

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
in Kooperation mit der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Blockade von drei Toll-like-Rezeptoren oder einzelnen
Immuncheckpointmolekülen zur Hemmung der Hyper- bzw.
Hypoinflammation im Vollblut von Patienten <24 Stunden nach
Sepsiserstdiagnose

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Willem Buys

aus
Biberach an der Riß
2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78137

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230427-115556-1



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC BY 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. C. Kirschning
2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. St. B. Flohé

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2022

THIS WORK IS LICENSED UNDER THE CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION 4.0
INTERNATIONAL LICENSE. TO VIEW A COPY OF THIS LICENSE, VISIT
[HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY/4.0/](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	8
1.1 Epidemiologie der Sepsis	8
1.2 Pathophysiologie der Sepsis	9
1.2.1 Proinflammatorische Sepsiskomponente	10
1.2.2 Antiinflammatorische Sepsiskomponente	11
1.3 Übersicht der Sepsisdiagnostik	12
1.4 Übersicht der Sepsistherapie	13
1.5 Toll-Like-Rezeptoren	14
1.6 TLR Hemmung zur experimentellen Sepsistherapie	16
1.7 Immuncheckpoint-Rezeptoren	18
1.8 Inhibition von Checkpointmolekülen zur Sepsistherapie	20
2 HYPOTHESEN	22
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Projektkonzeption und -kooperation	23
3.2 Geräte	24
3.3 Material	25
3.3.1 Hauszubereitungen	25
3.3.2 Lösungen	26
3.3.3 Verbrauchsmaterial	27
3.3.4 Organismen	28

3.3.5	Reagenzien	28
3.3.6	Antikörper	29
3.4	Methoden	30
3.4.1	Bakterienanzucht.....	30
3.4.2	Bakterieninaktivierung	31
3.4.3	Isolation mononukleärer Blutzellen	31
3.4.4	Materialetablierung <i>in vitro</i>	32
3.4.5	Blutprobenaufbereitung	32
3.4.6	Dosisfindung einer Immunstimulation in Vollblut	33
3.4.7	Zeitkinetik der Probenverarbeitung	33
3.4.8	Inkubation von Patientenproben <i>ex vivo</i>	34
3.4.9	Beurteilung der Mikrobiologie	35
3.4.10	Experimente mit Blutproben gesunder Probanden.....	35
3.4.11	ELISA Assay zur Messung von Zytokinkonzentrationen	36
3.4.12	Luminex Assay zur Messung von Zytokinkonzentrationen	37
3.4.13	Quantifizierung von DNA	37
3.4.14	Messung des TLR2-Aktivierungspotenzials von Blutplasma	38
3.4.15	Durchflusszytometrie	38
3.5	Darstellung und statistische Analyse	39
3.5.1	Darstellung	39
3.5.2	Exploration	39
3.5.3	Zweigruppenvergleiche.....	39
3.5.4	Korrektur für Mehrfachtestung	40
3.5.5	Globale F-Statistiken	43
3.5.6	Identifikation reaktiver Einzelproben	43
3.5.7	Post-hoc Analysen.....	43

4	ERGEBNISSE	44
4.1	Etablierung eines Vollblut-Experimentalsystems zur Modellierung der Sepsis.....	44
4.1.1	Durchführbarkeit und Robustheit von Vollblutkulturen als Experimentalsystem der septischen Inflammation.....	44
4.1.2	<i>Ex vivo</i> Gabe von Katecholaminen zur Simulation der Therapie des septischen Schocks im Experimentalmodell.....	47
4.1.3	Immunstimulation menschlichen Vollbluts durch spezifische, sepsisrelevante P/DAMPs und Erkennungshemmung per TLR-Inhibition	49
4.1.4	EGA als alternativer Inhibitor der Endosomenfunktion	51
4.1.5	Immunstimulation menschlichen Vollbluts durch sepsisrelevante Bakterien und Erkennungshemmung per TLR-Inhibition.....	52
4.1.6	Immuncheckpoint-Inhibition zur Entthemung der Immunreaktion von Vollblut und Blutleukozyten	59
4.2	Charakterisierung der Patienten und Probanden.....	63
4.2.1	Demografische, klinische und labormedizinische Daten von Sepsispatienten und Probanden.....	63
4.2.2	Ergebnisse der mikrobiologischen Aufarbeitung von Patientenproben.....	66
4.3	Fortlaufende septische Inflammation <i>ex vivo</i> und Hemmung per kombinierter TLR-Inhibition	71
4.4	Septische Hypoinflammation <i>ex vivo</i>	74
4.4.1	Immuncheckpoint Inhibition zur <i>ex vivo</i> Therapie der septischen Hypoinflammation.....	76
5	DISKUSSION	84
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	91

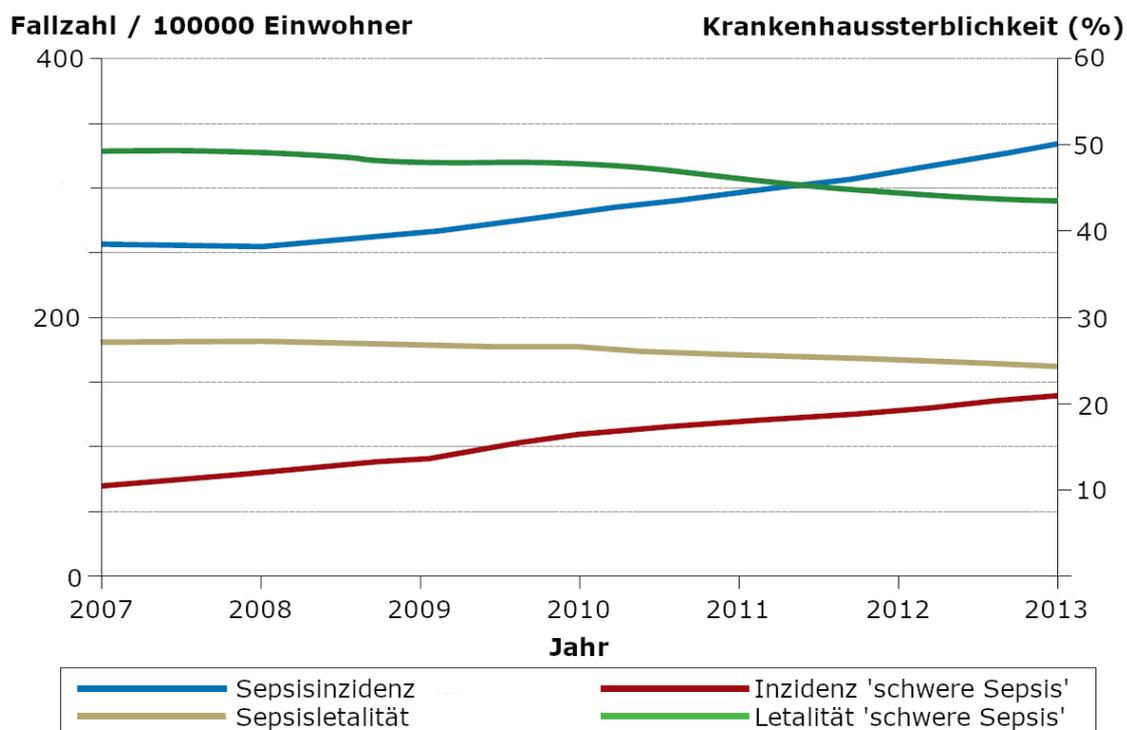
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
9	TABELLENVERZEICHNIS	106
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	107
11	DANKSAGUNG	108
12	LEBENS LAUF	109

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie der Sepsis

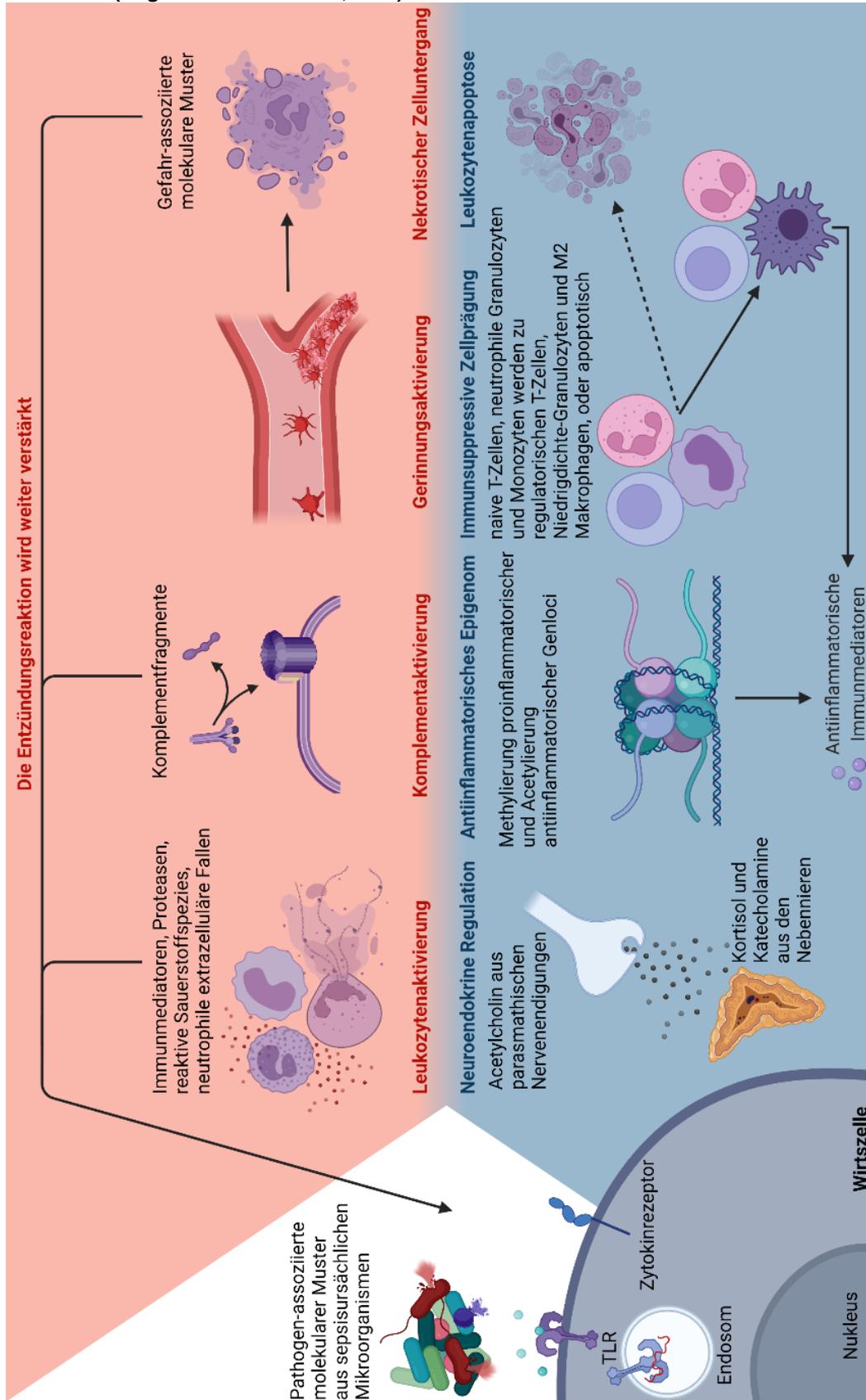
"Sepsis ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen und gehört zu den wenigen Erkrankungen, die gleichermaßen Menschen in Entwicklungsländern und in Industriestaaten heimsuchen." (Humme, 2016). Pro Jahr erkranken ca. 750000 Patienten in den USA und 280000 in Deutschland, wovon ca. 25% versterben (Angus et al., 2001; Fleischmann et al., 2016). Diese Letalität ist durch Fortschritte in der Intensivmedizin und frühe aggressive Therapie seit der Jahrtausendwende deutlich gesunken (siehe (s.) Abb. 1-1), trotzdem steigt die Zahl der Sepsis-Todesfälle weiter an, wofür vor Allem die demographische Entwicklung, Ausweitung der Hochleistungsmedizin auf extreme Patientengruppen (Fleischmann et al., 2016) und die steigende Zahl resistenter, zum Teil nosokomialer Infektionen verantwortlich sind (Bassetti and Righi, 2013; Zhao et al., 2016). Nach wie vor erfolgt die Therapie nebst Antibiotikagabe symptomatisch (Evans et al., 2021) und nicht ursachenorientiert. Da ein verlässlicher Biomarker noch nicht identifiziert wurde (Pierrakos and Vincent, 2010) und Septiden auf Basis mannigfaltiger Grunderkrankungen auftreten, gestaltet sich die Diagnostik schwierig.

Abbildung 1-1 Inzidenz und Krankenhausletalität von Sepsis und schwerer Sepsis einschließlich septischem Schock in Deutschland 2007 – 2013. Adaptiert von Grafik 1 aus (Fleischmann et al., 2016).



1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Abbildung 1-2 Zusammenfassung der Sepsispathophysiologie. TLR: Toll-like-Rezeptor. Inspiriert von Grafik 1 aus (Angus and van der Poll, 2013)



1.2.1 Proinflammatorische Sepsiskomponente

Sepsis ist „die schwerste Verlaufsform akuter Infektionen“ (Fleischmann et al., 2016). Die Pathophysiologie der Erkrankung ist ausgiebig beschrieben worden, doch wird bis heute lediglich unvollständig verstanden. Dies ist der großen Komplexität der zugrundeliegenden Mechanismen sowie der Heterogenität des Patientenkollektivs geschuldet (Riedemann et al., 2003). Das Wort „Sepsis“ entstammt dem Altgriechischen (σηψις) und steht in Homers Dichtung und Hippokrates Schriften für ‚Fäulnis‘ (Geroulanos and Douka, 2006). Bereits um das Jahr 1000 wurde die Sepsis durch Ibn Sīnā (auch bekannt als ‚Avicenna‘) mit einer Infektion des Blutes in Verbindung gebracht (Hotchkiss et al., 2016). Anfang des 20. Jahrhunderts wurde dieses Konzept als Eintrag von Bakterien in die Blutbahn formalisiert (Schottmüller, 1914), nachdem Bakterien als Krankheitserreger erkannt worden waren. Anfang der 1990er Jahre wurde gegenüber der Infektion selbst die Entzündungsreaktion des Körpers als pathogenes Element in den Vordergrund gerückt (Bone et al., 1992): Das systemische inflammatorische Response-Syndrom (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) als proinflammatorische Katastrophe galt als Essenz der Sepsispathologie mindestens bis in die Nullerjahre des neuen Jahrtausends. Gemäß dem SIRS-Konzept regen systemisch auftretende Pathogene oder deren Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) das angeborene Immunsystem zur Produktion von Signalmolekülen, wie proinflammatorischen Zytokinen, an. Effektorzellen, wie neutrophile Granulozyten, werden rekrutiert und lagern sich dem Endothel an, woraufhin sie reaktive Sauerstoffspezies, Proteasen und andere biochemische Kampfstoffe, Perforine sowie neutrophile extrazelluläre Fallen (neutrophil extracellular traps, NETs) freisetzen. In Folge der Zytokin- und Chemokinfreisetzung treten die Kardinalssymptome der Entzündung, nämlich dolor, calor, tumor, rubor, functio laesa (Übersetzung: Schmerz, Hitze, Schwellung, Rötung, Funktionsverlust; (Netea et al., 2017)) generalisiert auf, es kommt zu einer Vasodilatation und dadurch zu einem Blutdruckabfall. Zusätzlich verringert sich molekular, zum Beispiel (z.B.) durch Abbau von VE-Cadherin und Proteinen der tight junctions, sowie nekrotisch die Barrierefunktion des Endothels. Die Durchlässigkeit, besonders der fenestrierten postendothelialen Venolen (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012), steigt in Assoziation mit der Diapedese von Immunzellen, womit ein starker Flüssigkeitsverlust („capillary leak“, (Angus and van der Poll, 2013)) mit generalisierten Ödemen einhergeht.

Durch die (Kollateral)Schäden an Körpergewebe werden Gefahr-assoziierte molekulare Muster (damage / danger associated molecular patterns, DAMPs) freigesetzt, welche die Aktivierung des Immunsystems weiter antreiben. Auf Endothelschädigung hin wird das intravasale Gerinnungssystem durch den Kontakt mit extrazellulärer Matrix angeregt. Verstärkt durch von Makrophagen freigesetztes Gewebethromboplastin und eine Herabregulation der

Expression antithrombotischer Moleküle, wie Antithrombin, Thrombomodulin, und Protein C, gleichzeitige Hemmung des Plasminsystems, zum Beispiel durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI), sowie durch Thrombozyten- und Fibrinaggregation an NETs wird eine disseminierte intravasale Gerinnung (Angus and van der Poll, 2013) mit eventuell folgender Verbrauchskoagulopathie und disseminierten Blutungen ausgelöst (Simmons and Pittet, 2015).

Nach langjähriger Diskussion wird die Sepsis seit 2016 über ein Organversagen, gemessen durch den sequential / sepsis-related organ failure assesment score (SOFA-Score), in Assoziation mit einer Infektion definiert (Singer et al., 2016). Unbehandelt ist die Sepsis in der Regel tödlich. Mit jeder Stunde, um die sich die korrekte und vollständige Behandlung verzögert, steigt die Wahrscheinlichkeit zu Versterben um ca. 4 Prozentpunkte (Seymour et al., 2017). Glücklicherweise ist in den letzten Jahrzehnten die Rate der frühen Sepsistodesfälle signifikant gesunken (Zhao et al., 2016), es gelingt durch Fortschritte der Intensivmedizin die Letalität der Initialphase abzumildern, die Patienten versterben jedoch zunehmend während einer späteren Sepsisphase (Daviaud et al., 2015). Die Frage nach dem dafür verantwortlichen Pathomechanismus prägt die wissenschaftliche Diskussion der letzten 20 Jahre.

1.2.2 Antiinflammatorische Sepsiskomponente

“If the compensatory anti-inflammatory reaction is sufficiently severe, it will manifest clinically as anergy, an increased susceptibility to infection” (Übersetzung: „Wenn die kompensatorische, anti-inflammatorische Reaktion hinreichend stark ausfällt, manifestiert sie sich klinisch als Anergie, als gesteigerte Infektanfälligkeit“; (Bone, 1996)). Zum Ende des 20. Jahrhunderts entwickelte sich das Konzept des kompensatorischen anti-inflammatorischen Response-Syndroms („compensatory anti-inflammatory response syndrome“, CARS, (Bone et al., 1997)) als immunsuppressive Komponente der Sepsis (Boomer et al., 2011). Dieses äußert sich unter anderem als Anfälligkeit für Sekundärinfekte (Landelle et al., 2010) und eine bis zu einem Jahr nach Sepsiserkrankung erhöhten Mortalität im Vergleich zu kritisch kranken, nicht septischen Patienten (Prescott et al., 2016), was nicht ausreichend durch ein lange zurückliegendes Multiorganversagen im sogenannten ‚Zytokinsturm‘ („Cytokine Storm“, (Giamarellos-Bourboulis, 2013)) erklärt werden kann. Die umfassende Aufklärung der Mechanismen, die dem CARS zugrunde liegen, steht noch aus. Über einen reaktiven Vagotonus kommt es besonders in den unpaaren Bauchorganen durch eine Untergruppe Cluster of Differentiation (CD)4 positiver T-Zellen (Rosas-Ballina et al., 2011) zur Freisetzung von Acetylcholin, welches die dort ansässigen Makrophagen hemmt. Zytokine mit Schlüsselrollen in der proinflammatorischen Reaktion, wie IL-6, TNF und IL1 regen die kompensatorische Produktion antiinflammatorischer Proteine, wie IL-10, TGF β , IL1-Rezeptor Antagonist und löslicher Zytokinrezeptoren durch immunsuppressive Zelltypen wie

regulatorische T-Zellen (Luan et al., 2015), myeloid derived suppressor Zellen (MDSCs), Niedrigdichte-Neutrophile („low density neutrophils“, LDN, (Patera et al., 2016)) und M2-Makrophagen (Li et al., 2018) an. Diese Zellen exprimieren koinhibitorische Moleküle, wie programmed death Rezeptorligand 1 (PD-L1) und cytotoxic t-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4, (Hutchins et al., 2014)). Im aggressiven Milieu der generalisierten Entzündungsreaktion und unter inhibitorischer Kostimulation werden Effektorzellen apoptotisch oder nekrotisch (Boomer et al., 2011). Zellinterne Regulationsprozesse, wie Anergie, ‚cell exhaustion‘ oder LPS-Toleranz (Monneret and Venet, 2016), sowie epigenetische Regulationen der Leukozyten, beispielsweise (bspw.) durch Methylierung und folglich Inaktivierung der Promoter proinflammatorischer Gene (Biswas and Lopez-Collazo, 2009), resultieren in der Etablierung eines immunsupprimierenden extrazellulären Milieus.

1.3 Übersicht der Sepsisdiagnostik

Die Diagnose der Sepsis wird klinisch und laborchemisch multivariat gestellt, da die Präsentationen vielfältig sind. Gültige diagnostische Leitlinie ist die „Third International Consensus Definition for Sepsis and Septic Shock“ (Singer et al., 2016), diese wurde auch im Rahmen der vorliegenden Studie verwendet (s. auch Abschnitt 3.4.8). Ihr zufolge erfolgt eine Sepsisdiagnose bei Neuauftreten eines Organversagens, kennzeichnend ist ein Anstieg der Maßzahl zur Beurteilung des Organversagens bei Sepsis (sequential / sepsis-related organ failure assessment (SOFA) score, s. Tab. 1-1) um 2 Punkte oder mehr innerhalb von 24 h, bei gesicherter oder bei Verdacht auf eine Infektion.

Tabelle 1-1 Berechnung des SOFA-Scores: Addition des jeweils höchsten zutreffenden Punktwertes (Spalten) pro Organsystem (Zeilen der ersten Spalte). P_{aO_2} : Arterieller Sauerstoffpartialdruck. F_{IO_2} : Sauerstofffraktion des Einatemgases. Nach Tabelle 1 aus (Singer et al., 2016), dort adaptiert von (Vincent et al., 1996).

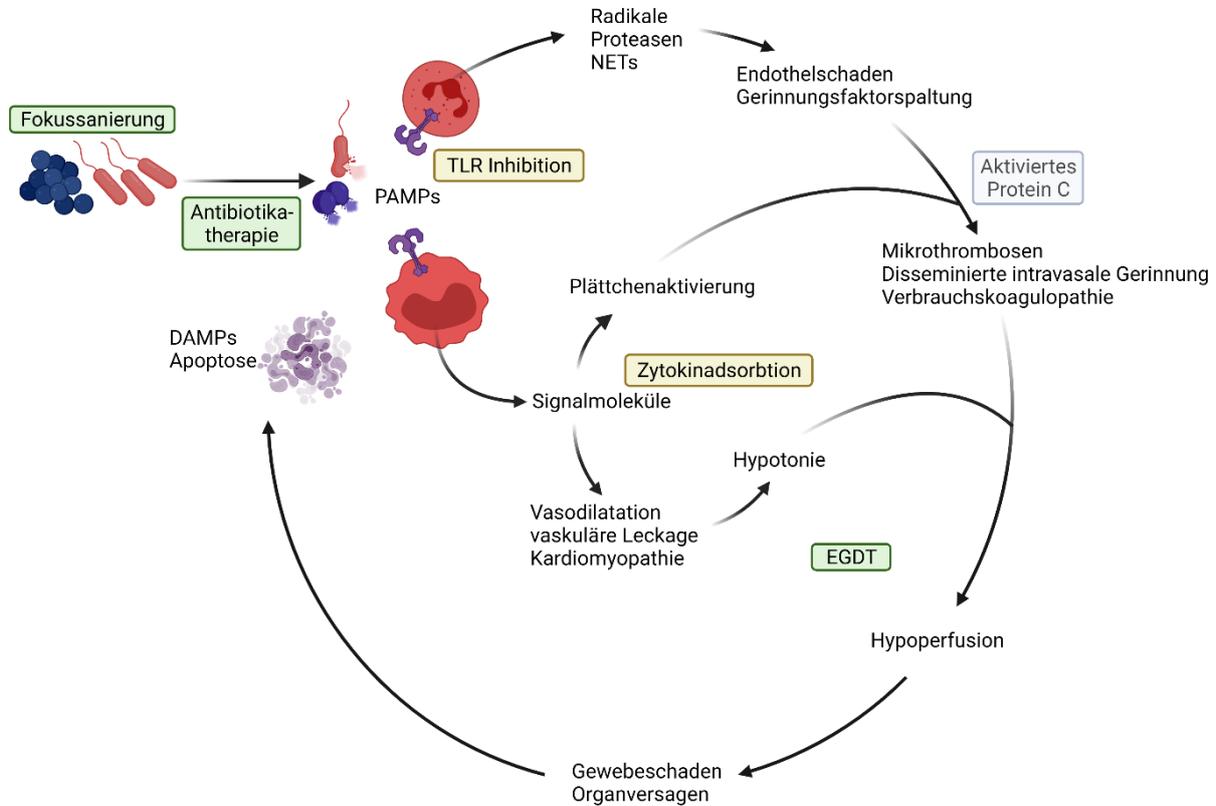
Organsystem / Punkte	0	1	2	3	4
Atmung: P_{aO_2} / F_{IO_2} [mmHG]	≥400	<400	<300	<200, Beatmung	<100, Beatmung
Gerinnung: Plättchen [nl^{-1}]	≥150	<150	<100	<50	<20
Leber: Serumbilirubin [mg/dl]	<1.2	<2	<6	<12	≥12
Herz-Kreislauf: Arterieller Mitteldruck [mmHg] oder infundierte Katecholamindosis in [$\mu g/kg$ Körpergewicht /min]	≥70	<70	Jede Katecholamin- Behandlung	Dopamin >5; jede Adrenalin- / Noradrenalingabe	Dopamin >15; Adrenalin- / Noradrenalin >0.1
Zentralnervensystem: Glasgow-Coma-Scale	15	<14	<12	<10	<6
Niere: Serumkreatinin [mg/dl] oder Urinausscheidung [ml/d]	<1.2	<2	<3.5	<5	≥5
				<500	<200

„Many biomarkers have been evaluated for use in sepsis. [...] None has sufficient specificity or sensitivity to be routinely employed in clinical practice.“ (Übersetzung: „Viele Biomarker wurden bzgl. ihrer Nutzung in der Sepsis evaluiert. [...] Keiner hatte eine hinreichende Sensitivität oder Spezifität für den klinischen Routineeinsatz“; (Pierrakos and Vincent, 2010)). Die Sepsis bleibt daher, wie oben beschrieben, in erster Linie eine klinische Diagnose (Seymour et al., 2016), auch wenn die Diagnostik durch die Bestimmung bspw. von Leukozytenzahl, reaktiver Linksverschiebung und toxischer Granulation der Leukozyten, sowie der Konzentration von Akut-Phase-Proteinen, wie C-reaktivem Protein, Procalcitonin, selten IL-6 und Ferritin (Kyriazopoulou et al., 2017) ergänzt wird. Zur Definition des septischen Schocks werden darüber hinaus Blutdruck und Laktatkonzentration als Indikatoren einer Sauerstoffunterversorgung von Geweben herangezogen (Angus and van der Poll, 2013; Singer et al., 2016).

1.4 Übersicht der Sepsistherapie

Die Initialtherapie der Sepsis wird als ‚frühe zielgerichtete Therapie‘ („early goal-directed therapy“, EGDT; (Evans et al., 2021)) zusammengefasst. Diese beinhaltet lebenserhaltende Intensivmaßnahmen, wie erhöhte Flüssigkeitsgabe und Vasopressoreinsatz, Beatmung, Sicherung der Ernährung, Überwachung des Elektrolyt- und Säure-Basenhaushalts und, falls identifiziert und möglich, Sanierung des infektiösen Fokus. Durch Etablierung eines einheitlichen Behandlungsprotokolls wurde die Mortalität signifikant gesenkt (Levy et al., 2010). Obwohl viel Hoffnung in immunhemmende Therapien, zum Beispiel die Blockade einzelner Zytokinrezeptoren (Fisher et al., 1994) oder die Reduktion zirkulierender Zytokine (Abraham et al., 1998) oder PAMPs (Angus et al., 2000) z.B. durch neutralisierende monoklonale Antikörper (monoclonal antibody, mAb, (Opal et al., 2013)), oder lösliche Rezeptoren (Abraham et al., 2001) investiert wurde, kann bisher keiner dieser Therapieansätze eine signifikante Mortalitätsreduktion proklamieren (Russell, 2006).

Abbildung 1-3 Pathophysiologie des systemischen inflammatorischen Response-Syndroms bei Sepsis und therapeutische Ansätze: Grün: Etablierte Behandlung; Gelb: Experimentelle Behandlung; Grau: Ehemals etablierte, wieder verlassene Therapieansätze. PAMPs: ‚pathogen-associated molecular patterns‘, Pathogen-assoziierte molekulare Muster. TLR: Toll-like Rezeptoren. NETs: ‚Neutrophil extracellular traps‘, Neutrophile extrazelluläre Fallen. EGDT: ‚early goal-directed therapy‘, frühe zielgerichtete Therapie. DAMPs: ‚Danger-associated molecular patterns‘, Gefahr-assoziierte molekulare Muster.



Bestrebungen, das Eintreten eines CARS zu verhindern, zu revidieren, oder zu hemmen, werden zur Zeit zahlreich betrieben (Hutchins et al., 2014; Ward and Fattahi, 2016), doch hat sich bisher keine diesbezügliche Therapie etabliert (Evans et al., 2021).

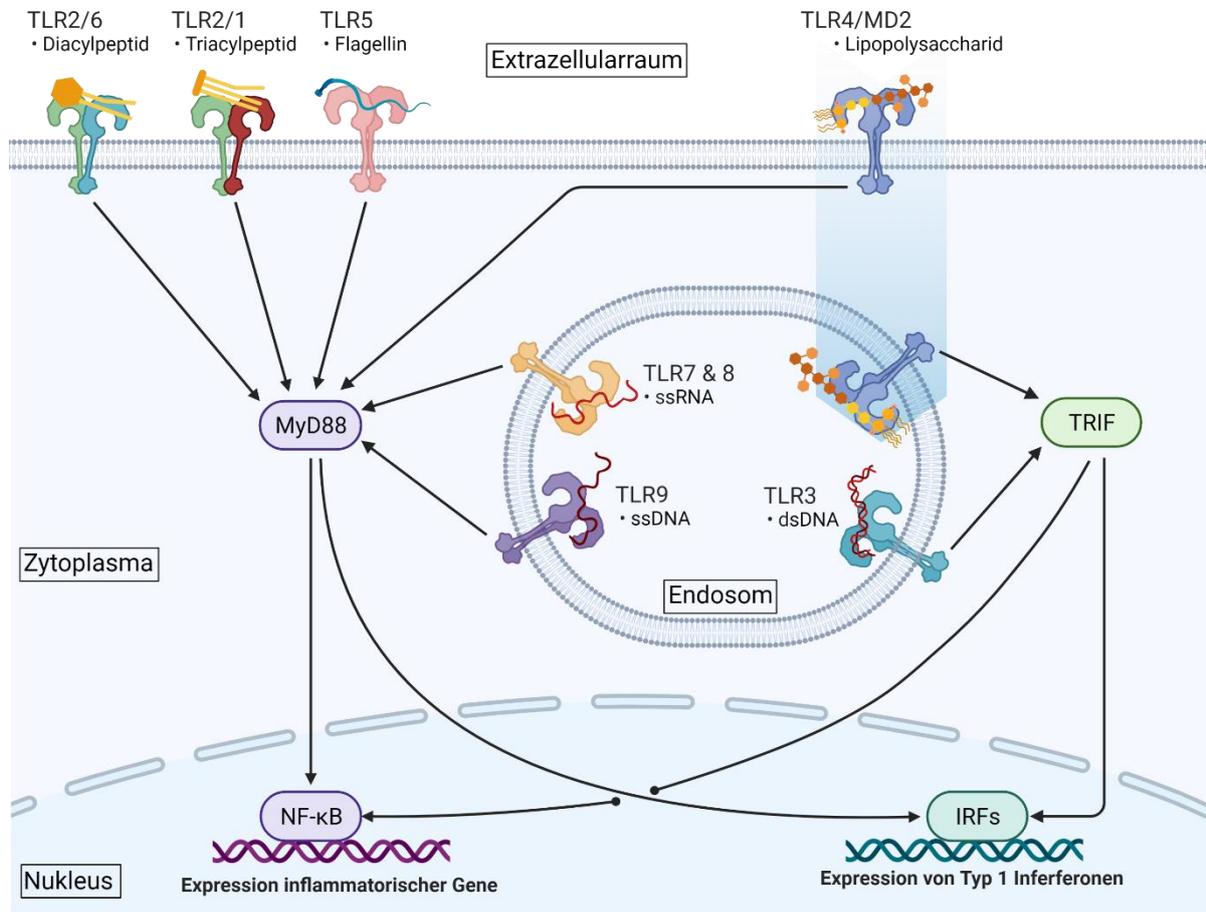
1.5 Toll-Like-Rezeptoren

Die sogenannten ‚Toll-Like-Rezeptoren‘ (TLR) sind nach dem Toll-Protein bei der Taufliegenart *Drosophila melanogaster* benannt. Toll wurde zunächst als maßgeblich für die dorsoventrale Polarisierung während der Embryonalentwicklung impliziert (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984). Später wurde eine Rolle von Toll in der Immunreaktion der Fliegen beobachtet (Reichhart et al., 1993), welche sich als erhöhte Anfälligkeit für Pilzinfektionen von adulten, Toll-defizienten Tieren zeigt (Lemaitre et al., 1996). Die von Toll aktivierte Signalkaskade weist große Ähnlichkeiten zur Kaskade der Interleukin-1 Rezeptorsignaltransduktion auf: Beide verlaufen über die Dissoziation von nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (nf-κB) von seinem Inhibitor (IκB), woraufhin eine Vielzahl inflammatorischer Gene aktiviert wird. Die intrazelluläre Domäne von Toll ähnelt erheblich (45%) der intrazellulären Domäne des IL-1 Rezeptors (Gay and Keith, 1991) und

auch nachgeschaltete Proteine sind zum Teil sequenzhomolog (Reichhart et al., 1993). Die extrazelluläre Domäne von Toll enthält zahlreiche leucinreiche Wiederholungen ('leucine-rich-repeats' (Hashimoto et al., 1988)), diese hat sie unter anderem mit dem CD14 Rezeptor (Ferrero et al., 1990; Lee et al., 1993) gemein, der unter anderem Lipopolysaccharid bindet. Später wurde eine Klasse von mit Toll strukturell eng verwandten Rezeptoren auf Säugetierzellen identifiziert (Mitcham et al., 1996); diese wurden Toll-Like-Rezeptoren (TLR) genannt. Gegen Ende des letzten Jahrtausends wurden unabhängig voneinander TLR2 (Kirschning et al., 1998; Yang et al., 1998) und -4 (Poltorak et al., 1998) als LPS-Rezeptoren erkannt und dem angeborenen Immunsystems zugeordnet. Nach der Aufklärung der Funktion von TLR2 und -4 wurden im Menschen acht weitere TLR und ihre Liganden identifiziert. TLR1, -2, -4, -5, -6 und -10 befinden sich in der Zellmembran. TLR2 heterodimerisiert mit TLR1 oder -6, TLR4 bildet als Homodimer einen Komplex mit CD14 und Lymphozytenantigen 96 (MD-2), TLR5 bildet ein Homodimer, TLR10 gehört strukturell zur selben Subgruppe, wie TLR1, -2 und -6 (Oliveira-Nascimento et al., 2012), ihm wird eine anti-inflammatorische Rolle zugeschrieben (Cavaillon and Giamarellos-Bourboulis, 2019). TLR2-TLR1/6 Komplexe binden Lipoproteine, Glykoproteine, Proteine und Glykolipide, TLR4 bindet mikrobielle Poly- und Lipopolysaccharide (LPS), TLR5 bindet bakterielles Flagellin.

Die endosomalen TLR3, -7, -8 und -9 erkennen Nukleinsäuren. TLR9 wird von Doppelstrang-DNA, TLR3 von Doppelstrang RNA und TLR7 sowie -8 von Einzelstrang-RNA aktiviert. Die Signalweiterleitung erfolgt über eine Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne, an die das myeloid-primary-response-88 (MyD88) Protein bindet. Die Signalweiterleitung von TLR5 erfolgt zusätzlich über MyD88-adapter-like (MAL), von TLR4 zusätzlich über das TIR-domain-containing-adapter-inducing-interferon- β (TRIF) und TRIF-related-adapter-molecule (TRAM). Das TLR3 Signal wird exklusiv über TRIF transduziert. Diese Adapter rekrutieren Interleukin 1 Rezeptor Kinasen (IRAKs), woraufhin der Komplex die mitogen-activated-protein-Kinase-Kinase (MAPKK), signal-transducer-and-activator-of-transcription (STATs) und interferon-responsive-factors (IRFs) phosphoryliert und aktiviert, sowie die I κ B-Kinase aktiviert, welche I κ B phosphoryliert, das daraufhin von NF- κ B dissoziiert (s. auch Abb. 1-4). Die aktivierten Transkriptionsfaktoren aktivieren inflammatorische Gene.

Abbildung 1-4 Übersicht der humanen Toll-like-Rezeptoren mit zugehörigen Liganden und Signalwegen: TLR: Toll-like Rezeptor. MD2: Myeloid differentiation protein 2. NF- κ B: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells. MyD88: Myeloid differentiation primary response 88. TRIF: Toll-interleukin 1 receptor domain containing adapter-inducing interferon- β . IRF: Interferon regulatory factor; ss: ‚single strand‘, Einzelstrang. ds: Doppelstrang. Inspiriert von (Kawai and Akira, 2010).



1.6 TLR-Hemmung zur experimentellen Sepsistherapie

Die TLR nehmen, da ihre Rolle in der Sepsispathologie besonders zentral zu sein scheint, eine prominente Stellung unter den Mustererkennungsrezeptoren ein. Wie bereits an anderer Stelle (s. Abschnitt 1.4) ausgeführt, wurden verschiedene Hemmstoffe von TLR4 und immunologisch verwandte Ansätze klinisch propagiert, haben sich jedoch nicht zur Sepsisbehandlung etabliert. Die meisten Toll-like-Rezeptoren jedoch wurden nicht auf ihr klinisches Potenzial hin untersucht (Russell, 2006). Insbesondere eine kombinierte Toll-like-Rezeptor Blockade wurde trotz Konvergenz der Signalwege einzelner TLRs klinisch noch nicht evaluiert.

TLR sind konstitutiv exprimiert und spielen eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Sie werden zu einem frühen Zeitpunkt im Krankheitsgeschehen aktiviert, weshalb konzeptionell ihre frühe Hemmung zur Verhinderung des Auslösens der Signalkaskade erfolgen sollte. Dieses Zeitfenster wurde durch die Arbeitsgruppe Kirschning in einem Mausmodell untersucht. Durch TLR-Blockade und synchrone Antibiotikatherapie

überleben bei einem Therapiebeginn bis vier Stunden nach bakterieller, peritonealer Infektion ca. 80% der Mäuse (Spiller et al., 2008), welche ohne TLR-Inhibition trotz Antibiotikatherapie versterben. In dieser vorangegangenen Arbeit wurden Antikörper verwendet, die TLR2 und -4 blockieren. Neben TLR2 und -4 nimmt TLR13 bei der Maus (Oldenburg et al., 2012) eine zentrale Rolle als Treiber der Sepsispathologie gegenüber Gram-positiven und -negativen Bakterien, dem Hauptauslöser der Sepsis, ein. Menschen verfügen nicht über TLR13, jedoch den unspezifischeren TLR8 als funktionelles Analogon zur Erkennung einzelsträngiger RNA. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluation, ob im humanen Vollblutmodell eine kombinierte Blockade von TLR2, -4, sowie -8 in der Frühphase der Sepsis eine putative Hyperinflammation mindert. Endosomale TLR wie TLR8 sind einer Antikörper-Therapie jedoch nicht zugänglich. Da auch TLR2 und -4 in den Endosomen exprimiert werden, möglicherweise sogar in größerer Zahl, als an der Zelloberfläche (Hornef et al., 2002; Meng et al., 2004), bietet sich jedoch eine Hemmung der Endosomenfunktion zur TLR-Hemmung an, bspw. durch Chloroquin (CQ).

