

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Anästhesie

Univ.-Prof. Dr. med. Christian Zöllner

Charakterisierung der Sphingosin-1-Phosphat 1 Rezeptorexpression auf peripheren mononukleären Zellen bei septischen Patienten und gesunden Kontrollen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Linda Robbe
aus Ibbenbüren

Hamburg 2017

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.02.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Zöllner

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Sebastian Debus

Inhaltsverzeichnis

0. Arbeitshypothese und wissenschaftliche Fragestellung	5
1. Einleitung	7
1.1. Sepsis	7
1.1.1. Geschichte.....	7
1.1.2. Definition.....	7
1.1.3. Epidemiologie.....	9
1.1.4. Erregerspektrum und Infektionsweg.....	10
1.1.5. Intensivmedizinische Scoring-Systeme.....	11
1.2. Immunsystem	12
1.2.1. Angeborenes Immunsystem.....	12
1.2.2. Adaptives Immunsystem.....	13
1.2.3. Pathophysiologie der Sepsis.....	14
1.3. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und S1P-Rezeptoren	16
1.3.1. Sphingosin-1-Phosphat.....	16
1.3.2. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren.....	19
1.3.3. Einfluss der S1P-S1PR1-Achse auf die Lymphozyten.....	21
2. Methoden	25
2.1. CySep-Studie	25
2.1.1. Studienablauf.....	25
2.1.2. Probenaufarbeitung.....	27
2.1.3. Erhebung klinischer Daten.....	28
2.1.4. S1P-Messung.....	28
2.1.5. RNA-Isolierung.....	29
2.1.6. Reverse Transkription.....	30
2.1.7. Quantitative Real Time PCR (qPCR).....	31
2.1.8. Statistik.....	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Demographische Daten	35
3.2. Immunzellen	36
3.3. Serum-S1P	38
3.4. mRNA Expression des S1PR1 in PBMC	38
3.5. Korrelation Serum-S1P und S1PR1-Expression	39
3.6. Korrelation Serum-S1P und S1PR1-Expression mit Immunzellen	40
3.6.1. Serum-S1P und Immunzellen.....	40

3.6.2.	S1PR1-Expression und Immunzellen	42
3.7.	Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung	43
4.	Diskussion	44
4.1.	Demographische Daten	44
4.2.	Assoziation Serum-S1P und S1PR1-Expression mit Immunzellen.....	46
4.2.1.	S1P und neutrophile Granulozyten	47
4.2.2.	Serum-S1P/S1PR-Expression und Monozyten/Lymphozyten.....	49
5.	Zusammenfassung	62
6.	Abstract.....	64
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	66
8.	Anhang	70
8.1.	Material	70
8.2.	Einverständniserklärung	73
8.3.	SAPS II.....	78
8.4.	SOFA Score.....	79
8.5.	GCS.....	80
9.	Abbildungsverzeichnis.....	79
10.	Tabellenverzeichnis.....	80
11.	Literaturverzeichnis.....	81
12.	Danksagung	97
13.	Lebenslauf.....	98
14.	Eidesstattliche Versicherung.....	99

0. Arbeitshypothese und wissenschaftliche Fragestellung

In der Sepsis kommt es zu einem Ungleichgewicht sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Prozesse. Letztere führen zu einem als Immunparalyse bezeichneten Immunstatus, der durch eine relative Veränderung der peripheren Immunzellpopulationen (Tabelle 1) in ihrer Zahl sowie durch Funktionseinschränkungen der Immunzellen gekennzeichnet ist (Hotchkiss et al. 2013). Die septische Lymphopenie ist ein häufiges phänotypisches Merkmal der Erkrankung und mit dem Schweregrad der Sepsis assoziiert (Hotchkiss und Nicholson 2006). Die Ursachen der im peripheren Blut beobachteten Lymphopenie sind unklar. Lymphozyten migrieren entlang eines S1P-Gradienten aus lymphatischem Gewebe mit niedrigen S1P-Konzentrationen in die Zirkulation mit hohen S1P-Konzentrationen (Pappu et al. 2007). Die essentielle Rolle des S1P für die Lymphozyten-Migration könnte vermuten lassen, dass erniedrigte S1P-Blutkonzentrationen in der Sepsis zu einer Lymphopenie beitragen. Den S1P-Gradienten erkennen die Zellen über den S1PR1 (Matloubian et al. 2004, Sanna et al. 2004). Damit könnten jedoch nicht nur die Veränderungen der S1P-Konzentrationen in der Sepsis, sondern auch Expressionsänderungen der S1P-Rezeptoren einen septischen Phänotyp miterklären.

Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie verändert sich das Differentialblutbild von Sepsis-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte?
2. Ist die Serum-S1P-Konzentration in Sepsis-Patienten verändert?
3. Ist die Expression des S1PR1 in Sepsis-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte verändert?
- 4a. Besteht eine Assoziation der Serum-S1P-Konzentration mit der S1PR1-Expression in PBMC?
- 4b. Lassen sich Veränderungen im Differentialblutbild, wie eine Lymphopenie, mit der Serum-S1P-Konzentration oder der S1PR1-Expression assoziieren?

Aus der prospektiven Kohortenstudie dieser Arbeitsgruppe mit insgesamt 100 Sepsis-Patienten (Winkler et al. 2015) wurden 45 Sepsis-Patienten willkürlich als Studien-Subkohorte für diese Arbeit ausgewählt. Anhand des Differentialblutbildes konnten die Veränderungen der Immunzellen beobachtet und mit der S1P-Konzentration korreliert werden. Die Messung der S1P-Konzentration fand mittels einer Tandem-Massenspektroskopie statt. Für die Analyse der S1PR1-Expression wurden periphere mononukleäre Zel-

len (PBMC) aus dem Blut von Sepsis-Patienten isoliert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Rezeptorexpression mithilfe der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Weiterhin wurden klinische Parameter der Patienten aufgenommen und der Schweregrad der Sepsis evaluiert sowie die gemessenen Laborparameter mit dem klinischen Zustand korreliert. Die Daten wurden mit einer gesunden Kontrollgruppe, die aus 20 Probanden bestand, verglichen.

1. Einleitung

1.1. Sepsis

1.1.1. Geschichte

Der Begriff der „Sepsis“ wird seit der Antike in der medizinischen Terminologie verwendet. Bereits Hippokrates (ca. 460-370 vor Christus) gebrauchte diesen Begriff, der sich von dem altgriechischen Wort σήπω, „faul machen“ ableitet, und zur Beschreibung der Wundfäulnis diente. Im ersten und zweiten Jahrhundert nach Christus prägten Celsus und Galen den Begriff und beschrieben die Kardinalsymptome der Entzündung: periphere Vasodilatation (*rubor*), Fieber (*calor*), Schmerz (*dolor*), Schwellung/Ödem (*tumor*) und Organ dysfunktion (*functio laesa*). Dem ungarischen Gynäkologen Ignaz Semmelweiss (1818-1865) wurde die Bedeutung der Sepsis bewusst, indem er den Blick auf die Sepsis erweiterte. Das damals häufige Wochenbettfieber war mit einer hohen Letalität der Wöchnerinnen verbunden. Semmelweiss vermutete, dass Keime durch unsteriles Arbeiten in die Blutbahn der Patientinnen gelangten. Er führte daraufhin die aseptische Händewaschung mit einer Chlorkalklösung ein und konnte so die Letalität drastisch reduzieren. Zur selben Zeit beschäftigte sich auch Louis Pasteur (1822-1895) mit dem Thema der Wundfäulnis und entdeckte, dass Bakterien die Voraussetzung für Wundinfektionen sind. Eine neue Sepsis-Definition beschrieb schließlich Hugo Schottmüller (1867-1936) im Jahre 1914: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ (Schottmüller 1914). Damit wurde die Wichtigkeit eines Infektionsherdes für die Pathogenese der Sepsis unterstrichen. Der US-amerikanische Intensivmediziner Roger C. Bone (1941-1997) formulierte 1989 dann die für lange Zeit geltende Sepsis-Definition. Er erweiterte darin die bisherige Sepsis-Definition, indem er auch die Immunreaktion des Körpers berücksichtigte (Bone 1991). Die körpereigenen Immunabwehr steht bis heute im Fokus der Sepsispathogenese. Die Sepsis ist eine generalisierte Entzündung verbunden mit Organfehlfunktionen.

1.1.2. Definition

1992 formulierte man auf der Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* (ACCP) und der *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) die bis dato geltenden Sepsis-Kriterien. Zur Patienten-Klassifizierung teilt man die Sepsis in vier Schweregrade ein: *Systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und sep-

tischer Schock (Bone et al. 1992a). 2001 re-evaluierte die *International Sepsis Definitions-Konferenz* diese Terminologie. Da neue Erkenntnisse fehlten, sind die 1992 auf der Konsensuskonferenz definierten Begriffe bis heute gültig (Levy et al. 2003). Aktuell erfahren diese jedoch in Form der „Sepsis-3“-Konsensuskriterien, erarbeitet durch die *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) und der SCCM, eine Überarbeitung (Singer et al. 2016). Bei Anfertigung sowie Fertigstellung der vorliegenden Arbeit galt noch die von der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) 2005 herausgegebene Leitlinie zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis und 2010 überarbeitete S2-Leitlinie (Reinhart 2010). Die Diagnosekriterien richten sich nach den ACCP/SCCM Konsensuskonferenz-Kriterien (Bone et al. 1992b). Das SIRS beschreibt eine Immunreaktion des Organismus auf eine unspezifische Entzündung. Dazu zählen auch nicht-infektiöse Ursachen wie Verbrennungen, Pankreatiden, Operationen sowie Traumata. Für die Diagnose des SIRS müssen dabei mindestens zwei von vier unspezifischen Symptomen vorliegen:

- Hyperthermie (≥ 38 °C) oder Hypothermie (≤ 36 °C)
- Tachykardie (Herzfrequenz ≥ 90 /min)
- Tachypnoe (Atemfrequenz ≥ 20 /min)
und/oder arterieller $\text{paCO}_2 \leq 4,3$ kPa (33 mmHg)
und/oder maschinelle Beatmung
- Leukozytose ($\geq 12\ 000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($\leq 4\ 000/\mu\text{l}$)
und/oder Linksverschiebung >10 % unreife Neutrophile im Differentialblut-bild

Liegt ein mikrobiologischer Nachweis pathogener Keime vor oder werden alle vier SIRS-Kriterien ohne Keimnachweis erfüllt, dann handelt es sich per definitionem um eine Sepsis. Diese lässt sich in drei Schweregrade einteilen: Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock. Während man lange Zeit von einem Krankheitskontinuum der Schweregrade ausging (Rangel-Frausto et al. 1995), wird diese Annahme in den überarbeiteten „Sepsis-3“-Konsensuskriterien verlassen (Singer et al. 2016). Bei einer schweren Sepsis liegt eine Organdysfunktion vor, die sich folgendermaßen äußern kann:

- Akute Enzephalopathie: Reduzierte Vigilanz, Unruhe, Desorientiertheit, Psychotropika-unabhängiges Delir.
- Relative/Absolute Thrombozytopenie: Thrombozyten $\leq 100\ 000/\mu\text{l}$ oder Abfall der Thrombozyten um $\geq 30\%$ in 24 Stunden; ohne Blutverlust als Ursache.
- Arterielle Hypoxämie: Mit $\text{paO}_2 \leq 10$ kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder

$paO_2/FiO_2 \leq 33$ kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation; ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache.

- Renale Dysfunktion: Urinausscheidung $\leq 0,5$ ml/kg/h über mindestens eine Stunde trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatinins um ≥ 2 -fache oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess $\leq 5,0$ mmol/l oder eine Plasma-Laktat-Konzentration $\geq 1,5$ -fache oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

Im septischen Schock liegt zusätzlich eine therapierefraktäre, unter Volumensubstitution bestehende, Hypotonie vor. Diese muss für mindestens eine Stunde bestehen und ist gekennzeichnet durch einen systolischen arteriellen Blutdruck < 90 mmHg bzw. mittleren arteriellen Druck (MAP) < 65 mmHg, oder durch die Notwendigkeit eines perfusionserhaltenden Einsatzes von Vasopressoren.

1.1.3. Epidemiologie

Die Sepsis war und ist eine große Herausforderung der Medizin und ist auch heute die häufigste Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen (Angus et al. 2001). Die Inzidenz und Mortalität sind steigend (Angus et al. 2001, Lagu et al. 2012, Martin et al. 2003). Trotz verbesserter medizinischer Versorgung konnte die Sterblichkeit nicht wesentlich gesenkt werden (Dombrovskiy et al. 2007, Zimmerman et al. 2013).

Eine prospektive Querschnittsstudie des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) stellte fest, dass in Deutschland pro Jahr 75 000 Patienten (110 von 100 000) an einer schweren Sepsis oder an einem septischen Schock und 79 000 Patienten (116 von 100 000) an einer Sepsis erkranken (Engel et al. 2007). Die Krankenhaus-Mortalität der Patienten mit schwerer Sepsis liegt schätzungsweise bei 55,2 % und man geht von 60 000 Sepsis-Todesfällen pro Jahr aus (Brunkhorst 2006, Engel et al. 2007). In Deutschland rangiert die Sepsis damit nach dem Myokardinfarkt auf Platz drei der häufigsten Todesursachen (Brunkhorst 2006). Eine kürzlich veröffentlichte Analyse der deutschlandweiten Fallpauschalen-bezogenen Sepsisfälle zeigte einen Anstieg der Sepsisfälle von 200 535 in 2007 auf 279 530 in 2013 (Fleischmann et al. 2016). 2013 starben trotz sinkender Krankenhaus-Mortalität 67 849 und damit etwa 12 % mehr Patienten an einer Sepsis (Fleischmann et al. 2016). Da die Datenlage unterschiedlich ist, können sich Inzidenz und Mortalität, abhängig von Datenerhebung und Datenauswahl, bis zu 3,5fach unterscheiden (Gaieski et al. 2013). Anhand der Extrapolation dieser Daten geht man davon aus, dass weltweit bis zu 19 Millionen Patienten pro Jahr an einer schweren Sepsis erkranken (Adhikari et al. 2010).

Es scheint Prädispositionen und Risikofaktoren für die Entwicklung einer schweren Sepsis und einer Organdysfunktion zu geben (Angus und van der Poll 2013). Prädisponierend sind das Säuglingsalter sowie ein höheres Alter, das männliche Geschlecht und möglicherweise eine schwarze Hautfarbe (Angus et al. 2001, Martin et al. 2003, Mayr et al. 2010, Moore et al. 2015).

