebnisse in der Modellierung zeigte die Analyse der zeitlichen Verläufe von sCTLA-4 (siehe Tabellen 18, 19, 20, 21).

Ein weiteres Immuncheckpoint-Protein, für welches mit einem hierarchischen Modell ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden konnte, ist sCD27. In der Betrachtung aller Messzeitpunkte konnte für die Gruppe der Sepsis-Fälle, aufgrund des 95% Konfidenzintervalls, kein Trend hin zu einer Zu- oder Abnahme der Plasmakonzentration gezeigt werden (95% KI: [-13,70 – 21,11]; $p = 0,651$). Die Kontrollgruppe hingegen zeigte im Beobachtungszeitraum einen geschätzten Anstieg der Plasmakonzentration von sCD27 von 27,49 pg/ml pro Stunde (95% KI: [10,09 – 44,89]; $p = 0,005$). Der Vergleich der beiden ermittelten zeitlichen Verläufe deutete auf einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen hin ($p = 0,04$). In der Betrachtung der Messwerte im Zeitraum vor der Diagnosestellung zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Für die Sepsis-Gruppe konnte kein eindeutiger Trend für den zeitlichen Verlauf der Plasmakonzentration festgestellt werden (95% KI: [-24,24 – 10,32]; $p = 0,397$). Für die Kontrollgruppe hingegen zeigte die Modellierung einen Anstieg der Plasmakonzentration von sCD27 von 26,76 pg/ml pro Stunde (95% KI: [12,85 - 40,66]; $p = 0,001$). Ein signifikanter Unterschied im Konzentrationsverlauf der beiden Gruppen bestand bei einem p-Wert von 0,002 auch hier.

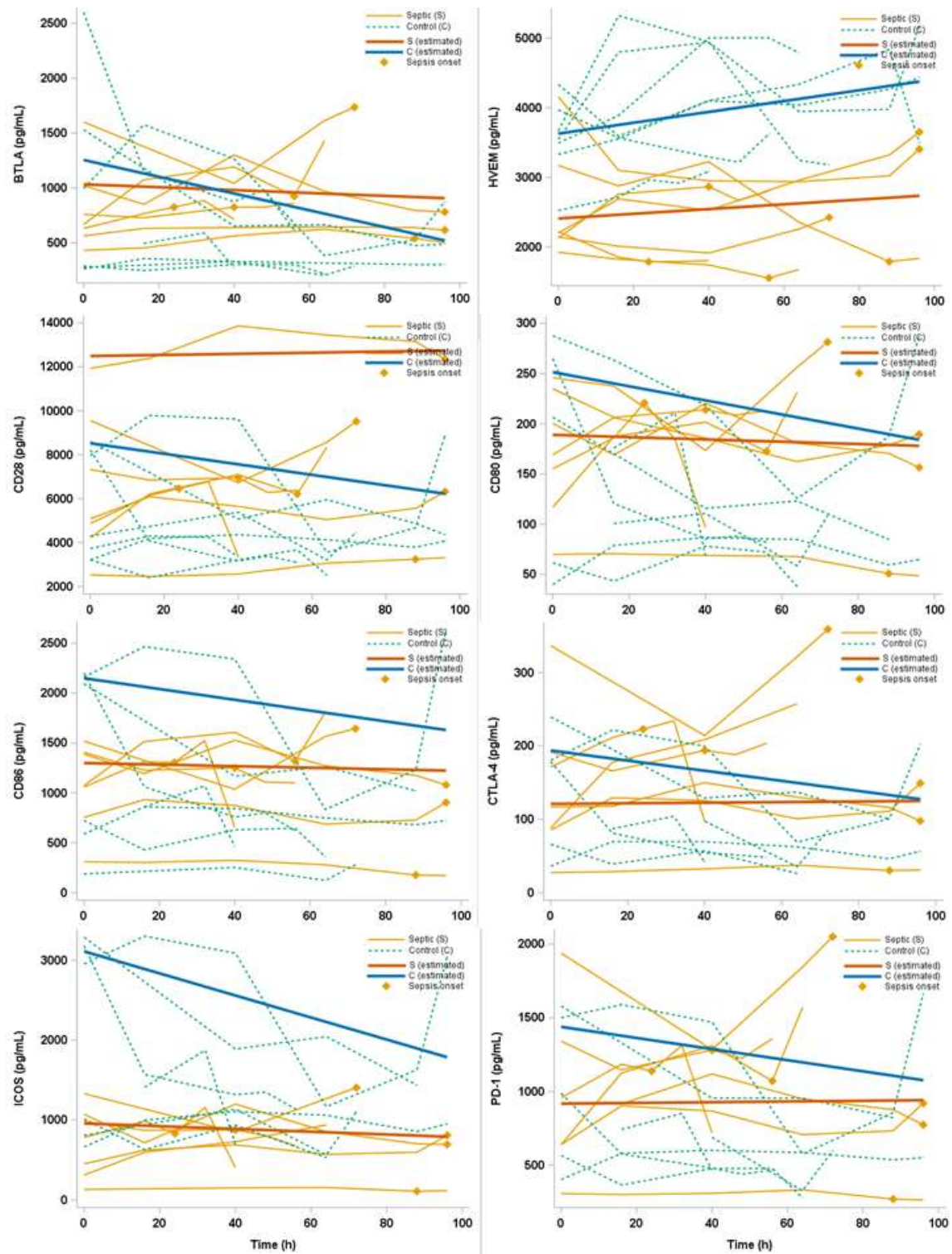
Für die Checkpoint-Proteine sCD80, sCD86 und sICOS ergab die Modellierung sowohl für den gesamten Messzeitraum, als auch für die Zeitpunkte vor der Diagnosestellung

keine signifikanten Gruppenunterschiede der Konzentrationsverläufe über die Zeit. Für die Kontrollgruppe ergab sich jedoch jeweils eine Abnahme der Plasmakonzentration über die Zeit (siehe Tabellen 18, 20). Diese Abnahme zeigte sich sowohl im Zeitraum vor der Diagnosestellung, als auch für den gesamten Messzeitraum.

Für sTIM-3 zeigte die Analyse mittels der hierarchischen Modellierung über den Beobachtungszeitraum für beide Gruppen jeweils eine ansteigende Plasmakonzentration. Diese lag für die Gruppe der Sepsis-Fälle bei 20,01 pg/ml pro Stunde (95% KI: [2,52 – 37,5]; $p = 0,028$), für die Kontrollgruppe lag diese bei stündlich 31,8 pg/ml (95% KI: [14,31 – 49,29]; $p = 0,002$). Folglich verliefen beide Kurven gleichgerichtet und es ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Trends. Einen ähnlichen Verlauf zeigten die beiden Gruppen für die Zeitpunkte vor Diagnosestellung. Auch hier verzeichneten die beiden Gruppen einen deutlichen Trend zum Konzentrationsanstieg über die Zeit.

Ebenfalls in den nachfolgenden Tabellen dargestellt sind die prozentualen Änderungen der Konzentrationen pro Stunde, in Relation zum geschätzten Intercept des jeweiligen Checkpoint-Proteins. Diese reichten vom Betrag her von 0,02 % für sPD-1 (siehe Tabelle 20), bis 0,86 % für sCD27 (siehe Tabelle 18).

Für die übrigen Checkpoint-Proteine konnten für beide Gruppen sowohl bei der Auswertung aller Messzeitpunkte als auch lediglich der Daten bis zum Nachweis der Sepsis in der Sepsis-Gruppe und der aller Kontrollen keine Zeittrends und demzufolge auch keine Unterschiede in den Zeittrends nachgewiesen werden.



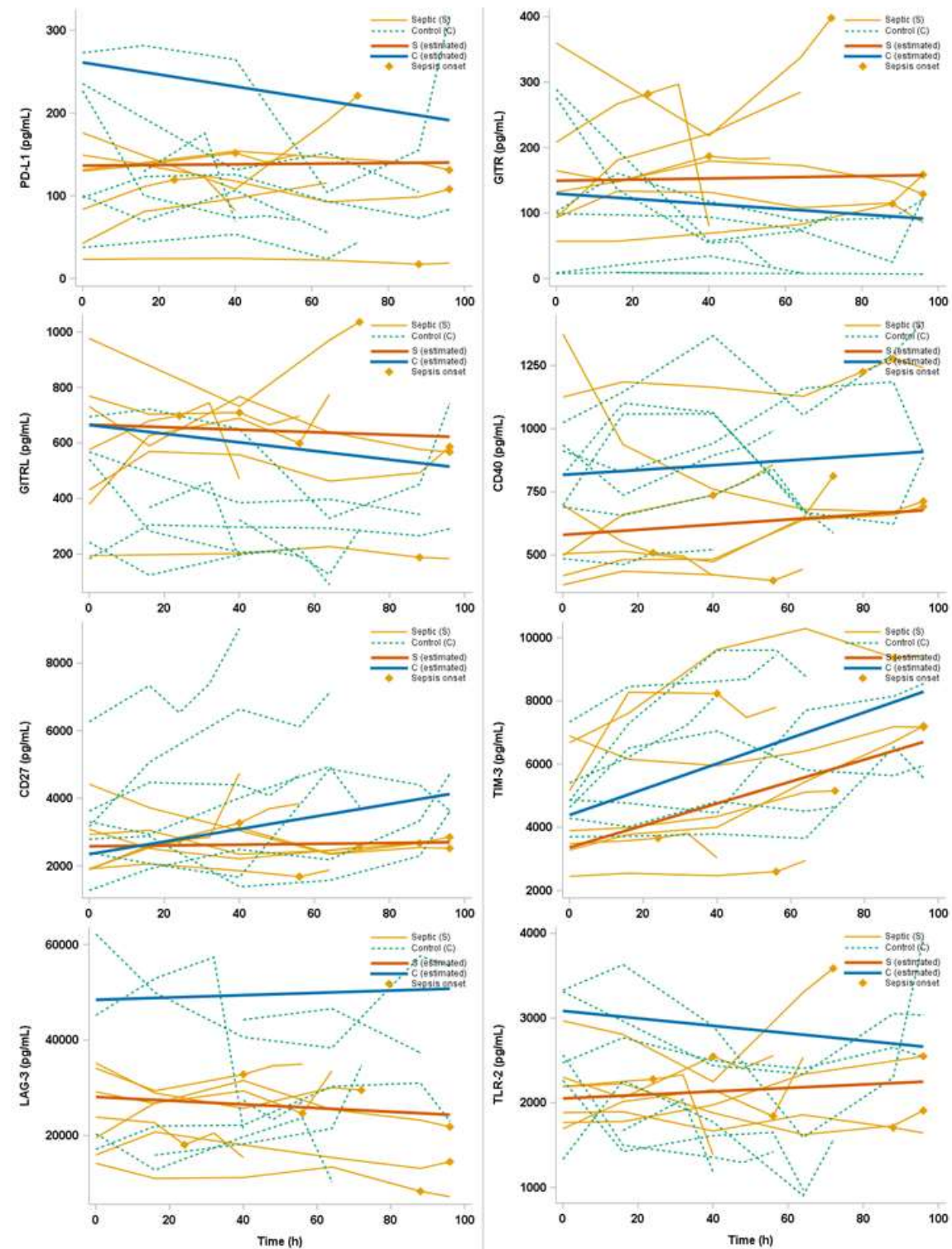


Abbildung 8: Gruppentrends der Sepsis- und Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum. Informationen über die Steigung der ermittelten Trends sind Tabelle 18 zu entnehmen. Die Informationen über die Unterschiede in den zeitlichen Trends der jeweiligen Gruppe sind Tabelle 19 zu entnehmen. Kontrollgruppe: n=7, Sepsis-Gruppe n=7.

Checkpointprotein	Intercept [pg/ml]	geschätzte Änderung Sepsis-Gruppe [pg/ml/h]	95% Konfidenzintervall	relative Änderung [%]	p-Wert
BTLA	838	1,21	(-4,58 - 7,00)	0,14	0,658
HVEM	2480	1,21	(-8,83 - 11,25)	0,05	0,798
CD28	6605	7,68	(-8,49 - 23,85)	0,12	0,321
CD80	177	-0,04	(-0,61 - 0,53)	-0,02	0,883
CD86	1121	-0,78	(-4,45 - 2,88)	-0,07	0,67
CTLA-4	150	0,3	(-0,32 - 0,92)	0,2	0,318
ICOS	750	-0,55	(-6,22 - 5,13)	-0,07	0,837
PD-1	1001	0,9	(-2,15 - 3,95)	0,09	0,534
PD-L1	110	0,04	(-0,38 - 0,45)	0,03	0,855
GITR	163	0,41	(-0,59 - 1,42)	0,25	0,39
GITRL	598	0,22	(-1,29 - 1,74)	0,04	0,752
CD40	691	0,63	(-2,45 - 3,70)	0,09	0,664
CD27	2617	3,71	(-13,70 - 21,11)	0,14	0,651
TIM-3	4649	20,01	(2,52 - 37,50)	0,43	0,028
LAG-3	24881	-38,69	(-108,20 - 30,81)	-0,16	0,269
TLR-2	2107	2,06	(-2,64 - 6,77)	0,1	0,384

Checkpointprotein	Intercept [pg/ml]	geschätzte Änderung Kontrollgruppe [pg/ml/h]	95% Konfidenzintervall	relative Änderung [%]	p-Wert
BTLA	884	-6,51	(-12,40 - -0,62)	-0,74	0,033
HVEM	3654	6,65	(-3,39 - 16,69)	0,18	0,174
CD28	5513	-19,55	(-35,99 - -3,10)	-0,35	0,024
CD80	152	-0,7	(-1,31 - -0,08)	-0,46	0,03
CD86	1189	-5,41	(-9,34 - -1,49)	-0,46	0,008
CTLA-4	127	-0,81	(-1,49 - -0,13)	-0,64	0,024
ICOS	1805	-7,51	(-13,49 - -1,53)	-0,42	0,018
PD-1	900	-3,8	(-7,19 - -0,41)	-0,42	0,031
PD-L1	151	-0,73	(-1,17 - -0,28)	-0,48	0,002
GITR	102	-0,87	(-1,90 - 0,16)	-0,85	0,091
GITRL	404	-1,65	(-3,33 - 0,02)	-0,41	0,052
CD40	811	1,13	(-1,95 - 4,20)	0,14	0,441
CD27	3203	27,49	(10,09 - 44,89)	0,86	0,005
TIM-3	5178	31,8	(14,31 - 49,29)	0,61	0,002
LAG-3	31431	24,18	(-59,61 - 107,96)	0,08	0,565
TLR-2	2301	-4,39	(-9,25 - 0,47)	-0,19	0,08

