

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

DISSERTATION

Einfluss der monozytären HLA-DR-Expression auf
Clock Genes bei Patienten mit septischem Schock

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Viktor Alexander Wünsch

aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

Teilergebnisse dieser Promotion wurden vor Abschluss des Promotionsverfahrens in folgender Originalarbeit zur Veröffentlichung akzeptiert:

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“

Zur Veröffentlichung akzeptiert im März 2021 beim Journal „Annals of Intensive Care“

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	9
1. Einleitung	11
1.1 Sepsis	11
1.1.1 Epidemiologie und Inzidenz	13
1.1.2 Pathogenese und Einfluss auf das Immunsystem	14
1.2 HLA-DR-Expression auf Monozyten	17
1.3 Clock Genes	18
1.3.1 Period-circadian-regulator-gene 1&2 (PER1/2)	20
1.3.2 Cryptochrome-gene 1&2 (CRY1/2)	20
1.3.3 NR1D1	20
1.3.4 NR1D2	20
1.3.5 DBP	21
1.3.6 BHLHE40	21
1.3.7 CIPC	21
1.3.8 CSNK1D	21
1.3.9 CSNK1E	22
1.3.10 NFIL3	22
1.4 Einfluss von Clock Genes auf die Immunfunktion	22
1.5 Aktuelle Datenlage zur zirkadianen Rhythmik bei kritisch kranken Patienten	23
1.6 Fragestellung	23
2. Methoden	25
2.1 Studiendesign	25
2.2 Studienlokalisierung und Patientenkollektiv	25
2.3 Ein- und Ausschlusskriterien	26
2.4 Datenerfassung	27
2.5 Messung von Clock Genes	27

2.6 Analyse der Clock Genes-Rhythmik	29
2.7 Rhythmizitätsscore	30
2.8 Messung von mHLA-DR	31
2.9 Messung der Körperkerntemperatur	31
2.10 Endpunkte	31
2.11 Statistische Analyse	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Studienpopulation	33
3.2 Clock Genes-Expression und Rhythmizitätsscores	36
3.3 Einfluss der mHLA-DR-Expression auf den Rhythmizitätsscore S_P	37
3.4 Einfluss der mHLA-DR-Expression auf den Rhythmizitätsscore S_G	37
3.5 Zusammenhang zwischen Temperatur und Rhythmik	39
4. Diskussion	40
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse	40
4.2 Zirkadiane Rhythmik und mHLA-DR	40
4.3 Clock Genes und das Immunsystem	42
4.4 Zirkadiane Rhythmik und Sepsis	45
4.5 Einfluss von mHLA-DR auf die Körperkerntemperatur	46
4.6 Limitationen	47
4.7 Perspektiven	48
Eidesstattliche Versicherung	59
Lebenslauf	61
Danksagung	62

Gender-Hinweis: Allein aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung männlicher, weiblicher und weiterer Sprachformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten für alle Geschlechterformen. Dies impliziert keinesfalls eine Benachteiligung der jeweils anderen Geschlechter, sondern ist als geschlechtsneutral zu verstehen.

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i>	Kriterien des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), modifiziert nach Singer 2016 (1)	10
<i>Abbildung 2:</i>	Sepsis-3 Definition nach Singer 2016 (1)	11
<i>Abbildung 3:</i>	Entwicklung der Sepsisdefinitionen nach Bone 1992 und Singer 2016, modifiziert nach Weis 2017 (1,5,7)	12
<i>Abbildung 4:</i>	Immunreaktionen im Verlauf einer Sepsis, modifiziert nach Cao 2019 (18)	14
<i>Abbildung 5:</i>	Organversagen in einer schweren Sepsis mit endothelialer und mitochondrialer Dysfunktion, reproduziert mit Genehmigung von Angus 2013 (4), Copyright Massachusetts Medical Society	15
<i>Abbildung 6:</i>	Zugrundeliegende Feedback-Schleifen in der menschlichen zellulären Uhr, modifiziert nach Albrecht 2003 (32)	18
<i>Abbildung 7:</i>	Studienverlauf	27
<i>Abbildung 8:</i>	Gemessene Clock Genes	28
<i>Abbildung 9:</i>	Einschlussbaum	32
<i>Abbildung 10:</i>	Quantifizierung der Rhythmizität von Clock Genes in Patienten mit septischen Schock, modifiziert nach Lachmann (76)	35
<i>Abbildung 11:</i>	Rhythmizitätsscores S_P abhängig von der mHLA-DR-Expression	36
<i>Abbildung 12:</i>	Körperkerntemperatur der Patienten	38

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	Basisdaten der Studienpopulation erhoben zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zur Clock Genes Messung	33
<i>Tabelle 2:</i>	Rhythmizitätsscores S_G aller Patienten pro Gen	37

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BMI	Body Mass Index
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CCI	Charlson Comorbidity Index
CD14	Cluster of differentiation 14
CI	Konfidenzintervall
CRY	Cryptochrome
CSNK1D	Casein kinase I isoform delta
CSNK1E	Casein kinase I isoform epsilon
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DBP	D-site of albumin promoter binding protein
DIC	Disseminated intravascular coagulation
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
mHLA-DR	monozytäres Humanes Leukozyten Antigen D-related
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
LOD	Logistic Organ Dysfunction Score
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexes
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer
PACU	Post Anaesthesia Care Unit
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PER	Period circadian protein

PRR	Pattern recognition receptor
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment
SAPS II	Simplified Acute Physiologic Score II
SCN	Suprachiasmatischer Nukleus
S _G	Rhythmizitätsscore pro Gen
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
S _P	Rhythmizitätsscore pro Patient
TISS-28	Therapeutic Intervention Scoring System-28
TNF	Tumornekrosefaktor

Zusammenfassung

Hintergrund: Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie von Sepsis und septischem Schock stagniert deren Letalität auf einem konstant hohen Niveau. Aktuelle Forschungsergebnisse legen einen zirkadianen Einfluss auf die Aktivität von Immunzellen nahe. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von monozytärer HLA-DR-Expression auf die Expression von Clock Genes bei Patienten mit septischem Schock untersucht.

Methoden: In dieser Subgruppenanalyse einer prospektiven, nicht-interventionellen klinischen Pilotstudie an der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurden 20 Patienten mit septischem Schock zwischen 2014 und 2018 eingeschlossen, denen über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden Blut zur Messung der Clock Genes abgenommen wurde. Es wurde ein Rhythmitätsscore pro Patient (S_P) und Gen (S_G) errechnet. Zusätzlich wurden die monozytären HLA-DR-Werte mit den Rhythmitätsscores S_P und S_G korreliert.

Ergebnisse: Von 20 eingeschlossenen Patienten mit septischem Schock wurden drei Patienten wegen unzureichender Expression von mindestens acht Clock Genes exkludiert. Bei 14 der 17 Patienten wurde eine mHLA-DR-Expression gemessen. Diese wurden in Gruppen ohne schwere Immunparalyse (mHLA-DR \geq 5 000 AG/Zelle, $n = 9$) und mit schwerer Immunparalyse (mHLA-DR $<$ 5 000 AG/Zelle, $n = 5$) eingeteilt. 76 % der gemessenen Gene zeigten einen uneindeutigen Rhythmus. Der errechnete mediane Rhythmitätsscore S_P lag bei 0,09 [Quartilen 0,00–0,20]. Die mediane mHLA-DR-Expression lag bei 5 632 AG/Zelle [Quartilen 3 322–10 192]. Es ließ sich keine Korrelation zwischen S_P und dem mHLA-DR-Wert zeigen. Die Summe der Rhythmitätsscores S_G zeigte einen signifikanten Unterschied ($p = 0,034$) zwischen Patienten ohne schwere und mit schwerer Immunparalyse.

Schlussfolgerung: Es gibt einen Zusammenhang zwischen Immunparalyse und der Expression von Clock Genes in Patienten mit septischem Schock. Es bedarf weiterer Studien, um das Ausmaß und die Wechselwirkung von Immunparalyse und veränderter zirkadianer Rhythmik zu untersuchen.

Abstract

Background: The mortality of sepsis and septic shock stagnates on a high level despite huge progresses in understanding its pathophysiology. Recent results of scientific research suggest a circadian impact on the activity of immune cells. In this study, the influence of monocyte HLA-DR expression on the expression of clock genes in patients with septic shock was investigated.

Methods: In this subgroup analysis of a prospective, non-interventional clinical pilot study at the Charité – University Hospital Berlin 20 patients with septic shock were included between 2014 and 2018, to whom every 4 hours blood was drawn to measure the clock gene expression for 24 hours. A rhythmicity score per patient (S_P) und per gene (S_G) was calculated. Additionally, mHLA-DR expression was correlated with the rhythmicity scores S_P and S_G .

Results: Of 20 patients with septic shock, 3 were excluded for not having sufficient expression in at least 8 clock genes. The mHLA-DR expression was measured in 14 of the 17 patients. They were divided in groups without severe immune paralysis (mHLA-DR $\geq 5\,000$ AG/cell, $n = 9$) and with severe immune paralysis (mHLA-DR $< 5\,000$ AG/cell, $n = 5$). 76 % of the measured genes showed an inconclusive rhythm. The calculated rhythmicity score S_P was 0.09 [quartiles 0.00–0.20]. The median mHLA-DR expression was 5 632 AG/cell [quartiles 3 322–10 192]. No correlation between S_P and mHLA-DR was detected. The sum of rhythmicity scores S_G showed a significant difference between patients with and without immune paralysis ($p = 0.034$).

Conclusion: There is an association between immune paralysis and clock gene expression in patients with septic shock. Further studies are needed to investigate the extent and interaction of immune paralysis and circadian rhythmicity.

1. Einleitung

1.1 Sepsis

„Sepsis, ein Syndrom physiologischer, pathologischer und biochemischer Abnormalitäten, induziert durch eine Infektion, ist eine bedeutende Sorge des Gesundheitswesens [...]“ (1: S. 802) (Übersetzung durch den Autor) – So beginnt „The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock“, in der 2016 die dritte Konsensuskonferenz die Definitionen für Sepsis und septischen Schock überarbeitet hat (1).

Vor gut zweitausend Jahren schrieb schon Hippokrates über Sepsis (σηψις), ein Phänomen von faulendem Fleisch und eiternden Wunden, das auch damals die Menschen sorgte (2). Erst nachdem Robert Koch die Bakterien als krankheitsursächlich beschrieben hatte, wurde Sepsis als systemische Infektion begriffen (3). Häufig als „Blutvergiftung“ bezeichnet, vermutete man die Invasion pathogener Organismen, die sich im Blut vermehrten, in den Körper. Doch mit dem Aufkommen moderner Antibiotikatherapien konnten die bestehenden Theorien über die Pathogenese die Letalität der Sepsis nicht mehr erklären: Trotz erfolgreicher Eradikation der verantwortlichen Erreger starben viele Patienten. Es wurde gefolgert, dass der Wirt und sein Immunsystem ursächlich für die Schwere der Erkrankung seien (4). 1992 beschäftigte sich erstmalig ein internationales Konsensusgremium mit der Definition von Sepsis und beschrieb diese als systemische inflammatorische Antwort auf eine Infektion (Sepsis-1) (5). Kamen zu dieser Erkrankung Komplikationen wie akutes Organversagen hinzu, wurde der Begriff „severe sepsis“ verwendet. Als septischer Schock wurde Sepsis mit flüssigkeitsrefraktärer Hypotonie oder mit Hyperlaktatämie definiert. Zur Diagnosestellung einer Sepsis mussten mindestens zwei von vier Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)-Kriterien erfüllt sein, ein Infektionsnachweis musste jedoch nicht erbracht werden (Abbildung 1) (5).

SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)

Mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C
- Herzfrequenz > 90/min
- Atemfrequenz > 20/min oder $\text{paCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Leukozytenzahl > 12.000/mm³ oder < 4000/mm³

Abbildung 1: Kriterien des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS),
modifiziert nach Singer 2016 (1)

2003 kam ein zweites Gremium zu dem Schluss, dass Zeichen von systemischer Inflammation wie Tachykardie oder Leukozytose bei vielen Patienten zu beobachten und daher nicht Sepsis-spezifisch sind (6). Die grundlegenden Konzepte wurden bestätigt und um mögliche Symptome und Laborparameter erweitert. Doch trotz der intensiven Bemühungen, eine schnelle Diagnostik und frühe, zielführende Therapien zu entwickeln, führten die bestehenden Kriterien zu keiner Verbesserung der Prognose. In neueren Studien wurde den induzierten Gewebeschäden immer mehr Bedeutung zugemessen (7).

Aus diesem Paradigmenwechsel heraus versammelten sich unter Singer und Deutschmann Spezialisten verschiedener Disziplinen, um in der dritten Konsensuskonferenz über die Definitionen von Sepsis und septischem Schock zu diskutieren. Eingeflossen sind Erkenntnisse zum zellulären Metabolismus und zur Unzulänglichkeit der SIRS-Kriterien. Die Sepsis-3 Definition ist die erste empirische und evidenzbasierte Beschreibung von Sepsis und wurde 2016 im Journal of the American Medical Association veröffentlicht (Abbildung 2) (1).

- Sepsis-3 Definition**

 - lebensbedrohliches Organversagen, verursacht durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion
 - SOFA-Score
 - zur Identifizierung von Organversagen (SOFA > 2 Punkte)
 - qSOFA
 - zur Identifizierung von Patienten mit vermuteter Infektion, die das Risiko eines längeren Intensivaufenthaltes haben oder im Krankenhaus sterben könnten
 - Septischer Schock definiert als:
 - Sepsis inklusive
 - Vasopressortherapie zur Gewährleistung eines MAP > 65 mmHg
 - und*
 - Serumlaktat > 2 mmol/L trotz adäquater Volumentherapie

Abbildung 2: Sepsis-3 Definition nach Singer 2016 (1)

(MAP: Mittlerer arterieller Druck; (q)SOFA: (quick) Sequential Organ Failure Assessment)

Was Sepsis – eine Antwort auf ein infektiöses Pathogen verstärkt durch endogene Faktoren – von einer Infektion unterscheidet, ist die dysregulierte Immunantwort und ein bestehendes Organversagen (Abbildung 3). Zudem schränken zelluläre und metabolische Dysfunktionen das Parenchym funktionell ein.

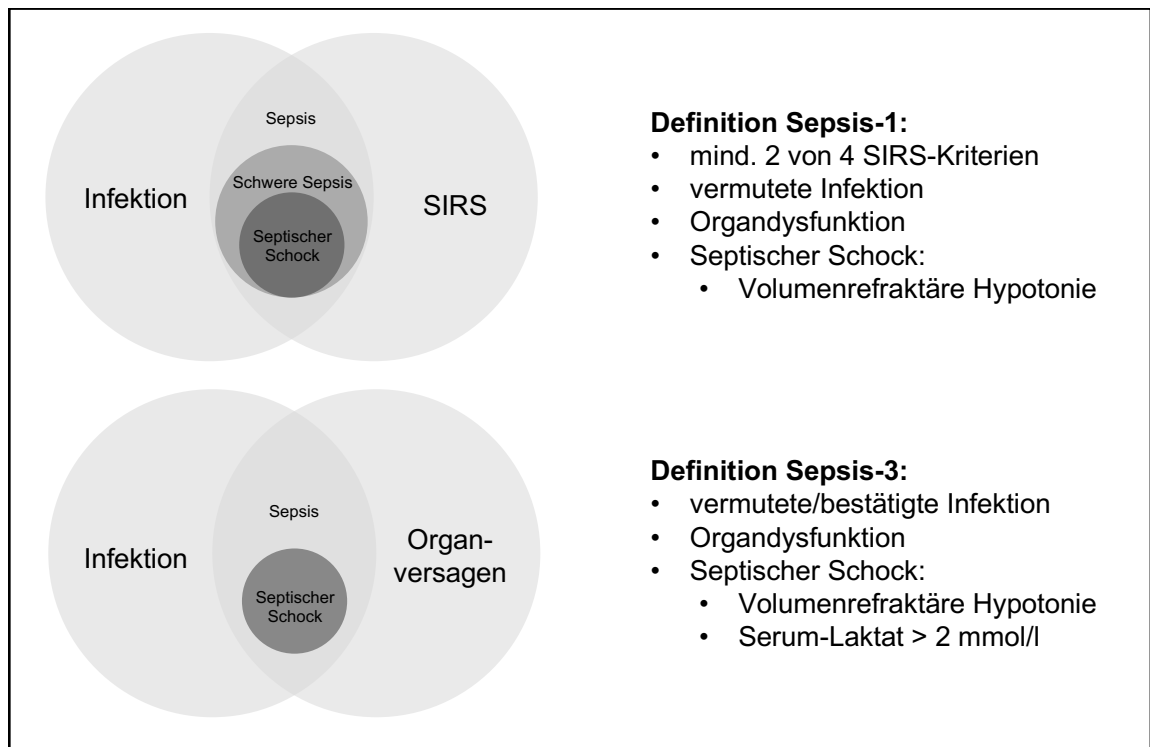


Abbildung 3: Entwicklung der Sepsisdefinitionen nach Bone 1992 und Singer 2016, modifiziert nach Weis 2017 (1,5,7)

1.1.1 Epidemiologie und Inzidenz

Ungeachtet der medizinischen Fortschritte in den letzten Jahren gehören Sepsis und septischer Schock weiterhin zu den häufigsten Erkrankungen auf Intensivstationen weltweit. Die absoluten Zahlen liegen bei 48,9 Millionen Sepsisfällen im Jahr 2017 und jährlich etwa 19 Millionen Fällen von schwerer Sepsis weltweit (8–10). Die Inzidenz von Sepsis wird auf 288 pro 100 000 Personenjahre und von schwerer Sepsis auf 148 pro 100 000 Personenjahre geschätzt (8). Laut Kompetenz-Netzwerk Sepsis (SepNet) liegt nach der Sepsisdefinition Sepsis-1 die kalkulierte Inzidenz von schwerer Sepsis und von septischem Schock bei 11,64 pro 1 000 Intensivstationstagen (11). 2015 wurde in Deutschland bei 320 198 Patienten eine Sepsis und bei 136 542 Patienten eine schwere Sepsis diagnostiziert (12). Dabei lag die Krankenhausletalität bei 23,1 % respektive 41,2 % (12). Die Letalität weltweit wird je nach Sepsisdefinition und Region zwischen 20–40 % angegeben (4,11,12), was zu 5,3–11 Millionen Todesfällen jährlich führt (8,10). Die große Varianz der Zahlen lässt sich auf die unterschiedlichen Definitionen und Codierungen von Sepsis und septischem Schock sowie auf die ungleiche weltweite Verfügbarkeit der intensivmedizinischen Behandlung zurückführen.