Membranassoziierte Endosomen weisen einen weitgehend extrazellulären pH-Wert von ca. 7,4 auf. Während diese als primäre Endosomen ins Zellinnere translozieren, transportiert die vesikuläre H⁺-ATPase Protonen vom Zytoplasma ins Endosom, wodurch der pH auf ca. 6,2 fällt. Nach der Fusion mit einem primären Lysosom zum Endolysosom sinkt der pH weiter auf ca. 5,5. Dies aktiviert zahlreiche Proteasen und andere lysosomale Enzyme, die den Inhalt der Endosomen degradieren. Die Phagozytose von Pathogenen mündet hier in eine intrazelluläre Abtötung der Erreger (Klinke et al., 2010). Phagozytierte Pathogene werden lysiert und ihr Inhalt, spezifische PAMPs, wie z.B. Nukleinsäuren, wird freigesetzt und aktiviert die endosomalen TLR3, -7, -8 und -9.

Chloroquin wird seit acht Jahrzehnten als Medikament zur Malariaphylaxe und -behandlung genutzt, es hebt den sauren pH-Wert der Verdauungsvakuole des Malariaparasiten an, was dessen Nahrungsaufnahme stört (Homewood et al., 1972). In Wirtszellen überwindet CQ als lipophiles Molekül in seiner deprotonierten Form Plasmamembranen und reichert sich als schwache Base in sauren Organellen an ('Ion-Trapping'), wodurch deren pH steigt (Jacquin et al., 2017). Zudem gibt es Hinweise für einen endosomalen Eflux des protonierten Chloroquin, wodurch dieses als H⁺-Shuttle die Ansäuerung der Endosomen verhindert (Ohkuma and Poole, 1978). Hierdurch wird u.a. die Funktion der endosomalen TLRs gehemmt, da diese pH-abhängig ist (Kindrachuk et al., 2007). Womöglich bindet CQ darüber hinaus direkt an DNA und RNA und maskiert deren Bindungsstellen für TLR (Kužnik et al., 2011) sowie vice-versa durch eine CQ Bindung an TLR9 (Yasuda et al., 2008). CQ hat sich als Hemmstoff der endosomalen Mustererkennung durch TLR etabliert. Neben seiner Anwendung gegen Malaria wird es bereits in der Rheumatologie zur Immunschwächung eingesetzt (Clancy et al., 2016). Nebenwirkungsprofil und Dosierung sind wohlbekannt (Jaeger and Flesch, 1994). Das

Potenzial einer so gearteten Intervention für die Sepsistherapie zu evaluieren, ist ein Ziel dieses Projekts.

1.7 Immuncheckpoint-Rezeptoren

Antigenpräsentierende Zellen (APCs) kommunizieren mit Effektorzellen über die sogenannte immunologische Synapse, deren zentrales Element der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) der APC bildet, auf dem der Effektorzelle ein Antigen präsentiert wird. Bindet auch der B-Zell- oder T-Zellrezeptor der Effektorzelle an das im MHC präsentierte Antigen, so aktiviert dies die Effektorzelle. Neben dem umgebenden Zytokin- und Chemokinmilieu wird die Aktivierung durch kostimulatorische und -inhibitorische Liganden-Rezeptor-Paare auf APC und Effektorzelle intensiv modifiziert, und so die Immunzellaktivität zwischen maximaler Antwort gegen Pathogene und minimaler Schädigung körpereigener Gewebe balanciert. So kommt es bspw. nur nach dem Empfang eines zweiten Signals, dem Kontakt von CD28 und B-7 (-1/2), zu einer T-Zell Aktivierung und Proliferation (Borriello et al., 1997; Linsley et al., 1991; Martin et al., 1986). Dazu gegensätzlich wird die Effektorzellaktivierung durch s.g. Immuncheckpoint-Moleküle gehemmt. Zu diesen gehören unter Anderen das cytotoxic T-lymphocyte associated protein (CTLA-) 4 und die programmed death receptor / ligand 1 Achse.

CTLA-4 bindet die essenziellen, aktivierenden Korezeptoren auf der APC, nämlich B7-1/2, mit höherer Affinität als CD28 (Linsley et al., 1994). Auf T-Zellstimulation wird CTLA-4 durch die Fusion von Speichervesikeln mit der Membran proportional zur Stärke des Stimulus vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert (Brunet et al., 1987; Egen and Allison, 2002), woraufhin B7-1/2 dieses bindet und nicht mehr zur Vermittlung eines Kostimulus per CD28-Bindung zur Verfügung steht. Zudem wird über eine Rolle von CTLA4 in der Prägung regulatorischer T-Zellen, sowie über eine Signalübertragung in Richtung der APC durch die B-7-1/2 Bindung an CTLA4, statt an CD28 spekuliert (Grohmann et al., 2002; Wing et al., 2008).

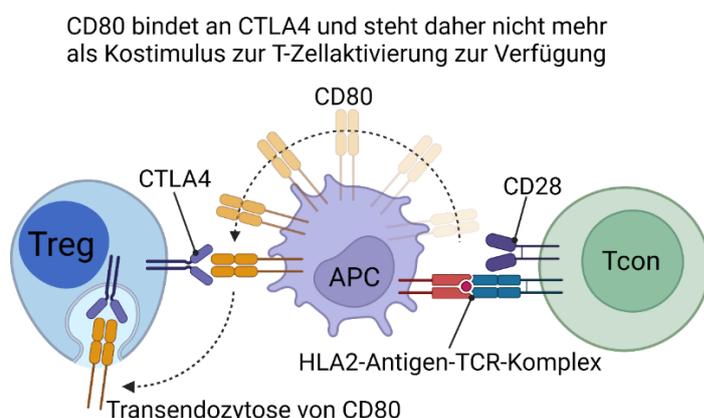


Abbildung 1-5 Hemmung der T-Zell-Kostimulation durch CTLA4: Tcon: Konventionelle T-Zelle. Treg: Regulatorische T-Zelle. APC: Antigenpräsentierende Zelle. HLA2: Humanes Leukozytenantigen (\triangleq MHC) 2. TCR: T-Zell-Rezeptor. Inspiriert von (Rowshanravan et al., 2018).

Eine CTLA4 Defizienz verdeutlicht die Wichtigkeit dieser immunologischen Fangleine (Waterhouse et al., 1995): Betroffenen Mäuse sterben binnen weniger Tage an einem Autoimmunsyndrom mit übermäßiger T-Zellproliferation. Unter einem therapeutisch-onkologischen Gesichtspunkt ist eine Verstärkung einer Immunantwort, in diesem Fall gegen Tumorgewebe, erwünscht, weshalb eine CTLA-4 Blockade regelmäßig eine wirksame Tumorthherapie darstellt, welche bereits im Jahr 2000 zugelassen wurde und sich klinisch etablierte (Leach et al., 1996; Ribas and Wolchok, 2018).

Ursprünglich wurde der programmed death receptor (PD-) 1 als Taktgeber der Lymphozytenapoptose impliziert (Ishida et al., 1992). Die PD-1 - PD-ligand (PD-L) 1 Interaktion stellte sich jedoch nachfolgend als Rheostat der peripheren Autotoleranz heraus. PD-L1 wird auf zahlreichen Geweben exprimiert, insbesondere, wenn diese Gewebe lymphatisch infiltriert oder sogar angegriffen werden. Diese periphere PD-L1 Expression vermittelt eine Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Gewebe (Keir et al., 2006).

Die intrazelluläre Signalkaskade des T-Zellrezeptors und seiner Kostimulation hin zur Zellaktivierung verläuft über die kaskadenartige Phosphorylierung intrazellulärer Proteine. Bei Bindung des MHC-Komplexes an den T-Zellrezeptor und Bindung des Korezeptors CD4 oder CD8 phosphoryliert die mit der intrazellulären Domäne von CD4 oder CD8 assoziierte lymphozytenspezifische Protein-Tyrosin Kinase (Lck) die intrazellulären Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotiv-(ITAM)-Domänen des CD3 Komplexes. Dort bindet die Zeta-chain assoziierte Protein Kinase 70 (ZAP70) und phosphoryliert daraufhin den Linker zur Aktivierung von T-Zellen (LAT) und das lymphozytenzytosolische Protein 2 (LCP2). Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase C- γ , welche die Transkriptionsfaktoren nuclear factor of activated T-cells (NFAT), Aktivator Protein (AP) 1 und den $\text{nf-}\kappa\text{B}$ aktiviert, was eine T-Zellaktivierung auslöst.

Wenn PD-1 einen seiner Liganden bindet, autophosphoryliert der Rezeptor Thyrosinreste in seiner intrazellulären Domäne. An diese bindet die Tyrosine-protein phosphatase non-Rezeptor Typ 11 (SHP1) und zu geringerem Anteil die Typ 6 (SHP2). Die SHPs dephosphorylieren die Proteine der Aktivierungskaskade unterhalb des T-Zellrezeptors, insbesondere ZAP70, und wirken somit einer Zellaktivierung entgegen (Okazaki et al., 2013). Das gilt insbesondere, wenn sich PD-1 bei Bindung seines Liganden und darauffolgender intrazellulärer Bindung von SHPs in räumlicher Nähe zur immunologischen Synapse (und damit zur aktivierenden Signalkaskade) befindet. Bei einer Immunzellaktivierung wird PD-1 vermehrt exprimiert (Agata et al., 1996; Nishimura et al., 1996) und innerhalb der Zellmembran an der immunologischen Synapse konzentriert (Pentcheva-Hoang et al., 2007). Eine PD-1 oder PD-L1 Defizienz korreliert mit einem weniger fulminanten Phänotyp als das Fehlen von CTLA-4, doch äußert sich ebenfalls in einer erhöhten Neigung zu Autoimmunerscheinungen (Keir et al., 2006; Nishimura et al., 1999), wobei tödliche Verläufe untypisch sind. Das spiegelt

sich in milderer immunvermittelter Nebenwirkungen (immune related side effects, IRAE) bei der PD-1 Blockade im Menschen im Vergleich zur CTLA-4 Blockade wider (Ribas and Wolchok, 2018). Eine direkte Korrelation des immunsuppressiven Interleukin 10 und der PD-1 Expression und eine Induktion des regulatorischen T-Zell-Phänotyps durch die PD-1 Achse wurden beschrieben (Francisco et al., 2009; Said et al., 2010). Non-kanonische Ligand-Rezeptor-Bindungspaare, wie PD-L1 und CD80 (Butte et al., 2007) oder eine Signalübermittlung über die PD-1-Achse in Richtung APC (Yu et al., 2009) werden bislang lediglich anekdotisch impliziert. Da PD-1 und -L1 auch von der Makrophagen-Familie und PD-L1 auch von Granulozyten exprimiert wird, ist deren Wirksamkeit auf myeloide Zellen denkbar (Bankey et al., 2010; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2010).

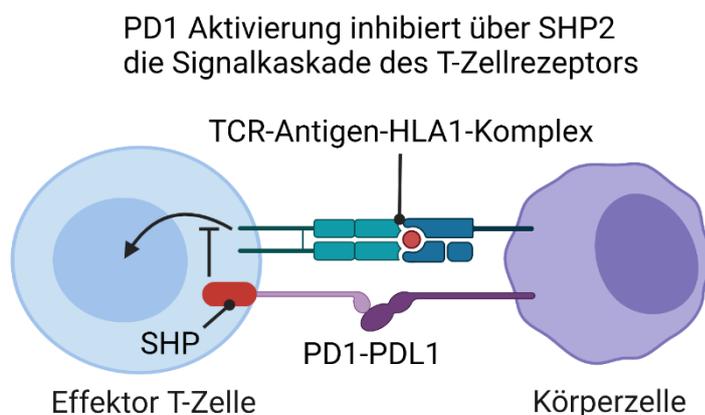


Abbildung 1-6 Mechanismus der Immunhemmung durch die PD1/L1 Achse: PD1: Programmed death Rezeptor 1. PDL1: Programmed death Rezeptor 1 Ligand 1. HLA1: Humanes Leukozytenantigen 1. TCR: T-Zell-Rezeptor. SHP: ‚Src Homologieregion 2 Domäne-enthaltende Phosphatase‘, auch Tyrosine-protein phosphatase non Rezeptor. Inspiriert von (Okazaki et al., 2013).

1.8 Inhibition von Checkpointmolekülen zur Sepsistherapie

“This year marks a turning point in cancer, as long-sought efforts to unleash the immune system against tumors are paying off—even if the future remains a question.” (Übersetzung: „Dieses Jahr markiert einen Wendepunkt der Onkologie, da sich der lange betriebene Aufwand, das Immunsystem gegen Tumore zu entfesseln, auszahlt – auch wenn die zukünftige Entwicklung noch offen bleibt“; (Couzin-Frankel, 2013)). Diese Aussage markiert den ‚Durchbruch des Jahres 2013‘ des Science Magazine; zwar führt eine Immuncheckpointinhibition (ICI) nur bei ca. 20% der Tumorpatienten zu einem Regress der Erkrankung, dieser ist jedoch typischerweise deutlich und langanhaltend (Ribas and Wolchok, 2018). Das offensichtlich erfolgreich anwendbare Konzept, per ICI ein supprimiertes Immunsystem zu entfesseln, lässt sich womöglich auf Krankheitsbilder jenseits der Onkologie, bspw. auf die septische Immunparalyse erweitern. So wurde z.B. murin *in vivo* über ein verbessertes Sepsisüberleben, erhöhte proinflammatorische Zytokinkonzentrationen, verminderte Lymphozytenapoptose und eine verbesserte Bakterienelemination

(Brahmamdham et al., 2010; Huang et al., 2009), sowie in humanen Proben *ex vivo* über erhöhte monozytäre und neutrophile Phagozytoseleistung (Patera et al., 2016) auf ICI Applikation hin berichtet. Die Ergebnisse klinischer Studien werden gespannt erwartet (Hotchkiss et al., 2019). Durch die vorliegende Studie hoffe ich, offene translationale Fragen auf dem Weg zu einer Sepsistherapie durch ICI zu klären.

2 HYPOTHESEN

1. In der frühen Sepsis entnommenes Vollblut zeigt eine *ex vivo* andauernde Entzündungsaktivität. Diese ist von der fortlaufenden TLR2, -4 und -8 Stimulation durch im Blut enthaltene P/DAMPs abhängig.
2. Bereits die Hyperinflammation der frühen Sepsis wird von einer Immunhyporeaktivität begleitet, welche durch eine CTLA-4-, oder PD-1/PD-L1-Blockade vermindert wird, sodass die Immunreaktivität ansteigt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Projektkonzeption und -kooperation

Das der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Projekt entstand in Kooperation zwischen dem Institut für medizinische Mikrobiologie (IMMi) und der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin (KAI), beide Teil des Universitätsklinikums Essen. Aus dem IMMi waren insbesondere Prof. Dr. Carsten Kirschning und ich, aus der KAI insbesondere Prof. (em.) Dr. Jürgen Peters und Dr. Alexandra Bick an Projektkonzeption und -durchführung beteiligt. Letztere trug wesentlich zu den meisten im Folgenden dargestellten Versuchen bei. Die Patientenversorgung erfolgte durch die Ärzte der anästhesistischen Intensivstation des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung Dr. Frank Herbstreits (KAI), ohne deren Unterstützung keine Probenakquise möglich gewesen wäre. Prof. Dr. Astrid M. Westendorf und Prof. Dr. Wiebke Hansen (beide IMMi) stellten jeweils ihre praktische Erfahrung, Laborraum und Gerätezeit, erstere zudem Arbeitskraft in Form technischer Assistenz zur Verfügung. Praktische Beiträge anderer Wissenschaftler werden jeweils im Textzusammenhang zur zugehörigen Methodik und Abbildung gewürdigt.

3.2 Geräte

Tabelle 3-1 Verwendete Geräte

Sterilarbeitshaube	Herasafe Heraeus HS12
Mikroskop	Zeiss Axiovert 40c
Waage	Acculab Vicon Sartorius
Feinwaage	VWR LPW 213i
Zentrifugen	Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3R
	Thermo Scientific Heraeus Fresco 17
ELISA Washer	BioTek ELx50
ELISA Reader	BioTek Epoch
Durchflusszytometer	Cytoflex S, Beckman Coulter
Inkubator	Heracell 150
Thermoschüttler	IKA KS 4000i control
Wasserbad	Peter Oehmen GFL
Vortex	Grant Bio PV1
	Scientific Industries (ELMIS) Vortex Genie 2
Luminex Washer	Biotek ELx50
Luminex Reader	Biotek Epoch
Zählkammer	Neubauer improved
Ultraschallbad	VWR Ultrasonic cleaner
Pipetten	Eppendorf Research Plus 1-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl. Eppendorf Easypet 3. Transferpipette-S-12 5-50µl, 50-300µl
Einfrierentschleunigungsbehälter	VWR Kryo-Einfrierbehälter -1 °C mit Isopropylalkohol (#479-0640)
Photometer zur Bakterienzeldichtemessung	Eppendorf BioPhotometer plus

3.3 Material

3.3.1 Hauszubereitungen

Tabelle 3-2 Verbrauchslösungen zubereitet in domo

Im Text	ggf. Vollname	Rezept:
PBS	Phosphate buffered saline	8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat auf einen Liter hochreines, vollentsalztes Wasser
PBST, PBT	Phosphate buffered saline with Tween	50 µl Tween® 20 (Sigma Aldrich P9416) auf einen Liter PBS
ELISA Blocking Puffer		10 g bovines Serumalbumin auf eine Liter PBS
ELISA Stop Solution	3 molare Schwefelsäure	167 ml Schwefelsäure (96%) + 833 ml PBS
ELISA Reagent Diluent		10 ml R&D Systems DY995 + 90 ml PBS
FACS Puffer		20 g bovines Serumalbumin auf einen Liter PBS
E. coli-RNA	totale RNA von Escherichia Coli (strain 30/185)	Isolation per Invitrogen PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific 12183018A) nach Herstellerangaben

3.3.2 Lösungen

Tabelle 3-3 Sonstige Verbrauchslösungen

Name:	Erklärung:	Hersteller:	Seriennummer
Ficoll®-Paque		Merck	GE17-5442-02
BHI-Medium	Brain-Heart-Infusion, Hirn-Herz-Bouillon	Merck	53286
DPBS	Dulbeccos Phosphate buffered saline	Thermo Fisher	14190144
DMSO	Dimethylsulfoxid	Merck	102952
RPMI 1640		Thermo Fisher	
DuoSet ELISA	Capture und Detecture Antikörper, Horseradish- Peroxidase-Streptavidin, Proteinstandard im Set	R&D	DY201(IL-1 β), DY206(IL-6), DY208(IL-8), DY210(TNF),
ELISA Substrat A&B	Enthält: A: Wasserstoffperoxid B: 3'3',5'5' Tetramethylbenzidin	BD Biosciences	555214
Ethanol		Merck	100983
FACS-Flow	Flusspuffer für FACS- Geräte	BD Biosciences	342002
FACS-Rinse	Spülflüssigkeit für FACS- Geräte	BD Biosciences	340346
FACS-Clean	Reinigungsflüssigkeit für FACS Geräte. Auch für ELISA Washer ELx50 genutzt.	BD Biosciences	340345
Färbepuffer		BioLegend	420201
HetaSep™	Erythrozytenaggregations- lösung	Stemcell technologies	07806
BamBanker Einfriermedium		Nippon Genetics	BB01

3.3.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3-4 Verbrauchsmaterial

Name:	ggf. Vollname/ Beschreibung	Hersteller	Katalogkennung
96 well Platten	Nunc™ U96 MicroWell x 300µL Assay Microplate with Lid And Round Bottom Wells, Non-Treated Clear Polystyrene	Thermo Fisher	268200
	Microlon 600, 96 well, high binding, flat bottom, clear	Greiner Bio One	655061
Filterplatte	MultiScreen HTS-FC, 1,2/0,65 µm	Merck	MSFCN6B10
Falcon® Röhrchen	15 und 50ml	Corning	382196 382070
Kryoröhrchen	2ml Röhrchen zum Einfrieren von Zellen	VWR	479-6837
Plastikpipetten	Greiner Cellstar® 5, 10, 25ml	Merck	P7865
Pipettenspitzen	Eppendorf epT.I.P.S und Dualfilter epT.I.P.S	Eppendorf	0030000811 0030000854 0030000889 0030000927 0030078551 0030078578 0030078519
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes®	Eppendorf	3810X
	Greiner centrifuge tubes	Greiner	T2068
Schafblutagarplatten		Thermo Fisher Scientific	BD 254005
EDTA Monovette		Sarstedt	02.1066.001
Zitrat Monovette			02.1067.001
Hirudin Monovette			04.1959.001
Heparin Monovette			02.1064

3.3.4 Organismen

Tabelle 3-5 Verwendete Organismen

Name	Abkürzung	Stamm
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> ; <i>S.a.</i>	DSMZ 20231
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> ; <i>E.c.</i>	Isolat 30/185 (Spiller et al., 2008)

3.3.5 Reagenzien

Tabelle 3-6 Verwendete Reagenzien

Name	ggf. Vollname/ Beschreibung	Hersteller	Katalogkennung
Gentamicin	Gentamicin-Infusionslösung 3 mg/ml	B. Braun	
Chloroquin		Sigma-Aldrich	C6628
LPS:O111		Merck (Sigma-Aldrich)	L4391
LPS:RE595		Merck (Calbiochem)	437628
Pam ₃ CSK ₄ ; P ₃ C	Triacyliertes synthetisches Lipopeptid Tripalmitoyl-cysteinyl-tetralysin, TLR 2/1 Agonist	EMC microcollections	L2000
ODN2006	synthetisches CpG reiches 24-mer Oligodesoxyribonukleotid mit Phosphothioatrückgrat, TLR 9 Agonist	InvivoGen	tlrl-2006
LyoVec™	Transfektionsreagenz. Kationisches Phospholipid.	InvivoGen	lyec
Resiquimod, R848	TLR7 und 8 Agonist	InvivoGen	tlrl-r848
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	Merck	79346
Ionomycin		Merck	I3909
IFN γ	Interferon γ	R&D Systems	285-IF
Zombie aqua™	Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	BioLegend	42310

3.3.6 Antikörper

Tabelle 3-7 Verwendete Antikörper

Name	Beschreibung / Handelsname	Hersteller	Katalognummer / Klon
Nivolumab	Opdivo	Bristol-Myers Squibb	
Pembrolizumab	Keytruda	Merck/MSD	
Atezolizumab	Tecentriq	Roche	
Ipilimumab	Yervoy	Bristol-Myers Squibb	
hIgG1κ	Anti-Fluoreszein rekombinantes humanes Immunglobulin G1 kappa	Absolute Antibody	ABA-AB00102-10.0-BT
hIgG4κ	Anti-Fluoreszein rekombinantes humanes Immunglobulin G4 kappa	Absolute Antibody	ABA-AB00102-13.0-BT
T2.5	anti-Toll-like-Rezeptor 2 rekombinantes murines Immunglobulin G1 kappa	Hycult Biotech	HM1054
3C3	anti-Toll-like-Rezeptor 4 rekombinantes murines Immunglobulin G1 kappa	Hycult Biotech	HM2247
CD4-BV421	Brilliant Violet 421 anti-human CD4 Antibody	BioLegend	RPA-T4
CD14-PECy7	PE/Cyanine7 anti-human CD14 Antibody	BioLegend	M5E2
CD3-AF488	Alexa Fluor 488 anti-human CD3 Antibody	BioLegend	UCHT1
PD1-PEDazzle594	PE/Dazzle 594 anti-mouse CD273 (B7-DC, PD-L2) Antibody	BioLegend	TY25
PDL1-BV605	Brilliant Violet 605 anti-mouse CD279 (PD-1) Antibody	BioLegend	29F.1A12
CTLA4/CD152-PE	PE anti-human CD152 (CTLA-4) Antibody	BioLegend	L3D10

3.4 Methoden

Es wird steril gearbeitet.

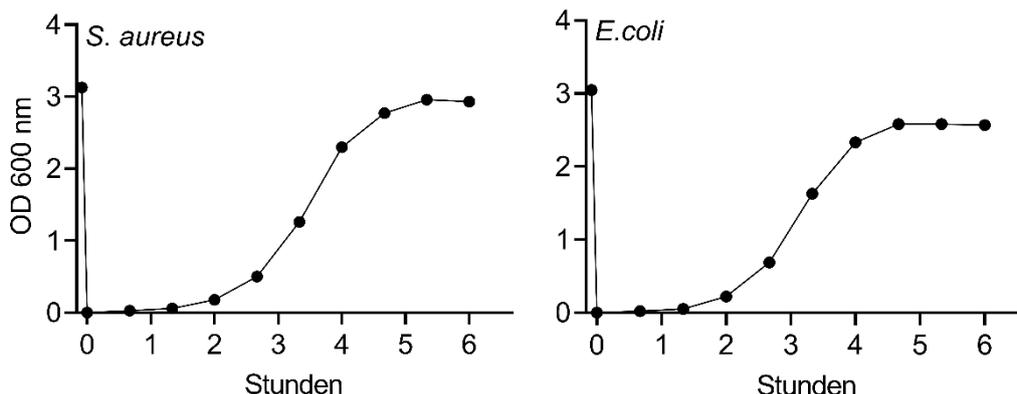
3.4.1 Bakterienanzucht

Zwecks Verwendung von *E. coli* und *S. aureus* als Immunstimulus legte ich je eine Bakterienkultur nach folgenden Protokollen an:

In einem 2 l Erlenmeyerkolben mit großem Einlauf wurden 200 ml Hirn-Herz-Bouillon (Brain-heart-Infusion, BHI) Medium vorgelegt und ein Nugget des respektiven Bakterienstamms aus der Tiefkühlung (-80°C) hinzugefügt. Im Warmschüttler rotierte die Flüssigkeit anschließend für 16 Stunden (h) bei 37°C unter Raumluft mit deutlicher Trübung und Geruchsentwicklung. Parallel rotierte eine nicht mit Bakterien versetzte Menge BHI Medium als Sterilkontrolle.

Nach 16 h wurden 2 ml der trüben Lösung entnommen und in 200 ml frisches BHI Medium überführt. Dieses wurde weiter bei 37°C in Raumluft geschüttelt und alle 30 Minuten (min) die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen, sowie zum Vergleich eine Messung der über Nacht in die stationäre Wachstumsphase eingetretenen Lösung und frischen BHI Mediums. Anhand der OD wurde bei der erstmaligen Durchführung eine Wachstumskurve von dem Vergleichswert des sterilen Mediums bis zum Vergleichswert der stationären Phase erstellt, um die logarithmische Wachstumsphase graphisch zu ermitteln (s. Abb. 3-1).

Abbildung 3-1 Wachstumskurven von *S. aureus* und *E. coli* Bakterien: Optische Dichte (OD) bei 600 nm im Vergleich zu BHI-Medium (definiert als „0“) aufgetragen gegen die Zeit in Stunden. Inkubation bei 37°C unter Raumluft, 180 Rotationen pro Minute (rpm) im Schüttler. Verdünnung zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ min um den Faktor 100 aus einer Übernachtinkubation ($t_{\text{stat}} = -5$ min; erster Messpunkt).



Der Zeitpunkt des Auftretens und die OD der mittlogarithmischen Phase wurden dokumentiert. Bei einer erneuten Anzucht wurde die OD viertelstündlich bestimmt und das Wachstum bei Überschreiten der per Standardkurve ermittelten OD der mittlogarithmischen Phase unterbrochen. Es folgte je nach Bedarf eine Aufkonzentrierung um den Faktor 10 oder 100 durch Zentrifugation bei 4500xG für 15 min, Abnahme des klaren Überstands und Resuspension des Pellets in 20 oder 2 ml PBS mit folgender Inaktivierung (siehe unten; s.u.) oder eine Kryokonservierung der lebenden Bakterien bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

Zudem wurde eine 16-schrittige Verdünnungsreihe zum Faktor 10 erstellt und auf Schafblutagar aufgetragen, um die Konzentration kolonieformender Einheiten (colony forming units, c.f.u.) zu bestimmen. Dieser Schritt wurde nach Einfrieren und Auftauen wiederholt. Typischerweise lag die Konzentration von *S. aureus* nach Abnahme in der mittlogarithmischen Phase bei 3×10^7 c.f.u. / ml und von *E. coli* bei 10^8 c.f.u. / ml (jeweils vor Anreicherung).

3.4.2 Bakterieninaktivierung

Eine Inaktivierung der oben genannten (o.g.) Bakterien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, per Inkubation für 15 min bei 96°C unter gleichmäßigem Schütteln mit 60 rpm. Darüber hinaus erfolgten während der Etablierungsphase Experimente mit Antibiotika-behandelten Bakterien suspensionen. Hierzu wurden frisch amplifizierte Bakterienkulturen (*S. aureus* und *E. coli*) für unterschiedliche Dauer bei unterschiedlicher Temperatur mit Gentamicin inkubiert. Es wurden folgende 1. Bakterienkonzentrationen, 2. Antibiotikakonzentrationen, 3. Zeiträume und 4. Inkubationstemperaturen in jeder möglichen Kombination erprobt:

1. 10^8 c.f.u./ml *E. coli*, 3×10^7 c.f.u./ml *S. aureus*.
2. 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 µg/ml Gentamicin
3. 30 min, 1, 2, 4, 6 h
4. 20°C, 37°C.

Die Proben wurden daraufhin per 3-Ösenausstrich auf Schafblutagar und Übernachtinkubation bei 37°C Raumluft auf Keimwachstum überprüft. Die Keime wurden optisch identifiziert, es erfolgte bei keinem Versuch Bakterienwachstum auf der Negativkontrolle (bspw. durch Verunreinigung, Niederschlag von Keimen) oder außerhalb der beimpften Fläche und die optische und olfaktorische Kontinuität blieb stets gewahrt.

3.4.3 Isolation mononukleärer Blutzellen

Ich erhielt Vollblutkonserven vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen. Im Labor überschichtete ich vorsichtig 20 ml Ficoll Lösung mit 13 ml dieses Blutes in einem 50 ml Falcon Röhrchen und zentrifugierte bei 400xG für 30 min bei Raumtemperatur mit Beschleunigung Stufe 1 und ohne Bremse. Danach ist eine Phasentrennung in Plasma (oben), mononukleäre Zellen (Phasengrenze), Ficoll Lösung und anukleäre, sowie polymorphonukleäre Zellen (unten) zu erkennen. Diese Phasentrennung beruht auf der geringeren Dichte des Zellkerns gegenüber dem Zytoplasma: Mononukleäre Zellen, das sind im Blut Monozyten und Lymphozyten, weisen eine hohe Kern / Plasma-Relation und daher eine geringere Dichte auf, als polymorphonukleäre, nämlich Granulozyten, und anukleäre Zellen, nämlich Erythrozyten und Thrombozyten. Das Plasma wurde vorsichtig abgenommen

und aufbewahrt, daraufhin wurden die mononukleären Zellen (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) abgenommen und mit 37°C warmem PBS gewaschen, in die Arbeitslösung aus 10% autologem Plasma und 90% RPMI 1640 überführt und in der Zellkultur verwendet. Non-monozytäre Zellen und Ficoll-Lösung wurden verworfen. Eine zweizeitige Verwendung der PBMCs kann nach Kryokonservierung bei -80°C erfolgen: Zu diesem Zweck wurden die PBMCs in eine Lösung aus 50% DMSO und 50% autologem Plasma überführt und in einem Einfrierentschleunigungsbehälter langsam eingefroren. Das autologe Plasma wurde bei -20°C aufbewahrt. Vor Verwendung wurden die PBMCs unter Schwenken im 37°C Wasserbad aufgetaut, einmal in warmem PBS gewaschen und in die Arbeitslösung überführt.

3.4.4 Materialetablierung *in vitro*

Nach gleichmäßiger Aussaat von 2×10^7 PBMCs (siehe oben; s.o.) pro 96 well Platte in der Arbeitslösung wurden diese mindestens eine Stunde bei 37°C, 5% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre (Standardbedingungen) inkubiert. Daraufhin wurde in unterschiedlicher Dosis anti-TLR2-mAB (T2.5), anti-TLR4-mAB (3C3) und Chloroquin einzeln oder in Kombinationen hinzugefügt und die Proben für weitere 30 min bei Standardbedingungen inkubiert, dann mit den spezifischen TLR-Stimuli LPS:O111 (TLR2 und -4), LPS:Re595 (TLR4), Pam₃CSK₄ (TLR2/1), Resiquimod (entspricht ‚R848‘; TLR7 und 8), ODN2006 (TLR9), *E. coli*-RNA (TLR 7 und 8, ggf. TLR3), sowie mit inaktivierten, oder vitalen Bakterien konfrontiert und für 6 h inkubiert. Bei Letzteren wurde jeweils parallel zur Inkubation ein Bakterientiter bestimmt. Äquivalent wurden PBMCs für 30 min oder 16 h mit Nivolumab, Pembrolizumab (beide anti-PD1 mAB), Atezolizumab (anti-PDL1 mAB) oder Ipilimumab (anti-CTLA-4 mAB) inkubiert, gefolgt von weiteren 6 h mit 10 ng/ml LPS:O111. Als Positivkontrolle der Antikörper wurden die Zellen mit 30 ng/ml IFN γ vorbehandelt („primed“). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400xG für 5 min und eine manuelle Abnahme der Überstände. Diese wurden per ELISA (s.u.) analysiert. In jedem Fall erfolgten zudem adäquate Kontrollen.

3.4.5 Blutprobenaufbereitung

Zur Antikoagulation wurden 1,6 mg/ml EDTA, 0,106 mol/l Trinatrium-Zitrat, 525 Anti-Thrombin-Einheiten / ml Hirudin, oder 16 internationale Einheiten (I.E.) / ml Ammonium-Heparin erprobt (Durchführung S. Schimanski). Das Vollblut wurde jeweils in Röhrchen mit vorgelegtem Antikoagulant abgenommen. Bei Heparin stellte sich regelmäßig nach Auftauen der Proben eine Gerinnung ein. Die entstehenden Gerinnsel neigten zum Verstopfen von Pipetten, Washern und den Filtern der Luminexplatten (s.u.). Während der Etablierungsphase versuchte ich daher vor Einfrieren der Proben Serum aus dem Plasma zu gewinnen und antagonisierte dafür die Heparinantikoagulation mit 4, 8, 12, oder 16 I.E. / ml Protamin. Unabhängig von der

Protamindosis ließ sich nach 5 oder 15 Minuten Inkubation unter Standardbedingungen und Zentrifugation bei 1000xG für 15 min oder 2500xG für 10 min im 96 well Format das Serum nicht manuell vom Gerinnsel trennen, weshalb ich eine Trennung mittels Filterplatte erprobte. Zum Blocken einer möglichen Proteinadsorption der Filterplatte bereitete ich diese vor, indem ich zunächst bei 1000xG (Maximum nach Herstellerangabe) für je 5 min 250 µl/well ELISA Blocking Buffer, gefolgt von 250 µl/well PBS durch die Filterplatte zentrifugierte. Daraufhin trug ich das Plasma auf und antagonisierte die Antikoagulation mittels verschiedener Protamindosen, wie oben beschrieben, um die Platte schließlich für 15 min bei 1000xG zu zentrifugieren. Da sich auch dieses Vorgehen als nicht umfassend robust herausstellte, antagonisierte ich die Gerinnung in Folgeversuchen nicht und entfernte die Gerinnsel bei spontanem Auftreten manuell aus den wells, indem ich sie mit einer Pipettenspitze an die Wand drückte und aus der Probe zog. Dies führte regelmäßig zu Volumenverlusten von 10 – 50 µl / well.

3.4.6 Dosisfindung einer Immunstimulation in Vollblut

Ein positives Ethikvotum der hiesigen Ethikkommission zur Blutentnahme von gesunden Probanden unter informiertem Einverständnis liegt vor (17-7869-B0). Blut wurde bei gesunden Probanden per Punktion der Vena cubiti in Ammoniumheparinmonovetten entnommen und möglichst schnell mit 200 µl/well auf eine 96 well Platte aliquotiert. Ein Aliquot des Blutes wurde direkt zentrifugiert, der Überstand gewonnen und bei -20°C verwahrt. Das Blut wurde einer zu Abschnitt 3.4.4 analogen Dosisfindung der Immunstimuli und –hemmstoffe unterzogen. Zudem verdünnte ich für spezifische Experimente Vollblut in RPMI 1640 (Verhältnis 1:4). Nach der Inkubation unter Standardbedingungen wurde die Platte bei 400xG zentrifugiert, das Plasma bzw. der Überstand gewonnen und zur weiteren Analyse verwendet oder bei -20°C verwahrt. Mein Fokus lag auf der Dosisfindung von CQ, welches zusätzlich gegen Phorbolmyristataacetat (PMA) und Ionomycin titriert wurde.

3.4.7 Zeitkinetik der Probenverarbeitung

In der Regel erfolgte eine unmittelbare Verwendung der Blutproben nach Entnahme. Um jedoch eine mögliche Beeinträchtigung der Proben durch den Transport von der Intensivstation ins Labor zu adressieren, wurde in einem Experiment vom selben Probanden zu drei Zeitpunkten, initial, sowie nach zwei und vier Stunden, Blut abgenommen, das daraufhin unmittelbar verwendet, oder für zwei oder vier Stunden bei RT oder 4°C gelagert wurden. Auf die Ausplattierung (96-well) folgte eine Behandlung mit 10 µg/ml Chloroquin und 30 min Inkubation bei Standardbedingungen, gefolgt von einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *E. coli* Bakterien für 16 h, jeweils mit adäquaten Kontrollen.

3.4.8 Inkubation von Patientenproben *ex vivo*

Patienten wurden auf der anästhesiologischen Intensivstation des Universitätsklinikums Essen rekrutiert. Ein positives Votum der hiesigen Ethikkommission (17-7330-B0) liegt vor. Suchkriterien waren eine Sepsisneudiagnose in den letzten 24 Stunden, positive SIRS Kriterien, ein positiver qSOFA-Score (Singer et al., 2016), sowie ein Anstieg der Akut-Phase-Proteine C-reaktives Protein und Procalcitonin. Einschlusskriterium war ein Anstieg des SOFA-Scores (Singer et al., 2016) um zwei oder mehr Punkte in den letzten 24 Stunden bei klinischem Verdacht auf eine (Calandra et al., 2005) oder bei gesicherter Infektion. Diese Einordnung ist mit der gültigen Sepsisdefinition (s.o.) konform. Ausschlusskriterien waren eine HIV-Infektion, die Einnahme immunsuppressiver oder anti-inflammatorischer Medikamente (inklusive Kortikosteroide >30mg/d Kortisoläquivalent, exklusive nichtsteroidalen Antirheumatika; NSAR), oder ein Alter unter 18 Jahren. Der Einschluss und Nichteinschluss bei Zutreffen mindestens eines Ausschlusskriteriums erfolgte durch die Ärzte der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Essen. Ein nachträglicher Ausschluss bei Zutreffen mindestens eines Ausschlusskriteriums erfolgte durch mich. Ich erhielt die Proben unter einer chronologisch vergebenen Fallnummer mit klinischen und laborchemischen Daten der Patienten, jedoch ohne Namensnennung, wodurch eine Anonymisierung erfolgte.

Bei Einschluss erfolgte eine Entnahme von Restblut wenn möglich aus einem arteriellen Katheter, sonst aus einem zentralvenösen Katheter in Ammoniumheparinmonovetten (16. I.E. Ammoniumheparin / ml Blut). Da das verfügbare Probenvolumen jeweils begrenzt war, konnte nicht jeder Versuch mit Proben aller Patienten oder Probanden durchgeführt werden. Das Datum der Krankenhausentlassung oder des Versterbens von Patienten wurde uns mitgeteilt. In einigen Fällen erfolgte eine Verfolgung des klinischen Verlaufs eingeschlossener Patienten, sowie bei einigen Patienten erneute Blutentnahmen. Die Kohärenz dieser Datensätze wurde durch Vergabe derselben Fallnummer durch die Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin gewahrt.