Die Diagnostik, Therapie und Prognose der Sepsis sind mit hohen volkswirtschaftlichen Kosten verbunden. Allein in Deutschland werden durch die intensivmedizinische Versorgung der Patienten Kosten in Höhe von 1,77 Milliarden Euro pro Jahr (ca. 30 % des intensivmedizinischen Gesamtbudgets) erzeugt (Brunkhorst 2006). Und in den USA haben sich die direkten Kosten der Patienten-Versorgung von 16,7 Milliarden Dollar auf 24,3 Milliarden Dollar nahezu verdoppelt (Angus et al. 2001, Lagu et al. 2012).

1.1.4. Erregerspektrum und Infektionsweg

Atemwegsinfektionen sind in mehr als 50 % der Fälle der Infektionsfokus bei schwerer Sepsis oder septischen Schock, gefolgt von intraabdominellen und urogenitalen Infektionen (Angus et al. 2001, Engel et al. 2007, Finfer et al. 2004, Lagu et al. 2012, Ranieri et al. 2012, Silva et al. 2004, Vincent et al. 2006). Während die Zahl intraabdomineller Infektionen konstant bleibt, nimmt die Zahl urogenitaler Infektionen als Sepsisfokus ab (Annane et al. 2005, Hugonnet et al. 2003).

Bis in die 1990er Jahre waren gramnegative Bakterien die Haupterreger der Sepsis. Sie wurden von grampositiven Bakterien, vor allem durch den Anstieg Koagulase-negativer Streptokokken (Hugonnet et al. 2003), als häufigster Auslöser der Sepsis abgelöst (Martin et al. 2003). Daten von 1265 Intensivstationen aus 75 Ländern zeigten, dass aktuell gramnegative Bakterien (62 %), noch vor grampositiven Bakterien (47 %) und Pilzen (19 %), die häufigsten Erreger der Sepsis sind (Vincent et al. 2009). Die Pilz-Sepsen sind von 4,6 % in 2000 (Martin et al. 2003) auf 19 % in 2007 angestiegen und mit einer schlechteren Prognose verbunden (van der Poll und Opal 2008). Nur bei etwa einem Drittel gelingt die kulturelle Anzucht, während sie bei einem weiteren Drittel negativ ausfällt (Opal et al. 2003, Ranieri et al. 2012). Die häufigsten isolierten gramnegativen Erreger sind *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* sowie Klebsiellen-Spezies sind die am häufigsten isolierten grampositiven Bakterien (Opal et al. 2003, Ranieri et al. 2012, Vincent et al. 2009).

Auch der Infektionsweg (ambulant vs. nosokomial) hat einen Einfluss auf das Erregerspektrum und die Prognose (Hagel et al. 2013). Während die Letalität nosokomial erwor-

bener Sepsen bei 15 % liegt, ist die Letalität der ambulant erworbenen Sepsen mit 10 % etwas niedriger (Lenz et al. 2012). Seit der *European Prevalence of Infection in Intensive Care* (EPIC)-Studie aus dem Jahre 1995 hatte man angenommen, dass nosokomial auf der Intensivstation erworbene Infektionen wesentlich die Entwicklung einer schweren Sepsis begünstigen (Vincent et al. 1995). Die deutsche *Sepsis Competence Network* (SepNet)-Prävalenz-Studie (2005) zeigte, dass 39 % der Infektionen ambulant, 14 % auf der Intensivstation und 33 % im Krankenhaus außerhalb der Intensivstation erworben wurden (Engel et al. 2007).

1.1.5. Intensivmedizinische Scoring-Systeme

Scoring-Systeme finden seit den 1980er-Jahren regelhaft Anwendung in der Intensivmedizin. Sie dienen dazu, komplexe Syndrome für eine objektive Betrachtung zu vereinfachen und vergleichbar zu machen (Fleig et al. 2011). Meist stellen sich Score-Werte als Summenwerte dar. Die einzelnen Punktwerte wurden vorab durch Expertenmeinungen, abhängig von Bewertung und Ausprägung der jeweiligen Parameter, definiert (Fleig et al. 2011). Je nach Scoring-System ist eine Abschätzung der Prognose oder des Schweregrades sowie eine Abschätzung des Therapieerfolges während des Krankheitsverlaufs möglich (Fleig et al. 2011). Zu den in der Intensivmedizin etablierten und in dieser Arbeit verwendeten Scores gehören als Prognosescore der *Simplified Acute Physiology Score II* (SAPS II) und als dynamischer Verlaufsscore der *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) Score. Eine Übersicht beider Scores befindet sich im Anhang (Kapitel 8.3 und 8.4).

Der SAPS II erlaubt eine Einschätzung der Prognose sowie Letalität und basiert auf der Grundlage des von Le Gall et al. veröffentlichten *Simplified Acute Physiology Scores* (SAPS). Das Scoring-System beinhaltet 17 Variablen, darunter 11 physiologische Parameter, den *Glasgow-Coma-Scale* (GCS), das Alter, die Aufnahmeart (geplant chirurgisch, ungeplant chirurgisch oder medizinisch) sowie chronische Grunderkrankungen (metastasierende Neoplasie, hämatologische Neoplasie oder AIDS) (Le Gall et al. 1993). Die Bestimmung der Parameter findet innerhalb der ersten 24 Stunden des Intensivaufenthaltes statt, wobei jeweils die „schlechtesten“ Werte, d.h. am weitesten von den Normwerten abweichend, verwendet werden. Ein steigender Punktwert korreliert positiv mit einer Abweichung vom physiologischen Normalzustand und mit einer steigenden Letalität. Der in den SAPS II integrierte GCS (Kapitel 8.5) ermöglicht eine Einschätzung der Bewusstseinslage des Patienten anhand der Fähigkeit zur Augenöffnung, zur verbalen sowie zur motorischen Antwort. Der maximal zu erreichende Punktwert ist dabei 15. Es fließt immer die bestmögliche Antwort des Patienten auf die Reaktion in die Bewertung ein.

Der anfänglich als *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA) bezeichnete und von der amerikanischen Konsensuskonferenz zur Sepsisdefinition veröffentlichte SOFA Score, erlaubt eine Beobachtung des Krankheitsverlaufes sowie eine Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung (Vincent et al. 1996). Das Scoring-System beinhaltet sechs Organsysteme. Darunter Herz, Leber, Lunge, Niere, Gerinnungssystem und das zentrale Nervensystem (ZNS). Letzteres wird, identisch zum SAPS II, anhand des GCS beurteilt. Im SOFA Score werden die Organsysteme mit jeweils 0 bis 4 Punkten bewertet. Der Punktwert 0 steht für den physiologischen Normalzustand. Nur der jeweils schlechteste Wert des Tages fließt in die Wertung ein. Mehrere Studien bewiesen, dass die Höhe des SOFA Score positiv mit der Mortalität der Patienten korreliert (Ferreira et al. 2001, Minne et al. 2008).

1.2. Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer unspezifischen angeborenen Immunantwort und aus einer spezifischen adaptiven Immunantwort. Dringt ein Mikroorganismus in den menschlichen Körper ein, so ist die angeborene Immunantwort die erste Barriere (Janeway et al. 2001). Die Zellen der angeborenen Immunantwort können Erreger selbst abwehren und Zellen der adaptiven Immunantwort aktivieren. Bis zur effektiven Wirkung der adaptiven Immunantwort vergehen mehrere Tage, so dass die angeborene Immunantwort für die schnelle Bekämpfung eines eingedrungenen Erregers wichtig ist. Alle Zellen des Immunsystems entstehen aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Sie werden nach Eigenschaften und Funktion entweder der angeborenen oder der adaptiven Immunantwort zugeordnet. Eine Übersicht über die verschiedenen Zelltypen beider Systeme ist in Tabelle 1 dargestellt.

1.2.1. Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus löslichen und zellulären Komponenten. Zu den löslichen Komponenten zählen das Komplementsystem, Zytokine (Tabelle 2) und Akute-Phase-Proteine. Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen stellen u.a. die zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems dar (Tabelle 1). Die zur Phagozytose befähigten Makrophagen und Neutrophilen erkennen Struktur motive häufiger Erreger, binden diese und phagozytieren sie schließlich. Weiterhin initiieren sie über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege die Freisetzung zahlreicher Zytokine. Dendritische Zellen nehmen eine Stellung zwischen den beiden Immunsystemen ein. Sie werden in der Peripherie durch Pathogene zu Antigen-präsentierenden Zellen (APC) akti-

viert, migrieren in die sekundären lymphatischen Organe und aktivieren die dortigen T-Zellen. Weiterhin sezernieren dendritische Zellen ebenfalls zahlreiche Zytokine. Letztere sind von großer Bedeutung für die Koordination der angeborenen sowie der adaptiven Immunantwort. Eine detaillierte Beschreibung der Aktivierung des Immunsystems im Rahmen der Sepsis ist in Kapitel 1.2.3 beschrieben.

Tabelle 1: Übersicht über die Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit Darstellung der wichtigsten Funktionen

Zelltyp	Funktion
Angeborenes Immunsystem	
Granulozyten	
Neutrophile	Phagozytose von Mikroorganismen
Eosinophile	Degranulation (Allergien und Parasitenabwehr)
Basophile	Degranulation (Allergien und Parasitenabwehr)
Monozyten	Im Blut zirkulierende Vorläuferzellen der Makrophagen
Makrophagen	Phagozytose von Mikroorganismen und abgestorbenen Zellen; T-Zellaktivierung
Dendritische Zellen	T-Zell-Aktivierung via Antigen-Präsentation
Mastzellen	Degranulation, u.a. Histamin (Allergien und Parasitenabwehr)
NK-Zellen	Phagozytose (Viren und Tumorzellen); vgl. cytotoxische T-Zellen
Adaptives Immunsystem	
T-Zellen, CD8-positiv	
Cytotoxische T-Zellen	Eliminierung bakteriell/viral infizierter Zellen; vgl. NK-Zellen
T-Gedächtniszellen	Speicherung der spezifischen Immunreaktion
T-Zellen, CD4-positiv	
T _H -Zellen	Aktivierung T-Effektorzellen
T _{Reg} -Zellen	Inhibierung Immunsystem
T-Gedächtniszellen	Speicherung der spezifischen Immunreaktion
B-Zellen	
Plasmazellen	Immunglobulinsynthese
B-Gedächtniszellen	Speicherung der spezifischen Immunreaktion

CD, Cluster of differentiation; NK-Zelle, natürliche Killerzellen; T_H, T-Helferzellen; T_{Reg}, T-Regulatorzellen.

1.2.2. Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten. Obwohl beide Zelltypen von pluripotenten Zellen im Knochenmark abstammen, findet deren Differenzierung und Proliferation in unterschiedlichen primären Lymphorganen statt. Die unreifen B-Zellen verbleiben dazu im Knochenmark, wohingegen die unreifen T-Zellen in den Thymus migrieren. Beide Zelltypen erwerben dort im Rahmen einer sog. klonalen Selektion die Fähigkeit körpereigene von körperfremden Antigenen zu unterscheiden. Erkennen Lymphozyten körpereigene Antigene als körperfremd, so kommt es zur klonalen Deletion dieser Zellen. Nach Abschluss dieser Reifungsprozesse migrieren beide Zelltypen ins Blut und in die Lymphe, um von dort aus in die sekundären Lymphorgane zu gelangen. Sie werden so lange als naive Lymphozyten bezeichnet, bis eine Aktivierung durch Antigene stattfindet. B-Zellen stellen durch die Synthese von Immunglobulinen die humorale, T-Zellen die

zelluläre Komponente der adaptiven Immunantwort dar. Die spezifischen Funktionen der B- und T-Lymphozyten sind in Tabelle 1 im Überblick dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten pro- und antiinflammatorischen Zytokine [modifiziert nach Schulte et al. (2013)].

Zytokin	Quelle	Funktion	Interaktion mit anderen Zytokinen
<i>Proinflammatorisch</i>			
TNF α	Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems; v.a. Makrophagen und Lymphozyten	- Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen - Induktion Fieber und Koagulation - Apoptose	- Förderung der Freisetzung proinflammatorischer Effektormoleküle
IL-1	Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems; v.a. Makrophagen und Lymphozyten	- Induktion Fieber und Koagulation - Hämatopoese - Förderung der Extravasation der Immunzellen	- Förderung der Freisetzung proinflammatorischer Effektormoleküle
IL-6	Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems; v.a. Makrophagen und Lymphozyten	- Aktivierung von T- und B-Zellen - Modulation der Hämatopoese und Akute-Phase-Reaktion - Induktion Fieber	- Sekretion durch TNF α und IL-1 - Inhibition von TNF α und IL-1 - Förderung antiinflammatorischer Immunantworten
IL-12	- Monozyten/Makrophagen - Neutrophile - Dendritische Zellen	- Differenzierung T _{H1} -Zellen	- Induktion von IFN γ
IFN γ	- NK-Zellen - T _{H1} -Zellen und CD8 ⁺ T-Zellen	- antivirale Aktivität - kann möglicherweise die Immunparalyse in der Sepsis aufheben	- Sekretion durch TNF α , IL-12 und IL-18
<i>Antiinflammatorisch</i>			
IL-10	Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems	- Immunsuppression durch gestörte Antigen-Präsentation und Phagozytose	- Suppression der Sekretion proinflammatorischer Zytokine
IL-4	- T _{H2} -Zellen - Mastzellen - Basophile, Eosinophile	- Differenzierung von T _{H2} -Zellen	- Induktion makrozytäre Sekretion von IL-4 und IL-13

CD, Cluster of differentiation; IFN γ , Interferon- γ ; IL, Interleukin; T_{H1}, T-Helferzellen Typ 1; T_{H2}, T-Helferzellen Typ 2; TNF α , Tumornekrosefaktor α ; T_{Reg}, T-Regulatorzellen.