Zusätzlich zur ethischen Motivation, die Sepsisinzidenz zu senken, spielen auch ökonomische Faktoren eine Rolle. Sepsis stellt eine hohe finanzielle Belastung für die Gesundheitssysteme dar. Pro Patient entstehen Kosten von 40.000–100.000 US-Dollar (13), was sich in den USA im Jahre 2011 auf Behandlungskosten von mehr als 20 Milliarden US-Dollar summiert hat (1,10). In Deutschland werden jährlich etwa acht Milliarden Euro für die Behandlung von Sepsispatienten ausgegeben (12).

1.1.2 Pathogenese und Einfluss auf das Immunsystem

Die Immunantwort des Körpers auf einen Erreger hängt vom ursächlichen Pathogen sowie von wirtsspezifischen Faktoren ab. Dazu zählen einerseits die Pathogenmenge und deren Virulenz, andererseits genetische Charakteristika, Risikofaktoren und vorbestehende Erkrankungen (4).

Typischerweise dringt ein bakterielles Pathogen in den Körper ein, woraufhin Zellen der angeborene Immunantwort über Pattern Recognition Receptors (PRR) mit Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) oder von verletzten Zellen ausgeschütteten Molekülen (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) interagieren und eine Immunantwort initiieren (14). Dabei schütten Immunzellen eine Vielzahl proinflammatorischer (u. a. Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukine, Interferon (IFN)- γ) und antiinflammatorischer Zytokine (u. a. Interleukin-10) aus, die Leukozyten und andere Immunzellen rekrutieren (15). Die resultierende Immunreaktion beinhaltet Phagozytose, hepatische Synthese von Akut-Phase-Proteinen sowie Chemotaxis von Leukozyten zum Infektionsort und Aktivierung des Gerinnungssystems (15). Das Gleichgewicht aus proinflammatorischer und antiinflammatorischer Reaktion reguliert die Immunantwort und führt dazu, dass nach erfolgreicher Pathogenelimination die Homöostase wiederhergestellt wird und das Gewebe regenerieren kann (16).

Bei einer Sepsis übersteigt die proinflammatorische Reaktion auf ein Pathogen die lokalen Gewebsgrenzen und führt somit zu einer generalisierten Immunantwort, die in der Sepsis in zwei Phasen unterteilt werden kann, die in jedem Sepsispatienten zu finden sind – die hyperinflammatorische und die immunsuppressive Phase (Abbildung 4) (17).

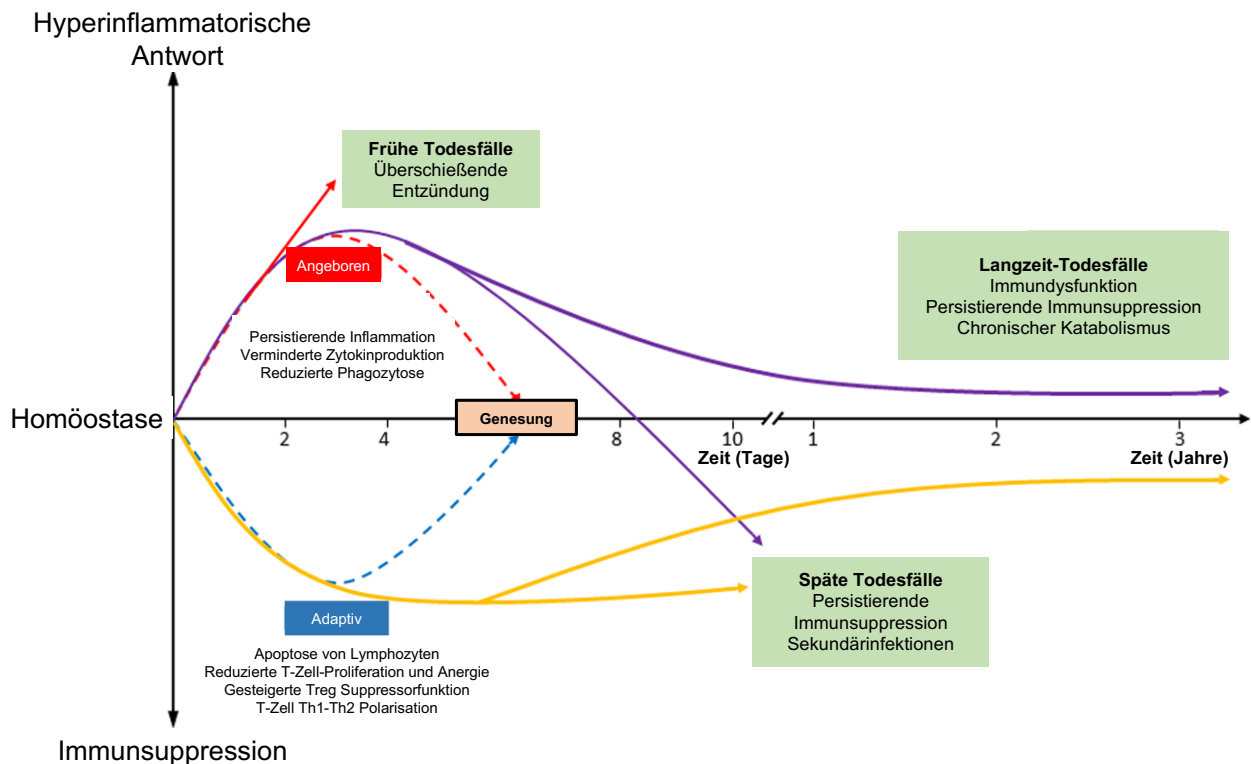


Abbildung 4: Immunreaktionen im Verlauf einer Sepsis, modifiziert nach Cao 2019 (18)

Häufig präsentieren sich septische Patienten mit Fieber, Schock und respiratorischem Versagen, hervorgerufen durch die zu Beginn vorherrschende hyperinflammatorische Immunantwort. Große Mengen an Zytokinen, vor allem $\text{TNF-}\alpha$ und Interleukin- 1β ($\text{IL-1}\beta$) werden freigesetzt und rufen neben obigen Symptomen eine Leukozytose und Aktivierung der Blutgerinnung hervor (15). Dass $\text{TNF-}\alpha$ eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielt, ist in zahlreichen Studien belegt worden (15,19). Es zeigten sich unter anderem erhöhte $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentrationen in Sepsispatienten (20), was sich durch Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion von Makrophagen erklären lässt (21). Die überschießende Immunantwort führt sukzessive zu Gewebeschäden und Organversagen, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig erschlossen ist. Eine mögliche Erklärung bietet folgende Kaskade (Abbildung 5) (4): Gesteigerte intravasale Gerinnung (Disseminated intravascular coagulation, DIC) und verminderte Antikoagulation sind ursächlich für Thrombosen. Hinzukommende inflammatorische Vasodilatation, erhöhte Gefäßdurchlässigkeit (capillary leak) und Ödembildung im Gewebe führen zu einer Gewebsminderperfusion. Zusätzlich verlieren Gewebe durch Apoptose der Gefäßwände ihre Barrierefunktion. Diese Faktoren führen zur verminderten Oxygenierung des Gewebes und schlussendlich

zum Organversagen (4). Die Konstanz der hyperinflammatorischen Phase hängt entscheidend von Faktoren wie Komorbiditäten, Ernährungsstatus und Virulenz der Erreger ab (17).

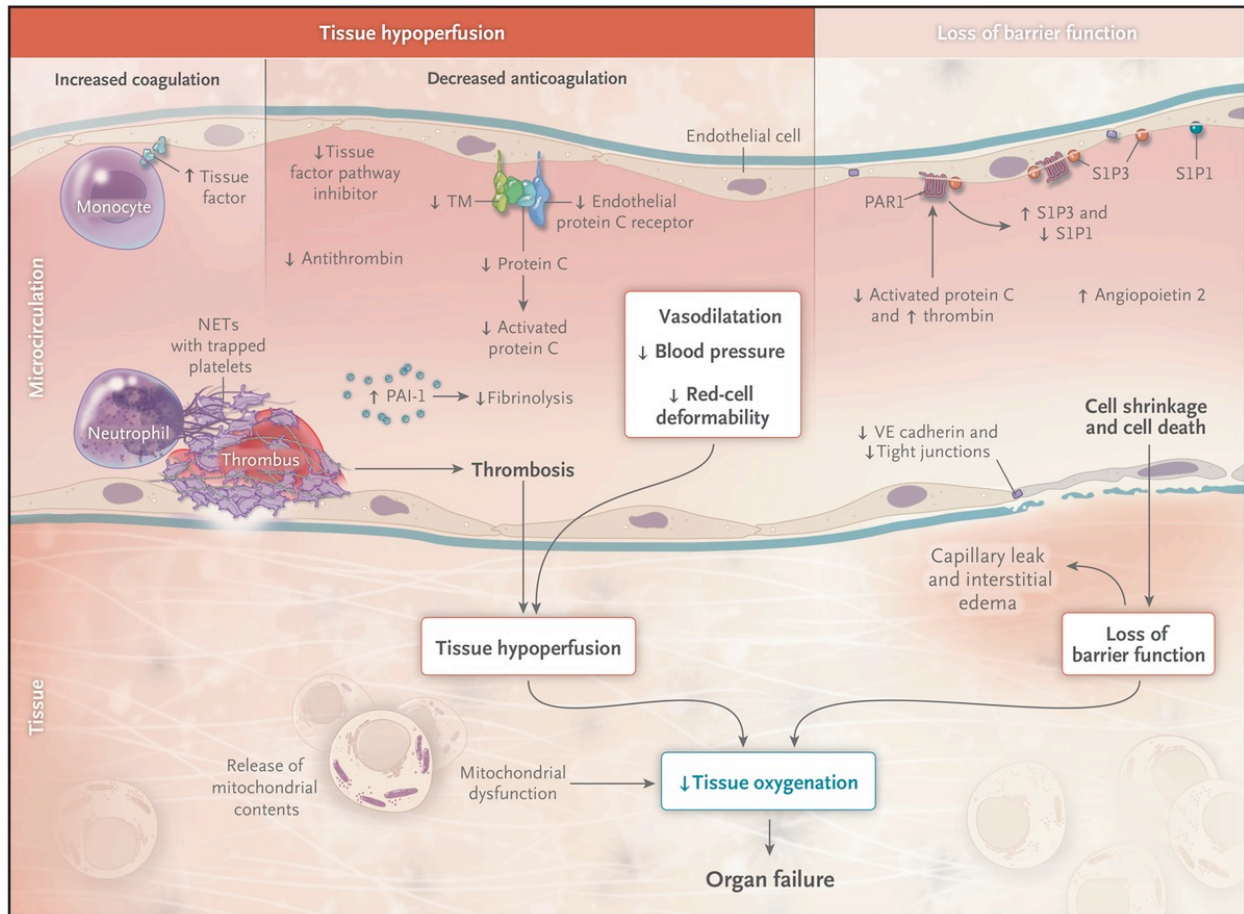


Abbildung 5: Organversagen in einer schweren Sepsis mit endothelialer und mitochondrialer Dysfunktion, reproduziert mit Genehmigung von Angus 2013 (4), Copyright Massachusetts Medical Society.

Parallel findet die immunsuppressive Reaktion statt, auch compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) genannt, mit der ursprünglichen Aufgabe, lokale und systemische Schäden zu limitieren (4). Viele Mechanismen sind für die Immunsuppression verantwortlich (15). Dazu gehören die Apoptose von T-, B- und Dendritischen Zellen und eine zelluläre Erschöpfung, ein Phänomen, das auch bei chronischen viralen Infektionen wie dem Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) oder Hepatitis C beobachtet werden konnte (15). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Splenozyten und Monozyten von Sepsispatienten signifikant weniger proinflammatorische Zytokine sezernieren (17,22). Jedoch ist ihre Fähigkeit, antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 auszuschütten, uneingeschränkt oder erhöht

(17,22). Der durch Hyperinflammation vorgeschädigte Körper kann folglich nur eingeschränkt auf das Primärpathogen reagieren und ist ebenso deutlich anfälliger für opportunistische Infektionen, was die hohe Letalität von Sepsis und septischem Schock erklärt.

1.2 HLA-DR-Expression auf Monozyten

Humane Leukozytenantigene (HLA) sind eine Gruppe von Genen, die Teil des Haupthistokompatibilitätskomplexes-II (MHC-II) sind (23). Aufgabe des MHC-II-Antigenkomplexes ist es, kurze Polypeptid-Sequenzen, die von den Antigenpräsentierenden Zellen (APC) nach Phago- oder Endozytose prozessiert wurden, auf den APC-Oberflächen CD4-positiven T-Zellen zu präsentieren, um eine Immunantwort zu initiieren (24). HLA-D-related (DR) stellt dabei einen spezifischen Isotypen dar.

Etliche Studien konnten zeigen, dass die Expression von HLA-DR auf zirkulierenden Monozyten bei kritisch Kranken und vor allem Patienten mit Sepsis vermindert ist (15,25,26). Sowohl Trimmel et al. als auch Drewry et al. stellten eine signifikant höhere HLA-DR-Expression bei überlebenden Sepsispatienten fest im Vergleich zur Gruppe der Verstorbenen (13,27). Le Tulzo et al. konnten eine Korrelation der HLA-DR-Level mit Severity Scores (Simplified Acute Physiologic Score II (SAPS II), Logistic Organ Dysfunction Score (LOD)) und hohen Kortisolwerten nachweisen (28). Zurückzuführen sind diese Ergebnisse auf eine Endotoxintoleranz von Monozyten und Makrophagen, die neben der reduzierten HLA-DR-Expression auch in einem Anstieg der Sekretion von antiinflammatorischem IL-10 resultiert, was zur Immunsuppression führen kann (29). Es gibt Hinweise dafür, dass IL-10 für die Reendozytose von HLA-DR-Molekülen verantwortlich ist, und somit die HLA-DR-Moleküle ihrer Funktion nicht mehr nachkommen können (30). Beides ist für die Patienten mit einem schlechteren Outcome, gesteigertem Risiko für nosokomiale Infektionen und erhöhter Letalität verbunden (17). Vor allem in der immunsuppressiven Phase korreliert die Expression von HLA-DR mit der Sepsisletalität (31).

1.3 Clock Genes

Die zirkadiane Rhythmik (aus dem Lateinischen *circa diem*) beschreibt eine nahezu 24 Stunden lange Periode, die – von internen und externen Informationen beeinflusst – durch das zirkadiane System generiert wird (32). Dieses System setzt sich aus einem zentralen Schrittmacher, molekularen Prozessen, den Augen und der Epiphyse sowie neuralen und humoralen Einflüssen zusammen.

Eine kleine hypothalamische Region, der Suprachiasmatische Nucleus (SCN), wurde in Säugetieren als Hauptzeitgeber identifiziert (33). Der SCN integriert Helligkeitsinformationen der Retina in zirkadiane Rhythmen, mit denen physiologische und metabolische Prozesse reguliert werden (34). Mittels Temperaturänderungen, sympathischen und parasympathischen sowie hormonellen Signalen steuert der SCN die peripheren Oszillationen in den unterschiedlichen Geweben. Der fundamentale Mechanismus des zirkadianen Systems beruht auf molekularen Transkriptions-Translations-Feedback-Schleifen, beinhaltet Clock Genes und ist hoch konserviert im SCN und peripheren Zellen (35). Erstmals in den 1980er Jahren konnten diese Gene in der Fruchtfliege *Drosophila* nachgewiesen werden, woraus geschlossen werden konnte, dass intrazelluläre Mechanismen für zirkadiane Rhythmen verantwortlich sein müssen (36,37).