Die Proben wurden schnellstmöglich und ungekühlt ins Labor verbracht und steril auf eine 96 well Rundbodenplatte aliquotiert (200 µl/well). Diese Blutaliquots wurden daraufhin

1. für 6 h mit einer Kombination von Chloroquin (10 ng/ml), 3C3, und T2.5 (je 15 µg/ml), oder je einzeln mit Pam₃CSK₄ (20 µg/ml), LPS:RE595 (100 ng/ml), R848 (5 µg/ml; entspricht Resiquimod), 3x 10⁵ c.f.u./ml hitzeinaktiviertem (hi) *S. aureus* (*S.a.*), oder 10⁴ c.f.u./ml hi *E. coli* (*E.c.*) Bakterien inkubiert,

2. erfolgte parallel eine sechsstündige Inkubation der Blutaliquots mit den o.g. ICI (einzeln, je 30 µg/ml). Diese Proben wurden daraufhin für weitere 16 h mit 10 oder 100 ng/ml LPS:O111 inkubiert. Blutproben von sieben Patienten wurden zur Isotypkontrolle mit anti-Fluoreszeind

hlgG1κ und hlgG4κ inkubiert; diese Isotypen sind identisch mit Nivolumab und Pembrolizumab (hlgG4κ), sowie Atezolizumab und Ipilimumab (hlgG1κ). Zudem erfolgten jeweils adäquate Kontrollen. Nach Zentrifugation bei 400xG für 5 min wurde der Überstand gewonnen und zur zweizeitigen Analyse per Luminex (s.u.) bei -20°C eingefroren. Das direkt nach Blutentnahme eingefrorene Plasma wurde zusätzlich vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen auf die Ferritinkonzentration hin untersucht.

3.4.9 Beurteilung der Mikrobiologie

Alle Keimnachweise wurden initial von mir auf Plausibilität hin überprüft. Die Überprüfung beruhte vor Allem auf der Beziehung des klinischen Fokus zum nachgewiesenen Keim unter besonderer Beachtung häufiger Kontaminanden (Dargere et al., 2018), eines geeigneten infektiösen Fokus, einer geeigneten Eindringpforte, sowie Konstanz des Nachweises bei i.d.R. mehreren abgenommenen Blutkulturen aus unterschiedlichen Punktionsstellen, oder des Nachweises durch verschiedene Methoden, bspw. in Fokuskultur und Blutkultur. Ob eine Sepsis allein durch Non-candida-Pilzinfektionen, bspw. durch *Aspergillus species*, oder durch Viren, bspw. Influenzaviren ausgelöst werden kann, ist Gegenstand von Diskussionen (Dutkiewicz and Hage, 2010; Gu et al., 2020). Hier sei daran erinnert, dass medikamentös, oder infektiös immunsupprimierte Patienten von der Studie ausgeschlossen waren, was die Auftretenswahrscheinlichkeit einer invasiven Pilzinfektionen, insbesondere durch *Aspergillus species*, im Studienkollektiv senkt. Beim Nachweis von Pilzen, potenziell nicht plausiblen bakteriellen oder viralen (Ko-)Infektionen erfolgte daher eine konkrete Rücksprache mit den behandelnden Ärzten und zuständigen Mikrobiologen zur Konsentsentscheidung bzgl. Plausibilität des Keimnachweises anhand insbesondere klinischer und laborchemischer Gesichtspunkte bspw. basierend auf dem Verlauf der Procalcitonin-, CRP-, Leukozyten- und Leukozyten-subspecies-Konzentration (ggf. wurde konsensgemäß ein unplausibler mikrobieller Nachweis nicht für die Analyse berücksichtigt).

3.4.10 Experimente mit Blutproben gesunder Probanden

Probanden wurden im persönlichen und Laborumfeld angesprochen und rekrutiert. Die Probanden wurden eingehend über die Risiken der Blutentnahme aufgeklärt und stimmten schriftlich der Entnahme sowie den Datenschutzbedingungen zu. Es erfolgte eine Messung und Dokumentation von Blutdruck und Herzfrequenz nach Riva-Rocci, eine Befragung zu Vorerkrankungen und Medikation, sowie zum aktuellen Gesundheitsstatus, gefolgt von der Entnahme von bis zu 36 ml Blut in Ammoniumheparinmonovetten. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor (s.o.). Es wurden zwei Gruppen äquivalent zur zweigipfligen Altersverteilung des Septikerkollektivs rekrutiert, Einschlusskriterien waren: 1. Alter zwischen

20 und 40 (junge Gruppe) oder 2. über 50 Jahre (alte Gruppe). Ausschlusskriterien waren aktuelles Krankheitsgefühl oder vorangegangene Erkrankungen aller Art in den letzten 14 Tagen vor oder bis zu zwei Tage nach Blutentnahme (nachträglicher Ausschluss), chronische Erkrankungen des Immunsystems oder des Knochenmarks, Behandlung mit immunsuppressiver oder anti-inflammatorischer Medikation (exklusive NSAR), bekannte chronische Infektionserkrankungen, insbesondere HIV, Autoimmunerkrankungen oder ein Selbstausschluss bei Frage nach der Verwertung des Materials für immunologische Fragestellungen. Eventuelle chronische Erkrankungen oder Medikamente ohne bekannte Wirkung auf das Immunsystems wurden dokumentiert. Die weitere Verwendung und Analyse erfolgten ausschließlich pseudonymisiert. Die Behandlung des Blutes erfolgte exakt, wie die Behandlung des Blutes der septischen Patienten, jedoch ohne erneute Blutentnahme nach einem bestimmten Zeitintervall.

3.4.11 ELISA Assay zur Messung von Zytokinkonzentrationen

Die Konzentration von Immunmediatoren in PBMC- und Dosisfindungsexperimenten wurde standardmäßig per Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) analysiert. In Einzelfällen erfolgte zudem die Nachmessung verdünnter Patientenproben per ELISA, falls die Konzentration über der Messgrenze des empfindlicheren Luminex-Assays (s.u.) lag.

High Protein binding 96 well Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur und Raumluft auf dem Schüttler bei 12 Umdrehungen pro Minute mit 50 µl Fänger-Antikörper-Suspension in PBS inkubiert (Konzentration gemäß Herstellerangabe). Am darauffolgenden Tag wurde die Platte dreimal mit PBT gewaschen, für eine Stunde mit 200 µl/well ELISA Blocking Puffer geschüttelt, und erneut dreimal mit PBT gewaschen. Danach wurde 50 µl/well Proben aufgetragen. Falls eine hohe Zielproteinkonzentration zu erwarten war, zum Beispiel im Falle von Plasma, wurde die Probe vorher mit Reagent Diluent (RD) verdünnt (Verhältnis 1:4). Auf drei wells wurde statt Probe ausschließlich RD aufgetragen (Negativkontrolle). Parallel wurde eine 7-schrittige Verdünnungsreihe zum Faktor 2 des jeweiligen Analyts in Reinform (rekombinantes Protein) in bekannter Konzentration aufgetragen (‘Standardreihe’).

Nach 90 min bei 37°C Raumluft auf dem Schüttler wurde erneut dreimal gewaschen und der Signalantikörper in RD hinzugefügt und weiter 90 Minuten bei 37°C Raumluft inkubiert (Konzentrationen gemäß Herstellerangabe).

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde eine Suspension eines Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Konjugats in RD aufgetragen, die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert und erneut dreimal gewaschen. ELISA Substrat A und B wurden zu gleichen Teilen gemischt und in alle wells gefüllt. Bei sichtbarer Farbentwicklung nach blau in zahlreichen wells wurde die Reaktion durch Auftragen der Stop Solution unterbrochen, was in einem Farbumschlag nach gelb resultierte. Bei den letzten beiden Pipettierschritten ist unbedingt auf die Vermeidung von

Bläschen zu achten, da diese durch Refraktion und Reflexion die Messung stören. Die Lichtabsorption bei 450 nm im Vergleich zu 570 nm Wellenlänge wurde im Anschluss am Epoch Lesegerät gemessen und per Standardreihe die Konzentration in jedem well ermittelt.

3.4.12 Luminex Assay zur Messung von Zytokinkonzentrationen

Die Messung der Plasmakonzentration von TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , und IL-1 α erfolgte per Multiplex bead-coupled ELISA (Luminex® LXSAH, R&D Systems) nach Herstellerangaben. Aus Kostengründen und wegen der im Luminex im Vergleich zum einfachen ELISA maßgeblich geringeren Inter- und Intratestvarianz wurden die Zytokinkonzentrationen hier nach Zusammenführung zum Pool-Singulet gemessen. Die Probenmessung erfolgte regelmäßig auch durch Dr. Rabea Madel (IMMi).

3.4.13 Quantifizierung von DNA

DNA-Isolation und quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) erfolgten durch Dr. Andrea Engler (KAI). Zur Entfernung möglicher Zellreste wurde das Plasma bei 1000xG für 5 min zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Aus je 200 μ l Plasma erfolgte die DNA-Isolation per QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Die PCR erfolgte an einem StepOne Plus PCR System (Applied Biosystems). Zur Messung der mitochondrialen DNA wurde der Mesa Green qPCR MasterMix for Sybr Assay (Eurogentec) mit folgenden Bedingungen genutzt: 5 min bei 95 °C, dann 40 Zyklen von je 3 Sekunden (s) bei 95 °C und 40 s bei 60 °C. Nach jedem Durchlauf wurde eine Schmelzkurve erstellt. Die Primersequenzen zur Amplifikation des ATPase 6 Gens (5'-TCCCCATACTAGTTATTATCGAAACCA-3' und 5'-GCCTGCAGTAATGTTAGCGGTTA-3'), sowie zur Amplifikation der D-Loop-Sequenz (5'-TGCACGCGATAGCATTGC-3' und 5'-AGGCAGGAATCAAAGACAGATACTG-3') wurden per Primer Express 3.0 Software (Applied Biosystems) erstellt. Zur Quantifizierung wurde zudem eine Standardkurve per Verdünnungsreihe aus spezifischen, reinen PCR Produkten (Invisorb Fragment CleanUp Kit, Stratec Molecular) erstellt. Zur Konzentrationsbestimmung bakterieller DNA wurde mit dem Eubacteria genesig® Standard Kit und dem Oasig lyophilised 2x qPCR Master Mix (Primerdesign Ltd) eine spezifische Sequenz aus dem 16S-ribosomale-RNA Gen amplifiziert und quantifiziert; die Bedingungen waren: 2 min bei 95°C gefolgt von 50 Zyklen von 10 s bei 95°C und 60 s bei 60°C. Die Konzentration humaner Kern-DNA wurde per gDNA detection kit (Primerdesign Ltd) und dem Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) gemessen. Hierin erfolgte die Amplifikation einer nicht transkribierten Region des humanen Zellkerngenoms, welche nur als Einzelkopie vorkomme. Primer und Hybridisierungssequenz waren im Set enthalten. Die Bedingungen waren: 2 min bei 50°C, darauf 20 s bei 95°C, gefolgt

von 50 Zyklen zu je 7 s bei 95°C und 40 s bei 60°C. Zur Quantifizierung bakterieller und humangenomischer DNA wurde jeweils eine Standardkurve per Verdünnungsreihe der beiliegenden Positivkontrolle erstellt.

3.4.14 Messung des TLR2-Aktivierungspotenzials von Blutplasma

Die blutplasmaassoziierte TLR2 Aktivität wurde durch Dr. Mazen Atia (IMMi) per Rezeptorgenassay gemessen (Oldenburg et al., 2012). HEK-293 Zellen wurden transient mit einem $\text{nf-}\kappa\text{B}$ abhängig transkribierten Luziferase Reporter gen, sowie zusätzlich mit einem TLR2-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden dann für 16 h mit dem mediumverdünnten Plasma von Sepsipatienten oder Probanden inkubiert und die Luziferaseaktivität im Zelllysate nach Inkubation in einem Luminometer bestimmt. Zudem erfolgten adäquate Kontrollen.

3.4.15 Durchflusszytometrie

Die zelluläre Expression von Immuncheckpointmolekülen wurde durch Dr. Andreas Limmer (KAI) per Durchflusszytometrie gemessen. Da Hämoglobin intensiv autofluoresziert und Licht absorbiert ist eine Reduktion der Erythrozytenkonzentration vor Messung per Durchflusszytometrie notwendig. Hierfür wurden aus Vollblutproben per Erythrozytensedimentation die Leukozyten isoliert. Dafür erfolgte die Mischung von HetaSep™ Aggregationslösung mit Vollblut in einem 1:5 Verhältnis und die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur, woraufhin eine Phasentrennung in leukozytenreiche (oben) und eine erythrozytenreiche (unten) Phase erkennbar ist. Die obere Phase wurde daraufhin abgenommen, im vierfachen Volumen PBS verdünnt und bei 120xG für 10 min ohne Bremse zentrifugiert, woraufhin das Zellpellet in BamBanker Einfriermedium resuspendiert, die Leukozytenkonzentration per Zählkammer bestimmt und die Probe zur zweizeitigen Analyse bei -80°C gelagert wurde. Zur Messung der Checkpointmolekül-Expression erfolgte nach Auftauen eine erneute Zellzählung, woraufhin 5×10^6 Leukozyten für 30 min bei 4°C mit den in Farbe-Puffer gelösten Antikörpern CD3-AF488, CD14-PECy7, CD4-BV421, PD1-PEDazzle594, PDL1-BV605, CTLA4/CD152-PE gefärbt wurden. Nach Waschen in frischem FACS-Puffer wurden die Zellen einer Probe in jeweils 50 μl Färbepuffer mit dem Zelltodfarbstoff Zombie aqua™ aufgenommen und daraufhin erneut in FACS-Puffer gewaschen, resuspendiert und einer Messung im Durchflusszytometer zugeführt. Es erfolgte pro Lauf einmal die Normalisierung der Intensität auf eine ungefärbte Probe desselben Patienten / Probanden. Die Auswertung erfolgte mit der Software DeNovo FCS Express 7.

3.5 Darstellung und statistische Analyse

Die Darstellung und statistische Auswertung erfolgten mit der Software GraphPad Prism Version 8.4.3. Die Abbildungen 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, und 4-35A wurden mit Biorender erstellt (1-4 adaptiert aus "TLR Signaling Pathway", 1-6 aus „Immune Checkpoint Inhibitor Against Tumor Cell“, beide BioRender.com/Biorender-templates (2021)).

3.5.1 Darstellung

Alle Versuche erfolgten in Dreifachbestimmung, falls nicht anders angegeben. Illustriert sind Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. In Einzelfällen sind (zum Teil vermeintlich) weniger als drei Einzelpunkte dargestellt. Dies liegt in der Regel darin begründet, dass zwei der drei Messungen nahezu identische Ergebnisse erbrachten und die Punkte übereinander liegen. In seltenen Fällen konnte eine Einzelprobe eines Triplets aus technischen Gründen, bspw. hohem Gerinnselgehalt, nicht gemessen werden, woraufhin lediglich das Ergebnis der übrigen beiden Messungen angegeben wurde (erkennbar an dem dann symmetrisch dazwischenliegenden Mittelwert). Resultate von Patientendaten sind als Tukey Boxplots dargestellt. In Abbildungen eingetragen wurden alle p-Werte <0.05 nach Korrektur (s.u.).

3.5.2 Exploration

Das Vorgehen in Pilot-experimentelle Studien zur Findung von Substanzdosen, Zeitschemata und Experimentalprotokollen war explorativ, folglich wurden die Daten nicht per Hypothesentests auf statistische Signifikanz hin untersucht.

3.5.3 Zweigruppenvergleiche

Nach Abschluss der Etablierungsphase wurde aus den übergeordneten Hypothesen (s. Abschnitt 2) und Ergebnissen der Etablierung die Versuchsplanung für die Patientenproben generiert und die Auswertung geplant. In diesem Stadium wurden die unten angegebenen statistischen Hypothesen generiert (s. Tab 3-1 und 3-2). Da keine Vorwerte zur Einschätzung der Effektstärke existierten und Zeit und Ressourcen fallzahlbegrenzend waren, erfolgte keine formale Fallzahlplanung. Es liegen keine Vordaten zu einer zu erwartenden Datenverteilung vor, weshalb grundsätzlich nichtparametrische Tests, nämlich der Mann-Whitney U Test für den Vergleich ungepaarter und der Wilcoxon-matched-pairs Test für den Vergleich gepaarter Datensätze verwendet wurden. Es wurden jeweils alle verfügbaren Werte für eine statistische Analyse verwendet. Der Wilcoxon-matched-pairs Test toleriert keine fehlenden Werte, Zeilen mit fehlenden Werten wurden folglich für den Test nicht beachtet. Dies betraf insgesamt vier Einzelwerte, wovon zwei aus einer defekten Messplatte, einer aus vollständiger Probengerinnung, sowie ein vierter aus einer Kontamination resultierte.

3.5.4 Korrektur für Mehrfachtestung

Um eine Akkumulation des α -Fehlers durch multiples statistisches Testen im Zusammenhang mit derselben übergeordneten Hypothese (und innerhalb eines Datensatzes) zu verhindern, erfolgte je eine Mehrfachtestkorrektur pro Hypothesenfamilie (s. Abschnitt 2) per Holm-Bonferroni-Prozedur. Der Übersichtlichkeit halber korrigierte ich die p-Werte nach oben, statt das α -Niveau zu senken, sodass alle Hypothesen-Tests gegen ein lokales α -Niveau von 0.05 erfolgen. Dafür wurden alle p-Werte der Hypothesentests einer Hypothesenfamilie (Anzahl k) in aufsteigender Größe geordnet und nach Position i in der Liste nummeriert (erste Position / niedrigster p-Wert $i=0$, letzte Position / höchster p-Wert $i=k-1$). Der korrigierte p-Wert p' beträgt dann $p'=p \cdot (k-i)$, wobei jeder Hypothesentest jenseits des ersten p' in aufsteigender Reihenfolge, welches das lokale α -Niveau (hier $p=0.05$) überschreitet unabhängig vom Ergebnis der Mehrfachtest-Korrektur als nicht signifikant gewertet wird.

Tabelle 3-8 Mehrfachtestkorrektur zur Hypothesenfamilie „septische Hyperinflammation“: Holm-Bonferroni-Prozedur mit Korrektur der p-Werte statt des lokalen α -Niveaus. Daten liegen vor für Zytokinmessungen von 51 Patienten und 11 Probanden, TLR2 Liganden Aktivität von 36 Patienten und 4 Probanden, DNA-Messungen von 40 Patienten und 10 Probanden. MWU: Mann-Whitney U Test; WMP: Wilcoxon-matched pairs Test; Prob(anden); Sep(sispatienten). Baseline, Konzentration unmittelbar nach Blutentnahme; TLR-I, dreifach TLR-Inhibition. ns, nicht signifikant (nach Korrektur).

Messwert:	Säulen:	Test:	Ursprünglicher p-Wert:	Korrigierter p-Wert:
TLR2 Liganden Aktivität	Plasma TLR2 Prob <> Sep	MWU	0.0004	0.0096
ATPase-6 Gen (mtDNA)	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0026
D-Loop (mtDNA)	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0026
nukleäre humane DNA	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0026
16S-rRNA Gen (bak. DNA)	Prob <> Sep	MWU	0.032	0.608 (ns)
TNF Baseline	Prob <> Sep	MWU	0.0008	0.0184
TNF	Prob Baseline <> Inkubation	WMP	0.1484	>0.9999 (ns)
TNF	Prob Inkubation <> TLR-I	WMP	0.4063	>0.9999 (ns)
TNF	Sep Baseline <> Inkubation	WMP	<0.0001	<0.0026
TNF	Sep Inkubation <> TLR-I	WMP	0.0263	0.0526 (ns)
IL-6 Baseline	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0026
IL-6	Prob Baseline <> Inkubation	WMP	0.083	>0.9999 (ns)
IL-6	Prob Inkubation <> TLR-I	WMP	0.2061	>0.9999 (ns)
IL-6	Sep Baseline <> Inkubation	WMP	<0.0001	<0.0026
IL-6	Sep Inkubation <> TLR-I	WMP	<0.0001	<0.0026
IL-8 Baseline	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0026
IL-8	Prob Baseline <> Inkubation	WMP	0.002	0.044
IL-8	Prob Inkubation <> TLR-I	WMP	0.2324	>0.9999 (ns)
IL-8	Sep Baseline <> Inkubation	WMP	<0.0001	<0.0026
IL-8	Sep Inkubation <> TLR-I	WMP	0.1532	>0.9999 (ns)
IL-10 Baseline	Prob <> Sep	MWU	0.0001	0.0026
IL-10	Prob Baseline <> Inkubation	WMP	0.0938	>0.9999 (ns)
IL-10	Prob Inkubation <> TLR-I	WMP	>0.9999	>0.9999 (ns)
IL-10	Sep Baseline <> Inkubation	WMP	0.3785	>0.9999 (ns)
IL-10	Sep Inkubation <> TLR-I	WMP	0.364	>0.9999 (ns)
IL-1 β Baseline	Prob <> Sep	MWU	0.7945	>0.9999 (ns)
IL-1 β	Prob Baseline <> Inkubation	WMP	0.25	>0.9999 (ns)
IL-1 β	Prob Inkubation <> TLR-I	WMP	0.625	>0.9999 (ns)
IL-1 β	Sep Baseline <> Inkubation	WMP	0.0441	0.7938 (ns)
IL-1 β	Sep Inkubation <> TLR-I	WMP	0.0145	0.3045 (ns)
IL-1 α Baseline	Prob <> Sep	MWU	0.3126	>0.9999 (ns)
IL-1 α	Prob Baseline <> Inkubation	WMP	>0.9999	>0.9999 (ns)
IL-1 α	Prob Inkubation <> TLR-I	WMP	0.25	>0.9999 (ns)
IL-1 α	Sep Baseline <> Inkubation	WMP	0.0002	0.005
IL-1 α	Sep Inkubation <> TLR-I	WMP	0.1161	>0.9999 (ns)

Tabelle 3-9 Mehrfachtestkorrektur zur Hypothesenfamilie „septische Hypoinflammation“: Daten liegen vor für Bakterien-Stimulation von je 11 Patienten und Probanden, Stimulation mit spezifischen Liganden von 19 Patienten und 11 Probanden. MWU: Mann-Whitney U Test; Prob(anden); Sep(sispatienten).

Messwert:	Säulen:	Test:	Ursprünglicher p-Wert:	Korrigierter p-Wert:
TNF <i>S. aureus</i>	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
TNF <i>E.coli</i>	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
TNF Inkubiert	Prob <> Sep	MWU	0.0406	0.4466 (ns)
TNF TLR 2 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0028	0.0476
TNF TLR 4 Ligand	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
TNF TLR 7/8 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0013	0.0234
IL-6 <i>S. aureus</i>	Prob <> Sep	MWU	0.0041	0.0656 (ns)
IL-6 <i>E. coli</i>	Prob <> Sep	MWU	0.001	0.022
IL-6 Inkubiert	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-6 TLR 2 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0011	0.0231
IL-6 TLR 4 Ligand	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-6 TLR 7/8 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0073	0.1095 (ns)
IL-8 <i>S. aureus</i>	Prob <> Sep	MWU	0.4009	>0.9999 (ns)
IL-8 <i>E. coli</i>	Prob <> Sep	MWU	0.0336	0.4368 (ns)
IL-8 Inkubiert	Prob <> Sep	MWU	0.0084	0.1176 (ns)
IL-8 TLR 2 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0506	0.506 (ns)
IL-8 TLR 4 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.2558	>0.9999 (ns)
IL-8 TLR 7/8 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.284	>0.9999 (ns)
IL-10 <i>S. aureus</i>	Prob <> Sep	MWU	0.1273	>0.9999 (ns)
IL-10 <i>E. coli</i>	Prob <> Sep	MWU	>0.9999	>0.9999 (ns)
IL-10 Inkubiert	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-10 TLR 2 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.6035	>0.9999 (ns)
IL-10 TLR 4 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0012	0.024
IL-10 TLR 7/8 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.5176	>0.9999 (ns)
IL-1 β <i>S. aureus</i>	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-1 β <i>E. coli</i>	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-1 β Inkubiert	Prob <> Sep	MWU	0.0402	0.4824 (ns)
IL-1 β TLR 2 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.1435	>0.9999 (ns)
IL-1 β TLR 4 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0004	0.0092
IL-1 β TLR 7/8 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0001	0.0025
IL-1 α <i>S. aureus</i>	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-1 α <i>E. coli</i>	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-1 α Inkubiert	Prob <> Sep	MWU	0.4436	>0.9999 (ns)
IL-1 α TLR 2 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0002	0.0048
IL-1 α TLR 4 Ligand	Prob <> Sep	MWU	<0.0001	<0.0025
IL-1 α TLR 7/8 Ligand	Prob <> Sep	MWU	0.0012	0.0228

Von der Mehrfachtestkorrektur ausgenommen sind post-hoc Analysen (s.u.)

3.5.5 Globale F-Statistiken

Da die ICI von Sepsispatientenblut nicht im Vergleich zu Probandenproben erfolgte, wurde hier eine globale F-Statistik mit Post-Tests angewendet. Ich nutzte diesbezüglich den Friedman Test mit Dunn's Post-Test mit Adjustierung für multiples Testen jeder behandelten Probe gegen die zugehörige Negativkontrolle gemäß Standardeinstellungen in Graphpad Prism. Dabei bildet je ein Panel in Abbildung 4-33 die Grundlage für einen Friedman-Test. Da der Friedman-Test keine fehlenden Werte toleriert, wurden Zeilen mit fehlenden Werten für den Test nicht beachtet. Dies betraf insgesamt acht Einzelwerte, wovon zwei durch eine defekte Messplatte, zwei durch vollständige Probengerinnung, einer durch Verschütten der Probe, ein weiterer durch Kontamination, sowie zwei durch Verstopfen von Filtern des Luminex Geräts verursacht wurden. In keiner globalen F-Statistik wurden mehr als zwei Zeilen übergangen.

Für die Auswertung eines Versuchs während der Etablierungsphase erfolgte zudem eine Two-way-ANOVA (nach Zugabeschema und nach Dosierung) gemäß Standardeinstellungen in Graphpad Prism, im Falle einer signifikanten F-Statistik mit Dunnet's Post-Test mit Adjustierung für multiples Testen gegen die zugehörige Negativkontrolle.

3.5.6 Identifikation reaktiver Einzelproben

Um die Daten der *ex vivo* Behandlung mit Immuncheckpointinhibitoren auf mögliche ICI reaktive Patienten zu untersuchen, nutze ich das ROUT Verfahren (Motulsky and Brown, 2006) mit $Q=1\%$. Dies ermittelt auf Basis der Daten per robuster, nicht-linearer Regression eine zugrundeliegende Verteilung und untersucht die Einzelpunkte auf signifikante Abweichung von dieser Verteilung.

3.5.7 Post-hoc Analysen

Nach Erhebung der Daten verglich ich die IL-6 Konzentration nach 6 h Inkubation mit LPS (IL-6 Reaktivität auf LPS) zwischen Patienten mit und ohne septischen Schock, sowie zwischen Patienten, welche 28 Tage überlebt, den Krankenhausaufenthalt überlebt hatten, oder jeweils vorher verstorben waren und testete per Mann-Whitney Test.

Zudem verglich ich Alter, SOFA Score, Noradrenalin-Infusionsrate, Horowitz-Quotient, Baseline Konzentration von IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-1 β , oder α , von Leukozyten, CRP, PCT, oder mtDNA, oder IL-6 Reaktivität auf LPS zwischen ICI reaktiven (mindestens auf einen ICI; sowie einzeln PD-1, PD-L1, CTLA-4) und non-reaktiven Patienten per Mann-Whitney Test und Geschlecht, Häufigkeit des Vorliegens eines septischen Schocks, eines initial glaubwürdigem Keimnachweises, sowie einer maschinellen Beatmung zwischen ICI reaktiven und non-reaktiven Patienten per Fisher's exact Test.

4 ERGEBNISSE

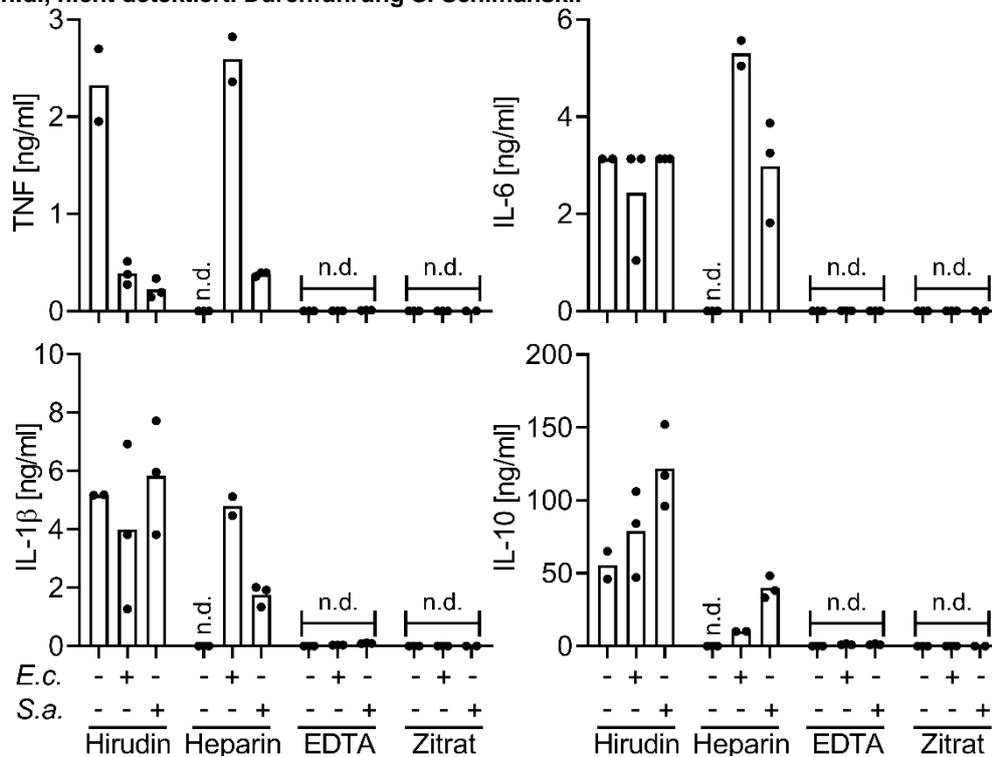
4.1 Etablierung eines Vollblut-Experimentalsystems zur Modellierung der Sepsis

Ein Kernziel dieses Projekts ist die Modellierung der Sepsis in einem möglichst patientennahen Experimentalsystem. Da Vollblutproben zur klinischen Routinediagnostik ohnehin entnommen werden, sind diese regelmäßig verfügbar und enthalten konzeptionell nicht nur alle zirkulierenden Immunzellen, sondern in der Sepsis auch Erreger sowie deren Bestandteile und Medikamente wie Antibiotika. Da Vollblut nach Entnahme jedoch rasch gerinnt, ist eine Antikoagulation erforderlich. Frisch entnommene Vollblutaliquots wurden daher mit verschiedenen Antikoagulantien und zur Modellierung der Immunreaktion mit verschiedenen mikrobiellen Substanzen kultiviert. Es erfolgte die photometrische Messung von Zytokinkonzentrationen per ELISA. Da das in Erythrozyten enthaltene Hämoglobin Licht verschiedener Wellenlängen absorbiert und fluoresziert wurde per Zentrifugation die zelluläre Fraktion vom Überstand (Plasma) getrennt; die Messung erfolgte im Überstand.

4.1.1 Durchführbarkeit und Robustheit von Vollblutkulturen als Experimentalsystem der septischen Inflammation

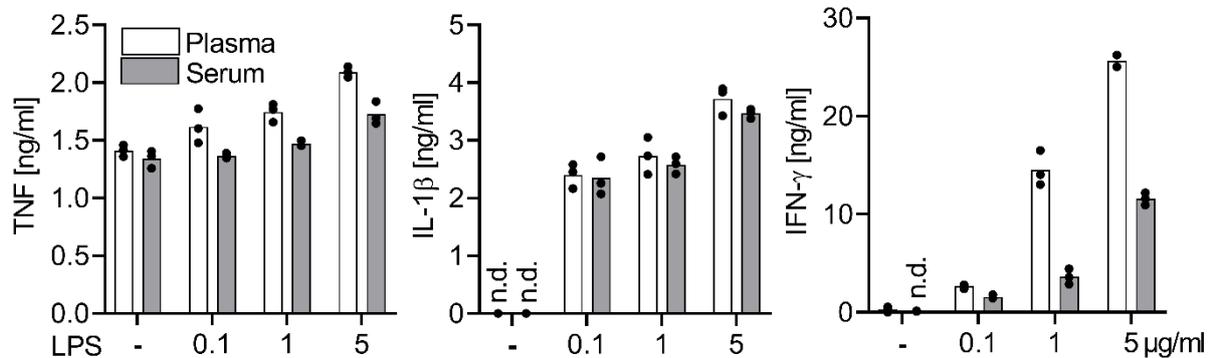
Eine Antikoagulation mit Zitrat oder EDTA unterdrückte die Reaktion auf bakterielle Immunstimuli. Unter Antikoagulation mit Hirudin kam es hingegen zu einer Zytokinproduktion ohne Stimulation (s. Abb. 4-1), weshalb Heparin als Antikoagulanz für weitere Versuche ausgewählt wurde.

Abbildung 4-1 Immunresponsivität von Vollblut unter Antikoagulation mit verschiedenen Substanzen: 16 h Inkubation von Vollblut eines gesunden Probanden unter Antikoagulation mit 1.6 mg/ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0.106 mol/l Trinatrium-Zitrat (Zitrat), 525 Anti-Thrombin-Einheiten / ml Hirudin, oder 16 I.E./ml Ammonium-Heparin (Heparin) mit hitzeinaktivierten *S. aureus* (S.a.; 10^3 c.f.u./ml) oder *E. coli* (*E.c.*; 10^4 c.f.u./ml) Bakteriensuspensionen. Triplikate. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. n.d., nicht detektiert. Durchführung S. Schimanski.



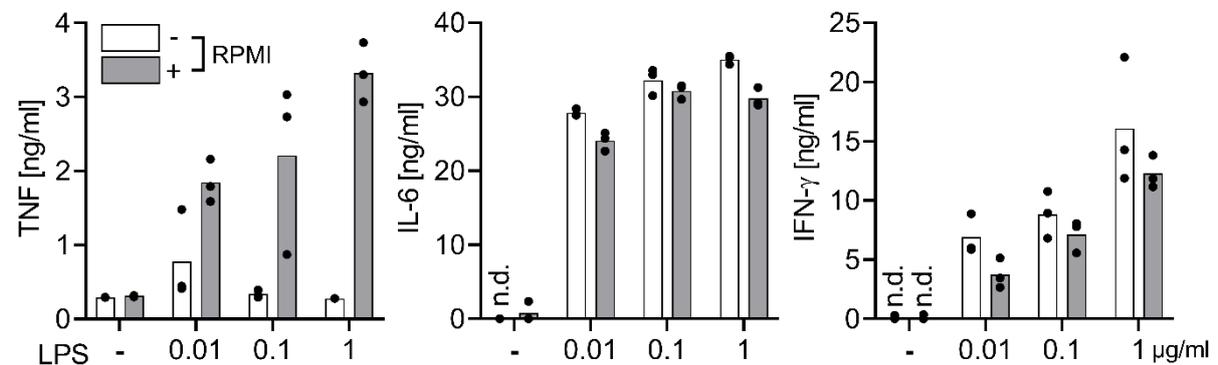
Trotz Heparinantikoagulation beobachtete ich jedoch gelegentliche Thrombusformation in den Proben. Da diese Thromben bisweilen die Messung der Zytokine behinderten (Verdecken von well-Bodenfläche während der ELISA, Lichtbrechung, Verstopfen von Luminex-Filtern) erprobte ich die Gewinnung von Serum aus dem nach Inkubation gewonnenen Heparin-Plasma. Dazu fügte ich dem Plasma Protamin zu, um Heparin zu antagonisieren und die Gerinnung in reproduzierbarer Weise einzuleiten. Thrombus und Serum ließen sich hiernach jedoch durch bloße Zentrifugation regelmäßig nicht trennen. Ich erprobte daher die Zentrifugation der Proben durch eine zweistufige Filterplatte (jeweils zur Entfernung grober und feiner Thromben). Es wurden diverse Konzentrationen, Inkubationszeiten und Zentrifugationsbedingungen erprobt (s. Abschnitt 3.4.5). Durch Zugabe von 4 I.E. Protamin / ml Plasma, 5 min Inkubation, Zentrifugation bei 1000xG für 15 min konnten reproduzierbar konstante Mengen Serum aus dem Plasma gewonnen werden. Trotz vorherigen ‚Blockings‘ der Platte (mit Elisa Blocking Buffer) fand jedoch Proteinadsorption an die Platte statt, wodurch die Konzentration von Immunmediatoren substanziell und differentiell vermindert wurde (s. Abb. 4-2). Folglich verwendete ich dieses Verfahren nicht weiter.

Abbildung 4-2 Zytokinverlust durch Serumpräparation aus LPS-stimuliertem Vollblutplasma: Inkubation von Vollblut mit 16 I.E./ml Heparin mit oder ohne LPS für 16 h. Zentrifugation bei 500xG und Abnahme des Überstands (Plasma). Messung der Zytokinkonzentrationen im Plasma oder nach Gewinnung von Serum: Hierzu Addition von 4 I.E./ml Protamin, 5 min Inkubation, Zentrifugation durch eine zweistufige Filterplatte (1000xG, 15 min, Porengröße 1,2 / 0,65 µm). Triplikate. Mittelwerte mit Einzelpunktendarstellung. n.d., nicht detektiert.



Alternativ verdünnte ich Blut mit Medium, um der Bildung größerer Thromben entgegenzuwirken. Eine Verdünnung von Vollblut in RPMI 1640 verringerte nicht nur die Zytokinkonzentrationen substantziell, sondern auch unterschiedlich stark in Bezug auf verschiedene Zytokine (s. Abb. 4-3).

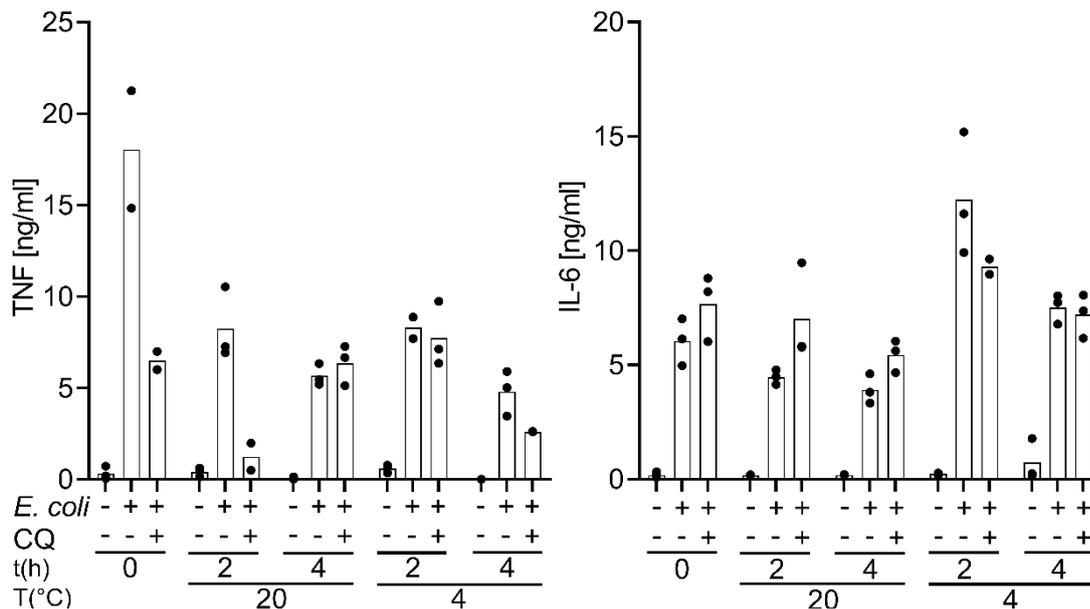
Abbildung 4-3 Differentielle Veränderung der Immunreaktion von Blutleukozyten durch Verdünnung in Medium: Inkubation von Heparin-antikoaguliertem Vollblut unverdünnt (weiß) oder 1:4 verdünnt in RPMI 1640 (grau) mit oder ohne LPS für 16 h. Triplikate. Mittelwerte mit Einzelpunktendarstellung. n.d., nicht detektiert.



Ich entfernte daher in allen weiteren Versuchen eventuell geformte Thromben vor der Messung manuell aus dem Plasma.

