

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt
operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression von Clock Genes bei kritisch kranken Patienten mit
septischem Schock

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lara-Marie Scherfig

aus Rostock

Datum der Promotion: 03.12.2021

Teilergebnisse dieser Promotion wurden vor Abschluss des Promotionsverfahrens in folgender Originalarbeit veröffentlicht:

Gunnar Lachmann, Bharath Ananthasubramaniam, Viktor A. Wunsch, Lara-Marie Scherfig, Clarissa von Haefen, Cornelia Knaak, Andreas Edel, Lukas Ehlen, Barbara Koller, Anton Goldmann, Hanspeter Herzel, Achim Kramer, Claudia Spies

„Circadian Rhythms in Septic Shock Patients“

Angenommen zur Publikation im März 2021 beim Journal „Annals of Intensive Care“

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	9
Abstract	11
1. Einleitung	12
1.1 Sepsis	12
1.1.1 Epidemiologie und Stellenwert der Sepsis	12
1.1.2 Definition Sepsis.....	13
1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis	14
1.1.3.1 Angeborene Immunität und Entzündungsmediatoren	16
1.1.3.2 Immunsuppression	17
1.1.3.3 Schädigung von Gewebe und Organen	17
1.1.3.4 Dysregulierung der Gerinnung	17
1.2 Zirkadianer Rhythmus	18
1.2.1 Zirkadianer Rhythmus des Immunsystems	19
1.2.2 Molekulare Mechanismen	20
1.3 Hypothese	22
2. Methodik.....	23
2.1 Studiendesign	23
2.1.1 Studieneinschluss	23
2.2 Patientenkollektiv	23
2.2.1 Einschlusskriterien	23
2.2.2 Ausschlusskriterien	23
2.3 Studienablauf	24
2.4 Intensivmedizinische Scores.....	25
2.4.1 SOFA Score	25
2.4.2 SAPS II	26
2.4.3 TISS–28 Score	26
2.5 Monozytenisolierung	28
2.6 Labor	28
2.6.1 NanoString Datenerfassung– und verarbeitung	29
2.7 Vergleichsgruppe	29
2.8. Statistische Analyse	30
3. Ergebnisse	32
3.1. Patienten	32
3.1.1 Patientenpopulation.....	32
3.1.2 Patientencharakteristika	32
3.2 Rhythmizität der Clock Genes in Patienten mit septischem Schock.....	34
3.2.1 Rhythmische und arrhythmische Gene	34

3.2.2 Genexpressionsprofile einzelner Clock Genes	35
3.2.3 Rhythmizitätswerte einzelner Patienten und Clock Genes.....	36
3.3 Vergleich Sepsis–Patienten mit jungen, gesunden Männern	38
3.4 Zusammenhang von Rhythmizitätswerten und Patientencharakteristika	42
3.5 Vergleich Basischarakteristika Patienten mit rhythmischen Genen und arrhythmischen / nicht zuzuordnenden Genen	42
3.6 Vergleich Letalität von Patienten mit rhythmischen Genen und arrhythmischen / nicht zuzuordnenden Genen	44
3.5 Temperaturverlauf bei septischen Patienten	44
4. Diskussion	46
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse	46
4.2 Clock Genes und das Immunsystem	46
4.3 Zirkadiane Rhythmik und Infektionen.....	48
4.4 Zirkadiane Rhythmik junger, gesunder Männer	50
4.5 Therapeutische Ansätze zur Beeinflussung der Expression von Clock Genes ...	50
4.6 Limitationen der vorliegenden Arbeit	51
4.7 Ausblick.....	52
Literaturverzeichnis	54
Eidesstattliche Versicherung	64
Lebenslauf.....	65
Danksagung	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SOFA Score [75].....	25
Tabelle 2: Der TISS–28 Score [80].....	27
Tabelle 3: Baselinecharakteristika erhoben zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme der Messreihe	33
Tabelle 4: Rhythmizitätswerte SeptiClock–Patienten	37
Tabelle 5: Rhythmizitätswerte der häufigsten Clock Genes in SeptiClock–Patienten...	38
Tabelle 6: Rhythmizitätswerte (reduziert auf 7 Gene)	41
Tabelle 7: Korrelation des Rhythmizitätswertes und Patientencharakteristika nach Pearson.....	42
Tabelle 8: Vergleich Basischarakteristika von Patienten mit rhythmischen und arrhythmischen / nicht zuzuordnenden Genen.....	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flussschema zur Diagnose Sepsis und septischer Schock [10]	14
Abbildung 2: Immunantwort bei Sepsis [23, 24]	15
Abbildung 3: Physiologie und molekulare Mechanismen der zirkadianen Rhythmik [62]	20
Abbildung 4: Graphische Darstellung einer Messreihe [74]	25
Abbildung 5: Flussdiagramm der gescreenten Patienten	32
Abbildung 6: Quantifizierung der Rhythmizität von Clock Genes von SeptiClock– Patienten [74]	34
Abbildung 7: Genexpressionsmuster der Clock Genes von SeptiClock–Patienten [74]	36
Abbildung 8: Vergleich der mittleren Expression verschiedener Gene in SeptiClock– Patienten und jungen, gesunden Männern [74].....	39
Abbildung 9: Vergleich der Rhythmizität in SeptiClock–Patienten und jungen, gesunden Männern [74]	40
Abbildung 10: Körperkerntemperatur bei SeptiClock–Patienten [74]	45

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	acute respiratory distress syndrom
arrhy	arrhythmisch
art.	arteriell
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BE	Base Excess
BMAL-1	Brain and Muscle ARNTL-Like 1
BMI	Body Mass Index
BOTI	BodyTime
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CAM-ICU	Confusion Assessment Method für Intensivstationen
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CCM	Campus Charité Mitte
CD	Cluster of Differentiation
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CMV	Cytomegalievirus
CRY	Cryptochrome
CVK	Charité Campus Virchow-Klinikum
DAMP	damage associated molecular patterns
DIC	disseminated intravascular Coagulation
DMARDS	Disease-modifying anti-rheumatic drugs
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Diagnosebezogene Fallgruppen
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
E-Box	Enhancer-Box
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
etc.	et cetera
GPT	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DR	human leukocyte Antigen-DR isotype
HSV	Herpes-simplex-Virus
kPa	Kilopascal
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
LPS	Lipopolysaccharid
kg	Kilogramm

KG	Körpergewicht
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MDD	Major Depression
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter mmHg
	Millimeter–Quecksilbersäule
mRNA	messenger–Ribonukleinsäure
nl	Nanoliter
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NOD	Nukleotidebinding oligomerization domain
	Operation
OP	Sauerstoff
O ₂	Simplified acute physiology Score II
SAPS II	Nucleus suprachiasmaticus
SCN	systematic inflammatory host response
SIRS	Sepsis–related Organ failure assessment score
SOFA	Kohlendioxidpartialdruck
	Pathogen–associated molecular pattern
PaCO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PAMP	Oxygenierungsindex nach Horovitz
PaO ₂	Positiver endexpiratorischer Druck
PaCO ₂ /FiO ₂	period circadian protein homolog
PEEP	partielle Thromboplastinzeit
PER	quickSOFA
PTT	rat sarcoma
qSOFA	rhythmisch
ras	Retinoic acid inducible gene
rhy	Ribonukleinsäure
RIG	Retinoid–related orphan receptor
RNA	Transösophageale Echokardiographie
ROR	Therapeutic Intervention Scoring System
TEE	28
TISS–28	Toll–like–Rezeptor
	Tumornekrosefaktor
TLR	ultraviolett
TNF	Verdacht auf
UV	visible
V. a.	zum Beispiel
VIS	
z. B.	

Zusammenfassung

Hintergrund: Trotz fortschreitendem Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis wird die weltweite Mortalität septischer Patienten auf 30 bis 50 % geschätzt. Aufgehobene zirkadiane Rhythmen konnten mit verschiedenen pathologischen Zuständen, die zu tödlichen Entzündungen und Immunschwäche führten, in Verbindung gebracht werden. Im Mausmodell korrelierten aberrante Rhythmen mit einer erhöhten Entzündungsreaktion bei experimenteller Sepsis. Gestörte zirkadiane Rhythmen von 3 Clock Genes (BMAL1, PER2 und PER3) konnten bereits bei Patienten mit schwerem Trauma nachgewiesen werden. Da für Patienten mit septischem Schock keine Daten verfügbar sind, war das Ziel dieser Arbeit, mögliche gestörte Rhythmen in dieser Patientengruppe zu identifizieren.

Methodik: Es wurden 20 Patienten mit septischem Schock in die prospektive Kohortenstudie eingeschlossen, deren Monozyten über einen Zeitraum von 24 Stunden alle 4 Stunden isoliert wurden. Mittels NanoString-Technologie erfolgte die Quantifizierung von 17 Clock Genes. 3 Patienten, deren Proben weniger als 8 Gene exprimierten, wurden von der endgültigen Analyse ausgeschlossen. Die Vergleichsgruppe bestand aus 12 jungen, gesunden Männern. Zur statistischen Auswertung der Daten erfolgte eine harmonische Regressionsanalyse mit einem Zeitintervall von 24 Stunden. Ein anschließend durchgeführtes Bootstrapping-Verfahren errechnete Konfidenzintervalle, anhand derer die Gene in rhythmisch, arrhythmisch und nicht zuordnungsbar eingeteilt wurden. Zusätzlich wurde ein Rhythmizitätswert definiert, welcher Werte zwischen -1 (arrhythmisch) und 1 (rhythmisch) umfasst. Sepsis-Patienten wurden anhand des Rhythmizitätswertes in 2 Gruppen eingeteilt und das Outcome verglichen. Das Ergebnis wurde mit einem Chi-Quadrat Test auf Signifikanz überprüft.

Ergebnisse: Die Rhythmizitätswerte der Patienten mit septischem Schock ($0,23 \pm 0,26$) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,70 \pm 0,18$) signifikant ($p < 0,0001$) niedriger. Die Gene NR1D1, NR1D2 und CRY2 waren am rhythmischsten exprimiert, die am wenigsten rhythmisch exprimierten Gene waren CLOCK und ARNTL. 77 % der bestimmten Clock Genes wurden als nicht rhythmisch oder arrhythmisch eingestuft. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Expression der Gene CRY1, NR1D1, NR1D2, DBP und PER2 vermindert, die Expression von CRY2 hingegen signifikant hochreguliert.

Schlussfolgerung: Die molekularen Rhythmen in Immunzellen von Patienten mit septischem Schock waren im Vergleich zu jungen, gesunden Männern deutlich verringert.

Eine Herunterregulierung der Expression von Clock Genes und der Verlust der Rhythmi-
zität könnte durch Sepsis verursacht werden und die Immunantwort verschlechtern. Zum
Verständnis dieser Pathophysiologie sind weitere Studien notwendig.

Abstract

Background: Despite the increasing understanding of the pathophysiology of sepsis, the worldwide mortality of septic patients is still estimated at 30–50 %. Aberrant circadian rhythms have been linked to various pathological conditions that lead to fatal inflammation and immunodeficiency. In the mouse model, aberrant rhythms correlated with an increased inflammatory reaction in experimental sepsis. Disturbed circadian rhythms of three clock genes (BMAL1, PER2 and PER3) have already been demonstrated in severe trauma patients. Since no study has investigated the circadian clock in patients with septic shock, the aim of this study was to identify possible aberrant rhythms in this patient group.

Methods: 20 patients with septic shock were included in this prospective cohort study, whose monocytes were isolated every 4 hours over a period of 24 hours. Using NanoString technology, 17 clock genes were quantified. 3 patients whose samples expressed fewer than 8 genes were excluded from the final analysis. The comparison group consisted of 12 young, healthy men. A harmonic regression analysis with a time interval of 24 hours was carried out for statistical evaluation of the data. A bootstrapping procedure that was carried out afterwards calculated confidence intervals on the basis of which the genes were divided into rhythmic, arrhythmic and non assignable. In addition, a rhythmicity value was defined, which comprises values between -1 (arrhythmic) and 1 (rhythmic). Sepsis patients were divided into 2 groups based on the rhythmicity value and the outcome compared. The result was checked for significance with a chi-square test.

Results: The rhythmicity scores of the patients with septic shock (0.23 ± 0.26) were significantly ($p < 0.0001$) lower than in the control group (0.70 ± 0.18). The genes NR1D1, NR1D2 and CRY2 were most rhythmic, the least rhythmic clock genes were CLOCK and ARNTL. 77 % of the measured clock genes were classified as neither rhythmic nor arrhythmic. Compared to the control group, the expression of the genes CRY1, NR1D1, NR1D2, DBP and PER2 was suppressed, while the expression of CRY2 was significantly upregulated.

Conclusion: The molecular rhythms in immune cells of patients with septic shock were significantly decreased compared to young healthy men. Downregulation of the expression of clock genes and the loss of rhythmicity could be caused by sepsis and worsen the immune response. Further studies are necessary to understand this pathophysiology.

1. Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Epidemiologie und Stellenwert der Sepsis

Unter dem Krankheitsbild der Sepsis versteht man eine systemische Reaktion des Körpers auf einen infektiösen Prozess, welcher zur Dysfunktion verschiedener Organe und in Folge dessen auch zum Tod führen kann [1]. Weltweit erkranken jährlich über 30 Millionen Menschen an diesem Krankheitsbild [1]. In Deutschland wurden im Jahr 2015 18.665.238 Patienten stationär behandelt, von diesen wurde für 320.198 Patienten die Diagnose Sepsis codiert [2]. In den letzten Jahren konnten zwar deutliche Fortschritte im pathophysiologischen Verständnis des Krankheitsbildes verzeichnet werden, trotzdem ist es noch immer eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei kritisch kranken Patienten [1, 3]. Weltweit standen im Jahr 2017 19,7 % aller Todesfälle im Zusammenhang mit Sepsis, die Mortalität ist jedoch auch stark von der Region abhängig [4]. Eine Analyse der deutschen DRG–Statistik zeigte im Zeitraum von 2007 bis 2013 eine Reduktion der Mortalität um 2,7 % auf 24,3 % [5]. Da die Inzidenz jedoch im gleichen Zeitraum jährlich um 5,7 % anstieg, nahm die Zahl der absoluten Todesfälle trotzdem zu [5]. Patienten mit Sepsis haben ein niedrigeres Risiko eines tödlichen Verlaufs als Patienten mit septischem Schock [6]. Die Mortalität bei Patienten mit schwerer Sepsis betrug in Deutschland im Jahr 2013 43,6 %, die des septischen Schocks im selben Jahr 58,8 % [5].

Für das Gesundheitssystem stellen Sepsis–Patienten mit hohen Kosten und langen durchschnittlichen Verweildauern im Krankenhaus eine überdurchschnittlich hohe Belastung dar [7]. Ein Vergleich der durchschnittlichen Verweildauer von Patienten mit Sepsis lag in Krankenhäusern der USA im Jahr 2008 um etwa 75 % höher als bei den meisten anderen Erkrankungen [8]. Patienten mit Sepsis hatten eine durchschnittliche Verweildauer von 4,5 Tagen, Patienten mit schwerer Sepsis von 6,5 Tagen und mit der Diagnose septischer Schock waren Erkrankte durchschnittlich insgesamt 16,5 Tage in stationärer Betreuung [7]. Die mit dem Krankheitsbild Sepsis assoziierten, zuletzt steigenden Gesamtkosten wurden für das Jahr 2013 in Deutschland auf 9,1 Milliarden Euro geschätzt und betragen somit 3 % des Budgets der Gesundheitsversorgung [9]. In den USA betragen die Kosten des Sepsis–Managements in amerikanischen Krankenhäusern im Jahr 2013 über 24 Milliarden US–Dollar, das entspricht 13 % der gesamten Krankenhauskosten der USA [7].

1.1.2 Definition Sepsis

„Die überholten Sepsis-Definitionen (Sepsis-1 von 1992 und Sepsis-2 von 2001) beruhen auf dem SIRS-Konzept (Systemisches-Inflammatorisches-Response-Syndrom)“ [10]. Die SIRS-Kriterien „(mindestens 2 der folgenden Kriterien):

- Fieber ($\geq 38\text{ °C}$) oder Hypothermie ($\leq 36\text{ °C}$), bestätigt durch eine rektale, intravasale oder vesikale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3\text{ kPa}/\leq 33\text{ mmHg}$)
- Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild“

haben für Infektionen keine besonders hohe Sensitivität noch Spezifität [10-12]. Churpek et al. zeigten, dass SIRS zwar mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist, jedoch 50 % der Krankenhauspatienten während des Krankenhausaufenthalts mindestens einmal 2 von 4 SIRS-Kriterien erfüllten, obwohl für viele dieser Patienten keine Infektion nachweisbar war [13]. Gleichzeitig zeigten Kaukonen et al., dass einer von 8 intensivmedizinisch behandelten Patienten mit schwerer Sepsis, innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation, weniger als 2 SIRS-Kriterien erfüllten [14].

Im Jahr 2016 wurde die S2-Leitlinie durch eine neue Definition der European Society of Intensive Care Medicine und der Society of Critical Care Medicine ersetzt [15]. Diese trägt den Namen „Sepsis-3“ und definiert das Krankheitsbild als „eine akut lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion“ [10, 15, 16]. Erhöht sich der Sequential Organ Failure Assessment Scores (SOFA) um 2 oder mehr Punkte, kann klinisch eine Organfunktionsstörung diagnostiziert werden [15]. Zur schnelleren Identifikation und somit auch schnelleren Therapieeinleitung kann der quickSOFA (qSOFA) verwendet werden [15]. Auch hier müssen mindestens 2 der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- „Atemfrequenz $\geq 22/\text{min}$
- verändertes Bewusstsein
- systolischer Blutdruck $\leq 100\text{ mmHg}$ “ [15]

Der septische Schock ist als eine Untergruppe der Sepsis definiert, welche durch gestörte zirkulatorische, zelluläre und metabolische Prozesse eine deutlich erhöhte Mortalität aufweist [15]. Werden zusätzlich die Kriterien

- Hypotonie und „Katecholaminbedarf, um einen mittleren arteriellen Druck ≥ 65 mmHg aufrechtzuerhalten und
- Serum Laktat Spiegel > 2 mmol/l (18 mg/dl) ohne Hypovolämie“

erfüllt, so spricht man von einem septischen Schock [15]. Die Terminologie der schweren Sepsis von Sepsis–2 entfällt in der Sepsis–3–Definition [15]. Abbildung 1 zeigt das Diagnoseschema der Sepsis und des septischen Schocks.