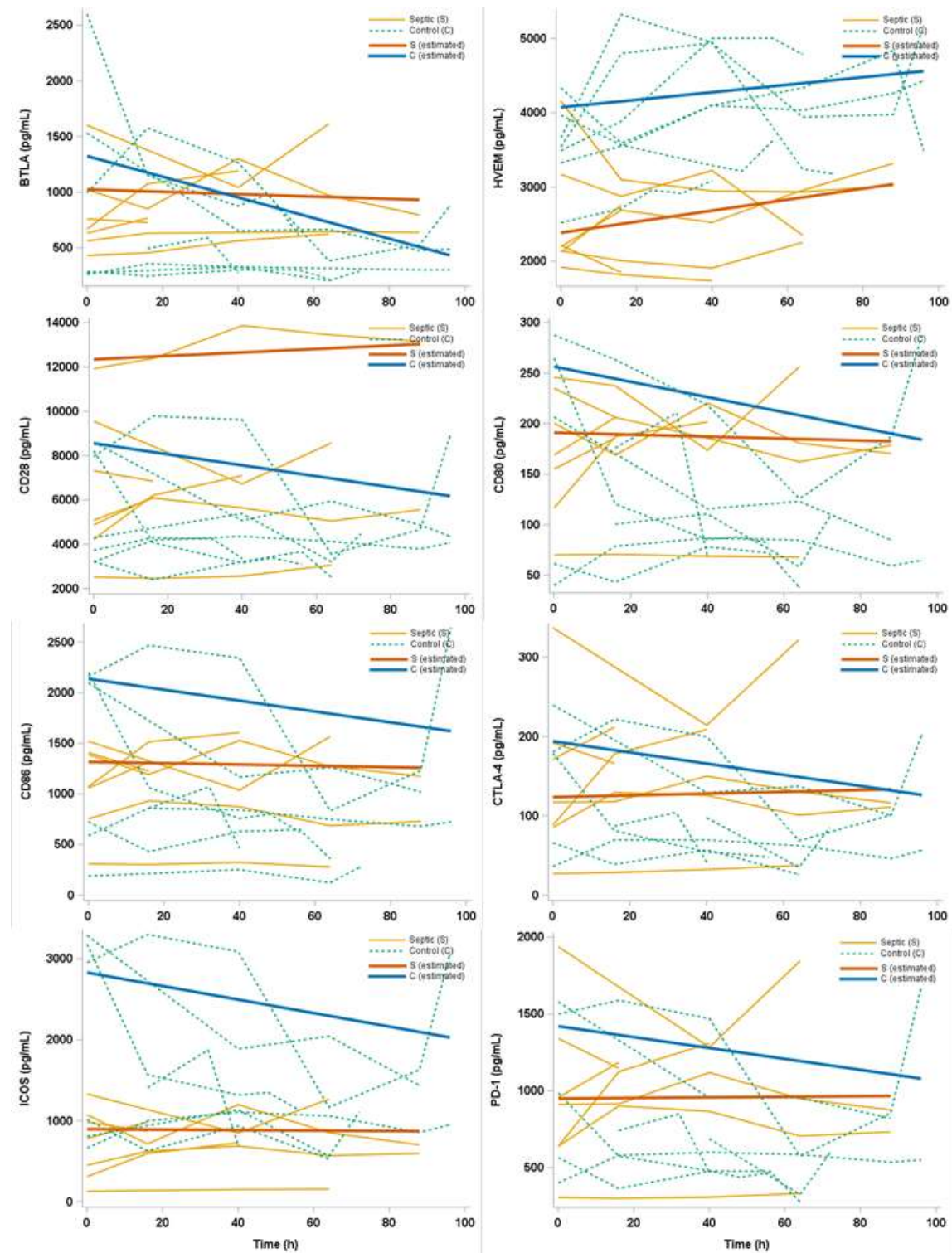
Tabelle 18: Gruppentrends der Sepsis- und Kontrollgruppe über den gesamten Messzeitraum

Hier dargestellt sind die ermittelten Trends der Konzentrationsänderung in der Sepsis- und Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die Intercepts bezeichnen den aus dem hierarchischen Modell geschätzten Ordinatenabschnitt. Somit entsprechen sie der geschätzten Konzentration des jeweiligen Immuncheckpoint-Proteins zum Zeitpunkt 0. Die relative Änderung bezeichnet den Anteil der geschätzten stündlichen Änderung am Intercept. Kontrollgruppe: n=7, Sepsis-Gruppe n=7.

Checkpointprotein	Unterschied der stündlichen Änderung Sepsis-Kontrollen [pg/ml/h]	95% Konfidenzintervall	p-Wert
BTLA	7,72	(0,07 - 15,36)	0,048
HVEM	-5,45	(-18,55 - 7,66)	0,408
CD28	27,23	(5,88 - 48,57)	0,0134
CD80	0,66	(-0,12 - 1,44)	0,1
CD86	4,63	(-0,74 - 10,00)	0,09
CTLA-4	1,1	(0,25 - 1,96)	0,013
ICOS	6,96	(-0,69 - 14,61)	0,073
PD-1	4,7	(0,47 - 8,93)	0,03
PD-L1	0,77	(0,16 - 1,37)	0,015
GITR	1,28	(-0,06 - 2,61)	0,06
GITRL	1,88	(-0,21 - 3,97)	0,077
CD40	-0,5	(-4,51 - 3,51)	0,8
CD27	-23,78	(-46,49 - -1,07)	0,041
TIM-3	-11,79	(-34,62 - 11,03)	0,304
LAG-3	-62,87	(-171,73 - 45,99)	0,252
TLR-2	6,45	(-0,31 - 13,22)	0,061

Tabelle 19: Unterschied der zeitlichen Änderung zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen errechnet sich aus der Differenz der stündlichen Konzentrationsänderung der Sepsis-Gruppe und der Kontrollgruppe. Kontrollgruppe: n=7, Sepsis-Gruppe n=7.



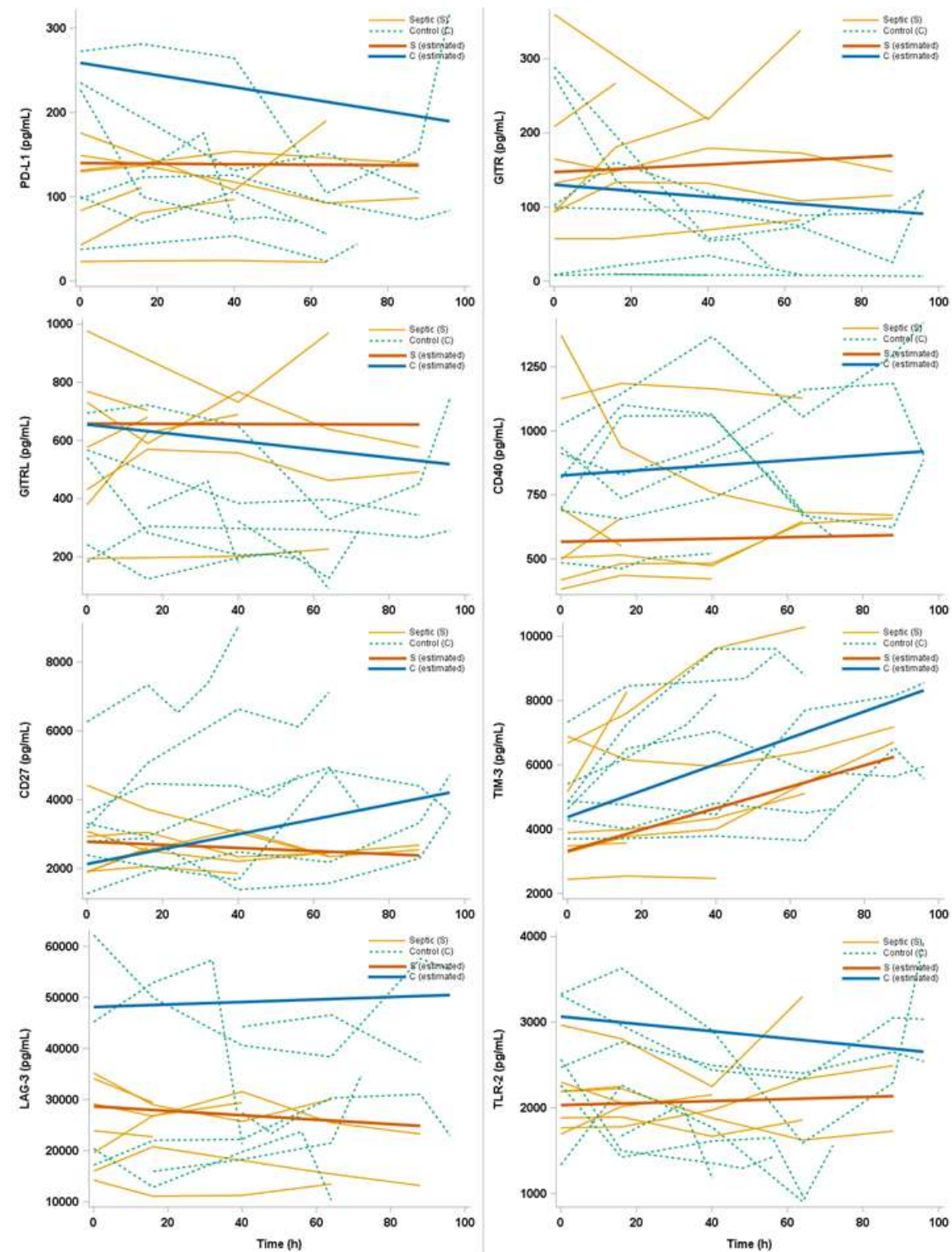


Abbildung 9: Gruppentrends der Sepsis- und Kontrollgruppe über den Zeitraum vor der Diagnosestellung der Sepsis.

Informationen über die Steigung der ermittelten Trends sind Tabelle 20 zu entnehmen. Die Informationen über die Unterschiede in den zeitlichen Trends der jeweiligen Gruppe sind Tabelle 21 zu entnehmen. Kontrollgruppe: n=7, Sepsis-Gruppe n=7.

Checkpointprotein	Intercept [pg/ml]	geschätzte Änderung Sepsis-Gruppe [pg/ml/h]	95% Konfidenzintervall	relative Änderung [%]	p-Wert
BTLA	838	0,74	(-5,02 - 6,50)	0,09	0,784
HVEM	2472	1,23	(-10,17 - 12,63)	0,05	0,818
CD28	6616	9,39	(-14,78 - 33,57)	0,14	0,414
CD80	175	-0,03	(-0,77 - 0,72)	-0,02	0,938
CD86	1107	-0,65	(-6,21 - 4,90)	-0,06	0,813
CTLA-4	151	0,11	(-0,49 - 0,71)	0,07	0,712
ICOS	734	-0,29	(-7,45 - 6,88)	-0,04	0,936
PD-1	997	0,2	(-3,42 - 3,82)	0,02	0,913
PD-L1	108	-0,03	(-0,67 - 0,60)	-0,03	0,922
GITR	166	0,21	(-0,91 - 1,34)	0,13	0,686
GITRL	597	-0,04	(-1,71 - 1,63)	-0,01	0,96
CD40	702	-0,4	(-3,96 - 3,16)	-0,06	0,812
CD27	2677	-6,96	(-24,24 - 10,32)	-0,26	0,397
TIM-3	4542	29,64	(3,75 - 55,53)	0,65	0,028
LAG-3	24807	-43,41	(-152,54 - 65,73)	-0,17	0,426
TLR-2	2111	1,2	(-5,72 - 8,12)	0,06	0,729

Checkpointprotein	Intercept [pg/ml]	geschätzte Änderung Kontrollgruppe [pg/ml/h]	95% Konfidenzintervall	relative Änderung [%]	p-Wert
BTLA	860	-5,69	(-10,83 - -0,55)	-0,66	0,033
HVEM	3728	4,8	(-4,71 - 14,31)	0,13	0,293
CD28	5526	-19,97	(-38,51 - -1,43)	-0,36	0,037
CD80	151	-0,68	(-1,30 - -0,06)	-0,45	0,03
CD86	1189	-5,38	(-9,60 - -1,16)	-0,45	0,014
CTLA-4	123	-0,7	(-1,19 - -0,22)	-0,57	0,005
ICOS	1826	-8,34	(-13,85 - -2,83)	-0,46	0,004
PD-1	890	-3,54	(-6,42 - -0,67)	-0,4	0,017
PD-L1	151	-0,72	(-1,21 - -0,23)	-0,48	0,005
GITR	102	-0,84	(-1,83 - 0,15)	-0,83	0,089
GITRL	396	-1,42	(-2,74 - -0,09)	-0,36	0,037
CD40	814	1,2	(-1,78 - 4,19)	0,15	0,396
CD27	3206	26,76	(12,85 - 40,66)	0,83	0,001
TIM-3	5154	32,91	(10,93 - 54,89)	0,64	0,007
LAG-3	31419	24,4	(-68,63 - 117,44)	0,08	0,599
TLR-2	2297	-4,28	(-9,37 - 0,81)	-0,19	0,097

Tabelle 20: Gruppentrends der Sepsis- und Kontrollgruppe über den Zeitraum vor der Diagnosestellung. Hier dargestellt sind die ermittelten Trends der Konzentrationsänderung in der Sepsis- und Kontrollgruppe über den Zeitraum vor der Diagnosestellung der Sepsis. Die Intercepts bezeichnen den aus dem hierarchischen Modell geschätzten Ordinatenabschnitt. Somit entsprechen sie der geschätzten Konzentration des jeweiligen Immuncheckpoint-Proteins zum Zeitpunkt 0. Die relative Änderung bezeichnet den Anteil der geschätzten stündlichen Änderung am Intercept. Kontrollgruppe: n=7, Sepsis-Gruppe n=7.

Checkpointprotein	Unterschied der stündlichen Änderung Sepsis-Kontrollen [pg/ml/h]	95% Konfidenzintervall	p-Wert
BTLA	6,43	(-0,81 - 13,67)	0,08
HVEM	-3,57	(-17,40 - 10,27)	0,604
CD28	29,36	(0,85 - 57,88)	0,044
CD80	0,65	(-0,26 - 1,57)	0,153
CD86	4,73	(-2,26 - 11,71)	0,179
CTLA-4	0,82	(0,04 - 1,59)	0,039
ICOS	8,05	(-0,98 - 17,09)	0,079
PD-1	3,74	(-0,88 - 8,36)	0,11
PD-L1	0,69	(-0,11 - 1,49)	0,089
GITR	1,06	(-0,35 - 2,47)	0,136
GITRL	1,38	(-0,75 - 3,51)	0,199
CD40	-1,6	(-5,93 - 2,72)	0,457
CD27	-33,72	(-54,39 - -13,05)	0,002
TIM-3	-3,27	(-34,92 - 28,37)	0,835
LAG-3	-67,81	(-211,22 - 75,60)	0,345
TLR-2	5,48	(-3,11 - 14,06)	0,206

Tabelle 21: Unterschied der zeitlichen Änderung zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe über den Zeitraum vor der Diagnosestellung.

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen errechnet sich aus der Differenz der stündlichen Konzentrationsänderung der Sepsis-Gruppe und der Kontrollgruppe. Kontrollgruppe: n=7, Sepsis-Gruppe n=7.

Gruppeneffekte

Zusätzlich zur Betrachtung der zeitlichen Verläufe ermöglichte die Modellierung auch den Vergleich der geschätzten Intercept-Werte der jeweiligen Checkpoint-Proteine in beiden Gruppen.

Betrachtet man den gesamten Beobachtungszeitraum, so lag der geschätzte Intercept für sHVEM in der Sepsis-Gruppe bei 2480 pg/ml und für die Kontrollgruppe bei 3654 pg/ml. Der hieraus zu berechnende Konzentrationsunterschied von 1174 pg/ml entspricht einer um 47,3% höheren Konzentration in der Kontrollgruppe (95% KI: [443,2 – 1904]; p = 0,002). Für den Zeitraum vor der Sepsis-Diagnose konnte ebenfalls ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Diese betrug, bei einem ermittelten Intercept in der Sepsis-Gruppe von 2472 pg/ml und einem Intercept in der Kontrollgruppe von 3728 pg/ml, 1256 pg/ml (95% KI: [499,3 – 2012,3]; p-Wert = 0,002).