Um die Robustheit des Experimentalsystems „Vollblutkultur für funktionelle Analysen“ zu untersuchen unterzog ich Vollblutaliquots einer Zeit- und Temperaturkinetik. Als realitätsnahen Immunstimulus verwendete ich hitzeinaktivierte *E. coli* Bakterien in Anwesenheit von Chloroquin, welches als etablierter Inhibitor endosomaler Immunaktivität die zelluläre Erkennung mikrobieller Komponenten (hier h.i. *E. coli*) hemmt. Durch die Lagerung nahm die Produktion von TNF und IL-6 durch die Blutproben in Reaktion auf hitzeinaktivierten *E. coli* ab (s. Abb. 4-4). Proben reagierten ähnlich nach Lagerung bei 4°C oder 20°C, weshalb aus logistischen Gründen Proben von Sepsispatienten für den Transport von Intensivstation ins Labor nicht gekühlt wurden.

Abbildung 4-4 Lagerungsbedingte Abnahme der Immunreaktivität von Vollblut: Inkubation von Vollblut für 16 ohne oder mit hitzeinaktivierten 10^4 c.f.u. *E. coli* Bakterien und 10 $\mu\text{g/ml}$ Chloroquin (CQ) unmittelbar nach Blutentnahme oder nach Lagerung für 2 h oder 4 h bei 4°C oder 20°C. Zeit t in Stunden (h), Temperatur (T) in °C. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate.

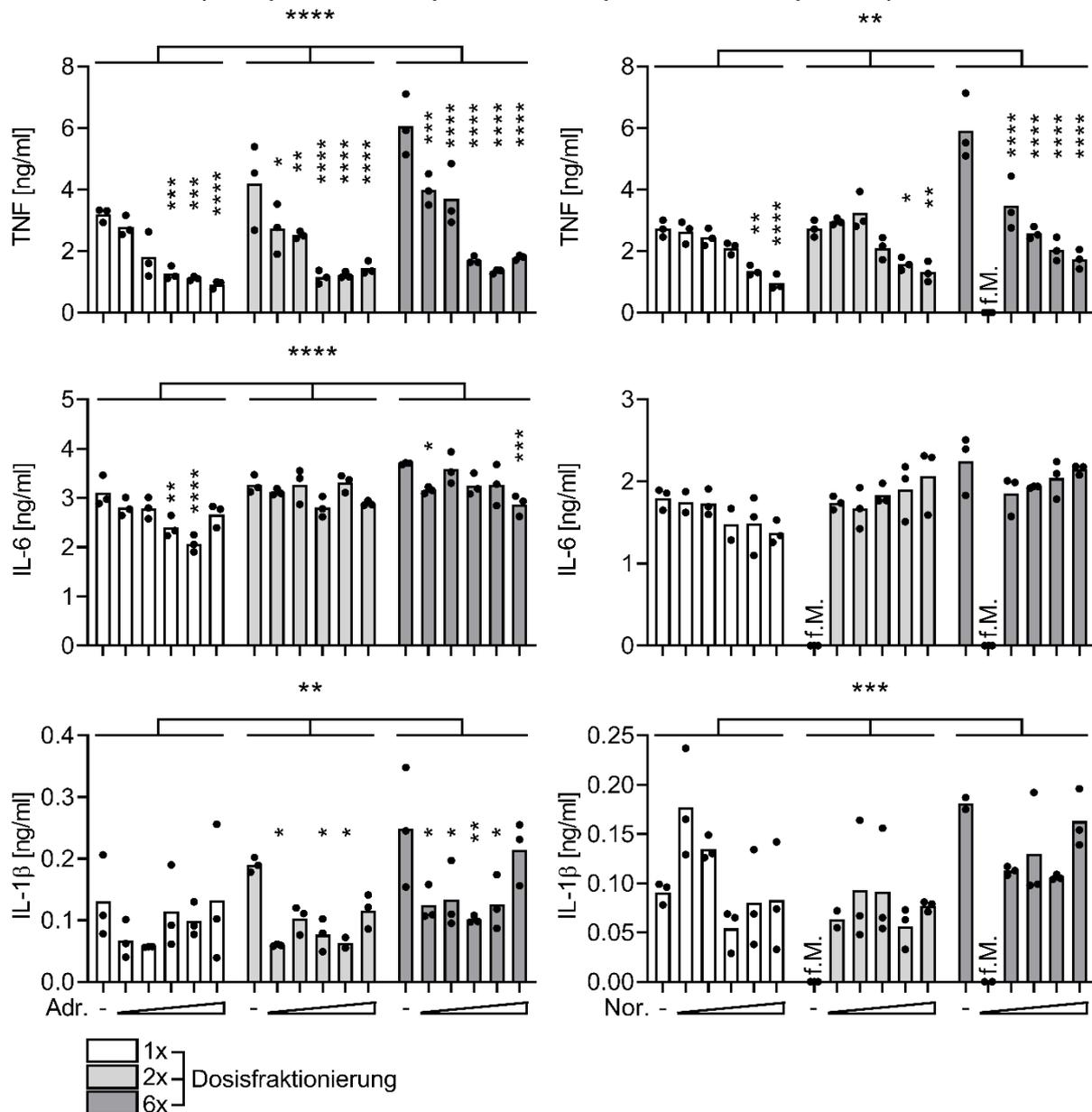


Dieses Experiment verdeutlicht die Notwendigkeit eines schnellen Probenverkehrs und einer zügigen Verarbeitung. Die Transportzeit des Patientenbluts von Blutentnahme bis Beginn der Bearbeitung lag bei ca. 60 Minuten.

4.1.2 *Ex vivo* Gabe von Katecholaminen zur Simulation der Therapie des septischen Schocks im Experimentalmodell

Ein großer Teil der untersuchten Sepsispatienten stand zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter Katecholamintherapie. Katecholamine haben jedoch eine kurze Halbwertszeit (Vögtli, 2020). Vor diesem Hintergrund erwog ich, das Experimentalmodell um Katecholamingaben zu ergänzen und supplementierte LPS-stimulierte Vollblutproben gesunder Probanden mit Katecholaminen. Dabei wählte ich Dosierungen entsprechend Plasmakonzentrationen, die unter Sepsistherapie beschrieben werden (Beloil et al., 2005). Angesichts des schnellen Katecholaminabbaus in Blut verglich ich einmalige und fraktionierte Zugabe der Katecholamine in Vollblutkultur (s. Abb. 4-5). Sowohl Noradrenalin als auch Adrenalin hemmten mit steigender Dosis signifikant die Produktion von TNF. Eine beobachtete Konzentrationserhöhung von TNF und IL-1 β durch fraktionierte statt einmaliger Gabe trat auch bei fraktionierter PBS-Gabe (als Negativkontrolle) auf und ist daher am ehesten auf mechanische Reizung der Zellen und nicht auf einen Katecholamin-Effekt zurückzuführen.

Abbildung 4-5 Senkung der LPS-stimulierten TNF Produktion von Vollblut durch Adrenalin und Noradrenalin: 6 h Inkubation von Vollblut mit 1 ng/ml LPS:O111. Zugabe von Adrenalin (Adr.) oder Noradrenalin (Nor.) in aufsteigender Gesamtdosis (Dreiecke von niedrig nach hoch) von 0.003, 0.03, 0.3, 3, oder 30 ng/ml in PBS, jeweils fraktioniert auf eine Gabe zu Inkubationsbeginn (1x), je eine Gabe zu Inkubationsbeginn und 3 h später (2x; je halbe Dosis), oder je eine Gabe ab Inkubationsbeginn stündlich (6x; je sechstel-Dosis). Zugabe von PBS als Negativkontrolle. Triplikate. Mittelwert mit Einzelpunktendarstellung. Two-way ANOVA (nach Fraktionierung und Dosis), Dunnet's Post-Test adjustiert für multiples Testen. Ergebnisse der Signifikanztestung in Bezug auf die Fraktionierung als Klammer oberhalb der Panele, in Bezug auf die Katecholamindosis (jeweils gegen die zugehörige Negativkontrolle) über der Säule (* \triangleq $p \leq 0.05$, ** \triangleq $p \leq 0.01$, *** \triangleq $p \leq 0.001$, **** \triangleq $p \leq 0.0001$). f.M., Messfehler.



Dennoch entschied ich schließlich wegen Überschreitung der logistischen Kapazität (Probenzahl) Katecholamingaben nicht ins Experimentalmodell zu inkludieren.

4.1.3 Immunstimulation menschlichen Vollbluts durch spezifische, sepsisrelevante P/DAMPs und Erkennungshemmung per TLR-Inhibition

Vorexperimente meiner Arbeitsgruppe (Kruger et al., 2015; Meng et al., 2004; Spiller et al., 2008) hatten TLR2 und -8 als wesentliche Sensoren für Gram-positive und TLR2 und -4 für Gram-negative Bakterien identifiziert. In Zellkultur und im Mausmodell etablierte spezifische Antikörper zeigten sich auch im menschlichen Vollblut-Modell als wirksam. Die monoklonalen Antikörper T2.5 (gegen TLR2) und 3C3 (gegen TLR4) bewirkten eine substantielle Hemmung der Zytokinproduktion auf assoziierte Stimuli hin, auch wenn eine Reststimulation der IL-6 Produktion verblieb (s. Abb. 4-6).

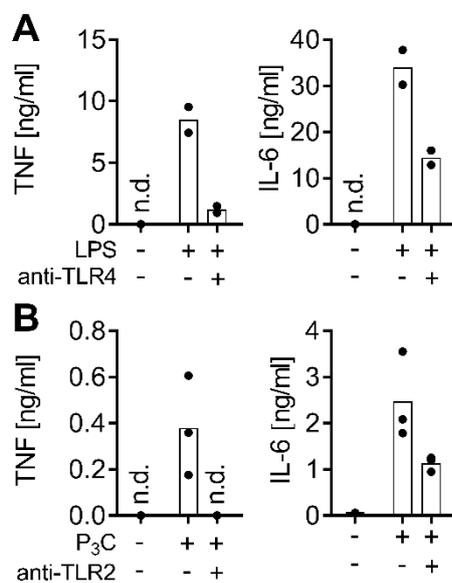
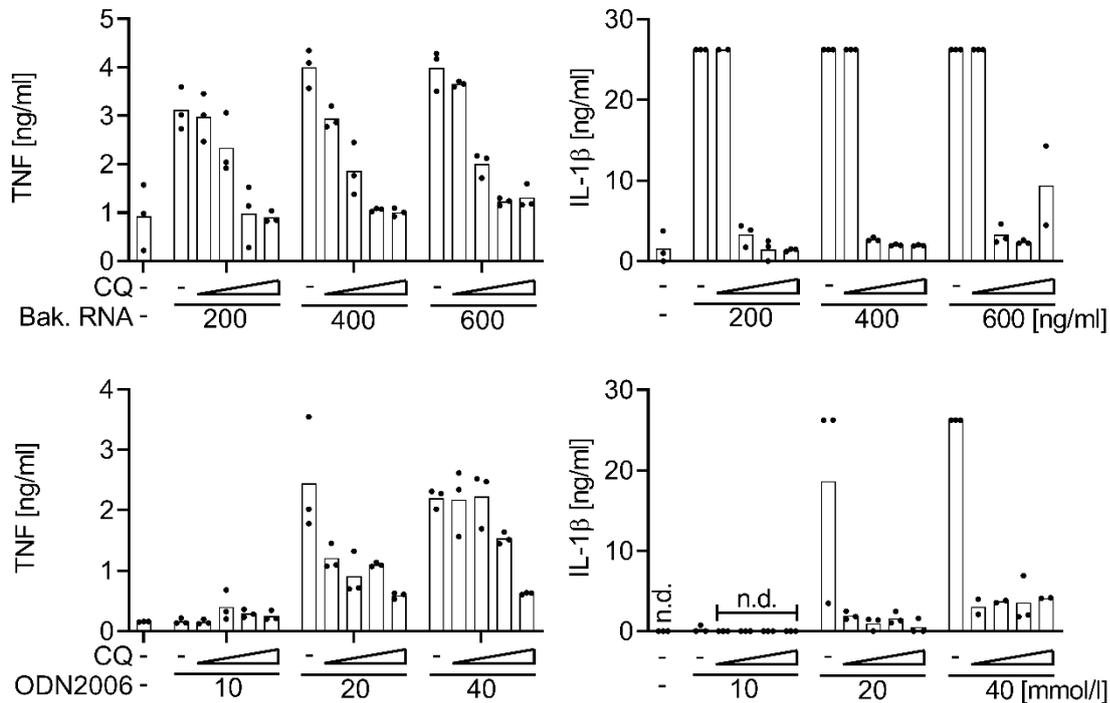


Abbildung 4-6 Spezifische Stimulation und Hemmung von TLR2 und -4 in Vollblut: Inkubation von Vollblut eines gesunden Probanden mit 15 µg/ml monoklonalem TLR-inhibitorischem Antikörper für 6 h. Zugabe eines spezifischen TLR Liganden 30 min nach Inkubationsbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunktdarstellung. n.d., nicht detektiert. A anti-TLR4 monoklonaler Antikörper 3C3 und TLR4 Ligand LPS:O111 (100 ng/ml), Duplikate; B anti-TLR2 monoklonaler Antikörper T2.5 und TLR2 Ligand P₃C (20 µg/ml). Triplikate.

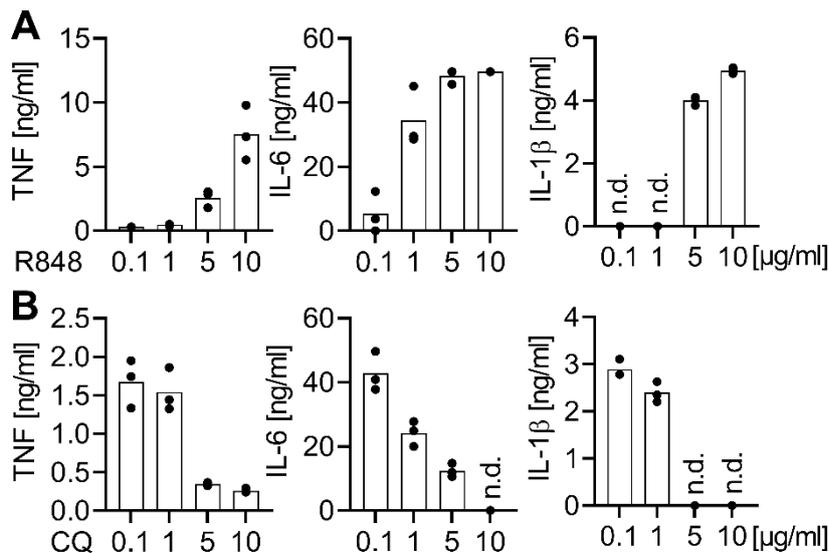
Als Hemmstoff der Nukleinsäureerkennung im Endosom verwendete ich Chloroquin, einen etablierten Inhibitor der endosomalen Ansäuerung und Rezeptorfunktion (s. auch Abschnitt 1.6). In einer Dosis von 5 µg/ml hemmte dies die Produktion von TNF und IL-1β substantiell, selbst bei Konfrontation des Vollbluts mit hohen Nukleinsäuredosen (isolierte Gesamt-RNA von *E. coli* oder ODN 2006, ein Oligodesoxyribonukleotid). Die Chloroquinwirkung ließ sich ab einer Konzentration von 10 µg/ml durch Dosiserhöhung nicht weiter steigern (s. Abb. 4-7).

Abbildung 4-7 Stimulation und Hemmung von TLR7/8 und -9 in Vollblut: Inkubation für 16 h von Vollblut mit Chloroquin (CQ) in aufsteigender Dosis (Dreieck von niedrig nach hoch) von 1, 5, 10, 20 µg/ml. Zugabe des TLR9 Liganden ODN2006 bzw. isolierter RNA von *E. coli* Bakterien (Bak. RNA, TLR7/8 Ligand). Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert.



Eine vollständige Hemmung der Zytokinproduktion nach Stimulation mit 5 µg/ml R848 (ein synthetischer TLR7/8 Stimulus) gelang durch 5 oder 10 µg/ml Chloroquin (s. Abb. 4-8).

Abbildung 4-8 Dosiskinetik einer spezifischen TLR7/8 Stimulation und der Hemmung mit Chloroquin: 6 h Inkubation von Vollblut mit A verschiedenen Dosen des TLR7/8 Stimulus R848 B verschiedenen Dosen Chloroquin (CQ) mit 5 µg/ml R848 (Zugabe 30 min nach Inkubationbeginn). Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert.



Zur Evaluierung der Spezifität und Toxizität der Chloroquinwirkung im Experimentalmodell „menschliches Vollblut“ verwendete ich zudem den Phorbol ester PMA mit Ionomycin als TLR-unabhängigen Immunstimulus (Crawford et al., 2014). PMA stimuliert Proteinkinase C,

Ionomycin erhöht als Kalzium-Ionophor die intrazelluläre Kalziumkonzentration, was die Signalweiterleitung über die Proteinkinase C und den Nuklearer-Faktor-aktivierter-T-Zellen-Signalweg ermöglicht, sowie die Exozytose gebildeter Zytokine verstärkt. Zusammen stimulieren diese Substanzen unabhängig von Rezeptoren der Zellmembran oder der Endosomen das Immunsystem, hier spezifisch die Produktion proinflammatorischer Zytokine. In einer Dosis von $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ inhibierte Chloroquin auch diese TLR-unabhängige Zytokinproduktion, was diese und höhere Chloroquindosierungen als toxisch bzw. unspezifisch inhibierend qualifizierte. Eine Dosis von $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ Chloroquin hingegen hemmte die TLR-unabhängige Zellaktivierung durch PMA + Ionomycin nicht (s. Abb. 4-9), während sie die TLR-abhängige Zellaktivierung substanziell hemmt (s.o.).

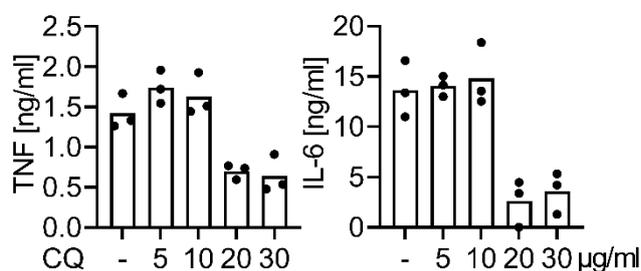


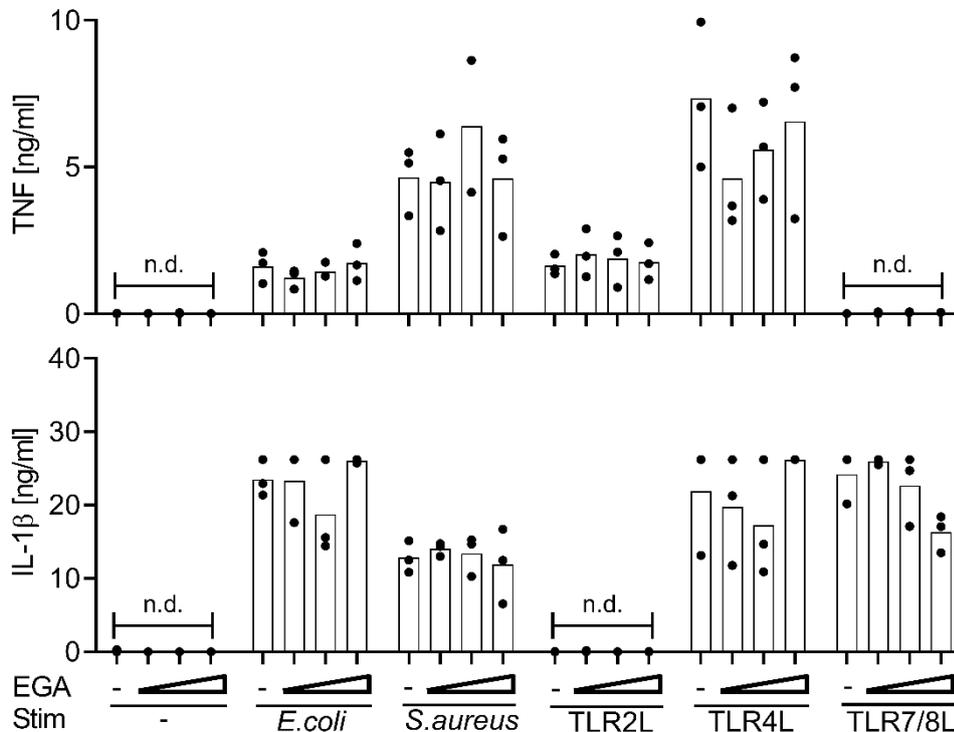
Abbildung 4-9 Toxizitätskontrolle von Chloroquin im Vollblutmodell: 6.5 h Inkubation von Vollblut mit Chloroquin (CQ) in Dosen von 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$. Zugabe von 0.2 $\mu\text{g/ml}$ PMA und 0.14 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin 30 min nach Inkubationsbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunktdarstellung. Triplikate.

Eine Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ Chloroquin war im Vollblutmodell also zur Hemmung der Nukleinsäureerkennung geeignet.

4.1.4 EGA als alternativer Inhibitor der Endosomenfunktion

Angesichts der unspezifischen Hemmung der Zytokinproduktion durch Chloroquin in hohen Dosierungen zog ich zwischenzeitlich die Verwendung von 4-bromobenzaldehyde N-(2,6-dimethylphenyl)semicarbazon („EGA“, (Gillespie et al., 2013)) als alternativen Endosomeninhibitor in Betracht. EGA blockiere laut Erstbeschreibern den Substanztransport vom frühen zum späten Endosom, hierdurch könnte es die Nukleinsäureerkennung durch endosomale TLRs hemmen, konzeptionell ohne die Endosomenfunktion global zu behindern. Es zeigte sich im Gegensatz zu Chloroquin bei EGA-Gabe jedoch keine substanzielle Senkung der Zytokinproduktion in Reaktion auf *E. coli* oder *S. aureus* Bakterien sowie spezifische TLR 2, -4 oder -7/8 Liganden (s. Abb. 4-10).

Abbildung 4-10 Keine Hemmung der Immunstimulation durch den Endosomeninhibitor EGA: 6 h Inkubation von Vollblut mit 2 µl/well DMSO ohne oder mit EGA in aufsteigender Dosis (Dreiecke von niedrig nach hoch) von 2,5, 5, 10 µmol/l. 30 min nach Inkubationsbeginn Zugabe der TLR-Liganden LPS:O111 (TLR4L; 1 ng/ml), R848 (TLR7/8L; 5 µg/ml), P₃C (TLR2L; 10 µg/ml), oder von 10⁵ c.f.u./ml hitzeinaktivierten *E. coli* oder 10⁶ c.f.u./ml hitzeinaktivierten *S. aureus* Bakteriensuspensionen. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert.



Folglich nutzte ich weiterhin Chloroquin als Inhibitor der Endosomenfunktion.

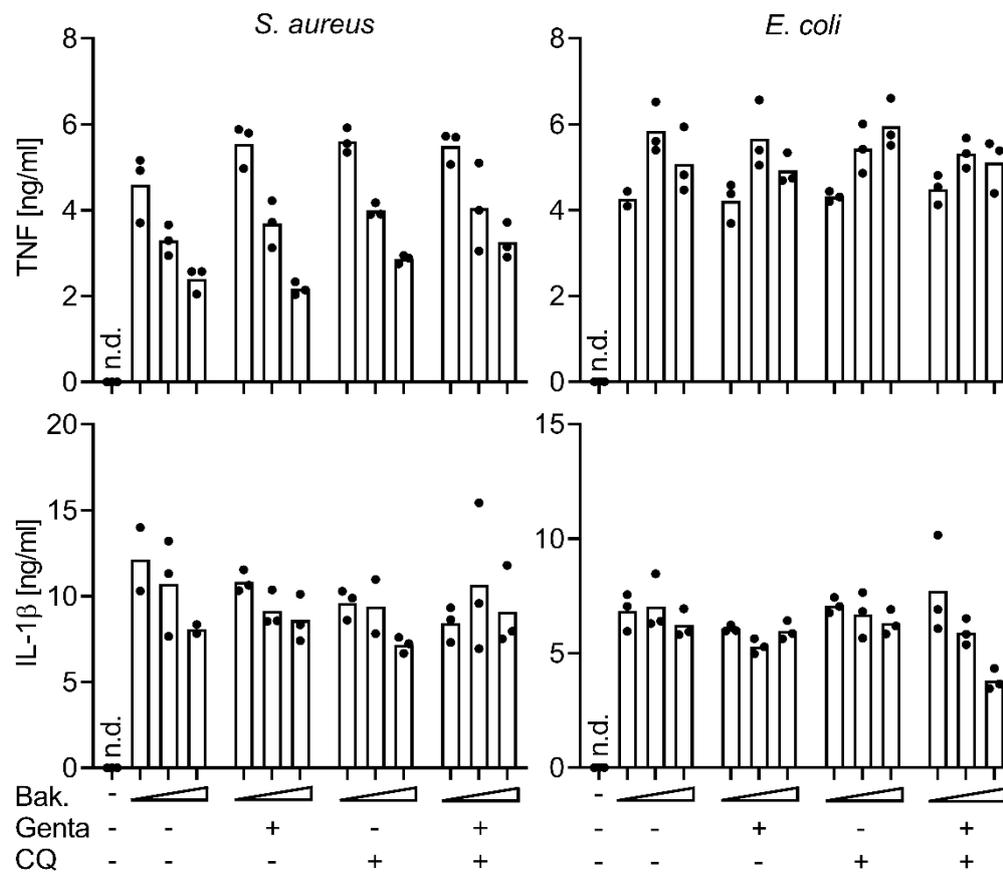
Nebenbefundlich fällt auf, dass eine reine TLR2-Stimulation (in der gewählten Dosis) hier keine IL-1β Produktion, sowie eine TLR7/8-Stimulation keine TNF Produktion stimuliert.

4.1.5 Immunstimulation menschlichen Vollbluts durch sepsisrelevante Bakterien und Erkennungshemmung per TLR-Inhibition

Die Sepsis wird durch die Konfrontation von Immunzellen mit Bakterien und deren Produkten verursacht. Um die Komplexität des Erreger-Wirt-Kontakts im Therapiesetting zu modellieren, unterzog ich Bakterienkulturen während der exponentiellen Wachstumsphase einer Gentamicinbehandlung, um die Bakterienzellen abzutöten, doch ihre Integrität weitgehend zu erhalten. Gentamicin ist ein Ribosom-hemmendes Aminoglykosid-Antibiotikum, welches sowohl gegenüber *S. aureus* als auch *E. coli* zytotoxisch wirkt und die Bakterienzellwand intakt lässt. Die minimale bakterizide Konzentration von Gentamicin liegt bei 7.5 µg/ml für *E. coli* und 10 µg/ml für *S. aureus* (Chikezie, 2017), folglich wählte ich eine Gentamicinkonzentration von 10 µg/ml. Eine um 2 h verzögerte Antibiotikabehandlung veränderte die Immunaktivierung durch bakterielle Präparate nicht wesentlich (s. Abb. 4-11). Die Stimulation wurde jedoch durch die Inhibition der endosomalen TLR mit Chloroquin nicht gehemmt, was darauf hinweist, dass

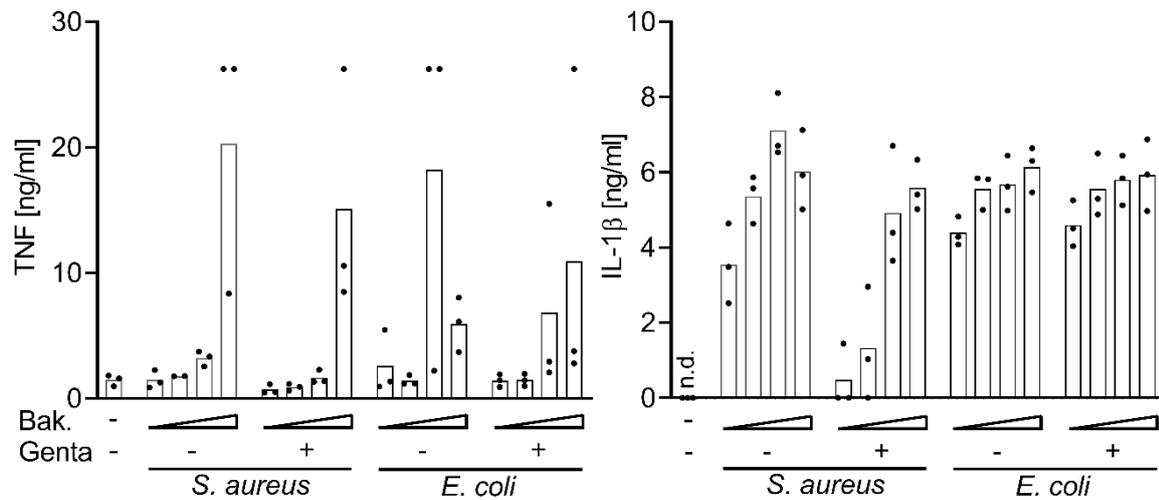
die Immunzellaktivierung über die Zelloberflächenrezeptoren TLR2 und -4 im gewählten Modell bereits maximal war, was einen möglichen Effekt der Antibiotikabehandlung verschleiern könnte. Zudem ist eine Abnahme der Zytokinproduktion unter höheren Konzentrationen von *S. aureus* zu beobachten, was auf einen toxischen Effekt auf die Blutimmunzellen hinweist.

Abbildung 4-11 Weitgehende Unabhängigkeit der bakteriell stimulierten Zytokinproduktion in Vollblut von Bakterienkonzentration, Antibiotikatherapie und endosomaler Hemmung: Inkubation von Vollblut für 16 h mit vitalen *E. coli* Bakterien (Bak.) in aufsteigender Dosis (Dreieck von niedrig nach hoch) von 10^3 , 10^4 , 10^5 c.f.u. / ml oder *S. aureus* Bakterien (10^4 , 10^5 , 10^6 c.f.u. / ml). Zugabe von 10 µg/ml Chloroquin (CQ) und 10 µg/ml Gentamicin (Genta) 2 h nach Inkubationbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunktdarstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert.

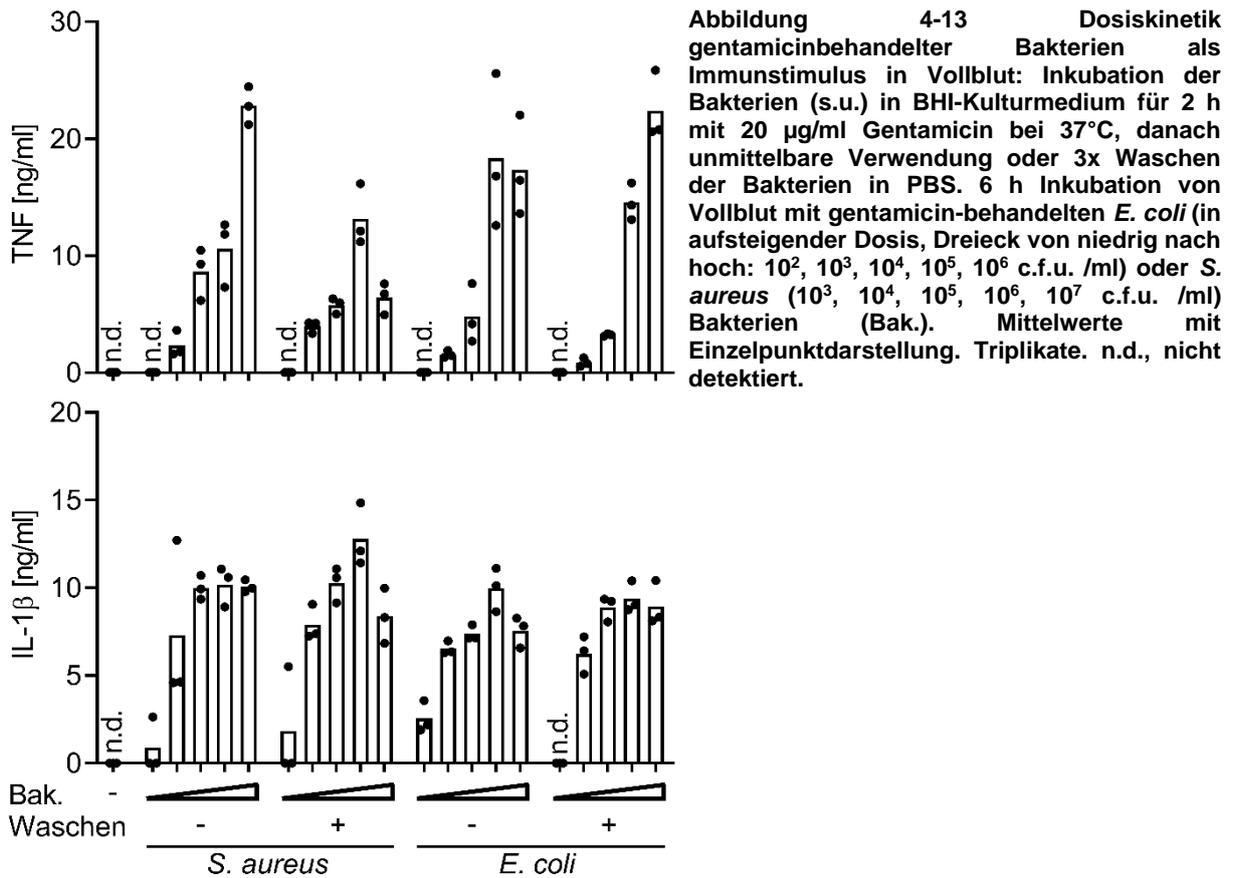


Die beobachtete maximale Stimulation der Zytokinproduktion könnte in der langen Inkubationszeit (16 h) begründet liegen. Durch eine verkürzte Inkubationszeit demaskierte sich eine positive Dosiskinetik in Bezug auf die Stimulation der Zytokinproduktion in Reaktion auf lebendige Bakterien (s. Abb. 4-12) sowohl mit als auch ohne nachfolgende Antibiotikatherapie. In beiden Experimenten kam es nie zu einem bakteriellen Überwachen der Blutproben.

Abbildung 4-12 Dosiskinetik bakterieller Immunstimulation mit zweizeitiger Antibiotikagabe in Vollblut: Inkubation von Vollblut für 6 h mit *E. coli* Bakterien (Bak.) in aufsteigender Dosis (Dreieck von niedrig nach hoch) von 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 c.f.u./ml oder *S. aureus* Bakterien (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 c.f.u. / ml). Zugabe von 10 µg/ml Gentamicin eine Stunde nach Inkubationsbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate.

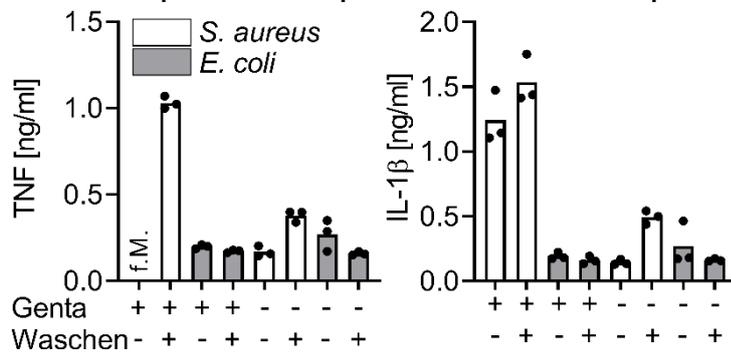


Lebende Bakterien jedoch sind ein komplexes biologisches System dessen robuste Vorhaltung logistisch besonders anspruchsvoll ist. Die Verwendung von Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase ist üblich. Patientenproben fallen jedoch unplanbar an, weshalb Zeitverzug zwischen Patientenprobeneingang und dem Einsatz lebendiger Bakterien nicht zu vermeiden wäre. Ich erprobte daher verschiedene Methoden zur Inaktivierung / Abtötung der Bakterien um eine stabile Aufbewahrung zu ermöglichen. Die Sterilisation der Proben wurde durch Übernachtinkubation eines 3-Ösenausstrichs auf Blutagar überprüft. In der Erprobung verschiedener Gentamicindosen (0 – 200 µg/ml), Inkubationszeiten (0.5 – 6 h) und Inkubationsbedingungen (20 – 37°C) gelang für *E. coli* eine Sterilisation (200 µg/ml Gentamicin, 6h Inkubation bei 37°C) der Probe, nicht jedoch für *S. aureus* (s. auch Abschnitt 3.4.2). Dennoch kam es in keinem Fall zu einem Überwachsen der Blutproben mit Bakterien. Die Reaktion von Vollblut auf Gentamicin-vorbehandelte Bakterien (s. Abb. 4-13) war vergleichbar mit der Reaktion auf lebendige Bakterien (mit oder ohne zweizeitige Antibiotikatherapie *in vitro*; s.o.), dies war unabhängig vom Waschen der Bakterien nach Antibiotikabehandlung (zur Entfernung überschüssigen Gentamicins sowie eventueller bakterieller Fragmente aus der Suspension). Gentamicin-behandelte Bakterien erscheinen daher als Immunstimulus im Experimentalsystem Vollblut geeignet.



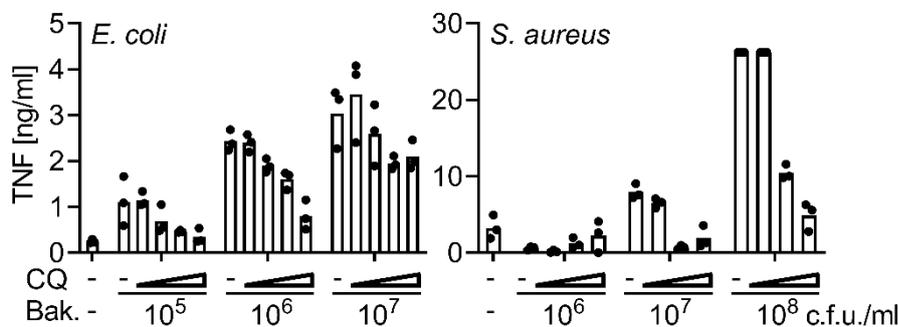
Da *S. aureus* jedoch Protein A (Kim et al., 2012) exprimiert, welches unspezifisch Antikörper bindet und damit einen möglichen Störfaktor der antikörperbasierten Zytokin-Konzentrationsmessung per ELISA darstellt, schloss ich ein Experiment an, in welchem ich Bakterien-suspensionen in Kulturmedium (Hirn-Herz-Infusion / BHI-Medium) als Probe auf ELISA-Messplatten auftrug. Diese Proben hatten keinen Kontakt zu Immunzellen, dennoch wies die ELISA vermeintlich substantielle Zytokin-Konzentrationen nach. Dieser Effekt trat bei Verwendung Gentamicin-behandelter Bakterien deutlich stärker auf, als bei Verwendung nicht vorbehandelter Bakterien und wurde durch mehrmaliges Waschen der Bakterienzellen (zur Entfernung von Protein A in Suspension) nicht vermindert (s. Abb. 4-14), was Gentamicin-behandelte Bakterien als Immunstimulus mit nachfolgender antikörperbasierter Messung der Zytokin-Konzentration disqualifiziert.

Abbildung 4-14 Falschpositive ELISA Messung bei Verwendung von Gentamicin-behandeltem *S. aureus*: Inkubation der Bakterien in BHI-Kulturmedium für 2 h mit 20 µg/ml Gentamicin bei 37°C, danach unmittelbare Verwendung oder 3x Waschen der Bakterien in PBS. ELISA mit PBS-Suspensionen von *E. coli* oder *S. aureus* Bakterien (je 10⁶ c.f.u./ml) mit oder ohne Gentamicin-Behandlung (Genta). Verwendung von TNF oder IL-1β-Primärantikörpern. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate. f.M., Messfehler.



Ich untersuchte daher die Immunstimulation durch hitzeinaktivierte Bakterien. Angesichts der Proteindenaturierung besteht hier konzeptionell keine Gefahr einer Messverfälschung durch Protein A. Da Sepsispatienten in der Regel mit bakterienzellwandtoxischen Antibiotika behandelt werden (Gregory A Schmidt and Jess Mandel, 2021), sowie die überwiegende Erregerabtötung am Ort der Primärinfektion stattfindet und zirkulierende Bakterien durch humorale und zelluläre Erregerabwehr rasch inaktiviert werden, sollten zudem konzeptionell auch *in vivo* zirkulierende Immunzellen in erster Linie mit inaktivierten Bakterien und Bakteriendetritus konfrontiert werden (Bryceson, 1976), welche bekanntermaßen in besonderem Maße Liganden der Mustererkennung darstellen. Die Probensterilisation war per 15 min Inkubation bei 96°C oder 2 h bei 60°C in jedem Fall erfolgreich (kein Wachstum im 3-Ösenausstrich). Hitzeinaktivierter *E. coli* und *S. aureus* stellten dosistitrierbare Immunstimuli im Experimentalmodell Vollblutkultur dar und die Stimulation wurde durch Chloroquin deutlich gehemmt (s. Abb. 4-15).