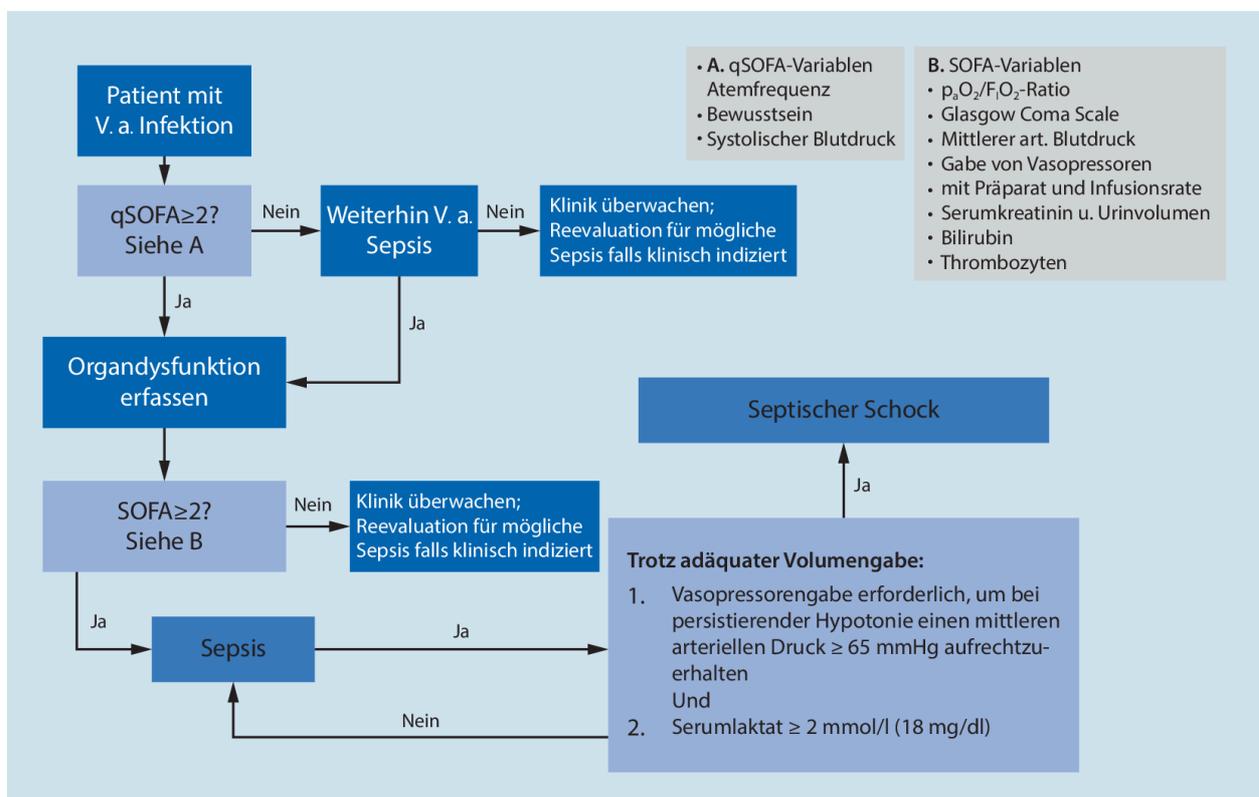


Abbildung 1: Flussschema zur Diagnose Sepsis und septischer Schock, entnommen aus [10]

1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis

Entgegen der früheren Vorstellungen, das Krankheitsbild Sepsis sei ausschließlich auf eine überschießende hyperinflammatorische Immunantwort mit Zytokinsturm zurückzuführen, konnten in den letzten 10 bis 15 Jahren neue Erkenntnisse gewonnen werden,

Funktion von Immunzellen, ein Verlust der Barrierefunktion des Endothels, sowie Veränderungen der Mikrobiota und der Gerinnungskaskade ursächlich für die Pathophysiologie der Sepsis [17]. Diese werden im Folgenden ausführlicher erläutert.

1.1.3.1 Angeborene Immunität und Entzündungsmediatoren

Durch das Eindringen von Mikroorganismen binden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) an Mustererkennungsrezeptoren von Immunzellen und initiieren eine Abwehrreaktion von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten und Natürlichen Killerzellen [25, 26]. Diese Rezeptoren erkennen Kohlenhydrat-, Lipid- und DNA-Moleküle, die üblicherweise auf der Oberfläche von Bakterien und Viren vorhanden sind [27]. Auch durch schädigungsassoziierte molekulare Muster (DAMPs), welche aus beschädigten Wirtszellen freigesetzt werden, werden Monozyten durch die Bindung an Toll-like Rezeptoren (TLRs), C-Typ-Leptinrezeptoren, NOD-like-Rezeptoren (Nukleotid-bindende-Oligomerisierungsdomäne) und RIG-1-ähnlichen Rezeptoren (Retinsäure induzierbares Gen 1) aktiviert [1]. Durch die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege kommt es zur Freisetzung von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies [17]. Diese bewirken eine Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Natürlichen Killerzellen, die Produktion von Akut-Phase-Proteinen, eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Proliferation von B-Zellen [28]. Auch eine Funktionsstörung von Monozyten wurde bei einer Sepsis nachgewiesen [17]. Landelle et al. untersuchten 209 Patienten mit septischem Schock und konnten zeigen, dass eine verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten (als Marker verminderter Immunkompetenz) einen unabhängigen Prädiktor für nosokomiale Infektionen bei Patienten mit Sepsis darstellt [29, 30]. Ein Vergleich der Expression des gesamten Genoms von Sepsis-Patienten mit akutem Atemnotsyndrom (ARDS) und ohne ARDS, ergab eine Korrelation einer verlängerten Neutrophilenreaktion mit dem Auftreten eines ARDS im frühen Krankheitsverlauf [31]. Die durch Neutrophile Granulozyten freigesetzten NETs (Neutrophil Extracellular Traps) können zwar Pathogene gezielt eliminieren, schädigen während einer systemischen Infektion jedoch auch Gewebe und Endothelien. Durch eine überschießende Reaktion der obigen Immunantwort kommt es zu Zell- und Gewebeschäden, welche im frühen Krankheitsverlauf auch zum Tod führen können [21, 32].

1.1.3.2 Immunsuppression

Die anfänglich proinflammatorische Reaktion der Sepsis geht häufig in einen deutlich längeren Zustand der Immunsuppression über und entwickelt sich innerhalb weniger Tage nach dem septischen Schock [1, 33]. In Studien konnte eine verminderte Produktion von TNF- α , einem entscheidenden proinflammatorischen Zytokin, als Reaktion auf die Gabe von Endotoxin in Schimpansen nachgewiesen werden [1, 34]. Eine vermehrte Apoptose von Lymphozyten in verschiedenen Organen von Sepsis-Patienten führt zu einer gestörten Immunantwort [35]. Hotchkiss et al. konnten in einer Untersuchung der Milz von septischen Patienten eine Apoptose von B- und CD (Cluster of Differentiation) 4-T-Helferzellen nachweisen, während die Zahl von CD8-T-Zellen und Natürlichen Killerzellen unverändert blieb [36]. Durch eine supprimierte Immunantwort ist auch die Abwehr sekundärer bakteriellen und viralen Infektionen gestört. [1]. Zusätzlich ist eine virale Reaktivierung von Herpes-Simplex-Virus (HSV), Zytomegalievirus (CMV) bzw. Epstein-Barr-Virus (EBV) häufig [37].

1.1.3.3 Schädigung von Gewebe und Organen

Die Schädigung von Gewebe und Organen bei Sepsis ist durch Hypoperfusion, also die verminderte Abgabe und Nutzung von Sauerstoff in den Zellen, zu begründen [1]. Die Hypoperfusion ist Folge einer veränderten Hämodynamik, welche durch eine direkte Myokardschädigung durch Zytokine, einer venösen Dilatation und einem verändertem systemischen Gefäßwiderstand entsteht [38]. Eine Schädigung des Adhäsionsprotein Cadherin, welches als wichtiges Barriereprotein fungiert, führt zu einem vermehrten Austritt intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium [1, 39]. Durch die verminderte Bereitstellung von Sauerstoff kommt es in den Zellen vermehrt zur anaeroben Glykolyse und Laktat reichert sich an, zusätzlich schädigen reaktive Sauerstoffspezies, welche im Rahmen der Entzündungsreaktion gebildet wurden, Mitochondrien [1]. Diese Mechanismen beeinflussen den Energiestoffwechsel und vermindern die zellulären ATP-Spiegel [1]. Die Folge von Hypoperfusion und Störung der Endothelbarriere können beispielsweise tubuläre Nekrosen und akute Nierenschäden, Hirnödem und septische Enzephalopathie, sowie in der Lunge ein Lungenödem bis zum ARDS sein [1].

1.1.3.4 Dysregulierung der Gerinnung

Neben der proinflammatorischen Reaktion des Immunsystems kommt es auch zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, deren Dysregulation je nach Schweregrad von einer

leichten Thrombozytopenie bis zu einer fulminanten DIC variieren kann [1]. Einen wichtigen Bestandteil der Hämostase nimmt das Molekül Thrombin ein, welches sowohl gerinnungsaktivierende als auch hemmende Eigenschaften besitzt [40]. Beispielsweise werden durch Thrombin Gerinnungsfaktoren aktiviert und die Bildung von Fibringerinnseln initiiert [40]. Andererseits aktiviert Thrombin durch die Bindung an Thrombomodulin auch die Fibrinolyse und besitzt chemotaktische Eigenschaften, welche unter anderem bei Entzündungsreaktionen wie Sepsis eine große Rolle spielen [40]. Während einer Infektion kann die Initiierung der Thrombinproduktion durch unterschiedliche Wege erfolgen, unter anderem erfolgt die Aktivierung des Gerinnungssystems durch das Eindringen von Bakterien in die Gefäßwände und durch die Schädigung des Gefäßendothels [41, 42]. Die Bildung von Thromben durch Blutplättchen und Immunzellen in kleinen Gefäßen, auch als Immunthrombose bezeichnet, verhindert die Verbreitung von Krankheitserregern im Organismus und die Infektion lebenswichtiger Organe [43]. Kommt es hingegen durch eine fortlaufende Aktivierung der Gerinnung zu einer übermäßigen Thrombinbildung, kann dies zu Fibrinablagerungen in Mikrogefäßen und einer DIC führen [41, 44, 45]. Die Zerstörung von extravaskulären Zellen führt zur Freisetzung des Gewebefaktors (tissue factor), dieser bewirkt durch die Interaktion mit Gerinnungsfaktoren eine systemische Aktivierung der Gerinnungskaskade [46]. Die gebildeten Fibringerinnsel fungieren als Mikrothromben und verursachen lokale Perfusionsdefekte, Gewebehypoxie und Organfunktionsstörungen [1]. Zusätzlich konnte bei Patienten mit schwerer systemischer Entzündung eine Reduktion von Protein C, einer Protease, welche Gerinnungsfaktoren inaktiviert und Fibrinolyse induziert, nachgewiesen werden [46, 47]. Das führt zu einer dysregulierten Ausbreitung der unter anderem durch den Gewebefaktor aktivierten Gerinnungskaskade [1]. Zusätzlich konnte in Patienten mit septischem Schock über einen Beobachtungszeitraum von 7 Tagen eine verringerte Fibrinolyse, welche zu einer Aufrechterhaltung von mikrovaskulären Thromben führt und mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist, nachgewiesen werden [48].

1.2 Zirkadianer Rhythmus

Unter zirkadianen Rhythmen versteht man eine 24–Stunden–Uhr in lebenden Organismen, welche wichtige biologische Funktionen reguliert und auf Umweltreize reagiert [49, 50]. Dieser Schlaf–Wach–Zyklus kann Körpertemperatur, Essgewohnheiten, Verdauung, aber auch Hormonausschüttung und weitere Körperfunktionen beeinflussen und so den Energieverbrauch und Stoffwechselprozesse des Körpers optimieren [49]. Da Föten

während der Schwangerschaft noch keinen äußeren Reizen ausgesetzt sind, kann die Entwicklung des zirkadianen Rhythmus bei Säuglingen erst in den ersten 4 Lebensmonaten erfolgen [49]. Melatonin und Cortisol sind entscheidende Hormone für die zirkadiane Rhythmik [49]. Der suprachiasmatische Kern des Hypothalamus stellt einen wichtigen, jedoch nicht den einzigen internen Kontrollmechanismus des zirkadianen Rhythmus dar, da zum Beispiel auch in Leber, Pankreas, Fett- und Muskelgewebe ein Einfluss auf den Schlaf-Wach-Zyklus nachgewiesen werden konnte [49, 51]. Der grundlegende Zeitgeber ist das Licht [52]. Die durch die Ganglienzellen der Retina wahrgenommenen Lichtreize werden durch elektrische Signale an spezialisierte Neuronen der suprachiasmatischen Kerne weitergeleitet und von einer elektrischen Information in eine chemische Information umgewandelt, welche die Genexpression der Neuronen verändert [53]. Zirkulierendes Melatonin, dessen Biosynthese hauptsächlich nachts erfolgt, stammt aus der Epiphyse und wird durch den suprachiasmatischen Nucleus reguliert [54, 55]. Die regulatorische Wirkung von Licht ist variabel und abhängig von der Wellenlänge und Bestrahlungsstärke [56]. Die nächtliche Melatoninproduktion wird in Abhängigkeit der Wellenlänge unterschiedlich stark inhibiert [56]. Eine Exposition von künstlichem Licht in der Nacht kann daher den Nucleus suprachiasmaticus und so auch den Melatonin-Rhythmus stören [57].

1.2.1 Zirkadianer Rhythmus des Immunsystems

Auch das Immunsystem unterliegt einer zirkadianen Rhythmik [52]. In Milzzellen von Ratten konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von Zytokinen (TNF- α und Interferon- γ) eine tägliche Rhythmizität aufweisen [58]. Funktionelle molekulare Uhren wurden in verschiedenen Zellen des Immunsystems wie Milzmakrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und Neutrophilen Granulozyten beschrieben [59, 60]. In Neutrophilen Granulozyten konnte um Mitternacht eine erhöhte Expression von Gp91phox, einem empfindlichen Marker der Neutrophilenreifung, und eine höhere Produktion von Superoxid nachgewiesen werden [60]. Im Vergleich zur Expression und Produktion um 13 Uhr am Tag war diese um Mitternacht signifikant höher [60]. Es wurde auch gezeigt, dass die molekulare Uhr die Expression und Funktion des Toll-like Rezeptors, einem Rezeptor der Zelloberfläche zur Immunerkennung, direkt moduliert [61]. Silver et al. wiesen in Milzmakrophagen der Maus sowie in B-Zellen und dendritischen Zellen für fast alle Toll-like Rezeptoren eine rhythmische Expression nach [61].

1.2.2 Molekulare Mechanismen

Auf molekularer Ebene besteht die zirkadiane Uhr aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren, deren Heterodimerisierung und nukleäre Translokation zur Repression bzw. Expression von Genen führt [62]. Dieser Vorgang wird auch als autoregulatorische Transkriptions–Translations–Rückkopplungsschleife bezeichnet [62]. Eine graphische Darstellung molekularer Mechanismen der Clock Genes zeigt Abbildung 3.

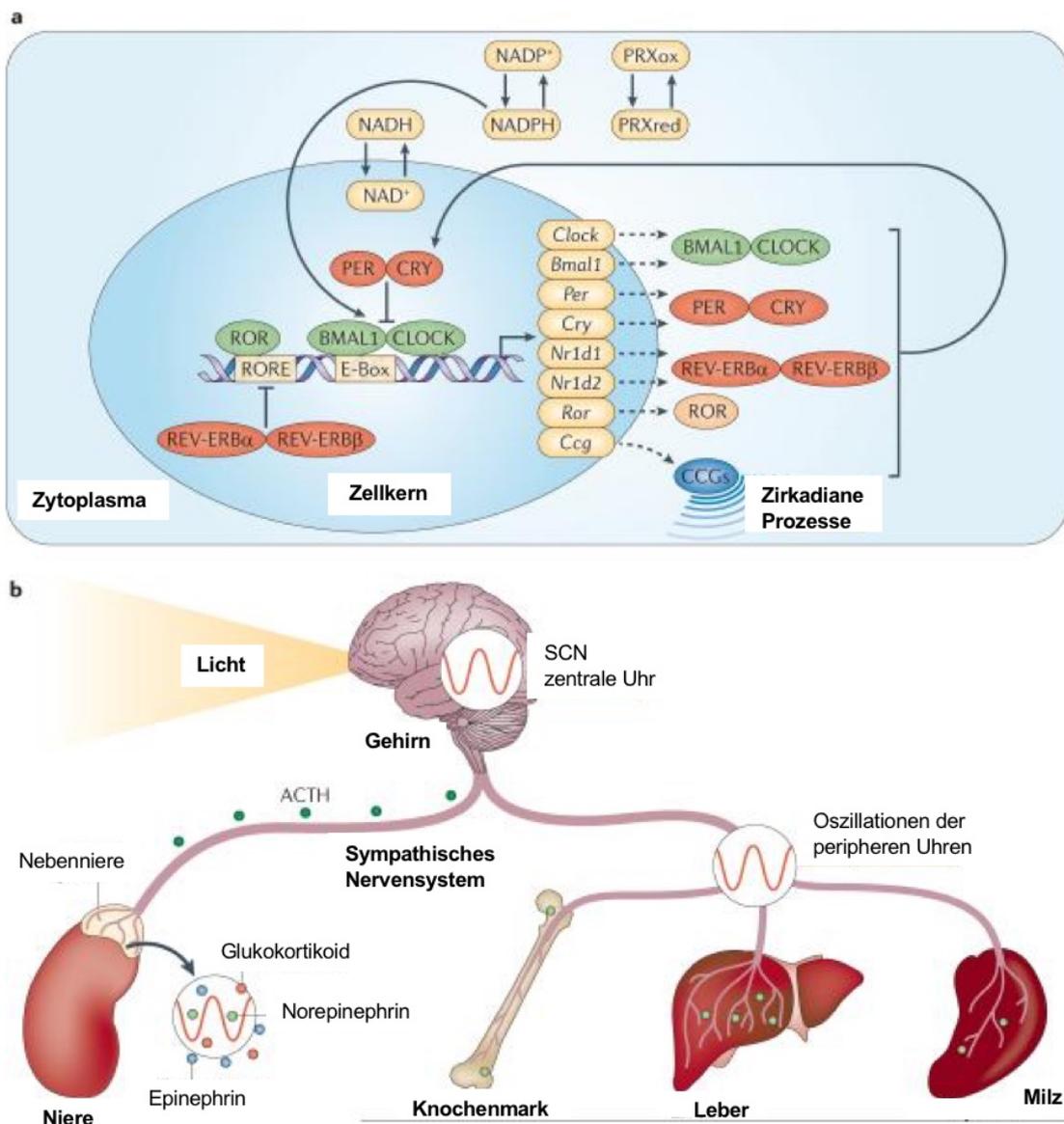


Abbildung 3: Physiologie und molekulare Mechanismen der zirkadianen Rhythmik, modifiziert nach [62]

a: Transkriptions–Translations–Rückkopplungsschleifen verschiedener Clock Genes, b: Beteiligung verschiedener Organsysteme an der zirkadianen Rhythmik