Ebenfalls signifikante Unterschiede in den Intercepts ließen sich für sICOS nachweisen. So lag die geschätzte Konzentration der Intercepts in der Betrachtung des gesamten Beobachtungszeitraumes für die Sepsis-Gruppe bei 750 pg/ml und für die Kontrollgruppe bei 1805 pg/ml. Somit lag der Unterschied beider Gruppen bei 1055 pg/ml (95% KI: [239,5 – 1870,7]; p = 0,013), was einer um 140,7% höheren

Konzentration in der Kontrollgruppe, verglichen mit der Sepsis-Gruppe entspricht. Auch für sICOS wurde der Zeitraum vor der Diagnosestellung betrachtet, wobei hier ebenfalls signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen Kontrollen und der Sepsis-Gruppe festgestellt wurden. Die Intercepts betrugen hier für die Sepsis-Gruppe 734 pg/ml und für die Kontrollgruppe 1826 pg/ml. Die Plasmakonzentration von sICOS, zu Beginn der Beobachtung, in der Kontrollgruppe lag hier also geschätzt um 1092 pg/ml (95% KI: [400,4 – 1783]; $p = 0,003$) und somit um 148,8% höher als in der Sepsis-Gruppe (siehe Tabelle 22).

Aus Gründen der Lesbarkeit wurden die geschätzten Intercepts auf ganze Zahlen, die prozentualen Unterschiede auf eine Nachkommastelle und die p-Werte, in diesem Abschnitt, auf vier Nachkommastellen gerundet.

Checkpointprotein	Intercept Sepsis- Gruppe [pg/ml]	Intercept Kontroll- gruppe [pg/ml]	Differenz der Intercepts [pg/ml]	95% KI [pg/ml]	p-Wert
gesamter Beobachtungszeitraum					
HVEM	2480	3654	1174	[443,2 - 1904]	0,003
ICOS	750	1805	1055	[239,5 - 1871]	0,013
Zeitraum vor Diagnose					
HVEM	2472	3728	1256	[499,3 - 2012]	0,002
ICOS	734	1826	1092	[200,4 - 1783]	0,003

Tabelle 22 Gruppeneffekt im Vergleich der Intercepts von Kontroll- und Sepsis-Gruppe.

Hier dargestellt sind die Immuncheckpoint-Proteine, welche in der hierarchischen Modellierung einen signifikanten Gruppeneffekt zeigten. Der Gruppeneffekt bezeichnet in diesem Modell einen signifikanten Unterschied der geschätzten Intercepts und somit der Plasmakonzentration zu Beginn des Beobachtungszeitraumes. Kontrollgruppe: $n=7$, Sepsis-Gruppe $n=7$.

6.4 Charakteristika der Gruppen für die Messung ausgewählter Immuncheckpoint-Proteine

Im zweiten Teil der Studie wurden in Plasmaproben von 69 weiteren Patienten aus der Septometer-Rekrutierung sowie in Proben von sieben gesunden Freiwilligen, Plasmakonzentrationen von löslichen Immuncheckpoint-Proteinen gemessen. Die Individuen aus der Septometer-Rekrutierung wurden in drei Gruppen aufgeteilt. 31 von

Ihnen zeigten zu Beginn des Beobachtungszeitraumes ein SIRS, welches entweder über den gesamten Beobachtungszeitraum bestand oder von einzelnen Zeitpunkten unterbrochen wurde, in denen im jeweiligen Fall weder ein SIRS noch eine Sepsis festgestellt werden konnte. 20 Patienten zeigten bereits zum ersten Zeitpunkt der Blutabnahme eine Sepsis. Diese wurde initial nach Sepsis-1/2 diagnostiziert. In der retrospektiven Bewertung hielt die Diagnose auch den Sepsis-3 Kriterien stand. Bei 18 der Fälle wurde im Beobachtungszeitraum eine Sepsis diagnostiziert, nachdem sich bei diesen Betroffenen zu Beginn des Beobachtungszeitraumes ein SIRS zeigte. Diese dritte Gruppe zeigte sowohl den höchsten SOFA-Score, den höchsten Anteil an Katecholamin-Bedarf als auch die höchste Krankenhaussterblichkeit (siehe Tabelle 23)

		SIRS	Sepsis zu Beginn Sepsis im Verlauf	
		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)
		N (%)	N (%)	N (%)
Allgemein				
	Gruppe	31 (44,9%)	20 (29%)	18 (26,1%)
	Alter [Jahre]	62 (53-76)	66 (49-79)	63 (54-76)
	Männer	15 (48,4%)	10 (50%)	16 (88,9%)
	Hospitalisierungsdauer [Tage]	23,9 (13,3-38,7)	25 (16,8-42,8)	30,1 (15,3-59,7)
	Krankenhausmortalität	5 (16,1%)	4 (20%)	8 (44,4%)*~
Fachabteilung				
	Neurochirurgie	12 (38,7%)	1 (5%)	5 (27,8%)
	Unfallchirurgie	6 (19,4%)	4 (20%)	5 (27,8%)
	HNO	3 (9,7%)	4 (20%)	1 (5,6%)
	Allgemeinchirurgie	10 (32,3%)	8 (40%)	9 (50%)
	Andere	3 (9,7%)	5 (25%)	1 (5,6%)
Vorerkrankungen				
	Diabetes	8 (25,8%)	5 (25%)	2 (11,2%)
	Herz-, Kreislauferkrankungen	16 (51,6%)	9 (45%)	7 (38,9%)
	Lungenerkrankungen	0 (0%)	2 (10%)	1 (5,6%)
	Alkoholabusus	1 (3,2%)	1 (5%)	0 (0%)
Laborparameter				
	Hb [g/dL]	8,5 (8-9,2)	9,6* (8,55-10,9)	8,9 (8,2-9,4)
	WBC [10E9/L]	12,3 (9,21-14,54)	12,7 (7,71-16,84)	9,1 (6,48-12,32)
	Thrombozyten [10E9/L]	137 (101-207)	217* (183-292)	139 (97-195)
	Creatinin [mg/dL]	0,8 (0,63-1,22)	0,865 (0,75-2,56)	1,175 (0,79-1,38)
	Bilirubin [mg/dL]	0,525 (0,31-0,93)	0,51 (0,34-0,81)	0,76 (0,44-0,89)
	Glucose [mg/dL]	139 (116-179)	124,5 (98,5-153,5)	136,5 (114-162)
	CRP [mg/L]	126 (54,4-171)	197,5* (142-322)	143,5 (84,6-225)
	PCT [µg/L]	0,4 (0,19-1,08)	0,9 (0,26-4,28)	1 (0,19-1,67)
	Laktat [mmol/l]	1 (0,8-1,6)	1 (0,7-1,4)	1 (0,8-1,5)
Vitalparameter				
	Temperatur [°C]	37 (36,7-37,4)	37 (36,7-37,5)	37,35 (37,1-38,1)
	Atemfrequenz [1/min]	17 (14-21)	19 (16-21,5)	19 (16-22)
	Herzfrequenz [1/min]	86 (77-99)	84 (70,5-98)	103 (74-118)
	MAP [mmHg]	82 (75-95)	80 (74,5-95,5)	78 (71-85)
	Horovitz Index [mmHg]	302,3 (237,5-362,1)	204,6 (193,0-320,8)	280,7 (219,8-325,7)
Interventionen				
	Beatmung	27 (87,1%)	15 (75,0%)	17 (94,4%)
	Katecholamine	19 (61,3%)	11 (55,0%)	17 (94,4%)*~
Scores				
	SOFA	8 (5-10)	5,5 (5-7)	11,5* (8-13)

pvalue: t-test (method Satterthwaite) for continuous parameters

Chi² test for categorical parameters

~: Fisher's exact test

* p-Wert ≤ 0,05

Tabelle 23: Charakteristika der verschiedenen Vergleichsgruppen

6.5 Immuncheckpoint-Proteine im Vergleich von Fällen mit persistierendem SIRS, bestehender Sepsis, Übergang von SIRS zur Sepsis und gesunden Kontrollen sowie der entsprechenden Messwerte aus der Polytrauma-Kohorte

Zunächst lässt sich sagen, dass sich alle gemessenen Checkpoint-Proteine in den Plasmaproben der verschiedenen Gruppen nachweisen ließen. Für einige dieser 9 untersuchten Checkpoint-Proteine wurden im Nachhinein häufiger Messergebnisse, aufgrund eines intraindividuellen Variationskoeffizienten von $>10\%$, aussortiert als dies für andere Proteine nötig war. So konnten beispielsweise in der Gruppe der gesunden Kontrollen für sBTLA nur drei Messergebnisse verwertet werden. Ebenfalls nur drei verwertbare Messwerte, lieferte die Messung der Kontrollen im Kollektiv der Polytrauma-Fälle.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die verwendeten Assays für die Messung der Polytrauma-Gruppen und den vier anderen Gruppen aus verschiedenen Chargen des Herstellers stammten. Somit ist eine direkte Vergleichbarkeit der beiden Polytrauma-Gruppen mit dem übrigen Septometer-Kollektiv und den gesunden Kontrollen nur eingeschränkt möglich. Festzuhalten ist jedoch, dass die gemessenen Konzentrationen in sowohl den Polytrauma-Fällen, als auch in den Gruppen des zweiten Messdurchganges für die jeweiligen Checkpoint-Proteine im gleichen Konzentrationsbereich lagen (siehe Tabelle 24).

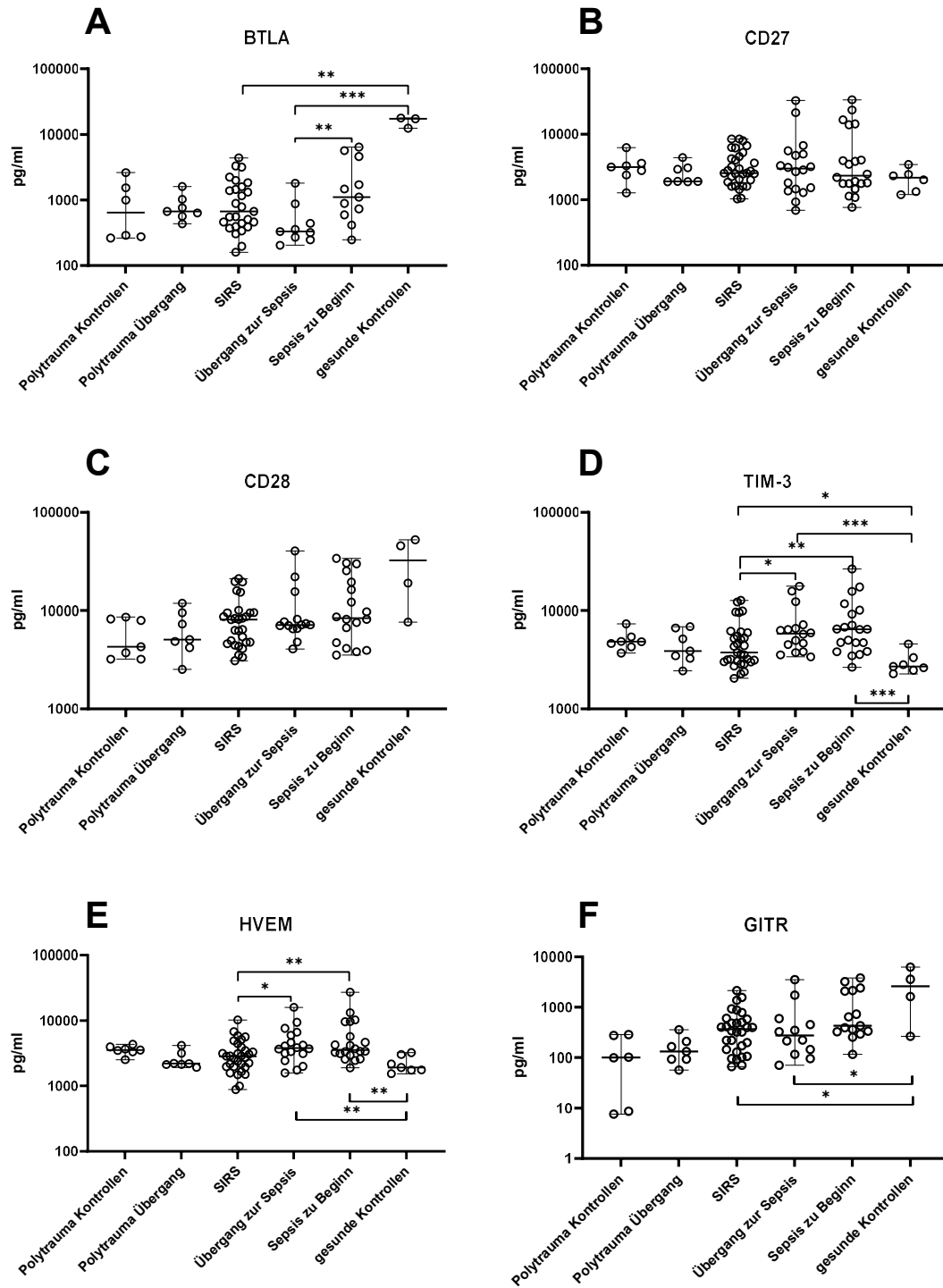
Die mittels des Kruskal-Wallis-Tests ermittelten Ergebnisse der Gruppenvergleiche sind in Abbildung 10 dargestellt. Das gewählte Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$. Die Korrektur der ermittelten p-Werte, die durch multiples Testen notwendig war, erfolgte mittels des Benjamini-Hochberg-Verfahrens (Benjamini and Hochberg, 1995).

Immunecheckpoint	Polytrauma Kontrollen	Polytrauma Übergang	SIRS
	Median (IQR) [pg/ml]	Median (IQR) [pg/ml]	Median (IQR) [pg/ml]
BTLA	643 (272,1 - 1798)	670 (563,7 - 1022)	668,7 (393,7 - 1590)
CD27	3164 (2388 - 3623)	1915 (1895 - 3082)	2560 (1860 - 4568)
CD28	4298 (3210 - 8210)	5080 (4213 - 9549)	8103 (4685 - 9531)
TIM-3	4830 (4286 - 5405)	3888 (3274 - 6674)	3742 (3015 - 5978)
HVEM	3543 (3329 - 3968)	2198 (2124 - 3170)	2856 (1971 - 3931)
GITR	101 (8,39 - 279,3)	132 (93,16 - 208,4)	368,9 (141,3 - 588,3)
LAG-3	45217 (17146 - 62196)*	23892 (15964 - 34093)	124487 (73531 - 151393)
GITRL	541 (212,6 - 631)	576 (379,1 - 769,1)	458,1 (174,3 - 966)
ICOS	1984 (771,7 - 3209)	782 (311,7 - 1072)	2723 (871,7 - 4849)

Immunecheckpoint	Übergang zur Sepsis	Sepsis zu Beginn	gesunde Kontrollen
	Median (IQR) [pg/ml]	Median (IQR) [pg/ml]	Median (IQR) [pg/ml]
BTLA	330 (257,7 - 655,7)	1104 (592,5 - 4598)	17239 (12453 - 17745)*
CD27	2990 (1436 - 5140)	2330 (1769 - 11459)	2172 (1300 - 3452)
CD28	7147 (6565 - 10029)	8391 (4581 - 21008)	32404 (10512 - 50849)
TIM-3	5854 (3998 - 7035)	6458 (4065 - 9899)	2700 (2477 - 3330)
HVEM	3792 (2943 - 6134)	3548 (3009 - 8656)	1910 (1745 - 3029)
GITR	276 (123,4 - 563,3)	432,6 (328,6 - 2155)	2610 (603,7 - 5580)
LAG-3	96340 (57804 - 187742)	194490 (121358 - 289538)	256193 (202113 - 333525)
GITRL	211 (195,3 - 2156)	983,2 (550,8 - 3072)	4427 (3599 - 6252)
ICOS	1050 (688,4 - 7643)	2880 (1957 - 13153)	22988 (18928 - 25661)

Tabelle 24: Ergebnisse der Messung von Plasmakonzentrationen löslicher Immunecheckpoint-Proteine zum ersten Zeitpunkt nach Studieneinschluss.