Abbildung 4-15 Dosiskinetik der Immunstimulation durch hitzeinaktivierten *E. coli* und *S. aureus* sowie der Hemmung durch Chloroquin: Inkubation von Vollblut für 6.5 h mit Chloroquin (CQ) in aufsteigender Dosis (Dreieck von niedrig nach hoch) von 1, 5, 10, 20 µg/ml. Zugabe von hitzeinaktivierten (96°C, 15 min) *E. coli* oder *S. aureus* Bakteriensuspensionen (Bak.) 30 min nach Inkubationsbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate.



Angesichts dieser Ergebnisse, der logistisch anspruchsvollen Vorhaltung lebender Bakterien in reproduzierbarer Form und falschpositiver Zytokinkonzentrationsmessungen bei Verwendung Gentamicin-behandelter Bakterien führte ich alle weiteren Experimente mit

hitzeinaktivierten Bakterien durch. Vorexperimente meiner Arbeitsgruppe legen nahe, dass ein qualitativer Unterschied der Immunstimulation durch Bakterien abhängig von Inaktivierungstemperatur und -zeit besteht, da bei niedrigeren Temperaturen bakterielle Enzyme, bspw. RNAsen, begrenzt weiter aktiv sind und potenzielle Immunstimuli verdauen. Im Experimentalmodell Vollblut zeigte sich eine insgesamt stärkere Immunstimulation durch hitzeinaktivierte als durch lebende Bakterien. Dies ist durch die Freisetzung zahlreicher PAMPs bei Fragmentation der Bakterienzellen gut erklärlich. Bakteriensuspensionen nach Inaktivierung bei 96°C stimulierten die Zytokinproduktion im Experimentalmodell Vollblut stärker als nach Inaktivierung bei 60°C. Diese Differenz wurde durch Zugabe von Chloroquin als Hemmstoff der endosomalen TLR vollständig gehemmt (s. Abb. 4-16). Passend zur Hypothese wurden also bei kurzer Inaktivierung bei hoher Temperatur endosomale TLR-Stimuli wie RNA erhalten, welche bei längerer Inaktivierung bei niedrigerer Temperatur nicht mehr vorlagen.

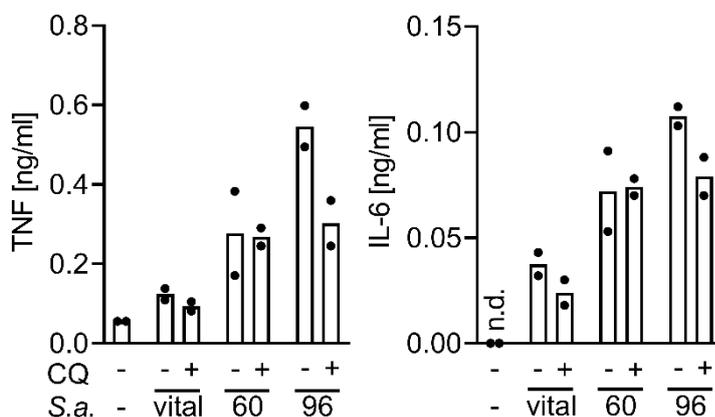


Abbildung 4-16 Verlust endosomaler TLR-Stimulation durch Bakterieninaktivierung bei 60°C, nicht aber bei 96°C: Inkubation von Vollblut für 6.5 h ohne oder mit 10 µg/ml Chloroquin (CQ). Zugabe 30 min nach Inkubationsbeginn von *S. aureus* Bakteriensuspensionen (*S.a.*) ohne (vital) oder mit vorheriger Hitzeinaktivierung für 15 min bei 96°C (96) oder für 2 h bei 60°C (60). Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Duplikate.

In der Sepsis ist bei Diagnosestellung der ursächliche Erreger üblicherweise nicht bekannt. Eine Immunhemmung zum frühzeitigen Einsatz in der Sepsis muss daher die Reaktion auf möglichst viele verschiedene sepsisursächliche Erreger erfassen. Darüber hinaus sollte eine solche Hemmung konzeptionell aufgrund möglicher Redundanz alle relevanten Signalwege erfassen. Nur die kombinierte Inhibition der Zelloberflächenrezeptoren TLR2 und -4 durch blockierende Antikörper und der endosomalen TLR durch Chloroquin vermag die Immunreaktion von menschlichem Vollblut auf die typischen Sepsiserreger *S. aureus* (Gram-positiv) und *E. coli* (Gram-negativ) umfassend zu hemmen (s. Abb. 4-17).

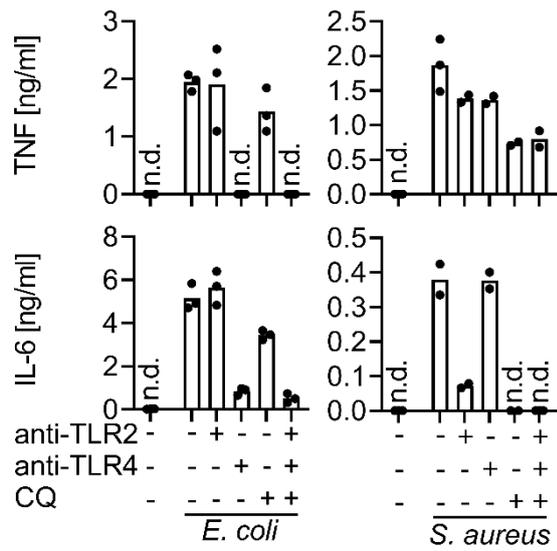


Abbildung 4-17 Kombinierte TLR-2, -4, -7/8 Inhibition zur Hemmung der Immunaktivierung durch *E. coli* und *S. aureus*: 6.5 h Inkubation von Vollblut mit 15 µg/ml anti-TLR2 (T2.5), 15 µg/ml anti-TLR4 (3C3) Antikörpern und / oder 10 µg/ml Chloroquin (CQ). Zugabe von 10⁵ c.f.u./ml hitzeinaktivierten *E. coli* oder 10⁶ c.f.u./ml *S. aureus* Bakteriensuspensionen 30 min nach Inkubationsbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunktdarstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert.

4.1.6 Immuncheckpoint-Inhibition zur Enthemmung der Immunreaktion von Vollblut und Blutleukozyten

In der Sepsis wird die Immunreaktion unter anderem durch Korezeptoren der immunologischen Synapse, bspw. durch s.g. Immuncheckpoint-Moleküle wie PD-1 / L1 und CTLA-4 gehemmt. Um den Effekt einer Immuncheckpoint-Inhibition auf die septische Immunreaktion zu untersuchen, inkubierte ich Blutproben mit den monoklonalen, klinisch etablierten Immuncheckpointinhibitor-Antikörpern (ICI) Nivolumab, Pembrolizumab (beide anti-PD-1), Atezolizumab (anti-PD-L1) und Ipilimumab (anti-CTLA-4). Initial verwendete ich hierzu Blutproben gesunder Probanden mit oder ohne Immunstimulation durch LPS. Hierin zeigte sich kein substanzieller Effekt der ICI auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 β oder des antiinflammatorischen IL-10 sowohl bei einer Vorinkubation des Bluts mit ICI Antikörpern für 30 min (s. Abb. 4-18), als auch bei Inkubation für 16 h (nicht gezeigt). Als Positivkontrolle verwendete ich Interferon (IFN) γ , auch dieses übte jedoch keinen substanziellen Effekt auf die Zytokinproduktion im Experimentalmodell Vollblutkultur aus.

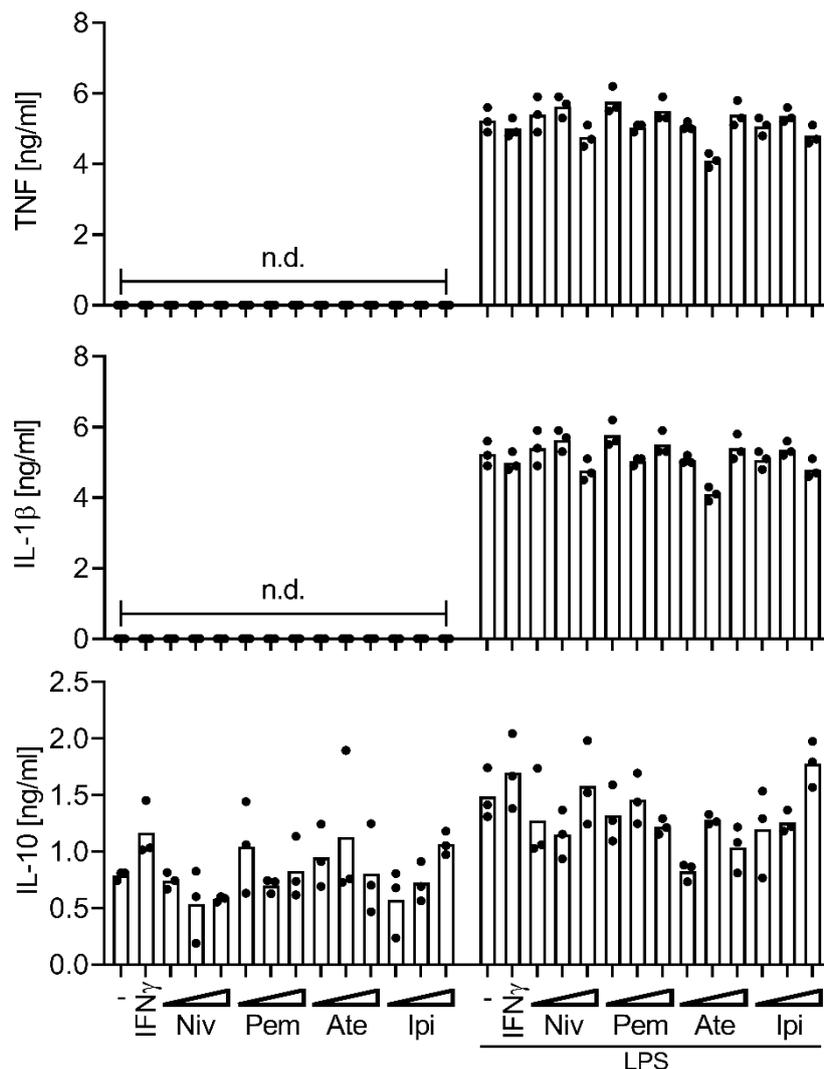
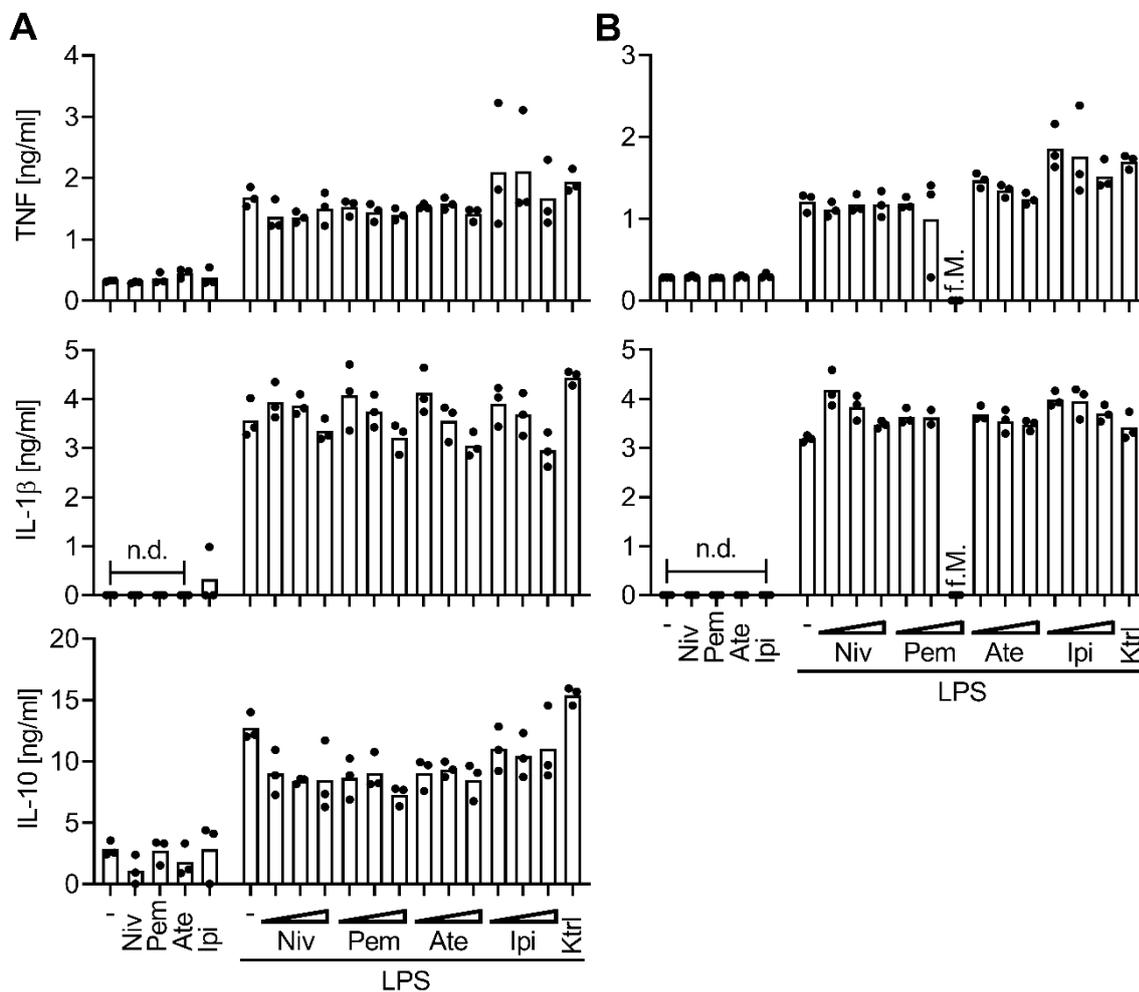


Abbildung 4-18 Kein Effekt von ICI auf die Zytokinproduktion von Vollblut unabhängig von einer LPS Stimulation: 6.5 h Inkubation von Vollblut mit ICI-Antikörpern in aufsteigender Dosis (Dreieck von niedrig nach hoch) von 2.5, 10, oder 30 μ g/ml Nivolumab, Pembrolizumab (Niv, Pem; beide anti PD-1), Atezolizumab (Ate; anti PD-L1), (Ipi; Ipilimumab anti CTLA-4) oder 30 ng/ml Interferon (IFN) γ . Zugabe von 1 μ g/ml LPS:O111 30 min nach Inkubationbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert.

Diese Ergebnisse stellten die Eignung einer einfachen LPS-Stimulation in Vollblut als Experimentalmodell der septischen Hypoinflammation infrage. Eine mögliche Erklärung bietet eine unspezifische Antikörperbindung oder mangelnde Antikörperdistribution im zellreichen Vollblut. Ich konfrontierte daher Medium-verdünntes Vollblut und PBMC mit ICI Antikörpern (s. Abb. 4-19). Auch hier zeigte sich jedoch kein substanzieller Effekt der Checkpointinhibition auf die Zytokinproduktion unabhängig von einer LPS-Stimulation.

Abbildung 4-19 Kein Effekt von ICI auf die Zytokinproduktion von verdünntem Vollblut oder PBMCs unabhängig von einer LPS Stimulation: Inkubation für 22 h von **A** Vollblut verdünnt 1:4 in RPMI 1640 oder **B** PBMC jeweils mit Nivolumab, Pembrolizumab (Niv, Pem; beide anti PD-1), Atezolizumab (Ate; anti PD-L1), (Ipi; Ipilimumab anti CTLA-4), oder anti-Fluorescein Immunglobulin G (Negativkontrolle, Ktrl) in 30µg/ml (Einzeldosis) oder in aufsteigender Dosis (Dreieck von niedrig nach hoch) von 5, 15, 30 µg/ml. Zugabe von 10 ng/ml LPS:O111 6 h nach Inkubationsbeginn. Messung der Zytokinkonzentration per ELISA. Triplikate. n.d., nicht detektiert. f.M., Messfehler. IL-10 bei Verwendung von PBMC (B) nicht detektiert.



Das Blut gesunder Probanden exprimiert jedoch kaum Immuncheckpointmoleküle (Aaron J. Middlebrook et al., 2017), dies könnte die fehlende Reaktion auf eine Immuncheckpointinhibition erklären. Eine niedrigdosierte LPS-Stimulation versetzt Immunzellen in einen Zustand ähnlich der septischen Immunsuppression (Biswas and Lopez-Collazo, 2009) und erhöht die Expression aller hier betrachteten Immuncheckpointmoleküle (Choi et al., 2013; Li et al., 2013; Sun et al., 2018). Folglich entwickelte ich ein Modellsystem

mit zwei konsekutiven Stimuli. Ex vivo lässt sich durch niedrigdosierte LPS Gabe eine substanzielle Toleranz gegenüber diversen TLR Stimuli erzielen (s. Abb. 4-20). Nach einem niedrigdosierten ersten Immunstimulus werden in Reaktion auf einen höherdosierten zweiten Stimulus substanziell geringere Mengen TNF und IL-1 β produziert als ohne Vorstimulation. Dazu passend erhöhte eine Vorstimulation die Produktion des anti-inflammatorischen IL-10. Diese Immuntoleranz durch Vorstimulation betraf insbesondere bakterielle und TLR4 Stimuli, während die IL-1 β Produktion auf reine TLR2-Stimuli nach Vorstimulation (Priming des Inflammasoms) erwartungsgemäß stärker ausfiel.

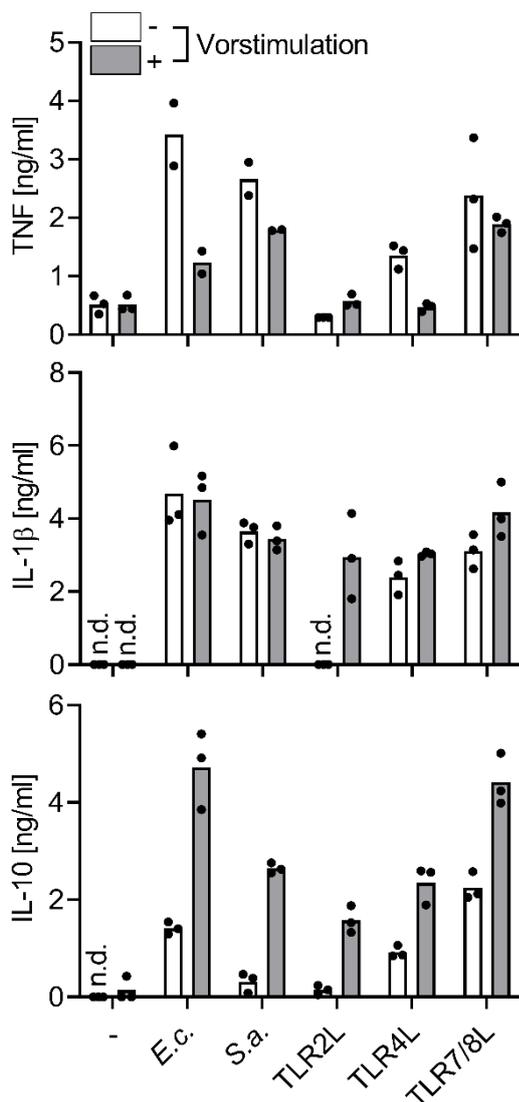


Abbildung 4-20 Reduzierte Reaktivität von Vollblut auf verschiedene TLR-Stimuli nach niedrigdosierter LPS-Gabe: Inkubation von Vollblut für 22 h ohne oder mit 10 ng/ml LPS:O111 (Vorstimulation). Zugabe von 10³ c.f.u./ml *S. aureus* (S.a.) oder *E. coli* (E.c.), oder der TLR-Liganden LPS:O111 (1 μ g/ml, TLR4L), P₃C (10 μ g/ml, TLR2L) oder R848 (5 μ g/ml, TLR7/8L) 4 h nach Inkubationsbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert.

Eine Immuncheckpointinhibition enthemmte diese supprimierte Zytokinproduktion gegenüber *E. coli*, nicht jedoch gegenüber *S. aureus* Bakterien als Zweitstimulus (s. Abb. 4-21). Interessanterweise wurde durch eine PD-1 Inhibition auch die IL-10 Produktion erhöht.

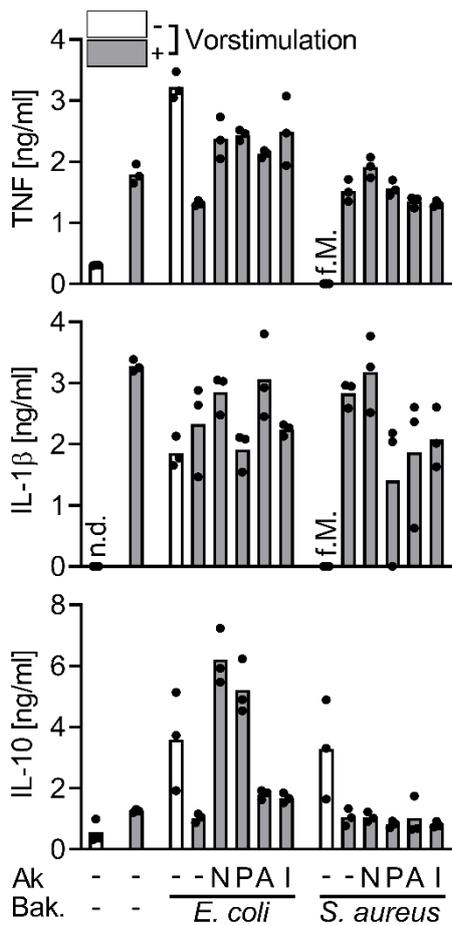


Abbildung 4-21 ICI vermindert die LPS-induzierte Immuntoleranz gegenüber *E. coli* Bakterien: Inkubation von Vollblut ohne oder mit 100 ng/ml LPS (Vorstimulation) für 21 h, Zugabe von 30 µg/ml Nivolumab (N, anti PD-1), Pembrolizumab (P, anti PD-1), Atezolizumab (A, anti PD-L1) oder Ipilimumab (I, anti CTLA-4) Antikörpern (Ak) 4 h nach, und von hitzeinaktivierten 10³ c.f.u./ml *E. coli* oder 10⁴ c.f.u./ml *S. aureus* Bakterien (Bak.) 5 h nach Inkubationsbeginn. Mittelwerte mit Einzelpunkt-darstellung. Triplikate. n.d., nicht detektiert; f.M., Messfehler.

Zusammenfassend enthemmten die verwendeten ICI eine per niedrigdosierter LPS-Vorstimulation supprimierte Immunreaktion gegenüber sepsisrelevanten Bakterien, namentlich *E. coli*, weshalb ich in Folgeexperimenten die hier verwendeten Antikörper in Blutproben von Sepsispatienten verwendete (s. Abschnitt 4.4.1).

4.2 Charakterisierung der Patienten und Probanden

4.2.1 Demografische, klinische und labormedizinische Daten von Sepsispatienten und Probanden

Es wurden Daten und Blutproben von insgesamt 61 Patienten innerhalb von 24 h nach Sepsiserstdiagnose und von 13 gesunden Probanden gesammelt. Erwartungsgemäß waren die Sepsispatienten größtenteils gehobenen Alters und wiesen pathologische Messvariablen in Bezug auf Atmung, Herz-Kreislauf-System, Leber- und Nierenfunktion, Vigilanz, Blutgerinnung und systemische Entzündung auf. Ein großer Teil der Patienten befand sich initial im septischen Schock und war auf maschinelle Beatmung und Kreislaufunterstützung durch intravenöse Katecholamingabe angewiesen, fast jeder zweite Patient überlebte nicht (s. Tab. 4-1). Folglich zeigten diverse, aus o.g. Werten errechnete sepsis-relevante Kennzahlen pathologische Ergebnisse (s. Tab. 4-2). Da ein großer Teil der Patienten beatmet und folglich sediert war, bestimmte ich zusätzlich zum (klassischen) SOFA Score eine modifizierte Version, welche die Richmond Agitation and Sedation Scale (Ely et al., 2003; Vasilevskis et al., 2016) statt der Glasgow Coma Scale verwendet; die Ergebnisse unterschieden sich jedoch kaum.

Tabelle 4-1 Klinische und demografische Patientencharakteristika: Numerische Daten als Fünf-Zahlen-Zusammenfassung (Hoaglin et al., 1983): Minimum, Unteres Quartil, Median, Oberes Quartil, Maximum. Binäre Daten als Anzahl n sowie Prozentsatz. Konzentrationsangaben in Blut. n Gesamt, Patienten von denen Daten verfügbar waren. PaO₂, Arterieller Sauerstoffpartialdruck. FiO₂, Inspiratorische Sauerstofffraktion. RASS, Richmond agitation and sedation scale. KG, Körpergewicht. Definition des septischen Schocks nach (Singer et al., 2016).

	n / Min.	% / Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Max.	n Gesamt
Geschlecht (weiblich)	25	41%				61
Alter (Jahre)	28	51	63	71	87	61
Körpergewicht (kg)	50	70	80	95	240	61
Körpertemperatur (°C)	32.9	36	37.2	38.6	40.3	60
Atemfrequenz (min ⁻¹)	4	14	19	24	36	55
Beatmet (n; %)	49	80%				61
PaO ₂ (mmHg)	28.9	59.8	71.5	84.6	160	60
FiO ₂ (%)	20	30	42.5	60	100	60
Horowitz-Quotient (paO ₂ / FiO ₂)	39	99	180	252	453	60
Lactat (mmol/l)	0.8	1.6	2.2	3.8	25	61
Kalium (mmol/l)	2.9	4.1	4.3	4.8	7	61
Natrium (mmol/l)	109	137	141	145	152	61
Hydrogenkarbonat (mmol/l)	12.2	21.4	26.2	30.6	55.2	61
Thrombozyten (nl ⁻¹)	10	80	172	265	756	60
C-reaktives Protein (mg/l)	2.5	11.1	17.9	29.4	65.4	60
Procalcitonin (µg/l)	0.03	1.57	4.19	17.88	587.9	60
Leukozyten (nl ⁻¹)	0.6	12.8	16.6	24.6	128	60
Systolisch arterieller Druck (mmHg)	70	100	105	120	160	61
Diastolisch arterieller Druck (mmHg)	20	50	50	60	90	61
Arterieller Mitteldruck (mmHg)	40	63	70	80	107	61
Herzfrequenz (min ⁻¹)	54	88	100	120	160	57
Noradrenalin-Gabe (µg/min/kg KG)	0	0.05	0.18	0.56	2.13	58
Bilirubin (mg/dl)	0.3	0.5	0.9	1.7	47	59
Kreatinin (mg/dl)	0.4	1	1.6	2.3	9.6	60
Harnstoff-Stickstoff (mg/dl)	5	20.8	30.5	46.5	137	60
RASS	-5	-5	-5	-4	0	41
Glasgow coma scale	3	3	3	3	15	60
Septischer Schock (n; %)	34	56%				61
Gesamtüberleben (n; %)	31	51%				61
Intensivstationsaufenthalt (Tage)	0	6	12.5	27	155	60

Tabelle 4-2 Sepsis-relevante Kennzahlen der Patientenkohorte: Numerische Daten als Fünf-Zahlen Zusammenfassung (Hoaglin et al., 1983): Minimum, Unteres Quartil, Median, Oberes Quartil, Maximum. Binäre Daten als Anzahl n sowie Prozentsatz. n Gesamt, Zahl der Patienten, von denen Daten verfügbar waren. RASS, Richmond agitation and sedation scale. RASS-modified SOFA-Score nach (Vasilevskis et al., 2016). SAPS II, Simplified acute physiology score II nach (Le Gall et al., 1993). SOFA, Sepsis-related organ failure assesment score; SIRS, Systemic inflammatory response syndrome; qSOFA, Quick-SOFA-Score, jeweils wie in (Singer et al., 2016).

	n / Min.	% / Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Max.	n Gesamt
SOFA Score	4	11	12	14	21	61
RASS-modified SOFA Score	4	11	12	15	21	43
SAPS II	29	59	72	79	101	61
≥2 SIRS Kriterien (n; %)	50	82%				61
≥2 qSOFA Kriterien (n; %)	40	66%				61

Bei Auswahl der Probanden wurde insbesondere auf eine geringe Abweichung der Gruppen bzgl. des mittleren Alters sowie auf eine ähnliche Geschlechterverteilung geachtet. Die Probanden gaben keine chronisch immunologischen, inflammatorischen oder infektiösen Erkrankungen, sowie allgemein keine akuten Erkrankungen an und wiesen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Krankheitssymptome sowie keine pathologischen Befunde in einer orientierenden körperlichen Untersuchung auf (s. auch Tab. 4-3).

Tabelle 4-3 Klinische und demografische Probandencharakteristika: Numerische Daten als Fünf-Zahlen Zusammenfassung nach (Hoaglin et al., 1983): Minimum, Unteres Quartil, Median, Oberes Quartil, Maximum. Binäre Daten als Anzahl n sowie Prozentsatz. Daten von 13 Probanden (n Gesamt).

	n / Min.	% / Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Max.	n Gesamt
Geschlecht (weiblich)	7	53%				13
Alter (Jahre)	22	51	54	59	78	13
Systolisch arterieller Blutdruck (mmHg)	112	126	137	143	159	13
Diastolisch arterieller Blutdruck (mmHg)	74	51	83	85	93	13
Arterieller Mitteldruck (mmHg)	56	95	99	103	109	13
Herzfrequenz (min ⁻¹)	53	66	69	73	75	13

Um ein mögliches Bias der Zytokinmessungen im Vergleich von Patienten- und Probandenproben zu adressieren, wurde zudem die Konzentration von Monozyten als Hauptproduzenten von Zytokinen im Blut bestimmt. Diese unterschied sich zwischen Sepsispatienten und Probanden nicht substantiell (s. Abb. 4-22).

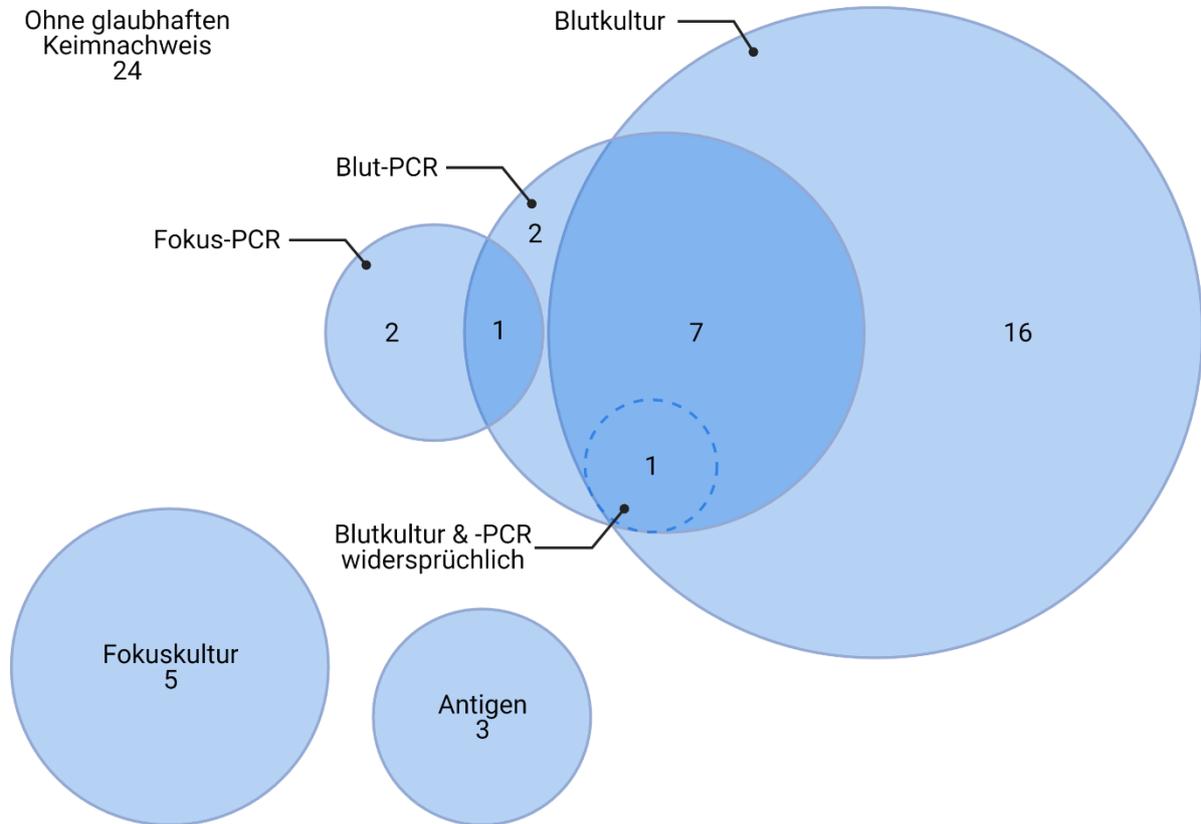
Abbildung 4-22 Ähnliche Monozytenkonzentration im Blut von Sepsispatienten und Probanden: Monozytenkonzentration im peripheren Blut (automatisierte Durchflusszytometrie durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen) verfügbar von n=30 Sepsispatienten und zehn gesunden Probanden. Tukey Boxplots. Mann-Whitney U Test.



4.2.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Aufarbeitung von Patientenproben

Leitliniengerecht wurden bei allen Patienten mehrere Blutkulturproben sowie Material aus möglichen Infektfoki zur Erregersicherung gewonnen und mikrobiologisch aufgearbeitet. Per Blutkultur gelang in 24 Fällen ein Erregernachweis. In sieben Fällen davon konnte der korrekte Erreger bereits kurz nach Diagnosestellung durch eine Panel-PCR-Untersuchung auf 20 typische Sepsiserreger aus Patientenblut festgestellt werden, während eine Erregeridentifikation per Blutkultur i.d.R. zwei Tage benötigt. Zudem wurde in weiteren fünf Fällen der ursächliche Erreger nur per Panel-PCR, nicht jedoch per Blutkultur festgestellt. In zwei dieser Fälle erfolgte der PCR-Nachweis aus Material des klinischen Fokus, bspw. einer Bronchiallavage, sonst aus Patientenblut. Per kultureller Anzuchtung aus Material, welches aus dem Infektfokus gewonnen wurde, gelang in fünf Fällen ein Erregernachweis. Insbesondere bei Verdacht auf Pneumonie erfolgte zudem routinemäßig eine Urinuntersuchung auf die renal ausgeschiedenen Antigene von *Streptokokkus pneumoniae* und *Legionella pneumophila*, was in drei Fällen zur Identifikation eines glaubhaft sepsisursächlichen Erregers führte. In 24 Fällen gelang kein glaubhaft sepsisursächlicher Keimnachweis (s. Abb. 4-23).

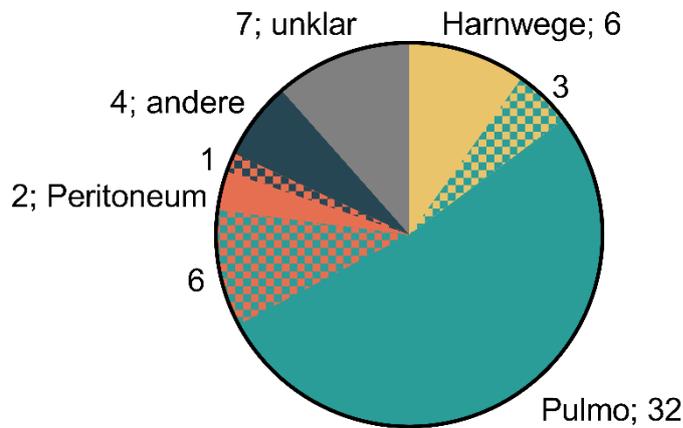
Abbildung 4-23 Keimnachweis und verwendete Methoden: Euler Diagramm der Patientenzahl, bei denen ein glaubhafter Keimnachweis gelang und der Methoden, mit denen dieser gelang. n Gesamt = 61 Patienten. Additive Zählung (jeder Patient ist nur Teil einer Zählung). Kultur und SeptiFast®-PCR aus Blut (Blutkultur / Blut-PCR) oder Material eines klinischen Fokus (bspw. Abstrich offener Wunden, Abszesspunktion, Bronchioalveoläre Lavage, Urin; Fokus-PCR / Fokuskultur). Antigennachweis aus Urin (Legionellen, Pneumokokken; Antigen). In einem Fall stimmten mehrere glaubhafte Nachweise nicht überein („widersprüchlich“).



Während Methoden, wie PCR oder der Antigen-Nachweis regelhaft am Tag der Probenentnahme ein Ergebnis liefern, kann daraus, im Gegensatz zur Blutkultur, i.d.R. keine Resistenzbestimmung erfolgen. Zudem unterstreichen die unterschiedlichen Erfolgsraten der Methoden die Wichtigkeit der Blutkultur als mikrobiologische Routinediagnostik der Sepsis. In dieser Studienpopulation wäre bei 13 Patienten ohne ergänzende Verfahren kein Erreger nachgewiesen worden und die Ergebnisse verschiedener Verfahren stimmten in lediglich einem Fall nicht überein. Dies untermauert die Wichtigkeit einer breit angelegten Erregersuche in der Sepsis, insbesondere angesichts der geringen Rate eines Keimnachweises, mit mehr als einer Methode.

Die Lunge war im untersuchten Patientenkollektiv der häufigste klinische Sepsisfokus, gefolgt von urologischen und peritonealen Foki. In zehn Fällen waren mehrere Foki plausibel, während in 7 Fällen eine Sepsisdiagnose mit unbekanntem Fokus gestellt wurde (s. Abb. 4-24).

Abbildung 4-24 Klinischer Infektfokus der Sepsispatienten: Primäre Infektfoki der 61 Sepsispatienten. Absolute Zahl betroffener Patienten. „Andere“ Foki beinhalten zwei Weichteilabszesse, ein Gelenkempyem, eine infizierte Wunde sowie eine Endokarditis. Fälle mit mehreren glaubhaften Sepsisfoki sind per Farbüberlappung dargestellt.



In 37 von 61 Fällen gelang ein glaubwürdiger Keimnachweis, wobei Gram-negative Erreger etwas häufiger nachgewiesen wurden als Gram-positive (s. Abb. 4-25). In einem Fall wurde eine reine Virusinfektion, in zwei Fällen eine reine Pilzinfektion (*Aspergillus species*) nachgewiesen. Diese drei Fälle wurden mit den behandelnden Ärzten und zuständigen Mikrobiologen diskutiert und die nachgewiesenen Erreger als vermutlich nicht sepsisursächlich beurteilt, jedoch wurden einige überzeugende fungal-bakterielle und eine viral-bakterielle Mischinfektion nachgewiesen, sowie zehn rein bakterielle Mischinfektionen, acht davon mit einer Kombination Gram-positiver und Gram-negativer Erreger und je eine rein Gram-positive und rein Gram-negative Mischinfektion. Alle sechs Fälle *Staphylococcus epidermidis* positiver Blutkulturen wurden in Rücksprache mit den behandelnden Ärzten und zuständigen Mikrobiologen als Probenkontamination und nicht als sepsisursächlicher Keim gewertet (s. auch Abschnitt 3.4.9). In 15 Fällen gelang kein Keimnachweis.

Abbildung 4-25 Nachgewiesene Erregertypen und Beurteilung der Glaubwürdigkeit als Sepsiserreger: Absolute Zahl der Patienten, bei denen ein Keimnachweis durch einen bestimmten Erregertyp oder kein Keimnachweis erfolgte. n Gesamt = 61 Sepsispatienten. Beurteilung der Glaubwürdigkeit anhand mikrobiologischer und klinischer Gesichtspunkte. Patienten mit nachgewiesenen Gram-positiven (Gram⁺) und -negativen (Gram⁻) Keimen per Farbüberlappung dargestellt. Je ein Nachweis einer glaubwürdigen Gram-positiv-bakteriellen und einer Gram-negativ-bakteriellen Mischinfektion (nicht gesondert dargestellt).