Die Clock Genes CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, CRY1 und CRY2 sind bei der zirkadianen Uhr in Säugetieren an dieser Rückkopplungsschleife beteiligt [62]. Nach der Transkription der Kern–Clock Genes Circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) und Brain and muscle Arnt–like Protein 1 (BMAL1) bilden diese im Zytoplasma das Heterodimer BMAL1–CLOCK [62]. Dieser Komplex transloziert wiederum in den Zellkern und bindet an Enhancer Box (E–Box) Sequenzen von zirkadian kontrollierten Genen, um dort deren Transkription zu beeinflussen [62]. Zusätzlich induzieren CLOCK und BMAL1 die Expression von PER (Period) und CRY (Cryptochrom), welche als PER–CRY–Heterodimer wiederum die Transkription von BMAL1 und CLOCK inhibieren [62]. Die PER–CRY–Heterodimerisierung löst seine nukleäre Translokation aus und interagiert mit dem BMAL1–CLOCK–Komplex, welches eine Hemmung der Transkription induziert [62]. Nimmt die Expression von PER–CRY aufgrund reduzierter BMAL1–CLOCK–Werte ab, beginnt der Zyklus erneut [62]. Einem ähnlichen Mechanismus folgt auch die Expression von REV–ERBA, deren Expression durch die Bindung des Heterodimers CLOCK–BMAL1 an die E–Box gefördert wird [63]. Eine vermehrte Expression von REV–ERBA führt wiederum zur Suppression der BMAL1–Transkription und eine verminderte Expression von REV–ERBA ist die Folge [63]. Für die Translokation, Dimerisierung und den Abbau von zirkadian gesteuerten Proteinen ist die posttranslationale Modifikation von entscheidender Bedeutung, diese wird hauptsächlich durch die Übertragung einer Phosphatgruppe realisiert [63]. Kitchen et al. wiesen einen Anstieg der Makrophagenfunktion nach Deletion des Core–Clock–Proteins Bmal1 in Mäusen nach und zeigten somit einen Mechanismus auf, bei dem Bmal1 als Repressor des Immunsystems wirkt und die Zellmotilität und Phagozytose nach einer Infektion reguliert [64]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass männliche Mäuse, bei denen CLP (Cecal ligation and puncture) um 2 Uhr morgens induziert wurde, schneller eine Sepsis entwickelten, als Mäuse, bei denen dies um 14 Uhr am Tag geschah [65]. Unter CLP versteht man ein in der Sepsis–Forschung etabliertes Verfahren, in welchem das Caecum perforiert wird und somit die Freisetzung von Fäkalien in die Bauchhöhle erfolgt [66]. Auf diese Weise wird eine verstärkte Immunantwort durch eine polymikrobielle Infektion erzeugt [66]. Der zeitabhängige Unterschied wurde bei PER2–mutierten Mäusen aufgehoben [65]. Auch das Clock Gene REV–ERBA spielt eine wichtige Rolle [67]. REV–ERBA inhibiert die Expression des Toll–

Like Rezeptor 4 Gens in menschlichen Makrophagen, die Expression des REV–ERBA Gens wird wiederum unter anderem durch den Lipopolysaccharid (LPS)– und Cholesteringehalt in Makrophagen reguliert [67, 68]. Außerdem konnte in menschlichen Makrophagen nach einer pharmakologische Aktivierung von REV–ERBA eine verminderte Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin–6 nachgewiesen werden [67]. Somit ist REV–ERBA eine wichtige Schnittstelle zwischen Clock Genes und dem Immunsystem, da eine direkte Beeinflussung der proinflammatorischen Genexpression in Makrophagen stattfindet [67].

1.3 Hypothese

Für die Induktion mehrerer proinflammatorischer Gene ist ein funktionierender zirkadianer Rhythmus wichtig. Es konnten bereits für verschiedene Krankheitsbilder, welche zu tödlichen Entzündungen und Immunschwäche führten, veränderte zirkadiane Rhythmen nachgewiesen werden, der zirkadiane Rhythmus spielt also unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen [69]. Im Mausmodell konnte bereits nachgewiesen werden, dass Mäuse mit einem, aufgrund der genetischen Deletion des myeloischen BMAL1–Gens, gestörten zirkadianen Rhythmus, bei experimentell verursachter Sepsis eine erhöhte Entzündungsreaktion und ein erhöhtes Risiko eines letalen Krankheitsverlaufes zeigten [69]. Bei septischen Patienten hängt die Schwere der Inflammation direkt mit dem Grad der Veränderung der Clock Genes BMAL1 und PER2 zusammen [70]. Coiffard et al. zeigten gestörte zirkadiane Rhythmen von Zytokinen, Leukozyten und 3 Clock Genes (BMAL1, PER2 und PER3) bei Patienten mit schwerem Trauma [71]. Möglicherweise zeigt sich auch bei Patienten mit septischem Schock ein gestörter zirkadianer Rhythmus. Bisher gibt es jedoch keine klinischen Studien, in denen die Expression von Clock Genes bei septischen Patienten untersucht und mit einer gesunden Kontrollpopulation verglichen wurden.

Primäres Ziel der Arbeit war unter Annahme der Hypothese, dass auch Sepsis–Patienten einen aufgehobenen zirkadianen Rhythmus zeigen, die Rhythmizität verschiedener Clock Genes für diese Patientengruppe zu untersuchen.

2. Methodik

2.1 Studiendesign

2.1.1 Studieneinschluss

Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission unter dem Aktenzeichen EA1/288/14 vorgelegt und genehmigt und an der Klinik für Anästhesiologie und Schwerpunkt operative Intensivmedizin (CCM/CVK) durchgeführt. Bei ClinicalTrials wurde die Studie unter dem Zeichen NCT02044575 registriert. Die Patienten wurden vor Studieneinschluss über den Verlauf der Studie, Nutzen, Risiken und die Möglichkeit des Widerrufs der Einwilligung aufgeklärt. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. War ein Patient nicht aufklärungsfähig, erfolgte die Einwilligung über den zuständigen Betreuer. Die Dateneingabe der Patienten erfolgte unter Verwendung des Pseudonyms „CLOCK“ sowie einer aufsteigenden Nummerierung nach Einschlussdatum. Um eine Kontrolle der Daten zu ermöglichen, wurde eine Patientenidentifikationsliste erstellt, die jedem Pseudonym den vollständigen Patientennamen sowie das dazugehörige Geburtsdatum zuordnet. Die Patientenidentifikationsliste war nur für Studienpersonal zugänglich.

2.2 Patientenkollektiv

Eingeschlossen wurden 20 Patienten im Zeitraum vom 21.08.2014 bis 21.01.2018 mit der Diagnose septischer Schock auf den Intensivstationen 8i, 9i und 14i des Campus Virchow Klinikum der Charité–Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin. Die Patienten wurden nach folgenden Kriterien ein– bzw. ausgeschlossen.

2.2.1 Einschlusskriterien

- Männliche und weibliche intensivpflichtige Patienten
- Septischer Schock laut American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [72]
- Noradrenalin–Gabe von über $> 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ über mindestens 2 Stunden
- Volljährigkeit

2.2.2 Ausschlusskriterien

- Schwangere oder stillende Patienten
- Akute Leukämie
- Schwere Leukozytose ($> 50.000/\text{nl}$)

- Schwere Thrombozytopenie ($< 5.000/\text{nl}$),
- Autoimmunerkrankung mit systemischer Medikation ≥ 10 mg Prednisolonequivalent pro Tag
- Transplantierte Patienten
- Patienten, die innerhalb der letzten 14 Tagen eine Interferontherapie erhielten
- Laufende (begleitende) Chemotherapie oder Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen
- Akute Lungenembolie oder akuter Myokardinfarkt innerhalb der letzten 72 Stunden
- Cardiopulmonale Reanimation innerhalb der letzten 7 Tage
- Sterbender Patient (Lebenserwartung < 72 Stunden)
- Vorhandensein einer Do–Not–Resuscitate oder Do–Not–Intubate Anordnung
- Bekannte HIV–Infektion (Human Immunodeficiency Virus) oder chronische Virushepatitis
- Mangelnde Bereitschaft, Daten innerhalb der Studie zu speichern und weiterzugeben
- Unterbringung in einer Einrichtung aufgrund einer behördlichen oder gerichtlichen Anordnung
- Patienten, deren Einwilligung oder die seines gesetzlichen Vertreters nicht rechtzeitig eingeholt werden kann
- Patienten, welche eine Teilnahme an einer Studie ablehnen

2.3 Studienablauf

Die Studie wurde als prospektive Kohortenstudie durchgeführt. Patienten, die die festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, wurden nach ausführlicher Aufklärung und Einwilligung in die Studie eingeschlossen. Die Messung begann um 8:00 Uhr am Folgetag. Insgesamt erfolgten 7 Blutentnahmen über einen Zeitraum von 24 Stunden alle 4 Stunden (Abbildung 4). Die Blutentnahme erfolgte aus dem arteriellen Zugang der Patienten. Es wurden 5 ml Blut in EDTA–Vollblut und 5 ml Serum–Vollblut abgenommen. Innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme wurde die gekühlte Probe verarbeitet und die Monozyten isoliert. Nach Monozytenisolierung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren und anschließend im Labor der Chronobiologie unter Leitung von Univ.–Prof. Dr. Achim Kramer analysiert. Dort erfolgte die Multiplex–Genexpressionsanalyse von insgesamt 24 Genen mittels NanoString–Technologie [73]. Die Datenerfassung

erfolgte prospektiv über die elektronische Patientenakte SAP sowie das Patientendatenmanagementsystem COPRA. Daten, die für jeden Patienten erfasst wurden, waren neben Alter, Geschlecht und Body Mass Index (BMI) auch Letalität, Dauer des Intensivaufenthalts, Länge des Krankenhausaufenthalts, Beatmungszeit, Laktat, Norepinephrin und die Temperatur (stündlich am Tag der Messung). Zusätzlich wurden die Scores SOFA, Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II), Therapeutic Intervention Scoring System (TISS–28) und Confusion Assessment Method für Intensivpatienten (CAM–ICU) bestimmt.

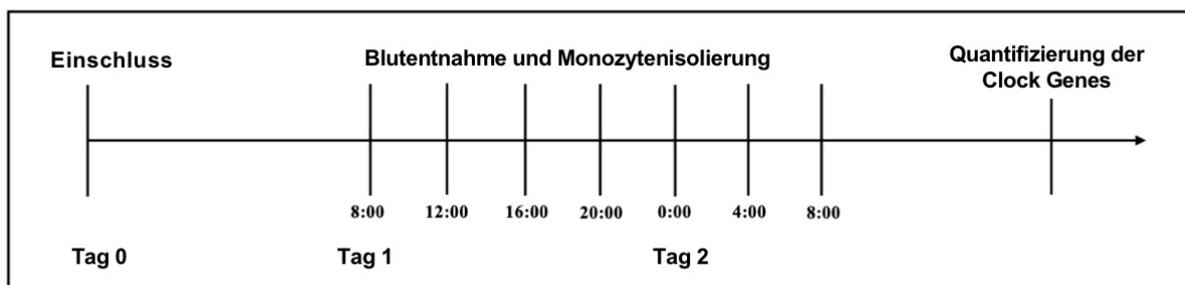


Abbildung 4: Graphische Darstellung einer Messreihe, modifiziert nach [74]

2.4 Intensivmedizinische Scores

2.4.1 SOFA Score

Der SOFA Score, ein Akronym für Sequential Organ Failure Assessment, wurde im Jahr 1994 entwickelt, um einen Score zu erstellen, welcher den Grad der Organfunktionsstörung oder des Organversagens im Zeitverlauf quantitativ darstellt [75]. Es werden 6 verschiedene Scores (Atmungs–, Herz–Kreislauf–, Leber–, Gerinnung–, Nieren– und neurologische Systeme), wie Tabelle 1 darstellt, von 0 bis 4 bewertet [75]. Ein zunehmender Score spiegelt die Verschlechterung der Organfunktionsstörung wider [75]. Moreno et al. konnten zeigen, dass eine gute Korrelation zwischen steigendem Score und Letalität besteht [75].

Tabelle 1: SOFA Score modifiziert nach [75]

System	Parameter	0	1	2	3	4
--------	-----------	---	---	---	---	---

Atmung	PaO ₂ /FiO ₂ in mmHg	> 400	< 400	< 300	< 200 und künstliche Beatmung	< 100 und künstliche Beatmung
Herz-Kreislauf	Dosierungen in µg/kg/min	MAP > 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dobutamin oder Dopamin ≤ 5	Dopamin > 5 oder Adrenalin ≤ 0,1 oder Noradrenalin ≤ 0,1	Dopamin > 15 oder Adrenalin > 0,1 oder Noradrenalin > 0,1
Leber	Bilirubin in mg/dl	> 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	> 12,0
Gerinnung	Thrombozyten x 10 ³ /ml	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Niere	Kreatinin in mg/dl	> 1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	> 5,0
Nervensystem	Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	< 6

2.4.2 SAPS II

In einer Multicenter-Studie wurde 1993 der SAPS II entwickelt [76]. Dafür wurden 13152 Patienten in 137 Intensivstationen in 12 Ländern eingeschlossen [76]. Der Score hilft bei der Vorhersage der Mortalität im Krankenhaus, ohne den Grund für die Aufnahme zu berücksichtigen [77]. Dafür werden 17 Variablen bei Aufnahme auf die Intensivstation berücksichtigt [77]. Diese bestehen aus dem Aufnahmebefund (Aufnahmestatus, chronisches Leiden, Glasgow Coma Scale, Alter), Messwerte (Herzfrequenz, Körpertemperatur, Ausfuhr des Urins, systolischer Blutdruck und bei maschineller Beatmung der Oxygenierungsindex (PaO₂/FiO₂) und verschiedenen Laborwerten (Natrium im Serum, Kalium im Serum, Bicarbonat im Serum, Bilirubin im Serum, Leukozyten und Harnstoff im Serum) [78]. Der SAPS II-Score kann zwischen 0 und 163 Punkten variieren [78].

2.4.3 TISS-28 Score

Ursprünglich wurde der TISS Score 1974 entwickelt, um die Schwere der Erkrankung zu messen und die Patientenversorgung anhand der Arbeitsbelastung der Pflegekräfte zu

vergleichen [79]. Der TISS–28 umfasst insgesamt 28 Elemente (siehe Tabelle 2), die in 7 Gruppen (Grundaktivitäten, Beatmungsunterstützung, Herz–Kreislauf–Unterstützung, Nierenunterstützung, neurologische Unterstützung, Stoffwechselunterstützung und spezifische Interventionen) unterteilt sind [79]. Diese werden unterschiedlich gewichtet, maximal können 78 Punkte erreicht werden [79].

Tabelle 2: Der TISS–28 Score, modifiziert nach [80]

Maßnahmen	Punkte
Standard–Monitoring (Vitalzeichenkontrolle, tägliche Bilanz)	5
Labor (tägliche Erhebung von Laborwerten oder Mikrobiologien)	1
Medikation: ein Medikament	2
Medikation: 2 oder mehr Medikamente	3
Verbandswechsel: 1 bis 2–mal täglich	1
Verbandswechsel: häufiger als 1 bis 2–mal täglich	3
Vorhandensein und Pflege von Drainagen	3
Beatmung (kontrolliert/assistiert, auch Spontanatmung mit PEEP)	5
Spontanatmung (via Tubus ohne PEEP, O ₂ –Insufflation)	2
Künstlicher Atemweg (Tubus, Trachealkanüle)	1
Atemtherapie (Absaugen, Inhalation, Atemgymnastik)	1
Vasoaktive Medikamente (Katecholamine): ein Medikament	3
Vasoaktive Medikamente (Katecholamine): > 1 Medikament	5
Flüssigkeitstherapie (> 6 l/24 h oder > 1 l Blutprodukte)	4
Arterieller Katheter	5
Pulmonalarterienkatheter	8
Zentraler Venenkatheter	2
Kardiopulmonale Reanimation	3
Dialyse (oder andere Nierenersatzverfahren)	3
Quantitative Bestimmung der Urinmenge	3
Aktivierung der Diurese (z. B. Furosemid > 1 mg/kg Körpergewicht/Tag)	3
Messung des intrakraniellen Drucks	4
Behandlung einer metabolischen Azidose/Alkalose	4
Parenterale Ernährung	3

Enterale Ernährung	2
Interventionen auf der Station (Intubation, Schrittmacher, Kardioversion, Endoskopie, Notfall-OP, Magenspülung, TEE, Bronchoskopie)	eine = 3 > eine = 5
Intervention außerhalb der Station (OP, Diagnostik, etc.)	5

(PEEP = positiv end-expiratory pressure, OP = Operation, TEE = Transösophageale Echokardiographie)

2.5 Monozytenisolierung

Die Monozytenisolierung erfolgte unter Verwendung des autoMACS[®] Pro Separators der Firma Miltenyi Biotec, dessen Funktionsweise im Folgenden dargestellt wird:

Nach Aufnahme der Probe in den autoMACS[®] Pro Separator wurden die CD 14 positiven Monozyten mit CD14 MACS MicroBeads gekoppelt. Hierbei handelt es sich um 50 nm große, superparamagnetische Partikel, die an hochspezifische Antikörper gegen ein Zelloberflächenantigen konjugiert sind [81]. Durch die geringe Größe der Beads werden die Zellen nicht aktiviert [81]. Die Probe mit den durch MicroBeads markierten Monozyten wurde anschließend durch eine im MACS Separator platzierte MACS Säule geleitet [81]. MACS Säulen enthalten eine Matrix aus ferromagnetischen Kugeln [81]. Durch Stahlkugeln in der Säulenmatrix wird der magnetische Gradient um das 10.000 fache verstärkt, sodass eine minimale Markierung der Zellen ausreicht und diese ihre volle Zellfunktionalität behalten [81]. Nach der magnetischen Separation der Zellen wurde die negative Durchflussfraktion gesammelt und verworfen [81]. Anschließend wurde die Säule aus dem MACS Separator entfernt und die markierte, selektierte Zellfraktion eluiert [81].