*: drei Messwerte verfügbar. Polytrauma Kontrollen: n=7, Polytrauma-Übergang: n=7, SIRS: n=31, Sepsis zu Beginn: n=20, Sepsis im Verlauf: n=18, gesunde Kontrollen: n=7.



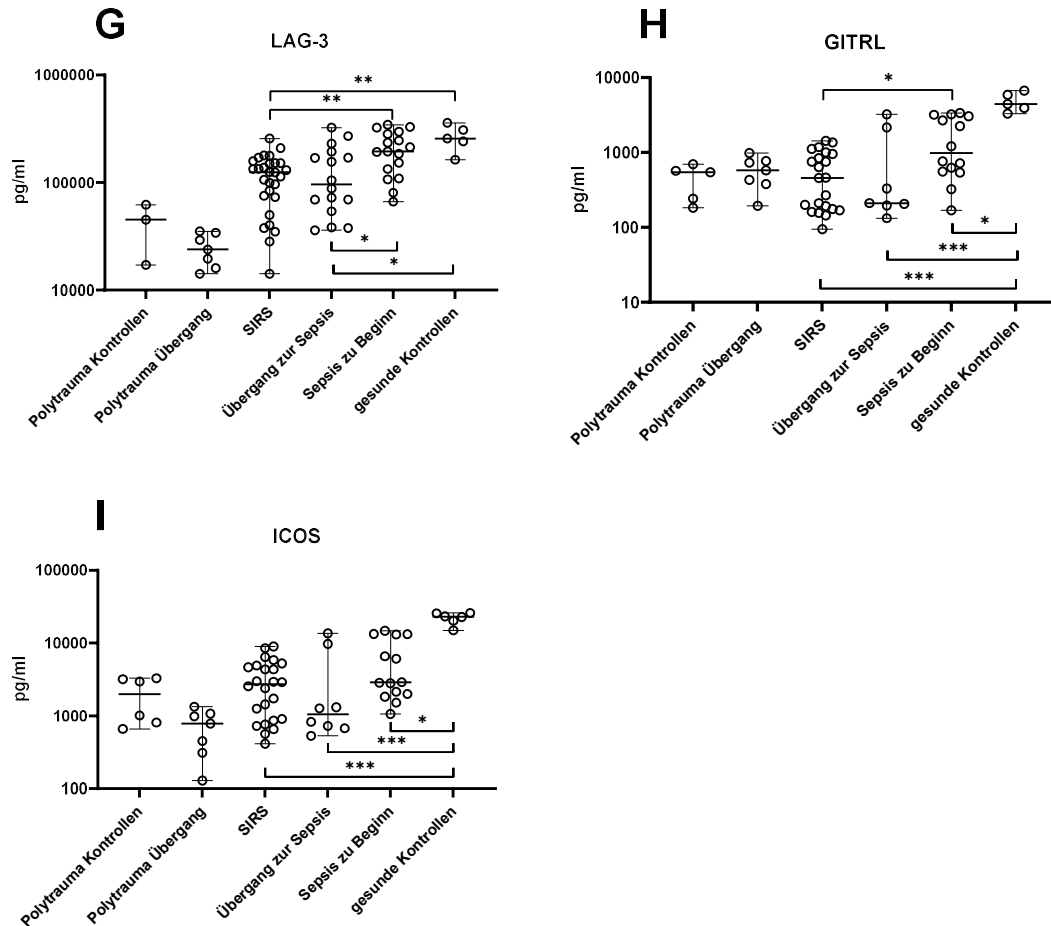


Abbildung 10: Gruppenvergleiche der Plasmakonzentrationen löslicher Immuncheckpoint-Proteine zum ersten Zeitpunkt nach Studieneinschluss.

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Gezeigt sind hier die Plasmakonzentrationen verschiedener Immuncheckpoint-Proteine in Patientinnen und Patienten aus der SEPTOMETER-Rekrutierung zum ersten Zeitpunkt nach Einschluss in die Studie. Die Patientinnen und Patienten wurden zuvor in verschiedene Gruppen eingeteilt, welche abhängig vom Krankheitsverlauf waren. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurden die Konzentrationsunterschiede der verschiedenen Gruppen auf statistische Signifikanz hin untersucht. Aufgrund verschiedener Chargen der verwendeten Assays in den beiden Gruppen von Polytrauma-Fällen, sind die Ergebnisse der statistischen Analyse nur eingeschränkt verwertbar. **(A)** Hier unterscheiden sich der Vergleich Polytrauma Kontrollen gegen gesunde Kontrollen ($p \leq 0,01$) und der Vergleich Polytrauma Übergang gegen gesunde Kontrollen ($p \leq 0,05$) signifikant voneinander. **(C)** unterscheidet sich die Kontrollgruppe der Polytrauma-Fälle signifikant von der Gruppe gesunder Kontrollen ($p \leq 0,01$). **(D)** unterscheidet sich die Kontrollgruppe der Polytrauma-Fälle signifikant von der Gruppe gesunder Kontrollen ($p \leq 0,05$). **(E)** Ebenfalls signifikant unterschiedlich sind die Plasmakonzentrationen im Vergleich der Polytrauma-Kontrollen mit den gesunden Kontrollen sowie die Konzentrationen im Vergleich der Polytrauma-Übergänge mit den Übergängen in den übrigen Septometer-Fällen und den Sepsis-Fällen zu Beginn der Beobachtung ($p \leq 0,05$). **(F)** Jeweils signifikant unterschiedliche Plasmakonzentrationen lieferte der Vergleich der Polytrauma-Kontrollgruppe mit den vier Gruppen des zweiten Messdurchganges sowie die Vergleiche der Polytrauma-Übergänge mit den gesunden Kontrollen und den Sepsis-Fällen zu Beginn der Beobachtung. **(G)** Jeweils signifikant unterschiedliche Plasmakonzentrationen lieferten der Vergleich der Polytrauma-Übergänge mit den vier Gruppen des zweiten Messdurchganges sowie die Vergleiche der Polytrauma-Kontrollgruppe mit den gesunden Kontrollen und den Sepsis-Fällen zu Beginn der Beobachtung. **(H)** Unterschied sich die Gruppe der gesunden Kontrollen zusätzlich noch von den beiden Polytrauma-Gruppen ($p \leq 0,01$). **(I)** Die gesunden Kontrollen und die Gruppe der Sepsis-Fälle zu Beginn der Beobachtung unterscheiden sich jeweils signifikant von den beiden Polytrauma-Gruppen. Polytrauma Kontrollen: $n=7$, Polytrauma-Übergang: $n=7$, SIRS: $n=31$, Sepsis zu Beginn: $n=20$, Sepsis im Verlauf: $n=18$, gesunde Kontrollen: $n=7$.

6.6 Interleukine im Vergleich von Fällen mit persistierendem SIRS, bestehender Sepsis, Übergang von SIRS zur Sepsis und gesunden Kontrollen sowie der entsprechenden Messwerte aus der Polytrauma-Kohorte

Neben den löslichen Checkpoint-Proteinen wurden in den Proben der Messung aus Kapitel 6.5 auch verschiedene Interleukine und Zytokine quantitativ bestimmt, die eine Rolle in der Pathogenese der Sepsis und systemischer Entzündungsreaktionen spielen.

Analog zu den Messungen der löslichen Checkpoint-Proteine wurden Messwerte von der statistischen Auswertung ausgeschlossen, bei denen der intraindividuelle Variationskoeffizient >10% lag. Bei der Gruppe aus gesunden Kontrollpersonen gelang nur in einem Fall eine valide Messung für IL-10.

Auch für die Messung der Zytokine wurden verschiedene Herstellerchargen verwendet, die die Beurteilbarkeit der statistischen Auswertung potentiell einschränken. Abbildung 11 zeigt jedoch, dass die Messergebnisse der verschiedenen Gruppen nicht systematisch von der Gruppe der Polytrauma-Fälle mit Übergang abweichen.

Die mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelten Ergebnisse der Gruppenvergleiche sind in Abbildung 11 dargestellt. Das gewählte Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$. Die Korrektur der ermittelten p-Werte, die durch multiples Testen notwendig war, erfolgte mittels des Benjamini-Hochberg-Verfahrens (Benjamini and Hochberg, 1995).

Zytokin	Polytrauma Übergang	SIRS	Übergang zur Sepsis
	Median (IQR) [pg/ml]	Median (IQR) [pg/ml]	Median (IQR) [pg/ml]
IL-1RA	200,1 (48,5 - 347,5)	16,7 (13,6 - 37,3)	36,5 (14 - 137,7)
IL-6	82,9 (44 - 154,2)	65,9 (32 - 131,5)	186,0 (107,6 - 708,3)
IL-10	11,3 (5,7 - 47,1)	17,0 (5,8 - 58,6)	31,9 (20,9 - 76,8)
TNF-alpha	14,0 (10,1 - 20,6)	36,2 (27,2 - 48,4)	41,7 (28,2 - 49,5)

Zytokin	Sepsis zu Beginn	gesunde Kontrollen
	Median (IQR) [pg/ml]	Median (IQR) [pg/ml]
IL-1RA	25,5 (14,7 - 121,9)	5,5 (4,5 - 11,2)
IL-6	68,5 (27,3 - 207,9)	1,6 (1,1 - 2,9)
IL-10	25,8 (5,5 - 39,5)	36,4 *
TNF-alpha	35,2 (26,3 - 69,1)	18,2 (16,7 - 38,1)

* nur ein Messwert

Tabelle 25: Ergebnisse der Messung von Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine zum ersten Zeitpunkt nach Studieneinschluss. Polytrauma-Übergang: n=7, SIRS: n=31, Sepsis zu Beginn: n=20, Sepsis im Verlauf: n=18, gesunde Kontrollen: n=7.

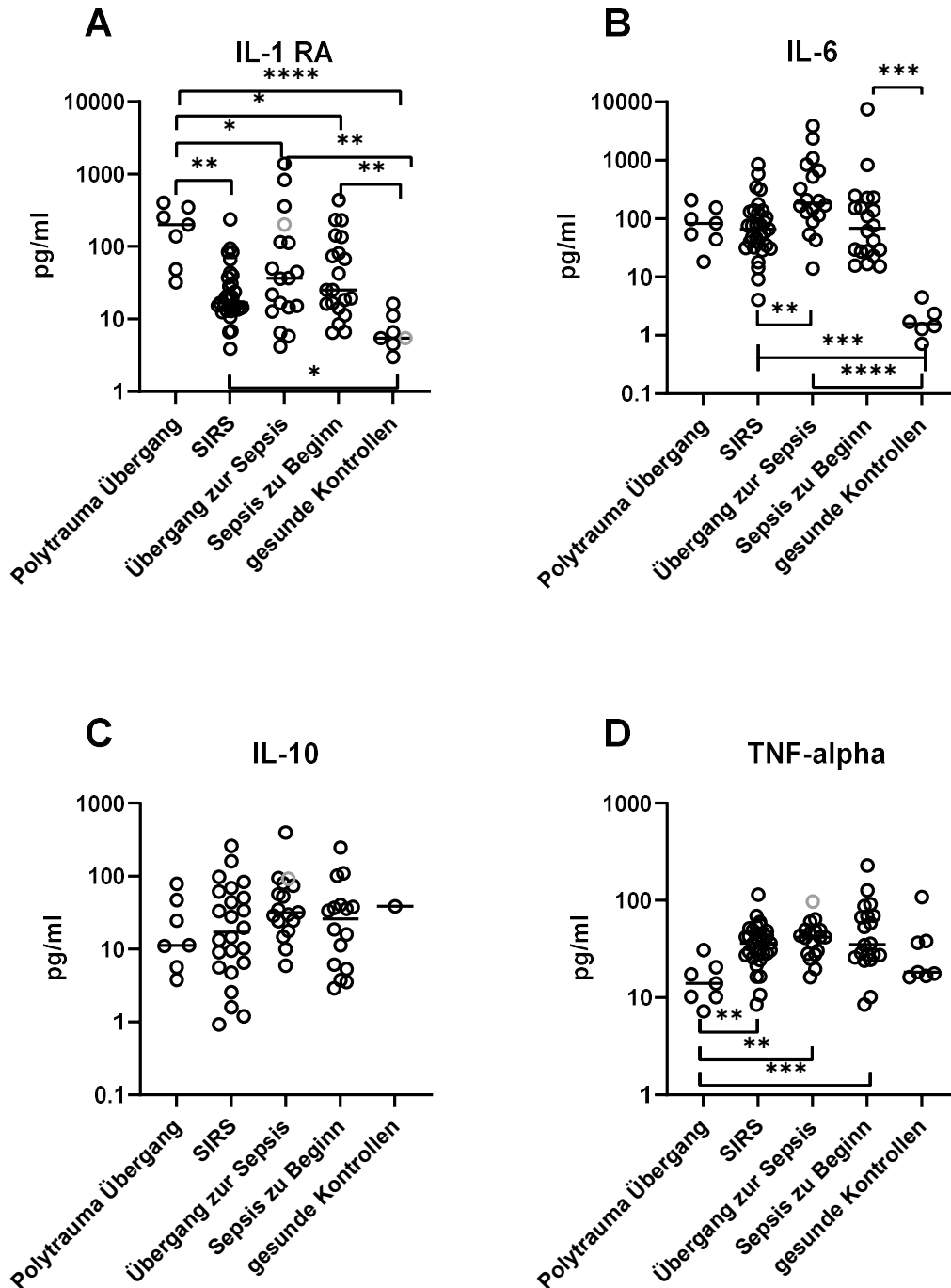


Abbildung 11: Gruppenvergleiche der Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine zum ersten Zeitpunkt nach Studieneinschluss.

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$. Gezeigt sind hier die Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine in Patientinnen und Patienten aus der SEPTOMETER-Rekrutierung zum ersten Zeitpunkt nach Einschluss in die Studie. Die Patientinnen und Patienten wurden zuvor in verschiedene Gruppen eingeteilt, welche abhängig vom Krankheitsverlauf waren. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurden die Konzentrationsunterschiede der verschiedenen Gruppen auf statistische Signifikanz hin untersucht. Aufgrund verschiedener Chargen der verwendeten Assays in den beiden Gruppen von Polytrauma-Fällen, sind die Ergebnisse der statistischen Analyse potentiell nur eingeschränkt verwertbar. **(A)** Die Polytrauma-Fälle mit einem Übergang zur Sepsis zeigten hier durchgehend höhere Konzentrationen an IL-1RA als alle anderen Gruppen. Weiterhin lag die Konzentration in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in allen anderen Gruppen. **(B)** Für IL-6 lagen die Messwerte in der Kontrollgruppe ebenfalls niedriger als in den übrigen Gruppen. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied

zwischen der SIRS-Gruppe und der Gruppe, die einen Übergang zur Sepsis hatte, gezeigt werden. **(C)** Für IL-10 zeigte keiner der durchgeführten Gruppenvergleiche einen statistisch signifikanten Unterschied. **(D)** TNF-alpha konnte in den Polytrauma-Fällen mit Übergang zur Sepsis in signifikant geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden, als in der SIRS-Gruppe, der Gruppe mit Übergang zur Sepsis sowie den Sepsisfällen bei Einschluss. Graue Ringe in der Abbildung entsprechen Messwerten, die in der technischen Doppelbestimmung einen Variationskoeffizienten von >10% aufwiesen. Diese Messwerte wurden in der statistischen Analyse nicht berücksichtigt. Polytrauma-Übergang: n=7, SIRS: n=31, Sepsis zu Beginn: n=20, Sepsis im Verlauf: n=18, gesunde Kontrollen: n=7.