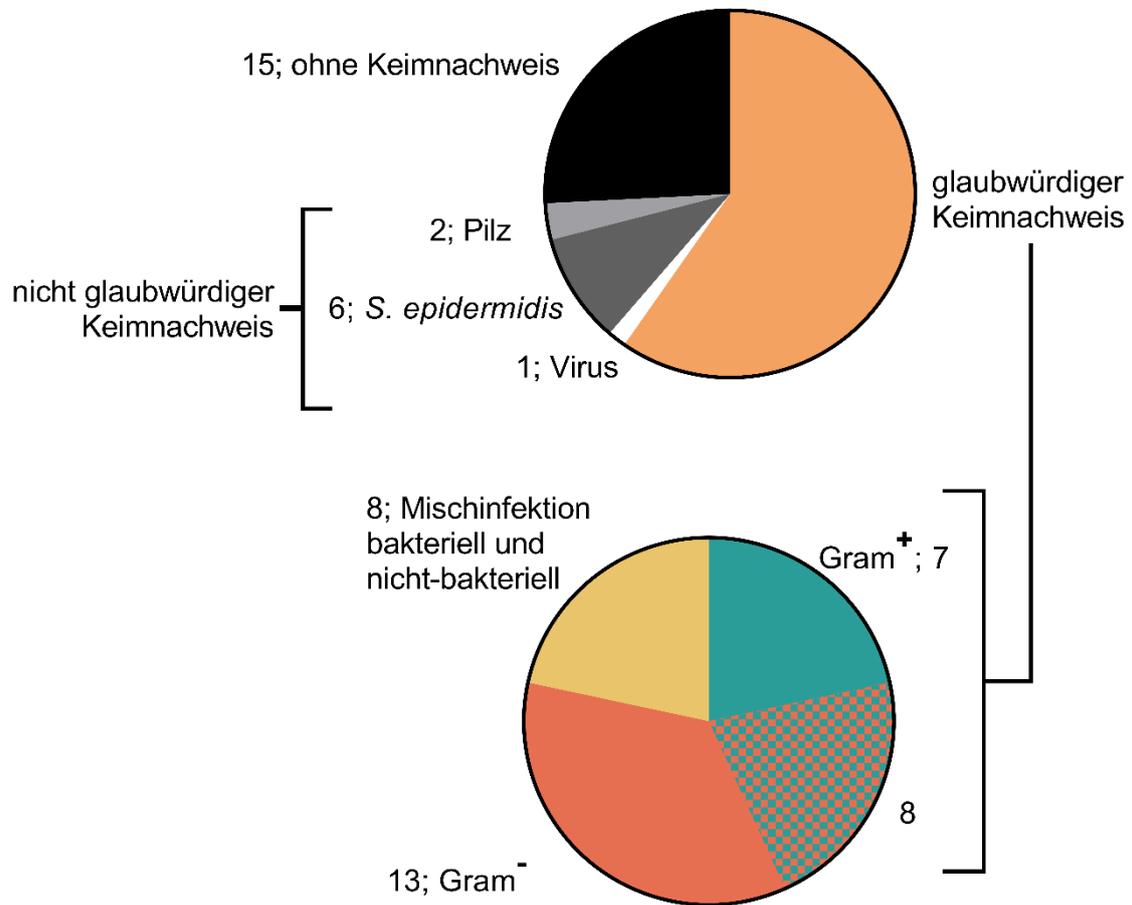


Tabelle 4-4 Nachgewiesener und glaubwürdig sepsisursächlicher Keim sowie Zahl der Patienten mit entsprechendem Keimnachweis. Mischinfektionen mit mehr als einem glaubwürdigen Erreger pro Fall sind möglich.

Keim	Anzahl	ggf. Subspecies	Anzahl
<i>Enterococcus</i>	9	<i>faecalis</i>	6
		<i>faecium</i>	2
		<i>avium</i>	1
<i>Klebsiella</i>	8	<i>pneumoniae</i>	4
		<i>oxytoca</i>	3
		<i>aerogenes</i>	1
<i>S. aureus</i>	6		
<i>E. coli</i>	6		
<i>P. aeruginosa</i>	5		
<i>A. baumannii</i>	3		
<i>S. marcescens</i>	2		
<i>L. pneumophila</i>	2		
<i>S. maltophilia</i>	1		
<i>M. pneumoniae</i>	1		

4.3 Fortlaufende septische Inflammation *ex vivo* und Hemmung per kombinierter TLR-Inhibition

Gemäß dem klassischen Konzept stellt eine Sepsis insbesondere während der Anfangsphase eine generalisierte, proinflammatorische Entzündungsreaktion des Körpers auf körperfremde und körpereigene Liganden der Mustererkennung dar, welche den Wirtsorganismus schädigt. Vorangegangene Experimente meiner Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass diese schädigende Immunreaktion im Mausmodell von einer fortlaufenden Toll-like-Rezeptor-Aktivierung abhängig ist, dabei waren TLR2, -4 und -8 von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der murinen Sepsis. Eine Blockade dieser Rezeptoren *in vivo* durch spezifische Antikörper unterbrach die wirtsschädigende Inflammation und verbesserte das Überleben der Mäuse gegenüber einer reinen Antibiotikatherapie deutlich (Spiller et al., 2008), eine Chloroquintherapie war hier gegenüber Gram-negativen Bakterien nicht notwendig, aber gegenüber Gram-positiven Bakterien in Vollblut (Kruger et al., 2015). Eine Kernfrage dieses Projekts war die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf ein Modell größerer Patientennähe. Ich entwickelte dazu ein Experimentalmodell zur *ex vivo* Inkubation von Patientenblut. Zur Etablierung sowie zum Wirksamkeitsnachweis nutzte ich extrinsisch stimulierte Blutproben gesunder Probanden. Eine Bedingung für eine sinnvolle TLR-Inhibition in der menschlichen Sepsis ist jedoch eine intrinsische, fortlaufende, TLR-getriebene Immunreaktion. Ich untersuchte daher die Blutproben von 40 Sepsispatienten auf das Vorliegen typischer P/DAMPs als mögliche Treiber einer solchen Immunreaktion. Im Vergleich zu gesunden Probanden wiesen Sepsispatienten signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen mitochondrialer und nukleärer menschlicher DNA sowie bakterieller DNA auf (s. Abb. 4-26). Interessanterweise war dabei die Plasma-Konzentration bakterieller DNA (im Vergleich zu mitochondrialer und nukleärer DNA) am geringsten erhöht (17% Mediandifferenz, $p=0.0608$ nach Mehrfachtestkorrektur).

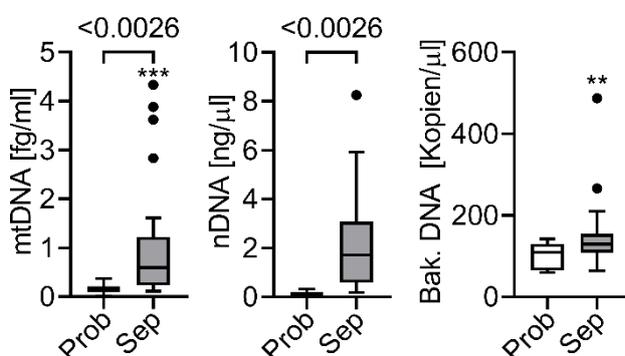
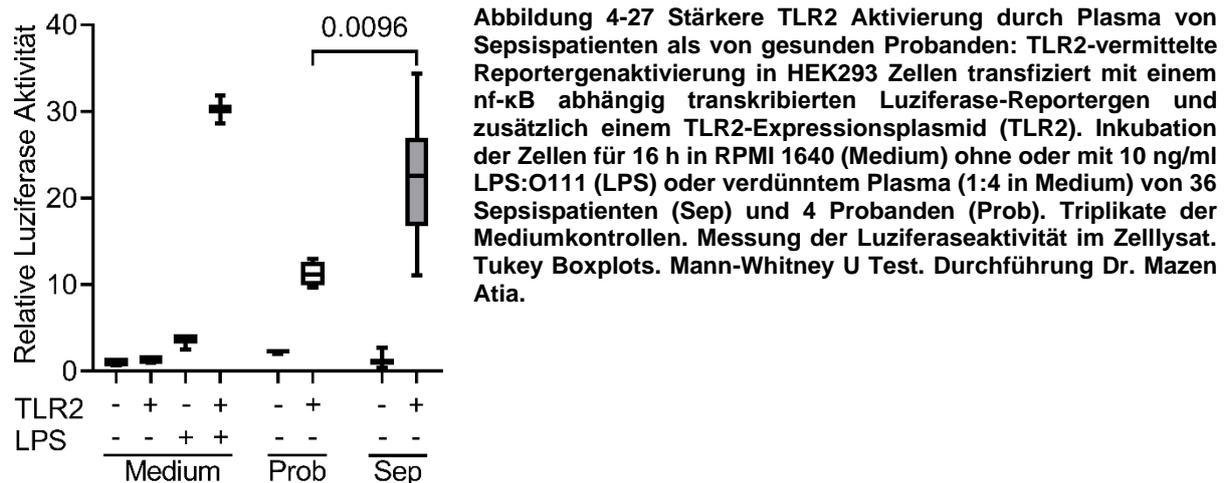


Abbildung 4-26 Erhöhte DNA-Konzentrationen im Plasma von Sepsispatienten: Konzentration von mitochondrialer (mt), nukleärer humaner (n) und bakterieller (Bak.) DNA im Plasma von 40 Sepsispatienten (Sep) und 10 gesunden Probanden. Tukey Boxplots. Mann-Whitney Test. * \triangle Datenpunkt oberhalb der Achsenbegrenzung. Durchführung Dr. Andrea Engler.

Der Eintrag bakterieller Bestandteile in die Blutbahn scheint also im Vergleich zur sepsisbedingten DAMP-Freisetzung selbst in der frühen Sepsis gering. Dies mag durch die hohe Rate von Patienten im septischen Schock, welcher u.a. durch den Nachweis einer

Gewebshypoxygenierung definiert ist, im betrachteten Patientenkollektiv erklärt werden. Darüber hinaus ist es möglich, dass die DAMP-Konzentration durch die intensivmedizinische Behandlung weiter ansteigt (Grazioli et al., 2019). Mitochondriale, nukleäre und bakterielle DNA stellen jedoch nicht nur selbst typische DAMPs / PAMPs dar, sondern zeigen darüber hinaus die Lyse menschlicher sowie bakterieller Zellen und folglich das Vorliegen weiterer P/DAMPs an. Dazu passend wies das Plasma von Sepsispatienten im Vergleich zu Plasma gesunder Probanden eine deutlich erhöhte Aktivität zur TLR2-Stimulation auf (s. Abb. 4-27).



Die Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Plasma von Sepsispatienten war bei Blutentnahme im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht und stieg ohne Zugabe extrinsischer Immunstimuli während der Inkubation bei Sepsispatienten, nicht jedoch bei Probanden, weiter an. Der Konzentrationsanstieg des proinflammatorischen Zytokins und Sepsisbiomarkers IL-6 wurde dabei durch eine kombinierte TLR2, -4 und -8 Blockade vollständig inhibiert, der Anstieg von TNF, IL-1 α und IL-8 reduziert (s. Abb. 4-28), während die Konzentration von IL-1 β und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch die TLR-Blockade kaum beeinflusst wurden. Für TNF und IL-8 ist dabei insbesondere eine Reduktion der Zytokinkonzentration in den jeweils oberen zwei Quartilen (>50. Perzentile) erkennbar; dies deutet darauf hin, dass die dreifache TLR Blockade die Produktion dieser Zytokine insbesondere bei Patienten reduziert, welche hohe Ausgangszytokinkonzentrationen und folglich eine putativ besonders starke Immunreaktion aufwiesen, während die Immunreaktion von Patienten mit geringerer Ausgangszytokinkonzentration durch TLR-Blockade kaum reduziert wurde. Die IL-8 Konzentration stieg durch alleinige Inkubation sowohl bei den Probanden als auch Sepsispatienten signifikant an, hier scheint folglich eine experimentalsystembedingte Stimulation der Produktion vorzuliegen, welche sich im Falle der Sepsispatientenproben zu dem TLR-abhängigen IL-8 Konzentrationsanstieg addiert.

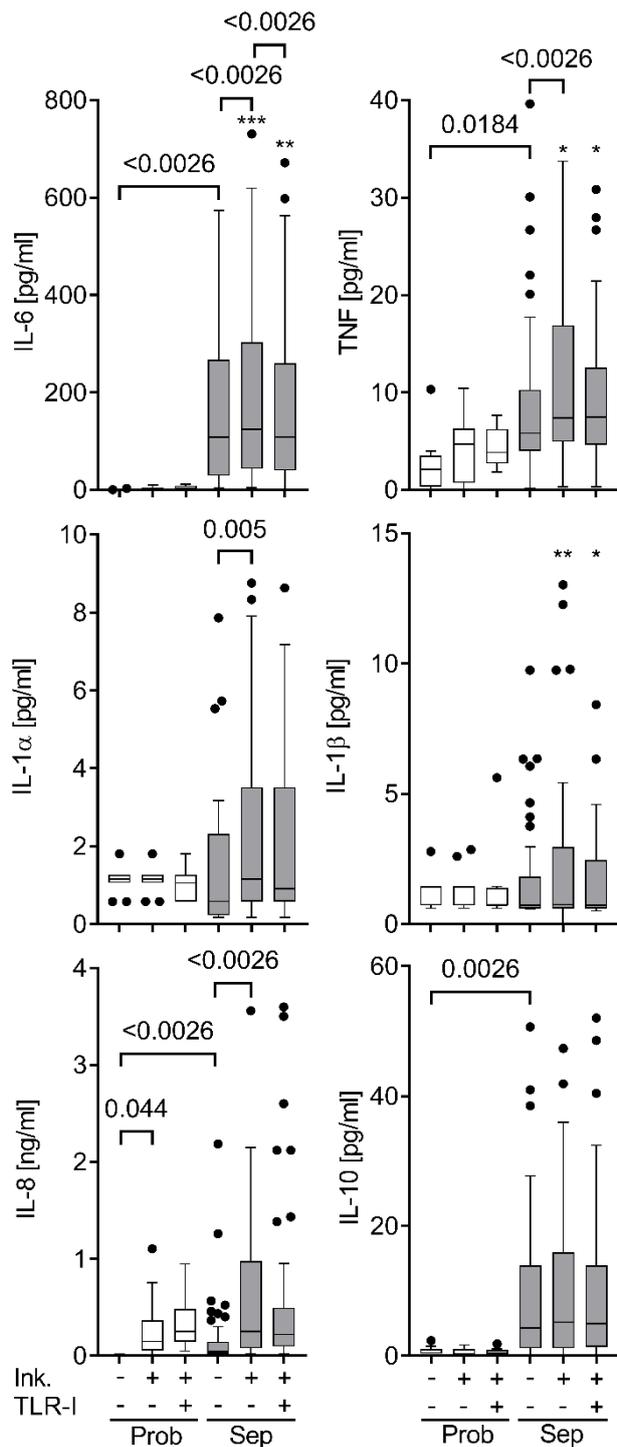


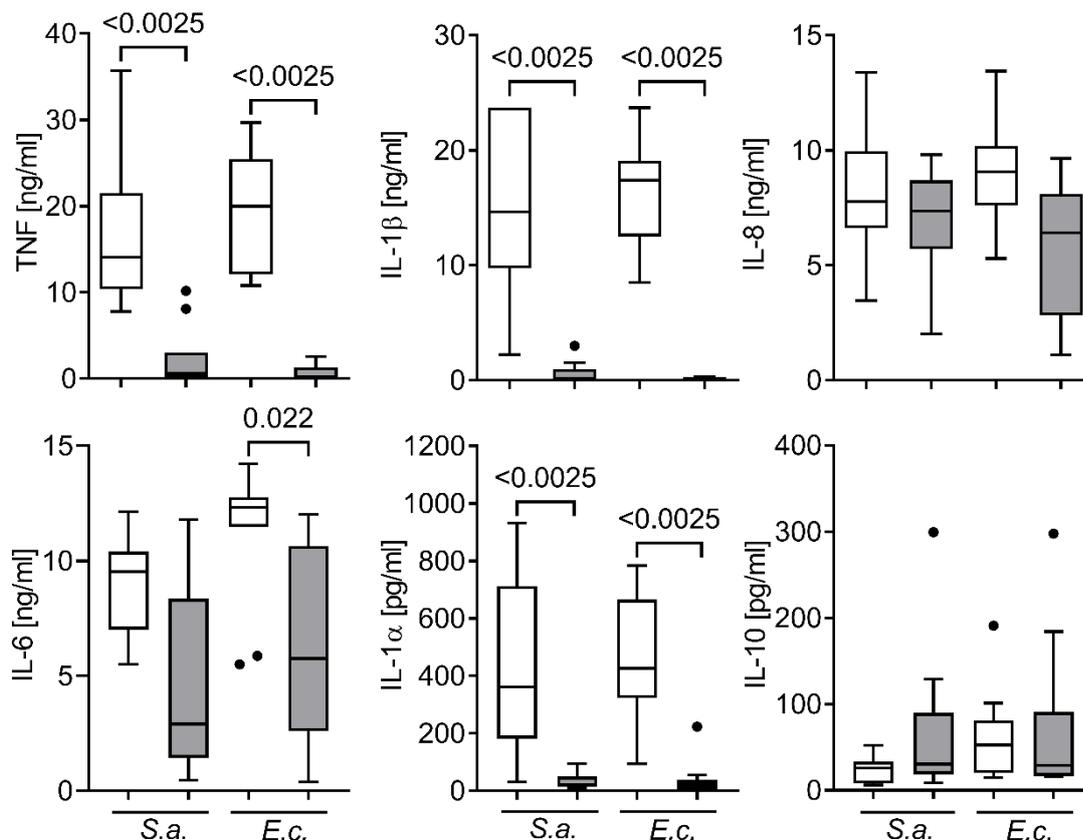
Abbildung 4-28 Fortlaufende Immunaktivität des Blutes von Sepsispatienten *ex vivo* abhängig von TLR2, -4, -8: 6 h Inkubation (Ink.) von Vollblut von 51 Sepsispatienten und 11 Probanden mit oder ohne dreifache TLR-Inhibition (TLR-I; 10 µg/ml Chloroquin, je 15 µg/ml anti-TLR-2 Antikörper T2.5 und anti-TLR-4 Antikörper 3C3). Inkubation in Triplikaten, Messung der Zytokinkonzentration vor Inkubation sowie nach Inkubation im Pool-Singulett. Tukey-Boxplots. Mann-Whitney U Test zum Vergleich ungepaarter, Wilcoxon-matched pairs Test zum Vergleich gepaarter Gruppen. * ≙ Datenpunkt oberhalb der Achsenbegrenzung.

Zusammenfassend wiesen Blutproben septischer Patienten eine blutintrinsische, *ex vivo* fortlaufende Immunreaktion auf, die mindestens teilweise von einer extrakorporal fortlaufenden Aktivierung von TLR2, -4 sowie endosomaler TLRs durch zirkulierende P/DAMPs abhängig war und durch eine Dreifachkombination von TLR-Inhibitoren signifikant reduziert wurde, im Falle von IL-6 auf das Ausgangsniveau.

4.4 Septische Hypoinflammation *ex vivo*

Die in Blutproben von Sepsispatienten im Vergleich zu Proben gesunder Probanden signifikant erhöhte Konzentration inflammatorischer Mediatoren sowie der TLR-abhängige weitere Konzentrationsanstieg *ex vivo* dokumentierte eine erhöhte und anhaltende proinflammatorische Immunaktivität der enthaltenen Leukozyten. In der Annahme einer umfassenden Erhöhung der Immunreaktivität unter septischen Bedingungen nahmen wir an, dass die Blutzellen auf zugeführte Immunstimuli mit einer stärkeren Zytokinfreisetzung im Vergleich zu Probandenblut reagieren würden. Das Gegenteil war jedoch der Fall: Blutproben von Sepsispatienten entnommen während der ersten 24 h nach Sepsisdiagnose reagierten auf Konfrontation mit Präparationen hitzeinaktivierter *E. coli* und *S. aureus* Bakterien mit einer signifikant geringeren Zytokinproduktion als die Blutproben gesunder Probanden (s. Abb. 4-29), als setze eine septische Hypoinflammation instant ein.

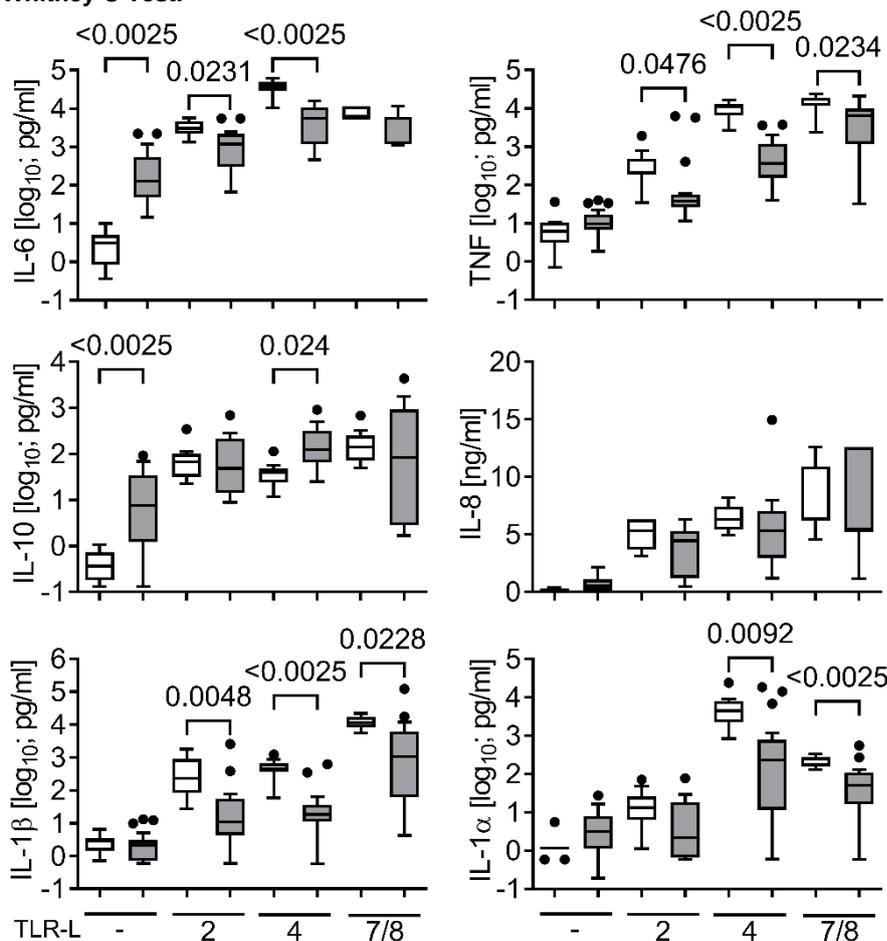
Abbildung 4-29 Im Vergleich zu gesunden Probanden verminderte Reaktion von Vollblut von Sepsispatienten auf bakterielle Immunstimulation: 6 h Inkubation von Vollblut von Sepsispatienten (grau) oder von gesunden Probanden (weiß) mit hitzeinaktivierten 3×10^5 c.f.u./ml *S. aureus* (*S.a.*) oder 10^4 c.f.u./ml *E. coli* (*E.c.*) Bakteriensuspensionen. Inkubation in Triplikaten. Messung der Zytokinkonzentration nach Zusammenführung zum Pool-Singulett. n=11 Patienten und Probanden. Tukey-Boxplots. Mann-Whitney U Test.



Auch auf eine Konfrontation mit spezifischen TLR2, -4 sowie 7/8 Liganden reagierten die Blutproben der Sepsispatienten trotz der gleichzeitig ablaufenden proinflammatorischen, intrinsischen, TLR-abhängigen Immunreaktion (s. Abschnitt 4.3) mit einer geringeren

Zytokinproduktion als die Proben gesunder Probanden (s. Abb. 4-30). Eine mögliche Erklärung wäre eine erniedrigte Leukozytenkonzentration der Sepsispatienten, diese war jedoch deutlich erhöht, zudem lag kein signifikanter Unterschied der Konzentration von Blutmonozyten, Hauptproduzenten der hier betrachteten Zytokine, zwischen Probanden und Sepsispatientenproben vor (s. Abschnitt 4.2.1).

Abbildung 4-30 Im Vergleich zu gesunden Probanden verminderte Reaktion von Vollblut von Sepsispatienten auf spezifische TLR2, -4, -7/8 Stimulation: 6 h Inkubation von Vollblut von Sepsispatienten, oder gesunden Probanden mit den spezifischen TLR-Liganden (TLR-L) P₃C (20 µg/ml; TLR2), LPS:RE595 (100 ng/ml; TLR4) oder R848 (5 µg/ml; TLR7/8). Inkubation in Triplikaten. Messung der Zytokinkonzentration nach Zusammenführung zum Pool-Singulett. n=19 Patienten und 11 Probanden. Tukey-Boxplots. Mann-Whitney U Test.



Eine solche Immuntoleranz könnte eine Adaptation des Wirtsorganismus zur Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion darstellen und dadurch das Sepsisüberleben verbessern. Andererseits könnte eine so abgeschwächte Immunreaktion eine besonders schwergradige initiale Sepsispathologie anzeigen und das Risiko für Sekundärinfekte oder eine mangelhafte Kontrolle des Primärinfekts erhöhen und damit einen Überlebensnachteil darstellen. Ich untersuchte den Datensatz daher auf eine mögliche Korrelation zwischen der Immunreaktion auf einen extrinsischen Stimulus und das Sepsisüberleben. In dieser post-hoc Analyse zeigt sich eine signifikante Assoziation der IL-6 Konzentrationserhöhung nach Inkubation mit LPS (am Tag der Diagnosestellung) mit dem Sepsisüberleben sowie mit dem

Vorliegen eines septischen Schocks. Diese Tendenz blieb unter Stratifizierung für die jeweils andere binäre Variable bestehen. Die LPS-getriebene IL-6 Konzentrationserhöhung im Vollblutüberstand ist demnach unabhängig mit dem Vorliegen eines septischen Schocks und langfristig mit dem Sepsisüberleben assoziiert (s. Abb. 4-31).

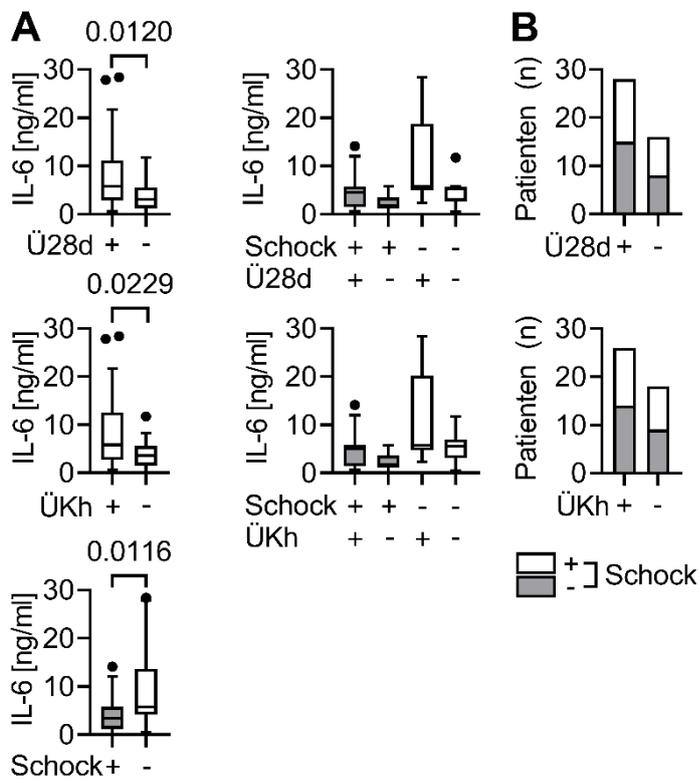
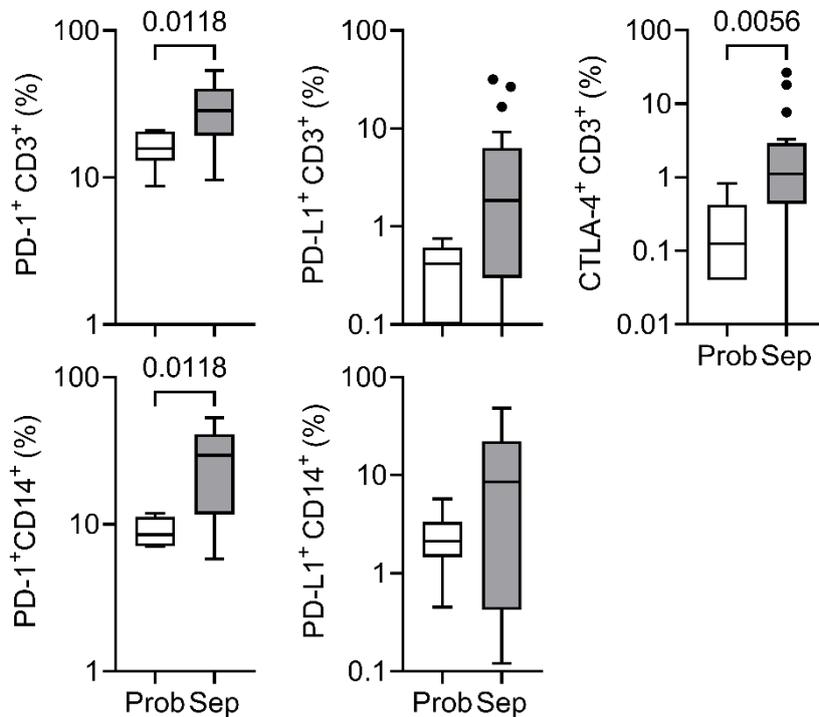


Abbildung 4-31 Unabhängige Assoziation von LPS-Reaktivität des Vollbluts und Sepsisüberleben sowie Vorliegen eines septischen Schocks: A IL-6 Konzentration nach 6 h Inkubation von Vollblut von 44 Sepsispatienten entnommen am Tag der Diagnosestellung mit 10 ng/ml LPS:O111 in Abhängigkeit vom 28-Tage-Überleben (Ü28d) sowie vom Krankenhausüberleben (ÜKh) oder vom Vorliegen eines septischen Schocks bei Blutentnahme (Schock). Tukey-Boxplots. Mann-Whitney U Test. B 28-Tage-Überleben und Krankenhausüberleben abhängig vom Vorliegen eines septischen Schocks bei Diagnosestellung, Patientenzahl n.

4.4.1 Immuncheckpoint Inhibition zur *ex vivo* Therapie der septischen Hypoinflammation

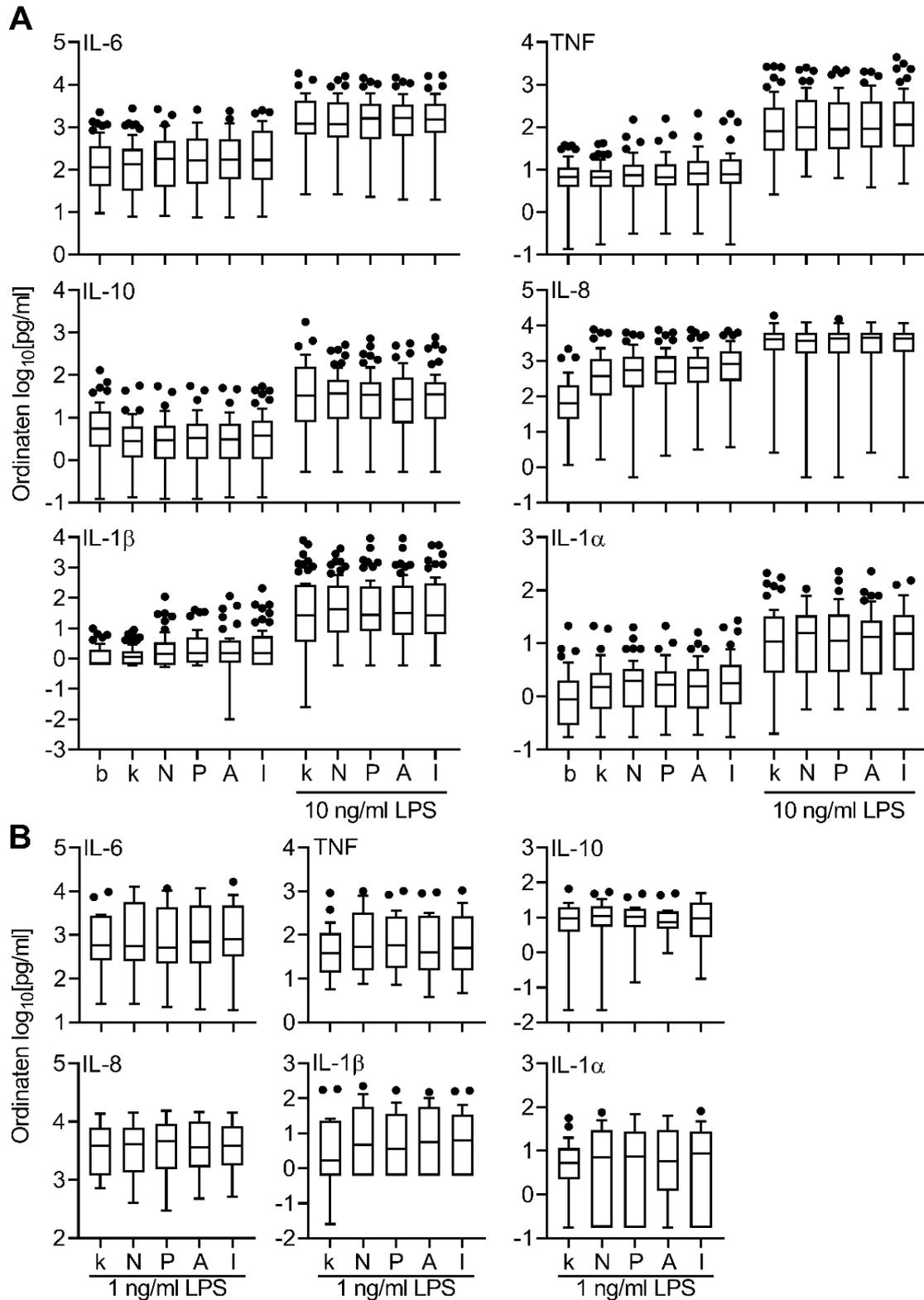
Die Immunzellen im Blut der Sepsispatienten hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits *in vivo* Kontakt zu diversen P/DAMPs (s. Abschnitt 4.3) sowie unter Umständen zu intakten mikrobiellen Krankheitserregern gehabt. Folglich weist die hier beobachtete Hyporeaktivität gegenüber extrinsischen Immunstimuli Analogien zur induzierten Immuntoleranz (s. Abschnitt 4.1.6) auf. Passend dazu zeigten die Sepsispatienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant erhöhte monozytäre und T-zelluläre PD-1 Expression und T-zelluläre CTLA-4 Expression (s. Abb. 4-32). Auch die PD-L1 Expression septischer Leukozyten war erhöht, dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Abbildung 4-32 Erhöhte Expression von PD-1, PD-L1 und CTLA-4 im Blut von Sepsispatienten: Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils PD-1, PD-L1 und CTLA-4 positiver Zellen an allen T-Zellen (CD3⁺) und PD-1 und PD-L1 positiver Zellen an allen Monozyten (CD14⁺) in Vollblut-Leukozytenisolaten von 18 Sepsispatienten (Sep) und 6 Probanden (Prob). Logarithmische Ordinate zur Basis 10. Tukey-Boxplots. Mann-Whitney U Test. Durchführung Dr. Andreas Limmer.



Diese erhöhte Expression von Checkpointmolekülen könnte die Immunreaktion im Blut septischer Patienten inhibieren und somit die verminderte Zytokinproduktion auf eine Konfrontation mit extrinsischen Stimuli hin erklären. Analog zur Enthemmung der Immunreaktion durch Immuncheckpointinhibition im Experimentalmodell zweier konsekutiver Stimuli (s. Abschnitt 4.1.6) behandelte ich folglich die Blutproben der Sepsispatienten mit Antikörpern gegen PD-1, PD-L1 und CTLA-4. Dies hatte jedoch keinen messbaren Effekt auf die intrinsische oder LPS-induzierte Produktion von IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-1 β , oder IL-1 α (s. Abb. 4-33).

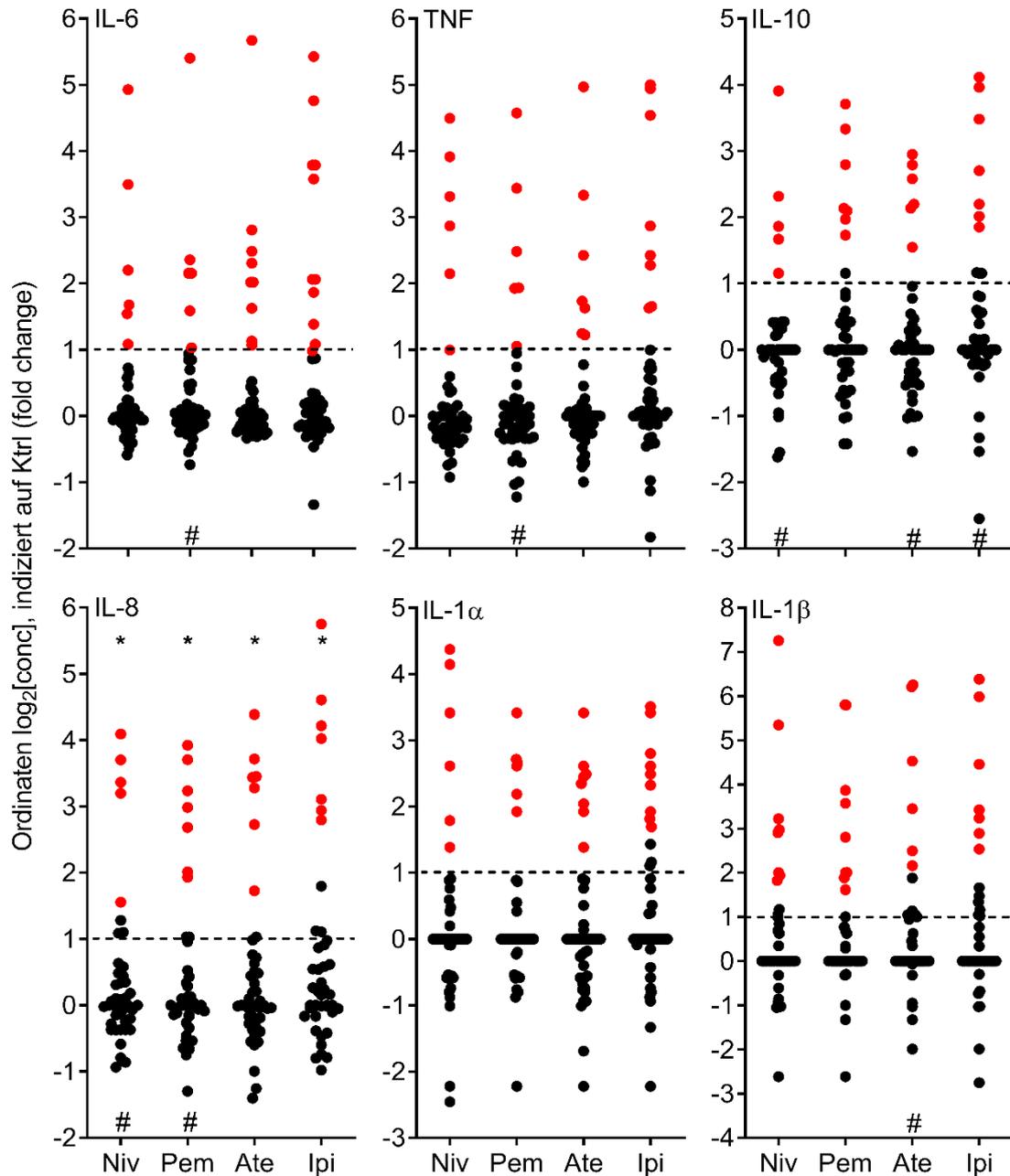
Abbildung 4-33 Keine Reaktion von Vollblut von Sepsispatienten auf eine PD-1 / L1 oder CTLA4 Inhibition: 22 h Inkubation von Vollblut von Sepsispatienten ohne (Kontrolle k) oder mit je 30 µg/ml Nivolumab (N; anti PD-1), Pembrolizumab (P; anti PD-1), Atezolizumab (A; anti PD-L1) oder Ipilimumab (I; anti CTLA-4). Zugabe von LPS:O111 6 h nach Inkubationsbeginn. Inkubation in Triplikaten. Messung der Zytokinkonzentration vor Inkubation (Basiswert b) sowie nach Inkubation nach Zusammenführung zum Singulett. Tukey-Boxplots. A Ohne LPS und Hochdosis LPS, n=41 B Niedrigdosis LPS, n=14. Keine Signifikanz gemäß Friedman-Test (F-Statistik).