1.2.3. Pathophysiologie der Sepsis

Seit den 1990er Jahren wird die Hypothese, dass die Dynamik der Sepsis von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Immunreaktionen abhängt, diskutiert (Bone et al. 1997). Die Sepsis-Forschung befasste sich lange Zeit vorwiegend mit der Beeinflussung proinflammatorischer Prozesse. Heute geht man davon aus, dass die Immunantwort vermutlich in zwei antagonistischen, sich jedoch überschneidenden Phasen, abläuft (Kovach und Standiford 2012). Die frühe Phase der Sepsis ist gekennzeichnet durch eine überschießende proinflammatorische Antwort des Immunsystems als Reaktion auf die Infektion (SIRS). Diese kann möglicherweise zeitgleich durch die Initiierung antiinflammatorischer Mechanismen (*Compensatory anti inflammatory response syndrome*, CARS) kompensiert werden. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht, das in einer Immunparalyse münden kann. Die Immunparalyse ist z.B. durch die Reaktivierung latenter Virusinfektio-

nen (Walton et al. 2014) oder durch opportunistische Infektionen und Erreger (sog. Sekundärinfektionen), die das Immunsystem weiter schwächen (Otto et al. 2011), gekennzeichnet.

Eine Sepsis entsteht, wenn pathogene Erreger die natürlichen Schutzbarrieren (z.B. Haut und Schleimhäute) des Körpers überwinden. Dies führt zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Die Reaktionen des Organismus auf ebensolche Erreger hängen von der Rezeptorbindung spezifischer Struktur motive ab. *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) binden an *Pattern recognition receptors* (PRRs), die sich auf der Zelloberfläche der Immunzellen des angeborenen Immunsystems befinden (Janeway und Medzhitov 2002). Die PRRs, die für die Erkennung der Mikroorganismen sorgen, gehören zu der Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLR), die z.B. eine hohe Ligandenspezifität für Oberflächenproteine von Bakterien, Pilzen und Hefen besitzen (Aderem und Ulevitch 2000). Diese Bindungen unterliegen einem komplexen Mechanismus. Gramnegative Bakterien besitzen in der äußeren Zellmembran lokalisierte Lipopolysaccharide (LPS) (Alexander und Rietschel 2001). Diese sogenannten Endotoxine binden an den *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) (Hoshino et al. 1999). Hierzu wird das LPS von dem LPS-Bindeprotein (LPB) zu dem Korezeptor des TLR4, dem *Cluster of differentiation 14* (CD14), transportiert (Wright et al. 1990). Unter Anwesenheit des *Myeloid differentiation factor 2* (MD2) wird der TLR4 aktiviert (Nagai et al. 2002). Grampositive Bakterien besitzen keine Endotoxine. Das Immunsystem identifiziert diese über zwei andere Mechanismen. Einerseits erkennt der *Toll-like* Rezeptor 2 (TLR2) ihre Zellwandbestandteile, das Peptidoglykan und die Lipoteichonsäure, als PAMPs (Schwandner et al. 1999, Takeuchi et al. 1999). Andererseits können grampositive Bakterien sogenannte Exotoxine synthetisieren, z.B. das *Toxic shock syndrome Toxin-1* (TSST-1), das zu sehr akuten und sehr schweren Formen des septischen Schocks führen kann (Bochud und Calandra 2003). Die Exotoxine können dabei als „Superantigen“ (Cohen 2002) eine T-Zell-Aktivierung mit anschließender Freisetzung proinflammatorischer Zytokine triggern (Lavoie et al. 1999). Intrazellulär führt die PAMP/PRR-Interaktion zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die meist in einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (*Nuclear factor κB*, *Activator protein 1*, Fos, Jun) mündet. Die Genexpression der an der Immunantwort beteiligten Gene wird so kontrolliert und führt zur Freisetzung zahlreicher Effektormoleküle (z.B. Zytokine, Chemokine) (Bochud und Calandra 2003, Cohen 2002). Ein wesentlicher und gut untersuchter Signalweg ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor κB* (NF-κB), der von großer Bedeutung für die humane Immunantwort ist (Fang et al. 2012, Liu und Malik 2006). Die Bindung von PAMPs an ihre Rezeptoren führt zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges. Viele inflammatorische Signalmoleküle sind Zielgene von NF-κB (Pahl 1999).

Zytokine sind von großer Bedeutung für die Koordination der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Calandra 2001). Eine Übersicht über die wichtigsten pro- und antiinflammatorischen Zytokine ist in Tabelle 2 dargestellt. Zellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, Makrophagen) sezernieren den Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und das Interleukin 1 (IL-1) (Dinarello 1997). Diese sogenannten „Alarmzytokine“ (Bauer et al. 2006) initiieren weitere Signalwege (Cohen 2002). Dazu gehört die Sekretion vieler Mediatoren, wie z.B. der Interleukine IL-6, IL-8, IL-15 und IL-18 (Cohen 2002) sowie des *High-mobility group box-1-Proteins* (HMGB 1) (Riedemann et al. 2003). Weiterhin kommt es zur Sekretion von Chemokinen mit dem Ziel, naive, zum adaptiven Immunsystem gehörende T-Lymphozyten anzulocken und zu aktivieren (Janeway und Medzhitov 2002). Aktivierte T-Zellen können Zelltyp-abhängig proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine sezernieren. Der Mechanismus, ob ein Pathogen T-Helferzellen vom Typ 1 (T_{H1}) oder Typ 2 (T_{H2}) aktiviert, ist vermutlich vom jeweiligen Erreger abhängig (Abbas et al. 1996). Während T_{H1}-Zellen durch die Ausschüttung von TNF α , Interferon- γ (INF γ) und IL-2 proinflammatorisch wirken, besitzen T_{H2}-Zellen durch die Freisetzung von IL-4 und IL-10 antiinflammatorische Eigenschaften (Abbas et al. 1996, Opal und DePalo 2000). Anhand der IL-10- und TNF α -Serumkonzentration ist eine Aussage über die Mortalität der Sepsis möglich (Gogos et al. 2000).

1.3. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und S1P-Rezeptoren

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren 1, 2, 3, 4 und 5 (S1PR1-5) spielen eine wichtige Rolle im Herzkreislauf-, Nerven- und Immunsystem (Blaho und Hla 2014). Letzteres wird in dieser Arbeit genauer untersucht. S1P wirkt auf die Immunzellen vor allem durch Effekte auf die Migration, die Steuerung der Lymphozyten-Zirkulation ist einer der am besten erforschten Effekte des S1P (Blaho und Hla 2014).

In der bereits veröffentlichten Arbeit dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Serum-S1P-Konzentration in der Sepsis signifikant vermindert ist (Winkler et al. 2015). Die Auswirkungen dieser S1P-Konzentrationsveränderung auf die Immunzellen, insbesondere auf die Lymphozyten, sowie die Expression des S1PR1 in der Sepsis ist unklar. Im Folgenden wird zunächst auf das S1P und die S1PRs und anschließend auf die S1P/S1PR1-Wirkungen auf Lymphozyten eingegangen.

1.3.1. Sphingosin-1-Phosphat

Das Sphingosin-1-Phosphat (C₁₈H₃₈NO₂P) ist die phosphorylierte Form des langkettigen,

ungesättigten Aminoalkohols Sphingosin ($C_{18}H_{37}NO_2$). Sphingosine bilden das Grundgerüst der Sphingolipide und sind in allen eukaryotischen Zellen ein wichtiger Bestandteil von Membranen (Holthuis et al. 2001).

Die Vorstufen des S1P, Ceramid und Sphingosin, galten lange Zeit als inaktive Abbauprodukte (Van Brocklyn und Williams 2012). Die Erkenntnis, dass diese Lipide jedoch zum Teil sehr gegensätzliche biologische Wirkungen auf Zellen haben, veränderte deren Einschätzung. Der sog. Sphingolipid-Rheostat (Abbildung 1) reguliert das Gleichgewicht zwischen S1P und Ceramid bzw. Sphingosin (Maceyka et al. 2002). Die drei ineinander umwandelbaren Metabolite verhalten sich diesbezüglich antagonistisch: Während das S1P das Zellwachstum fördert und die Apoptose verhindert, inhibieren Ceramid und Sphingosin das Zellwachstum und fördern die Apoptose (Cuvillier et al. 1996, Hait et al. 2006, Maceyka et al. 2002). Die Ceramide stehen im Zentrum des Sphingolipid-Metabolismus und gelten als dessen Dreh- und Angelpunkt (Hannun und Obeid 2008). Drei Mechanismen können für einen Anstieg der intrazellulären Menge an Ceramid sorgen:

1. Die *De-Novo*-Synthese am Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Hannun et al. 2001).
2. Die reversible Hydrolyse des aus der Lipidmembran gelösten Sphingomyelins durch Sphingomyelinasen (Skoura und Hla 2009).
3. Das Recycling durch die Re-Acetylierung von Sphingosin im Rahmen des sog. *Salvage Pathway* (Kitatani et al. 2008).

Die Hydrolyse des synthetisierten Ceramids zu Sphingosin erfolgt durch Ceramidasen (Galadari et al. 2006, Xu et al. 2006). Aufgrund der Umkehrbarkeit der Syntheseschritte kann das Sphingosin entweder mittels einer Ceramid-Synthase zu Ceramid kondensiert werden oder zu Sphingosin-1-Phosphat phosphoryliert werden. Letzteres wird durch die beiden Isoenzyme der Sphingosinkinase (SphK), SphK1 und SphK2, katalysiert. Die Sphingosinkinasen sind wichtige Regulatoren des Sphingolipid-Reostats, da sie durch ihre Aktivität vermutlich antiapoptotisches S1P und durch ihre Inaktivität proapoptotisches Sphingosin synthetisieren (Hait et al. 2006). Eine Deletion beider Sphingosinkinasen ist in Mäusen letal (Mizugishi et al. 2005, Pappu et al. 2007).

S1P wird entweder durch die S1P-Lyase irreversibel zu Phosphoethanolamin und Hexadecanal degradiert, wobei letzteres durch Reduktion zu Palmitat dem Lipidstoffwechsel zugeführt werden kann, oder zu Sphingosin umgewandelt (Hannun und Obeid 2008). Katalysiert wird dieser Schritt durch die S1P-spezifischen Phosphatasen S1P-Phosphatase 1

(SPP1) und S1P-Phosphatase 2 (SPP2) (Johnson et al. 2003, Ogawa et al. 2003) oder durch unspezifische Lipidphosphat-Phosphatasen (LPP) (Brindley und Pilquill 2009).

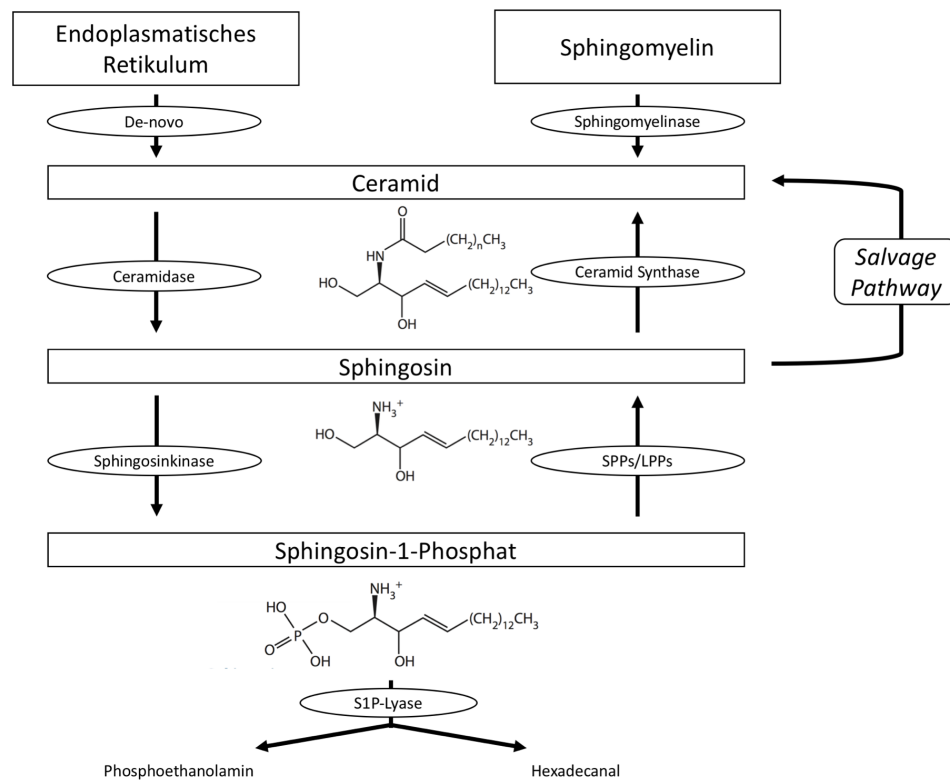


Abbildung 1: Darstellung des S1P-Metabolismus. S1P, Sphingosin-1-Phosphat; SPP, Sphingosin-Phosphatase; LPP, Lipidphosphatase.

Grundsätzlich sind alle Zellen zur S1P-Synthese fähig. Es gibt bestimmte Zellen bzw. biologische Speicher, die als Hauptquellen gelten. Hierzu gehören die Thrombozyten (Yatomi et al. 1995) und die Erythrozyten (Hanel et al. 2007, Ito et al. 2007, Pappu et al. 2007). Vaskuläre Endothelzellen sind ebenfalls an der Regulation der S1P-Konzentration beteiligt. *In vitro* Experimente zeigten eine, durch auf das Endothel wirkende laminare Scherkräfte induzierte, gesteigerte Synthese und Sekretion von S1P (Venkataraman et al. 2008). Die S1P-Konzentration in der Lymphe wird vermutlich eigenständig durch die S1P-Synthese lymphatischer Endothelzellen kontrolliert (Pappu et al. 2007).

Für die Migration von Immunzellen ist ein S1P-Gradient wichtig. Die Konzentration eines lokalen S1P-Gradienten kann durch die jeweilige Enzymaktivität der für den Sphingolipid-Metabolismus wichtigen Enzyme bestimmt werden (Abbildung 1). S1P ist im Gewebe aufgrund der schnellen Degradation durch die gewebebeständige S1P-Lyase instabil (Rivera et al. 2008). Während im lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe somit niedrige

S1P-Konzentrationen vorliegen, ist die S1P-Konzentration in Blut und Lymphe, wie in Abbildung 2 dargestellt, erhöht (Pappu et al. 2007, Schwab et al. 2005).