Die Hauptkomponenten der molekularen zirkadianen Rhythmik sind die Gene *CLOCK* und *BMAL1* (auch als *ARNTL* bezeichnet) als aktivierende sowie *PER* und *CRY* als inhibierende Regulatoren. Sie codieren jeweils für die Proteine CLOCK, BMAL1 (bzw. ARNTL), PER und CRY (Gene in kursiver, Proteine in recter Schreibweise). Die zugrundeliegende Feedback-Schleife ist in der folgenden Grafik vereinfacht dargestellt (32):

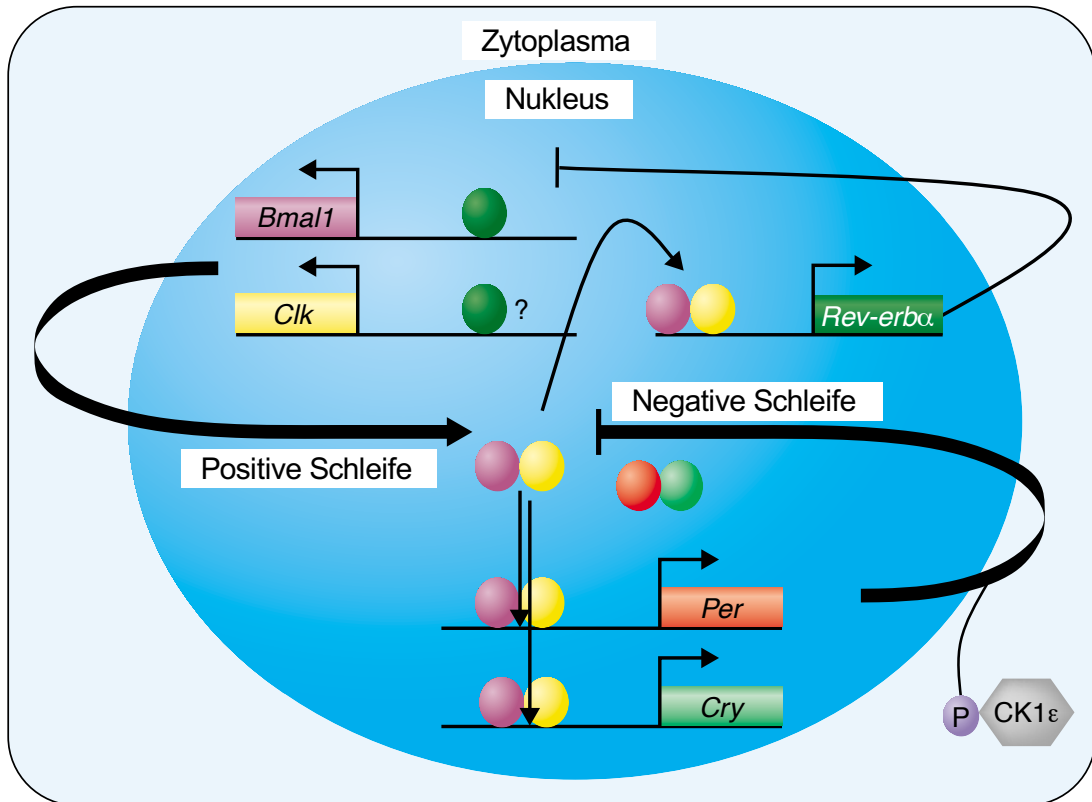


Abbildung 6: Zugrundeliegende Feedback-Schleifen in der menschlichen zellulären Uhr, modifiziert nach Albrecht 2003 (32)

CLOCK und BMAL1 bilden im Zytoplasma ein Heterodimer und wandern in den Nukleus, wo sie die Transkription von unterschiedlichen Zielgenen aktivieren (38). Dazu gehören Gene der molekularen Uhr (*PER*, *CRY*, *Rev-Erb-α*), aber auch zirkadian kontrollierte Gene, die im Zellzyklus oder Metabolismus wirken (38).

Die negative Schleife entsteht durch die Heterodimerisierung von PER und CRY im Zytoplasma, die ebenfalls in den Nukleus wandern, um ihre eigene Transkription durch Inhibition von *CLOCK* und *BMAL1* zu supprimieren (38). Zeitgleich hemmt das Protein Rev-Erb- α die BMAL1-Transkription, indem es sich an die Promotorregion anlegt (38). In der Konsequenz fällt die BMAL1-Konzentration, während die von PER und CRY ansteigt (38). PER/CRY-Heterodimere hemmen durch Bindung an CLOCK/BMAL1 nicht nur die eigene Transkription, sondern auch die von Rev-Erb- α , sodass in Folge die Transkription von BMAL1 wieder aktiviert werden kann (38).

Zu den in der klinischen Forschung bisher relevantesten Clock Genes gehören neben *CLOCK* und *BMAL1* folgende:

1.3.1 *Period-circadian-regulator-gene 1&2 (PER1/2)*

PER1 codiert für das Period-circadian-regulator-homolog-1 Protein (PER1), *PER2* analog dazu für das Period-circadian-regulator-homolog-2 Protein (PER2). Diese werden hauptsächlich im SCN, aber auch in peripheren Geweben exprimiert. Sie sind zentraler Bestandteil der zirkadianen Feedbackschleife, indem sie als Inhibitoren von CLOCK und BMAL1 die positive Rückkopplung unterbrechen (39).

Ein verbreiteter Polymorphismus nahe *PER1* ist mit dem Todeszeitpunkt von Menschen assoziiert (40). Dieser Polymorphismus ist bei Patienten, die am Tage verstorben sind, mit der *PER1*-Expression assoziiert, bei Patienten, die nachts verstarben, nicht. Ebenso wurde nachgewiesen, dass eine Herunterregulierung von *PER1* in Tumorzellen zu gesteigertem Tumorwachstum *in vivo* durch eine Steigerung der zirkadianen Amplitude auf zwei Tagesspitzen führt (41). Im Gegensatz dazu hat PER1 zu bestimmten Tageszeiten auch tumorsupprimierende Funktionen (41).

1.3.2 *Cryptochrome-gene 1&2 (CRY1/2)*

Die Gene *CRY1* und *CRY2* codieren für die Proteine Cryptochrome-1 (CRY1) und Cryptochrome-2 (CRY2). Diese binden mit PER1/2, dringen in den Nucleus ein und inhibieren die durch CLOCK/BMAL1 aktivierte Transkription. Ko et al. zeigten, dass es bei Gendefekten im *CRY1*- oder *CRY2*-Gen zu veränderten Schlafmustern beim Menschen kommt (42).

1.3.3 *NR1D1*

Das *NR1D1*-Gen codiert für den nukleären Rezeptor Rev-ErbA- α , der unter anderem in der Leber, im Fettgewebe, im Muskel und Gehirn exprimiert wird. Rev-ErbA- α reguliert als Gegenspieler vom RAR-related-orphan-rezeptor ROR α die Expression von BMAL1 und verbindet die zellulären Timer mit der angeborenen Immunantwort (43). Es unterdrückt unter anderem die IL-6 und Toll-like-Rezeptor-4-Expression in Makrophagen (44). Außerdem vermittelt das Protein multiple zelluläre metabolische Pfade, die unter anderem den hepatischen Lipidmetabolismus und die Glukosehomöostase beeinflussen (43,45).

1.3.4 *NR1D2*

Der nukleäre Rezeptor Rev-ErbA- β wird vom *NR1D2*-Gen codiert. Seine Rolle ähnelt der des Rev-ErbA- α -Proteins, wobei die genaue Funktion im Rahmen der zirkadianen

Rhythmik bislang noch wenig untersucht ist. Bekannt ist, dass eine doppelte Depletion von Rev-ErbA- α und - β in Doppel-Knockout-Mäusen die zirkadiane Rhythmik tiefgreifend stört (46). Im Skelettmuskel dient Rev-ErbA- β der Kontrolle des Lipid- und Energiestoffwechsels (47).

1.3.5 DBP

Das *DBP*-Gen codiert für das Albumin-site-D-binding-Protein (DBP), das als aktivierender Transkriptionsfaktor in der Promotorregion von *PER1* agiert und primär im SCN exprimiert wird (48). Es wird durch CLOCK/BMAL1 aktiviert und von PER und CRY durch negative Rückkopplung inhibiert (48).

1.3.6 BHLHE40

Das Gen Basic-Helix-Loop-Helix-Family Member E40 (*BHLHE40*) codiert für das Protein BHLHE40, das mit BMAL1 interagiert bzw. an der Enhancer-Box mit PER1 kompetitiert, um die *PER1*-Aktivierung durch CLOCK/BMAL1 zu unterbinden (49). Es beeinflusst außerdem die Zytokinproduktion und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese autoimmuner Neuroinflammation (49).

1.3.7 CIPC

Das Gen *CIPC* codiert für den CLOCK-interacting pacemaker (CIPC), der als negativer Feedbackregulator von CLOCK/BMAL1 fungiert und möglicherweise die BMAL1-abhängige Phosphorylierung von CLOCK stimuliert. CIPC scheint für eine funktionale zirkadiane Rhythmik nicht notwendig zu sein, sodass weitere Funktionen wie zum Beispiel als Regulator im Zellzyklus diskutiert werden (50).

1.3.8 CSNK1D

Das Gen *CSNK1D* codiert für das Protein Casein kinase I isoform delta (CSNK1D). Dieses inhibiert im Nucleus die durch CLOCK/BMAL1-aktivierte Transkription, indem es deren Bindung zur DNA vermindert (51). Außerdem phosphoryliert es PER1/2-Proteine und führt zu deren Degradation (52). Somit spielt es eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung eines 24-Stunden-Rhythmus (53).

1.3.9 CSNK1E

Das Gen *CSNK1E* codiert für das Protein Casein kinase I isoform epsilon (CSNK1E) und phosphoryliert ebenso wie CSNK1D PER1/2-Proteine (46,47). Studien zeigten Assoziationen von CSNK1E mit psychiatrischen Erkrankungen wie z. B. bipolaren Störungen und Schizophrenie (55,56).

1.3.10 NFIL3

Das Gen *NFIL3* codiert für das Protein Nuclear factor interleukin 3 regulated (NFIL3), auch E4BP4 genannt, und vermindert unter anderem als negativer Transkriptionsfaktor die Expression von PER1 und PER2 (57). Die Expression von NFIL3 wird durch den Transkriptionsfaktor Rev-ErbA- α vermindert (58).

1.4 Einfluss von Clock Genes auf die Immunfunktion

In der Pathologie vieler Erkrankungen lassen sich zirkadiane Rhythmen erkennen. Lebensstile, die die innere Uhr unterbrechen, sind mit einem erhöhten Risiko für onkologische, metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (59,60). Neben Myokardinfarkten und Asthmaanfällen zeigen vor allem inflammatorische Erkrankungen eine starke Tag-Nacht-Varianz (33,61). Ursächlich dafür könnte die zirkadian oszillierende Freisetzung von hämatopoetischen Stammzellen und Progenitorzellen aus dem Knochenmark und damit zusammenhängend die schwankende Anzahl an Leukozyten im Blut sein (62). Aber auch die phagozytische Funktion von Makrophagen und deren Zytokinexpression unterliegt einer zirkadianen Varianz (63). Sie erreicht während der Lichtperiode ein Maximum und in Dunkelheit ein Minimum (63).

Bellet et al. konnten nachweisen, dass der Zeitpunkt einer Infektion Einfluss auf die inflammatorische Antwort hat (64). Mäuse wurden zu zwei Tageszeiten mit *Salmonella enterica* infiziert und zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion eingeschläfert, um Blut-, Gewebe und mikrobiologische Proben zu entnehmen. Dabei konnten sie in der Gruppe mit früher Infektion (10:00 Uhr) eine höhere Kolonisation mit Salmonellen und eine stärkere proinflammatorische Antwort feststellen als in der Gruppe mit später Infektion (22:00 Uhr). Dies spricht dafür, dass eine funktionierende zirkadiane Rhythmik für die optimale inflammatorische Reaktion des Körpers auf ein Pathogen notwendig ist. Diese These unterstützt auch eine Studie von Deng et al., in der Mäuse mit dezimierter BMAL1-Expression ein höheres Risiko für das Versterben aufgrund einer Sepsis aufwiesen (65). BMAL1 vermittelte zirkadiane Oszillationen sind verantwortlich für

den Laktatstoffwechsel, der indirekt das Überleben von T-Zellen mitbeeinflusst (65). Ebenso ist bekannt, dass ein unterbrochener Schlaf-Wach-Rhythmus bzw. eine dauerhafte Wachheit die angeborene Immunantwort verändert bzw. dysreguliert (60,66). Diese Studienergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Clock Genes immunologische Checkpoints und Pfade beeinflussen und somit einen potenziellen Ansatz für therapeutische Maßnahmen bieten.

1.5 Aktuelle Datenlage zur zirkadianen Rhythmik bei kritisch kranken Patienten

Neben unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich auch Coiffard et al. mit der Expression von Clock Genes bei kritisch erkrankten Patienten (67). Sie zeigten, dass Traumapatienten eine gestörte Rhythmik der Cortisol-, Zytokin- und Clock Genes-Expression aufweisen und eine frühe zirkadiane Unterbrechung mit dem Auftreten von Sepsis assoziiert war (67). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe von Acuna-Fernandez et al., die eine Beziehung zwischen der Clock Genes-Expression, Immunantwort und oxidativem Stress bei Sepsispatienten untersuchte (68). Sie konnten nachweisen, dass einerseits die Rhythmik im Vergleich zu nicht-septischen Patienten gedämpft, andererseits jedoch die angeborene Immunantwort und die Reaktion auf oxidativen Stress erhöht war (68). Diaz et al. schreiben, dass bei Patienten einer neurologischen Intensivstation die am Tag der Aufnahme vorhandene zirkadiane Rhythmik nach einer Woche Aufenthalt nicht mehr nachweisbar war (69). Ein wesentlicher klinischer Parameter, der durch zirkadiane Rhythmik gesteuert und beeinflusst wird ist die Körperkerntemperatur (33). Eine Veränderung von deren Tagesverlauf gilt bei Trauma- und Sepsispatienten als Risikofaktor für ein schlechteres Outcome (70,71).

1.6 Fragestellung

Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten große Fortschritte im Verständnis zur Pathophysiologie der Sepsis erzielt werden konnten, befindet sich deren Letalität weiterhin auf einem konstant hohen Niveau. Zugleich haben in den letzten Jahren zahlreiche Studien gezeigt, dass Immunzellen einer zirkadianen Rhythmik unterliegen, die von Clock Genes gesteuert werden.

Aus dem Bestreben heraus, innovative Ansätze zum Verständnis und zur Therapie des septischen Schocks zu entwickeln, wurde 2014 die Pilotstudie „CLOCK Genes in Patients with Refractory Septic Shock“ (SeptiClock) initiiert. Hierbei sollte primär der

Zusammenhang von zirkadianer Rhythmik und septischer Immunsuppression erforscht werden. Da lange bekannt ist, dass bei septischen Patienten die Expression von monozytärem HLA-DR als Marker für Immunkompetenz vermindert ist, ergibt sich für diese sekundäre Analyse folgende Fragestellung:

Gibt es einen Einfluss der monozytären HLA-DR-Expression auf die Expression von Clock Genes bei Patienten mit septischem Schock?

Die Primärhypothese lautet, dass bei Patienten mit septischen Schock und mit verminderter mHLA-DR-Expression die zirkadiane Rhythmik aufgehoben ist.

2. Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie ist eine Subgruppenanalyse der prospektiven, nicht-interventionellen klinischen Pilotstudie „SeptiClock“, die an der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Zeitraum von April 2014 bis Januar 2018 Patienten eingeschlossen hat. Die Studie wurde der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter dem Aktenzeichen EA1/288/13 vorgelegt und genehmigt. Die Registrierung erfolgte bei ClinicalTrials.gov unter dem Zeichen NCT02044575.

Die Studienpopulation wurde in Patienten ohne schwere bzw. mit schwerer Immunparalyse gemäß in der Literatur diskutierter Grenzwerte eingeteilt (23). Als Cut-Off-Wert wurden 5 000 AG/Zelle gewählt, was als Grenze zwischen moderater bis schwerer Immunsuppression und schwerer Immunparalyse angesehen wird (23). Mehr als 15 000 AG/Zelle gelten als Indikator für Immunkompetenz (23).