Klinisch ist dies ein enttäuschendes Ergebnis, insbesondere angesichts der signifikant erhöhten Expression der assoziierten Immuncheckpointmoleküle. Vom Einsatz der Checkpointinhibitoren in der Onkologie ist jedoch bekannt, dass diese gegenüber vielen Tumorentitäten nur bei einem geringen Prozentsatz der Patienten wirken und eine Wirkung anhand der Checkpointmolekülexpression nur ungenau vorhergesagt werden kann (Ribas and Wolchok, 2018).

Es fiel auf, dass einzelne Patientenproben deutlich höhere Zytokinkonzentration „mit“ gegenüber „ohne“ ICI Zugabe enthielten. Durch Messungenauigkeiten wäre bei Unwirksamkeit der ICI eine symmetrische Streuung des Quotienten aus Konzentration „mit“ und „ohne“ Antikörper um die Zahl 1 (Abb. 4-34: $\log_x[1] = 0$) zu erwarten. Zusätzlich zu einer solchen symmetrischen Streuwolke liegt jedoch eine relevante Anzahl von Punkten über dem Streubereich, aber kaum Punkte darunter. Um den Datensatz systematisch auf solche möglichen ICI-reaktiven Proben zu untersuchen, führte ich eine ROUT-Analyse durch. Diese Methode errechnet per robuster Regression ein Modell der Datenverteilung und untersucht den Datensatz in einem zweiten Schritt auf signifikante Ausreißer von diesem Modell (s. auch Abschnitt 3.5.6). Dies ergab eine relevante Anzahl, welche mit einer deutlichen Erhöhung der Zytokinproduktion auf die ICI-Therapie reagierten (s. Abb. 4-34). Sowohl visuell als auch per ROUT-Verfahren liegt die Trennung von ICI-reaktiven („Ausreißern“) und nichtreaktiven Patienten ca. bei einem Quotienten von 2, d.h. doppelter Zytokinkonzentration in der Probe „mit“ im Vergleich zu „ohne“ Antikörper (Abb. 4-34: $\log_2[2] = 1$).

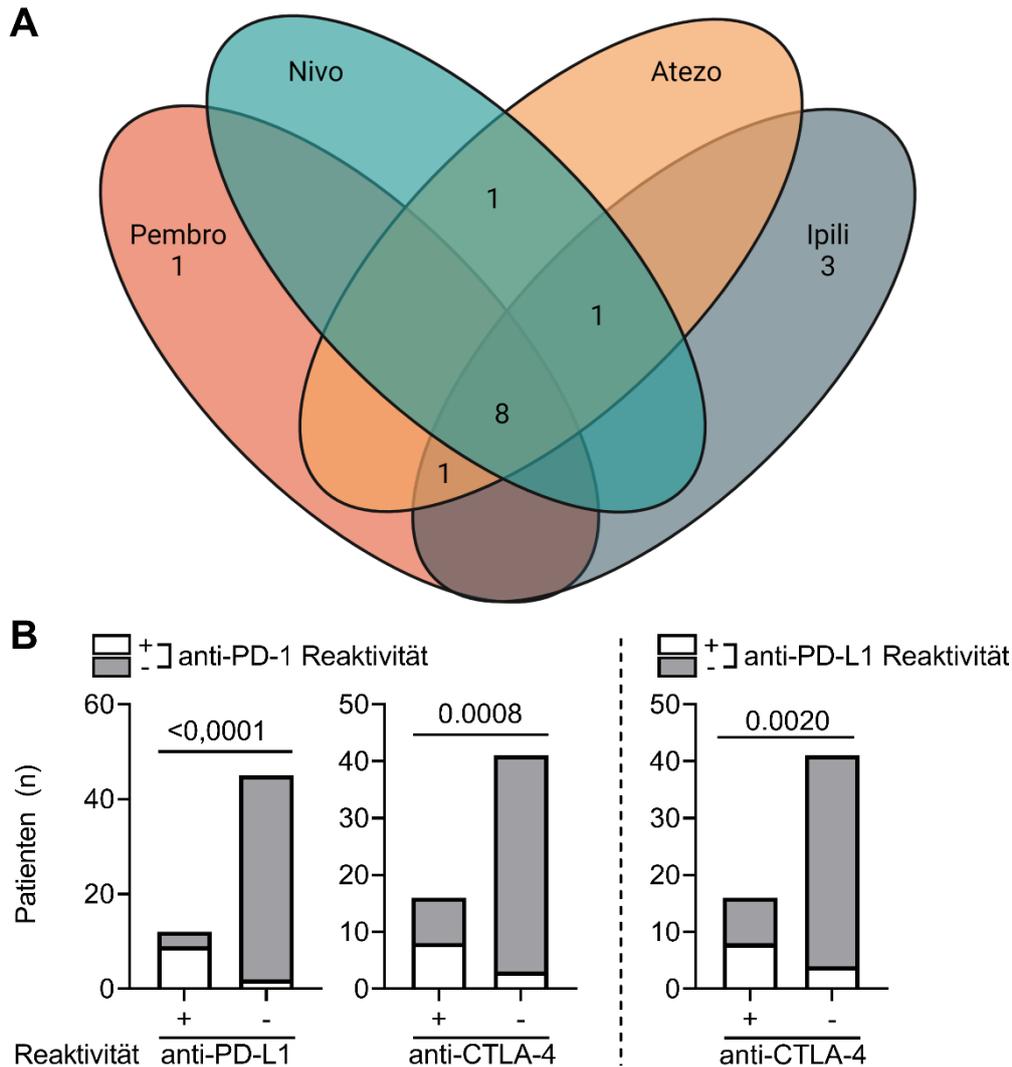
Abbildung 4-34 ICI reaktive Vollblutproben von Sepsispatienten gemäß ROU-Analyse: 22 h Inkubation von Vollblut von Sepsispatienten ohne oder mit je 30 µg/ml Nivolumab (Niv; anti PD-1), Pembrolizumab (Pem; anti PD-1), Atezolizumab (Ate; anti PD-L1) oder Ipilimumab (Ipi; anti CTLA-4). Darstellung des Quotienten von Konzentration „mit Antikörper“ und „ohne Antikörper“ (Ktrl). n=57 Patienten. Inkubation in Triplikaten. Messung der Zytokinkonzentration nach Zusammenführung zum Pool-Singulett. Logarithmische Ordinate zur Basis 2. Signifikante Ausreißer nach ROU-Analyse (Q=1) rot markiert. Gestrichelte Linie bei 2. * ≙ Datenpunkt oberhalb der Achsenbegrenzung. # ≙ Datenpunkt unterhalb der Achsenbegrenzung.



Ich untersuchte diese reaktiven Blutproben auf systematische Zusammenhänge. Dazu definierte ich ICI-Reaktivität als Anstieg mindestens zweier proinflammatorischer Immunmediatoren (TNF, IL-6, IL-8, IL-1β, IL-1α) jeweils mindestens um den Faktor zwei durch Antikörperbehandlung gegenüber der zugehörigen unbehandelten Probe. Es fiel auf, dass die Blutproben einer kleinen Zahl von Patienten den Großteil der beobachteten reaktiven Proben ausmachten und diese Patienten oft auf verschiedene Antikörper reagierten (s. Abb. 4-35). Die

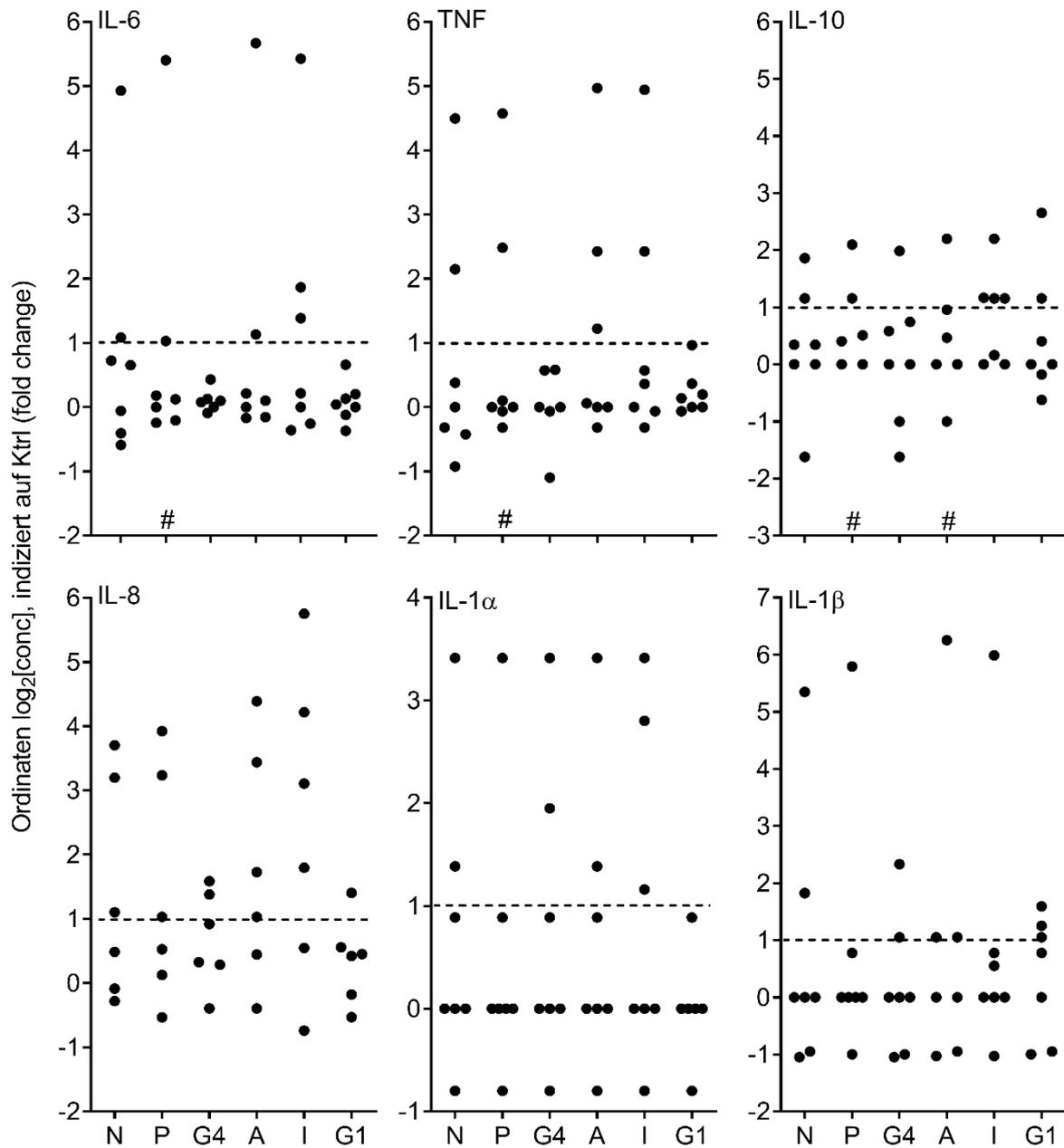
Reaktivität auf verschiedene ICI zeigt eine signifikante Korrelation, was den Verdacht einer zufälligen Streuung weiter entkräftet und stattdessen suggeriert, dass die ICI-Reaktivität ein Patientencharakteristikum darstellt.

Abbildung 4-35 Korrelation der Reaktivität auf verschiedene ICI: ICI-Reaktivität definiert als ≥ 2 fache Konzentration in der Antikörper-behandelten gegenüber der Kontrollprobe von mindestens zwei der Immunmediatoren TNF, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-1 α . Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab (Nivo, Pembro; beide anti PD-1), Atezolizumab (Atezo; anti-PD-L1) und Ipilimumab (Ipili; anti-CTLA-4). Inkubationsbedingungen s. Abb. 4-34. n=57 Patienten. A Venn Diagramm der ICI reaktiven Patienten nach verwendetem Antikörper. B Gestapeltes Säulendiagramm der Zahl ICI-reaktiver Patienten nach Zielantigen. Fisher's exact Test.



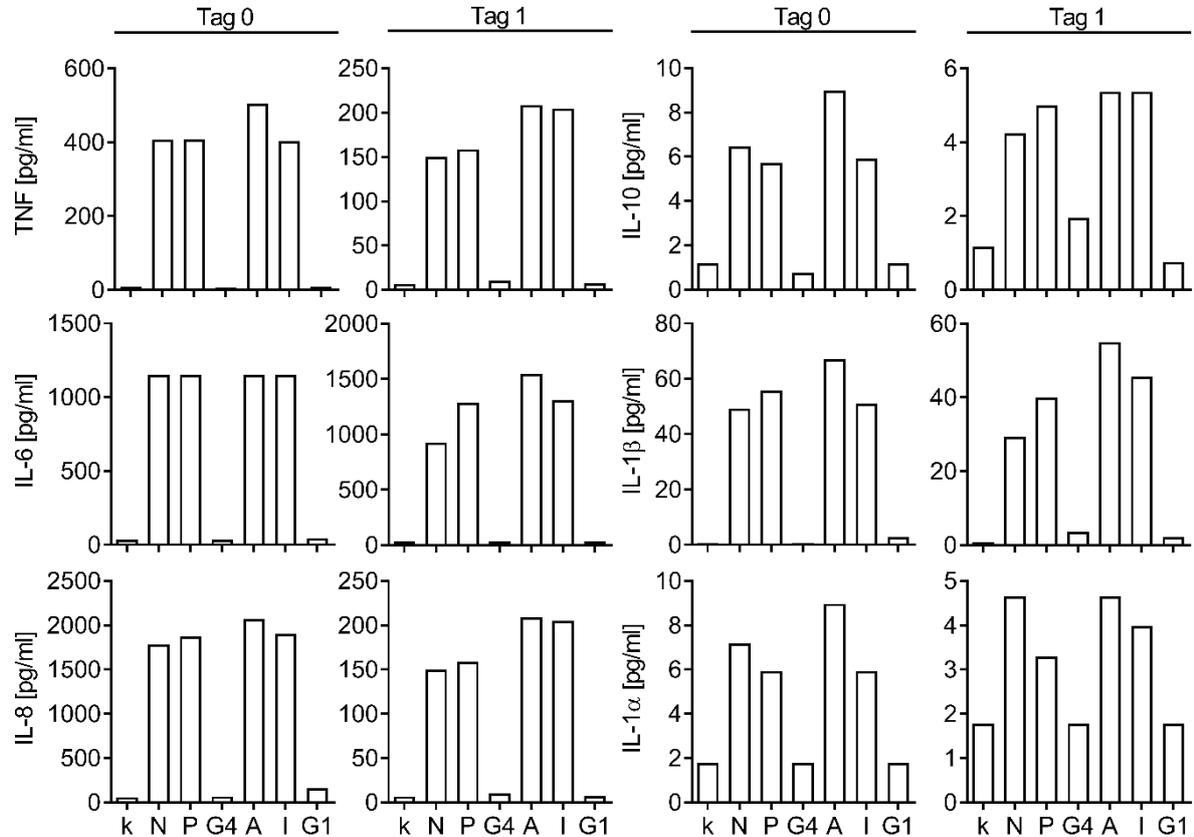
Um eine unspezifische Reaktivität der Patientenproben auf Antikörper auszuschließen, behandelte ich parallel Blutproben mit Antikörpern desselben Isotyps gegen ein nicht-menschliches Antigen (Fluorescein). Da die ersten zwei gelieferten Chargen der Isotypkontrollen sich jedoch im Nachhinein als LPS-kontaminiert herausstellten, liegen lediglich von sieben Patienten verlässliche Daten dazu vor. Erwähnenswerterweise reagierten zwei dieser sieben Patienten auf alle vier Immuncheckpointinhibitoren, jedoch keiner auf eine der zwei Isotypkontrollen (s. Abb. 4-36)

Abbildung 4-36 Keine Reaktion der ICI-reaktiven Patienten auf Isotypkontrollen: 22 h Inkubation von Vollblut von sieben Sepsispatienten ohne oder mit je 30 µg/ml Nivolumab, Pembrolizumab (N, P; beide anti PD-1 & IgG4κ), Atezolizumab (A; anti PD-L1; IgG1κ), Ipilimumab (I; anti CTLA-4; IgG1κ), anti-Fluorescein IgG1κ oder IgG4κ (G1 bzw. G4), letztere zwei als Isotypkontrollen. Inkubation in Triplikaten. Messung der Zytokinkonzentration nach Zusammenführung zum Pool-Singulett. Darstellung des Quotienten von Konzentration „mit Antikörper“ und „ohne Antikörper“ (Ktrl). Logarithmische Ordinate zur Basis 2. Gestrichelte Linie bei 2. #, Datenpunkt unterhalb der Achsenbegrenzung.



Einer Sepsispatientin, die ICI-, jedoch nicht Isotyp-reaktiv war, konnte ich 24 h nach Studieneinschluss erneut Blut entnehmen. Ihr Blut reagierte auf alle betrachteten ICI substanziell und über die Zeit stabil (s. Abb. 4-37). Da die Patientin jedoch am dritten Tag nach Diagnosestellung verstarb, konnte ich die ICI-Reaktivität nicht längerfristig verfolgen.

Abbildung 4-37 Zeitstabile Reaktion auf ICI des Vollbluts einer Sepsispatientin: Vollblut einer Sepsispatientin innerhalb von 24 h nach Diagnosestellung (Tag 0) und weitere 24 h später (Tag 1), jeweils inkubiert für 22 h mit 30 µg/ml Nivolumab (N; anti PD-1; IgG4κ), Pembrolizumab (P; anti PD-1; IgG4κ), Atezolizumab (A; anti PD-L1; IgG1κ), Ipilimumab (I; anti CTLA-4; IgG1κ), anti-Fluorescein IgG1κ (G1), oder anti-Fluorescein IgG4κ (G4), letztere zwei als Isotypkontrollen. Inkubation in Triplikaten. Messung der Zytokinkonzentration nach Zusammenführung zum Pool-Singulett. Darstellung der gemessenen Zytokinkonzentration.



Zusammenfassend reagierte mit 15/47 (32%) ein relevanter Anteil der Patientenproben auf eine ICI Behandlung mit einem signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen. Dabei scheint es sich um ein über mindestens 24 h zeitstabiles Patientencharakteristikum zu handeln. Wir fanden jedoch keinen laborchemischen oder klinischen Prädiktor für diese ICI-Reaktivität. Sie korrelierte weder signifikant mit der Expression von PD-1, PD-L1, oder CTLA-4 auf Monozyten oder T-Zellen, dem Horowitz-Quotienten, dem SOFA Score, der Katecholamin-Infusionsrate, der Konzentration von Leukozyten, CRP, PCT, mtDNA, nDNA oder von IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-1β, sowohl vor als auch nach Inkubation sowie nach Inkubation mit LPS (Mann-Whitney U Test), noch mit dem Patientenalter, -geschlecht, Vorliegen eines septischen Schocks, einer maschinellen Beatmung, oder eines glaubwürdigem Keimnachweises (Fisher's exact test). Mangels eines validen Prädiktors einer ICI-Reaktivität mögen Assays wie der hier verwendete daher in zukünftigen Studien ermöglichen, Patienten per Vollblutinkubation auf ICI-Reaktivität zu untersuchen.

5 DISKUSSION

Das Verständnis der menschlichen Sepsis basiert insbesondere auf Beobachtungsstudien, sowie *in vitro* und tierexperimentellen Modellsystemen und die Translation gestaltet sich angesichts der rapide voranschreitenden Pathologie und folglich herausfordernden zeitigen Probenakquise und -verarbeitung und regelmäßiger Veränderungen der Sepsisdefinition als komplex (Dyson and Singer, 2009; Rittirsch et al., 2007). Das zeitliche und kausale Verhältnis septischer Hyperinflammation und Hypoinflammation als wesentliche Komponenten der Sepsispathologie sind daher Gegenstand andauernder Diskussionen (Cavaillon and Giamarellos-Bourboulis, 2019; Darden et al., 2021). Obwohl ein besseres Verständnis der Pathologie und Fortschritte der Intensivmedizin das Sepsisüberleben über die letzten Jahre verbessert haben und mit dem Sepsis-3 Konsensus eine einheitliche Definition zur Verfügung steht, sind jenseits der Antibiotikatherapie keine kausalen Therapien klinisch etabliert (Cavaillon et al., 2020; Hotchkiss et al., 2016), und geeignete Modellsysteme zum präklinischen Testen potenzieller Sepsistherapien fehlen.

Folglich etablierte ich zur Modellierung wesentlicher Aspekte des angeborenen Immunsystems und der menschlichen Sepsis sowie zur Testung einer kombinierten TLR-Blockade zur Hemmung der septischen Inflammation und einer Immuncheckpointinhibition zur Revertierung der septischen Hypoinflammation ein Experimentalsystem auf Basis von Vollblut. Dieses ist im Rahmen der klinischen Routinediagnostik ohnehin verfügbar und gemäß der vorliegenden Studie unter Heparin-Antikoagulation für mindestens 22 h stabil und mindestens 6 h responsiv für Stimulation des angeborenen Immunsystems, während längere Inkubationszeiten mit einer Verminderung der immunologischen Agilität einhergehen (F. Faro, AG Kirschning, unveröffentlicht).

Gegenüber Vollblut als Experimentalsystem bilden insbesondere Zellisolate wie PBMCs traditionelle *in vitro* System der Inflammationsforschung. Ihre Kontrollierbarkeit, bspw. in Bezug auf die Zellzahl, sowie die Möglichkeit der recht stabilen Kryokonservierung bieten einige Vorteile. Da jedoch intrinsische Reize (bspw. Serumzytokine, P/DAMPs) durch die Präparation der Zellen verloren gehen, werden solchen traditionellen Experimentalsystemen immunologische Stimuli (bspw. aktivierende Antikörper, Superantigene, oder bakterielle Komponenten) hinzugefügt, um zelluläre Entzündungsaktivität beobachten zu können. Ferner fehlen diesen Systemen spezifische Blutzellpopulationen, welche die Gesamt-Immunaktivität potenziell modulieren, während bei der Verwendung von Vollblut alle Blutzellen (einschließlich beispielsweise Granulozyten) und das umgebende Medium mit allen im Blutstrom zirkulierenden Substanzen erhalten bleiben. In septischem Blut betrifft dies u.a. auch Erreger bzw. deren Produkte, die als inflammatorische PAMPs wirken, sowie Medikamente wie

Antibiotika und unter Umständen therapeutische Katecholamine, wodurch das Experimentalmodell Vollblut (septischer Patienten) viele Restriktionen traditioneller Systeme umschiffte, da die enthaltenen Leukozyten die im Körper begonnene Immunaktivität ohne Zugabe externer Stimuli *ex vivo* fortsetzen. Naturgemäß bleibt hingegen auch bei Verwendung von Vollblut als Experimentalmodell die Wechselwirkung mit insbesondere immunologischen Organen unbeachtet, wobei in der Sepsis angesichts der schnell voranschreitenden Pathologie deren Bedeutung womöglich begrenzt ist. Da die Krankheitsschwere akuter Inflammation mit der Plasmakonzentration spezifischer Zytokine korreliert (Thijs and Hack, 1995) und diese aus Vollblut (bzw. dessen Plasma) zeitlich stabil messbar sind, nutzte ich die Konzentration von TNF, IL-6 und IL-1, wesentliche Zytokine der akuten Entzündung, von IL-8 als wichtigstes Chemokin zur Granulozyten-Mobilisierung sowie von IL-10 als wesentliches antiinflammatorisches Zytokin zur Quantifizierung der Inflammation. Inwieweit Immunfunktionen wie Phagozytose oder Lymphozytenaktivität im Vollblutmodell durch die hier angewandten Behandlungen beeinflusst werden, möge in Folgestudien untersucht werden. Als Ausdruck einer wirtschädigenden systemischen Inflammationsreaktion wiesen die Patientenproben bei Blutentnahme erwartungsgemäß deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen proinflammatorischer Zytokine und P/DAMPs auf, zudem stieg die Konzentration spezifischer proinflammatorischer Zytokine als Ausdruck der fortlaufenden septischen Immunreaktion durch bloße Inkubation weiter an. Kleinere klinische Studien zur vergleichsweise invasiven extrakorporalen Entfernung von Zytokinen und P/DAMPs aus dem Blut (Monard et al., 2019) suggerieren, dass eine Verminderung der P/DAMP-Erkennung und der Zytokinproduktion in der Frühphase der Sepsis das Überleben verbessert. Eine solche, deutliche Senkung der P/DAMP-Erkennung und in Folge der Produktion spezifischer proinflammatorischer Zytokine gelang in der vorliegenden Studie durch eine dreifache TLR-Inhibition. Diese Studie überträgt damit die erfolgreiche tierexperimentelle Anwendung einer kombinierten TLR-Inhibition (Spiller et al., 2008) auf ein Experimentalmodell größerer Patientennähe. Da zudem alle in dieser Studie verwendeten TLR-Inhibitoren für die Anwendung am Menschen erprobt sind (Monnet et al., 2020; Reilly et al., 2013; Slater, 1993), legen die vorliegenden Daten die Möglichkeit einer Sepsistherapie durch dreifache TLR-Inhibition nahe. In der Vergangenheit scheiterten mehrere klinische Studien, jeweils unter Verwendung von Einzelsubstanzen, zur Hemmung der septischen Inflammation (Fisher et al., 1996; Fisher et al., 1994; Giamarellos-Bourboulis, 2013; Opal et al., 2013). Mögliche Erklärungen dafür bilden reduktionistische präklinische Experimentalsysteme (Cavaillon et al., 2020; Dyson and Singer, 2009), weshalb ich in dieser Studie ein möglichst umfassendes präklinisches Modell mit geringer Probenmanipulation wählte, und die Redundanz verschiedener TLRs zueinander. Die vorliegenden Daten zeigen, dass lediglich eine Dreifachkombination von anti-TLR2 und TLR4 Antikörpern und Chloroquin die Immunantwort

sowohl auf Gram-positive als auch Gram-negative Erreger hin blockiert, indem sie TLR2 als wichtigsten Rezeptor für Gram-positives Lipoprotein, TLR4 als wichtigsten Rezeptor für LPS Gram-negativer Erreger, sowie jegliche (endosomalen) Nukleinsäure-TLRs hemmt. Eine solche, umfassende Hemmung der Mustererkennung erscheint insofern als besonders relevant, als dass bei Sepsisbeginn der verursachende Erreger regelhaft unbekannt ist.

Im Mausmodell ist eine deutliche Abnahme der Wirksamkeit einer kombinierten TLR-Inhibition (parallel zur Antibiotikagabe) bei Verabreichung 4 h nach Sepsisbeginn zu beobachten (Spiller et al., 2008), zudem lässt eine Hemmung der Pathogen-Erkennung früh im Verlauf der Inflammationskaskade einen besonders umfassenden Effekt erhoffen, was die Frage nach einem ausreichenden Zeitfenster zur Therapie der menschlichen Sepsis aufwirft. Da jedoch in der vorliegenden Studie alle Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme wenigstens die erste Antibiotikagabe zur Sepsistherapie erhalten hatten und die Blutproben zu diesem Zeitpunkt deutlich auf eine TLR-Inhibition reagierten, scheint das Zeitfenster unter realen klinischen Bedingungen groß genug für eine *in vivo* TLR-Blockade.

Die Sorge vor einer anhaltenden Immunhemmung durch therapeutische TLR-Inhibition wird insofern gemindert, als dass die Wirkdauer *in mure* lediglich 4-5 h (Meng et al., 2004; Spiller et al., 2008) betrug. Eine TLR-Hemmung würde also gezielt während der frühen, wirtschädigenden Hyperinflammation wirken, ohne im weiteren Sepsisverlauf die Immunität zu beeinträchtigen. Dies gilt eingeschränkt für die Verwendung von Chloroquin als Hemmstoff der endosomalen Mustererkennung. Angesichts der kurzen Inkubationsdauer nutzte ich zum Teil *in vivo* toxische Chloroquin-Dosen, demonstrierte jedoch gleichzeitig, dass diese die TLR-unabhängige Zytokinproduktion und folglich die Zellviabilität nicht beeinträchtigen. Zudem zeigte ich in Etablierungsversuchen eine Wirksamkeit deutlich niedrigerer, bis hin zu nicht-toxischen, Dosen (<5 µg/ml, (Jaeger and Flesch, 1994)). Da Chloroquin als amphiphile schwache Base zudem einer starken intrazellulären Anreicherung (‘Ion-Trapping’) insbesondere in Endolysosomen (Homewood et al., 1972) unterliegt, ist bei *in vivo* Anwendung eine spezifische Wirkverstärkung auch auf endosomale TLRs anzunehmen.

Auch im Rahmen der aktuellen SARS-CoV-2 Pandemie wurde eine solche immunhemmende Chloroquin-Therapie gegen den ‚Zytokinsturm‘ - mit widersprüchlichen Ergebnissen - diskutiert (Kamat and Kumari, 2021). Unbestritten bleibt Chloroquin dabei eine nebenwirkungsreiche Substanz, doch eine punktuelle Anwendung zur Sepsistherapie sollte, auch mangels Zugänglichkeit der endosomalen TLRs für nebenwirkungsärmere (bspw. Antikörper-) Therapien, in Kombination mit einer TLR2 und -4 Inhibition evaluiert werden.

Gleichzeitig zur fortlaufenden, blutintrinsischen, TLR-abhängigen Inflammation zeigte das Vollblut von Sepsispatienten bereits während der ersten 24 h nach Diagnosestellung eine deutlich verminderte Reaktion auf extrinsische / sekundäre Immunstimulation durch

sepsisrelevante Bakterien bzw. deren Bestandteile. Das Konzept der septischen Hypoinflammation beruht auf Beobachtungsstudien, sowie dem Phänomen der LPS-Toleranz *in vivo* (murin) und *in vitro* (Cavaillon and Adib-Conquy, 2006) und wird oft relativ diffus als Folge zahlreicher Mechanismen beschrieben, wobei Leukozytenapoptose (Nedeva et al., 2019), ein immunsuppressives extrazelluläres Milieu (Cavaillon, 2002), und epigenetische Regulation (Foster et al., 2007) die häufigsten „Erklärungen“ sind. Septische Hypoinflammation und LPS-Toleranz werden dabei oft nicht klar voneinander abgegrenzt, weshalb Informationen über Mechanismen der septischen Hypoinflammation oft vereinfachend sind und vor Allem LPS-Modellen unter Verwendung isolierter Leukozytenpopulationen entstammen. Zudem konzentrierte sich die diesbezügliche Forschung insbesondere in der Vergangenheit vor allem auf TNF (Heagy et al., 2000), welches im Mausmodell das zentrale Sepsiszytokin darstellt und für welches sich *in vitro*, wie auch in der vorliegenden Studie für Vollblut gezeigt, leicht eine LPS Toleranz induzieren lässt. Die Betrachtung richtet sich traditionell auf Spätphasen der Sepsis, in denen Sekundärinfekte auftreten (Daviaud et al., 2015; Landelle et al., 2010; Otto et al., 2011; Walton et al., 2014; Zhao et al., 2016), die häufig einem Versagen der adaptiven, statt angeborenen Immunität zugeschrieben werden (Monneret and Venet, 2016; Patera et al., 2016; Venet et al., 2017; Walton et al., 2014).

Die vorliegende Studie hingegen zeigt die Gleichzeitigkeit von fortlaufender septischer Inflammation und Hypoinflammation in der Frühphase der Sepsis nach aktuellen Sepsis-3 Kriterien als Reaktion septischen Vollbluts auf endogene und exogene, sepsisrelevante P/DAMPs und Bakterien. Eine Gleichzeitigkeit von septischer Hyper- und Hypoinflammation in der frühen Sepsis wurde in den letzten Jahren wiederholt verkündet, jedoch eher selten experimentell dargestellt (Feueracker et al., 2018; Malewicz et al., 2019). Da 1. eine mögliche geschwächte Kontrolle des Primärinfekts durch die frühe septische Hypoinflammation, auch mangels geeigneter Messvariablen zur Quantifizierung einer solchen Hypoinflammation, bisher nicht dargestellt wurde, 2. die Entwicklung von Sekundärinfekten durch opportunistische Erreger typischerweise in spätere Sepsisphasen fällt (s.o.), 3. kein zugelassenes Therapeutikum gegen die septische Hypoinflammation und kaum experimentelle Substanzen (bspw. ICI, s.u.) vorliegen, sowie 4. keine geeigneten Tiermodelle oder *in vitro* Modelle existieren, liegen über die klinische Relevanz dieser frühen im Gegensatz zur späten (Monneret and Venet, 2016) septischen Hypoinflammation kaum Daten vor.

Das hier vorgestellte Modell der Vollblutinkubation mit sepsistypischen Erregern bzw. deren Bestandteilen ermöglicht, das Ausmaß der Hypoinflammation zu quantifizieren und mit dem Verlauf der Sepsis zu korrelieren. So zeigte sich in der vorliegenden Studie eine Korrelation einer geringen Immunreaktion auf extrinsische Stimuli mit einem verminderten Sepsisüberleben, wie bereits in kleineren Studien beschrieben (Heagy et al., 2003) und

suggeriert die Möglichkeit einer Sepsistherapie durch Steigerung der Immunaktivität, bspw. per Immuncheckpoint-Inhibition. Meine Daten zeichnen diesbezüglich ein Bild, welches sich mit Ergebnissen aus der Onkologie vergleichen lässt: Lediglich eine begrenzte Anzahl von Patienten(proben) reagiert auf eine ICI-Therapie, im positiven Fall ist diese jedoch sehr deutlich und zeitlich stabil wirksam. Wie auch in der Onkologie lässt sich die ICI-Reaktivität bisher nicht vorhersagen, so korrelierte sie in meiner Studie mit keiner der erhobenen klinischen, laborchemischen, oder immunologischen Variablen. Das hier vorgestellte Modell könnte daher in Zukunft einen einfachen Vortest darstellen, um ICI-reaktive, hypoinflammatorische Sepsispatienten für eine solche Intervention zu präselektieren und die Verabreichung einer potenziell nebenwirkungsreichen Therapie auf eine Patientengruppe zu begrenzen, welche mit größerer Wahrscheinlichkeit darauf anspricht. Alle verwendeten ICI-Antikörper sind in der Tumortherapie etabliert und stehen folglich für die Anwendung im Menschen zur Verfügung (Picardo et al., 2019), Ergebnisse der Anwendung gegen die septische Hypoinflammation *in homine* (Hotchkiss et al., 2019) werden von mir, insbesondere im Lichte meiner Versuche mit derselben Substanz *ex vivo*, gespannt erwartet.

Die beiden hier diskutierten Ansätze, Hemmung der septischen Inflammation durch kombinierte TLR-Inhibition und Verstärkung der septischen Inflammation durch Immuncheckpoint-Inhibition, widersprechen einander dabei nur scheinbar, da auch die Entwicklung der septischen Hypoinflammation wenigstens teilweise einen aktiven, durch Kontakt zu mikrobiellen Krankheitserregern und deren Bestandteilen hervorgerufenen Prozess darstellt (s. auch Abschnitt 1.2.2), welcher ebenso durch eine Verminderung der Mustererkennung inhibiert werden könnte, wie proinflammatorische Sepsiskomponenten. Zudem könnte eine instant wirkende TLR-Inhibition und eine verzögert wirkende Enthemmung des Immunsystems sowohl ein frühes Überschießen der Immunreaktion dämpfen als auch die Entwicklung einer sekundären Hypoinflammation reduzieren. Welche Art der Immunmodulation im klinischen Kontext wann und für welchen Patienten zur Verbesserung des Sepsisüberlebens geeignet ist, werden abschließend Folgestudien beantworten müssen. Diese Arbeit legt nahe, dass Sepsispatienten sowohl von einer kombinierten TLR-Inhibition als auch einer Immuncheckpoint-Inhibition profitieren können, um die Inflammationsreaktion der frühen Sepsis zu balancieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Sepsis ist eine komplexe Erkrankung in Reaktion des Wirtskörpers auf eindringende Pathogene, bestehend aus mehreren, zum Teil gegenläufigen Komponenten von Hyper- und Hypoinflammation. Erkenntnisse zum genauen Ablauf der Sepsispathologie basieren oft auf tierexperimentellen oder *in vitro* Modellen, was die Translation vielversprechender Sepsistherapien erschwert. Das in dieser Studie etablierte Experimentalsystem basierend auf Vollblut von Sepsispatienten entnommen während der ersten 24 Stunden nach Diagnosestellung ermöglichte die Modellierung wesentlicher Aspekte der menschlichen Sepsis und präklinische Testung verschiedener Therapieansätze in einem patientennahen Modell. Die Hauptergebnisse sind:

1. Vollblut von Sepsispatienten setzt die *in corpore* begonnene Immunreaktion unter physiologischen Bedingungen (37°C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre, 5% CO₂) *ex vivo* für circa einen Tag fort. Dies wird durch Mikroben oder zumindest deren Produkte (Pathogenassoziierte molekulare Muster; PAMPs) sowie körpereigene Immunstimulanzen (Gefahrassoziierte molekulare Muster) unterhalten und bedarf keiner extrinsischen Stimulation.
2. Durch eine kombinierte Inhibition von Toll-like Rezeptor (TLR) 2, -4, sowie endosomaler TLR wird diese fortlaufende Immunreaktion blockiert. Die verwendeten Substanzen sind für die Anwendung im Menschen etabliert.
3. Die Reaktion des Vollbluts von Sepsispatienten auf extrinsische PAMPs ist im Vergleich zum Vollblut gesunder Probanden deutlich reduziert. Dies repräsentiert das Vorliegen einer frühzeitigen Hypoinflammation innerhalb der ersten 24 Stunden nach Diagnosestellung der Sepsis.
4. Eine Gabe von Immuncheckpoint-Inhibitoren in Vollblutkultur von Sepsispatienten verstärkt die autonome Immunaktivität von 32% der untersuchten Patientenproben.

SUMMARY

In sepsis a dysregulated immune reaction consisting of both hyper- and hypoinflammation towards invading pathogens or products thereof damages the host. Current knowledge on pathophysiology, course, and timing is mainly based on animal and *in vitro* experiments complicating translation of promising findings towards a clinical setting. The experimental system established in this study, which is based on patient blood drawn within 24 hours of first sepsis diagnosis, allowed to model core aspects of sepsis and to preclinically test potential therapies while staying close to the clinic. Main results are:

1. Patients' whole blood continues the immune reaction started *in corpore* for about one day when incubated *ex vivo* under physiological conditions (37°C, 100% humidity, 5% CO₂). This immune activity is maintained by continued contact to microbes, products thereof (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) and to host immune stimulants (danger associated molecular patterns, DAMPs); no extrinsic immune stimulation is necessary.
2. This continued immune reaction is inhibited by a combined blockade of Toll-like receptor (TLR) 2, 4 and endosomal TLRs. The blocking substances used in this study are established for use in humans.
3. The immune reaction of sepsis patients' whole blood towards extrinsic PAMPs is markedly reduced in comparison to whole blood samples from healthy volunteers. This represents an early septic hypoinflammation present within 24 hours of first sepsis diagnosis.
4. Blockade of immune checkpoints increased the autonomous immune activity of 32% of the analyzed sepsis patients' samples.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aaron J. Middlebrook, Casey Fox, Peter Llontop, Mamatha Bharadwaj, Dina Huckaby, and Ghanekar, S. (2017). Expression of Immune Checkpoint Receptors on Peripheral Blood Immune Cells Using a 10-Color Assay on the BD FACSLyric Flow Cytometer (San Jose, CA: BD Life Sciences).
2. Abraham, E., Anzueto, A., Gutierrez, G., Tessler, S., San Pedro, G., Wunderink, R., Dal Nogare, A., Nasraway, S., Berman, S., Cooney, R., Levy, H., Baughman, R., Rumbak, M., Light, R.B., Poole, L., Allred, R., Constant, J., Pennington, J., and Porter, S. (1998). Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* (London, England) *351*, 929-933.
3. Abraham, E., Laterre, P.F., Garbino, J., Pingleton, S., Butler, T., Dugernier, T., Margolis, B., Kudsk, K., Zimmerli, W., Anderson, P., Reynaert, M., Lew, D., Lesslauer, W., Passe, S., Cooper, P., Burdeska, A., Modi, M., Leighton, A., Salgo, M., Van der Auwera, P., and Lenercept Study, G. (2001). Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med* *29*, 503-510.
4. Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* *8*, 765-772.
5. Anderson, K.V., and Nusslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* *311*, 223-227.
6. Angus, D.C., Birmingham, M.C., Balk, R.A., Scannon, P.J., Collins, D., Kruse, J.A., Graham, D.R., Dedhia, H.V., Homann, S., and MacIntyre, N. (2000). E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. *JAMA* *283*, 1723-1730.
7. Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* *29*, 1303-1310.
8. Angus, D.C., and van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* *369*, 840-851.
9. Bankey, P.E., Banerjee, S., Zucchiatti, A., De, M., Sleem, R.W., Lin, C.F., Miller-Graziano, C.L., and De, A.K. (2010). Cytokine induced expression of programmed death ligands in human neutrophils. *Immunology letters* *129*, 100-107.
10. Bassetti, M., and Righi, E. (2013). Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? *Hematology American Society of Hematology Education Program 2013*, 428-432.
11. Beloeil, H., Mazoit, J.-X., Benhamou, D., and Duranteau, J. (2005). Norepinephrine kinetics and dynamics in septic shock and trauma patients. *BJA: British Journal of Anaesthesia* *95*, 782-788.
12. Biswas, S.K., and Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* *30*, 475-487.