6.7 Quantitative PCR granulozytärer cDNA

Für die Durchführung der quantitativen RT-PCR wurden Proben transkribierter cDNA von drei Patienten und einer Patientin ausgewählt, die allesamt im Rahmen der SEPTOMETER-Studie auf der anästhesiologischen Intensivstation der Universitätsmedizin Mannheim rekrutiert wurden. Alle vier Untersuchten wiesen zum Einschluss in die Studie und zum Zeitpunkt der ersten Isolierung von Granulozyten klinisch ein SIRS auf. Im Laufe der Studienteilnahme entwickelten alle vier eingeschlossenen entweder eine Sepsis oder einen septischen Schock.

Die zur Auswahl einer endogenen Kontrolle für die spätere quantitative Genexpressionsanalyse der Immuncheckpoints untersuchten Gene wurden in zwei Phasen statistisch ausgewertet. Zunächst wurden die in der quantitativen RT-PCR erhobenen Ct-Werte der einzelnen Patienten über die Zeit miteinander verglichen. Da eine Normalverteilung der Messwerte aufgrund der geringen Anzahl an Proben nicht sicher angenommen werden konnte, wurde hierfür der Friedman-Test sowie der Dunn's multiple comparisons Test verwendet. Für keines der fünf untersuchten Gene *AKIRIN1*, *POLR2A*, *GUSB*, *B2M*, und *TNF* konnte über den Untersuchungszeitraum ein signifikanter Unterschied in den Ct-Werten festgestellt werden. Die p-Werte lagen für alle durchgeführten Analysen deutlich über dem festgelegten Cut-Off von $p=0,05$. Die Mittelwerte der Ct-Werte der einzelnen Gene lagen im Bereich von 18,89 (*B2M*, nach 96 Stunden) und 30,43 (*GUSB*, nach 48 Stunden) (siehe Abbildung 12).

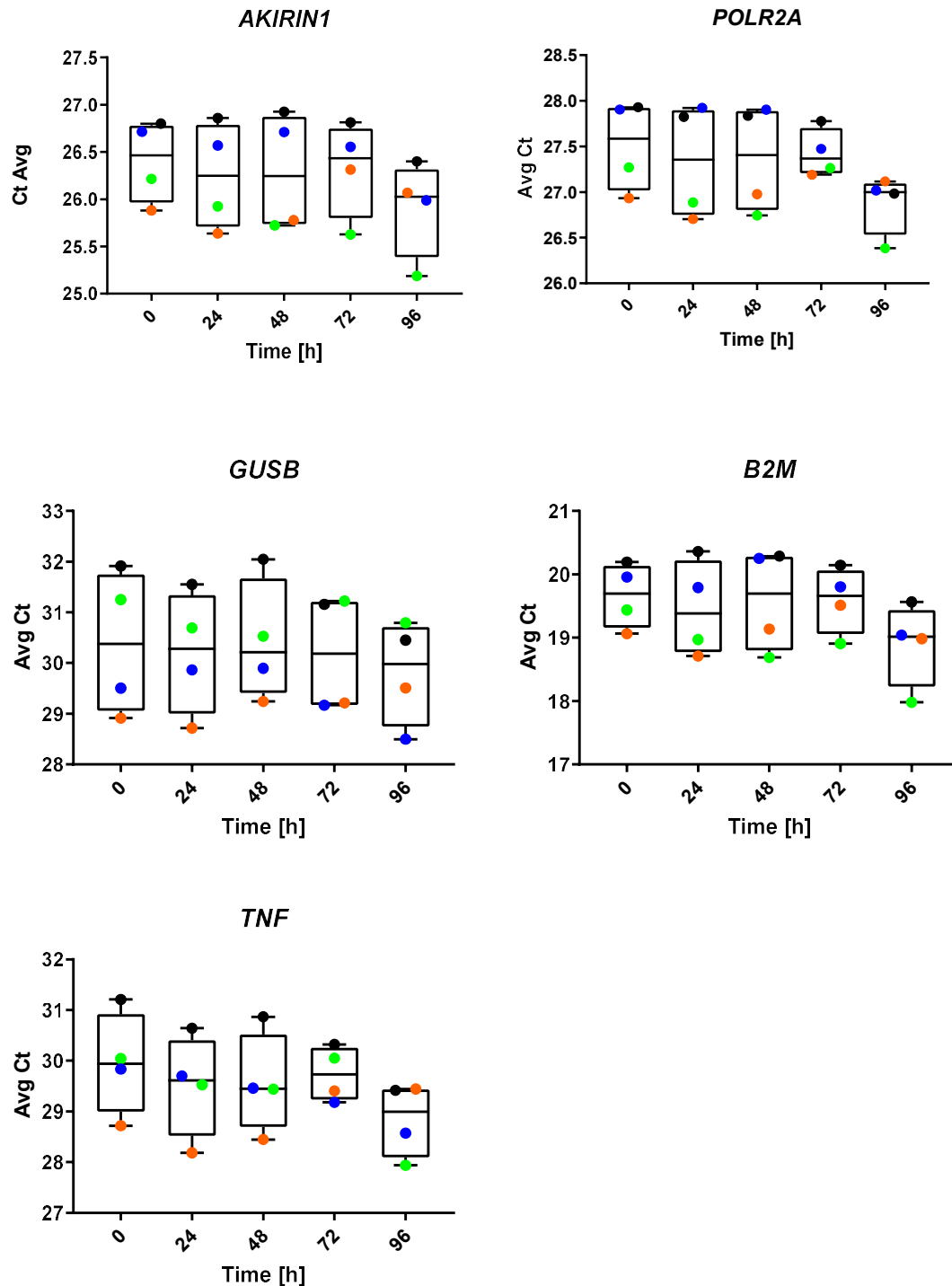


Abbildung 12: Ct-Werte der quantitativen RT-PCR potentieller Kontrollgene in Granulozyten von Sepsis-Patienten über die Zeit.

Die hier gezeigten Abbildungen zeigen die Ct-Werte der einzelnen untersuchten Gene zum jeweiligen Zeitpunkt innerhalb der Studienteilnahme. Die unterschiedlichen Farben stehen hier jeweils für den gleichen untersuchten Patienten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) konnten für keines der fünf untersuchten Gene gefunden werden. Für die statistische Auswertung wurden der Friedman-Test sowie der Dunn's multiple comparisons Test verwendet. $n=4$.

Im zweiten Teil der statistischen Analyse wurden die verschiedenen Messzeitpunkte nach Krankheitsstatus kategorisiert, sodass ein Vergleich, zwischen SIRS, Sepsis und septischem Schock ermöglicht wurde. Die Einteilung in die verschiedenen Kategorien erfolgte analog zu den Plasmaproben nach retrospektiver ärztlicher Einschätzung. Von den insgesamt zwanzig untersuchten Proben konnten so sieben Zeitpunkte der Gruppe SIRS, neun Zeitpunkte der Gruppe Sepsis und 3 Zeitpunkte der Gruppe septischer Schock zugeordnet werden. Eine Probe konnte keiner der drei Gruppen zugeordnet werden. Zur Untersuchung der drei Gruppen auf signifikant unterschiedliche Ct-Werte, wurde hier der Kruskal-Wallis-Test verwendet, der ebenfalls eine Normalverteilung der Messwerte nicht zwingend voraussetzt. Auch in diesem Vergleich konnten für die fünf verschiedenen Gene keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Alle ermittelten p-Werte lagen im Bereich von $p \geq 0,247$ und somit deutlich über dem gewählten Cut-Off von $p = 0,05$ (siehe Abbildung 13).

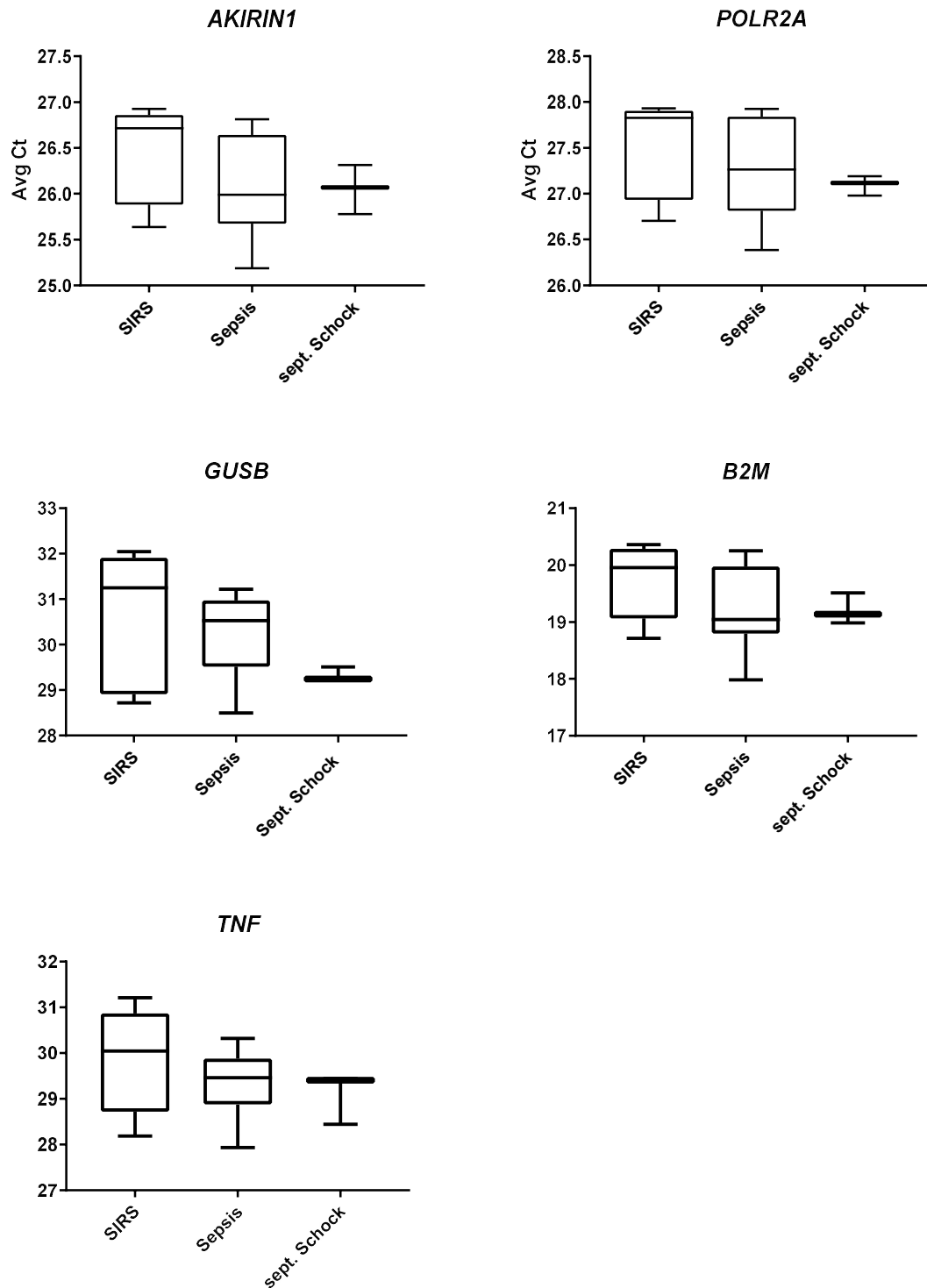


Abbildung 13: Ct-Werte der quantitativen RT-PCR potentieller Kontrollgene in Granulozyten von Patienten mit SIRS, einfacher Sepsis und septischem Schock.

In dieser Abbildung sind die Ct-Werte für verschiedene potentielle Kontrollgene in Granulozyten von Patienten mit

einem Übergang von SIRS zur Sepsis oder einem septischen Schock gezeigt. Hierfür wurden Granulozyten der vier Patienten 24-stündlich über einen Zeitraum von 5 Tagen isoliert. Anhand der Ausprägung des Krankheitsbildes wurden die einzelnen Messwerte der einzelnen Patienten einer von drei Gruppen zugeordnet. Diese sind SIRS, Sepsis oder septischer Schock. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Ein signifikanter Unterschied in den Ct-Werten ($p \leq 0,05$) konnte für keines der untersuchten Gene festgestellt werden. Anzahl der Patienten $n=4$, Messwerte SIRS $n=7$, Messwerte Sepsis $n=9$, Messwerte septischer Schock $n=3$.

In der Zusammenschau der hier erhobenen Ergebnisse wurde *AKIRIN1* als endogene Kontrolle für die weiteren Expressionsanalysen ausgewählt (Siehe Kapitel 5.8.2)

6.8 QuantigenePlex

Im Rahmen der SEPTOMETER-Rekrutierung wurden für einen begrenzten Zeitraum zusätzlich zur Plasmaaufbereitung auch Granulozyten-Proben gesammelt (Siehe Kapitel 5.8.3). Sieben der in diesem Zeitraum eingeschlossenen Erkrankten waren Teil der beiden Gruppen aus Polytrauma-Fällen, in deren Plasma-Proben, im Rahmen des ersten Teils dieser Studie bereits die Konzentrationen von löslichen Immuncheckpoint-Proteinen gemessen wurden. Diese sieben Untersuchten wurden für die Analyse der Genexpression von Immuncheckpoint-Proteinen ausgewählt. Drei dieser Individuen hatten einen Übergang von SIRS hin zur Sepsis und waren folglich Teil der ursprünglichen Sepsis-Gruppe aus Kapitel 5.4. Die anderen vier waren Teil der Kontrollgruppen und zeigten für den Zeitraum der Rekrutierung das klinische Bild eines SIRS. Betrachtet man die Matches der Sepsis- und der Kontrollgruppe, so stellt man fest, dass die gematchten Kontrollen der drei Fälle aus der Sepsis-Gruppe ebenfalls im Pool der Eingeschlossenen mit verfügbaren Granulozyten-Proben waren. Für den gematchten Sepsis-Patienten zur vierten Granulozyten-Probe war eine solche nicht verfügbar.

Die gemessenen MFI-Werte in Relation zur Signalstärke von *AKIRIN1* lagen für 15 der untersuchten Gene durchweg unterhalb von *AKIRIN1*. Lediglich für *TLR-2* war die ermittelte Genexpression in beiden Gruppen höher als die von *AKIRIN1* (Median: 3,856, Standardabweichung: 0,9865).

Im ersten Schritt der Analyse wurde die Sepsis-Gruppe betrachtet. Hier wurden die Messzeitpunkte der einzelnen Untersuchten unmittelbar vor der Diagnosestellung mit den Messergebnissen der Zeitpunkte, direkt nach der Diagnosestellung verglichen. Dieser Vergleich wurde mittels des Wilcoxon-Matched-Pairs-Signed-rank Tests statistisch validiert.

In diesem Vergleich konnte für keines der 16 untersuchten Gene, welche für Immuncheckpoint-Proteine kodieren, ein signifikanter Unterschied in den MFI-Werten festgestellt werden.

Im zweiten Schritt der Auswertung wurden die MFI-Werte der einzelnen Immuncheckpoint-Proteine in der Sepsis-Gruppe mit denen der gematchten Kontroll-Patienten verglichen. Hierfür wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet.