2.2 Studienlokalisierung und Patientenkollektiv

Für SeptiClock wurden Patienten auf drei anästhesiologischen und zwei chirurgischen Intensivstationen gescreent: Auf den zwei Intensivstationen der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin (CCM/CVK) 8i, 14i und der Post Anaesthesia Care Unit (PACU) werden Patienten mit allgemein-postoperativem Schwerpunkt behandelt, wobei die Station 8i ein überregionales Referenzzentrum für das Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) und die Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) ist und die Station 14i vor allem auf neurologische und neurochirurgische Patienten fokussiert ist. Auf den chirurgischen Intensivstationen 9i und 21i werden Patienten nach viszeralchirurgischen Eingriffen und Organtransplantationen betreut. Alle Patienten erhielten eine Therapie nach aktuellen Leitlinien und internen Standard Operating Procedures (72). Lichtquellen in den Patientenzimmern wurden gemäß internen Standards nach Einbruch der Dunkelheit außer für erforderliche Notfallmaßnahmen ausgeschaltet.

2.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Von den oben genannten Intensivstationen wurden 20 Patienten nach folgenden Kriterien eingeschlossen:

Einschlusskriterien:

- Männliche und weibliche Patienten ab dem vollendeten 18. Lebensjahr
- Patient in intensivmedizinischer Behandlung
- Septischer Schock
 - Noradrenalin-Dosis $\geq 0,3 \mu\text{g/kg/min}$ für mind. zwei Stunden

Ausschlusskriterien:

- Schwangere oder stillende Frauen
- Akute Leukämie
- Schwere Leukozytose ($> 50\,000/\text{nl}$)
- Schwere Thrombozytopenie ($< 5\,000/\text{nl}$)
- Autoimmunerkrankung mit systemischer Gabe von $> 10 \text{ mg}$ Prednisolon oder Äquivalent pro Tag
- Zustand nach Transplantation
- Patienten unter Interferontherapie (in den letzten 14 Tagen)
- Anhaltende Chemo- oder Radiotherapie wegen maligner Erkrankung
- Akute Lungenembolie oder akuter Myokardinfarkt in den letzten 72 Stunden
- Cardiopulmonale Reanimation in den letzten sieben Tagen
- Sterbender Patient (Lebenserwartung < 72 Stunden)
- Bekannte HIV-Infektion oder chronische virale Hepatitis
- Bestehende Do-Not-Resuscitate oder Do-Not-Intubate Anweisung
- Teilnahme an einer anderen Studie (ab 30 Tage vor Einschlussdatum)
- Fehlende Bereitschaft, Daten für die Studie zu speichern oder auszuhändigen
- Unterbringung in einer Einrichtung durch offizielle oder gerichtliche Anweisung
- Die informierte Einwilligung des Patienten oder seines gesetzlichen Betreuers kann nicht rechtzeitig eingeholt werden.
- Patient hat eine Vollmacht oder Verfügung, in der er ablehnt an einer Studie teilzunehmen.

2.4 Datenerfassung

Nicht unmittelbar personenbezogene Patientendaten zum Screening und zur statistischen Erfassung wurden dem zentralen Datenverarbeitungssystem (SAP, Walldorf, Deutschland) und dem intensivmedizinischen Patientendaten-Management-System (COPRA System GmbH, Sasbachwalden, Deutschland) entnommen.

Es wurden regelmäßig die genannten Intensivstationen nach geeigneten Patienten gescreent. Patienten, die den Einschlusskriterien entsprachen, wurden in einer Screeningliste protokolliert und nach etwaigen Ausschlusskriterien überprüft. Sobald eine Einwilligung der Patienten oder eines gesetzlichen Betreuers zur Studienteilnahme vorlag, wurde dem Patienten ein Pseudonym zugeteilt und dieses zusammen mit den Personalien in die Patientenidentifikationsliste eingetragen. Alle folgenden Proben und Messungen wurden pseudonymisiert gekennzeichnet. Die Patientenidentifikationsliste ist nur autorisiertem Studienpersonal zugänglich.

2.5 Messung von Clock Genes

Als Quelle für exprimierte Clock Genes wurden CD14-positive Monozyten aus peripherem Blut ausgewählt, da Blut im klinischen Alltag leicht entnommen werden kann und nachgewiesen ist, dass Monozyten eine hochamplitudige zirkadiane Rhythmik aufweisen (35).

Blutentnahme: Den Patienten wurden über einen liegenden arteriellen Zugang 5 ml EDTA-Vollblut und 5 ml Serum-Vollblut entnommen und umgehend auf Eis lagernd ins Labor transportiert. Gemäß Studienprotokoll wurden die Blutentnahmen um 8:00 Uhr morgens begonnen und alle vier Stunden über 24 Stunden durchgeführt, was pro Patient sieben Messzeitpunkte ergab (Abbildung 7).

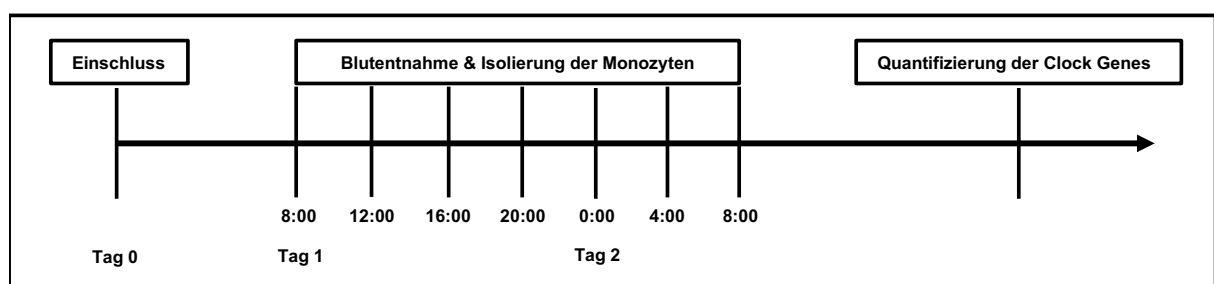


Abbildung 7: Studienverlauf

Serum-Rückstellprobe: Das Serumröhrchen wurde zentrifugiert, das Blutserum in ein 1 ml Eppendorfgefäß umgefüllt und bei -80 °C konserviert.

Monozyten- und RNA-Isolierung: Die CD14-positiven Monozyten wurden aus dem EDTA-Röhrchen mittels Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) isoliert. Dazu wurde ein Auto-MACS Pro Separator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) mit dazugehörigen whole-blood CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Der Vorgang wurde streng nach Protokoll des Herstellers bei 4 °C durchgeführt. Nach vorsichtiger Abzentrifugation der isolierten Monozyten aus dem Rest des Spülpuffers wurden diese umgehend bei -80 °C gelagert. Nach dem vollständigen Aufbereiten aller Proben wurden diese in das Labor der AG Achim Kramer transportiert, wo die RNA mittels TRIzol Reagenz (Thermo Fisher Scientific) isoliert wurde. Unter Verwendung des NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) und des Qubit RNA BR Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) wurden die RNA-Proben auf Qualität und Quantität überprüft.

Gen-Messung: Um 20 Clock Genes (Abbildung 8) und vier Housekeeping Genes (*GAPDH*, *HPRT1*, *PPIA*, *PSMB2*) zu bestimmen, wurde ein 24-plex NanoString Panel entworfen. Für jedes Ziel-Gen wurden eine 3'-biotinylierte Nachweissonde sowie eine 5'-fluoreszierende Reportersonde entworfen. Die Hybridisierung der Sonden und der 100–500 ng monozytären RNA wurde strikt nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Weiterverarbeitung der Expressionsrohdaten wurde der NanoString nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies, Seattle, Washington, USA) verwendet. Die Normalisierung wurde in drei Schritten, die vom Hersteller des NanostringQCPro vorgegeben wurden, durchgeführt. Ein Gen in einer Probe wurde dann als exprimiert klassifiziert, sofern die Expressionsrohdaten dreifach größer als das geometrische Mittel der Negativkontrollen für diese Probe waren. Darauf erfolgte eine technische Normalisierung der Rohexpressionsdaten durch die positiven Spike-in-Kontrollen. Zuletzt wurde das geometrische Mittel der vier Housekeeping Genes zur Normalisierung der Expression aller Proben verwendet, gefolgt von der Kalibrierung der Nanostring-Sonden über die Multiplex-Proben hinweg gemäß der „Gene Expression Data Analysis Guidelines“ (Nanostring Technologies, Seattle, Washington, USA). Für alle weiteren Analysen wurden die Daten gemäß Nanostring Analyseleitfaden binär logarithmisch transformiert.

Gen-Analyse: In die Auswertung wurden die Messdaten aller Patienten aufgenommen, bei denen mindestens acht Gene in ausreichender Zahl an mindestens sechs Messzeitpunkten exprimiert wurden. Dabei wurden nur Gene in die Analyse aufgenommen, die bei mindestens sechs Patienten gefunden wurden (Abbildung 8). Die Gene *ARNTL* und *ARNTL2* entsprechen den in der Literatur geläufigeren Bezeichnungen *BMAL1* bzw. *BMAL2*.

ARNTL (=BMAL1)	CSNK1E
ARNTL2 (=BMAL2)	DBP
<i>BHLHE40</i>	NFIL3
BHLHE41	<i>NPAS2</i>
<i>CIART</i>	NR1D1
CIPC	NR1D2
CLOCK	PER1
CRY1	PER2
CRY2	<i>PER3</i>
CSNK1D	<i>RORA</i>

Abbildung 8: Gemessene Clock Genes (hervorgehoben: in die Auswertung aufgenommene Gene)

2.6 Analyse der Clock Genes-Rhythmik

Um einen Zusammenhang von mHLA-DR-Expression und zirkadianer Rhythmik herstellen zu können, mussten zunächst die Expressionsmuster der Clock Genes auf rhythmische Oszillationen untersucht werden. Hierfür wurde eine harmonische Regressionsanalyse mit einer festen Oszillationsperiode von 24 Stunden durchgeführt. Um die Amplituden der zirkadianen Rhythmen zu beschreiben, wurden Konfidenzintervalle anstelle von einzelnen Amplituden genutzt. Das Konfidenzintervall (CI) steht für die Bandbreite der zirkadianen Amplituden der Genexpression, die konsistent zu der Messung auf dem 95 %-Level mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ sind. Die Amplitude wurde als x-fache Änderung der Expression zwischen dem Hoch- und Tiefpunkt des Rhythmus definiert.

Nur Rhythmen mit einer ausreichend weiten Amplitude gelten als biologisch relevant (73). Diese Amplitude sollte größer als das 1,4-fache bzw. das 0,5-fache bei binär logarithmischen Skalen sein, was als Schwellenwert definiert wurde (73). Unter Berücksichtigung dieser Schwellenwerte wurden drei Kategorien von Clock Genes definiert:

- Clock Genes mit CI, das komplett über dem Schwellenwert liegt, haben einen biologisch relevanten Rhythmus mit einem angepassten p-Wert von $\leq 0,05$ (74)
- Clock Genes mit CI, das komplett unter dem Schwellenwert liegt, haben keinen relevanten Rhythmus mit einem angepassten p-Wert von $\leq 0,05$ (74)
- Clock Genes mit CI, das um den Schwellenwert herum liegt, gelten als uneindeutig

Um das Konfidenzintervall der Amplituden der Genexpression für jedes Gen und jeden Probanden zu berechnen, wurden folgende Rechnungen durchgeführt: Unter Verwendung der *lm* Funktion wurde eine harmonische Regression der Daten mit der Funktion $m + b_1 \cos\left(2\pi \frac{t}{24}\right) + b_2 \sin\left(2\pi \frac{t}{24}\right)$ für die beste Anpassung und die Residuen durchzuführen. Dabei stehen m für die mittlere Genexpression, t für den Messzeitpunkt und b für Koeffizienten der Sinusfunktion. Durch Hinzufügen der besten Anpassung der ermittelten Residuen (mit Zurücklegen) wurden Bootstrapdaten generiert (75). Die Regression der harmonischen Funktion auf die Bootstrapdaten ergab eine Bootstrapschätzung der Amplitude ($A = \sqrt{b_1^2 + b_2^2}$). 3 999 Bootstrapwiederholungen wurden mittels R-package „boot“ (Version 1.3-24) durchgeführt. Das 95%-Konfidenzintervall für die Amplitude wurde aus der Verteilung der Bootstrapschätzungen nach der Bonferroni-Korrektur berechnet, um Mehrfachtests innerhalb jedes Patienten zu berücksichtigen. Die Korrektur für multiples Testen verbreiterte die Konfidenzintervalle. Die Berechnung der Clock Genes-Rhythmik wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Bharath Ananthasubramaniam, PhD vom Institut für Theoretische Biologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt (76).

2.7 Rhythmizitätsscore

Um die Expressionsmuster der unterschiedlichen Gene in einem Patienten besser beurteilen zu können, wurde ein Rhythmizitätsscore S_P definiert. Dieser Score ist definiert als $S_P = \frac{N_{rhy} - N_{arrhy}}{N_{genes}}$. Des Weiteren wurde ein Rhythmizitätsscore S_G für die Rhythmik einzelner Gene in allen Patienten entwickelt. Dieser Score ist definiert als $S_G = \frac{N_{rhy} - N_{arrhy}}{N_{patients}}$.

Der jeweilige Score hat den Wert 1, sofern alle Gene rhythmisch sind. Bei einem Wert von -1 sind alle Gene arrhythmisch. Werte um 0 gelten demnach als uneindeutig.

2.8 Messung von mHLA-DR

Die mHLA-DR-Expression wurde im Rahmen der klinischen Routine bestimmt. Das entnommene Blut wurde direkt in das hauseigene Labor (Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, Berlin, Deutschland) transportiert, wo mittels Durchflusszytometrie die mHLA-DR-Antigenmenge pro Zelle gemessen wurde.

2.9 Messung der Körperkerntemperatur

Die Körperkerntemperatur wurde mittels vesikaler Temperatursonde am einliegenden Blasenkatheter gemessen. Die Temperaturdaten wurden für den Zeitraum der Probenentnahmen stündlich erfasst. In der Analyse wird die Differenz zwischen niedrigster und höchster Körperkerntemperatur innerhalb des Beobachtungszeitraumes als Amplitude bezeichnet. Die Temperaturverlaufskurven wurden visuell auf vorhandene Rhythmik untersucht (77,78).

2.10 Endpunkte

Primärer Endpunkt:

Vergleich der Rhythmizität der Clock Genes zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse

Sekundäre Endpunkte:

Zusammenhänge abhängig vom Vorhandensein einer schweren Immunparalyse:

- Rhythmizitätsscores S_G
- Verlauf der Körperkerntemperatur

2.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mittels IBM SPSS Statistics 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und R statistical software (Version 3.6.2) durchgeführt.

Stetige Variablen wurden aufgrund der geringen Studienpopulation als Median und Quartilen dargestellt. Der Vergleich der Basisdaten ebenso wie alle weiteren nicht-parametrischen Testungen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test und bei kategorialen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt. Die Korrelation zwischen absoluten mHLA-DR-Werten und dem Rhythmizitätsscore S_P wurde nach Spearman-Rho berechnet. Danach wurden die Rhythmizitätsscores S_P abhängig von einer bestehenden schweren Immunparalyse errechnet und verglichen. Weiterhin

wurden die Rhythmisitätsscores S_G aller Patienten bzw. abhängig von einer bestehenden schweren Immunparalyse berechnet. Es folgte die nicht-parametrische Testung der Summen der Rhythmisitätsscores S_G zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse sowie der einzelnen Rhythmisitätsscores S_G untereinander. In die letztere Analyse wurden nur Gene aufgenommen werden, die in beiden Patientengruppen jeweils mindestens einmal als rhythmisch oder arrhythmisch klassifiziert wurden. Uneindeutig Expressierungen wurden hierbei nicht berücksichtigt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde bei der Bestimmung der Signifikanz als statistisch signifikant angenommen und der statistische Basiswert des Konfidenzintervalls war 95%. Sämtliche p-Werte haben explorativen Charakter und erlauben keine konfirmatorische Verallgemeinerung. Es wurde nicht für multiples Testen adjustiert.

Eine statistische Beratung erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Sophie Piper aus dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

3. Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Während des Studienzeitraumes wurden insgesamt 112 Patienten (68 männlich (60,7 %), Alter 61 Jahre [50–72 Jahre]) mit einer Noradrenalin dosierung von $\geq 0,3 \mu\text{g/kg/min}$ für mindestens zwei Stunden gesichtet, von denen fünf nicht das Einschlusskriterium des septischen Schocks erfüllten (Abbildung 9). 87 Patienten erfüllten weitere Ausschlusskriterien. Insgesamt wurden 20 Patienten (11 männliche und 9 weibliche) mit einem septischen Schock in die Studie eingeschlossen. Drei Patienten mussten wegen einer nicht ausreichenden Menge an auswertbaren Clock Genes ausgeschlossen werden. Bei weiteren drei Patienten lag keine mHLA-DR-Messung vor. Insgesamt wurden Daten von 14 Patienten in der Studie ausgewertet, deren Basisdaten in Tabelle 1 dargestellt sind.