Die Probe wurde bei 4 °C für 8 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die auf Eis gekühlte Probe bei -80 °C in einem Eppendorf-Gel-Röhrchen eingefroren.

2.6 Labor

Unter Verwendung von TRIzol[™]-Reagenz wurde nach Beendigung der gesamten Zellreihe die Gesamt-RNA isoliert. Die Qualität und Quantität wurde mit dem NanoDrop[™] 2000c, einem Vollspektrum-UV/VIS-Spektralphotometer der Firma Thermo Fisher Scientific, und dem Qubit RNA BR Assay Kit der gleichen Firma analysiert. Die in dem Qubit

Assays verwendeten zielselektiven Farbstoffe emittieren Fluoreszenz, wenn sie an RNA binden [82].

2.6.1 NanoString Datenerfassung– und verarbeitung

Es wurde ein 24–Plex–NanoString–Panel entworfen, das 20 Clock Genes (ARNTL, ARNTL2, BHLHE40, BHLHE41, CIART, CIPC, CLOCK, CRY1, CRY2, CSNK1D, CSNK1E, DBP, NFIL3, NPAS2, NR1D1, NR1D2, PER1, PER2, PER3, RORA) und 4 Kontroll–Housekeeping–Gene (GAPDH, HPRT1, PPIA, PSMB2) umfasste. Für jedes Zielgen wurde eine 5´–Fluoreszenz–Barcode–Reportersonde und eine biotinylierte 3´–End–Einfangsonde verwendet. Die Hybridisierung der Sonden und der 100 bis 500 ng Monozyten–RNA wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nachdem rohe Expressionsdaten unter Verwendung eines NanoString nCounter Digital Analyzers vorlagen, konnte die Normalisierung in 3 Schritten (1. Normalisierung durch das arithmetische Mittel der positiven Einschaltkontrollen, 2. Subtraktion des Mittelwerts der negativen Kontrollen und 3. Normalisierung durch das geometrische Mittel der 4 Housekeeping–Gene) gemäß dem Bioconductor NanostringQCPro durchgeführt werden. Zur weiteren Analytik wurden die Daten logarithmiert. Der endgültige Datensatz enthielt Zeitreihen von 17 Patienten mit bis zu 15 Clock Genes. Patienten, welche weniger als 8 Clock Genes exprimierten, wurden ausgeschlossen. Zusätzlich wurden in den Datensatz nur Zeitreihen von Genen eingeschlossen, wenn das Gen zu mehr als 5 Messzeitpunkten nachweisbar war. Anschließend erfolgte die Kennzeichnung der Patienten im septischen Schock mit „SCXX“.

2.7 Vergleichsgruppe

Als Vergleichsgruppe wurden die Zeitreihen von 12 jungen, gesunden, männlichen Probanden der zwischen Mai 2015 und Januar 2016 durchgeführten Studie „High–accuracy determination of internal circadian time from a single blood sample“ von Wittenbrink et al. verwendet [83]. Die Studie, als BOTI (BodyTime) bezeichnet, wurde der zuständigen Ethikkommission unter dem Aktenzeichen EA1/018/15 vorgelegt und genehmigt. Nikotin– und Drogenkonsum, Schichtarbeit in den letzten 8 Wochen vor Studienteilnahme und Reisen über mehr als eine Zeitzone innerhalb der letzten 3 Monate waren Ausschlusskriterien der BOTI–Studie [83]. 7 Tage vor der ersten Messung mussten alle Probanden einen regelmäßigen Schlaf–Wach–Zyklus mit einer Schlafphase von ca. 8 Stunden

einhalten, welcher mittels Schlaftagebüchern und Aktivitätsuhren überprüft wurde [83]. Die Messung der Zeitreihen erfolgte unter Verwendung von Nanostring™ aus CD 14 positiven Monozyten. Es erfolgte alle 3 Stunden eine Blutentnahme von 8 ml Vollblut, sodass 9 Proben innerhalb von 24 Stunden erfasst wurden [83]. Zu besseren Vergleichbarkeit mit den 7 Proben der Patienten im septischen Schock wurden 2 Messzeitpunkte nicht berücksichtigt. Dies war wichtig, da die berechneten Konfidenzintervalle, die zur Schätzung der Amplitude zur Verfügung stehen, auch Informationen über die Anzahl der Zeitpunkte enthalten. Die Zeitreihen der BOTI-Studie wurden für eine sekundäre Analyse mit den Daten der Sepsis-Patienten in einem Datensatz zusammengeführt.

2.8. Statistische Analyse

Eine statistische Beratung erfolgte durch Dr. rer. hum. biol. Jochen Kruppa, stellvertretendem Institutsleiter und Leiter der Arbeitsgruppe Statistische Bioinformatik der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die statistische Auswertung der Patientendaten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation, Armonk, NY). Um einen Überblick über die Patientencharakteristika der Sepsis-Patienten zu erhalten, wurde unter Verwendung deskriptiver Statistik Median, Perzentile, Minimum und Maximum von Alter, BMI, Dauer der mechanischen Beatmung, SAPS II, SOFA Score, stationärer Aufenthalt, Intensivaufenthalt und Laktat zur 1. Messung bestimmt. Um einen Überblick über die Konstitution des Patientenkollektivs zu bekommen, wurde aufgrund der geringen Patientenzahl der Median mit Perzentilen genutzt. Zur Darstellung von Korrelationen von Patientencharakteristika wurde der Pearson Korrelationskoeffizient berechnet.

Die Berechnungen der zirkadianen Rhythmik erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Bharath Ananthasubramaniam aus dem Institut für Theoretische Biologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Zur Aufarbeitung der zirkadianen Rhythmik wurde die Statistiksoftware R (Version 3.6.2) verwendet. Zur Verarbeitung der Expressionsmuster der Clock Genes wurde eine harmonische Regressionsanalyse mit einem Zeitintervall von 24 Stunden durchgeführt. Um die Daten an die Funktion $m + b_1 \cos\left(2\pi \frac{t}{24}\right) + b_2 \sin\left(2\pi \frac{t}{24}\right)$ (m = mittlere Genexpression, t = Zeitpunkt der Messung, b = Koeffizienten der Sinusfunktion) anzupassen, wurde die Im-Funktion verwendet [74]. Unter Verwendung eines Bootstrapping-Verfahrens wurden Konfidenzintervalle für die Genamplituden ($A = \sqrt{b_1^2 + b_2^2}$) (A = Amplitude, b = Koeffizienten der Sinusfunktion) errechnet [74]. Eine Amplitude wurde als Ausschlag zwischen Spitzen- und Talwert des Rhythmus definiert.

Da nur Rhythmen mit ausreichend hohen Amplituden als für die zirkadiane Uhr relevant angesehen werden, wurden nur Amplituden, die größer als das 1,4-fache sind, berücksichtigt. Es erfolgte die Zuordnung der einzelnen Gene in rhythmisch, arrhythmisch und nicht zuordnungsbar. Das statistische Basisniveau für die Konfidenzintervalle betrug 0,05 und wurde mit der Bonferroni-Methode korrigiert. Zusätzlich erfolgte die Berechnung eines Rhythmizitätsscores zur besseren Übersicht einzelner Genprofile in Patienten. Dieser ist definiert als $S_P = \frac{N_{rhy} - N_{arrhy}}{N_{genes}}$ (S_P = Rhythmizitätsscore Patient, N_{rhy} = Anzahl der rhythmischen Gene, N_{arrhy} = Anzahl der arrhythmischen Gene, N_{genes} = Anzahl der exprimierten Gene) [74]. Analog wurde ein Rhythmizitätswert für einzelne Gene anhand der Formel $S_G = \frac{N_{rhy} - N_{arrhy}}{N_{patients}}$ (S_G = Rhythmizitätsscore Gen, N_{rhy} = Anzahl der rhythmischen Expressionen, N_{arrhy} = Anzahl der arrhythmischen Expressionen, $N_{patients}$ = Anzahl der Expressionen des Gens in allen Patienten) berechnet [74]. Eine mögliche Korrelation zwischen Patientencharakteristika und dem Rhythmizitätswert wurde durch eine Korrelationsanalyse nach Pearson getestet. Die mittlere Genexpression der beiden Patientengruppen wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test untersucht. Zusätzlich wurde die Patientenpopulation in Rhythmizitätswert größer oder kleiner gleich 0 eingeteilt und die Patientencharakteristika mittels Mann-Whitney-U Test verglichen. Das Outcome (verstorben oder überlebt) der Patienten wurde nach Rhythmizitätswert eingeteilt und in einer Kreuztabelle dargestellt. Die Signifikanz wurde durch einen Chi-Quadrat-Test kontrolliert. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Patienten

3.1.1 Patientenpopulation

Insgesamt wurden 112 Patienten mit einer Noradrenalin-Gabe von über $> 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ über mindestens 2 Stunden im Zeitraum vom 21.08.2014 bis 21.01.2018 gescreent. 107 Patienten erfüllten das Kriterium des septischen Schocks. Nach Berücksichtigung der Ausschlusskriterien erfolgte die Messung der Clock Genes von 20 Patienten, von denen in 17 Patienten eine ausreichende Clock Genes Expression gemessen werden konnte. Diese wurden in die statistische Auswertung einbezogen (Abbildung 5).

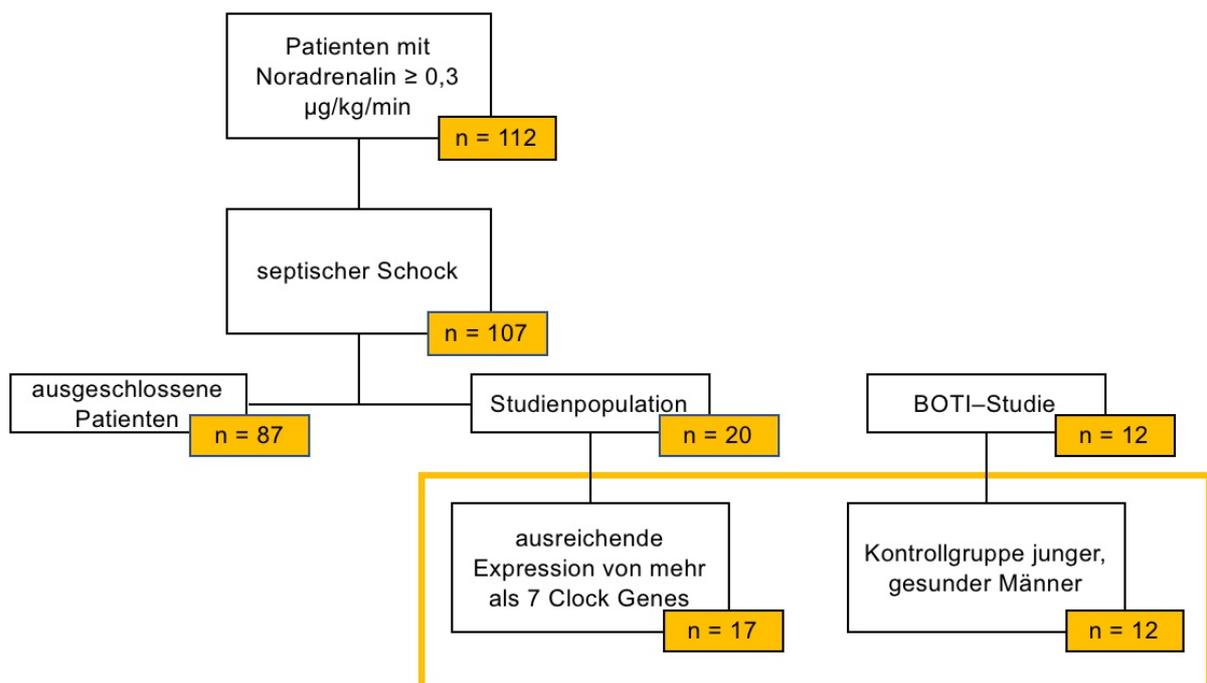


Abbildung 5: Flussdiagramm der gescreenten Patienten, modifiziert nach [74]

3.1.2 Patientencharakteristika

Tabelle 3 stellt die Baselinecharakteristika der 17 eingeschlossenen Patienten dar. Diese zeigt, dass der Median des Patientenalters bei 66,5 liegt. Die Altersspanne der Patienten reicht von 44 bis 85 Jahren. Der mittlere BMI beträgt ca. $28 \text{ kg}/\text{m}^2$. Der Median des SOFA Scores beträgt 17. Nur 25 % der Patienten haben einen SOFA Score von unter 11,25. Vor dem Hintergrund, dass ein Wert über 11 eine Mortalität von über 80 % vorhersagen kann, zeigt dies, wie schwer krank die Mehrheit der eingeschlossenen Patienten sind [84]. Bei 75 % der Patienten liegt der Score über 18. Der SAPS II Score liegt im Median bei 70, minimal bei 27 und maximal bei 98. Die Länge des Intensivaufenthaltes beträgt

durchschnittlich ca. 30 Tage, der gesamte stationäre Krankenhausaufenthalt im Mittel ca. 36 Tage. Der Median der maschinellen Beatmungszeit liegt bei 444,5 Stunden. Das durch eine arterielle Blutgasanalyse bestimmte Laktat lag im Durchschnitt bei 27,1 mg/dl (Normwert 5,7-22 mg/dl). Der Median des Hämoglobins und der Thrombozyten liegt unterhalb des Referenzwertes für junge, gesunde Erwachsene. Die Leukozyten waren im Mittel deutlich erhöht.

Tabelle 3: Baselinecharakteristika erhoben zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme der Messreihe

Parameter	Median (25.-75. Perzentile) / prozentualer Anteil
Alter in Jahren	66 (51,5-74)
BMI in kg/m ²	27,7 (23,6-33,4)
Hämoglobin in g/dl	8,6 (7,9-10)
Leukozyten pro nl	14,8 (8,7-19,5)
Thrombozyten pro nl	104 (65-218)
Lactat in mg/dl	15 (12-42,5)
PTT in Sekunden	40,6 (37,5 -57,9)
INR	1,31 (1,27-1,53)
SOFA Score	17 (11,5-17,5)
SAPS II	69 (57-79,5)
TISS-28	42 (37-49,5)
Anzahl Patienten Hämodialyse (prozentualer Anteil)	14 (82,4 %)
Anzahl Patienten ECMO (prozentualer Anteil)	3 (17,6 %)
Dauer der invasiven Beatmung in h	471 (331-910)
Intensivaufenthalt in Tagen	25 (15,5-40)
Stationärer Aufenthalt in Tagen	29 (15,5-40)

(BMI = Body Mass Index, PTT = partielle Thromboplastinzeit, INR = International Normalized Ratio, ECMO = extrakorporale Membranoxygenierung, SOFA = Sequential Organ Failure Assessment Score, TISS = Therapeutic Intervention Scoring System, SAPS II = Simplified Acute Physiology Score II)

3.2 Rhythmicität der Clock Genes in Patienten mit septischem Schock

3.2.1 Rhythmische und arrhythmische Gene

Abbildung 6 zeigt die Auswertung verschiedener Clock Genes der 17 eingeschlossenen Sepsis-Patienten. Über jedem Graphen erfolgt die Zuordnung der eingeschlossenen Sepsis-Patienten (SC004-SC021), die y-Achse stellt die 15 gemessenen Clock Genes dar. Auf der x-Achse ist die zur Basis 2 logarithmierte Amplitude dargestellt. Die Amplituden der zirkadianen Rhythmen wurden anhand von Konfidenzintervallen charakterisiert. Eine vertikal eingezeichnete Linie der einzelnen Graphen zeigt die minimale Amplitude, die als biologisch relevant angesehen wird [85].

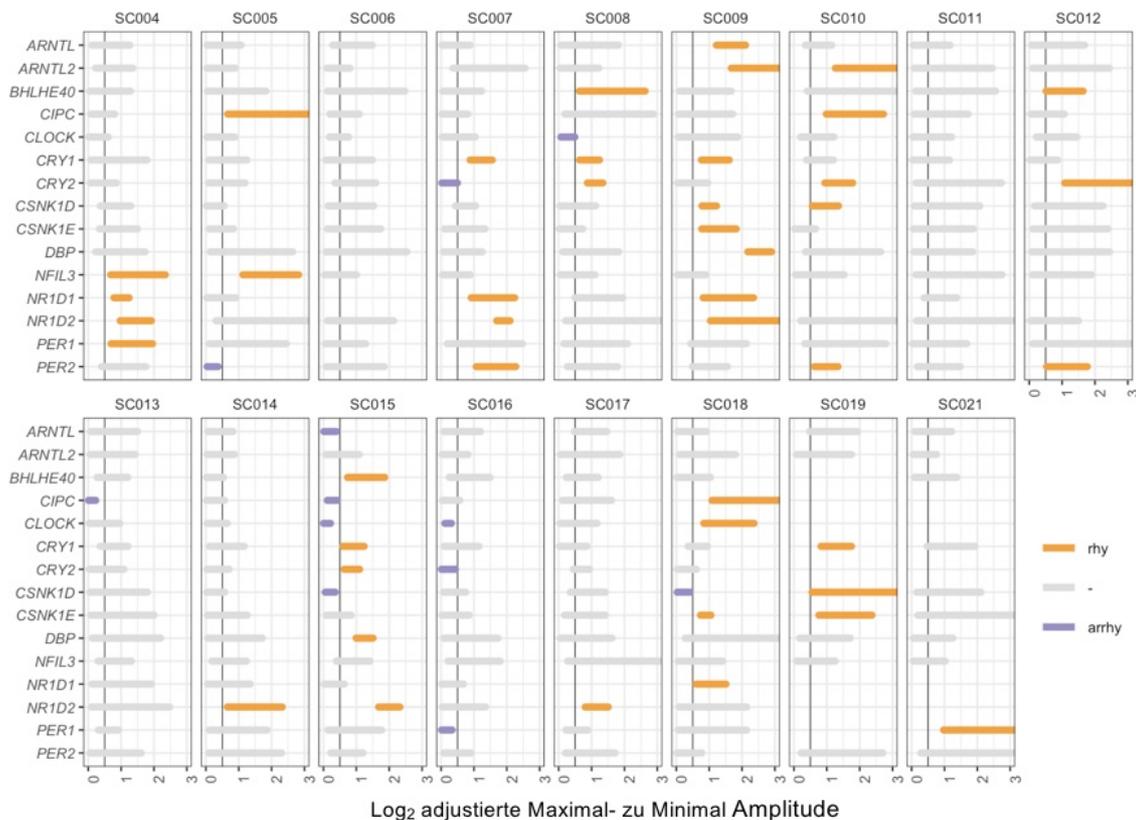


Abbildung 6: Quantifizierung der Rhythmicität von Clock Genes von SeptiClock-Patienten, modifiziert nach [74]

(rhy = rhythmisch, - = nicht zuzuordnen, arrhy = arrhythmisch)

Die Gene können in 3 Kategorien eingeteilt werden. Als rhythmische Clock Genes (in Abbildung 6 orange gekennzeichnet) wurden Gene oberhalb eines für eine Genreihe errechneten Schwellenwerts mit einem Konfidenzintervall von $p < 0,05$ und einer

ausreichend großen Amplitude (größer als das 1,4 fache) definiert. Arrhythmische Clock Genes (in Abbildung 6 lila gekennzeichnet) liegen innerhalb des errechneten Schwellenwerts und 0. Für Gene, deren Konfidenzintervalle den Schwellenwert enthalten, konnte weder Rhythmizität noch Arrhythmizität festgelegt werden. Diese sind in Abbildung 6 grau gekennzeichnet. Einige Gene konnten bei manchen Patienten nicht bestimmt werden und wurden in der Abbildung nicht dargestellt.