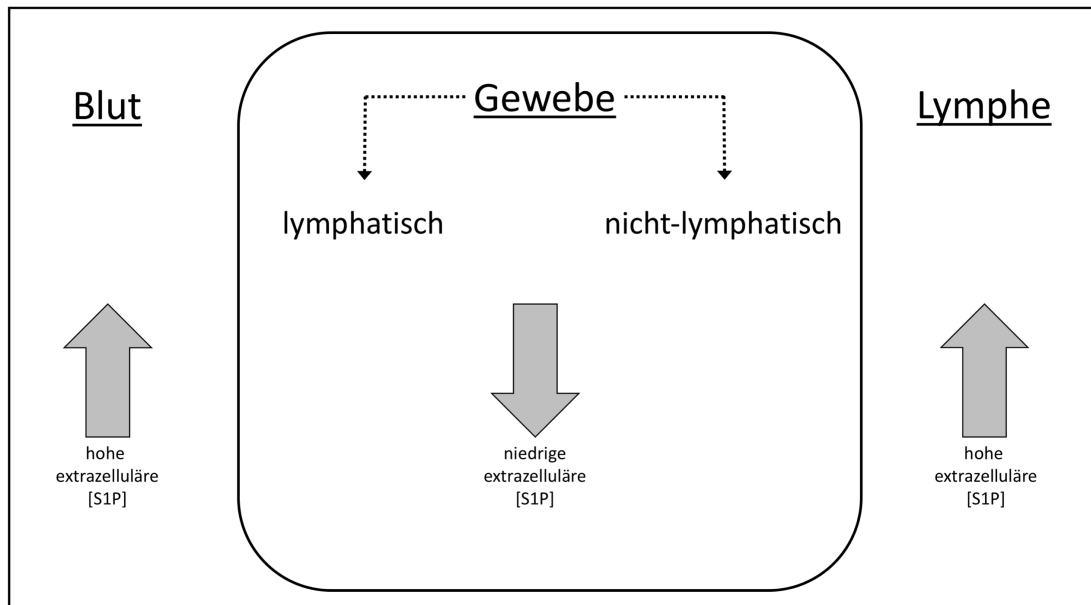


Abbildung 2: Darstellung der S1P-Konzentration in Abhängigkeit von der Umgebung. S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

Sowohl im Plasma als auch im Serum liegt das S1P in einer, vor der Degradation geschützten, proteingebundenen Form vor (Murata et al. 2000). S1P bindet vor allem an Lipoproteine. Primär an das *High-density lipoprotein* (HDL) (Aoki et al. 2005, Okajima 2002). Wobei das Apolipoprotein M vermutlich das eigentliche Bindeprotein für S1P ist (Christoffersen et al. 2011). Auch das *Low-density lipoprotein* (LDL) sowie das Plasma-protein Albumin können S1P binden (Aoki et al. 2005, Okajima 2002).

1.3.2. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

1991 wurde erstmals beschrieben, dass unterschiedliche S1P-Konzentrationen das Zellwachstum beeinflussen (Zhang et al. 1991). Der Signalmechanismus des S1P gilt als evolutionär konserviert, da S1P auch in Hefen, Fliegen und Würmern nachweisbar ist (Skoura und Hla 2009). Die Bedeutung des S1P als Kontroll-Molekül diverser physiologischer sowie pathologischer Signalwege wurde mit der Entdeckung des S1P als Ligand der *Endothelial differentiation gene* (EDG)-1-Rezeptor-Familie deutlich (Lee et al. 1998). Dem folgte die Entdeckung von EDG-3, EDG-5, EDG-6 und EDG-8 als weitere S1P-Rezeptoren (Malek et al. 2001, Spiegel 2000). Diese Erkenntnisse führten zur Änderung der Nomenklatur der EDG-Rezeptoren, so dass aus den Rezeptoren EDG-1, EDG-5, EDG-3, EDG-6 und EDG-8 die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren S1PR1, S1PR2,

S1PR3, S1PR4 und S1PR5 wurden (Chun et al. 2002). Das S1P wirkt zwar hauptsächlich über die Bindung an die EDG-Rezeptoren. Allerdings hat es zusätzlich eine intrazelluläre Funktion als sogenannter *Second-Messenger*. Das S1P nimmt so z.B. Einfluss die Kontrolle der Calcium-Homöostase (Mattie et al. 1994) sowie auf den Schutz vor der Apoptose (Cuvillier et al. 1996).

Die EDG-Rezeptoren sind Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Protein (G-Protein) - gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und besitzen sieben Transmembrandomänen. Die heterotrimeren G-Proteine dissoziieren nach ihrer Aktivierung in ihre Untereinheiten (α , β/γ) und aktivieren verschiedene Signalwege. Die vielfältigen zellulären Effekte des S1P entstehen, in Abhängigkeit des jeweiligen G-Proteins, durch die Aktivierung bzw. Inhibierung verschiedener Effektormoleküle. Eine Übersicht der Signalwege ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Kopplung der S1PRs mit den G-Proteinen ist abhängig von dem jeweiligen Rezeptor-Subtyp, findet aber vor allem über die Untereinheiten G_i , G_q sowie $G_{12/13}$ statt (Ancellin und Hla 1999, Malek et al. 2001, Windh et al. 1999). Während G_i , Pertussis-Toxin (PTX)-abhängig, das Überleben, die Proliferation und die Motilität der Zellen beeinflusst, aktiviert G_q vor allem Signalwege mit zahlreichen Effektorfunktionen. $G_{12/13}$ wirkt auf den Umbau des Zytoskelettes und auf Änderungen der Zellform ein (Rosen und Goetzl 2005).

Die einzelnen S1PRs zeigen innerhalb von Zellen und Geweben verschiedene Expressionsmuster (Sanchez und Hla 2004). S1PR1-3 werden nahezu ubiquitär exprimiert (Spiegel 2000). S1PR4 wird überwiegend auf lymphatischen und hämatopoetischen Zellen und Geweben sowie in der Lunge exprimiert (Graler et al. 1998). S1PR5 lässt sich vorwiegend im Gehirn und in der Milz nachweisen (Im et al. 2001, Im et al. 2000, Malek et al. 2001).

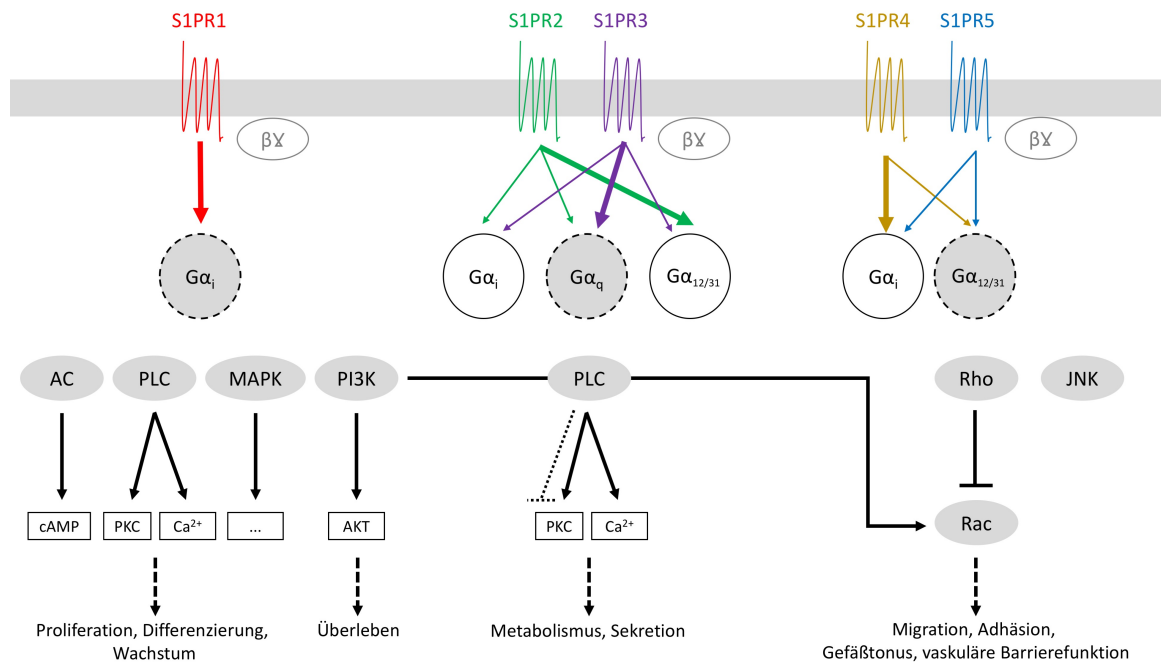


Abbildung 3: Überblick über die Signaltransduktion der S1P-Rezeptoren 1-5 mit Darstellung der G-Protein-Dissoziation in die α - und β/γ -Untereinheit mit nachfolgenden Aktivierungsketten. AC, Adenylcyclase; Ca²⁺, Calcium; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; MAPK, Mitogen-activated protein-Kinasen; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PLC, Phospholipase C; PKC, Proteinkinase C; S1PR, S1P-Rezeptor. [Abbildung modifiziert und nachgezeichnet nach Spiegel und Milstien (2003)]

1.3.3. Einfluss der S1P-S1PR1-Achse auf die Lymphozyten

S1P beeinflusst die Migration von T- und B-Lymphozyten. Die chemotaktischen Wirkungen des S1P werden durch die S1P-Konzentration im Plasma sowie durch die S1PR-Oberflächenexpression der lymphatischen Zellen bestimmt. Bei niedrigen Plasmakonzentrationen (10 nM bis 0,1 μ M) hat das S1P eine direkte chemotaktische Wirkung auf T-Zellen (Graeler und Goetzl 2002). Bei höheren S1P-Plasmakonzentrationen (0,3 μ M bis 3 μ M) können die chemotaktischen Effekte des S1P auf T-Zellen um bis zu 70 % reduziert sein (Graeler et al. 2002).

Der Einfluss des S1P auf die Lymphozyten-Zirkulation konnte anhand des Immunmodulators FTY720 (Fingolimod) beobachtet werden. Das Prodrug FTY720 besitzt durch eine Sphingosinkinase-vermittelte Phosphorylierung strukturelle Ähnlichkeiten zum S1P (Brinkmann et al. 2002, Clemens et al. 2003) und bindet nicht selektiv sowie mit hoher Affinität vor allem an S1PR1 aber auch an S1PR 3-5 (Brinkmann et al. 2002, Mandala et al. 2002). Das phosphorylierte FTY720, FTY720-P, wirkt agonistisch auf die S1PRs. Nach längerer Applikation wirkt es jedoch als funktioneller Antagonist: Nach Bindung des FTY720-P an S1PR1 kommt es zur Rezeptor-Internalisierung und -Degradation (Graeler und Goetzl 2004, Oo et al. 2007). Die so induzierte Rezeptor-Downregulierung verursacht eine verminderte Empfindlichkeit der Lymphozyten auf den S1P-Gradienten (Brinkmann

et al. 2004). Anhand einer Blockade der S1PR1-kontrollierten Lymphozyten-Zirkulation ließen sich verminderte Lymphozytenzahlen im Blut beobachten (Pinschewer et al. 2000, Yanagawa et al. 1998). Man entdeckte, dass diese Lymphopenie durch eine Blockade des Lymphozyten-Austritts aus den sekundären lymphatischen Organen verursacht wurde (Mandala et al. 2002, Pinschewer et al. 2000). Therapeutische Anwendung findet dieser Mechanismus in der Therapie der schubweise remittierenden Multiplen Sklerose (Cohen et al. 2010, Kappos et al. 2010). Unter dem Namen Gilenya® ist das FTY720 seit März 2011 als Zweitlinientherapie nach einer nicht erfolgreichen Behandlung der Patienten mit Interferon β (INF β) oder bei Patienten mit einer rasch fortschreitenden Form der Erkrankung in Anwendung (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2012).

Die Regulation der Lymphozyten-Zirkulation erfolgt über den S1PR1 (Sanna et al. 2004). Matloubian et al. zeigten in Knockout-Mäusen, deren hämatopoetischen und lymphatischen Zellen keinen S1PR1 exprimierten, eine Änderung der Verteilung der T- und B-Lymphozyten (Matloubian et al. 2004). Während die T-Lymphozyten im Thymus akkumulierten und im Blut sowie in den SLO fehlten, reichert sich die B-Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen an und waren im Blut sowie in der Lymphe reduziert (Matloubian et al. 2004). Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen Lo et al. anhand von Mausmodellen, in denen retroviral eine S1PR1-Überexpression induziert wurde (Lo et al. 2005). Diese führte zur Reduktion der B-Zellen in den SLO und förderte den Austritt aktivierter T-Zellen aus den Lymphknoten (Lo et al. 2005).

Voraussetzung für die Zirkulation der Lymphozyten ist ein S1P-Konzentrationsgradient zwischen Blut bzw. Lymphe und lymphatischem bzw. nicht-lymphatischem Gewebe (Abbildung 4). Die Lymphozyten erkennen diesen Gradienten dabei über den S1PR1 (Schwab et al. 2005). In sekundären Lymphorganen ist der S1PR1 auf Lymphozyten hochreguliert (Lo et al. 2005) und die S1P-Konzentration im lymphatischen Gewebe niedrig (Pappu et al. 2007, Schwab et al. 2005). In Blut und Lymphe hingegen ist die S1P-Konzentration hoch (Pappu et al. 2007, Schwab et al. 2005) und der S1PR1 auf Lymphozyten herunterreguliert (Lo et al. 2005). Nach Migration der Lymphozyten aus dem Blut in die sekundären Lymphorgane kommt es aufgrund dort herrschender niedriger S1P-Konzentrationen dementsprechend zu einer Hochregulation des S1PR1 auf Lymphozyten. Die Lymphozyten können dann erleichtert aus den Lymphorganen auswandern (Allende et al. 2004, Matloubian et al. 2004). Bei Migration der Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen in die S1P-reichere Lymphe kommt es dann wiederum zu einer Downregulation des S1PR1 auf den Lymphozyten. Im peripheren Blut bleibt die S1PR1-Expression auf den Lymphozyten niedrig, so dass eine Rezirkulation in die sekundären

Lymphorgane entlang des S1P-Konzentrationsgradienten möglich ist (sog. Lymphozyten-Homing). Gleichen sich die S1P-Konzentrationen an, so kommt der Austritt der Lymphozyten aus den Lymphorganen zum Erliegen (Pappu et al. 2007). Aufrechterhalten wird der Gradient durch die Degradation des S1P mittels S1P-Lyase (Schwab et al. 2005) und durch die S1P-Synthese mittels der S1P-Kinasen (Pappu et al. 2007). In der Lymphe spielen lympho-eigene Mechanismen eine Rolle für die Aufrechterhaltung des Gradienten (Pappu et al. 2007).