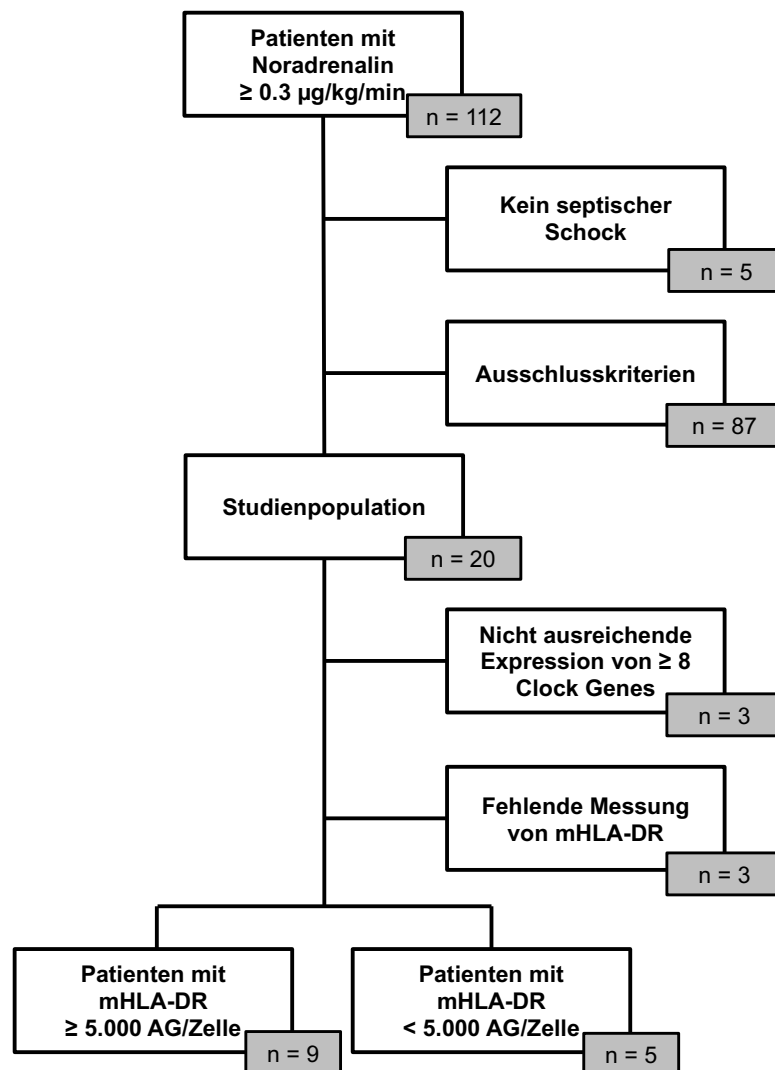


Abbildung 9: Einschlussbaum

Die Studienpopulation bestand zu 71,4 % aus männlichen Patienten. Das mediane Alter betrug 66 Jahre [54–74 Jahre]. Die mediane Noradrenalin-dosis betrug zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme 0,24 µg/kg/min [0,13–0,45 µg/kg/min]. 78,6 % der Patienten waren analgosediert, drei (21,4 %) erhielten eine ECMO-Therapie. Alle Patienten wurden maschinell beatmet. Im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes verstarben fünf Patienten (35,7 %).

Zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich demografischer Daten, klinischer Scores, Blut- oder Outcomeparametern. Jedoch ergab sich eine Tendenz zu höheren Thrombozyten bei Patienten ohne schwere Immunparalyse ($p = 0,053$).

Tabelle 1: Basisdaten der Studienpopulation erhoben zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zur Clock Genes Messung

Parameter	Gesamtpopulation (n = 14)	Patienten ohne schwere Immunparalyse (n = 9)	Patienten mit schwerer Immunparalyse (n = 5)	p-Wert
Alter (Jahre)	66 [54-74]	66 [55-74]	66 [51-71]	0,789 ¹
Männliches Geschlecht, n (%)	10 (71,4%)	6 (66,7%)	4 (80,0%)	0,597 ²
BMI (kg/m ²)	29,4 [23,6-34,8]	32,5 [25,7-40,5]	23,8 [20,7-29,9]	0,142 ¹
TISS-28	42 [37-51]	40 [36-44]	49 [38-58]	0,316 ¹
CCI	6 [5-8]	6 [4-8]	6 [5-10]	0,686 ¹
SOFA	16 [12-17]	15 [12-17]	17 [12-19]	0,418 ¹
SAPS II	70 [54-82]	69 [53-76]	80 [49-90]	0,423 ¹
Hämoglobin (g/dl)	8,85 [7,88-10,10]	9,10 [8,20-11,20]	8,40 [7,75-9,20]	0,142 ¹
Leukozyten (/nl)	15,12 [7,12-18,72]	14,75 [7,04-20,90]	15,48 [8,36-20,69]	0,947 ¹
Thrombozyten (/nl)	102,5 [66,5-171,0]	113,0 [99,5-229,5]	68,0 [51,0-122,0]	0,053 ¹
INR	1,36 [1,27-1,50]	1,40 [1,29-1,54]	1,30 [1,20-1,59]	0,422 ¹
PTT (s)	50,3 [36,4-58,2]	52,0 [36,2-63,7]	48,6 [38,1-58,6]	1,000 ¹
Laktat (mg/dl)	15,5 [12,8-42,3]	18,0 [13,0-42,5]	15,0 [8,5-41,5]	0,463 ¹

Fortsetzung Tabelle 2

Parameter	Gesamtpopulation (n = 14)	Patienten ohne schwere Immunparalyse (n = 9)	Patienten mit schwerer Immunparalyse (n = 5)	p-Wert
Noradrenalin (µg/kg/min)	0,24 [0,13-0,45]	0,25 [0,17-0,37]	0,18 [0,07-0,52]	0,548 ¹
mHLA-DR (AG/Zelle)	5632 [3322-10192]	7049 [5632-20554]	2987 [2073-3508]	0,003 ¹
Tage zwischen mHLA-DR-Wert und 1. Messzeitpunkt	-0,5 [-3,3-0,3]	-1,0 [-2,5-0,5]	0,0 [-11,0-0,5]	0,787 ¹
Körperkerntemperatur* (°C)	37,5 [36,4-37,9]	37,5 [36,4-37,9]	37,7 [36,5-37,9]	0,947 ¹
Körperkerntemperatur Amplitude (°C)	1,2 [0,9-1,6]	1,1 [0,9-1,7]	1,3 [1,0-1,7]	0,946 ¹
Analgosedierung, n (%)	11 (78,6%)	6 (66,7%)	5 (100,0%)	0,145 ²
Dialyse, n (%)	13 (92,9%)	9 (100,0%)	4 (80,0%)	0,164 ²
ECMO, n (%)	3 (21,4%)	1 (11,1%)	2 (40,0%)	0,207 ²
Maschinelle Beatmung, n (%)	14 (100%)	9 (100%)	5 (100%)	1,000 ²
Dauer maschineller Beatmung (h)	473,0 [295,0-949,5]	826,0 [185,5-952,0]	471,0 [353,0-744,5]	0,947 ¹
Dauer des Aufenthaltes auf Intensivstation (d)	30,0 [13,25-40,25]	35,0 [9,0-40,5]	25,0 [17,5-43,5]	0,689 ¹
Dauer des Aufenthaltes im Krankenhaus (d)	30,0 [13,25-41,75]	35,0 [9,0-40,5]	25,0 [17,5-58,0]	0,549 ¹
Verstorben, n (%)	5 (35,7)	3 (33,3)	2 (40)	0,803 ²

(alle stetigen Variablen als Median und 25.-75. Quartile, Unterschiede zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse getestet mittels Mann-Whitney-U-Test (1) bzw. Chi-Quadrat-Test (2);
* Körperkerntemperatur im Median über 24 Stunden)

3.2 Clock Genes-Expression und Rhythmitätsscores

Von 20 gemessenen Clock Genes wurden 15 in die Auswertung aufgenommen, da fünf Clock Genes nicht ausreichend exprimiert wurden (Abbildung 8). Nach der Kategorisierung der Genexpression in rhythmisch, arrhythmisch und uneindeutig zeigt sich ein gemischtes Bild für die Clock Genes (Abbildung 10). Einige Patienten wiesen starke Rhythmen (CI über dem 1,4-fachen der Amplitude, siehe 2.6) in mehreren Genen auf. Bei einer Vielzahl der Gene zeigten sich eher arrhythmische oder uneindeutige Expressionen. 76 % der gemessenen Gene zeigten einen uneindeutigen Rhythmus. Der errechnete mediane Rhythmitätsscore S_P lag bei 0,09 [0,00–0,20]. Durch die breite Streuung der Scores und die Häufung um den Wert 0 konnte bei den meisten Patienten keine eindeutige Rhythmik nachgewiesen werden.

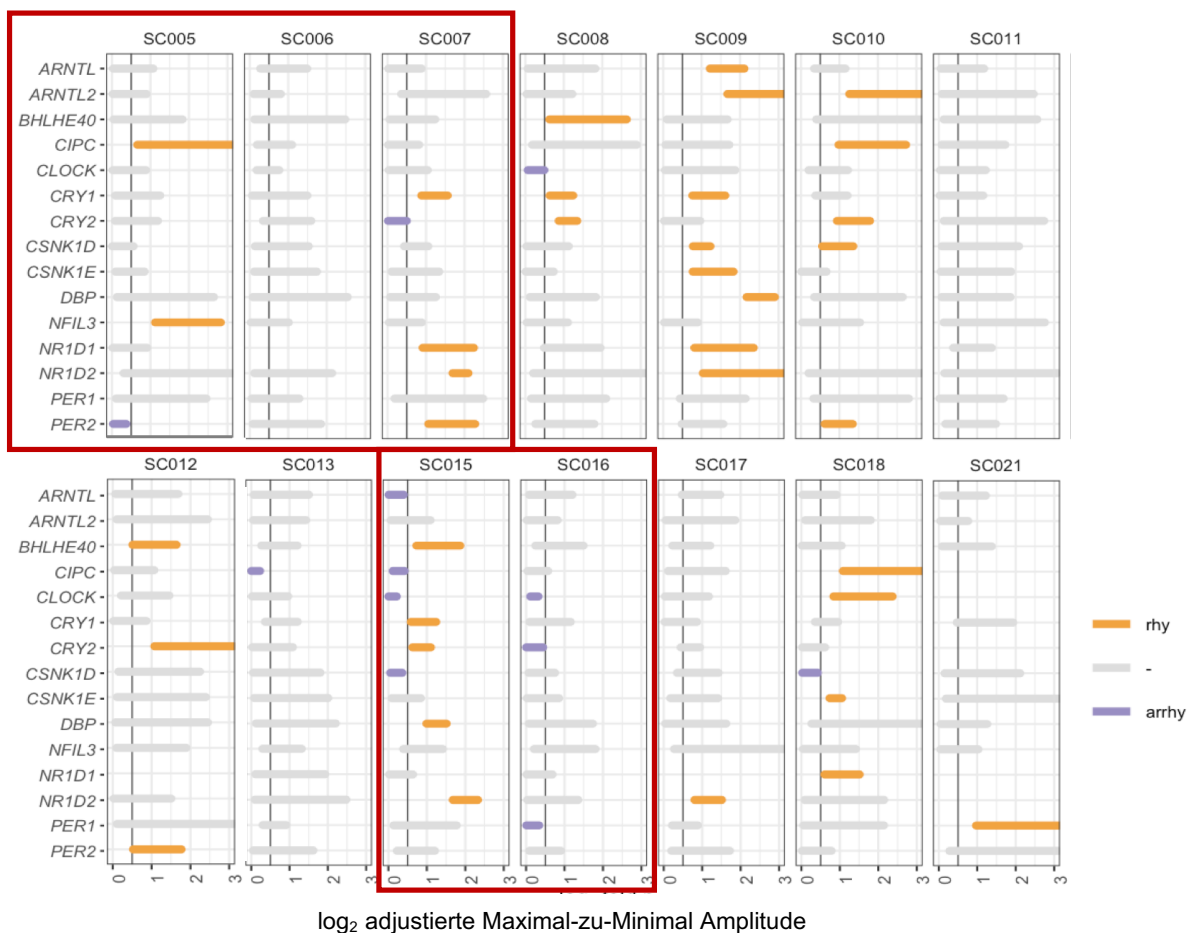


Abbildung 10: Quantifizierung der Rhythmität von Clock Genes in Patienten mit septischen Schock, modifiziert nach Lachmann (76) (Waagerechte Balken: CI der Rhythmik-Amplituden der Genexpression, Rhythmus vorhanden (orange), abwesend (violett), Daten uneindeutig (grau); vertikale Linien: minimale biologisch relevante Amplitude; Balken fehlen bei Clock Genes, die nicht analysiert wurden (siehe 2.5); Rote Umrandung: Patienten mit schwerer Immunparalyse; ohne Umrandung: Patienten ohne schwere Immunparalyse)

3.3 Einfluss der mHLA-DR-Expression auf den Rhythmitätsscore S_P

Die mediane mHLA-DR-Expression lag bei 5 632 AG/Zelle [3 322–10 192], wobei der Wert im Median 0,5 Tage vor der ersten Probenentnahme [3,3 Tage vor bis 0,3 Tage nach] erhoben wurde (Tabelle 1).

Es wurden die Rhythmitätsscores S_P der 14 Patienten mit den absoluten mHLA-DR-Werten korreliert. Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,440 ($p = 0,116$) ließ sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Rhythmik der Clock Genes-Expression und der mHLA-DR-Expression nachweisen.

Der mediane Rhythmitätsscore S_P lag bei Patienten ohne schwere Immunparalyse bei 0,20 [0,04–0,29] und bei Patienten mit schwerer Immunparalyse bei 0,07 [-0,10–0,14]. Bei Patienten ohne schwere Immunparalyse wurden 77,0 % der Gene als uneindeutig klassifiziert, bei Patienten mit schwerer Immunparalyse 73,0 %. Die nicht-parametrische Testung ($p = 0,139$) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Rhythmitätsscores S_P beider Gruppen.

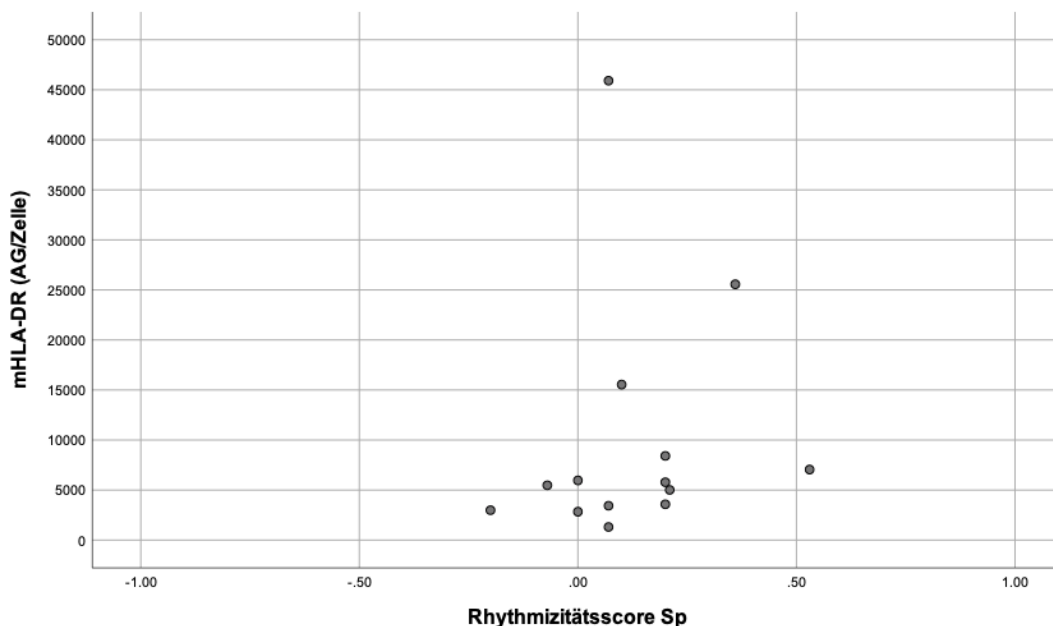


Abbildung 11: Rhythmitätsscores S_P abhängig von der mHLA-DR-Expression

3.4 Einfluss der mHLA-DR-Expression auf den Rhythmitätsscore S_G

Die Rhythmitätsscores einzelner Gene S_G aller Patienten bzw. aller Patienten mit schwerer oder ohne schwere Immunparalyse sind in Tabelle 2 dargestellt. Unter allen Patienten wiesen *CRY1* und *NR1D2* die höchste Rhythmik auf, während nur *CLOCK* arrhythmisch exprimiert wurde. Bei Patienten ohne schwere Immunparalyse waren *CRY1*

und *CRY2* am häufigsten rhythmisch exprimiert und es gab keine arrhythmischen Gene. Bei Patienten mit schwerer Immunparalyse zeigten *CRY1* und *NR1D2* die höchsten Rhythmizitätsscores S_G und *CLOCK* den niedrigsten. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Summe der Rhythmizitätsscores S_G zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse ($p = 0,034$) (Tabelle 2).