Wie in Abbildung 6 aufgezeigt, fällt die Auswertung der Rhythmizität für verschiedene Patienten sehr unterschiedlich aus. Die meisten als rhythmisch eingestuften Clock Genes besitzt Patient SC009 mit 8 von 15 orange eingefärbten Genen. Die Daten der 7 anderen Gene sind bei Patient SC009 nicht beurteilbar. Patient SC006 und SC011 exprimieren keine schlüssig rhythmisch oder arrhythmischen Gene. Überwiegend arrhythmische Gene findet man bei 2 Patienten (SC013 und SC016). Die meisten arrhythmischen Gene exprimiert Patient SC015. Neben 4 als arrhythmisch eingestuften Genen werden bei Patient SC015 auch 5 Datenreihen mit einem robusten zirkadianen Rhythmus dargestellt. Insgesamt exprimieren 7 der eingeschlossenen Patienten mit Sepsis arrhythmische Gene, 8 der eingeschlossenen Patienten (SC004, SC009, SC010, SC012, SC014, SC017, SC019, SC021) haben nur rhythmische und nicht beurteilbare Gene. Keiner der Patienten exprimiert die gleiche Anzahl an rhythmischen und arrhythmischen Genen. Bei Patient SC019 konnten insgesamt 7 Gene nicht ausreichend bestimmt werden.

3.2.2 Genexpressionsprofile einzelner Clock Genes

Eine Darstellung der Genexpressionsprofile der Clock Genes zeigt Abbildung 7. Jeder Graph stellt die Genexpression einzelner Clock Genes unterschiedlicher Patienten dar. Die Zuordnung der 17 Sepsis-Patienten ist über den Graphen vermerkt, die gemessenen Gene sind am rechten Abbildungsrand beschriftet. Die horizontale Achse gibt die Zeit in Stunden an. Zur Vereinfachung wurde der Tagesrhythmus durch 8 bis 32 h dargestellt, wobei 8 Uhr die Uhrzeit zu Beginn der Messreihe entspricht und 32 h den letzten Messzeitpunkt, 24 Stunden nach Beginn der Messreihe, darstellt. Die Genexpression befindet sich auf der vertikalen Achse. Wie in Abbildung 7 sind auch in dieser Darstellung die rhythmischen Gene orange, die arrhythmischen Gene lila und die auf die Rhythmik nicht beurteilbaren Gene grau dargestellt. Wird kein Genmuster dargestellt, wurden die Einschlusskriterien der statistischen Analyse nicht erfüllt. Die Mehrheit der Graphen ist grau eingefärbt und spiegelt die nicht beurteilbare Rhythmik wider. Einen robusten Rhythmus

zeigen 44 der dargestellten Gene. 12 Graphen stellen eine arrhythmische Genexpression dar.

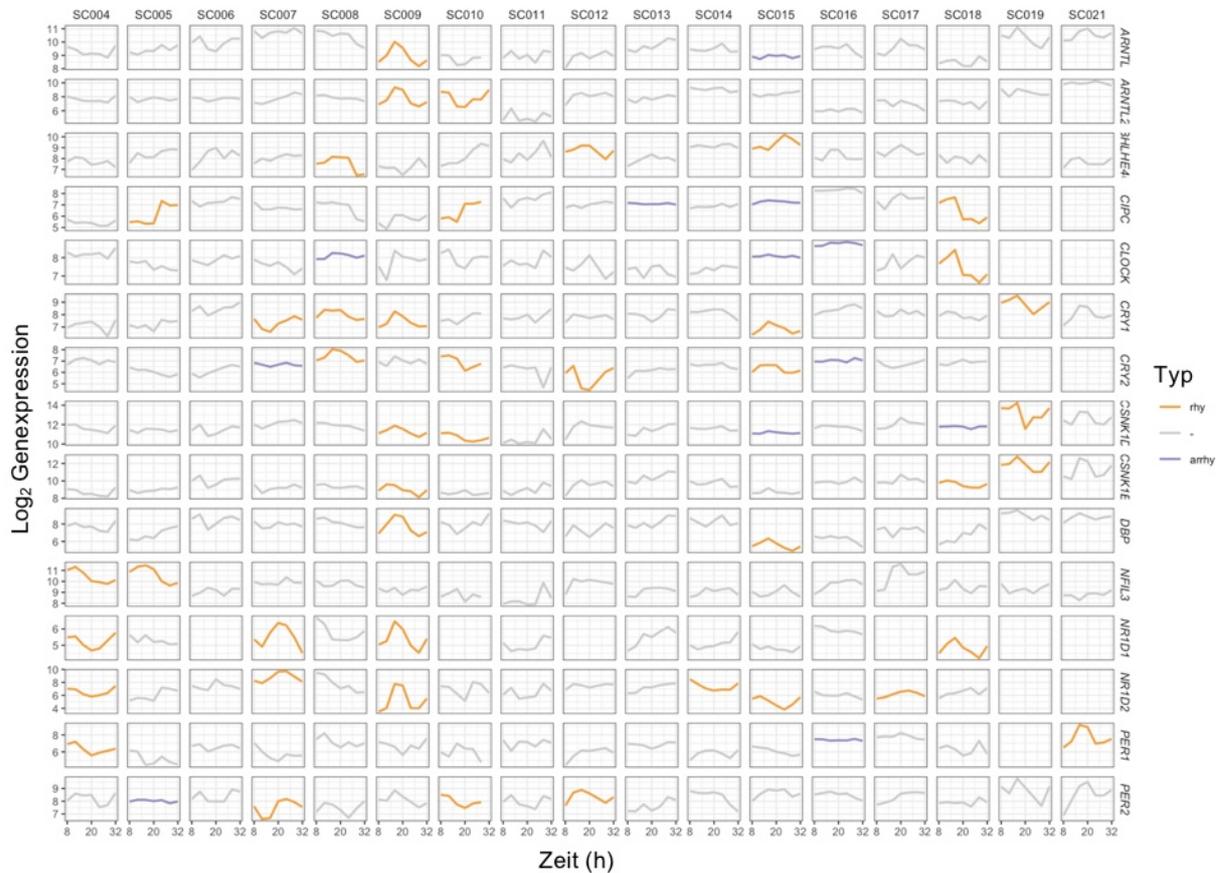


Abbildung 7: Genexpressionsmuster der Clock Genes von SeptiClock-Patienten, modifiziert nach [74]

(rhy = rhythmisch, - = nicht zuzuordnen, arrhy = arrhythmisch)

3.2.3 Rhythmizitätswerte einzelner Patienten und Clock Genes

Zur besseren Beurteilung der Rhythmizität einzelner Gene und Genprofile einzelner Patienten erfolgte die Berechnung eines Rhythmizitätsscores. Die Werte der Patienten sind in Tabelle 4 dargestellt. Der Definitionsbereich des Scores liegt zwischen -1 und 1. Ein Wert von 1 entspricht einem rhythmischen Verlauf aller gemessenen Gene eines Patienten, -1 wird erreicht, wenn alle Gene arrhythmisch sind. Patienten mit negativen Werten haben mehr arrhythmische als rhythmische Clock Genes. Bei 2 Patienten konnten weder rhythmische noch arrhythmische Gene klassifiziert werden, bei diesen beträgt der Score 0. Je größer der Betrag des Scores, desto mehr rhythmische oder arrhythmische Gene konnten identifiziert werden. Der Mittelwert des Rhythmizitätsscores aller Patienten

beträgt 0,14. Minimal wurde ein Wert von -0,2, maximal ein Wert von 0,53 erreicht. Das spiegelt die deutlich größere Anzahl an rhythmischen Genen bei Patient SC009 im Vergleich zur Anzahl der arrhythmischen Gene bei Patient SC016 wider. Bei 13 Patienten liegt der Rhythmitätswert im positiven Bereich, 4 der SeptiClock-Patienten haben einen Score zwischen -1 und 0.

Tabelle 4: Rhythmitätswerte SeptiClock-Patienten

Patient	Rhythmitätswert Sp
SC004	0,27
SC005	0,07
SC006	0
SC007	0,20
SC008	0,20
SC009	0,53
SC010	0,36
SC011	0
SC012	0,21
SC013	-0,07
SC014	0,07
SC015	0,07
SC016	-0,20
SC017	0,07
SC018	0,20
SC019	0,20
SC021	0,10

Ein weiterer Rhythmitätsscore wurde für einzelne Clock Genes berechnet, um diese über die Patienten hinweg beurteilen zu können. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 5 dargestellt. Den kleinsten Rhythmitätswert hat das Gen CLOCK mit -0,13, das am häufigsten rhythmisch exprimierte Gen ist NR1D2. Im Median beträgt der Rhythmitätsscore der Gene 0,1. Die Gene ARNTL2, BHLHE40, CRY1, CSNK1E, NR1D2, NR1D1, NFL3, und DBP waren in keinem Patienten als sicher arrhythmisch bestimmbar. Die am häufigsten arrhythmisch exprimierten Gene sind CLOCK, CSNK1D und CRY2. CLOCK und

ARNTL sind die einzigen Clock Genes mit nicht positiven Rhythmitätsscores. Das Gen NR1D1 wurde nur in 11 von 17 Patienten zu ausreichend Messzeitpunkten gemessen, sodass der hohe Rhythmitätswert vor dem Hintergrund der geringeren Patientenzahl gewertet werden muss.

Tabelle 5: Rhythmitätswerte der häufigsten Clock Genes in SeptiClock–Patienten

Gen	Rhythmitätswert
ARNTL	0
ARNTL2	0,12
BHLHE40	0,19
CIPC	0,07
CLOCK	-0,13
CRY1	0,29
CRY2	0,13
CSNK1D	0,06
CSNK1E	0,18
DBP	0,12
NFIL3	0,12
NR1D1	0,36
NR1D2	0,4
PER1	0,06
PER2	0,12

3.3 Vergleich Sepsis–Patienten mit jungen, gesunden Männern

Zur ersten Übersicht der verschiedenen Genexpressionen dient Abbildung 8. Durch Boxplots wurden die logarithmierten Expressionswerte der 7 Gene in der Sepsis– und Vergleichsgruppe dargestellt. Die Zuordnung des Gens erfolgt oberhalb des Graphen. Der Boxplot der Sepsis–Patienten wurde in orange, die Vergleichsgruppe in grün dargestellt. Der Median der mittleren Genexpression ist nur in CRY2 und PER1 in septischen Patienten größer als in der Vergleichsgruppe. Durch den Wilcoxon–Mann–Whitney–Test konnte für fast alle Gene (bis auf PER1) ein signifikanter Unterschied der mittleren Genexpression in SeptiClock–Patienten und BOTI–Probanden bestätigt werden.

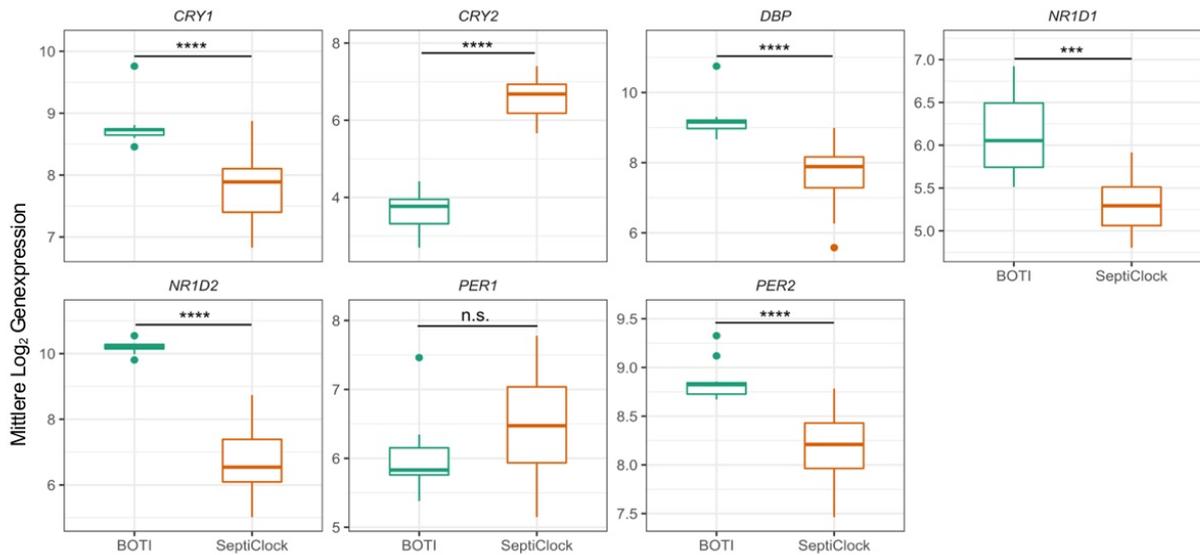


Abbildung 8: Vergleich der mittleren Expression verschiedener Gene in SeptiClock–Patienten und jungen, gesunden Männern, modifiziert nach [74]

(n.s. = nicht signifikant, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$)

Analog zur Auswertung der Clock Genes der SeptiClock–Patienten erfolgte die Analyse der Vergleichsgruppe. Eine Zuordnung der einzelnen Gene in rhythmisch oder arrhythmisch erfolgt in Abbildung 9. A zeigt die Graphen der einzelnen BOTI–Probanden, B die der SeptiClock–Patienten. In der Vergleichsgruppe wurden die 7 häufigsten Clock Genes bestimmt, sodass zur besseren Gegenüberstellung die Graphik B auf die 7 gemeinsamen Gene reduziert wurde. C zeigt einen Vergleich der Rhythmitätswerte beider Gruppen. In der Vergleichsgruppe sind alle gemessenen Gene rhythmisch oder nicht zuzuordnen. Einzelne Gene (NR1D1, NR1D2), die auch bei SeptiClock–Patienten durch einen hohen Rhythmitätsscore aufgefallen sind, sind in jedem Probanden der BOTI–Studie rhythmisch. Auffällig ist auch, dass nur 29,8 % der Gene nicht zuzuordnen sind. In der Sepsis–Gruppe konnten 72,2 % der Gene nicht als rhythmisch oder arrhythmisch zugeordnet werden. Auch für die jungen, gesunden Männer wurde ein Rhythmitätsscore (siehe Tabelle 6) errechnet, um die Daten besser vergleichen zu können. Den höchsten Rhythmitätswert hat Proband B05 mit dem Wert 1, dies entspricht einer rhythmischen Expression aller gemessenen Gene. Den niedrigsten Wert haben mit 0,43 Proband B04 und B13. Ein negativer Rhythmitätswert kommt in der Vergleichsgruppe nicht vor. Der Median des Rhythmitätswertes liegt bei der Vergleichsgruppe bei 0,71. Berücksichtigt man nur die 7 Gene, welche in der BOTI–Studie bestimmt wurden, liegt der Median bei

Patienten im septischen Schock bei 0,29. Unter Berücksichtigung der geringeren Genanzahl exprimieren Patient SC005 und Patient SC016 mehr arrhythmische als rhythmische Gene. 3 Patienten der Sepsis-Gruppe besitzen keine Gene, welche als rhythmisch oder arrhythmisch zuzuordnen sind. Die Rhythmisitätswerte der Patienten im septischen Schock sind im Vergleich zu den Werten der jungen, gesunden Männer der Kontrollgruppe signifikant geringer (einseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p < 0,0001$).