Fünf der untersuchten Gene zeigten einen signifikanten Unterschied in den MFI-Werten zwischen den beiden Gruppen. So lag der MFI-Wert für *CD40* in der Sepsis-Gruppe im Median bei 0,1917 mit einer Spanne von [0,0716 - 0,2244]. Der MFI-Wert der Kontrollgruppe lag hingegen im Median bei 0,07525, die Spanne der Messwerte lag hier bei [0,01085 - 0,1818]. Der ermittelte p-Wert für den Unterschied zwischen den beiden Gruppen lag bei $p = 0,0005$. Für *HVEM* lagen die MFI-Werte in der Kontrollgruppe mit im Median 0,2459 (Spanne: [0,1648 – 0,3536]) höher als in der Sepsis-Gruppe. Hier lag der mediane MFI-Wert bei 0,1578 (Spanne: [0,086 – 0,2683]). Mit einem ermittelten p-Wert von $p = 0,0011$ ist dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen als signifikant anzusehen. Mit einem Median von 0,0125 (Spanne: [0,006615 – 0,02219]) lagen die MFI-Werte von *BTLA* in der Sepsis-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Median: 0,007242; Spanne [0,006250 – 0,01877]; $p = 0,0137$). Eine ähnliche Tendenz höherer MFI-Werte in der Sepsis-Gruppe als in der Kontrollgruppe zeigten sich auch für *CD86* und *CD28*. Für *CD86* lagen die MFI-Werte in der Sepsis-Gruppe im Median bei 0,004444 (Spanne: [0,002874 – 0,009249]). In der Kontrollgruppe lag der Median bei MFI = 0,003595 (Spanne: [0 – 0,006849]). Mit einem p-Wert von $p = 0,0286$ ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen als signifikant anzusehen. Auch für *CD28* war, mit einem p-Wert von $p = 0,0355$, der Unterschied zwischen der Sepsis- (Median: MFI = 0,004444; Spanne [0 – 0,007293]) und Kontrollgruppe (Median: MFI = 0,002342; Spanne [0 – 0,005398]) als signifikant zu betrachten siehe Abbildung 14.

Für die übrigen der untersuchten Gene konnten keine Gruppenunterschiede festgestellt werden.

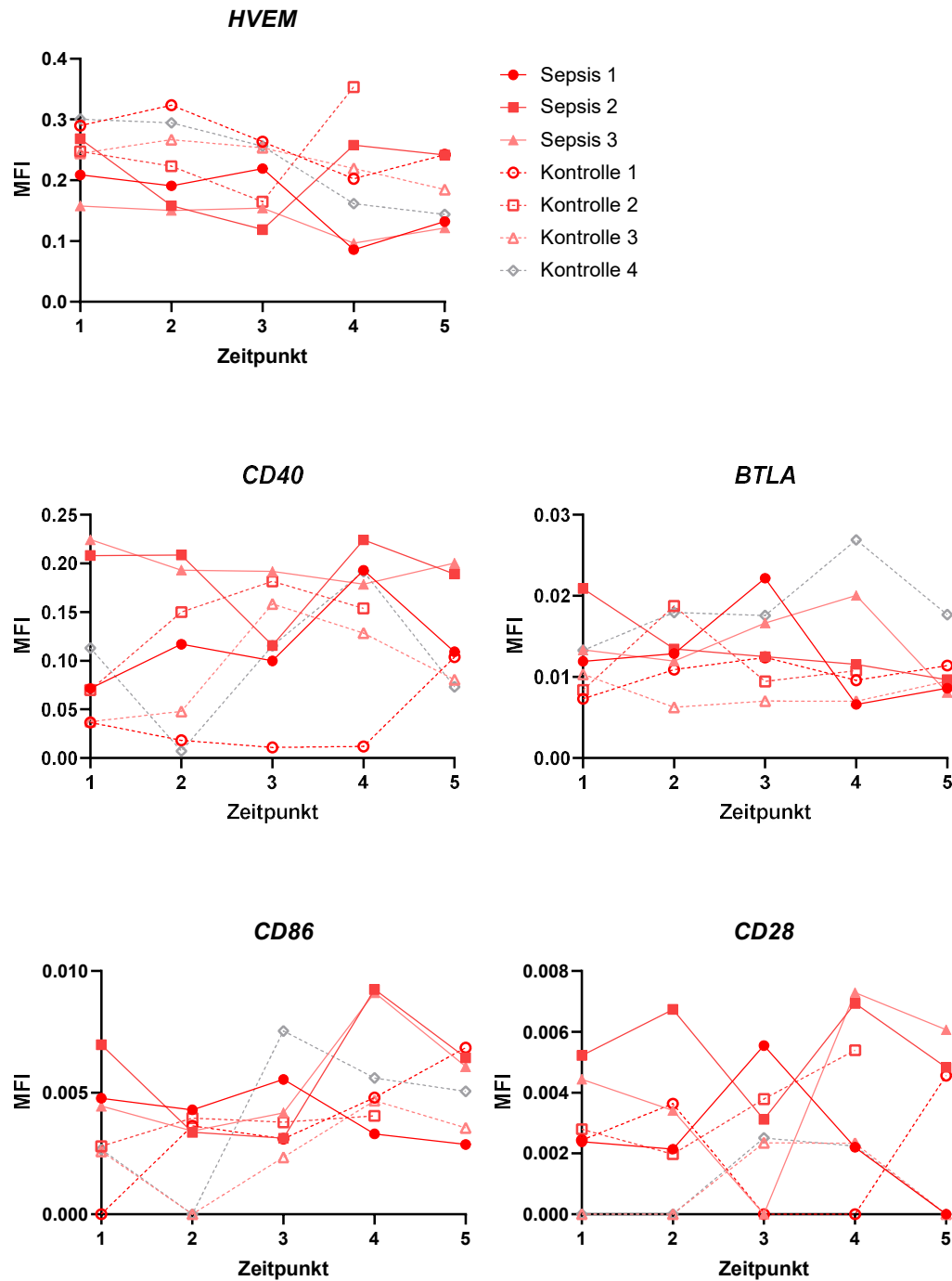


Abbildung 14: Genexpression der Immuncheckpoint-Proteine normiert für *AKIRIN1* über einen Zeitraum von 96 Stunden in Granulozyten von Sepsis-Patienten und von Patienten mit persistierendem SIRS. Die Genexpression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten, in jeweils neu gewonnenen Proben, über einen Zeitraum von 96 Stunden mittels des QuantiGene™-Plex Gene Expression Assay bestimmt und die mediane Fluoreszenzintensität auf das Referenzgen *AKIRIN1* normiert. Zwischen den einzelnen Messzeitpunkten lagen jeweils 24 Stunden, beginnend mit dem Zeitpunkt unmittelbar nach Studieneinschluss. Die Kurven mit den durchgezogenen Linien repräsentieren die Patienten mit Sepsis im Untersuchungszeitraum, die Kurven mit den gestrichelten Linien repräsentieren in gleicher Farbe jeweils einen Altersgemachten Patienten mit persistierendem SIRS. Die graue Kurve zeigt den Verlauf eines zusätzlichen Kontrollpatienten ohne zugehöriges Match in der Sepsis-Gruppe. Sepsis-Gruppe: n=3, Kontrollgruppe: n=4.

7 DISKUSSION

7.1 Studiendesign und Rekrutierung

In der Rekrutierung sollten Patientinnen und Patienten identifiziert werden, bei denen über einen Zeitraum von zwei Tagen nach der Aufnahme auf die Intensivstation ein SIRS vorlag. Zusätzlich wurden Patientinnen und Patienten eingeschlossen, bei denen eine Sepsis bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation vorlag. Dieses Vorgehen ermöglichte die Gewinnung von Proben bereits vor dem Beginn der Sepsis und die longitudinale Beobachtbarkeit der klinischen Verläufe. Vergleichbare Studien haben Patientinnen und Patienten erst eingeschlossen, nachdem eine Sepsis vorlag (Lange et al., 2017). Das Labelling der Patientinnen und Patienten hinsichtlich des Vorhandenseins einer Sepsis und deren Schweregrad erfolgte anhand der Sepsis-1/2 Definition, die sich am Vorhandensein eines SIRS orientiert (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003). Dies war zum Zeitpunkt der Studienplanung die gültige Sepsis-Definition. Auch wenn nach Sepsis-3 die Organdysfunktion in der Sepsis durch die Einführung des SOFA-Score als Diagnosekriterium mehr in den Fokus gerückt ist (Singer et al., 2016), legt die aktuelle Leitlinie der Surviving Sepsis Campaign nahe, dass die systemische Inflammation, die mittels der SIRS-Kriterien abgebildet wird, weiterhin beim Screening auf eine Sepsis verwendet werden sollte (Evans et al., 2021). Zusätzlich wurden die Labels und damit die Zuteilung der Patientinnen und Patienten in die verschiedenen Studiengruppen in dieser Studie durch die Experteneinschätzung der beiden Studienärzte und des Studienleiters retrospektiv vergeben. Dies ermöglichte die Prüfung der Diagnose auf Plausibilität und den Zugriff auf Informationen und klinische Daten, die zum Zeitpunkt der Behandlung auf der Intensivstation noch nicht vorgelegen haben.

7.2 Messung löslicher Checkpointproteine

Die initiale Idee zur Untersuchung der Rolle von Immuncheckpoint-Proteinen war es, die Plasmakonzentration von verschiedenen Immuncheckpoint-Proteinen in Patienten vor und nach dem Beginn einer einfachen Sepsis zu messen und diese miteinander zu vergleichen. Es sollte hier untersucht werden, ob es mögliche Kandidaten gibt, die sich als Biomarker zur Diagnose einer Sepsis eignen könnten (siehe Kapitel 5.4).

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten löslichen Checkpoint-Proteine in den untersuchten Plasmaproben allesamt in messbaren Konzentrationen enthalten waren. Dies gilt sowohl für die Proben aus der SEPTOMETER-Rekrutierung, als auch für die Kontrollgruppe aus gesunden Freiwilligen. Die Konzentrationsbereiche, in denen die löslichen Checkpoints gemessen wurden, variierten zum Teil deutlich um mehrere Größenordnungen zwischen den einzelnen Analyten. LAG-3 zeigte die höchste Konzentration. Diese betrug in einzelnen Proben zum Teil deutlich mehr als 100.000 pg/ml, was einem Konzentrationsbereich entspricht, in dem etablierte Entzündungsparameter, wie das CRP gemessen werden können. Im Median lag die Konzentration von LAG-3 etwa im Bereich von stark über der Norm liegenden Procalcitonin-Werten. Die geringsten Konzentrationen wurden für die Checkpoint-Proteine PD-L1, CTLA-4 und GITR gemessen. Diese lagen im Median um 100 pg/ml. In einem solchen Konzentrationsbereich wäre auch Interleukin-6 in Entzündungen nachweisbar.

Vergleicht man die Konzentrationen der löslichen Checkpoint-Proteine mit denen zirkulierender Interleukine wie IL-6 oder IL-10, so stellt man fest, dass die Konzentration der Checkpoint-Proteine im Allgemeinen als höher oder vergleichbar hoch anzusehen ist. So konnten im Rahmen dieser Arbeit die Plasmakonzentrationen verschiedener Interleukine quantitativ bestimmt werden. Für IL-6, IL-10, IL-1-RA sowie TNF-alpha lagen die medianen Messwerte im Bereich des Vielfachen von 10 – 100 pg/ml und somit im Vergleich mit den löslichen Checkpoint-Proteinen eher niedrig. Dies ist von großer Bedeutung im Hinblick auf die mögliche Nutzbarkeit der löslichen Checkpoint-Proteine als Biomarker, da aktuell im klinischen Alltag genutzte Verfahren in den hier vorhandenen Konzentrationsbereichen von Plasmaproteinen etabliert sind.

7.3 Immuncheckpoint-Proteine im longitudinalen Vergleich vor und nach der Sepsisdiagnose

Der Unterschied in der Plasmakonzentration von löslichem TIM-3 für die Zeit vor und nach der Sepsis deutet darauf hin, dass dieser als potentieller Biomarker die Sepsisdiagnose unterstützen kann. Allerdings ist das Ergebnis dieser Analyse als vorläufig anzusehen, da nach Korrektur für multiples Testen das statistische Signifikanzniveau nicht mehr erreicht wurde. TIM-3, ein Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen, gilt als inhibitorischer Immuncheckpoint, welcher beteiligt ist an der

Unterdrückung der T-Zell-vermittelten Immunantwort (Wherry and Kurachi, 2015). Auch eine Beteiligung von im Plasma gelösten TIM-3 an der Vermittlung von Sepsis-bedingter Immunsuppression wurde vereinzelt diskutiert (Ren et al., 2015). Innerhalb von 24 Stunden nach Sepsisdiagnose wiesen Ren et al. (2015) eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen verringerte TIM-3 Konzentration im Plasma nach. Der Absolutwert in der Sepsis war jedoch noch um zwei Größenordnungen höher als die hier bestimmten Werte (Ren et al., 2015). Gleichzeitig waren die von Ren et al. (2015) bestimmten TIM-3 Plasmakonzentrationen im septischen Schock höher als in der einfachen Sepsis und in der schweren Sepsis. Eine mögliche Interpretation dieser und der Daten aus dieser Dissertation könnte sein, dass Patienten mit deutlich verringertem Level an Plasma TIM-3 eine höhere Schwere der Erkrankung und ein höheres Risiko für eine Sepsis aufweisen, beides Faktoren, die wiederum mit einem Anstieg von TIM-3 assoziiert sind. Die beobachtete Tendenz zu einem Anstieg in den Kontrollpatienten (Abbildung 7), wenn auch ohne statistische Signifikanz und auf einem geringeren Level, erscheint plausibel, da sich diese von den Fällen hinsichtlich Interventionen, SOFA, ISS und aller anderen klinischen Variablen (Tabelle 8), also in der allgemeinen Erkrankungsschwere, bei Aufnahme nicht signifikant unterscheiden, aber ebenso wenig in den Zielgrößen Mortalität und Hospitalisierungsdauer.

Ähnlich zu den Ergebnissen für TIM-3 von Ren et al. (2015) fanden Lange et al. (2017), eine Zunahme der Plasmakonzentrationen des ko-inhibitorischen BTLA bei Intensivpatienten mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung bei Intensivaufnahme, namentlich von sepsisfreien Kontrollen bis hin zu Patienten mit schwerer Sepsis. Da wie diese beiden Studien (Lange et al., 2017; Ren et al., 2015) die meisten veröffentlichten Studien zu Immuncheckpoint-Proteinen in der Sepsis Gruppenvergleiche aus Querschnittstudien darstellen (zum Teil mit Nachverfolgung post Sepsisdiagnose), ist bislang unklar, ob das Biomarker-Potential dieser Proteine primär darin liegt, Immunkompetenz/Immunsuppression und somit ein niedriges/hohes Erkrankungsrisiko für eine Sepsis anzuzeigen oder ob Änderungen ihrer Level auch die frühzeitige Prognoseeinschätzung einer Sepsis unterstützen können. Weiterhin ist nicht geklärt inwieweit Checkpoint-Proteine geeignet sind, als diagnostische Laborparameter, zur Erkennung einer Sepsis beizutragen.

7.4 Hierarchisches Modell des zeitlichen Konzentrationsverlaufes

Ziel dieser Analyse war es, herauszufinden, wie sich die beiden Gruppen an Polytrauma-Fällen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Konzentration der verschiedenen Checkpoint-Proteine verhalten, und ob sich diese Verläufe in beiden Gruppen voneinander unterscheiden.