13. Bone, R.C. (1996). Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Critical Care Medicine* 24, 1125-1128.
14. 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.
15. 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.
16. Boomer, J.S., To, K., Chang, K.C., Takasu, O., Osborne, D.F., Walton, A.H., Bricker, T.L., Jarman, S.D., 2nd, Kreisel, D., Krupnick, A.S., Srivastava, A., Swanson, P.E., Green, J.M., and Hotchkiss, R.S. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306, 2594-2605.
17. Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (1997). B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 6, 303-313.
18. Brahmamdam, P., Inoue, S., Unsinger, J., Chang, K.C., McDunn, J.E., and Hotchkiss, R.S. (2010). Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol* 88, 233-240.
19. 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.
20. Bryceson, A.D. (1976). Clinical pathology of the Jarisch-Herxheimer reaction. *J Infect Dis* 133, 696-704.
21. Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27, 111-122.
22. Calandra, T., Cohen, J., and International Sepsis Forum Definition of Infection in the, I.C.U.C.C. (2005). The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 33, 1538-1548.
23. Cavaillon, J.-M. (2002). "Septic Plasma". *American journal of respiratory and critical care medicine* 166, 1417-1418.
24. Cavaillon, J.M., and Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 10, 233.
25. Cavaillon, J.M., and Giamarellos-Bourboulis, E.J. (2019). Immunosuppression is Inappropriately Qualifying the Immune Status of Septic and SIRS Patients. *Shock* 52, 307-317.
26. Cavaillon, J.M., Singer, M., and Skirecki, T. (2020). Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Mol Med* 12, e10128.

27. Chikezie, I.O. (2017). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African Journal of Microbiology Research* 11, 977-980.
28. Choi, E.-K., Lee, S.-W., and Lee, S.-W. (2013). PD-1 Expression in LPS-Induced Raw264.7 Cells Is Regulated via Co-activation of Transcription Factor NF- κ B and IRF-1. *The Korean Journal of Microbiology* 49.
29. Clancy, R.M., Markham, A.J., and Buyon, J.P. (2016). Endosomal Toll-like receptors in clinically overt and silent autoimmunity. *Immunological reviews* 269, 76-84.
30. Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342, 1432-1433.
31. Crawford, T.Q., Jalbert, E., Ndhlovu, L.C., and Barbour, J.D. (2014). Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell subsets by flow cytometry. *Cytometry Part A* 85, 268-276.
32. Darden, D.B., Kelly, L.S., Fenner, B.P., Moldawer, L.L., Mohr, A.M., and Efron, P.A. (2021). Dysregulated immunity and immunotherapy after sepsis. *J Clin Med* 10, 1742.
33. Dargere, S., Cormier, H., and Verdon, R. (2018). Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation and prevention. *Clin Microbiol Infect* 24, 964-969.
34. Daviaud, F., Grimaldi, D., Dechartres, A., Charpentier, J., Geri, G., Marin, N., Chiche, J.D., Cariou, A., Mira, J.P., and Pene, F. (2015). Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* 5, 16.
35. Dutkiewicz, R., and Hage, C.A. (2010). Aspergillus infections in the critically ill. *Proc Am Thorac Soc* 7, 204-209.
36. Dyson, A., and Singer, M. (2009). Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med* 37, S30-37.
37. Egen, J.G., and Allison, J.P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16, 23-35.
38. Ely, E.W., Truman, B., Shintani, A., Thomason, J.W., Wheeler, A.P., Gordon, S., Francis, J., Speroff, T., Gautam, S., Margolin, R., Sessler, C.N., Dittus, R.S., and Bernard, G.R. (2003). Monitoring sedation status over time in ICU patients: reliability and validity of the Richmond Agitation-Sedation Scale (RASS). *Jama* 289, 2983-2991.
39. Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., Schorr, C., Simpson, S., Wiersinga, W.J., Alshamsi, F., Angus, D.C., Arabi, Y., Azevedo, L., Beale, R., Beilman, G., Belley-Cote, E., Burry, L., Cecconi, M., Centofanti, J., Coz Yataco, A., De Waele, J., Dellinger, R.P., Doi, K., Du, B., Estenssoro, E., Ferrer, R., Gomersall, C., Hodgson, C., Hylander Møller, M., Iwashyna, T., Jacob, S., Kleinpell, R., Klompas, M., Koh, Y., Kumar, A., Kwizera, A., Lobo, S., Masur, H., McLaughlin, S., Mehta, S., Mehta, Y., Mer, M., Nunnally, M., Oczkowski, S., Osborn, T., Papatthanassoglou, E., Perner, A., Puskarich, M., Roberts, J., Schweickert, W., Seckel, M., Sevransky, J., Sprung, C.L., Welte, T., Zimmerman, J., and Levy, M. (2021). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med* 49, e1063-e1143.

40. Ferrero, E., Hsieh, C.L., Francke, U., and Goyert, S.M. (1990). CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *145*, 331-336.
41. Feuerecker, M., Sudhoff, L., Crucian, B., Pagel, J.I., Sams, C., Strewe, C., Guo, A., Schelling, G., Briegel, J., Kaufmann, I., and Chouker, A. (2018). Early immune anergy towards recall antigens and mitogens in patients at onset of septic shock. *Sci Rep* *8*, 1754.
42. Fisher, C.J., Jr., Agosti, J.M., Opal, S.M., Lowry, S.F., Balk, R.A., Sadoff, J.C., Abraham, E., Schein, R.M., and Benjamin, E. (1996). Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* *334*, 1697-1702.
43. Fisher, C.J.J., Dhainaut, J.-F.A., Opal, S.M., Pribble, J.P., Balk, R.A., Slotman, G.J., Iberti, T.J., Rackow, E.C., Shapiro, M.J., Greenman, R.L., Reines, H.D., Shelly, M.P., Thompson, B.W., LaBrecque, J.F., Catalano, M.A., Knaus, W.A., Sadoff, J.C., Astiz, M., Carpati, C., Bone, R.C., Friedman, B., Mure, A.J., Brathwaite, C., Shapiro, E., Melhorn, L., Taylor, R., Keegan, M., O'Brien, J., Schein, R., Pena, M., Wasserluf, M., Oropello, J., Benjamin, E., DelGuidice, R., Emmanuel, G., Lie, T., Anderson, L., Marshall, J., De Majo, W., Rotstein, O., Foster, D., Abraham, E., Middleton, H., Perry, C., Levy, H., Fry, D.E., Simpson, S.Q., Crowell, R.E., Neidhart, M., Stevens, D., Coffman, T., Narasimhan, N., Merrick, D.K., Bergquist, W., Matzel, K.E., Huebler, M., Foulke, G.E., Albertson, T.E., Walby, W.F., Allen, R.P., Baughman, R., Hasselgren, P.-O., Fink, M.P., Favorito, F., Thompson, B.T., Corbin, R., Shellhorse, G.Y., Frazier, A., White, S., Garrard, C., A'Court, C., Storer, S., Gervich, D.H., Foshe, D., Brase, R., Bagdahn, A., Cooney, R., Smith, J.S.J., Martin, L.F., Vincent, J.-L., Friedman, G., Berlot, G., Fletcher, J.R., Williams, M.D., Wright, T.F., Johnson, S., Feild, C., Wolf, K., MacIntyre, N., Dubin, H.G., Durkin, M.R., Dubin, P.K., Staubach, K.H., Fein, A.M., Schulman, D.B., Niederman, M.S., Chalfin, D.B., van Leeuwen, P.A.M., Boermeester, M.A., J. Schneider, A., Bander, J., Imm, A., Bernard, G., Nelson, L., Stroud, M., Safcsak, K., Cerra, F., Rindal, J., Mann, H., Halpern, N., Silverstein, J., Alicea, M., Sibbald, W.J., Martin, C.M., Rutledge, F.S., Petti, K., Russell, J.A., Kruger, R., Drummond, A., Lange, P., Seifert, T., Durocher, A., Tenailon, A., Boiteau, R., Lherm, T., Lowry, S.F., Coyle, S.M., Barie, P.S., DeMaria, E., Snyderman, D.R., Schweitzberg, S.D., Nasraway, S.A.J., Grindlinger, J., Summer, W., de Boisblanc, B., Wahl, M., Alestig, K., Grossman, J., Maki, D., Paz, H.L., Weiner, M., Bihari, D., Campbell, D., Bleichner, G., Dahn, M.S., Lange, M.P., Hall, J., Pohlman, A., Wenzel, R.P., Grosserode, M., Costigan, M., Mileski, W., Weigelt, J., Yeston, N., Irizarry, C., Ross, J., Robbins, J., Nightingale, P., Owen, K., Sandstedt, S., Berg, S., Simon, G.L., Seneff, M.G., Conry, K.M., Zimmerman, J.L., Dellinger, R.P., Johnston, R.J., Allee, P., Grande, P.-O., Myhre, E., Dhainaut, J.-F., Hamy, I., Mira, J.-P., Harmon, J., White, J., McKie, L., Silverman, H., Tuma, P., Bennett, D., Porter, J.C., Laurell, M.H., Jacobs, S., Ash, S., Stiles, D.M., Prior, M.J., Knatterud, G., Terrin, M., Kufera, J., Wilkens, P., Ra, K., Monroe, L., Sprung, C., Hamilton, C.M., Matthay, R., McCabe, W., Tonascia, J., Wiedeman, H., Wittes, J., Knatterud, G., Champion, G.V., Croft, C.R., Lustick, R., Lookabaugh, J., Gordon, G.S., Noe, L., Bloedow, D., Christopher, S.G., Brannon, D., Kush, R., Ng, D., Moore, E., Bazemore, K., Galvan, M., Wagner, D., Harrell, F., and Stablein, D. (1994). Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* *271*, 1836-1843.
44. Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D.O., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U., and Reinhart, K. (2016). Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* *113*, 159-166.
45. Foster, S.L., Hargreaves, D.C., and Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* *447*, 972-978.

46. Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 3015-3029.
47. Gay, N.J., and Keith, F.J. (1991). *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.
48. Geroulanos, S., and Douka, E.T. (2006). Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med* 32, 2077.
49. Giamarellos-Bourboulis, E.J. (2013). Failure of treatments based on the cytokine storm theory of sepsis: time for a novel approach. *Immunotherapy* 5, 207-209.
50. Gillespie, E.J., Ho, C.L., Balaji, K., Clemens, D.L., Deng, G., Wang, Y.E., Elsaesser, H.J., Tamilselvam, B., Gargi, A., Dixon, S.D., France, B., Chamberlain, B.T., Blanke, S.R., Cheng, G., de la Torre, J.C., Brooks, D.G., Jung, M.E., Colicelli, J., Damoiseaux, R., and Bradley, K.A. (2013). Selective inhibitor of endosomal trafficking pathways exploited by multiple toxins and viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E4904-4912.
51. Grazioli, S., Dunn-Siegrist, I., Pauchard, L.-A., Blot, M., Charles, P.-E., and Pugin, J. (2019). Mitochondrial alarmins are tissue mediators of ventilator-induced lung injury and ARDS. *PloS one* 14, e0225468-e0225468.
52. Gregory A Schmidt, M., and Jess Mandel, M. (2021). Evaluation and management of suspected sepsis and septic shock in adults. Retrieved 14.03.2021, Online-Publikation; <https://www.uptodate.com/contents/evaluation-and-management-of-suspected-sepsis-and-septic-shock-in-adults#H11633281939>
53. Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3, 1097-1101.
54. Gu, X., Zhou, F., Wang, Y., Fan, G., and Cao, B. (2020). Respiratory viral sepsis: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment. *Eur Respir Rev* 29.
55. Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.
56. Heagy, W., Hansen, C., Nieman, K., Cohen, M., Richardson, C., Rodriguez, J.L., and West, M.A. (2000). Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify "septic" intensive care unit patients. *Shock* 14, 271-276; discussion 276-277.
57. Heagy, W., Nieman, K., Hansen, C., Cohen, M., Danielson, D., and West, M.A. (2003). Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 4, 171-180.
58. Hoaglin, e., Hoaglin, D.C., Mosteller, F., Mosteller, e., Tukey, J.W., Wiley, J., Sons, Tukey, e., Emerson, J.D., Gasko, M., and Goodall, C. (1983). *Understanding Robust and Exploratory Data Analysis* (Wiley).
59. Homewood, C.A., Warhurst, D.C., Peters, W., and Baggaley, V.C. (1972). Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature* 235, 50-52.

60. Hornef, M.W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S., and Richter-Dahlfors, A. (2002). Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 559-570.
61. Hotchkiss, R.S., Colston, E., Yende, S., Angus, D.C., Moldawer, L.L., Crouser, E.D., Martin, G.S., Coopersmith, C.M., Brakenridge, S., Mayr, F.B., Park, P.K., Ye, J., Catlett, I.M., Girgis, I.G., and Grasela, D.M. (2019). Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis: A Phase 1b Randomized, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study of Antiprogrammed Cell Death-Ligand 1 Antibody (BMS-936559). *Crit Care Med* 47, 632-642.
62. Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., Reinhart, K., Turnbull, I.R., and Vincent, J.L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16045.
63. Huang, X., Venet, F., Wang, Y.L., Lepape, A., Yuan, Z., Chen, Y., Swan, R., Kherouf, H., Monneret, G., Chung, C.S., and Ayala, A. (2009). PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6303-6308.
64. Humme, A. (2016). Viele Todesfälle in Deutschland laut Experten vermeidbar. In *Ärzte Zeitung online*.
65. Hutchins, N.A., Unsinger, J., Hotchkiss, R.S., and Ayala, A. (2014). The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med* 20, 224-233.
66. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* 11, 3887-3895.
67. Jacquin, E., Leclerc-Mercier, S., Judon, C., Blanchard, E., Fraitag, S., and Florey, O. (2017). Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway driving unconventional LC3 lipidation. *Autophagy* 13, 854-867.
68. Jaeger, A., and Flesch, F. (1994). Chloroquine PIM 123 (<http://www.inchem.org/>: IPCS Inchem).
69. Kamat, S., and Kumari, M. (2021). Repurposing Chloroquine Against Multiple Diseases With Special Attention to SARS-CoV-2 and Associated Toxicity. *Front Pharmacol* 12, 576093.
70. Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.
71. Keir, M.E., Liang, S.C., Guleria, I., Latchman, Y.E., Qipo, A., Albacker, L.A., Koulmanda, M., Freeman, G.J., Sayegh, M.H., and Sharpe, A.H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 203, 883-895.
72. Kim, H.K., Thammavongsa, V., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2012). Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology* 15, 92-99.
73. Kindrachuk, J., Potter, J.E., Brownlie, R., Ficzy, A.D., Griebel, P.J., Mookherjee, N., Mutwiri, G.K., Babiuk, L.A., and Napper, S. (2007). Nucleic acids exert a sequence-independent cooperative effect on sequence-dependent activation of Toll-like receptor 9. *J Biol Chem* 282, 13944-13953.

74. Kirschning, C.J., Wesche, H., Merrill Ayres, T., and Rothe, M. (1998). Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* *188*, 2091-2097.
75. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., and Silbernagl, S. (2010). 7.4 Abwehrmechanismen des Körpers. In *Physiologie*, R. Klinke, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, eds. (Georg Thieme Verlag).
76. Kruger, A., Oldenburg, M., Chebrolu, C., Beisser, D., Kolter, J., Sigmund, A.M., Steinmann, J., Schafer, S., Hochrein, H., Rahmann, S., Wagner, H., Henneke, P., Hornung, V., Buer, J., and Kirschning, C.J. (2015). Human TLR8 senses UR/URR motifs in bacterial and mitochondrial RNA. *EMBO Rep* *16*, 1656-1663.
77. Kužnik, A., Benčina, M., Švajger, U., Jeras, M., Rozman, B., and Jerala, R. (2011). Mechanism of Endosomal TLR Inhibition by Antimalarial Drugs and Imidazoquinolines. *The Journal of Immunology* *186*, 4794-4804.
78. Kyriazopoulou, E., Leventogiannis, K., Norrby-Teglund, A., Dimopoulos, G., Pantazi, A., Orfanos, S.E., Rovina, N., Tsangaris, I., Gkavogianni, T., Botsa, E., Chassiou, E., Kotanidou, A., Kontouli, C., Chaloulis, P., Velissaris, D., Savva, A., Cullberg, J.S., Akinosoglou, K., Gogos, C., Armaganidis, A., Giamarellos-Bourboulis, E.J., and Hellenic Sepsis Study, G. (2017). Macrophage activation-like syndrome: an immunological entity associated with rapid progression to death in sepsis. *BMC Med* *15*, 172.
79. Landelle, C., Lepape, A., Voirin, N., Tognet, E., Venet, F., Bohe, J., Vanhems, P., and Monneret, G. (2010). Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* *36*, 1859-1866.
80. Le Gall, J.R., Lemeshow, S., and Saulnier, F. (1993). A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *Jama* *270*, 2957-2963.
81. Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* *271*, 1734-1736.
82. Lee, J.D., Kravchenko, V., Kirkland, T.N., Han, J., Mackman, N., Moriarty, A., Leturcq, D., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J. (1993). Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 9930-9934.
83. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
84. Levy, M.M., Dellinger, R.P., Townsend, S.R., Linde-Zwirble, W.T., Marshall, J.C., Bion, J., Schorr, C., Artigas, A., Ramsay, G., Beale, R., Parker, M.M., Gerlach, H., Reinhart, K., Silva, E., Harvey, M., Regan, S., and Angus, D.C. (2010). The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med* *36*, 222-231.
85. Li, J., Lin, K.-W., Murray, F., Nakajima, T., Zhao, Y., Perkins, D.L., and Finn, P.W. (2013). Regulation of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 by cyclic AMP. *Am J Respir Cell Mol Biol* *48*, 63-70.

86. Li, X., Mu, G., Song, C., Zhou, L., He, L., Jin, Q., and Lu, Z. (2018). Role of M2 Macrophages in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Shock* 50, 233-239.
87. Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *The Journal of experimental medicine* 173, 721-730.
88. Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., and Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.
89. Luan, Y.Y., Yin, C.F., Qin, Q.H., Dong, N., Zhu, X.M., Sheng, Z.Y., Zhang, Q.H., and Yao, Y.M. (2015). Effect of Regulatory T Cells on Promoting Apoptosis of T Lymphocyte and Its Regulatory Mechanism in Sepsis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 35, 969-980.
90. Lüllmann-Rauch, R., and Paulsen, F. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie, 4* (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG).
91. Malewicz, N.M., Walstein, K., Heine, T., Engler, A., Bick, A., Cox, L., Dotsch, A., Westendorf, A.M., Horn, P.A., Lindemann, M., Peters, J., and Schafer, S.T. (2019). Early suppression of peripheral mononuclear blood cells in sepsis in response to stimulation with cytomegalovirus, OKT3, and pokeweed mitogen. *J Appl Physiol* (1985) 127, 1539-1547.
92. Martin, P.J., Ledbetter, J.A., Morishita, Y., June, C.H., Beatty, P.G., and Hansen, J.A. (1986). A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 136, 3282-3287.
93. Meng, G., Rutz, M., Schiemann, M., Metzger, J., Grabiec, A., Schwandner, R., Lippa, P.B., Ebel, F., Busch, D.H., Bauer, S., Wagner, H., and Kirschning, C.J. (2004). Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 113, 1473-1481.
94. Mitcham, J.L., Parnet, P., Bonnert, T.P., Garka, K.E., Gerhart, M.J., Slack, J.L., Gayle, M.A., Dower, S.K., and Sims, J.E. (1996). T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. *J Biol Chem* 271, 5777-5783.
95. Monard, C., Rimmelé, T., and Ronco, C. (2019). Extracorporeal Blood Purification Therapies for Sepsis. *Blood Purification* 47, 2-15.
96. Monneret, G., and Venet, F. (2016). Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 90, 376-386.
97. Monnet, E., Choy, E.H., McInnes, I., Kobakhidze, T., de Graaf, K., Jacqmin, P., Lapeyre, G., and de Min, C. (2020). Efficacy and safety of NI-0101, an anti-toll-like receptor 4 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis after inadequate response to methotrexate: a phase II study. *Ann Rheum Dis* 79, 316-323.
98. Motulsky, H.J., and Brown, R.E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 7, 123.
99. Nedeva, C., Menassa, J., and Puthalakath, H. (2019). Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7.

100. Netea, M.G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M.Y., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Golenbock, D., Gresnigt, M.S., Heneka, M.T., Hoffman, H.M., Hotchkiss, R., Joosten, L.A.B., Kastner, D.L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K.H.G., Nowak, K.L., O'Neill, L.A., Pickkers, P., van der Poll, T., Ridker, P.M., Schalkwijk, J., Schwartz, D.A., Siegmund, B., Steer, C.J., Tilg, H., van der Meer, J.W.M., van de Veerdonk, F.L., and Dinarello, C.A. (2017). A guiding map for inflammation. *Nat Immunol* **18**, 826-831.
101. Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., Minato, N., Yagita, H., Nakano, T., and Honjo, T. (1996). Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *International immunology* **8**, 773-780.
102. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-151.
103. Ohkuma, S., and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75**, 3327-3331.
104. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2013). A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* **14**, 1212-1218.
105. Oldenburg, M., Kruger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H., and Kirschning, C.J. (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* **337**, 1111-1115.
106. Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., and Wetzler, L.M. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol* **3**, 79.
107. Opal, S.M., Laterre, P.F., Francois, B., LaRosa, S.P., Angus, D.C., Mira, J.P., Wittebole, X., Dugernier, T., Perrotin, D., Tidswell, M., Jauregui, L., Krell, K., Pachl, J., Takahashi, T., Peckelsen, C., Cordasco, E., Chang, C.S., Oeyen, S., Aikawa, N., Maruyama, T., Schein, R., Kalil, A.C., Van Nuffelen, M., Lynn, M., Rossignol, D.P., Gogate, J., Roberts, M.B., Wheeler, J.L., Vincent, J.L., and Group, A.S. (2013). Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* **309**, 1154-1162.
108. Otto, G.P., Sossdorf, M., Claus, R.A., Rodel, J., Menge, K., Reinhart, K., Bauer, M., and Riedemann, N.C. (2011). The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* **15**, R183.
109. 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**, 1239-1254.
110. Pentcheva-Hoang, T., Chen, L., Pardoll, D.M., and Allison, J.P. (2007). Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17765-17770.
111. Picardo, S.L., Doi, J., and Hansen, A.R. (2019). Structure and Optimization of Checkpoint Inhibitors. *Cancers (Basel)* **12**, 38.

112. Pierrakos, C., and Vincent, J.L. (2010). Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 14, R15.
113. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
114. Prescott, H.C., Osterholzer, J.J., Langa, K.M., Angus, D.C., and Iwashyna, T.J. (2016). Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ* 353, i2375.
115. Reichhart, J.M., Georgel, P., Meister, M., Lemaitre, B., Kappler, C., and Hoffmann, J.A. (1993). Expression and nuclear translocation of the rel/NF-kappa B-related morphogen dorsal during the immune response of *Drosophila*. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie* 316, 1218-1224.
116. Reilly, M., Miller, R.M., Thomson, M.H., Patris, V., Ryle, P., McLoughlin, L., Mutch, P., Gilboy, P., Miller, C., Broekema, M., Keogh, B., McCormack, W., and van de Wetering de Rooij, J. (2013). Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating phase I, healthy subjects study of intravenous OPN-305, a humanized anti-TLR2 antibody. *Clin Pharmacol Ther* 94, 593-600.
117. Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359, 1350-1355.
118. Riedemann, N.C., Guo, R.F., and Ward, P.A. (2003). The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112, 460-467.
119. Rittirsch, D., Hoesel, L.M., and Ward, P.A. (2007). The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 81, 137-143.
120. Rosas-Ballina, M., Olofsson, P.S., Ochani, M., Valdes-Ferrer, S.I., Levine, Y.A., Reardon, C., Tusche, M.W., Pavlov, V.A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T.W., and Tracey, K.J. (2011). Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334, 98-101.
121. Rowshanravan, B., Halliday, N., and Sansom, D.M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 131, 58-67.
122. Russell, J.A. (2006). Management of sepsis. *N Engl J Med* 355, 1699-1713.
123. Said, E.A., Dupuy, F.P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B.J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S.G., Van Grevenynghe, J., Boulassel, M.R., Bruneau, J., Shoukry, N.H., Routy, J.P., Douek, D.C., Haddad, E.K., and Sekaly, R.P. (2010). Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* 16, 452-459.
124. Schottmüller, H. (1914). Verhandlungen des 31. Deutschen Kongresses für Innere Medizin. . *Band 31*, S. 257–280.
125. Seymour, C.W., Gesten, F., Prescott, H.C., Friedrich, M.E., Iwashyna, T.J., Phillips, G.S., Lemeshow, S., Osborn, T., Terry, K.M., and Levy, M.M. (2017). Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med* 376, 2235-2244.

126. 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., Deutschman, C.S., Escobar, G.J., and Angus, D.C. (2016). Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 762-774.
127. Simmons, J., and Pittet, J.F. (2015). The coagulopathy of acute sepsis. *Current opinion in anaesthesiology* 28, 227-236.
128. 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., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.L., and Angus, D.C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801-810.
129. Slater, A.F. (1993). Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 57, 203-235.
130. Spiller, S., Elson, G., Ferstl, R., Dreher, S., Mueller, T., Freudenberg, M., Daubeuf, B., Wagner, H., and Kirschning, C.J. (2008). TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *The Journal of experimental medicine* 205, 1747-1754.
131. Sun, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T.N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* 48, 434-452.
132. Thijs, L.G., and Hack, C.E. (1995). Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Medicine* 21, S258-S263.
133. Vasilevskis, E.E., Pandharipande, P.P., Graves, A.J., Shintani, A., Tsuruta, R., Ely, E.W., and Girard, T.D. (2016). Validity of a Modified Sequential Organ Failure Assessment Score Using the Richmond Agitation-Sedation Scale. *Crit Care Med* 44, 138-146.
134. Venet, F., Demaret, J., Blaise, B.J., Rouget, C., Girardot, T., Idealisoa, E., Rimmelé, T., Mallet, F., Lepape, A., Textoris, J., and Monneret, G. (2017). IL-7 Restores T Lymphocyte Immunometabolic Failure in Septic Shock Patients through mTOR Activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 199, 1606-1615.
135. Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, 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. *Intensive Care Medicine* 22, 707-710.
136. Vögtli, A. (2020). Adrenalin. Retrieved 08.04.2022, 2022, Online-Publikation; <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Adrenalin>
137. Walton, A.H., Muenzer, J.T., Rasche, D., Boomer, J.S., Sato, B., Brownstein, B.H., Pachot, A., Brooks, T.L., Deych, E., Shannon, W.D., Green, J.M., Storch, G.A., and Hotchkiss, R.S. (2014). Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PloS one* 9, e98819.
138. Ward, P.A., and Fattahi, F. (2016). Editorial: Blockade of PD-1 and PD-L1 restores defective innate immune responses in leukocytes from septic humans. *J Leukoc Biol* 100, 1229-1231.

139. Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science* 270, 985-988.
140. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275.
141. Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L., and Godowski, P.J. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395, 284-288.
142. Yasuda, H., Leelahavanichkul, A., Tsunoda, S., Dear, J.W., Takahashi, Y., Ito, S., Hu, X., Zhou, H., Doi, K., Childs, R., Klinman, D.M., Yuen, P.S., and Star, R.A. (2008). Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology* 294, F1050-1058.
143. Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L.C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C.J., Clark, H., Eaton, D., and Grogan, J.L. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 48-57.
144. 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, R70.
145. 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, R220.
146. Zhao, G.J., Li, D., Zhao, Q., Song, J.X., Chen, X.R., Hong, G.L., Li, M.F., Wu, B., and Lu, Z.Q. (2016). Incidence, risk factors and impact on outcomes of secondary infection in patients with septic shock: an 8-year retrospective study. *Sci Rep* 6, 38361.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1 Inzidenz und Krankenhausletalität von Sepsis und schwerer Sepsis einschließlich septischem Schock in Deutschland 2007 – 2013	8
Abbildung 1-2 Zusammenfassung der Sepsispathophysiologie	9
Abbildung 1-3 Pathophysiologie des systemischen inflammatorischen Response-Syndroms bei Sepsis und therapeutische Ansätze.....	14
Abbildung 1-4 Übersicht der humanen Toll-like-Rezeptoren mit zugehörigen Liganden und Signalwegen.....	16
Abbildung 1-5 Hemmung der T-Zell-Kostimulation durch CTLA4.....	18
Abbildung 1-6 Mechanismus der Immunhemmung durch die PD1/L1 Achse	20
Abbildung 3-1 Wachstumskurven von <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i> Bakterien	30
Abbildung 4-1 Immunresponsivität von Vollblut unter Antikoagulation mit verschiedenen Substanzen	45
Abbildung 4-2 Zytokinverlust durch Serumpräparation aus LPS-stimuliertem Vollblutplasma	46
Abbildung 4-3 Differentielle Veränderung der Immunreaktion von Blutleukozyten durch Verdünnung in Medium	46
Abbildung 4-4 Lagerungsbedingte Abnahme der Immunreaktivität von Vollblut.....	47
Abbildung 4-5 Senkung der LPS-stimulierten TNF Produktion von Vollblut durch Adrenalin und Noradrenalin	48
Abbildung 4-6 Spezifische Stimulation und Hemmung von TLR2 und -4 in Vollblut	49
Abbildung 4-7 Stimulation und Hemmung von TLR7/8 und -9 in Vollblut	50
Abbildung 4-8 Dosiskinetik einer spezifischen TLR7/8 Stimulation und der Hemmung mit Chloroquin.....	50
Abbildung 4-9 Toxizitätskontrolle von Chloroquin im Vollblutmodell.....	51
Abbildung 4-10 Keine Hemmung der Immunstimulation durch den Endosomeninhibitor EGA	52
Abbildung 4-11 Weitgehende Unabhängigkeit der bakteriell stimulierten Zytokinproduktion in Vollblut von Bakterienkonzentration, Antibiotikatherapie und endosomaler Hemmung	53
Abbildung 4-12 Dosiskinetik bakterieller Immunstimulation mit zweizeitiger Antibiotikagabe in Vollblut	54
Abbildung 4-13 Dosiskinetik gentamicinbehandelter Bakterien als Immunstimulus in Vollblut	55
Abbildung 4-14 Falschpositive ELISA Messung bei Verwendung von Gentamicinin-behandeltem <i>S. aureus</i>	56

Abbildung 4-15 Dosiskinetik der Immunstimulation durch hitzeinaktivierten <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> sowie der Hemmung durch Chloroquin.....	56
Abbildung 4-16 Verlust endosomaler TLR-Stimulation durch Bakterieninaktivierung bei 60°C, nicht aber bei 96°C.....	57
Abbildung 4-17 Kombinierte TLR-2, -4, -7/8 Inhibition zur Hemmung der Immunaktivierung durch <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i>	58
Abbildung 4-18 Kein Effekt von ICI auf die Zytokinproduktion von Vollblut unabhängig von einer LPS Stimulation.....	59
Abbildung 4-19 Kein Effekt von ICI auf die Zytokinproduktion von verdünntem Vollblut oder PBMCs unabhängig von einer LPS Stimulation	60
Abbildung 4-20 Reduzierte Reaktivität von Vollblut auf verschiedene TLR-Stimuli nach niedrigdosierter LPS-Gabe	61
Abbildung 4-21 ICI vermindert die LPS-induzierte Immuntoleranz gegenüber <i>E. coli</i> Bakterien	62
Abbildung 4-22 Ähnliche Monozytenkonzentration im Blut von Sepsispatienten und Probanden	66
Abbildung 4-23 Keimnachweis und verwendete Methoden.....	67
Abbildung 4-24 Klinischer Infektfokus der Sepsispatienten.....	68
Abbildung 4-25 Nachgewiesene Erregertypen und Beurteilung der Glaubwürdigkeit als Sepsiserreger.....	69
Abbildung 4-26 Erhöhte DNA-Konzentrationen im Plasma von Sepsispatienten	71
Abbildung 4-27 Stärkere TLR2 Aktivierung durch Plasma von Sepsispatienten als von gesunden Probanden	72
Abbildung 4-28 Fortlaufende Immunaktivität des Blutes von Sepsispatienten <i>ex vivo</i> abhängig von TLR2, -4, -8	73
Abbildung 4-29 Im Vergleich zu gesunden Probanden verminderte Reaktion von Vollblut von Sepsispatienten auf bakterielle Immunstimulation	74
Abbildung 4-30 Im Vergleich zu gesunden Probanden verminderte Reaktion von Vollblut von Sepsispatienten auf spezifische TLR2, -4, -7/8 Stimulation	75
Abbildung 4-31 Unabhängige Assoziation von LPS-Reaktivität des Vollbluts und Sepsisüberleben sowie Vorliegen eines septischen Schocks	76
Abbildung 4-32 Erhöhte Expression von PD-1, PD-L1 und CTLA-4 im Blut von Sepsispatienten	77
Abbildung 4-33 Keine Reaktion von Vollblut von Sepsispatienten auf eine PD-1 / L1 oder CTLA4 Inhibition.....	78
Abbildung 4-34 ICI reaktive Vollblutproben von Sepsispatienten gemäß ROUT-Analyse	80
Abbildung 4-35 Korrelation der Reaktivität auf verschiedene ICI	81

Abbildung 4-36 Keine Reaktion der ICI-reaktiven Patienten auf Isotypkontrollen.....82
Abbildung 4-37 Zeitstabile Reaktion auf ICI des Vollbluts einer Sepsispatientin83

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1 Berechnung des SOFA-Scores.....	12
Tabelle 3-1 Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 3-2 Verbrauchslösungen zubereitet in domo.....	25
Tabelle 3-3 Sonstige Verbrauchslösungen.....	26
Tabelle 3-4 Verbrauchsmaterial.....	27
Tabelle 3-5 Verwendete Organismen.....	28
Tabelle 3-6 Verwendete Reagenzien.....	28
Tabelle 3-7 Verwendete Antikörper.....	29
Tabelle 3-8 Mehrfachtestkorrektur zur Hypothesenfamilie „septische Hyperinflammation“ ...	41
Tabelle 3-9 Mehrfachtestkorrektur zur Hypothesenfamilie „septische Hypoinflammation“.....	42
Tabelle 4-1 Klinische und demografische Patientencharakteristika.....	64
Tabelle 4-2 Sepsis-relevante Kennzahlen der Patientenkohorte: Numerische Daten als Fünf-Zahlen Zusammenfassung (Hoaglin et al., 1983).....	65
Tabelle 4-3 Klinische und demografische Probandencharakteristika.....	65
Tabelle 4-4 Nachgewiesener und glaubwürdig sepsisursächlicher Keim sowie Zahl der Patienten mit entsprechendem Keimnachweis.....	70
Tabelle 10-1 Abkürzungen.....	107

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SI-Einheiten, Einheiten des Alltags und übliche Skalenbegriffe werden als bekannt vorausgesetzt.

Tabelle 10-1 Abkürzungen

c.f.u.	Kolonieformende Einheiten („Colony forming units“). Die Anzahl von einzelnen Bakterien oder Bakterienhaufen, die bei Aussaat auf einem geeigneten Medium und Inkubation je eine Kolonie formen.
hi	hitzeinaktiviert
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
bspw.	beispielsweise
s.g.	sogenannt; sogenannte; sogenannter; sogenanntes
s.	siehe
s.u.	siehe unten
s.o.	siehe oben
o.g.	oben genannte
I.E.	Internationale Einheiten
h	Stunde(n) („hora“; „horae“)
min	Minuten
s	Sekunden
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster („Pathogen associated molecular pattern“)
DAMP	Gefahr-assoziiertes molekulares Muster („Danger associated molecular pattern“)
TLR	Toll-like Rezeptor
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor; Immuncheckpoint-Inhibition
PBMC	Monozytäre Zellen im peripheren Blut; („Periphery blood mononuclear cells“)

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Dissertationsschrift ermöglicht haben:

Prof. Dr. Carsten Kirschning danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, sowie für die Projektkonzeption in Kooperation mit Prof. em. Dr. Jürgen Peters. Diese Beiden haben bei unseren produktiven Kooperationstreffen mit scharfsinnigen und anspornenden Anregungen zu neuen Versuchen das Projekt immer wieder nach vorne gebracht. Prof. Dr. Jan Buer danke ich für seine Bereitschaft, mich als Zweitbetreuer bei der Promotion zu unterstützen. Zudem danke ich Prof. Dr. Stefanie Flohé für die Begutachtung dieser Dissertationsschrift, Dr. Maike Busch für die Organisation und Leitung meiner Promotionsprüfung und dem Promotionsbüro für die Organisation des Verfahrens.

Dr. Alexandra Bick danke ich für die langjährige, enge, fruchtbare und kollegiale Zusammenarbeit in beinahe allen Belangen dieses Projekts. Ich bin froh, dass wir gemeinsam immer wieder einen Weg gefunden haben, das Projekt am Laufen zu halten.

Dr. Frank Herbstreit und den Ärzten, Pflegekräften und Hilfskräften der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin danke ich für Hilfe bei der Probenakquise, die sie zusätzlich zur Patientenversorgung leisteten.

Dr. Andrea Engler, Dr. Andreas Limmer, Dr. Mazen Atia und Dr. Rabea Madel danke ich für ihre Arbeit an Patientenproben und die Bereitstellung der zugehörigen Daten, sowie die gemeinsame Diskussion von experimentellen Verfahren und Ergebnissen.

Prof. Dr. Wiebke Hansen und Prof. Dr. Astrid Westendorf danke ich für die Bereitstellung von Labormaterialien, Gerätezeit, sowie Rat und Tat zu Luminex und Durchflusszytometrie, sowie Dr. Schnurrer für die Bereitstellung der Immuncheckpoint-Inhibitoren und dem Institut für Transfusionsmedizin unter Prof. Dr. Horn für die Bereitstellung von Blut zur PBMC Isolation.

Sabine Schimanski danke ich für ihre Hilfe bei der Etablierung des Experimentalmodells Vollblut, sowie für die Anleitung zu Zellkultur und ELISA, zudem danke ich Thomas Scholtysik für seine Anleitung zu Bakterienkultur und -inaktivierung.

Prof. Dr. Ursula Rauen und Dr. Gesine Pless-Petig danke ich für die Organisation, sowie der Else-Kröner-Fresenius Stiftung für die Finanzierung des ELAN-Programms, durch welches ich viel wissenschaftliches Handwerkszeug erlernte, auf das Projekt aufmerksam wurde und durch welches das Projekt mitfinanziert wurde.

Am Schluss danke ich meiner Familie, meinen Freunden und Lieben für Ihre seelische und persönliche Unterstützung während meines Studiums und dem Verfassen meiner Dissertation. Ohne diese Hilfe hätte ich all das nicht geschafft.

12 LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.