Die Unterschiede der Rhythmizitätsscores S_G zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 2). Die Gene *ARNTL2*, *CSNK1E* und *NFIL3* konnten nicht analysiert werden, da sie nicht in beiden Patientengruppen mindestens einmal als rhythmisch oder arrhythmisch klassifiziert wurden.

Tabelle 3: Rhythmizitätsscores S_G aller Patienten pro Gen

Gen	Rhythmizitätsscore S_G aller Patienten (n = 14)	Rhythmizitätsscore S_G bei Patienten ohne schwere Immunparalyse (n = 9)	Rhythmizitätsscore S_G bei Patienten mit schwerer Immunparalyse (n = 5)	Asymptotische Signifikanz (2-seitig), p-Wert
<i>ARNTL</i>	0,00	0,11	-0,20	0,317
<i>ARNTL2</i>	0,14	0,22	0,00	-
<i>BHLHE40</i>	0,21	0,22	0,20	1,00
<i>CIPC</i>	0,07	0,11	0,00	1,00
<i>CLOCK</i>	-0,14	0,00	-0,40	0,317
<i>CRY1</i>	0,36	0,33	0,40	1,00
<i>CRY2</i>	0,14	0,33	-0,20	0,114
<i>CSNK1D</i>	0,00	0,11	-0,20	0,317
<i>CSNK1E</i>	0,14	0,22	0,00	-
<i>DBP</i>	0,14	0,11	0,20	1,00
<i>NFIL3</i>	0,07	0,00	0,20	-
<i>NR1D1</i>	0,21	0,22	0,20	0,317
<i>NR1D2</i>	0,29	0,22	0,40	1,00
<i>PER1</i>	0,00	0,11	-0,20	0,317
<i>PER2</i>	0,14	0,22	0,00	0,317
Summe S_G	-	2,56	0,4	0,034

(markiert: Gene mit den höchsten bzw. niedrigsten Rhythmizitätsscores S_G ; Unterschiede zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse getestet mittels Mann-Whitney-U-Test)

3.5 Zusammenhang zwischen Temperatur und Rhythmik

In Abbildung 12 sind die Körperkerntemperaturverläufe der einzelnen Patienten über den 24-stündigen Verlauf der Probenentnahmen aufgetragen. Im Median betrug die Körperkerntemperatur 37,5 °C [36,4-37,9] mit einer Amplitude über 24 Stunden von 1,2 °C [0,9-1,6] (Tabelle 1). Bei sechs Patienten betrug die Körperkerntemperatur $\geq 38,0$ °C für mindestens zwei Stunden. Die Unterschiede der Körperkerntemperaturmediane sowie deren Amplitude zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 1).

Visuell waren keine Rhythmen im Verlauf der Körperkerntemperatur aller Patienten erkennbar. Zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse sind keine relevanten Unterschiede erkennbar.

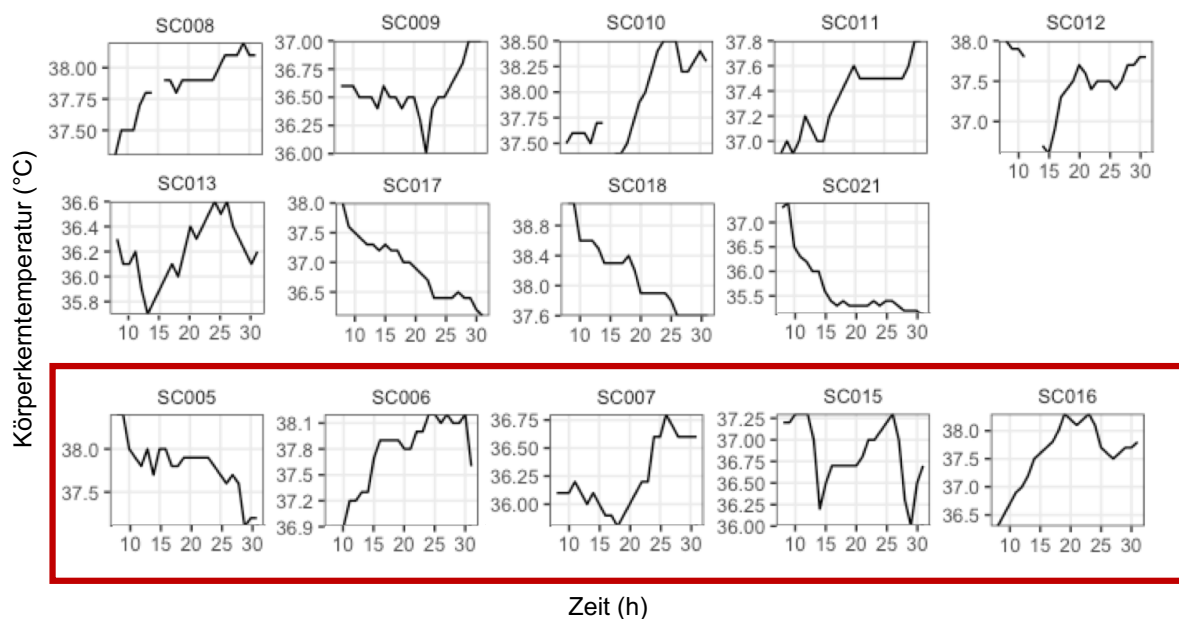


Abbildung 12: Körperkerntemperatur der Patienten (Zeitraum von 24 Stunden ab 8 Uhr, 32h entspricht 8 Uhr des Folgetages; Unterbrechungen im Kurvenverlauf entsprechen fehlenden Messwerten; rote Umrandung: Patienten mit schwerer Immunparalyse; ohne Umrandung: Patienten ohne schwere Immunparalyse)

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Primärhypothese, dass bei Patienten mit septischen Schock und mit verminderter mHLA-DR-Expression die zirkadiane Rhythmik aufgehoben ist, wurde bestätigt. Die Summe der Rhythmizitätsscores einzelner Gene S_G zeigte zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse einen signifikanten Unterschied. Bei Patienten ohne schwere Immunparalyse zeigten *CRY1* und *CRY2* die rhythmischste Expression und kein Gen wurde als arrhythmisch klassifiziert. Bei schwer immunparalysierten Patienten hingegen wurden vor allem *CRY1* und *NR1D2* rhythmisch und *CLOCK* arrhythmisch exprimiert. Die einzelnen Gene im direkten Vergleich zeigten keine signifikanten Unterschiede.

76,12 % der gemessenen Gene konnten weder als rhythmisch noch arrhythmisch klassifiziert werden und der Rhythmizitätsscore S_P lag bei 0,09, was für keine nachweisbare Rhythmik spricht. Zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse gab es diesbezüglich keinen statistisch signifikanten Unterschied. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen absolutem mHLA-DR-Wert und Rhythmizitätsscore S_P nachgewiesen werden.

Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Körperkerntemperatur und deren Amplituden. Ein typischer zirkadianer Verlauf der Körperkerntemperatur konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2 Zirkadiane Rhythmik und mHLA-DR

Nach aktuellem Stand ist dies die erste Arbeit, in der sowohl die zirkadiane Rhythmik als auch die Expression von mHLA-DR bei Sepsispatienten untersucht wurde. In der Literatur werden zahlreiche Zusammenhänge von mHLA-DR-Expression und anderen klinischen Parametern in septischen Patienten beschrieben.

Der Einfluss von Clock Genes auf die mHLA-DR-Expression wurde bisher nicht untersucht. Deshalb soll zunächst die zirkadiane Rhythmik von Monozyten beleuchtet werden. Ackermann et al. haben herausgefunden, dass in gesunden männlichen Probanden Blutzellen einem täglichen Rhythmus unterliegen (79). Monozyten zeigen dabei nachts ihre höchste Konzentration im Blut, haben jedoch von allen ausgewerteten Zelltypen die geringste Amplitude und den am wenigsten robusten Rhythmus (79). Die Arbeitsgruppe von Coiffard et al. untersuchte die zirkadiane Rhythmik und das Auftreten

von Sepsis in Traumapatienten (67). Zusätzlich wurden verschiedene Blutzellen untersucht. Der Midline Estimating Statistic of Rhythm (Mesor) von Monozyten war in Patienten mit Sepsis signifikant höher als in nicht-septischen Patienten, die Amplitude war jedoch vergleichbar (67). Demnach ist die Blutkonzentration von Monozyten nachts am höchsten und bei Patienten mit Sepsis höher als bei nicht-septischen Patienten. In der hier vorliegenden Studie wurden die mHLA-DR-Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten und nur einmalig gemessen, sodass wir solch eine Tendenz nicht beschreiben konnten.

Die Arbeitsgruppe von Nguyen et al. befasste sich mit der Fragestellung, ob Monozyten eine diurnale Variation der Clock Genes-Expression aufweisen. Es konnte in Monozyten von Mäusen mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus eine ausgeprägte Oszillation von *BMAL1* nachgewiesen werden (80). Zusätzlich wurde die Konzentration von Monozyten im Tagesverlauf in verschiedenen Geweben der Mäuse untersucht. Es wurde im Tagesverlauf eine zweifache Differenz zwischen der niedrigsten und höchsten Konzentration in Milz und Blut im Vergleich zum Knochenmark gezeigt, was für eine ausgeprägte zirkadiane Varianz spricht (80). Um den Einfluss von *BMAL1* auf die Monozyten-Oszillation zu untersuchen, wurden myeloidspezifische *BMAL1*-Knockout-Mäuse herangezogen. Die zirkadiane Rhythmik von Monozyten, nachgewiesen in Milz, Knochenmark und Blut war im Vergleich zum normalen Rhythmus signifikant aufgehoben (80). Diese Ergebnisse zeigen, dass *BMAL1* die rhythmische Oszillation von Monozyten im Blut steuert. In unserem Patientenkollektiv zeigte *BMAL1* keine Rhythmik. Auch ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse konnte nicht nachgewiesen werden. In den absoluten Zahlen lässt sich aber bei Patienten mit schwerer Immunparalyse eine Tendenz zur *BMAL1*-Arrhythmik erkennen. Hier können Studien mit größerer Patientenzahl Aufschluss darüber bringen, ob eine aufgehobene *BMAL1*-Rhythmik mit verminderter mHLA-DR-Expression einhergeht.

Clock Genes steuern die Konzentration von Monozyten im Blut, sodass sich die Frage stellt, inwiefern auch die Expression von mHLA-DR auf der Zelloberfläche einem täglichen Rhythmus unterliegt und ob dieser durch eine Infektion verändert werden kann. Zu diesem Thema sind bisher keine Studien veröffentlicht worden, sodass unsere Studie einen ersten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen monozytärer HLA-DR-Expression mit einhergehender Immunsuppression und einer unterbrochenen zirkadianen Rhythmik gibt. Weitere Studien zu dieser Thematik sind erforderlich.

4.3 Clock Genes und das Immunsystem

Es ist in zahlreichen Studien nachgewiesen worden, dass eine zirkadiane Rhythmik in den verschiedenen Komponenten des Immunsystems vorliegt. Zudem wird vermutet, dass der SCN, als Hauptzeitgeber, Einfluss auf die Oszillation von Lymphozyten- und Zytokinmenge sowie auf die Antigenpräsentation nimmt (81). Einige Immunzellen wie Monozyten oder T- und B-Lymphozyten, und Zytokine wie TNF- α zeigen eine Variation der Expressionsrate im Tagesverlauf mit einem Peak in der Nacht (35,79,82). Cortisol ist dabei der Mediator des SCN, da eine Veränderung der Cortisolkonzentration im Blut zu einer Unterbrechung des Rhythmus von T-Lymphozyten führt (80).

Acuna-Castroviejo et al. beschreiben Hinweise darauf, dass das angeborene Immunsystem von Clock Genes kontrolliert wird (82). BMAL1 erscheint als zentraler Mediator, da es unter anderem die NF κ B-abhängige Immunantwort reduziert und die Expression von proinflammatorischen Molekülen und Zytokinen vermindert (82). Es dient unter Normalbedingungen als antiinflammatorische Komponente des angeborenen Immunsystems und reduziert die überschießende Immunantwort einer Sepsis (43,82). Dies wird von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Deng et al. gestützt (65). Sie konnten nachweisen, dass bei *BMAL1*-Knock-out-Mäusen die Produktion des Immuncheckpoint-Proteins PD-L1 vermindert ist, was zu einer erhöhten Sepsissterblichkeit führt (65). Außerdem führt eine nicht-letale Dosis *Listeria monocytogenes* bei Wildtyp-Mäusen zu einer höheren Sterblichkeit als bei *BMAL1*-Knockout-Mäusen (80). Demnach agiert BMAL1 als antiinflammatorisches Molekül in Monozyten und seine Abwesenheit kann zu schweren Entzündungen und Sepsis führen. Wir konnten keine erhöhte *BMAL1*-Expression bei Patienten mit schwerer Immunparalyse nachweisen. Ebenso gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl verstorbener Patienten. Ursächlich dafür kann sein, dass Patienten mit jeweils sehr niedriger mHLA-DR-Expression im immunsupprimierten und -paralysierten Bereich verglichen wurden. Im Unterschied zu den zitierten Studien fehlt eine immunkompetentere Vergleichsgruppe. Aktuell sind sich Wissenschaftler nicht einig darüber, ob die proinflammatorische und antiinflammatorische Phase der Sepsis aufeinander folgen oder zeitgleich stattfinden. Unklar ist insofern, ob eine *BMAL1*-Erhöhung im Sinne der Antiinflammation am Tag unserer Messungen zu erwarten ist. Da die Probenentnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf stattgefunden haben, kann hier kein interindividueller Vergleich durchgeführt werden. Weitere Studien mit größeren Patientenpopulationen und

synchronisierten Messzeitpunkten müssen Aufschluss darüber geben, ob in immunkompetenten Patienten mit septischem Schock eine geringere BMAL-1-Expression nachweisbar ist.

CLOCK weist im Gegensatz zu BMAL1 keine signifikante Oszillation in Makrophagen im Tagesverlauf auf (35). Spengler et al. zeigten jedoch, dass die tageszeitabhängige Sepsissterblichkeit mit der Aktivierung des NFκB-Komplexes korreliert, dessen Aktivität durch erhöhte *CLOCK*-Expression gesteigert wird (83). In einem Tierexperiment von Bellet et al. wurde die Zytokinantwort auf eine LPS-Injektion untersucht (64). Bei Makrophagen aus dem Knochenmark von *CLOCK*^{-/-}-Knock-out-Mäusen war die Zytokinkonzentration signifikant geringer im Vergleich zum Wildtyp (64). Demnach hat *CLOCK* vor allem eine proinflammatorische Wirkung.

In unserer Studie konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der *CLOCK*-Expression zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse feststellen. Jedoch sind die absoluten Rhythmitätsscores S_G von *CLOCK* bei Patienten mit schwerer Immunparalyse niedriger und weisen auf eine Tendenz zur Arrhythmik hin, was sich in die Erkenntnisse zur proinflammatorischen Wirkung von *CLOCK* einfügt. Auch hier sollten weitere Studien mit größerer Patientenzahl und mit abgestimmten Messzeitpunkten im Sepsisverlauf durchgeführt werden, um einen Einfluss von verminderter *CLOCK*-Expression auf eine verminderte mHLA-DR-Expression nachzuweisen.

Die beiden anderen Hauptkomponenten der zirkadianen Uhr sind PER und CRY. Einige Studien konnten proinflammatorische Effekte von PER2 zeigen (84–86). Bei einer Sepsis sind die Zytokine IFN γ und IL-1 β bei PER2-Verminderung signifikant vermindert (85,87). Außerdem bindet PER2 den CLOCK/BMAL1-Komplex und reduziert somit dessen antiinflammatorische Wirkung (84).

Die Cryptochrome CRY1 und CRY2 sowie PER2 dienen als Inhibitoren des CLOCK/BMAL1-Komplexes. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an CRY1 und CRY2 zu einer erhöhten Produktion von unter anderem TNF- α und IL-6 führt, was eine proinflammatorische Antwort fördert (82,84). Ebenso unterdrückt CRY1 indirekt die NFκB-Phosphorylierung und Transkriptionsaktivität (88). Somit dienen CRY1 und CRY2 der Antiinflammation.

Bei Patienten mit schwerer Immunparalyse konnten wir keine signifikant verminderte *PER1*- oder *PER2*-Expression im Vergleich zu Patienten ohne schwere Immunparalyse zeigen. Ebenso konnte keine signifikant erhöhte Expression von *CRY1* oder *CRY2* bei Patienten mit schwerer Immunsuppression nachgewiesen werden. Im Gegenteil ist der absolute Rhythmitätsscore S_G von *CRY2* bei Patienten mit schwerer Immunparalyse niedriger, was für eine arrhythmische Expression von antiinflammatorischem *CRY2* spricht. Diese Beobachtung könnte, wie bereits erläutert, an den Messpunkten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Krankheitsverläufe liegen.