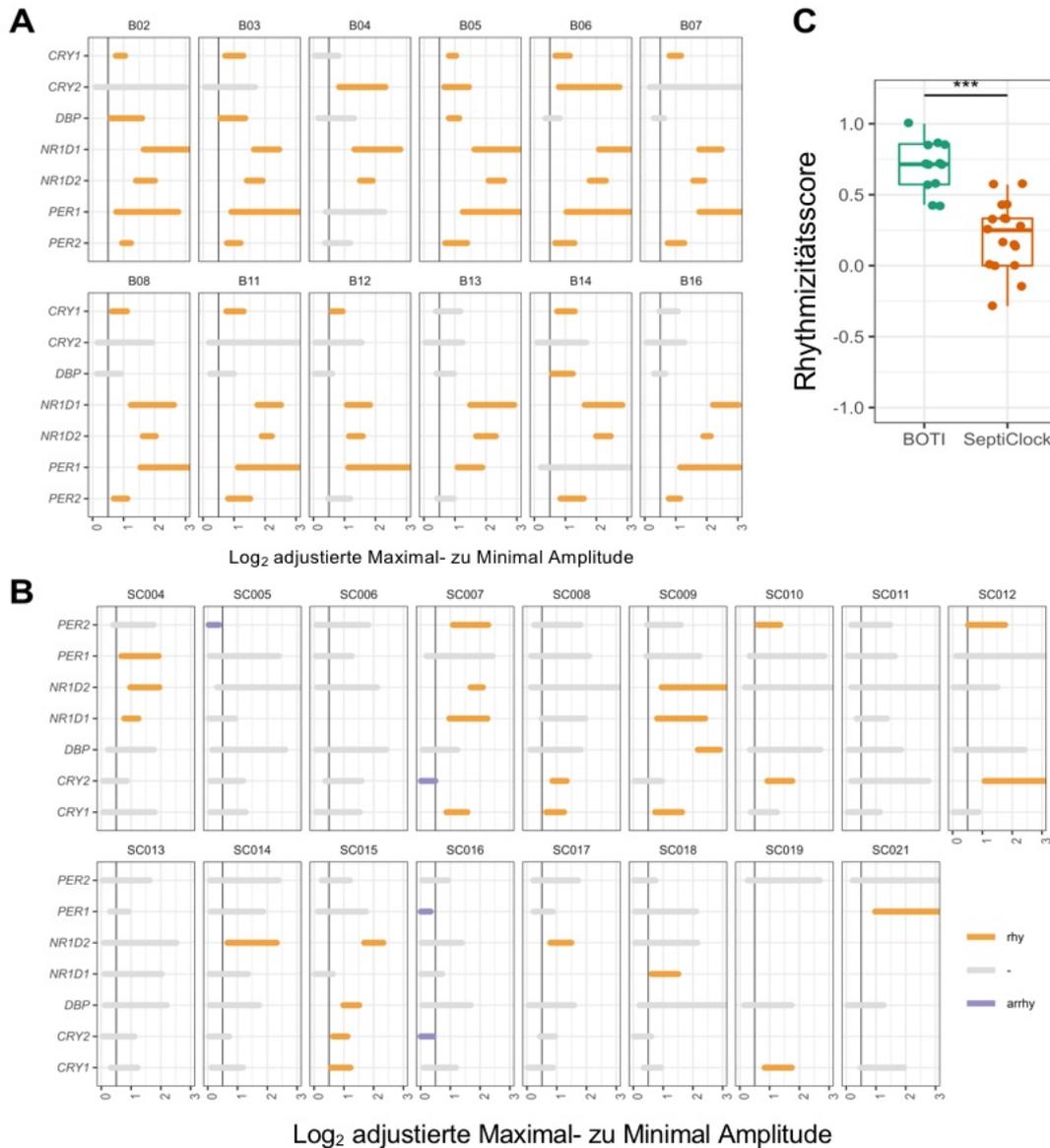


Abbildung 9: Vergleich der Rhythmisität in SeptiClock-Patienten und jungen, gesunden Männern, modifiziert nach [74]

(*** = $p < 0,001$, rhy = rhythmisch, - = nicht zuzuordnen, arrhy = arrhythmisch).

A: Rhythmizität Clock Genes in jungen, gesunden Männern, B: Rhythmizität Clock Genes in Patienten mit septischem Schock, C: Vergleich der Rhythmizitätswerte von Patienten mit Sepsis und jungen, gesunden Männern

Tabelle 6: Rhythmizitätswerte (reduziert auf 7 Gene)

Patient / Proband	Rhythmizitätswert
B02	0,86
B03	0,86
B04	0,43
B05	1
B06	0,86
B07	0,71
B08	0,71
B11	0,71
B12	0,57
B13	0,43
B14	0,71
B16	0,57
SC004	0,43
SC005	-0,14
SC006	0
SC007	0,43
SC008	0,29
SC009	0,57
SC010	0,33
SC011	0
SC012	0,33
SC013	0
SC014	0,14
SC015	0,57
SC016	-0,29
SC017	0,17

SC018	0,14
SC019	0,33
SC021	0,25

3.4 Zusammenhang von Rhythmitätswerten und Patientencharakteristika

In Patienten mit septischem Schock konnten signifikant veränderte Rhythmitätswerte festgestellt werden. Um eine mögliche Assoziation mit den Patientencharakteristika herzustellen, erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Pearson. Wie in Tabelle 7 dargestellt ist, konnte keine signifikante lineare Korrelation zwischen Rhythmitätswert und Alter, BMI, SAPS II, TISS–28, Größe, Gewicht, oder SOFA Score nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Korrelation des Rhythmitätswertes und Patientencharakteristika nach Pearson

	Alter	BMI	SAPS II	TISS 28	Größe	Ge- wicht	HLA– DR	SOFA
Korrela- tion nach Pearson	0,172	0,229	-0,341	0,089	0,233	0,268	0,129	-0,252
Signifi- kanz (2– seitig)	0,509	0,377	0,180	0,735	0,369	0,299	0,659	0,329
n	17	17	17	17	17	17	14	17

(BMI = Body Mass Index, SAPS II = Simplified Acute Physiology Score, TISS–28 = Therapeutic Intervention Scoring System, SOFA = Sequential Organ Failure Assessment)

3.5 Vergleich Basischarakteristika Patienten mit rhythmischen Genen und arrhythmischen / nicht zuzuordnenden Genen

Ein Vergleich der Basischarakteristika von Patienten mit rhythmischen und arrhythmischen oder nicht zuzuordnenden Genen ist in Tabelle 8 dargestellt. Der Median des Intensiv– und stationären Aufenthaltes ist in der Gruppe mit einem Rhythmitätswert ≤ 0 mit 37 Tagen deutlich höher als bei Patienten mit vermehrt rhythmischer Expression. Dieser Zusammenhang ist statistisch jedoch nicht signifikant. Der SAPS II ist in der Gruppe

von Patienten mit vermehrt arrhythmischen Genen signifikant höher als in der Vergleichsgruppe ($p=0,015$). Während der TISS–28 bei Patienten mit einem positiven Rhythmisierungsscore im Median bei 44 lag, beträgt dieser bei Patienten mit einem Score kleiner gleich 0 im Median nur 36 ($p=0,032$).

Tabelle 8: Vergleich Basischarakteristika von Patienten mit rhythmischen und arrhythmischen / nicht zuzuordnenden Genen (Daten erhoben zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme der Messreihe, dargestellt mittels Median mit den Grenzen des Interquartilbereiches (25.-75. Perzentil), getestet mittels Mann–Whitney–U–Test)

Parameter	Patienten mit Rhythmisierungsscore ≤ 0 (n=4)	Patienten mit Rhythmisierungsscore > 0 (n=13)	p–Wert
Alter in Jahren	64 (59,8-72,3)	66 (51,5-74,5)	0,871
BMI in kg/m^2	30 (24,5-36,3)	28 (23-33)	0,549
Hämoglobin in g/dl	8,5 (8,0-9,1)	9,1 (7,8-10,6)	0,785
Leukozyten pro nl	14,8 (8,7-19,5)	14,3 (8,6-19,5)	0,703
Thrombozyten pro nl	95 (69,5-193,3)	113 (58,5-222,5)	0,624
Lactat in mg/dl	14 (7-36,5)	15 (12-46,5)	0,624
PTT in Sekunden	53,3 (39,5 -69,8)	47,1 (37,2-57,5)	0,412
INR	1,3 (1,2-1,4)	1,42 (1,3-1,7)	0,350
SOFA Score	16 (15-17,8)	17 (11-18,5)	0,624
SAPS II	82,5 (73,8-91,3)	67 (52,5-72)	0,015
TISS–28	36 (34-40,3)	44 (38,5-53)	0,032
Anzahl Patienten Hämodialyse (prozentualer Anteil)	3 (75 %)	11 (84,6 %)	0,785
Anzahl Patienten ECMO (prozentualer Anteil)	1 (25 %)	2 (15,4 %)	0,785
Dauer der invasiven Beatmung in h	849 (442-978)	458 (293-748)	0,350

Intensivaufenthalt in Tagen	37 (19,3-45)	24 (14-40)	0,477
Stationärer Aufent- halt in Tagen	37 (15,5-40)	25 (14-42,5)	0,703

BMI = Body Mass Index, ECMO = extrakorporale Membranoxygenierung, PTT = partielle Thromboplastinzeit, INR = International Normalized Ratio, SAPS II = Simplified Acute Physiology Score, TISS-28 = Therapeutic Intervention Scoring System, SOFA = Sequential Organ Failure Assessment)

3.6 Vergleich Letalität von Patienten mit rhythmischen Genen und arrhythmischen / nicht zuzuordnenden Genen

Im Verlauf starben 7 der 17 eingeschlossenen Patienten (41 %). Von den Patienten, deren Rhythmisizitätswert über 0 lag, verstarben 46 %. Bei septischen Patienten mit überwiegend arrhythmischen Genen verstarben 25 %. Ob ein Zusammenhang zwischen Rhythmisizitätswert und Mortalität bestand, wurde durch den Chi-Quadrat-Test untersucht. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p=0,231$).

3.5 Temperaturverlauf bei septischen Patienten

Während einer Messreihe erfolgte zusätzlich die Erfassung der Körperkerntemperatur über 24 Stunden. Die Graphen in Abbildung 10 stellen die Temperaturkurven einzelner Patienten dar. Zur besseren Übersicht wurde auch in dieser Abbildung ein Tagesrhythmus von 8 h bis 32 h gewählt, der letzte Zeitpunkt entspricht 8 Uhr am Folgetag. Fehlende Messwerte wurden durch Lücken im Graphen dargestellt. Die Graphik zeigt deutlich, dass die Körperkerntemperatur der Patienten über 24 Stunden sehr unterschiedliche Verläufe hat. Die Körperkerntemperatur, welche bei gesunden Menschen über den Tagesverlauf bis zu 0,5 °C variiert, zeigte bei Patienten im septischen Schock eine deutlich größere Abweichung von bis zu 3 °C.

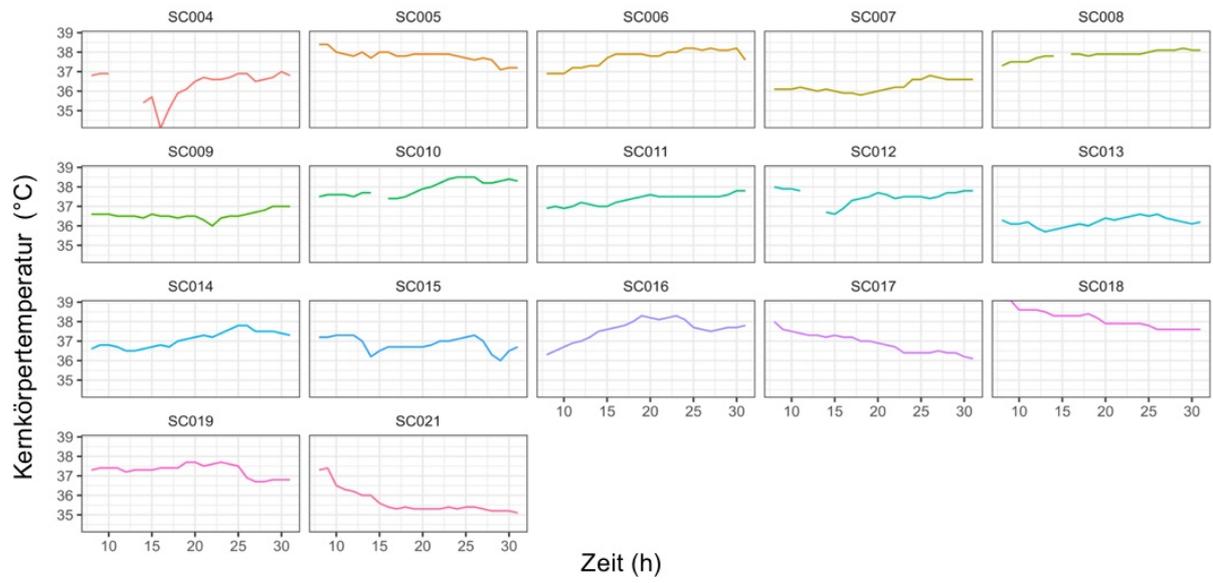


Abbildung 10: Körperkerntemperatur bei SeptiClock-Patienten, modifiziert nach [74]

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Haupthypothese, dass kritisch kranke Patienten im septischem Schock im Vergleich zu jungen, gesunden Männern eine aufgehobene zirkadiane Rhythmik der Clock Genes zeigen, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Rhythmizitätswerte der Patienten- und Probandengruppe zeigten einen signifikanten Unterschied. Im Median lag der Rhythmizitätswert der Sepsis-Patienten bei 0,07 und zeigt die fehlende Rhythmik. 72,2 % der gemessenen Gene konnten nicht als rhythmisch oder arrhythmisch zugeordnet werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass fast alle Clock Genes von septischen Patienten eine verminderte mittlere Genexpression aufwiesen. Das Gen CRY2 war am häufigsten rhythmisch exprimiert und bei Sepsis-Patienten hochreguliert.

Der Rhythmizitätswerte der Gene CLOCK und ARNTL waren bei Patienten im septischen Schock am kleinsten. Es gab keinen Zusammenhang zwischen Patientencharakteristika und Rhythmizitätswert. Auch konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Letalität und Rhythmizitätsscore der Patienten nachgewiesen werden.

4.2 Clock Genes und das Immunsystem

Es konnte bereits in Studien gezeigt werden, dass Einflüsse wie Schichtarbeit oder Jetlag, welche zu einer zirkadianen Dysregulation führen, die Immunregulation negativ beeinflussen, indem sie verstärkte Immunantworten initiieren [86].

In dieser Arbeit konnten spezifische Clock Genes der Sepsis-Patienten als rhythmisch bzw. arrhythmisch klassifiziert werden. Den niedrigsten Rhythmizitätswert hatten die Gene CLOCK und ARNTL. Pathophysiologisch bildet das Protein Bmal1, welches durch das ARNTL Gen codiert wird, ein Heterodimer mit CLOCK und bindet an die E-Box der PER- und CRY-Gene [62]. Die Folge ist eine vermehrte Transkription [62]. Das Clock Gene CLOCK stellt eines der essentiellsten Clock Genes dar [87]. Basierend auf den Mechanismen, durch die CLOCK-BMAL1 die Expression mehrerer Kern-Clock Genes reguliert, wird allgemein angenommen, dass die rhythmische Bindung dieses Komplexes an die DNA notwendig und ausreichend ist, um eine rhythmische Transkription der Zielgene zu steuern [87]. Die Arbeitsgruppe um Hergenhahn konnte nachweisen, dass CLOCK proinflammatorische Proteine direkt beeinflusst [88]. PER1 depletierte Mäuse zeigten eine erhöhte Expression von entzündlichen Zytokinen wie $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$

und CCL2 im Serum [88]. Die Mäuse zeigten eine verringerte Überlebensrate nach LPS-Exposition [88].

Auch Bmal1, welches durch das ARNTL-Gen kodiert wird, reguliert verschiedene Gene [89]. Eine rhythmische Expression in Makrophagen konnte bereits nachgewiesen werden [89]. Die genauen Auswirkungen sind jedoch noch unzureichend verstanden. Die zirkadiane Uhr beeinflusst stark die Immunantwort, während eine Entzündung die Uhr scheinbar umgekehrt beeinflusst [89]. Wang et al. konnten zeigen, dass LPS in Peritonealmakrophagen eine Beeinflussung des PER2-Rhythmus bewirkte und auch vorübergehend die ARNTL-mRNA-Spiegel senkte [89]. Makrophagen mit niedrigen Bmal1-Spiegeln zeigten eine höhere Expression mehrerer proinflammatorischer Zytokine [89]. Jedoch ist die Funktion von Bmal1 komplexer als lediglich als entzündungshemmendes Molekül. Kitchen et al. wiesen in Pneumokokken infizierten Mäusen nach Deletion des Clock-Proteins Bmal1 eine geringere Bakterienbelastung im Blut, eine verbesserte Makrophagenphagozytose und somit einen Gewinn der antibakteriellen Funktion nach [64].

In der vorliegenden Arbeit konnte für Sepsis-Patienten ein geringer Rhythmisitätsscore der Gene CLOCK und ARNTL gezeigt werden. Während CLOCK in der Literatur als proinflammatorisches Molekül gilt, konnten für Bmal1 sowohl pro- als auch antiinflammatorische Prozesse nachgewiesen werden. Da die Patienten dieser Studie zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs eingeschlossen wurden, ist eine genauere Einordnung der Erkenntnisse in die komplexe Pathophysiologie der Sepsis nicht möglich. Der Zusammenhang von aufgehobenen Rhythmen der wichtigen Clock Genes CLOCK und BMAL1 bei Sepsis-Patienten sollte durch weitere Studien mit größeren Fallzahlen und definierten Zeiten des Krankheitsverlaufs weiter erforscht werden.

In der Auswertung der Ergebnisse dieser Studie fiel auf, dass Gene, welche bei Sepsis-Patienten häufiger rhythmisch exprimiert wurden, gegenteilige Funktion zu den Clock Genes CLOCK und ARNTL haben. Die Gene NR1D1, NR1D2 und CRY2 fungieren als negative Regulatoren der Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife [62].

Narasimamurthy et al. untersuchten die Entzündungsreaktion von Säugetierzellen, deren Cry-Proteine fehlten [90]. In Mäusen konnte eine erhöhte Aktivierung von TNF- α in Fibroblasten und im Hypothalamus nachgewiesen werden [90]. Zusätzlich regulieren Cry-Proteine die Glukosehomöostase durch mindestens 2 bekannte Mechanismen, indem sie unter anderem an Glukokortikoidrezeptoren binden und die Transkription glukoneogener Gene inhibieren [90]. Wu et al. zeigten in mehreren verschiedenen Krebsarten, dass eine dysregulierte zirkadiane Uhr, gemessen an den 14 häufigsten Clock Genes, mit einer

globalen Hochregulation von antiinflammatorischen Molekülen und einer Verminderung der T-Zellen einhergeht [91]. Es konnte gezeigt werden, dass die zirkadiane Uhr 45 Signalwege, unter anderem den Ras-Signalweg und den T-Zell-Rezeptor stark beeinflusst [91].

Die aktuelle Datenlage zur Pathophysiologie der Clock Genes NR1D1, NR1D2 und CRY2 in Hinblick auf das Immunsystem wurde bereits in mehreren Krebsarten erforscht [91, 92]. Für Infektionen ist der aktuelle Stand der Wissenschaft noch unzureichend, es konnten aber auch hier bereits komplexe pathophysiologische Mechanismen gezeigt werden. Cavadini et al. zeigten in vivo, dass TNF und IL-1 β die Expression von bisher nur wenig erforschten Genen wie DBP inhibieren [93]. Für BHLHE40 konnte bereits die Repression von IL-10 während einer Mycobacterium tuberculosis Infektion nachgewiesen werden [94]. Die Ergebnisse der SeptiClock-Studie zeigen auch eine verminderte Genexpression von bisher nur wenig erforschten Clock Genes wie DBP und BHLHE40 und liefern neue Erkenntnisse für Patienten mit Sepsis.