Für den Mittelwertvergleich im Zeitraum vor dem Beginn der Sepsis konnten für CD28, CD27 und CTLA-4 jeweils verschiedene zeitliche Konzentrationsverläufe festgestellt werden. Unterschiede für diese drei Checkpoint-Proteine erreichten statistische Signifikanz. Dies ist bemerkenswert, da eine potentielle Vulnerabilität der Sepsis-Gruppe bereits Stunden vor dem Onset der Sepsis messbar sein könnte.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnten signifikante Unterschiede in den Konzentrationsverläufen für BTLA, CD28, CTLA-4, PD-1, PD-L1 und CD27 gezeigt werden. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedlichen Verläufe eine Vulnerabilität für die Sepsis anzeigen. Alternativ ist auch denkbar, dass die verschiedenen Konzentrationsverläufe durch die Pathophysiologie der Sepsis ausgelöst werden.

In der Betrachtung der Gruppeneffekte mittels modellierter Intercept-Werte konnte gezeigt werden, dass für HVEM und ICOS bereits zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses eine signifikant unterschiedliche Plasmakonzentration in den beiden Gruppen gab. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde anschließend an die Modellierung, die Messung der Plasmakonzentrationen zum Einschlusszeitpunkt in den übrigen SEPTOMETER-Patienten geplant und für ausgewählte Checkpoint-Proteine durchgeführt. Die Intention hierbei war es, herauszufinden, inwieweit unterschiedliche Plasmakonzentrationen bestimmter Checkpoint-Proteine eine Sepsis vorhersagen können.

7.5 Gruppenunterschiede in der HVEM-BTLA-Achse

Im Zeitraum nach der Sepsisdiagnose waren die Plasmakonzentrationen der Checkpoint-Proteine GITR, CD27, HVEM, BTLA und ICOS in den polytraumatisierten Fällen und Kontrollen signifikant unterschiedlich. So zeigte die Sepsis-Gruppe höhere Konzentrationen an sBTLA. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von Lange et al. (Lange et al., 2017).

Die Expression von HVEM, einem Liganden von BTLA, auf bestimmten Immunzellen hat möglicherweise eine klinisch relevante Auswirkung auf die Immunkompetenz. So wurde eine Studie publiziert, in der die Expression von HVEM auf CD3+-Lymphozyten bei 31 Trauma-Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivtherapiestation gemessen wurde (Wakeley et al., 2020b). Hier zeigte sich, dass die Expression von HVEM auf diesem Zelltyp nach dem Trauma, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder sowie alters- und geschlechts-gematchten Probandinnen und Probanden, anstieg. Darüber hinaus haben die Autoren beobachtet, dass Patienten, bei denen dieser Anstieg ausgeblieben ist, anfälliger für sekundäre Infektionen im Verlauf der Behandlung waren. Dieses vermehrte Auftreten von sekundären Infektionen erklären die Autoren mit einer verlängerten Immundysfunktion, an der die Interaktion von HVEM mit seinen Liganden möglicherweise beteiligt ist (Wakeley et al., 2020b).

Ähnliche Ergebnisse konnten in der Untersuchung der Genexpression in CD15+-Granulozyten ermittelt werden. Auch hier war die Expression von HVEM der Polytrauma-Fälle mit Sepsis vermindert im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Dies ist bemerkenswert, da es sich in dieser Studie, bei den untersuchten Zellen nicht um Lymphozyten, sondern um Granulozyten gehandelt hat. Eine Hypothese der Autoren für dieses Phänomen war, dass ein Trauma eine Immunsuppression induziert, welche protektiv gegenüber einer sekundären Infektion wirkt. Fälle, in denen die Hochregulation von HVEM versagte, waren demnach vulnerabler für Lungeninfektionen (Wakeley et al., 2020b).

Interessant ist, dass HVEM, in seiner löslichen Form, in dieser Studie, ebenfalls eine verminderte Konzentration in der Sepsis-Gruppe zeigte.

Diese Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass sich die Expression von HVEM in CD15+-Granulozyten über die Konzentration von sHVEM möglicherweise abbilden kann und somit die Vulnerabilität für Infektionen und Sepsis, bei traumatisch Verletzten abschätzen lassen könnte.

In der Analyse eines größeren Studienkollektivs, welches nicht nur Polytraumatisierte Patienten einschloss, zeigt in den Untersuchungen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses höhere Plasmakonzentrationen von sHVEM in der Gruppe, welche eine Sepsis entwickelte, verglichen mit der SIRS-Gruppe oder den gesunden Kontrollen. Ebenfalls erhöhte Plasmakonzentrationen konnten für die Gruppe gezeigt werden, welche von Beginn des Beobachtungszeitraumes eine Sepsis hatten. Auch hier waren die Konzentrationen signifikant höher als in der SIRS- oder der

Kontrollgruppe. Interindividuell zeigten die einzelnen Messwerte innerhalb der verschiedenen Gruppen eine hohe Varianz auf.

Dieses Ergebnis scheint wiederum mehr im Einklang mit anderen Studien zu stehen, welche nicht primär Traumata untersucht haben (Boomer et al., 2011). Hier konnte eine gesteigerte Expression von HVEM in Lungengewebe bei Patienten und Patientinnen mit Sepsis im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diese Inkongruenz zwischen den Gruppen aus Polytraumata und dem übrigen Septometer-Kollektiv könnte sein, dass die Sepsis in Polytraumata einer anderen Pathogenese zugrunde liegt als die Sepsis, der kein Trauma voranging. Hier ist besonders auf die Rolle der Immunsuppression über die HVEM-BTLA-Achse hinzuweisen, welche in den Trauma-Gruppen einen protektiven Effekt gegenüber der Sepsis gehabt haben könnte.

Um diese Hypothese zu untersuchen und ein mechanistisches Verständnis für diesen möglichen protektiven Effekt der HVEM-BTLA-Achse zu entwickeln, könnte man in einem ersten Schritt die Lungen von nicht-überlebenden Polytrauma-Patienten untersuchen. Die Lunge bietet sich vor allem deswegen als zu untersuchendes Organ an, da sie den häufigsten Fokus für eine Sepsis nach Trauma darstellt. So könnten mittels Immunhistochemie BTLA und HVEM nachgewiesen werden und weiterführend der exprimierende Zelltyp bestimmt werden.

HVEM wird nicht nur auf T-Zellen exprimiert, sondern auch auf anderen Zelltypen des Immunsystems und anderen Geweben, wie der Milz oder dem Lungenepithel (Boomer et al., 2011; Wakeley et al., 2020a). In dieser Studie wurde die Expression von verschiedenen Genen, die für Checkpoint-Proteine kodieren, in CD15+-Granulozyten quantifiziert. Dieses Oberflächenantigen ist auf allen Granulozyten jenseits des Myeloblastenstadiums exprimiert (Velásquez et al., 2022). Hierfür wurden Granulozyten von drei Patientinnen und Patienten aus der Gruppe der Polytraumata mit Übergang zur Sepsis sowie deren gemachter Kontrollen ausgewählt. Im Falle der Kontrollgruppe konnten noch die Granulozyten eines weiteren Individuums verwendet werden. Vergleicht man nun die Expressionen der Sepsis-Gruppe mit denen der Kontrollgruppe, so stellt man fest, dass sich diese für alle untersuchten Checkpoint-Proteine signifikant unterscheiden. Im Falle von *HVEM* zeigten die Fälle aus der Sepsis-Gruppe eine geringere Expression, als die in der Kontrollgruppe.

Interessant ist, dass für die Zeitpunkte zu denen die Expression der verschiedenen Checkpoints gemessen wurden auch die Plasmakonzentrationen bestimmt wurden. Dies ermöglicht die Untersuchung hin auf eine Korrelation zwischen der Expression der Checkpoint-Proteine in Granulozyten und der Plasmakonzentration. Sollte eine solche Korrelation bestehen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass eine potentielle Quelle der löslichen Immuncheckpoint-Proteine in Granulozyten zu suchen ist.

Für *HVEM* scheint eine hohe Expression mit einer erhöhten Plasmakonzentration einherzugehen und eine niedrige Expression mit einer verminderten Plasmakonzentration vergesellschaftet zu sein.

Ähnliches lässt sich auch zu *BTLA* sagen. Hier schien eine höhere Expression in der Sepsis-Gruppe ebenfalls mit höheren Levels an sBTLA im Plasma einherzugehen.

Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Proben ist eine qualitative statistische Untersuchung auf eine mögliche Korrelation jedoch nicht sinnvoll durchführbar.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Expression von HVEM und BTLA in CD15+-Granulozyten und die Plasmakonzentration gelöster Formen der beiden Checkpoint-Proteine ist eine weitere Studie mit einer größeren Anzahl an Teilnehmenden in der Zukunft notwendig.

Für die übrigen untersuchten Checkpoints *CD40*, *CD28* und *CD86* konnten keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression auf RNA-Ebene und der Plasmakonzentration festgestellt werden. Auch hier gilt die Limitation, dass es sich bei der Untersuchung um eine sehr kleine Gruppe an untersuchten Individuen handelt.

7.6 Limitationen

Die Rekrutierung der Patientinnen und Patienten sowie das Design der SEPTOMETER-Studie erfolgte nicht mit dem Ziel, die Rolle der im Plasma gelösten Checkpoint-Proteine in der Sepsis zu untersuchen. Es handelt sich in dieser Arbeit folglich um eine Analyse einer in Teilen bereits bestehenden Studienkohorte.

Die Einordnung der Patientinnen und Patienten in die verschiedenen Studiengruppen waren letztendlich abhängig von den Expertenlabels der Studienärzte und des Studienleiters. Diese wurden mit zeitlichem Abstand zum Studieneinschluss, nach dem Ende des Beobachtungszeitraumes vergeben. Eine Folge dieses Vorgehens ist, dass den beteiligten Personen zum Teil umfassendere Informationen und Befunde zu den jeweiligen Patientinnen und Patienten vorlagen, als dies zum Zeitpunkt des

Studieneinschlusses möglich war. Die beiden Studienärzte waren im Rekrutierungszeitraum anteilig in klinischer und wissenschaftlicher Tätigkeit beschäftigt und verfügten über die Expertise der Tätigkeit auf der anästhesiologisch geführten, operativen Intensivstation. Dies ermöglichte die klinische Einschätzung der einzelnen eingeschlossenen Fälle und die Überprüfung der Labels auf Plausibilität.

Auch die Tatsache, dass nicht alle Fälle mit einem Übergang von SIRS hin zu einer einfachen Sepsis im Beobachtungszeitraum, in den Längsschnittanalysen berücksichtigt werden konnten, schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse potentiell ein. Die Berücksichtigung war aufgrund technischer Limitationen nicht möglich.

Für das Matching der Kontrollgruppe von Polytrauma-Fällen ohne Sepsis nach dem Alter war zunächst unklar, ob dieser Parameter allein zu vergleichbaren Gruppen führen würde. Die klinischen Charakteristika der beiden Gruppen legten dies jedoch in der Nachschau nahe (siehe Tabelle 8).

Die kleinen Gruppen in der Längsschnittanalyse und in der Analyse der Genexpressionen sorgten potentiell dafür, dass einzelne Individuen durch Fehlmessungen, in der späteren statistischen Auswertung, überrepräsentiert wurden. Dieser Fehler ließe sich mit einer größeren Anzahl an Mitgliedern in den einzelnen Gruppen minimieren.

Die Tatsache, dass bei der Messung der verschiedenen Analyten im Plasma stets mehrere Checkpoints bestimmt wurden, birgt das Risiko, dass aufgrund von multiplem Testen signifikante Gruppenunterschiede gefunden wurden. Dieses wurde mittels der Anwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens deutlich verringert. Hierfür wurde die Falscherkennungsrate auf 0,3 festgelegt.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Anderson, A.C., Anderson, D.E., Bregoli, L., Hastings, W.D., Kassam, N., Lei, C., Chandwaskar, R., Karman, J., Su, E.W., Hirashima, M., *et al.* (2007). Promotion of Tissue Inflammation by the Immune Receptor Tim-3 Expressed on Innate Immune Cells. *Science* 318, 1141.

Araki, K., Youngblood, B., and Ahmed, R. (2013). Programmed Cell Death 1-Directed Immunotherapy for Enhancing T-Cell Function. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 78, 239-247.

Azuma, T., Yao, S., Zhu, G., Flies, A.S., Flies, S.J., and Chen, L. (2008). B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111, 3635-3643.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57, 289-300.

Bermejo-Martin, J.F., Andaluz-Ojeda, D., Almansa, R., Gandía, F., Gómez-Herreras, J.I., Gomez-Sanchez, E., Heredia-Rodríguez, M., Eiros, J.M., Kelvin, D.J., and Tamayo, E. (2016). Defining immunological dysfunction in sepsis: A requisite tool for precision medicine. *Journal of Infection* 72, 525-536.

Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology* 10, 29-37.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655.

Bone, R.C., Grodzin, C.J., and Balk, R.A. (1997). Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112, 235-243.

Boomer, J.S., Shuherk-Shaffer, J., Hotchkiss, R.S., and Green, J.M. (2012). A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 16.

Boomer, J.S., To, K., Chang, K.C., Takasu, O., Osborne, D.F., Walton, A.H., Bricker, T.L., Jarman, S.D., Kreisel, D., Krupnick, A.S., *et al.* (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306.

Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G., and Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328, 267-270.

Brunkhorst FM, Weigand M, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weyland A, Marx G, Bucher M, *et al.* (2018). S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge. AWMF Online.

Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology* 30, 1538-1543.

Chang, K.C., Burnham, C.A., Compton, S.M., Rasche, D.P., Mazuski, R., Smcdonough, J., Unsinger, J., Korman, A.J., Green, J.M., and Hotchkiss, R.S. (2013). Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit Care* 17.

Chen, C.-w., Mittal, R., Klingensmith, N.J., Burd, E.M., Terhorst, C., Martin, G.S., Coopersmith, C.M., and Ford, M.L. (2017). Cutting Edge: 2B4-Mediated Coinhibition of CD4+ T Cells Underlies Mortality in Experimental Sepsis. *The Journal of Immunology* 199, 1961.

Chen, D., Juedes, A.E., Temann, U.-A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97.

Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* 13, 227-242.

Cheng, T. (2016). Enhanced innate inflammation induced by anti-BTLA antibody in dual insult model of hemorrhagic shock/Sepsis. *Shock (Augusta, Ga)* 45.

Collins, M., Ling, V., and Carreno, B.M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biology* 6, 223.

Coulibaly, A., Velásquez, S.Y., Sticht, C., Figueiredo, A.S., Himmelhan, B.S., Schulte, J., Sturm, T., Centner, F.-S., Schöttler, J.J., Thiel, M., *et al.* (2019). AKIRIN1: A Potential New Reference Gene in Human Natural Killer Cells and Granulocytes in Sepsis. *International journal of molecular sciences* 20, 2290.

Crawford, A., and Wherry, E.J. (2009). The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Current Opinion in Immunology* 21, 179-186.

Delano, M.J., and Ward, P.A. (2016). The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunological Reviews* 274, 330-353.

Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., *et al.* (2021). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med* 49, e1063-e1143.

Fleischmann-Struzek, C., Mellhammar, L., Rose, N., Cassini, A., Rudd, K.E., Schlattmann, P., Allegranzi, B., and Reinhart, K. (2020). Incidence and mortality of

hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Intensive care medicine* 46, 1552-1562.

Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., and Reinhart, K. (2016). Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193, 259-272.

Gold, J.A., Parsey, M., Hoshino, Y., Hoshino, S., Nolan, A., Yee, H., Tse, D.B., and Weiden, M.D. (2003). CD40 Contributes to Lethality in Acute Sepsis: In Vivo Role for CD40 in Innate Immunity. *Infection and Immunity* 71, 3521.

Gonzalez, L.C., Loyet, K.M., Calemene-Fenau, J., Chauhan, V., Wranik, B., Ouyang, W., and Eaton, D.L. (2005). A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1116.