Clock Genes haben einen Einfluss auf das Immunsystem. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass andere Komponenten des Immunsystems die zirkadiane Rhythmik verändern. Okada et al. untersuchten in einer Studie die Auswirkungen von LPS-Gabe auf die Expression von Clock Gene-mRNA im SCN von Ratten (89). LPS supprimierte signifikant die Menge an exprimiertem *PER2* und *DBP* (89). Die Arbeitsgruppe von Haimovich et al. führte ein ähnliches Experiment an gesunden Menschen durch (90). Sie injizierten den Probanden Endotoxin und maßen die Expression verschiedener Clock Genes im Vergleich zu einer Placebogruppe. Die gemessenen Clock Genes *CLOCK*, *CRY1-2*, *PER1-3*, *CSNK1E*, *Rora* und *Rev-erb* waren um 80-90 % vermindert mit dem niedrigsten Messwert 3–6 Stunden nach Injektion (90). *PER1* und *PER2* hatten den niedrigsten Messwert nach 13–17 Stunden (90). Die Expression der Clock Genes war bis zu 17 Stunden nach Injektion vermindert (90). Cavadini et al. suchten nach einer Erklärung für diese Phänomene und konnten nachweisen, dass $TNF-\alpha$ und $IL-1\beta$ die Fähigkeit von *CLOCK/BMAL1* inhibieren, Enhancer-Box-abhängige Gene in Leber und SCN zu aktivieren (91). Außerdem interagiert eine $NF\kappa B$ -Untereinheit direkt mit *BMAL1* und inhibiert somit das Clock Gene *DBP* (92).

Von der Annahme ausgehend, dass bei Patienten mit stark verminderter mHLA-DR-Expression die antiinflammatorischen Komponenten des Immunsystems zum Zeitpunkt unserer Messungen überwiegen, müssten den obigen Erkenntnissen nach die Clock Genes bei Patienten mit schwerer Immunparalyse entsprechend wieder rhythmischer exprimiert sein. Bisher gibt es keine Studien, die solch einen Zusammenhang zeigen konnten. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in den Rhythmitätsscores aller Clock Genes zwischen Patienten mit schwerer und ohne schwere Immunparalyse nachweisen. Im Gegenteil sind die Clock Genes bei Patienten mit schwerer Immunparalyse eher arrhythmischer exprimiert. Zusammenhänge von

verminderter mHLA-DR-Expression und rhythmischer Expression von Clock Genes muss in Studien mit größeren Patientenpopulation untersucht werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Auslösen einer Immunantwort zu einer starken Veränderung unserer zirkadianen Rhythmik führt. Ob die Einflüsse von Immunsystem und zirkadianer Rhythmik gerichtet sind und inwiefern sie sich überlappen, bleibt Gegenstand künftiger Forschung.

4.4 Zirkadiane Rhythmik und Sepsis

Neben den experimentellen Studien zum Einfluss von Endotoxinen und LPS auf die zirkadiane Rhythmik wurden in den letzten Jahren einige klinische Studien zu dieser Fragestellung durchgeführt (67–69).

Acuna-Fernández et al. untersuchten bei gesunden Probanden sowie septischen und nicht-septischen Intensivpatienten die Expression von Clock Genes und die Menge an ausgeschütteten pro- und antiinflammatorischen Zytokinen an vier Messzeitpunkten (68). Gezeigt wurde, dass der zirkadiane Rhythmus von BMAL1 bei Sepsispatienten aufgehoben war und es keinen erkennbaren Rhythmus bei CLOCK gab. Außerdem wurden deutlich erhöhte Mengen an pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei Patienten mit Sepsis gemessen. Es wurde gefolgert, dass eine Inflammation Clock Genes unterdrückt, was eine systemische Infektion begünstigt (68). Die äußeren Umstände einer Intensivstation erscheinen nicht verantwortlich für die veränderte Genexpression, da in nicht-septischen Intensivpatienten rhythmische Clock Genes nachgewiesen wurden (68). Die Arbeitsgruppe von Coiffard et al. untersuchte die zirkadiane Rhythmik und das Auftreten von Sepsis bei Traumapatienten (67). Bei 38 Patienten, von denen 13 im Verlauf eine Sepsis entwickelten, wurden über 24 Stunden hinweg alle vier Stunden Blutproben zur Messung der Clock Gene Expression entnommen, sowohl am Tag nach Aufnahme auf die Intensivstation als auch vier Tage danach. Es konnte kein Unterschied der Expressionsmuster von BMAL1 zwischen septischen und nicht-septischen Patienten dargestellt werden. PER2 und PER3 waren herunterreguliert. Dass Clock Genes bei Intensivpatienten vermindert exprimiert werden und somit die zirkadiane Rhythmik gestört wird, ist hinreichend untersucht (93–96). Dies konnten Diaz et al. nochmals für elf Patienten mit Subarachnoidalblutung oder intrazerebraler Blutung nachweisen (69). CLOCK war nach einer Woche intensivmedizinischen Aufenthalts vermindert exprimiert (69).

Diese Arbeiten zeigten ein inhomogenes Bild bezüglich aufgehobener zirkadianer Rhythmik bei Intensivpatienten. In der Regel sind jedoch positive Regulatoren wie CLOCK und BMAL1 herunterreguliert, und Proteine des negativen Feedbackloops werden weiterhin rhythmisch exprimiert. Dies konnte in unserer Analyse ebenfalls sowohl bei Patienten mit schwerer als auch ohne schwere Immunparalyse dargestellt werden. Papaioannou et al. formulierten die Hypothese, dass nicht nur die Umgebung einer Intensivstation sondern auch intensivmedizinische Behandlungen zur Disruption zirkadianer Rhythmik führen können (81). So scheint diese unter anderem von Katecholaminen und Sedierung sowie maschineller Beatmung beeinflusst zu sein (81,96,97). Außerdem beeinflusst Noradrenalin die Immunantwort negativ bei Patienten mit septischem Schock (98). Gerade auch bei Patienten mit septischem Schock, die eine intensivisierte Vasopressortherapie, maschinelle Beatmung inklusive Sedierung und weitere intensivmedizinische Maßnahmen benötigen, sollten diese Einflüsse nicht unbeachtet gelassen werden. Jedoch sind weitere Studien notwendig, um einen sicheren Zusammenhang feststellen zu können. In unserer Studie wurden alle Patienten maschinell beatmet mit Bedarf an hohen Noradrenaldosen, sodass hier kein Nachweis einer Korrelation mit veränderter zirkadianer Rhythmik möglich war.

4.5 Einfluss von mHLA-DR auf die Körperkerntemperatur

Die Körpertemperatur unterliegt einem strengen zirkadianen Rhythmus gesteuert durch den Zeitgeber im SCN sowie durch interne und externe Reize. Die normale Körperkerntemperatur liegt bei 37 °C variierend um 0,5–1 °C mit dem tiefsten Wert in den frühen Morgenstunden und dem höchsten am späten Nachmittag (71,99). Es wurde gezeigt, dass die Temperatur als Marker für die zirkadiane Rhythmik dienen kann (70,100). Gazendam et al. untersuchten Temperaturrhythmen von Patienten auf der Intensivstation und stellten fest, dass zwar eine Rhythmik vorhanden, diese jedoch im Vergleich zu Gesunden stark verändert war (100). In die Studie wurden keine Patienten mit Fieber aufgenommen. Jedoch haben etwa 90 % aller Patienten mit Sepsis Fieber, also eine Körperkerntemperatur von $\geq 38,0$ °C (101–103). Bisher gibt es wenige Studien zur Temperaturrhythmik in Sepsispatienten. Papaioannou et al. zeigten, dass eine höhere Temperaturrhythmizität bei Intensivpatienten mit einem milderen Krankheitsverlauf und einem besseren klinischen Outcome assoziiert ist (70). Patienten mit schweren Sepsisverläufen hatten eine geringere Rhythmizität in der Körperkerntemperatur (70). Zudem ist Hypothermie mit einer erhöhten Letalität

assoziiert (75). Culver et al. untersuchten die Temperaturverläufe von kritisch kranken Traumapatienten. Im Median lagen der Mesor bei 37,5 °C, die Amplitude bei 0,35 °C und die Periode bei 24 Stunden (71). Nur 29 % der Patienten zeigten eine Periode von 22–26 Stunden, während 30 % der Patienten eine Periode von 48 Stunden oder länger aufwiesen (71). Ein Mesor unter 36,9 °C und eine Amplitude > 0,6 °C galten als Risikofaktoren für Letalität (71).

Die beschriebenen Studien konnten nachweisen, dass die Rhythmik der Körperkerntemperatur durch Trauma und Sepsis eingeschränkt werden kann. Hohe Amplituden im Tagesverlauf und geringere Durchschnittstemperaturen sind mit einem schlechteren Outcome assoziiert. In unserer Studie wurde im Median eine Körperkerntemperatur von 37,5 °C und eine Amplitude von 1,2 °C gemessen. Die Definition von Amplitude unterschied sich jedoch von obigen Studien, sodass diese Werte nicht vergleichbar sind. Temperaturrehythmen waren aufgrund der geringen Beobachtungsdauer von 24 Stunden nicht kalkulierbar. Korrelationen zur Letalität waren aufgrund der geringen Größe der Studienpopulation nicht zu berechnen. Die visuelle Beurteilung der Temperaturkurven legen nahe, dass weder Sterblichkeit noch schwere Immunparalyse einen Einfluss auf den Verlauf der Körperkerntemperatur haben.

4.6 Limitationen

Mit 14 Patienten war die Fallzahl der Studie gering und mHLA-DR wurde im Rahmen der klinischen Routine erhoben, was zum Fehlen von drei Messwerten führte. Die vorhandenen Messwerte wurden jedoch zeitnah zur Messung der Clock Genes erhoben. Durch den Messzeitraum von sieben Messzeitpunkten über 24 Stunden war die Aussagekraft zur Rhythmik in der Genexpression begrenzt, jedoch gelten Beobachtungszeiträume von 24 Stunden allgemein hin als ausreichend (73,77,81,105). Bei teilweise unterbrochenen oder veränderten Rhythmen sind längere Zeiträume erforderlich, um eine etwaige Arrhythmik nachzuweisen. Dies gilt auch für den Nachweis einer Rhythmik der Temperaturverläufe.

Ein gerichteter Zusammenhang von Sepsis und abgeschwächter Rhythmik der Genexpression lässt sich ohne weiterführende Studien mit angemessenen Vergleichsgruppen nicht darstellen. Ebenso kann ein Zusammenhang sekundärer Outcomeparameter mit der zirkadianen Rhythmik ohne den Vergleich mit anderen Patienten auf der Intensivstation nicht beurteilt werden. Die Messung der monozytären HLA-DR-Expression erfolgte punktuell und nicht parallel zu denen der Clock Genes, was

die Aussagekraft erhöht hätte. Die eingeschlossenen Patienten hatten einen Infektfokus sowie einen Noradrenalinbedarf von $> 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ für mindestens zwei Stunden, was der Definition des septischen Schocks nach ACCP-Leitlinie entspricht (5). Die aktuellen Leitlinien geben zusätzlich eine Hyperlaktatämie von $> 2 \text{ mmol/l}$ vor, was die Vergleichbarkeit mit daran orientierten Studien erschwert.

4.7 Perspektiven

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Zusammenhang von zirkadianer Rhythmik und Immunsuppression im Sinne der mHLA-DR-Expression bei Patienten mit septischem Schock untersucht. Etliche ähnliche Studienansätze zeigen das große Interesse daran, den Zusammenhang von Sepsis und der Expression von Clock Genes sowie deren Einfluss auf das Immunsystem zu verstehen. Große Übersichtsarbeiten beschreiben zukunftsweisende Ansätze zur Verbesserung des Outcomes von Sepsispatienten. Dabei zielt die Aufrechterhaltung des Tag-Nacht-Rhythmus auf Intensivstationen nicht nur auf die Vermeidung des Delirs ab, sondern soll sich auch positiv auf das Immunsystem auswirken (106). Zusätzlich ist es dringend erforderlich, Erkenntnisse über die immunopathologischen Vorgänge während einer Sepsis besser zu verstehen und welche intrinsischen und extrinsischen Faktoren sich darauf auswirken können (25). Beides dient sowohl der Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren und therapeutischer Ansätze als auch der Individualisierung bisheriger Behandlungsstrategien.

Literaturverzeichnis

1. Singer M, Deutschman C, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GR, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10.
2. Majno G. The Ancient Riddle of Sepsis. *J Infect Dis*. 1991;163:937–45.
3. Koch R. Untersuchung über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. 1. Auflage. Koch R, editor. Leipzig: F. C. W. Vogel, Leipzig; 1878.
4. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2013;369:840–51.
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992;101(6):1644–55.
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G. 2001 SCCM / ESICM / ACCP / ATS / SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003;29:530–8.
7. Weis S, Dickmann P, Pletz MW, Coldewey SM, Gerlach H, Bauer M. Sepsis 2017: Eine neue Definition führt zu neuen Konzepten. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(29–30):1424–8.
8. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259–72.
9. Adhikari NKJ, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010;376(9749):1339–46.
10. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara D V, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990 – 2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–11.
11. SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in

- German intensive care units: the prospective , multicentre INSEP study. *Intensive Care Med.* 2016;42:1980–9.
12. Sepsissterblichkeit in Deutschland höher als in anderen Ländern. *aerzteblatt.de*. 2017 [accessed Nov 20, 2017]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/83527/Sepsissterblichkeit-in-Deutschland-hoeher-als-in-anderen-Laendern>
 13. Trimmel H, Luschin U, Ko K, Anzur C, Vevera D, Spittler A. Clinical Outcome Of Critically Ill Patients Cannot be Defined By Cutoff values Of Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Expression. *Shock.* 2012;37(2):140–4.
 14. Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20:345–52.
 15. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):45–56.
 16. Bone RC. Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). *Ann Intern Med.* 1996;125:680–7.
 17. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:862–74.
 18. Cao C, Yu M, Chai Y. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 2019;10(10):1–14.
 19. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus Anti- inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *J Infect Dis.* 2000;181(1):176–80.
 20. Pinsky MR, Vincent J-L, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum Cytokine Levels in Human Septic Shock: Relation to Multiple-System Organ Failure and Mortality. *Chest.* 1993 Feb 1;103(2):565–75.
 21. Lamping N, Dettmer R, Schröder NWJ, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R, Schumann RR. LPS-binding Protein Protects Mice from Septic Shock Caused by LPS or Gram-negative Bacteria. *J Clin Invest.* 1998;101(10):2065–71.
 22. Boomer JS, Chang KC, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman II SD, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA.* 2011;306(23):2594–605.
 23. Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret

- G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: A multicenter standardized study. *Clin Chem*. 2005;51(12):2341–7.
24. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(10):793–806.
 25. Van Der Poll T, Van De Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(7):407–20.
 26. Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler MS, Lachmann G, La Rosée P, Monneret G, Venet F, Bauer M, Brunkhorst FM, Kox M, Cavaillon JM, Uhle F, Weigand MA, Flohé SB, Wiersinga WJ, Martin-Fernandez M, Almansa R, Martin-Loeches I, Torres A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Girardis M, Cossarizza A, Netea MG, van der Poll T, Scherag A, Meisel C, Schefold JC, Bermejo-Martín JF. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(12):e422–36.
 27. Drewry AM, Ablordeppey EA, Murray ET, Beiter ER, Walton AH, Hall MW, Hotchkiss RS. Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. 2016;20(334):1–10.
 28. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, Camus C, Fauchet R, Thomas R, Drénou B. Monocyte Human Leukocyte Antigen–DR Transcriptional Downregulation by Cortisol during Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(10):1144–51.
 29. Wolk K, Kunz S, Crompton NEA, Volk HD, Sabat R. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J Biol Chem*. 2003;278(20):18030–6.
 30. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(11):1475–82.
 31. Papadopoulos P, Pistiki A, Theodorakopoulou M, Christodouloupoulou T, Damoraki G, Goukos D, Briassouli E, Dimopoulou I, Armaganidis A, Nanas S, Briassoulis G, Tsiodras S. Cytokine Immunoparalysis : Clinical and immunological associations in SIRS and severe sepsis patients. *Cytokine*. 2017;92:83–92.