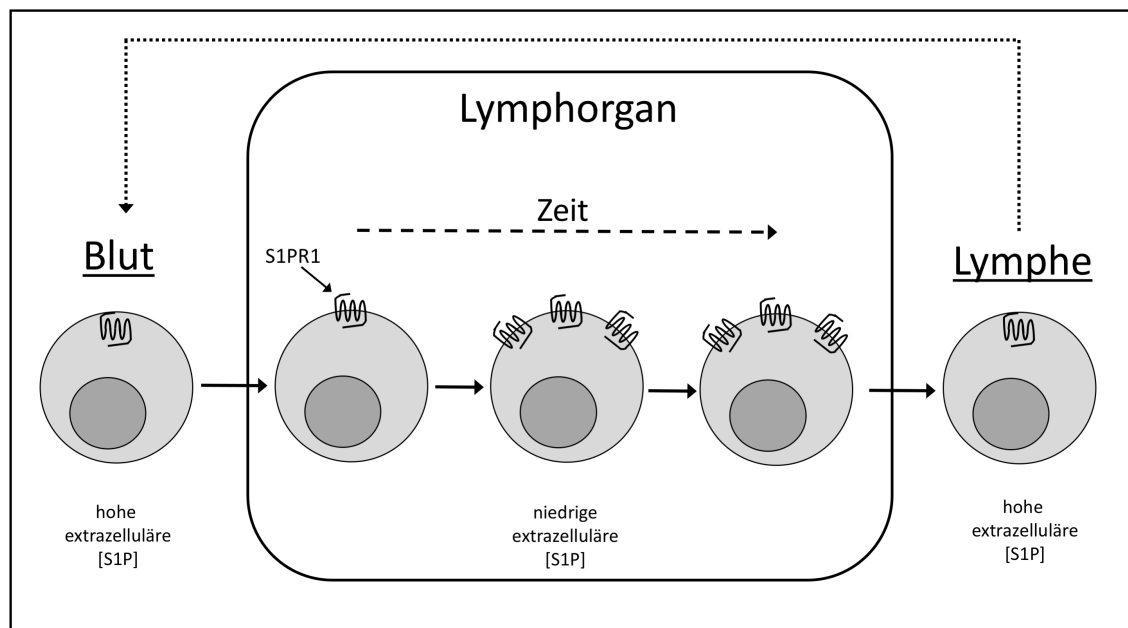


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lymphozytenzirkulation zwischen Blut, Lymphe und Lymphorganen in Abhängigkeit der S1P-Konzentration und S1PR1-Expression auf den Lymphozyten. S1P, Sphingosin-1-Phosphat; S1PR1, Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor [modifiziert nach (Lo et al. 2005)].

Die S1PR1-vermittelte Migration der T-Lymphozyten aus den Lymphorganen ist ein streng regulierter Prozess. Die erste Regulierung findet zunächst während der Reifung der T-Lymphozyten im Thymus statt (Matloubian et al. 2004). Dort fördert S1PR1 den T-Zell-Austritt (Allende et al. 2004, Matloubian et al. 2004). Wohingegen der Chemokinrezeptor 7 (CCR7) antagonistische Signale vermittelt (Ishimaru et al. 2012, Matloubian et al. 2004). In der frühen Phase der T-Zell-Reifung überwiegt das CCR7-Signal (Matloubian et al. 2004). In der späten Phase der T-Zell-Reifung übertrifft das S1PR1-Signal das CCR7-Retentionssignal und es kommt zum Austritt der T-Zellen in die Peripherie (Allende et al. 2004, Ishimaru et al. 2012, Matloubian et al. 2004). Ähnliche Regulationsmechanismen gelten für den Austritt von T-Effektorzellen aus den Lymphknoten in die Zirkulation (Pham et al. 2008). Auf transkriptioneller Ebene wird der S1PR1 durch den Transkriptionsfaktor *Krüppel-like factor 2* (KLF2) reguliert. Die Expressionsmuster des KLF2 spiegeln während

der frühen T-Zell-Aktivierung und im Laufe der T-Zell-Differenzierung die Expressionsmuster des S1PR1 wider (Bai et al. 2007). Knockout-Mäuse mit einem KLF2-Defekt zeigten einen gestörten T-Zell-Austritt aus dem Thymus in die Peripherie (Carlson et al. 2006). Der *Cluster of Differentiation 69* (CD69), einer der ersten von T-Zellen exprimierten Oberflächenrezeptoren, ist ein funktioneller Antagonist des S1PR1. Durch eine Immunpräzipitation der beiden Rezeptoren reguliert der CD69 den S1PR1 auf der posttranskriptionellen Ebene (Shiow et al. 2006). Diese Komplexbildung gleicht einer Liganden-gebundenen Konformation und initiiert die Internalisierung sowie die Degradation des S1PR1 (Bankovich et al. 2010). Dementsprechend inhibiert CD69 die S1PR1-vermittelte Chemotaxis und den Austritt der Lymphozyten aus den lymphatischen Organen (Shiow et al. 2006). Die Interaktion zwischen dem CD69 und dem S1PR1 geschieht in einer reziproken Weise, wobei jeweils der Rezeptor mit der höheren Expression in seiner Wirkung überwiegt (Chu et al. 2003, Shiow et al. 2006).

2. Methoden

2.1. CySep-Studie

Die CySep-Studie dieser Arbeitsgruppe ist eine prospektive Kohortenstudie bei der der Patienteneinschluss über einen Zeitraum von acht Monaten (04/2014 – 11/2014) erfolgte (Winkler et al. 2015). Die Zielgruppe dieser Studie waren Patienten, die an einem SIRS bzw. einer Sepsis erkrankt waren. Sämtliche Patienten waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses intensivpflichtig und befanden sich auf den Intensivstationen des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE). Eine Zustimmung der Studiendurchführung seitens der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg auf der Grundlage der Deklaration von Helsinki (1964) lag vor (Bearbeitungsnummer PV4550). Die Studienteilnehmer bzw. deren bevollmächtigten Betreuer stimmten der Teilnahme an der Studie sowie der Veröffentlichung ihrer Daten in anonymisierter Form durch Unterzeichnung eines entsprechenden Formblatts zu (Kapitel 8.2).

Insgesamt wurden 100 Patienten in die Studie eingeschlossen, die anhand des Schweregrades der Sepsis in drei Gruppen eingeteilt wurden. Der Gruppe A wurden Patienten, die das klinische Bild eines SIRS oder einer Infektion zeigten, zugeordnet (n=40). Der Gruppe B wurden Patienten, die das klinische Bild einer schweren Sepsis zeigten, zugeordnet (n=30). Der Gruppe C wurden Patienten, die das klinische Bild des septischen Schocks zeigten, zugeordnet (n=30). Darüber hinaus wurden 20 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter sowie Studentinnen und Studenten des UKEs für die Kontrollgruppe K (n=20) in die Studie eingeschlossen.

Als Einschlusskriterien galten die Leitlinien der deutschen Sepsisgesellschaft bezüglich der jeweiligen Schweregrade der Sepsis (vgl. Kapitel 1.1.2). Ausschlusskriterien waren eine Schwangerschaft bzw. Stillzeit, ein kardiogener Schock sowie ein moribunder Status. Weiterhin führten ein Alter unter 18 Jahren und ein fehlendes Einverständnis zum Studienausschluss.

2.1.1. Studienablauf

Wie bei Winkler et al. beschrieben, wurden an insgesamt drei Tagen entweder Blutentnahmen vorgenommen und/oder klinische Daten erhoben (Winkler et al. 2015). Die Studientage waren von sechs Uhr des Vortages bis sechs Uhr des Folgetages definiert. Am Einschlusstag (Tag 0) hat in der Regel keine Blutentnahme stattgefunden, es sei denn Tag 1 fiel aus organisatorischen Gründen auf Tag 0. In der Gruppe B und C fand an

Tag 1, Tag 3 sowie an Tag 7 eine Blutentnahme sowie die Erhebung klinischer Daten statt. Für die Gruppe A erfolgte sowohl die Blutentnahme als auch die Erhebung der klinischen Daten nur an Tag 1. Der Tag 28 galt für alle drei Gruppen als *Follow-Up* Tag und diente der Überprüfung des Überlebens der Patienten. Bei der Kontrollgruppe K fand eine einmalige Entnahme von Blutproben statt. Für die Untersuchung des Rezeptorstatus der PBMC wurden aus der Patienten-Gesamtpopulation dieser Arbeitsgruppe (Winkler et al. 2015) jeweils 15 Patienten aus der Gruppe A, B und C selektiert, so dass sich die in dieser Arbeit untersuchte Patienten-Gesamtpopulation aus 45 Patienten sowie 20 Kontrollen zusammensetzte (Abbildung 5). Im Unterschied zu der Untersuchung von Winkler et al. bezogen sich die Untersuchungen dieser Arbeit ausschließlich auf die Betrachtung von Studientag 0 und Studientag 1. Die Blutentnahme erfolgte überwiegend über einen arteriellen Zugang. Bei Fehlen eines arteriellen Zugangs fand eine Blutentnahme aus dem venösen System statt (zentralvenös oder peripher). An den Studientagen wurden jeweils ein Serum-, ein Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-, ein Gerinnungs- und ein Blutgasanalyse-röhrchen abgenommen. Das Zentrallabor des UKEs bestimmte daraus weitere Parameter: Blutbild und Differentialblutbild, Gerinnungsparameter (Quick-Wert), Fettstoffwechselparameter (*Very low-density lipoprotein* (VLDL), *Low-density lipoprotein* (LDL), *High-density lipoprotein* (HDL)), Leberfunktionsparameter (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Albumin, Bilirubin), Entzündungsparameter (Procalcitonin (PCT), C-reaktives Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6)), Kreatinin, Harnstoff und Laktat.

Für die S1P-Bestimmung wurde ein Serum- und ein EDTA-Röhrchen abgenommen. Für die Separierung der PBMC erfolgte eine zusätzliche Blutentnahme mittels eines BD Vacutainer® *Cell Preparation Tube* (CPT) Systems. Diese drei zusätzlich abgenommenen Probenentnahmeröhrchen wurden innerhalb von drei Stunden im Labor der Gefäßmedizin/Intensivmedizin des UKEs aufgearbeitet.

Studien-Kohorte (Winkler et al. 2015)	Studieneinschluss (Tag 0) n=100			K Kontrolle n=20
	A SIRS/Infektion n=40 → Tag 1	B schwere Sepsis n=30 → Tag 1 → Tag 3 → Tag 7	C septischer Schock n=30 → Tag 1 → Tag 3 → Tag 7	
Studien-Subkohorte	Selektion für Rezeptorexpression in PBMC n=45			K Kontrolle n=20
	A SIRS/Infektion n=15 → Tag 1	B schwere Sepsis n=15 → Tag 1	C septischer Schock n=15 → Tag 1	
Follow-Up (Tag 28)				

Abbildung 5: Übersicht der Studien-Kohorte und Studien-Subkohorte unter Angabe der Zeitpunkte der Probennahme.

2.1.2. Probenaufarbeitung

Die EDTA-Röhrchen wurden bei 3000 *revolutions per minute* (rpm) für 15 Minuten im Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend sind jeweils 500 µl des Überstandes in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren worden (-20 °C). Nachdem die Serum-Röhrchen 120 Minuten aufrecht und bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, sind sie ebenfalls für 15 Minuten bei 3000 rpm ungebremst zentrifugiert worden. Der Überstand wurde in Mengen von jeweils 500 µl auf 1,5 ml-Eppendorf-Tubes verteilt und ebenso wie die EDTA-Proben eingefroren (-20 °C).

Die BD Vacutainer® CPT-Röhrchen wurden zunächst acht- bis zehn Mal vorsichtig geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1650 *relative centrifugal force* (rcf) für 20 Minuten im Ausschwingrotor ohne Bremse. Nach der Zentrifugation waren die PBMCs in einer separaten Schicht direkt unterhalb der Plasmaschicht vorzufinden (Abbildung 6). Diese Schicht konnte mittels einer Pipette aufgenommen und in ein neues 15 ml fassendes Gefäß umgefüllt werden. Dieses wurde dann mit PBS-Puffer auf 15 ml aufgefüllt. Einem kurzen Mischvorgang folgte eine ungebremste Zentrifugation bei 1300 rpm für 15 Minuten. Im Anschluss daran wurde der Überstand aspiriert, das entstandene Zellpellet in ca. 12-14 ml PBS Puffer resuspendiert und via Vortexer gemischt. Nach diesem Waschvorgang fand eine zweite ungebremste Zentrifugation bei 1300 rpm für 10 Minuten statt. Anschließend wurde der Überstand wieder aspiriert und das Zellpel-

let in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert. Dieser Lysispuffer war ein Bestandteil des verwendeten *RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kits* und wurde zuvor mit 1 %igen Beta-Mercaptoethanol versetzt. Die Kombination beider Substanzen sorgte für die Inaktivierung der RNasen. Die Proben wurden in Sekundärröhrchen umgefüllt und bis zur Weiterverarbeitung bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

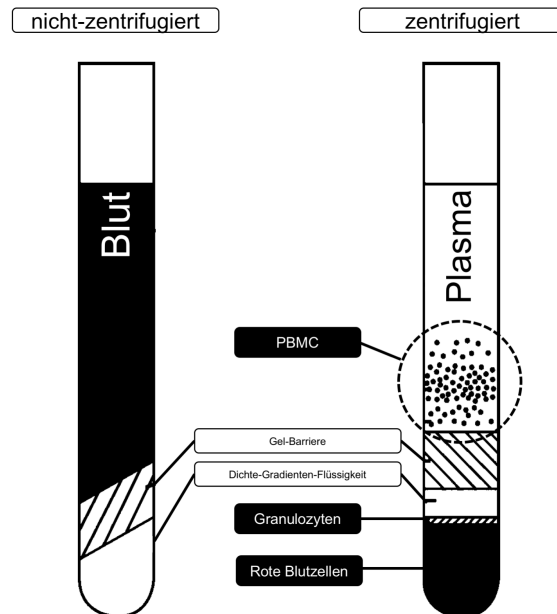


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines BD Vacutainer® CPT-Röhrchens. Nach der Zentrifugation befinden sich die PBMCs in einer separaten Schicht unterhalb der Plasma-Schicht. [Abbildung modifiziert und nachgezeichnet nach BD Vacutainer® CPT Datenblatt (BD)]

2.1.3. Erhebung klinischer Daten

Die Erhebung der klinischen Daten der Studienteilnehmer fand im Rahmen der routinemäßigen, intensivmedizinischen Dokumentation durch pflegerische und ärztliche Kollegen statt. Anhand der aufgezeichneten Vitalparameter, Blutgasanalysen, Beatmungsparameter und der Bilanzierung des Flüssigkeitshaushaltes ließen sich mittels weiterer Einflussgrößen die verwendeten Scoring-Systeme (Kapitel 1.1.5) zur Einschätzung des Krankheitszustandes der Studienteilnehmer anwenden.