4.3 Zirkadiane Rhythmik und Infektionen

Auch Coiffard et al. konnten einen aufgehobenen zirkadianen Rhythmus der Clock Genes BMAL1, PER2 und PER3 nachweisen [71]. BMAL1 entspricht ARNTL unserer Studie. Zusätzlich wurde ein aufgehobener Rhythmus von Leukozyten, Zytokinen und Cortisol nachgewiesen [71]. Es wurden 38 Patienten eingeschlossen, von denen 13 mindestens eine septische Episode entwickelten [71]. Unter anderem wurden die 3 Clock Genes alle 4 Stunden über 24 Stunden gemessen und Patienten mit und ohne Sepsis unter Verwendung des Cosinor Modells, einer Methode, welcher der in dieser Arbeit angewendeten Auswertung sehr ähnlich ist, miteinander verglichen [71]. In der Studie konnte gezeigt werden, dass der Tagesverlauf von BMAL1 bei allen Patienten ähnlich war, die Genexpression von PER2 und PER3 in septischen Patienten war vermindert [71]. Auch bei SeptiClock-Patienten konnte eine verminderte Expression von PER2 nachgewiesen werden. Eine valide Aussage zu diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gemacht werden, da unterschiedliche Messmethoden zur Bestimmung der Genexpression bei Patienten mit septischem Schock und der Vergleichsgruppe verwendet wurden. Da PER3 in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, lässt sich zu diesem Clock Gene keine Aussage treffen. Zusammenfassend konnte in der beschriebenen Studie von Coiffard et al. statistisch signifikant gezeigt werden, dass alle Traumapatienten einen

beeinträchtigten zirkadianen Rhythmus von Cortisol, Zytokinen, Leukozyten und Clock Genes aufwiesen [71]. Interessanterweise war eine frühe zirkadiane Störung mit dem Auftreten einer Sepsis verbunden [71].

Die Arbeitsgruppe um Diaz et al. schlossen 11 Patienten von neurologischen Intensivstationen ein und verglichen die Rhythmen der Clock Genes CLOCK, BMAL1, CRY1 und PER2 am ersten Tag nach der Aufnahme und nach einer Woche. Messungen erfolgten alle 6 Stunden [95]. Zur Auswertung des möglichen Rhythmus wurden Fourier-Reihen verwendet [95]. Es konnte eine rhythmische RNA-Expression am ersten Tag nach der Aufnahme gezeigt werden [95]. Nach einer Woche beeinflusste der Aufenthalt auf der Intensivstation die zirkadiane Uhr, sodass die Expression der Clock Genes ohne signifikante Fluktuation zwischen den 4 analysierten Zeitpunkten ähnlich war [95]. Im Vergleich zu dieser Arbeit konnte auch in neurologischen Patienten, die auf einer Intensivstation behandelt wurden, eine Beeinflussung des Gens CLOCK gezeigt werden, sodass möglicherweise der Aufenthalt auf Intensivstationen auch einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik der Clock Genes in septischen Patienten hat [95].

Diesen Zusammenhang untersuchten Solera et al., indem sie die Expression der Clock Genes BMAL1, PER2, CLOCK und CRY1 in gesunden Freiwilligen, Patienten auf Intensivstationen ohne Sepsis und intensivpflichtigen septischen Patienten verglichen [96]. In dieser Studie konnte ein verminderter zirkadianer Rhythmus der Clock Genes in septischen Patienten nachgewiesen werden, während der Tagesrhythmus bei nicht septischen Patienten aufrechterhalten wurde [96]. Die Ergebnisse von Solera et al. stimmen mit den Ergebnissen der SeptiClock-Studie überein, da auch bei den eingeschlossenen SeptiClock-Patienten eine arrhythmische Expression des Gens CLOCK beobachtet werden konnte. Zusätzlich konnte signifikant nachgewiesen werden, dass die Bedingungen auf der Intensivstation nicht ursächlich für den gestörten zirkadianen Rhythmus in Patienten mit Sepsis sind, da als Vergleichsgruppe postoperative Patienten der gleichen Intensivstation ohne Sepsis eingeschlossen wurden [96]. Diese Beobachtung ist auch für die Auswertung der SeptiClock-Daten von großem Interesse, da die Vergleichsgruppe der BOTI-Studie anderen Umwelteinflüssen, wie z. B. dem wichtigen zirkadianen Zeitgeber Licht, ausgesetzt waren [83]. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Sepsis der ursächliche Faktor eines aufgehobenen zirkadianen Rhythmus ist.

Im Mausmodell wiesen Anderson et al. auch chronische Auswirkungen des septischen Schocks auf das zirkadiane System nach [97]. Nach der intraperitonealen Injektion von LPS zeigten Tiere einen Monat nach der Injektion veränderte Expressionsmuster von

PER1 und PER2 im Hippocampus [97]. Die Daten wurden durch eine Cosinor Analyse ausgewertet [97]. Eine Auswirkung auf die Expression von CLOCK konnte nicht gezeigt werden [97].

4.4 Zirkadiane Rhythmik junger, gesunder Männer

Die Vergleichsgruppe der jungen, gesunden Männer exprimiert nur rhythmische und nicht sicher zuzuordnende Gene, einen negativen Rhythmisitätsscore hat keines der Gene. Ursächlich könnten die wenigen Messzeitpunkte sein, obwohl Takimoto et al. in einem Fall bei einem Patienten mit Schlafstörungen eine Variation der Peakphasen der Expression der Clock Genes PER1, PER2, PER3, CLOCK und BMAL1 nachweisen konnten [98]. Die Probandengruppe bestand aus 12 gesunden männlichen Probanden [98].

Ando et al. untersuchten die Zusammenhänge von Stoffwechselfparametern und Alkoholkonsum mit der mRNA-Expression von Clock Genes in 29 gesunden, nicht adipösen, älteren Männern und konnten eine signifikante Korrelation zwischen Taillenumfang und mRNA-Spiegel von PER1, Plasmaglukosekonzentration und PER2, Alkoholkonsum und BMAL1 und Serum-Gamma-GTP-Konzentration, einem empfindlichen Marker für den Alkoholkonsum, und PER2 nachweisen [99]. Ob diese Zusammenhänge auch auf die in den SeptiClock- und BOTI-Studien untersuchten Patienten und Probanden übertragbar sind, ist fraglich. Jedoch sollten auch diese Parameter in künftigen Studien untersucht werden.

4.5 Therapeutische Ansätze zur Beeinflussung der Expression von Clock Genes

Bunney et al. konnten 2014 durch Schlafentzugstherapie und niedrig dosiertem Ketamin die Symptomatik bei Patienten mit Major Depression (MDD) innerhalb von Stunden verbessern [100]. Für dieses Krankheitsbild wurde bereits in mehreren Studien ein signifikant gestörtes Expressionsmuster von Clock Genes nachgewiesen [100]. Die schnelle antidepressive Wirkung führten die Autoren auf die wiederhergestellte und stabilisierte zirkadiane Rhythmik zurück [100].

Antoch et al. wiesen eine signifikant modulierte Expression von Clock Genes bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nach, welche mit DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs) behandelt wurden [101]. Es ist bereits bekannt, dass Clock Genes die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beeinflussen [101]. Auch die Krankheitsaktivität

korreliert signifikant mit der Expression der Clock Genes, sodass auch ein diagnostischer Wert als Biomarker der Krankheitsaktivität und therapeutischer Wirksamkeit besteht [101].

Studien zeigen, dass die Freisetzung von Melatonin bei septischen Patienten stark gestört ist [102]. In klinischen Studien, welche hauptsächlich Neugeborene oder pädiatrische Patienten einschlossen, konnten bereits vielversprechende Ergebnisse zur Melatoningabe bei Sepsis-Patienten publiziert werden [102]. Melatonin ist nicht nur der hormonelle Hauptregulator des zirkadianen Rhythmus, es besitzt auch antiinflammatorische, antiapoptotische und stark antioxidative Eigenschaften [102]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression der Gene CLOCK, BMAL1, PER1 und CRY1 in Abwesenheit von Melatonin dramatisch reduziert ist [103].

Die obigen Studien zeigen, dass ein positiver Effekt durch die therapeutische Beeinflussung von Clock Genes bereits in verschiedenen Krankheitsbildern nachgewiesen werden konnte. Für das Krankheitsbild der Sepsis sind dringend weitere Studien notwendig, um die Beeinflussung von Clock Genes zu evaluieren und neue therapeutische Ansätze zu untersuchen.

4.6 Limitationen der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit wurden Daten von lediglich 17 Patienten ausgewertet, sodass die geringe Fallzahl der Sepsis-Patienten eine der größten Limitationen dieser Studie darstellt.

Die Blutentnahmen erfolgten während der Messreihe im 4 Stunden Rhythmus über 24 Stunden, in der Auswertung konnten 7 Messzeitpunkte berücksichtigt werden. In einigen Fällen mussten in der anschließenden Analyse einzelne Gene ausgeschlossen werden, da lediglich die Daten von 6 oder weniger Messzeitpunkten aufgrund von Problemen bei der Aufbereitung der Proben vorlagen. Die Mehrheit der Clock Genes konnte nicht eindeutig als rhythmisch oder arrhythmisch klassifiziert werden, was auf die begrenzte Anzahl der Messzeitpunkte zurückzuführen sein könnte. Insbesondere bei teilweise gestörten Rhythmen werden deutlich mehr Messzeitpunkte benötigt, um eine Arrhythmie nachzuweisen. Durch längere Messzeiträume könnte die Rhythmik nicht klassifizierbarer Gene beurteilt werden.

Auch die Vergleichsgruppe junger, gesunder Männer hatte mit nur 12 eingeschlossenen Probanden eine geringe Fallzahl. Durch die unterschiedliche Konstitution und Umgebung der Patienten- und Probandengruppen, ist das Ergebnis des veränderten zirkadianen

Rhythmus einzelner Gene in Sepsis-Patienten nicht eindeutig durch das Krankheitsbild der Sepsis zu erklären und kann viele verschiedene Ursachen haben. Beispielsweise kann der Aufenthalt auf Intensivstationen durch veränderte Umweltfaktoren (z. B. dauerhaften Lichteinfluss, eine erhöhte Geräuschbelastung und hochfrequentierten personellen Kontakt) eine Begründung für die aufgehobene zirkadiane Rhythmik einzelner Gene sein [95]. Zusätzlich wurden die Daten der Vergleichsgruppe durch eine ähnliche, aber nicht identische Messmethode ausgewertet, sodass quantitativ unterschiedliche Genexpressionslevel vorlagen. Ein Einfluss auf die statistische Auswertung durch die verschiedenen Messmethoden ist denkbar.

Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt, ist die Pathogenese der Sepsis sehr komplex. Die Messungen erfolgten lediglich an einem Tag eines deutlich längeren Krankheitsverlaufs. Mehrere Messreihen der eingeschlossenen Sepsis-Patienten, welche zu definierten Zeitpunkten stattfinden, könnten möglicherweise eindeutigere Ergebnisse hervorbringen.

Für diese Studie wurden Monozyten isoliert und die Expression verschiedener Clock Genes ausgewertet. Wie oben bereits beschrieben, scheinen auch andere Zellreihen des Immunsystems einen tagesabhängigen Rhythmus zu haben. Die Ergebnisse haben somit keine Aussagekraft bezüglich der gesamten komplexen Immunreaktion bei septischen Patienten.

Andere Laborparameter wie Melatonin und Cortisol, deren Synthese vom Tagesverlauf abhängig ist, wurden nicht bestimmt. Zur besseren Darstellung der komplexen zirkadianen Rhythmik unterschiedlicher Systeme wäre neben der Erhebung der Temperatur auch eine regelmäßige Bestimmung weiterer Werte denkbar gewesen. Auch die Frage, inwieweit die Temperatur bei Patienten mit septischem Schock verwertbar ist, sollte kritisch hinterfragt werden, da nicht nur die durch die Monozyten produzierten Pyrogene, sondern auch zahlreiche andere Systeme an der Temperaturregulation beteiligt sind.

4.7 Ausblick

Diese Arbeit untersuchte erstmals die Rhythmik von Clock Genes bei Patienten mit septischem Schock und konnte im Vergleich zu jungen, gesunden Männern einen statistisch signifikanten Unterschied in der Rhythmizität von 7 Clock Genes zeigen. Da die Pathophysiologie der Sepsis noch nicht vollständig verstanden und die Letalität trotz vieler Studien und unterschiedlichen Therapieansätzen noch immer unzureichend hoch ist,

könnten neue pathophysiologische Erkenntnisse möglicherweise auch therapeutische Konsequenzen haben.

Um weitere Erkenntnisse zu erlangen, sollte für künftige Forschung eine größere Fallzahl an Patienten sowie mehr Gene und Messzeitpunkte bestimmt werden. Zusätzlich sollten als Vergleichsgruppe Patienten mit ähnlicher Konstitution und gleichen Umwelteinflüssen gewählt werden. So könnte der Einfluss des septischen Schocks auf die Expression der Clock Genes besser beurteilt kann.

Es konnten bereits für verschiedene Krankheitsbilder Therapieansätze und eine diagnostische Bedeutung von Clock Genes gezeigt werden [100-103]. Es ist dringend weitere Forschung notwendig, um dies auch für das komplexe Krankheitsbild der Sepsis zu evaluieren.

Literaturverzeichnis

1. Gyawali, B., K. Ramakrishna, and A.S. Dhamoon, *Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management*. SAGE Open Med, 2019. **7**: p. 2050312119835043.
2. Fleischmann-Struzek, C., A. Mikolajetz, D. Schwarzkopf, J. Cohen, C.S. Hartog, M. Pletz, P. Gastmeier, and K. Reinhart, *Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany*. Intensive Care Med, 2018. **44**(11): p. 1826-1835.
3. Kaukonen, K.M., M. Bailey, S. Suzuki, D. Pilcher, and R. Bellomo, *Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012*. JAMA, 2014. **311**(13): p. 1308-16.
4. Rudd, K.E., S.C. Johnson, K.M. Agesa, K.A. Shackelford, D. Tsoi, D.R. Kievlan, D.V. Colombara, K.S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F.R. Machado, K.K. Reinhart, K. Rowan, C.W. Seymour, R.S. Watson, T.E. West, F. Marinho, S.I. Hay, R. Lozano, A.D. Lopez, D.C. Angus, C.J.L. Murray, and M. Naghavi, *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study*. Lancet, 2020. **395**(10219): p. 200-211.
5. Fleischmann, C., D.O. Thomas-Rueddel, M. Hartmann, C.S. Hartog, T. Welte, S. Heublein, U. Dennler, and K. Reinhart, *Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(10): p. 159-66.
6. Martin, G.S., *Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(6): p. 701-6.
7. Paoli, C.J., M.A. Reynolds, M. Sinha, M. Gitlin, and E. Crouser, *Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level*. Crit Care Med, 2018. **46**(12): p. 1889-1897.
8. Hall, M.J., S.N. Williams, C.J. DeFrances, and A. Golosinskiy, *Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals*. NCHS Data Brief, 2011(62): p. 1-8.
9. Fleischmann, C., M. Hartmann, C.S. Hartog, T. Welte, S. Heublein, D. Thomas-Rueddel, U. Dennler, and K. Reinhart, *Epidemiology of Sepsis in Germany:*

- Incidence, Mortality And Associated Costs of Care 2007-2013*. Intensive Care Medicine Experimental, 2015. **3**(S1).
10. F. M. Brunkhorst, M.a.W., M. Pletz, P. Gastmeier, S.W. Lemmen, A. Meier-Hellmann, M. Ragaller, A. Weyland, G. Marx, M.Bucherm H. Gerlach, B. Salzberger, B. Grabein, T. Welte, K. Werdan, S. Kluge, H.G. Bone, C. Putensen, R.Rossaint, M. Quintel, C. Spies, B. Weiß,, *S3-Leitlinie Sepsis- Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge*. Springer Medizin Verlag GmbH, 2020. **Springer Nature 2020**.
 11. AWMF, *Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis*. 2010.
 12. Claudia Spies, M.K., Thoralf Kerner, Christoph Melzer-Gartzke, Hendrik Zielke, Wolfgang J. Kox, *SOPs in Intensivmedizin und Notfallmedizin Alle relevanten Standards und Techniken für die Klinik*. 2013, Stuttgart: Gerog Thieme Verlag KG.
 13. Churpek, M.M., F.J. Zadavec, C. Winslow, M.D. Howell, and D.P. Edelson, *Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(8): p. 958-64.
 14. Kaukonen, K.M., M. Bailey, D. Pilcher, D.J. Cooper, and R. Bellomo, *Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis*. N Engl J Med, 2015. **372**(17): p. 1629-38.
 15. Singer, M., C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C.M. Coopersmith, R.S. Hotchkiss, M.M. Levy, J.C. Marshall, G.S. Martin, S.M. Opal, G.D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.L. Vincent, and D.C. Angus, *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
 16. Wiersinga, W.J., S.J. Leopold, D.R. Cranendonk, and T. van der Poll, *Host innate immune responses to sepsis*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 36-44.
 17. McConnell, K.W. and C.M. Coopersmith, *Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside*. Presse Med, 2016. **45**(4 Pt 2): p. e93-8.
 18. Remick, D.G., *Pathophysiology of sepsis*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1435-44.
 19. Cavillon, J.M. and E.J. Giamarellos-Bourboulis, *Immunosuppression is Inappropriately Qualifying the Immune Status of Septic and SIRS Patients*. Shock, 2019. **52**(3): p. 307-317.