32. Albrecht U, Eichele G. The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13:271–7.
33. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock. In: Kramer A, Meroz M, editors. *Circadian Clocks*. 217th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 3–27.
34. Lamont EW, James FO, Boivin DB, Cermakian N. From circadian clock gene expression to pathologies. *Sleep Med.* 2007;8:547–56.
35. Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk H, Kramer A, Maier B. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(50):21407–12.
36. Zehring W, Wheeler D, Reddy P, Konopka R, Kyriacou C, Rsbash M, Hall J. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell.* 1984;39(12):369–76.
37. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine (Press release). Stockholm; 2017. [accessed Mar 6, 2021]; Available from:
https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2017/press.html
38. Albrecht U, Ripperger JA. Clock Genes. In: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, editors. *Encyclopedia of Neuroscience*. 1st ed. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 759–62.
39. Korenčič A, Košir R, Bordyugov G, Lehmann R, Rozman D, Herzel H. Timing of circadian genes in mammalian tissues. *Sci Rep.* 2014;4(5782):1–9.
40. Lim ASP, Chang A, Shulman JM, Raj T, Chibnik LB, Cain SW, Rothamel K, Benoist C, Myers AJ, Czeisler CA, Buchman AS, Bennett DA, Duffy JF, Saper CB, Jager PL De. A Common Polymorphism Near PER1 and the Timing of Human Behavioral Rhythms. *Ann Neurol.* 2012;72(3):324–34.
41. Yang X, Wood P, ANsell C, Quiton D, Oh E, Du-Quiton J, Hrushesky W. The Circadian Clock Gene PER1 Suppresses Cancer Cell Proliferation And Tumor Growth At Specifiv Times Of Day. *Chronobiol Int.* 2009;26(7):1323–39.
42. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.* 2006;15(2):271–7.
43. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH, Farrow SN, Else KJ, Singh D, Ray DW, Loudon ASI. The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of in

- flammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(2):582–7.
44. Liu H, Zhu Y, Gao Y, Qi D, Zhao L, Zhao L, Liu C, Tao T, Zhou C, Sun X, Guo F, Xiao J. NR1D1 modulates synovial inflammation and bone destruction in rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis*. 2020;11(129):1–18.
 45. Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szwegold NR, Wisely GB, Lazar MA. Rev-erba, a Heme Sensor That Coordinates Metabolic and Circadian Pathways. *Science*. 2007;318(December):1786–9.
 46. Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, Chong L, Ditacchio L, Atkins AR, Glass CK, Liddle C, Auwerx J, Downes M, Panda S, Evans RM. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-a and REV-ERB-b. *Nature*. 2012;485(7396):123–7.
 47. Ramakrishnan SN, Lau P, Burke LJ, Muscat GEO. Rev-erb β regulates the expression of genes involved in lipid absorption in skeletal muscle cells: Evidence for cross-talk between orphan nuclear receptors and myokines. *J Biol Chem*. 2005;280(10):8651–9.
 48. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. Role of DBP in the Circadian Oscillatory Mechanism. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4773–81.
 49. Lin CC, Bradstreet TR, Schwarzkopf EA, Sim J, Carrero JA, Chou C, Cook LE, Egawa T, Taneja R, Murphy TL, Russell JH, Edelson BT. Bhlhe40 controls cytokine production by T cells and is essential for pathogenicity in autoimmune neuroinflammation. *Nat Commun*. 2014;5:1–13.
 50. Matsunaga R, Nishino T, Yokoyama A, Nakashima A, Kikkawa U, Konishi H. Versatile function of the circadian protein CIPC as a regulator of Erk activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469(3):377–83.
 51. Aryal RP, Kwak PB, Tamayo AG, Gebert M, Chiu PL, Walz T, Weitz CJ. Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell*. 2017;67(5):770–82.
 52. Narasimamurthy R, Hunt SR, Lu Y, Fustin JM, Okamura H, Partch CL, Forger DB, Kim JK, Virshup DM. CK1 δ /e protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23):5986–91.
 53. Etchegaray J-P, Machida KK, Noton E, Constance CM, Dallmann R, Di Napoli MN, DeBruyne JP, Lambert CM, Yu EA, Reppert SM, Weaver DR. Casein Kinase 1 Delta Regulates the Pace of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell Biol*. 2009;29(14):3853–66.

54. Vielhaber E, Eide E, Rivers ANN, Gao Z. Nuclear Entry of the Circadian Regulator mPER1 Is Controlled by Mammalian Casein Kinase I ϵ . *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4888–99.
55. Lee KY, Ahn YM, Kim SH, Kang HG, Joo EJ. Genetic association study of CSNK1E gene in bipolar disorder and circadian characteristics. *Nord J Psychiatry*. 2018;72(8):599–604.
56. Pinacho R, Villalmanzo N, Meana JJ, Ferrer I, Berengueras A, Haro JM, Villén J, Ramos B. Altered CSNK1E, FABP4 and NEFH protein levels in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2016;177(1–3):88–97.
57. Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, Takayasu S, Nakata O, Hashimoto S. Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Lett*. 2011;585(14):2217–22.
58. Labrecque N, Cermakian N. Circadian clocks in the immune system. *J Biol Rhythm*. 2015;30(4):277–90.
59. Truong KK, Lam MT, Grandner MA, Sassoos CS, Malhotra A. Timing matters: Circadian rhythm in sepsis, obstructive lung disease, obstructive sleep apnea, and cancer. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(7):1144–54.
60. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen C, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, Besing RC, Menaker M, Gewirtz AT, Davidson AJ. Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption. *J Immunol*. 2010;185:5796–805.
61. Perry MG, Kirwan JR, Jessop DS, Hunt LP. Overnight variations in cortisol, interleukin 6, tumour necrosis factor α and other cytokines in people with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:63–8.
62. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang J, Zhang D, Hashimoto D, Merad M, Frenette PS. Adrenergic Nerves Govern Circadian Leukocyte Recruitment to Tissues. *Immunity*. 2012;37:290–301.
63. Hayashi M, Shimba S, Tezuka M. Characterization of the Molecular Clock in Mouse Peritoneal Macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(4):621–6.
64. Bellet MM, Deriu E, Liu JZ, Grimaldi B, Blaschitz C, Zeller M, Edwards RA, Sahar S, Dandekar S, Baldi P, George MD, Raffatellu M. Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(24):9897–902.
65. Deng W, Zhu S, Zeng L, Liu J, Kang R, Yang M, Cao L, Wang H, Billiar TR, Jiang J, Xie M, Tang D. The Circadian Clock Controls Immune Checkpoint Pathway in

- Sepsis. *Cell Rep.* 2018;24(2):366–78.
66. Brager AJ, Ehlen JC, Castanon-Cervantes O, Natarajan D, Delisser P, Davidson AJ, Paul KN. Sleep Loss and the Inflammatory Response in Mice Under Chronic Environmental Circadian Disruption. *PLoS One.* 2013;8(5):e63752.
 67. Coiffard B, Diallo AB, Culver A, Mezouar S, Hammad E, Vigne C, Nicolino-Brunet C, Dignat-George F, Baumstarck K, Boucekine M, Leone M, Mege JL. Circadian Rhythm Disruption and Sepsis in Severe Trauma Patients. *Shock.* 2019;52(1):29–36.
 68. Acuna-Fernández C, Marin JS, Diaz-Casado ME, Rusanova I, Darias-Delbey B, Perez-Huillama L, Florido-Ruiz J, Acuna-Castroviejo D. Daily changes in the expression of clock genes in sepsis and their relation with sepsis outcome and urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin. *Shock.* 2020;53(5):550–9.
 69. Diaz E, Diaz I, del Busto C, Escudero D, Pérez S. Clock Genes Disruption in the Intensive Care Unit. *J Intensive Care Med.* 2019;1–8.
 70. Papaioannou VE, Sertaridou EN, Chouvarda IG, Kolios GC, Pneumatikos IN. Determining rhythmicity and determinism of temperature curves in septic and non-septic critically ill patients through chronobiological and recurrence quantification analysis: a pilot study. *Intensive Care Med Exp.* 2019;7(53):1–16.
 71. Culver A, Coiffard B, Antonini F, Duclos G, Hammad E, Vigne C, Mege J, Baumstarck K, Boucekine M, Zieleskiewicz L, Leone M. Circadian disruption of core body temperature in trauma patients : a single- center retrospective observational study. *J Intensive Care.* 2020;8(4):1–11.
 72. Spies C, Kastrup M, Kerne T, Melzer-Gartzke C, Zielke H, Kox WJ. SOPs in Intensivmedizin und Notfallmedizin. 1st ed. Spies C, Kastrup M, Kerner T, Melzer-Gartzke C, Zielke H, Kox WJ, editors. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2013.
 73. Lück S, Westermark P. Circadian mRNA expression: Insights from modeling and transcriptomics. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(3):497–521.
 74. Quertemont E. How to statistically show the absence of an effect. *Psychol Belg.* 2011;51(2):109–27.
 75. Davison AC, Hinkley D V. *Bootstrap Methods and their Application.* 1st ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1997.
 76. Lachmann G, Ananthasubramaniam B, Wünsch VA, Scherfig L-M, von Haefen C, Knaak C, Edel A, Ehlen L, Koller B, Goldmann A, Herzel H, Kramer A, Spies C.

- Circadian Rhythms in Septic Shock Patients. *Ann Intensive Care*. accepted for publication in March 2021
77. Refinetti R, Cornélissen G, Halberg F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res*. 2007;38(4):275–325.
 78. Drewry AM, Fuller BM, Bailey TC, Hotchkiss RS. Body temperature patterns as a predictor of hospital-acquired sepsis in afebrile adult intensive care unit patients: A case-control study. *Crit Care*. 2013;17(5).
 79. Ackermann K, Revell VL, Lao O, Rombouts EJ, Skene DJ, Kayser M. Diurnal rhythms in blood cell populations and the effect of acute sleep deprivation in healthy young men. *Sleep*. 2012;35(7):933–40.
 80. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6Chi inflammatory monocytes. *Science*. 2013;341(6153):1–15.
 81. Papaioannou V, Mebazaa A, Plaud B, Legrand M. ‘Chronomics’ in ICU: circadian aspects of immune response and therapeutic perspectives in the critically ill. *Intensive Care Med Exp*. 2014;2(1):1–14.
 82. Acuna-Castroviejo D, Rahim I, Acuna-Fernández C, Fernández-Ortiz M, Solera-Marín J, Sayed RKA, Díaz-Casado ME, Rusanova I, López LC, Escames G. Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(21):3965–87.
 83. Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, Gasparian A V., Fedtsova N, Gleiberman AS, Gitlin II, Artemicheva NM, Deluca KA, Gudkov A V., Antoch MP. Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- κ B-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):E2457–65.
 84. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O’Neill LAJ. Circadian Clock Proteins and Immunity. *Immunity*. 2014;40(2):178–86.
 85. Diallo AB, Coiffard B, Leone M, Mezouar S, Mege JL. For Whom the Clock Ticks: Clinical Chronobiology for Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2020;11(7):1–13.
 86. Silver AC, Arjona A, Walker WE, Fikrig E. The Circadian Clock Controls Toll-like Receptor 9-Mediated Innate and Adaptive Immunity. *Immunity*. 2012;36(2):251–61.
 87. Liu J, Mankani G, Shi X, Meyer M, Cunningham-Runddles S, Ma X, Sun ZS. The circadian clock *Period 2* gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Infect Immun*.

- 2006;74(8):4750–6.
88. Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(31):12662–7.
 89. Okada K, Yano M, Doki Y, Azama T, Iwanaga H, Miki H, Nakayama M, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Ishida N, Monden M. Injection of LPS Causes Transient Suppression of Biological Clock Genes in Rats. *J Surg Res*. 2008;145(1):5–12.
 90. Haimovich B, Calvano J, Haumovich AD, Calvano SE, Coyle SM, Lowry SF. In vivo edotoxin synchronizes and suppresses clock gene expression in human peripheral blood leukocytes. *Crit Care Med*. 2010;38(3):751–8.
 91. Cavadini G, Petrzilka S, Kohler P, Jud C, Tobler I, Birchler T, Fontana A. TNF α suppresses the expression of clock genes 2007 PNAS.pdf. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(31):12843–8.
 92. Bellet MM, Zocchi L, Sassone-Corsi P. The RelB subunit of NF κ B acts as a negative regulator of circadian gene expression. *Cell Cycle*. 2012;11(17):3304–11.
 93. Gabor JY, Cooper AB, Crombach SA, Lee B, Kadikar N, Bettger HE, Hanly PJ. Contribution of the intensive care unit environment to sleep disruption in mechanically ventilated patients and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(5):708–15.
 94. Scott B. Disruption of Circadian Rhythms and Sleep in Critical Illness and its Impact on the Development of Delirium. *Curr Pharm Des*. 2015;21(24):3443–52.
 95. Verceles AC, Silhan L, Terrin M, Netzer G, Shanholtz C, Scharf SM. Circadian rhythm disruption in severe sepsis: The effect of ambient light on urinary 6-sulfatoxymelatonin secretion. *Intensive Care Med*. 2012;38(5):804–10.
 96. Jobanputra AM, Scharf MT, Androulakis IP, Sunderram J. Circadian Disruption in Critical Illness. *Front Neurol*. 2020;11(8):1–8.
 97. Frisk U, Olsson J, Nylén P, Hahn RG. Low melatonin excretion during mechanical ventilation in the intensive care unit. *Clin Sci*. 2004;107(1):47–53.
 98. Stolk RF, van der Pasch E, Naumann F, Schouwstra J, Bressers S, van Herwaarden AE, Gerretsen J, Schambergen R, Ruth MM, van der Hoeven JG, van Leeuwen H, Pickkers P, Kox M. Norepinephrine Dysregulates the Immune Response and Compromises Host Defense during Sepsis. *AJRCCM*.

- 2020;202(6):830–42.
99. Kelly G. Body temperature variability (Part 1): a review of the history of body temperature and its variability due to site selection, biological rhythms, fitness, and aging. *Altern Med Rev.* 2006;11(04):278–93.
 100. Gazendam JAC, Van Dongen HPA, Grant DA, Freedman NS, Zwaveling JH, Schwab RJ. Altered circadian rhythmicity in patients in the ICU. *Chest.* 2013;144(2):483–9.
 101. Yang YL, Liu DW, Wang XT, Long Y, Zhou X, Chai WZ. Body temperature control in patients with refractory septic shock: Too much may be harmful. *Chin Med J.* 2013;126(10):1809–13.
 102. Laupland KB. Fever in the critically ill medical patient. *Crit Care Med.* 2009;37(7 (Supl.)):S273–8.
 103. Warmbrunn A. Pschyrembel Online: Fieber. [accessed Sep 7, 2020]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Fieber/K07SB>
 104. Kushimoto S, Abe T, Ogura H, Shiraishi A, Saitoh D, Fujishima S, Mayumi T, Hifumi T, Shiino Y, Nakada T aki, Tarui T, Otomo Y, Okamoto K, Umemura Y, Kotani J, Sakamoto Y, Sasaki J, Shiraishi S ichiro, Takuma K, Tsuruta R, Hagiwara A, Yamakawa K, Masuno T, Takeyama N, Yamashita N, Ikeda H, Ueyama M, Fujimi S, Gando S. Impact of blood glucose abnormalities on outcomes and disease severity in patients with severe sepsis: An analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. *Crit Care.* 2020;15(3):1–9.
 105. Krauchi K, Wirz-Justice A. Circadian rhythm of heat production, heart rate, and skin and core temperature under unmasking conditions in men. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1994;267(3):R819–29.
 106. Madrid-Navarro C, Sanchez-Galvez R, Martinez-Nicolas A, Ros M, Garcia J, Madrid J, Rol M. Disruption of circadian rhythms and delirium, sleep impairment and sepsis in critically ill patients. *Curr Pharm Des.* 2015;21(24):3453–68.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Viktor Alexander Wunsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Einfluss der monozytären HLA-DR-Expression auf Clock Genes bei Patienten mit septischem Schock / Influence of monocyte HLA-DR expression on clock genes in 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, Grafiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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 unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer 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

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt Herrn PD Dr. med. Gunnar Lachmann, der mir als Erstbetreuer jederzeit helfend und richtungsweisend zur Seite stand. Seine Anregungen, Kritik und Kommentare haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss meines Vorhabens beigetragen. Danke für die umfassende Betreuung und unermüdliche Unterstützung, es war eine große Hilfe.

Ganz herzlich möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Spies für die freundliche Überlassung des Themas und Bereitstellung jeglicher Ressourcen danken. Frau Dr. rer. medic. Clarissa von Haefen und Frau Birgit Brand danke ich für die ausführliche Einführung in die Laborarbeit und fachliche Unterstützung in allen labortechnischen Fragen. Mein Dank gilt auch Herrn Bharath Ananthasubramaniam, PhD für die Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung der Clock Gene-Expression. Ich möchte mich außerdem beim Pflegepersonal der Intensivstationen und allen Kollegen und Kolleginnen für die Geduld und Hilfe bei der Datenerhebung bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich allen Patienten, die trotz der Belastung ihrer Erkrankung durch ihre Kooperation maßgeblich die klinische Forschung ermöglicht haben.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. med. Anton Goldmann, der mir ebenfalls als Betreuer eine große Unterstützung war. Vielen Dank für die Geduld und Hilfe, als unser Vorhaben noch in den Kinderschuhen steckte.

Ebenso möchte ich mich herzlichst bei meinen Mitdotorandinnen Frau Lara-Marie Scherfig und Frau Anna Marie Theiß bedanken. Ohne eure Mitarbeit und Motivation wären die etlichen Messungen zu nächtlichen Stunden nicht möglich gewesen.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester für die bedingungslose und unvoreingenommene Unterstützung in allen Lebenslagen, ohne die weder mein Medizinstudium noch diese Dissertation möglich gewesen wären. Danke für Eure Zeit und das gewissenhafte Korrekturlesen.