Gotts, J.E., and Matthay, M.A. (2016). Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353, i1585.

Gu, D., Ao, X., Yang, Y., Chen, Z., and Xu, X. (2018). Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6, 132.

Guignant, C., Lepape, A., Huang, X., Kherouf, H., Denis, L., Poitevin, F., Marcus, C., Cheron, A., Allaouchiche, B., Gueyffier, F., *et al.* (2011). Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* 15.

Hotchkiss, R.S., Coopersmith, C.M., McDunn, J.E., and Ferguson, T.A. (2009). The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature Medicine* 15, 496-497.

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13.

Huang, X. (2009). PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106.

Huang, X., Chen, Y., Chung, C.-S., Yuan, Z., Monaghan, S.F., Wang, F., and Ayala, A. (2014). Identification of B7-H1 as a Novel Mediator of the Innate Immune/Proinflammatory Response as well as a Possible Myeloid Cell Prognostic Biomarker in Sepsis. *The Journal of Immunology* 192, 1091-1099.

Huang, Y.-H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A.C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S.K., Petersen, B.-S., Melum, E., Pertel, T., *et al.* (2015). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* 517, 386-390.

- Hutchins, N.A., Wang, F., Wang, Y., Chung, C.-S., and Ayala, A. (2013). Kupffer cells potentiate liver sinusoidal endothelial cell injury in sepsis by ligating programmed cell death ligand-1. *Journal of Leukocyte Biology* 94, 963-970.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Inoue, S., Bo, L., Bian, J., Unsinger, J., Chang, K., and Hotchkiss, R.S. (2011). Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis. *Shock* (Augusta, Ga) 36, 38-44.
- Jämsä, J., Syrjälä, H., Huotari, V., Savolainen, E.-R., and Ala-Kokko, T. (2017). Monocyte and lymphocyte surface molecules in severe sepsis and non-septic critically ill Patients. *APMIS* 125, 536-543.
- Kane, L.P. (2010). T Cell Ig and Mucin Domain Proteins and Immunity. *The Journal of Immunology* 184, 2743-2749.
- Kaukonen, K., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D., and Bellomo, R. (2014). Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in australia and new zealand, 2000-2012. *JAMA* 311, 1308-1316.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology* 26, 677-704.
- Lange, A., Sunden-Cullberg, J., Magnuson, A., and Hultgren, O. (2017). Soluble B and T lymphocyte attenuator correlates to disease severity in sepsis and high levels are associated with an increased risk of mortality. *PLoS One* 12.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., *et al.* (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2, 261-268.
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., and Ramsay, G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174, 561-569.
- Liu, M., Zhang, X., Chen, H., Wang, G., Zhang, J., Dong, P., Liu, Y., An, S., and Wang, L. (2017). Serum sPD-L1, Upregulated in Sepsis, May Reflect Disease Severity and Clinical Outcomes in Septic Patients. *Scandinavian Journal of Immunology* 85, 66-72.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif) 25, 402-408.

Magistrelli, G., Jeannin, P., Herbault, N., Benoit de Coignac, A., Gauchat, J.-F., Bonnefoy, J.-Y., and Delneste, Y. (1999). A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *European journal of immunology* 29, 3596-3602.

Möhnle, P., Hirschberger, S., Hinske, L.C., Briegel, J., Hübner, M., Weis, S., Dimopoulos, G., Bauer, M., Giamarellos-Bourboulis, E.J., and Kreth, S. (2018). MicroRNAs 143 and 150 in whole blood enable detection of T-cell immunoparalysis in sepsis. *Molecular Medicine* 24, 54.

Monaghan, S.F. (2016). Soluble programmed cell death receptor-1 (sPD-1): a potential biomarker with anti-inflammatory properties in human and experimental acute respiratory distress syndrome (ARDS). *J Transl Med* 14.

Monaghan, S.F., Banerjee, D., Chung, C.-S., Lomas-Neira, J., Cygan, K.J., Rhine, C.L., Fairbrother, W.G., Heffernan, D.S., Levy, M.M., Cioffi, W.G., *et al.* (2018). Changes in the process of alternative RNA splicing results in soluble B and T lymphocyte attenuator with biological and clinical implications in critical illness. *Molecular Medicine* 24, 32.

Murphy, K., and Weaver, C. (2018). Signalgebung durch Rezeptoren des Immunsystems. In Janeway Immunologie, K. Murphy, and C. Weaver, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 329-375.

Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2010). Slow Down and Survive: Enigmatic Immunoregulation by BTLA and HVEM. *Annual Review of Immunology* 28, 389-411.
Nolan, A., Weiden, M., Kelly, A., Hoshino, Y., Hoshino, S., Mehta, N., and Gold, J.A. (2008). CD40 and CD80/86 Act Synergistically to Regulate Inflammation and Mortality in Polymicrobial Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177, 301-308.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118, 240-249.

Orabona, C., Grohmann, U., Belladonna, M.L., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Bozza, S., Volpi, C., Salomon, B.L., Fioretti, M.C., *et al.* (2004). CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nature Immunology* 5, 1134-1142.

Patera, A.C., Drewry, A.M., Chang, K., Beiter, E.R., Osborne, D., and Hotchkiss, R.S. (2016). Frontline science: defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol* 100.

Patil, N., Guo, Y., Luan, L., and Sherwood, E. (2017). Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2413.

Patil, N.K., Bohannon, J.K., and Sherwood, E.R. (2016). Immunotherapy: A promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Pharmacol Res* 111, 688-702.

Ren, F., Li, J., Jiang, X., Xiao, K., Zhang, D., Zhao, Z., Ai, J., Hou, C., Jia, Y., Han, G., *et al.* (2015). Plasma soluble Tim-3 emerges as an inhibitor in sepsis: sepsis contrary to membrane Tim-3 on monocytes. *Tissue Antigens* 86, 325-332.

Roderburg, C., Benz, F., Schüller, F., Pombeiro, I., Hippe, H.-J., Frey, N., Trautwein, C., Luedde, T., Koch, A., Tacke, F., *et al.* (2016). Serum Levels of TNF Receptor Ligands Are Dysregulated in Sepsis and Predict Mortality in Critically Ill Patients. *PLOS ONE* 11, e0153765.

Rudd, K.E., Johnson, S.C., Agesa, K.M., Shackelford, K.A., Tsoi, D., Kievlan, D.R., Colombara, D.V., Ikuta, K.S., Kissoon, N., Finfer, S., *et al.* (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 395, 200-211.

Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L., *et al.* (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature Immunology* 6, 90-98.

Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., Brunkhorst, F.M., Rea, T.D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J.M., Shankar-Hari, M., Singer, M., *et al.* (2016). Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 762-774.

Shankar-Hari, M., Datta, D., Wilson, J., Assi, V., Stephen, J., Weir, C.J., Rennie, J., Antonelli, J., Bateman, A., Felton, J.M., *et al.* (2018). Early PREdiction of sepsis using leukocyte surface biomarkers: the ExPRES-sepsis cohort study. *Intensive care medicine* 44, 1836-1848.

Sharpe, A.H. (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunological Reviews* 229, 5-11.
Sherwood, E.R., and Hotchkiss, R.S. (2013). BTLA as a biomarker and mediator of sepsis-induced immunosuppression. *Critical Care* 17, 1022.

Shubin, N.J., Chung, C.S., Heffernan, D.S., Irwin, L.R., Monaghan, S.F., and Ayala, A. (2012). BTLA expression contributes to septic morbidity and mortality by inducing innate inflammatory cell dysfunction. *J Leukoc Biol* 92.

Shubin, N.J., Monaghan, S.F., Heffernan, D.S., Chung, C.S., and Ayala, A. (2013). B and T lymphocyte attenuator expression on CD4⁺ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. *Crit Care* 17.

Sierro, S., Romero, P., and Speiser, D.E. (2011). The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15, 91-101.

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., *et al.* (2016). The

Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801-810.

Song, M.Y., Park, S.H., Nam, H.J., Choi, D.H., and Sung, Y.C. (2011). Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *Journal of immunotherapy* (Hagerstown, Md : 1997) 34, 297-306.

Spec, A., Shindo, Y., Burnham, C.-A.D., Wilson, S., Ablordeppey, E.A., Beiter, E.R., Chang, K., Drewry, A.M., and Hotchkiss, R.S. (2016). T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype. *Critical Care* 20, 15.

Sugimoto, K., Galle, C., Preiser, J.C., Creteur, J., Vincent, J.L., and Pradier, O. (2003). Monocyte CD40 expression in severe sepsis. *Shock* (Augusta, Ga) 19, 24-27.
 ThermoFisherScientificInc. (2020). QuantiGene Plex Gene Expression Assay Workflow. Online: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/gene-expression-analysis-genotyping/quantigene-rna-assays/quantigene-plex-assay/quantigene-plex-assay-workflow.html> Stand: 2020-08-12.

Velásquez, S., Coulibaly, A., Sticht, C., Schulte, J., Hahn, B., Sturm, T., Schefzik, R., Thiel, M., and Lindner, H. (2022). Key Signature Genes of Early Terminal Granulocytic Differentiation Distinguish Sepsis From Systemic Inflammatory Response Syndrome on Intensive Care Unit Admission. *Frontiers in Immunology*.

Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., and Thijs, L.G. (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 medicine* 22, 707-710.

Wakeley, M.E., Gray, C.C., Monaghan, S.F., Heffernan, D.S., and Ayala, A. (2020a). Check Point Inhibitors and Their Role in Immunosuppression in Sepsis. *Crit Care Clin* 36, 69-88.

Wakeley, M.E., Shubin, N.J., Monaghan, S.F., Gray, C.C., Ayala, A., and Heffernan, D.S. (2020b). Herpes Virus Entry Mediator (HVEM): A Novel Potential Mediator of Trauma-Induced Immunosuppression. *Journal of Surgical Research* 245, 610-618.

Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nature Reviews Immunology* 11, 852-863.

Wang, F., Huang, X., Chung, C.-S., Chen, Y., Hutchins, N.A., and Ayala, A. (2016). Contribution of programmed cell death receptor (PD)-1 to Kupffer cell dysfunction in murine polymicrobial sepsis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 311, G237-G245.

Weiß, C. (2013). Lagetests. In *Basiswissen Medizinische Statistik*, C. Weiß, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 179-197.

Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15, 486-499.

- Wilson, J.K., Zhao, Y., Singer, M., Spencer, J., and Shankar-Hari, M. (2018). Lymphocyte subset expression and serum concentrations of PD-1/PD-L1 in sepsis - pilot study. *Critical Care* 22, 95.
- Yang, X., Jiang, X., Chen, G., Xiao, Y., Geng, S., Kang, C., Zhou, T., Li, Y., Guo, X., Xiao, H., *et al.* (2013). T Cell Ig Mucin-3 Promotes Homeostasis of Sepsis by Negatively Regulating the TLR Response. *The Journal of Immunology* 190, 2068-2079.
- Zhang, Y., Li, J., Lou, J., Zhou, Y., Bo, L., Zhu, J., Zhu, K., Wan, X., Cai, Z., and Deng, X. (2011). Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* 15.
- Zhang, Y., Zhou, Y., Lou, J., Li, J., Bo, L., Zhu, K., Wan, X., Deng, X., and Cai, Z. (2010). PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care* 14.
- Zhao, Y., Jia, Y., Li, C., Fang, Y., and Shao, R. (2018). The risk stratification and prognostic evaluation of soluble programmed death-1 on patients with sepsis in emergency department. *The American Journal of Emergency Medicine* 36, 43-48.
- Zhao, Z., Jiang, X., Kang, C., Xiao, Y., Hou, C., Yu, J., Wang, R., Xiao, H., Zhou, T., Wen, Z., *et al.* (2014). Blockade of the T cell immunoglobulin and mucin domain protein 3 pathway exacerbates sepsis-induced immune deviation and immunosuppression. *Clinical & Experimental Immunology* 178, 279-291.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology* 6, 1245-1252.

9 LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Schäfer, Noah
 Geburtsdatum: 04.12.1995
 Geburtsort: Büdingen

SCHULISCHER WERDEGANG

2002 – 2006 Herzbergschule, Kefenrod
 2006 – 2014 Wolfgang-Ernst-Gymnasium, Büdingen
 04.06.2014 Allgemeine Hochschulreife

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2014/2015 Beginn des Studiums der mathematischen Finanzökonomie
 an der Universität Konstanz
 08.01.2015 Exmatrikulation
 WS 2015/2016 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
 Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
 2015 – 2017 Grundstudium an der Medizinischen Fakultät Mannheim der
 Universität Heidelberg
 15.09.2017 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2017 – 2021 Hauptstudium an der Medizinischen Fakultät Mannheim der
 Universität Heidelberg
 15.04.2021 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2021 – 2022 Praktisches Jahr an den Main-Kinzig-Kliniken Gelnhausen
 und der Universitätsmedizin Mannheim
 25.05.2022 Ärztliche Prüfung
 09.06.2022 Approbation als Arzt

10 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden als Artikel in einem begutachteten Journal veröffentlicht:

Schaefer, N., Lindner, H.A., Hahn, B., Schefzik, R., Velásquez, S.Y., Schulte, J., Fuderer, T., Centner, F.-S., Schoettler, J.J., Himmelhan, B.S., *et al.* (2023). **Pneumonia in the first week after polytrauma is associated with reduced blood levels of soluble herpes virus entry mediator.** *Frontiers in Immunology* 14.

Posterbeitrag:

Noah Schäfer, Holger A. Lindner, Bianka Hahn, Roman Schefzik, Sonia Y. Velásquez, Jutta Schulte, Tanja Fuderer, Franz-Simon Centner, Jochen J. Schoettler, Bianca S. Himmelhan, Timo Sturm, Manfred Thiel, Verena Schneider-Lindner, Anna Coulibaly, 11th Sepsis Update 2023, Postersession, September 2023, Weimar
Sepsis in the first week after polytrauma is associated with reduced blood levels of soluble HVEM

11 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Holger Lindner möchte ich für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine stets wertschätzende Art danken. Ich konnte mich jederzeit auf sein konstruktives Feedback zur wissenschaftlichen Konzeption und Strukturierung dieser Arbeit verlassen.

Weiter möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Manfred Thiel bedanken. Ohne die Aufnahme der SEPTOMETER-Studie und der mir damit zur Verfügung gestellten Studienpopulation und Infrastruktur wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Einen besonderen Dank schulde ich meiner Betreuerin Fr. Dr. Anna Coulibaly, die mich hervorragend an die Arbeitsweise im Labor und die verwendeten Methoden herangeführt hat. Weiterhin habe ich von ihr sehr wertvolle Hilfestellungen beim Verfassen meiner Arbeit erhalten können.

Ohne das große Engagement von Frau PD Dr. Dr. med. Verena Schneider-Lindner wäre die statistische Auswertung meiner Daten nicht möglich gewesen. Hierfür bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet.

Frau Jutta Schulte und Frau Tanja Fuderer gilt ein besonderer Dank für die große Unterstützung bei der Aufarbeitung der SEPTOMETER-Proben und für ihre immer freundliche und humorvolle Art.

Vielen Dank an Frau Dr. Bianca Himmelhan und Frau Susanne Kleiner für die freundschaftliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und den guten wissenschaftlichen Austausch.

Für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester Mara und meinen Großeltern ganz besonders bedanken. Ich kann mich stets auf Euch verlassen. Danke auch an meine Freundin Annika, die mich durch das Studium und die Doktorarbeit begleitet hat und mich trotz meiner Eigenheiten immer wieder motivieren und auffangen konnte.