2.1.4. S1P-Messung

Die S1P-Messung ist bei Winkler et al. beschrieben und wurde im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE Hamburg durchgeführt (Winkler et al. 2015).

2.1.5. RNA-Isolierung

Für die Extraktion der zellulären Gesamt-RNA aus den PBMC-Zellen wurde das *RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit* verwendet. Mittels dieses Verfahrens wurden die Zellen zunächst lysiert, die RNasen inaktiviert und die Proteine gespalten. Die freigesetzten Nukleinsäuren wurden auf eine Säule mit einer Silica-Membran aufgetragen, die diese band. Nach mehreren Waschschrritten konnte die so gereinigte RNA in Nuklease-freiem Wasser eluiert werden. Anschließend fand eine photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA statt.

Nach dem Auftauen der Proben wurde die jeweilige Probe mit 1180 µl Nuklease-freiem Wasser und 20 µl Proteinase K versetzt. Um die Zellen aufzubrechen wurde das Gemisch ca. fünf bis sechs Mal in einer 1 ml-Feindosierungsspritze mit einer Sicherheitsinjektionskanüle aufgezogen. Im Anschluss daran fand eine Inkubation der Proben bei 55 °C für 30 Minuten statt. Hierdurch wurden die Proteine der Probe durch Proteinase K enzymatisch zersetzt. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 10 000 x g für drei Minuten. Dann wurde der Überstand auf 2 ml-Eppendorf-Tubes aufgeteilt. Um die Bindung der DNA an die Silica-Membran der Säule zu erhöhen, wurde jeweils 900 µl des Überstands mit 450 µl 96 %igen Alkohols vermischt. Dann wurden 700 µl des Lysats auf die *RNeasy*-Säule übertragen und bei 8000 x g für eine Minute zentrifugiert. Unter Verwerfung des Überstandes wurde dieser Schritt so lange wiederholt, bis das Lysat vollständig verbraucht war. Diesem Schritt folgte das Waschen mit dem RW1-Puffer. Hierfür wurden 350 µl RW1-Puffer auf die *RNeasy*-Säule übertragen und anschließend bei 8000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Zum Abbau der ebenfalls an der Säule gebundenen genomischen DNA wurde eine DNase-Lösung (10 µl DNase1 + 70 µl RDD-Puffer) auf die Säule pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation fand ein zweiter Waschvorgang mit dem RW1-Puffer statt. Hierfür wurden jeweils 350 µl RW1-Puffer auf die Säule übertragen. Dem folgte eine Zentrifugation bei 8000 x g für eine Minute mit anschließender Verwerfung des Überstandes. Die Säule wurde dann mit 500 µl RPE-Puffer befüllt und bei 8000 x g für eine Minute zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde wiederum verworfen. Die Säule wurde abermals mit 500 µl RPE-Puffer versetzt und bei 8 000 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Unter Verwerfung des Überstandes fand direkt im Anschluss eine weitere Zentrifugation der *RNeasy*-Säule bei > 10 000 x g für eine Minute statt. Zum Schluss wurde die *RNeasy*-Säule in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Tube übertragen. Nach dem Auftragen von 50 µl Nuklease-freies Wasser auf die Säule wurden die Proben nochmals bei 8000 x g für eine Minute zentrifugiert.

Die Konzentration sowie die Reinheit der einzelnen RNA-Proben wurden anhand einer spektralphotometrischen Messung bestimmt. Hierzu wurden jeweils 2 µl der jeweiligen RNA-Proben sowie zweimal 2 µl Nuklease-freies-Wasser zwecks Eichung auf die dafür vorgesehene Fläche appliziert. Die Absorption wurde einerseits bei einer Wellenlänge von 260 nm (A260), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, andererseits bei einer Wellenlänge von 280 nm (A280), dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Eine optische Dichte (OD) bei A260 mit dem Wert eins entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Der Quotient aus A260 und A280 zeigt Verunreinigungen der RNA mit Proteinen an. In dieser Arbeit lag der Quotient zwischen 1,9 und 2,6.

2.1.6. Reverse Transkription

Vor der weiteren Analyse der zellulären RNA mittels quantitativer PCR musste diese zunächst in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für die reverse Transkription der *messenger* RNA (mRNA) wurde das *Maxima® First Strand cDNA Synthesis-Kit* verwendet. Dazu wurden jeweils 200 ng RNA mit 4 µl *5X Reaction-Mix* und 2 µl *Maxima® Enzyme-Mix* in 0,2 ml-Eppendorf-Tubes pipettiert. Um auf ein Gesamtvolumen von 20 µl zu kommen, wurde Nuklease-freies Wasser hinzugefügt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Substanz	Volumen (µl)
5X Reaction Mix	4
Maxima® Enzyme Mix	2
Probe	200 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 20
Total	20

Im Anschluss daran erfolgte eine Inkubation für zehn Minuten bei 25 °C (Tabelle 4). Dann erfolgte die cDNA-Synthese bei 50 °C für 30 Minuten. Abgeschlossen wurde die Reaktion bei 85 °C für fünf Minuten.

Tabelle 4: Reaktionsschritte der cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min.)
Inkubation	25	10
Synthese	50	30
Termination	85	5

2.1.7. Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Die von Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) (1983) dient der enzymatischen Vervielfältigung kleinster, von Oligonukleotid-Primern flankierten Nukleinsäure-Segmenten mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Die PCR läuft in ca. 30-50 Zyklen ab, wobei die einzelnen Zyklen kontinuierlich in der gleichen Reihenfolge stattfinden. Der initialen DNA-Denaturierung zum Trennen der Doppelstränge, folgt das sogenannte *Annealing*, die Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende Sequenz (*Template*). Anschließend erfolgt die sog. Elongation mit der Anlagerung komplementärer Basenpaare an den neu zu synthetisierenden Einzelstrang, so dass die Amplifikate am Ende der PCR als doppelsträngige DNA vorliegen. Die quantitative Real Time PCR ist eine Weiterentwicklung der PCR und erlaubt eine zusätzliche Quantifizierung der mRNA. Anhand einer Fluoreszenzmessung kann mittels der zunehmenden Fluoreszenz die Menge der gebildeten Nukleinsäuren beobachtet werden. Als Fluoreszenzquelle kann man entweder eine sequenzspezifische Sonde oder einen sequenzunspezifischen Farbstoff verwenden. Letzterer kam bei dieser Arbeit in Form des DNA-Farbstoffes SYBR GREEN zum Einsatz. Die Quantifizierung der mRNA kann absolut anhand einer Standardkurve oder relativ mittels eines Referenzgens stattfinden. Letzteres sollte stabil und nicht-reguliert sein (Pfaffl 2001). Aufgrund dessen sind die am häufigsten verwendeten Referenzgene die sogenannten Housekeeping-Gene (Cinar et al. 2013).

Primer sind kurze einzelsträngige, 15-20 Nukleotide lange DNA-Fragmente, die komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind und von der DNA-Polymerase aufgrund ihrer Hydroxygruppe als Startpunkt für die Polymerisation benötigt werden. Die Konzentration der Primer hat einen Einfluss auf die Synthese der PCR-Produkte. Daher wurden alle Primer-Paare vor der qPCR optimiert. Zunächst wurde mittels einer qPCR ein geeignetes DNA-Fragment synthetisiert. Hierzu wurde eine humane cDNA als Template mit den genspezifischen Primer in einem qPCR Ansatz eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden mittels des GeneJET™ Purification Kits gereinigt und auf eine Konzentration von 1 ng/μl verdünnt. Zur Feststellung der optimalen Template-Konzentration wurde zunächst für alle Gene eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Hierfür ist das Template in Zehnerschritten von 1/100 000 auf 1/100 000 000 verdünnt worden. Im Anschluss daran wurde eine qPCR durchgeführt, anhand derer die, für alle Proben verwendete, Template-Konzentration von 1/100 000 bestimmt werden konnte. Für die Primer wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Zunächst wurden die Primer in Wasser gelöst (Endkonzentration 100 mM). Sense- und Antisense-Primer wurden im Verhältnis 1/1 gemischt und verdünnt (1/10; 1/20; 1/50; 1/100; 1/200). Diese wurden mit der zuvor ermittelten Template-Konzentration in der qPCR analysiert. Ausgehend von einer Konzentration von

100 µM ist eine 10fach, 5fach, 2fach und 1fach verdünnte Konzentration der Primer hergestellt worden. Dem folgte eine qPCR mit der zuvor ausgewählten Template-Konzentration. Als optimale Primer-Konzentration stellte sich eine 5fache Template-Verdünnung (1/100 000) mit einer Primerkonzentration von 2,5 µM heraus. Unter Verwendung von 1 µl Primermix befand sich in den einzelnen PCR-Tubes eine Primerkonzentration von 0,25 µM.

Die qPCR wurde im Rotor Gene Q in einem 72-Well-Rotor durchgeführt. Sowohl die Proben als auch die Negativkontrollen wurden dreifach bestimmt. Das Gesamt-Reaktionsvolumen betrug 10 µl (Tabelle 5). Hierfür wurde zunächst der Mastermix für jeden Primer hergestellt. Die 72 0,1 ml-PCR-Tubes sind nach dem entsprechenden Pipettierschema (Abbildung 7) jeweils mit 9 µl Mastermix beladen worden. Erst danach erfolgte die Zugabe von 1 µl cDNA (1/4 verdünnt) bzw. 1 µl Nuklease-freiem Wasser als Negativkontrolle inklusive Mischvorgang via Pipette. Zum Schluss wurden die Tubes mit den dazugehörigen Caps verschlossen.

Tabelle 5: Mastermix-Reaktionsansatz für die einzelnen Proben

Substanz	Menge (µl)
Nuklease-freies Wasser	3
Primer	1
SYBR Green	5
cDNA	1
Total	10

cDNA, complementary DANN.

GAPDH	○ ○ ○ 1 2 3	○ ○ ○ 4 5 6	○ ○ ○ 7 8 9	○ ○ ○ 10 11 12	○ ○ ○ 13 14 15	○ ○ ○ 16 17 18
	A2	B11	C8	K4	K5	H ₂ O
S1PR1	○ ○ ○ 19 20 21	○ ○ ○ 22 23 24	○ ○ ○ 25 26 27	○ ○ ○ 28 29 30	○ ○ ○ 31 32 33	○ ○ ○ 34 35 36
	A2	B11	C8	K4	K5	H ₂ O
GAPDH	○ ○ ○ 37 38 39	○ ○ ○ 40 41 42	○ ○ ○ 43 44 45	○ ○ ○ 46 47 48	○ ○ ○ 49 50 51	○ ○ ○ 52 53 54
	A8	B12	C13	K7	K9	H ₂ O
S1PR1	○ ○ ○ 55 56 57	○ ○ ○ 58 59 60	○ ○ ○ 61 62 63	○ ○ ○ 64 65 66	○ ○ ○ 67 68 69	○ ○ ○ 70 71 72
	A8	B12	C13	K7	K9	H ₂ O

Abbildung 7: Exemplarisches Pipettierschema einer 72 Well-Platte. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; S1PR1, Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1.

Um die im Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit enthaltene HotStarTaq Plus DNA-Polymerase zu aktivieren und einen gleichzeitigen Start der Reaktionen zu gewährleisten, wurde die PCR-Reaktion mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für fünf Minuten gestartet. Im Anschluss daran fand die Amplifikation der Proben im Rahmen von 40 Zyklen nach dem folgenden Schema statt: (1) Denaturierung bei 95 °C für zehn Sekunden. (2) Annealing bei 60 °C für 15 Sekunden. (3) Elongation bei 72 °C für 20 Sekunden.

Nach jedem Zyklus fand zudem die zuvor beschriebene Fluoreszenzmessung statt. Zum Ausschluss unspezifischer Nebenprodukte, die unter ungünstigen Reaktionsbedingungen entstehen können, wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die doppelsträngige DNA bei der jeweils charakteristischen Schmelztemperatur in seine Einzelstränge aufgeschmolzen, indem die Temperatur bei gleichzeitiger Fluoreszenzmessung langsam und kontinuierlich gesteigert wurde (72 °C bis 95 °C, 1 °C per step). Die Auftrennung der doppelsträngigen DNA in die einzelsträngige DNA führte zu einer Fluoreszenzabnahme. Spezifische PCR-Produkte zeigten hierbei höhere Schmelzpunkte, so dass eine Differenzierung von unspezifischen Nebenprodukten möglich war.

Anhand einer entsprechenden Software (Rotor-Gene Q Series V2.3.1) wurde für alle Proben eine Basislinie, sogenannter *Threshold*, gesetzt. Der *Threshold* markiert den Schwellenwert zwischen dem signifikanten Fluoreszenzanstieg und der Hintergrundfluoreszenz. Der Schnittpunkt der Basislinie mit der Fluoreszenzkurve befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation und wird als sogenannter *Cycle of Threshold* (C_T)-Wert bezeichnet. Der C_T -Wert beschreibt hierbei denjenigen PCR-Zyklus, bei dem das PCR-Signal den festgelegten Schwellenwert zum ersten Mal überschreitet. Je mehr DNA vorhanden ist, desto niedriger ist der C_T -Wert. Die Zunahme der Amplifikatmenge ist proportional zur Zunahme der Fluoreszenzintensität. Setzt man eine 100 %ig effiziente PCR voraus, so verdoppelt sich sowohl die Amplifikatmenge als auch das Fluoreszenzsignal pro Zyklus. Darüber hinaus ist der C_T -Wert umgekehrt proportional zur relativen Genexpression. In dieser Arbeit wurde sich für die relative Quantifizierung der mRNA-Menge anhand des Housekeeping-Gens Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) entschieden. GAPDH ist dafür bekannt, eines der am stabilsten exprimierten Gene in PBMCs zu sein (Cinar et al. 2013). Für die Auswertung der Daten wurden folgenden Formeln eingesetzt (Pfaffl 2001):

$$1. \Delta Ct = \bar{Ct}_{Zielgen} - \bar{C}_{GAPDH}$$

$$2. Ratio = 2^{\Delta Ct}$$

$$3. GAPDH \text{ in } \% = \frac{1}{2^{\Delta Ct}} \cdot 100$$

2.1.8. Statistik

Die Messdaten sind bei fehlender Normalverteilung als Median mit Angabe des Interquartilsabstands (IQR) sowie als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung (SD) angegeben. Falls notwendig wurden Messwerte logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erhalten. Für den Vergleich normalverteilter Messdaten wurde der t-Test verwendet. Für den Vergleich nicht-normalverteilter Messdaten wurden nicht-parametrische Tests benutzt. Die Signifikanzanalyse zwischen zwei Gruppen fand anhand des Mann-Whitney U Tests statt. Für mehr als zwei Gruppen wurde die Signifikanzanalyse mittels des Kruskal-Wallis Tests durchgeführt. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs wurde auf die Angabe von $p \leq 0,001$ und $p \leq 0,01$ verzichtet, so dass ein p-Wert von $p \leq 0,05$ als signifikant definiert wurde. Die Berechnung von Häufigkeiten wurde mittels des Fisher-Yates-Tests berechnet, der bei Stichproben mit kleinem Umfang verwendet wird. Für die Korrelationsanalysen der Messdaten kam der Rangkorrelationskoeffizient ρ (rho) nach Spearman zum Einsatz. Die gesamte statistische Auswertung fand mithilfe der Software Graphpad Prism 6.0h® (Graphpad Software®) statt.