20. Binkowska, A.M., G. Michalak, and R. Slotwinski, *Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection*. Cent Eur J Immunol, 2015. **40**(2): p. 206-16.
21. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach*. Lancet Infect Dis, 2013. **13**(3): p. 260-8.
22. Ward, N.S., B. Casserly, and A. Ayala, *The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients*. Clin Chest Med, 2008. **29**(4): p. 617-25, viii.
23. Lachmann, G., *Habilitationsschrift Zwischen Immunparalyse und Hyperinflammation: Einflussfaktoren auf die Immundefunktion perioperativ und bei kritisch kranken Patienten*. 2019.
24. Keane, C., M. Jerkic, and J.G. Laffey, *Stem Cell-based Therapies for Sepsis*. Anesthesiology, 2017. **127**(6): p. 1017-1034.
25. Horner, C., A. Bouchon, A. Bierhaus, P.P. Nawroth, E. Martin, H.J. Bardenheuer, and M.A. Weigand, *[Role of the innate immune response in sepsis]*. Anaesthesist, 2004. **53**(1): p. 10-28.
26. Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward, *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 776-87.
27. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
28. Zhang, J.M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain*. Int Anesthesiol Clin, 2007. **45**(2): p. 27-37.
29. Landelle, C., A. Lepape, N. Voirin, E. Tognet, F. Venet, J. Bohe, P. Vanhems, and G. Monneret, *Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock*. Intensive Care Med, 2010. **36**(11): p. 1859-66.
30. Palojarvi, A., J. Petaja, S. Siitonen, C. Janer, and S. Andersson, *Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants*. Pediatr Res, 2013. **73**(4 Pt 1): p. 469-75.
31. Kangelaris, K.N., A. Prakash, K.D. Liu, B. Aouizerat, P.G. Woodruff, D.J. Erle, A. Rogers, E.J. Seeley, J. Chu, T. Liu, T. Osterberg-Deiss, H. Zhuo, M.A. Matthay, and C.S. Calfee, *Increased expression of neutrophil-related genes in patients with*

- early sepsis-induced ARDS*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **308**(11): p. L1102-13.
32. Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 813-22.
 33. Venet, F., T. Rimmelé, and G. Monneret, *Management of Sepsis-Induced Immunosuppression*. Crit Care Clin, 2018. **34**(1): p. 97-106.
 34. Biemond, B.J., M. Levi, H. Ten Cate, T. Van der Poll, H.R. Buller, C.E. Hack, and J.W. Ten Cate, *Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and coagulation cascades*. Clin Sci (Lond), 1995. **88**(5): p. 587-94.
 35. Hotchkiss, R.S., P.E. Swanson, B.D. Freeman, K.W. Tinsley, J.P. Cobb, G.M. Matuschak, T.G. Buchman, and I.E. Karl, *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction*. Crit Care Med, 1999. **27**(7): p. 1230-51.
 36. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, R.E. Schmiegel, Jr., J.J. Hui, K.C. Chang, D.F. Osborne, B.D. Freeman, J.P. Cobb, T.G. Buchman, and I.E. Karl, *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6952-63.
 37. Walton, A.H., J.T. Muenzer, D. Rasche, J.S. Boomer, B. Sato, B.H. Brownstein, A. Pachot, T.L. Brooks, E. Deych, W.D. Shannon, J.M. Green, G.A. Storch, and R.S. Hotchkiss, *Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e98819.
 38. Zanotti Cavazzoni, S.L. and R.P. Dellinger, *Hemodynamic optimization of sepsis-induced tissue hypoperfusion*. Crit Care, 2006. **10 Suppl 3**: p. S2.
 39. Ivanov, D.B., M.P. Philippova, and V.A. Tkachuk, *Structure and functions of classical cadherins*. Biochemistry (Mosc), 2001. **66**(10): p. 1174-86.
 40. Narayanan, S., *Multifunctional roles of thrombin*. Ann Clin Lab Sci, 1999. **29**(4): p. 275-80.
 41. Delabranche, X., J. Helms, and F. Meziari, *Immuno-haemostasis: a new view on haemostasis during sepsis*. Ann Intensive Care, 2017. **7**(1): p. 117.
 42. Lerolle, N., A. Carlotti, K. Melican, F. Aubey, M. Pierrot, J.L. Diehl, V. Caille, G. Hekimian, S. Gandrille, C. Mandet, P. Bruneval, G. Dumenil, and D. Borgel, *Assessment of the interplay between blood and skin vascular abnormalities in adult purpura fulminans*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(6): p. 684-92.

43. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
44. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2013. **369**(21): p. 2063.
45. van der Poll, T. and H. Herwald, *The coagulation system and its function in early immune defense*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 640-8.
46. Esmon, C.T., *The interactions between inflammation and coagulation*. Br J Haematol, 2005. **131**(4): p. 417-30.
47. Griffin, J.H., J.A. Fernandez, A.J. Gale, and L.O. Mosnier, *Activated protein C*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 73-80.
48. Schmitt, F.C.F., V. Manolov, J. Morgenstern, T. Fleming, S. Heitmeier, F. Uhle, M. Al-Saeedi, T. Hackert, T. Bruckner, H. Schochl, M.A. Weigand, S. Hofer, and T. Brenner, *Acute fibrinolysis shutdown occurs early in septic shock and is associated with increased morbidity and mortality: results of an observational pilot study*. Ann Intensive Care, 2019. **9**(1): p. 19.
49. Reddy, S. and S. Sharma, *Physiology, Circadian Rhythm*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
50. Voigt, R.M., C.B. Forsyth, S.J. Green, P.A. Engen, and A. Keshavarzian, *Circadian Rhythm and the Gut Microbiome*. Int Rev Neurobiol, 2016. **131**: p. 193-205.
51. Bass, J. and J.S. Takahashi, *Circadian integration of metabolism and energetics*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1349-54.
52. Chan, M.C., P.M. Spieth, K. Quinn, M. Parotto, H. Zhang, and A.S. Slutsky, *Circadian rhythms: from basic mechanisms to the intensive care unit*. Crit Care Med, 2012. **40**(1): p. 246-53.
53. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 517-49.
54. Pandi-Perumal, S.R., I. Trakht, D.W. Spence, V. Srinivasan, Y. Dagan, and D.P. Cardinali, *The roles of melatonin and light in the pathophysiology and treatment of circadian rhythm sleep disorders*. Nat Clin Pract Neurol, 2008. **4**(8): p. 436-47.
55. Klein, D.C. and R.Y. Moore, *Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus*. Brain Res, 1979. **174**(2): p. 245-62.

56. Thapan, K., J. Arendt, and D.J. Skene, *An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans*. *J Physiol*, 2001. **535**(Pt 1): p. 261-7.
57. Potter, G.D., D.J. Skene, J. Arendt, J.E. Cade, P.J. Grant, and L.J. Hardie, *Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures*. *Endocr Rev*, 2016. **37**(6): p. 584-608.
58. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 7618-24.
59. Silver, A.C., A. Arjona, M.E. Hughes, M.N. Nitabach, and E. Fikrig, *Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells*. *Brain Behav Immun*, 2012. **26**(3): p. 407-13.
60. Ella, K., R. Csepanyi-Komi, and K. Kaldi, *Circadian regulation of human peripheral neutrophils*. *Brain Behav Immun*, 2016. **57**: p. 209-221.
61. Silver, A.C., S.M. Buckley, M.E. Hughes, A.K. Hastings, M.N. Nitabach, and E. Fikrig, *Daily oscillations in expression and responsiveness of Toll-like receptors in splenic immune cells*. *Heliyon*, 2018. **4**(3): p. e00579.
62. Scheiermann, C., Y. Kunisaki, and P.S. Frenette, *Circadian control of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 190-8.
63. Golombek, D.A. and R.E. Rosenstein, *Physiology of circadian entrainment*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(3): p. 1063-102.
64. Kitchen, G.B., P.S. Cunningham, T.M. Poolman, M. Iqbal, R. Maidstone, M. Baxter, J. Bagnall, N. Begley, B. Saer, T. Hussell, L.C. Matthews, D.H. Dockrell, H.J. Durrington, J.E. Gibbs, J.F. Blaikley, A.S. Loudon, and D.W. Ray, *The clock gene *Bmal1* inhibits macrophage motility, phagocytosis, and impairs defense against pneumonia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(3): p. 1543-1551.
65. Heipertz, E.L., J. Harper, C.A. Lopez, E. Fikrig, M.E. Hughes, and W.E. Walker, *Circadian Rhythms Influence the Severity of Sepsis in Mice via a TLR2-Dependent, Leukocyte-Intrinsic Mechanism*. *J Immunol*, 2018. **201**(1): p. 193-201.
66. Toscano, M.G., D. Ganea, and A.M. Gamero, *Cecal ligation puncture procedure*. *J Vis Exp*, 2011(51).
67. Everett, L.J. and M.A. Lazar, *Nuclear receptor Rev-erb α : up, down, and all around*. *Trends Endocrinol Metab*, 2014. **25**(11): p. 586-92.
68. Fontaine, C., E. Rigamonti, B. Pourcet, H. Duez, C. Duhem, J.C. Fruchart, G. Chinetti-Gbaguidi, and B. Staels, *The nuclear receptor Rev-erb α is a liver X*

- receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(8): p. 1797-811.
69. Deng, W., S. Zhu, L. Zeng, J. Liu, R. Kang, M. Yang, L. Cao, H. Wang, T.R. Billiar, J. Jiang, M. Xie, and D. Tang, *The Circadian Clock Controls Immune Checkpoint Pathway in Sepsis*. *Cell Rep*, 2018. **24**(2): p. 366-378.
 70. Acuna-Fernandez, C., J.S. Marin, M.E. Diaz-Casado, I. Rusanova, B. Darias-Delbey, L. Perez-Guillama, J. Florido-Ruiz, and D. Acuna-Castroviejo, *Daily Changes in The Expression of Clock Genes in Sepsis and Their Relation with Sepsis Outcome and Urinary Excretion of 6-Sulfatoximelatonin*. *Shock*, 2019.
 71. Coiffard, B., A.B. Diallo, A. Culver, S. Mezouar, E. Hammad, C. Vigne, C. Nicolino-Brunet, F. Dignat-George, K. Baumstarck, M. Boucekine, M. Leone, and J.L. Mege, *Circadian Rhythm Disruption and Sepsis in Severe Trauma Patients*. *Shock*, 2019. **52**(1): p. 29-36.
 72. Verdonk, F., A. Blet, and A. Mebazaa, *The new sepsis definition: limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis*. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2017. **30**(2): p. 200-204.
 73. Cesano, A., *nCounter((R)) PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA)*. *J Immunother Cancer*, 2015. **3**: p. 42.
 74. Gunnar Lachmann, B.A., Viktor A. Wunsch, Lara-Marie Scherfig, Clarissa von Haefen, Cornelia Knaak, Andreas Edel, Lukas Ehlen, Barbara Koller, Anton Goldmann, Hanspeter Herzel, Achim Kramer, Claudia Spies, *Circadian Rhythms in Septic Shock Patients*. 2020.
 75. Lambden, S., P.F. Laterre, M.M. Levy, and B. Francois, *The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials*. *Crit Care*, 2019. **23**(1): p. 374.
 76. Le Gall, J.R., S. Lemeshow, and F. Saulnier, *A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study*. *JAMA*, 1993. **270**(24): p. 2957-63.
 77. Allyn, J., C. Ferdynus, M. Bohrer, C. Dalban, D. Valance, and N. Allou, *Simplified Acute Physiology Score II as Predictor of Mortality in Intensive Care Units: A Decision Curve Analysis*. *PLoS One*, 2016. **11**(10): p. e0164828.
 78. Rapsang, A.G. and D.C. Shyam, *Scoring systems in the intensive care unit: A compendium*. *Indian J Crit Care Med*, 2014. **18**(4): p. 220-8.

79. Moreno, J.-L.V.R., *Clinical review: Scoring systems in the critically ill*. Critical Care, 2010.
80. Uhrlau, C., *Intensivmedizinische Basics: Eine Einführung für Studierende und Ärzte in der Weiterbildung*. 2020: Lehmanns. 163.
81. Biotec, M., *MACS Cell Separation*.
82. Desjardins, P. and D. Conklin, *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids*. J Vis Exp, 2010(45).
83. Wittenbrink, N., B. Ananthasubramaniam, M. Munch, B. Koller, B. Maier, C. Weschke, F. Bes, J. de Zeeuw, C. Nowozin, A. Wahnschaffe, S. Wisniewski, M. Zaleska, O. Bartok, R. Ashwal-Fluss, H. Lammert, H. Herzel, M. Hummel, S. Kadener, D. Kunz, and A. Kramer, *High-accuracy determination of internal circadian time from a single blood sample*. J Clin Invest, 2018. **128**(9): p. 3826-3839.
84. Ferreira, F.L., D.P. Bota, A. Bross, C. Melot, and J.L. Vincent, *Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients*. JAMA, 2001. **286**(14): p. 1754-8.
85. Luck, S. and P.O. Westermarck, *Circadian mRNA expression: insights from modeling and transcriptomics*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(3): p. 497-521.
86. Abele, S.H., K.E. Meadows, D. Medeiros, and A.C. Silver, *Time is on the Immune System's Side, Yes it is*. Yale J Biol Med, 2019. **92**(2): p. 225-231.
87. Trott, A.J. and J.S. Menet, *Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1*. PLoS Genet, 2018. **14**(1): p. e1007156.
88. Hergenhan, S., S. Holtkamp, and C. Scheiermann, *Molecular Interactions Between Components of the Circadian Clock and the Immune System*. J Mol Biol, 2020. **432**(12): p. 3700-3713.
89. Oishi, Y., S. Hayashi, T. Isagawa, M. Oshima, A. Iwama, S. Shimba, H. Okamura, and I. Manabe, *Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 7086.
90. Narasimamurthy, R., M. Hatori, S.K. Nayak, F. Liu, S. Panda, and I.M. Verma, *Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. 12662-7.
91. Wu, Y., B. Tao, T. Zhang, Y. Fan, and R. Mao, *Pan-Cancer Analysis Reveals Disrupted Circadian Clock Associates With T Cell Exhaustion*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2451.

92. Liu, L., H. Shen, and Y. Wang, *CRY2 is suppressed by FOXM1 mediated promoter hypermethylation in breast cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **490**(1): p. 44-50.
93. Cavadini, G., S. Petrzilka, P. Kohler, C. Jud, I. Tobler, T. Birchler, and A. Fontana, *TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(31): p. 12843-8.
94. Huynh, J.P., C.C. Lin, J.M. Kimmey, N.N. Jarjour, E.A. Schwarzkopf, T.R. Bradstreet, I. Shchukina, O. Shpynov, C.T. Weaver, R. Taneja, M.N. Artyomov, B.T. Edelson, and C.L. Stallings, *Bhlhe40 is an essential repressor of IL-10 during Mycobacterium tuberculosis infection*. *J Exp Med*, 2018. **215**(7): p. 1823-1838.
95. Diaz, E., I. Diaz, C. Del Busto, D. Escudero, and S. Perez, *Clock Genes Disruption in the Intensive Care Unit*. *J Intensive Care Med*, 2019: p. 885066619876572.
96. Acuna-Fernandez, C., J.S. Marin, M.E. Diaz-Casado, I. Rusanova, B. Darias-Delbey, L. Perez-Guillama, J. Florido-Ruiz, and D. Acuna-Castroviejo, *Daily Changes in the Expression of Clock Genes in Sepsis and Their Relation with Sepsis Outcome and Urinary Excretion of 6-Sulfatoximelatonin*. *Shock*, 2020. **53**(5): p. 550-559.
97. O'Callaghan, E.K., S.T. Anderson, P.N. Moynagh, and A.N. Coogan, *Long-lasting effects of sepsis on circadian rhythms in the mouse*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47087.
98. Takimoto, M., A. Hamada, A. Tomoda, S. Ohdo, T. Ohmura, H. Sakato, J. Kawatani, T. Jodoi, H. Nakagawa, H. Terazono, S. Koyanagi, S. Higuchi, M. Kimura, H. Tukikawa, S. Irie, H. Saito, and T. Miike, *Daily expression of clock genes in whole blood cells in healthy subjects and a patient with circadian rhythm sleep disorder*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **289**(5): p. R1273-9.
99. Ando, H., K. Ushijima, M. Kumazaki, T. Eto, T. Takamura, S. Irie, S. Kaneko, and A. Fujimura, *Associations of metabolic parameters and ethanol consumption with messenger RNA expression of clock genes in healthy men*. *Chronobiol Int*, 2010. **27**(1): p. 194-203.
100. Bunney, B.G., J.Z. Li, D.M. Walsh, R. Stein, M.P. Vawter, P. Cartagena, J.D. Barchas, A.F. Schatzberg, R.M. Myers, S.J. Watson, H. Akil, and W.E. Bunney, *Circadian dysregulation of clock genes: clues to rapid treatments in major depressive disorder*. *Mol Psychiatry*, 2015. **20**(1): p. 48-55.

101. Kaneshiro, K., K. Yoshida, K. Morii, Y. Oketani, K. Uchida, A. Yaekura, I. Okumura, T. Hashimoto, Y. Kawasaki, N. Shibanuma, Y. Sakai, and A. Hashiramoto, *Expressions of circadian clock genes represent disease activities of RA patients treated with biological DMARDs*. Mod Rheumatol, 2020. **30**(2): p. 293-300.
102. Colunga Biancatelli, R.M.L., M. Berrill, Y.H. Mohammed, and P.E. Marik, *Melatonin for the treatment of sepsis: the scientific rationale*. J Thorac Dis, 2020. **12**(Suppl 1): p. S54-S65.
103. von Gall, C., D.R. Weaver, J. Moek, A. Jilg, J.H. Stehle, and H.W. Korf, *Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1040**: p. 508-11.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lara-Marie Scherfig, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Expression von Clock Genes bei kritisch kranken Patienten mit septischem Schock / Expression of clock genes in critically ill patients with septic shock“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ganz herzlichen Dank gilt vor allem meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Gunnar Lachmann, der mir jederzeit helfend zur Seite stand und immer für mich ansprechbar war. Vielen Dank für die stetige Motivation, Kritik und Kommentare. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Frau Univ.- Prof. Dr. med. Claudia Spies möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung der Studie und für die Zurverfügungstellung der Ressourcen danken.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Bharath Ananthasubramaniam für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Für die Unterstützung bezüglich der Messungen im Labor bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. medic. Clarissa von Haefen und Birgit Brand. Vielen Dank für die Einweisung und kontinuierliche Hilfe.

Ganz besonders möchte ich auch Herrn Dr. med. Anton Goldmann danken, der zu Beginn der Studie die Betreuung übernahm. Vielen Dank für die Organisation, Unterstützung und die Betreuung meiner Hausarbeit.

Ich möchte auch sehr den Doktoranden Viktor Wunsch, Anna Marie Theiß und Felix Siegmeier für die gemeinsamen Messungen und Datenerhebung danken.

Danke an meine Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, den Rückhalt und die aufbauenden Worte während der Promotion und dem Medizinstudium.