3. Ergebnisse

3.1. Demographische Daten

Die demographischen Daten der untersuchten Gesamtkohorte (n=45) sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Patientenkohorte bestand aus 29 Männern (64 %) und 16 Frauen (36 %). Das mediane Alter der Patienten (n=45) war 60 Jahre. Patienten mit einem SIRS bzw. einer Infektion (Gruppe A) wurden am kürzesten auf der Intensivstation behandelt. Patienten im septischen Schock (Gruppe C) waren am längsten auf der Intensivstation. Patienten mit einem SIRS bzw. einer Infektion (Gruppe A) hatten einen signifikant höheren SAPS II und SOFA Score als Patienten im septischen Schock (Gruppe C). Die Konzentrationen der untersuchten Inflammationsmarker waren in Patienten mit einem SIRS bzw. einer Infektion (Gruppe A) signifikant niedriger als in Patienten im septischen Schock (Gruppe C). Intraabdominelle (43 %) sowie respiratorische Infektionen (36 %) waren die häufigste Ursache der Sepsis in der untersuchten Patientenkohorte (Tabelle 7).

Tabelle 6: Charakteristika der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe signifikanter Unterschiede zwischen den Schweregraden

	K Kontrolle	Alle Patienten	A SIRS/Infektion	B schwere Sepsis	C septischer Schock	**Signifikanz (p), A bis C
Anzahl	20	45	15	15	15	n.a.
*Alter, [J]	37 (32-48)	^a 60 (50-70)	55 (38-69)	60 (55-72)	65 (54-70)	n.s.
Geschlecht, n [%]						
männlich	11 [55]	29 [64]	8 [53]	13 [87]	8 [53]	n.s.
weiblich	9 [45]	16 [36]	7 [47]	2 [13]	7 [47]	n.s.
Aufnahmegrund, n [%]						
medizinisch	n.a.	16 [36]	3 [20]	7 [47]	6 [40]	n.s.
chirurgisch	n.a.	29 [64]	12 [80]	8 [53]	9 [60]	n.s.
*Länge Aufenthalt ITS	n.a.	6 (2-13)	1 (1-7)	6 (3-17)	9 (5-34)	≤ 0,05
*Länge Aufenthalt KH	n.a.	21 (11-52)	17 (9-31)	18 (11-47)	26 (20-103)	n.s.
Todesfälle ITS, n [%]	n.a.	8 (18)	1 (7)	4 (27)	3 (20)	***n.s.
Todesfälle, n [%]	n.a.	9 (20)	1 (7)	5 (33)	3 (20)	***n.s.
*SAPS II	n.a.	34 (20-41)	^b 27 (17-37)	35 (24-41)	37 (24-45)	≤ 0,05
*SOFA Score (Tag 1)	n.a.	5 (3-8)	^b 4 (1-6)	^b 4 (3-6)	9 (7-14)	≤ 0,05
Inflammationsmarker						
*CRP, [mg/l]	n.a.	125 (66-204)	^b 72 (30-148)	134 (82-186)	202 (101-256)	≤ 0,05
*PCT, [µg/l]	n.a.	0,6 (0,3-3,7)	^b 0,3 (0,1-0,7)	^b 0,5 (0,2-1,5)	5,0 (0,6-26,0)	≤ 0,05
*IL-6, [ng/l]	n.a.	168 (44-534)	^b 72 (18-259)	^b 111 (44-360)	591 (168-848)	≤ 0,05
*Laktat, [mmol/l]	n.a.	1,3 (1,0-2,2)	1,3 (1,0-1,8)	^b 1,1 (0,9-1,9)	2,1 (1,5-3,8)	≤ 0,05

*Anwendung des Medians mit Interquartilsabstand (IQR), **Anwendung des Kruskal-Wallis Tests, ***Anwendung des Fisher-Yates Tests, ^a p≤0,05 verglichen mit Kontrolle, ^b p≤0,05 verglichen mit Gruppe C; CRP, C-reaktives Protein; IL-6, Interleukin-6; ITS, Intensivstation; KH, Krankenhaus; n.a., nicht anwendbar; n.s., nicht signifikant; PCT, Procalcitonin; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment.

Tabelle 7: Ursachen und Lokalisation der Sepsis in untersuchter Patientenkohorte (n=45)

Ursache	Anzahl in % [n]	Lokalisation
unbekannt	38 [17]	n.a.
bekannt	62 [28]	n.a.
	43 [12]	intraabdominell
	36 [10]	respiratorisch
	11 [3]	urogenital
	4 [1]	Katheter-assoziiert
	4 [1]	Weichteile/Knochen
	4 [1]	zentralnervös

n.a., nicht anwendbar.

3.2. Immunzellen

Veränderungen der Immunzell-Populationen im peripheren Blut wurden anhand eines Differentialblutbildes erfasst. Innerhalb der Schweregrade (Gruppe A-C) gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der absoluten Zellzahlen (Tabelle 8). In den nachfolgenden Aufführungen wurde daher auf eine Unterscheidung in die klinischen Schweregrade der Gruppe A-C verzichtet und nur die gesamte Patientenkohorte analysiert und mit gesunden Kontrollen verglichen.

Die absolute sowie prozentuale Verteilung der Immunzellen in der Kontrollgruppe und in den Patienten unterschied sich signifikant. Patienten hatten eine Leukozytose mit einer Neutrophilie, Lymphozytopenie und Monozytose (Abbildung 8). Die mediane Leukozyten- sowie Neutrophilenzahl war in den Patienten 2-3fach erhöht (Tabelle 8). Die mediane Lymphozytenzahl war in den Patienten 2,5fach erniedrigt, während die mediane Monozytenzahl in den Patienten 1,8fach erhöht war (Tabelle 8). Prozentual wurde in den Patienten eine Neutrophilie, eine Lymphozytopenie sowie eine nicht signifikante Monozytopenie registriert (Abbildung 9). Der Unterschied zwischen der prozentualen und der absoluten Monozytenzahl ist durch die prozentuale Betrachtung aller Immunzellpopulationen bedingt. Bei Anstieg der Gesamt-Leukozytenzahl kann eine absolute Erhöhung der Monozytenzahl in der prozentualen Darstellung maskiert sein.

Tabelle 8: Absolute Leukozytenzahlen der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe signifikanter Unterschiede zwischen den Schweregraden

Zellpopulation [Mrd./l]	K Kontrolle	Alle Patienten	A SIRS/ Infektion	B schwere Sepsis	C septischer Schock	**Signifikanz (p), A bis C
*Leukozyten	6 (6-8)	^a 13 (10-18)	13 (12-21)	15 (12-23)	12 (10-18)	n.s.
*Neutrophile	4 (3-5)	^a 11 (9-16)	12 (10-20)	10 (9-14)	10 (8-16)	n.s.
*PBMC	2,5 (2,1-2,8)	^a 1,6 (1,1-2,5)	1,5 (1,1-2,0)	1,7 (1,2-2,7)	1,6 (0,7-3,2)	n.s.
*Lymphozyten	2,0 (1,6-2,4)	^a 0,8 (0,6-1,3)	0,7 (0,5-1,2)	1,1 (0,7-1,4)	0,8 (0,5-1,3)	n.s.
*Monozyten	0,4 (0,3-0,6)	^a 0,7 (0,4-1,0)	0,8 (0,6-1,2)	0,6 (0,4-0,8)	0,7 (0,3-1,0)	n.s.

*mediane Zellzahlen sowie Interquartilsabstand (IQR), ** Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests, ^a p<0,05 bei Vergleich Kontrolle und Patienten anhand des Mann-Whitney U Test; n.s., nicht signifikant; PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome.

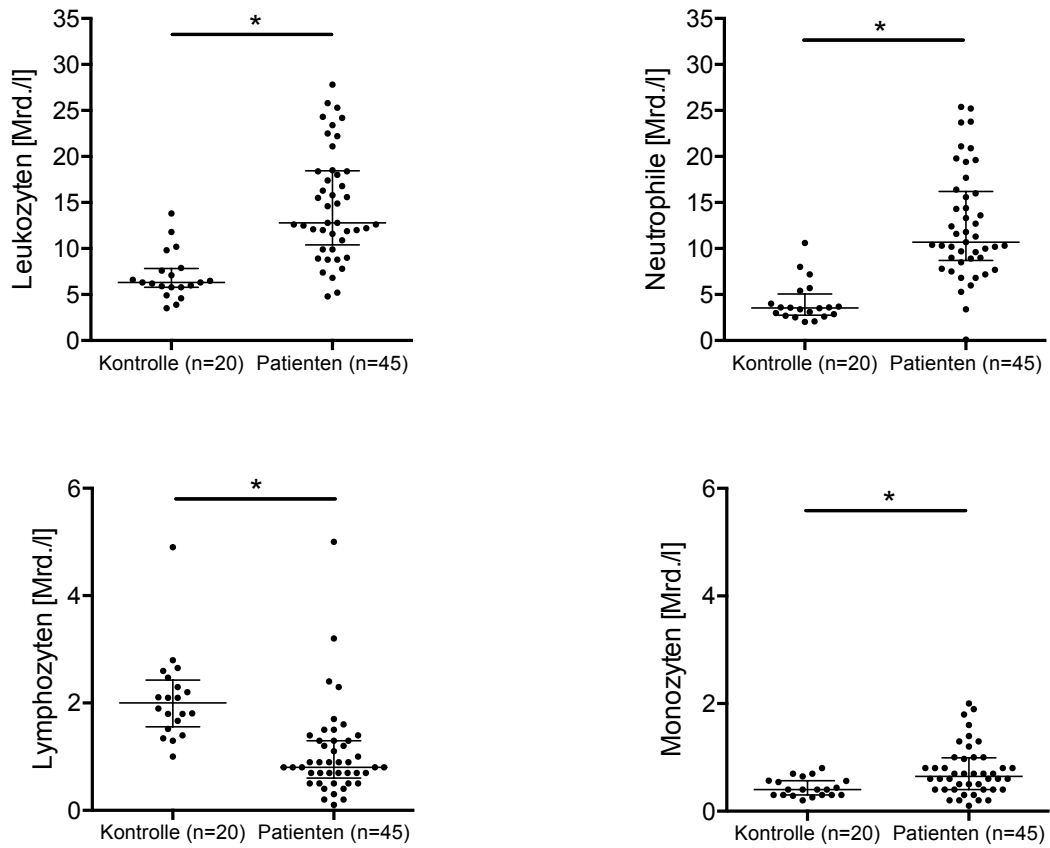


Abbildung 8: Absolute Anzahl der Leukozyten und -Subpopulationen in Kontroll- und Patientengruppe. Balken zeigen die medianen Werte sowie den Interquartilsabstand (IQR). Vergleich von Kontrolle und Patienten anhand des Mann-Whitney U Test. * $p \leq 0,05$.

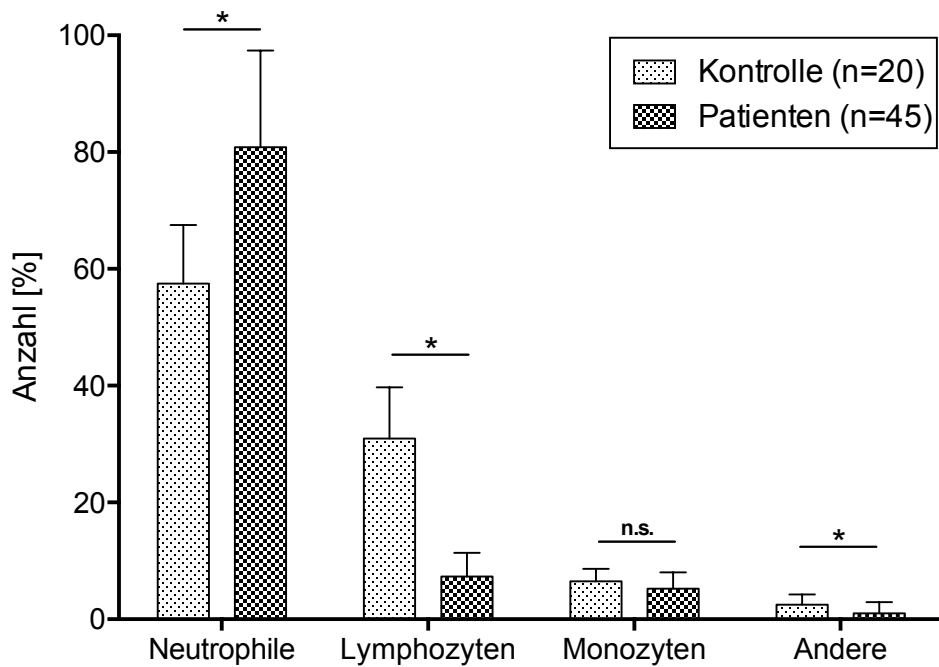


Abbildung 9: Relative Zusammensetzung der Leukozyten in Kontroll- und Patientengruppe. Balken zeigen arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (SD). Vergleich von Kontrolle und Patienten anhand des t-Tests. * $p \leq 0,05$; Andere, eosinophile und basophile Granulozyten; n.s., nicht signifikant.

3.3. Serum-S1P

Unsere Arbeitsgruppe (Winkler et al. 2015) konnte in einer Gruppe von Sepsis-Patienten (n=100) zeigen, dass die Serum-S1P-Konzentration in der Sepsis signifikant reduziert ist. Die Patientenkohorte (n=45) dieser Arbeit ist Bestandteil der zitierten Sepsis-Studie. Die mediane Serum-S1P-Konzentration war in Patienten 2,3fach niedriger als in der Kontrolle (Tabelle 9) und unterschied sich damit signifikant (Abbildung 10). Patienten mit einem SIRS bzw. einer Infektion (Gruppe A) unterschieden sich nicht signifikant von Patienten mit einer schweren Sepsis (Gruppe B). Beide Patientengruppen unterschieden sich jedoch signifikant ($p \leq 0,05$) von Patienten im septischen Schock (Gruppe C), in denen die niedrigsten Serum-S1P-Konzentrationen gemessen wurden.

Tabelle 9: Serum-S1P-Konzentration der Kontroll- und Patientengruppe sowie der Schweregrade unter Angabe der Signifikanz

	K Kontrolle	Alle Patienten	A SIRS/ Infektion	B schwere Sepsis	C septischer Schock	**Signifikanz (p), A bis C
Anzahl, [n]	20	45	15	15	15	n.a.
*S1P, [nmol/l]	1209 (1001-1482)	^a 521 (281-770)	^b 681 (542-914)	^b 630 (331-947)	278 (229-302)	$\leq 0,05$

*Anwendung des Medians mit Angabe des Interquartilsabstands (IQR), ** Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests, ^a $p \leq 0,05$ verglichen mit Kontrolle, ^b $p \leq 0,05$ verglichen mit Gruppe C; n.a., nicht anwendbar; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome.

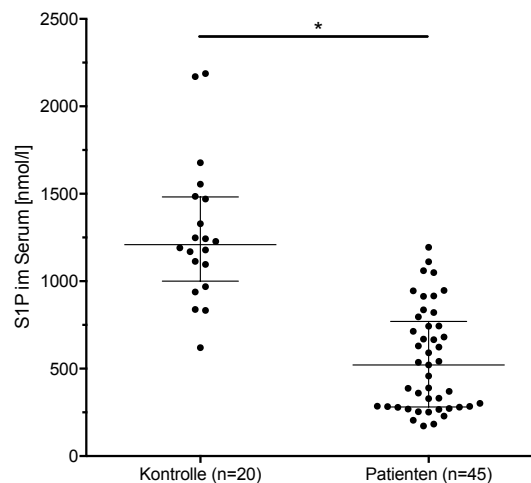


Abbildung 10: Serum-S1P-Konzentration in Kontroll- und Patientengruppe. Balken zeigen die mediane Serum-S1P-Konzentration sowie den Interquartilsabstand (IQR). Vergleich von Kontrolle und Patienten anhand des Mann-Whitney-U Test. * $p \leq 0,05$; S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

3.4. mRNA Expression des S1PR1 in PBMC

Die Quantifizierung der mRNA Expression des S1PR1 erfolgte ausschließlich in den PBMC, die im Wesentlichen aus Lymphozyten sowie Monozyten besteht und fand mithilfe der qPCR statt. Die Verwendung des GAPDH-Gens als interne Kontrolle und als Referenzgen ermöglichte die Angabe der Rezeptorexpression in GAPDH %.

Die Gruppen A-C unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der mRNA Expression des S1PR1 in PBMC (Tabelle 10). In der weiteren Aufführung wurde daher auf die Differenzierung in die Schweregrade verzichtet und die gesamte Patientenkohorte (n=45) statistisch ausgewertet. Die mRNA Expression des S1PR1 in PBMC von Patienten unterschied sich signifikant ($p \leq 0,05$) von dem der Kontrollen (Abbildung 11). In den Patienten war die mRNA Expression des S1PR1 5fach niedriger als in den Kontrollen.

Tabelle 10: mRNA Expression des S1PR1 in PBMC der Kontroll- und Patientengruppe sowie der Schweregrade unter Angabe der Signifikanz

	K Kontrolle	Alle Patienten	A SIRS/ Infektion	B schwere Sepsis	C septischer Schock	**Signifikanz (p), A-C
Anzahl, [n]	12	45	15	15	15	n.a.
*S1PR1, [GAPDH %]	7,10 ± 1,80	^a 1,40 ± 1,40	1,40 ± 1,40	1,60 ± 1,20	1,10 ± 0,80	n.s.

*mittlere mRNA Expressions sowie Standardabweichung (SD), ** Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests, ^a $p \leq 0,05$ verglichen mit Kontrolle, n.a., nicht anwendbar, n.s., nicht signifikant; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome; S1PR1, S1P-Rezeptor 1

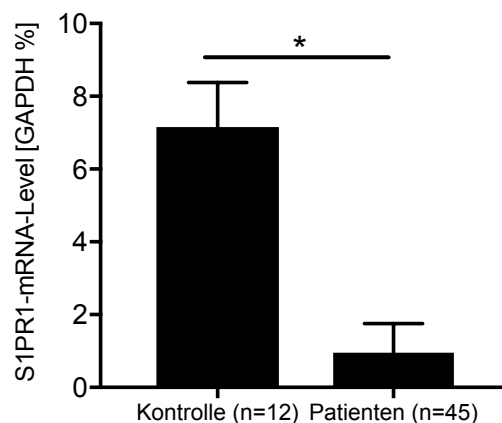


Abbildung 11: mRNA Expression des S1PR1 in peripheren mononukleären Blutzellen der Kontroll- und Patientengruppe. Die Balken zeigen die medianen Werte sowie den Interquartilsabstand (IQR). Vergleich von Kontrolle und Patienten anhand des Mann-Whitney-U Test. * $p \leq 0,05$; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; mRNA, messenger RNA; PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; S1PR1, S1P-Rezeptor 1.

3.5. Korrelation Serum-S1P und S1PR1-Expression

Zur Berechnung einer möglichen Assoziation der Serum-S1P-Konzentration mit der mRNA Expression des S1PR1 wurde unter Einschluss der Kontrolle (n=12) der Rangkorrelationskoeffizient ρ nach Spearman berechnet. Der S1PR1 zeigte eine positive und signifikante Korrelation mit der Serum-S1P-Konzentration (Abbildung 12).

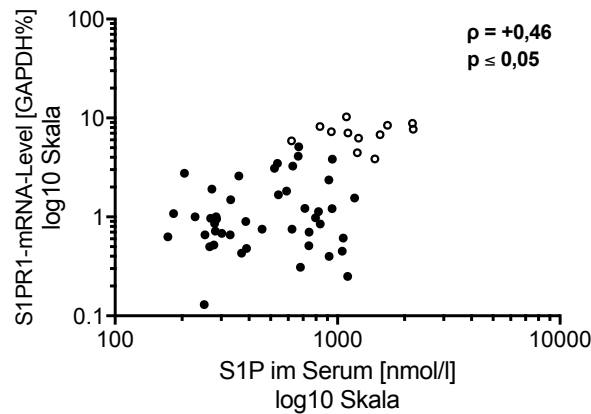


Abbildung 12: Korrelation der Serum-S1P-Konzentration mit der mRNA Expression des S1PR1. Ermittelt anhand des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman. Kontrollgruppe (Kreise), Signifikanz (p). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; S1PR1, S1P-Rezeptor 1.

3.6. Korrelation Serum-S1P und S1PR1-Expression mit Immunzellen

3.6.1. Serum-S1P und Immunzellen

Zur Überprüfung möglicher Assoziationen der Serum-S1P-Konzentration mit den Immunzellzahlen wurde unter Einschluss der Kontrolle ($n=20$) ein Rangkorrelationskoeffizient ρ nach Spearman berechnet (Tabelle 11). Es zeigte sich eine signifikante negative Assoziation ($p \leq 0,05$) der Serum-S1P-Konzentration mit der absoluten Zahl aller Leukozyten sowie der Neutrophilen (Abbildung 13). Die PBMC- und die Lymphozytenzahlen korrelierten hingegen positiv mit der Serum-S1P-Konzentration (Abbildung 14). Die Monozytenzahl war nicht mit der Serum-S1P-Konzentration assoziiert.

Tabelle 11: Korrelation der Immunzell-Populationen mit Serum-S1P-Konzentration der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman und der Signifikanz

Zellpopulation [Mrd./l]	Spearman r (ρ)	Signifikanz (p)
Leukozyten	-0,44	$\leq 0,05$
Neutrophile	-0,43	$\leq 0,05$
PBMC	+0,29	$\leq 0,05$
Lymphozyten	+0,42	$\leq 0,05$
Monozyten	-0,24	n.s.

n.s., nicht signifikant; PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

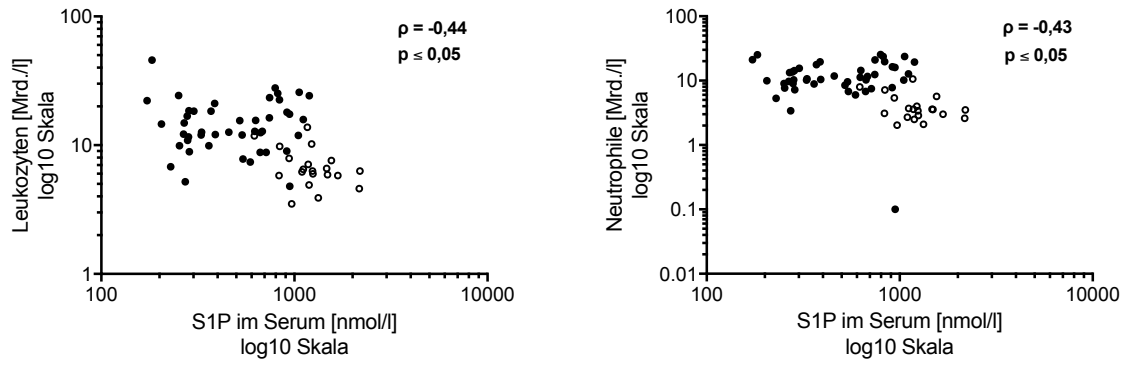


Abbildung 13: Korrelation der Serum-S1P-Konzentration mit Leukozyten und Neutrophilen. Ermittelt anhand des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman. Kontrollgruppe (Kreise), Signifikanz (p). S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

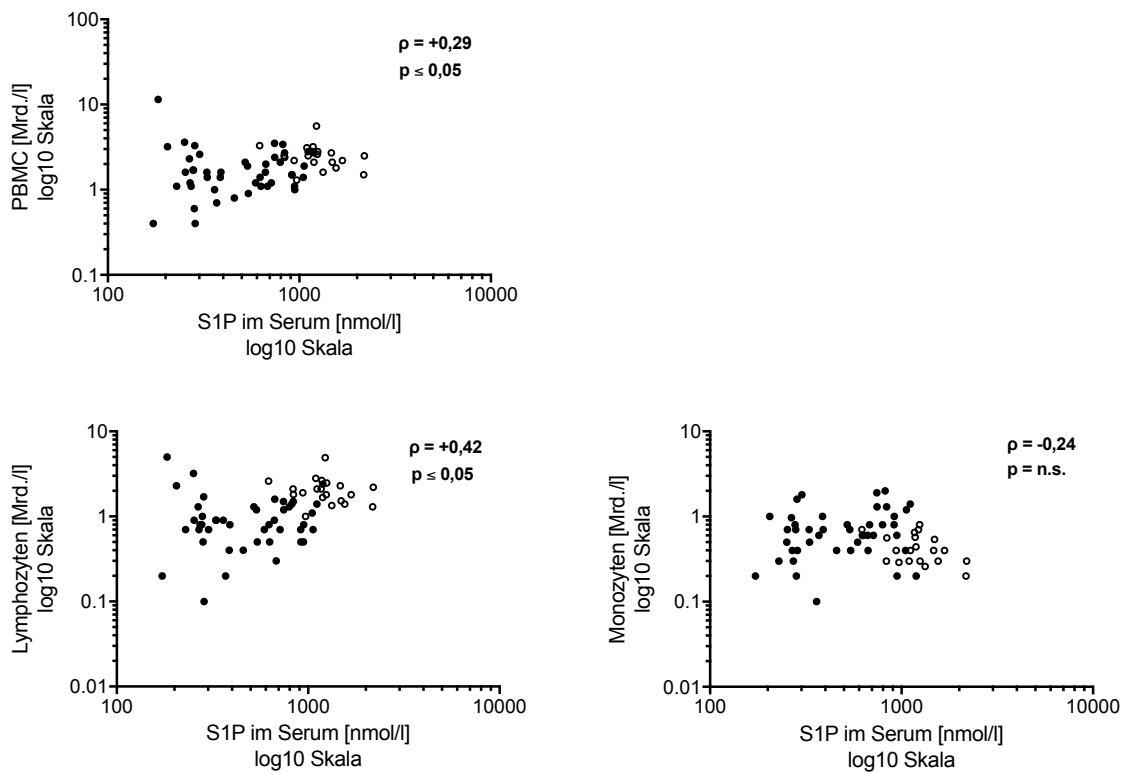


Abbildung 14: Korrelation der Serum-S1P-Konzentration mit peripheren mononukleären Blutzellen und Lymphozyten/Monozyten. Ermittelt anhand des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman. Kontrollgruppe (Kreise), Signifikanz (p). S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

3.6.2. S1PR1-Expression und Immunzellen

Zur Analyse einer möglichen Assoziation des S1PR1 in PBMC mit der Immunzellzahl wurde unter Einschluss der Kontrolle (n=12) der Rangkorrelationskoeffizient ρ nach Spearman berechnet (Tabelle 12). Es wurde kein Zusammenhang zwischen der mRNA Expression des S1PR1 und der Zellzahl der PBMC gefunden. In der Subgruppenanalyse war jedoch die Lymphozytenzahl positiv und die Monozytenzahl negativ korreliert (Abbildung 15).

Tabelle 12: Korrelation der mRNA Expression des S1PR1 in PBMC mit PBMC sowie Lymphozyten und Monozyten der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman und der Signifikanz

Rezeptor	Zellpopulation	Spearman r (ρ)	Signifikanz (p)
S1PR1	PBMC	+0,19	n.s.
	Lymphozyten	+0,46	$\leq 0,05$
	Monozyten	-0,44	$\leq 0,05$

n.s., nicht signifikant; PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; S1PR1, S1P-Rezeptor 1.

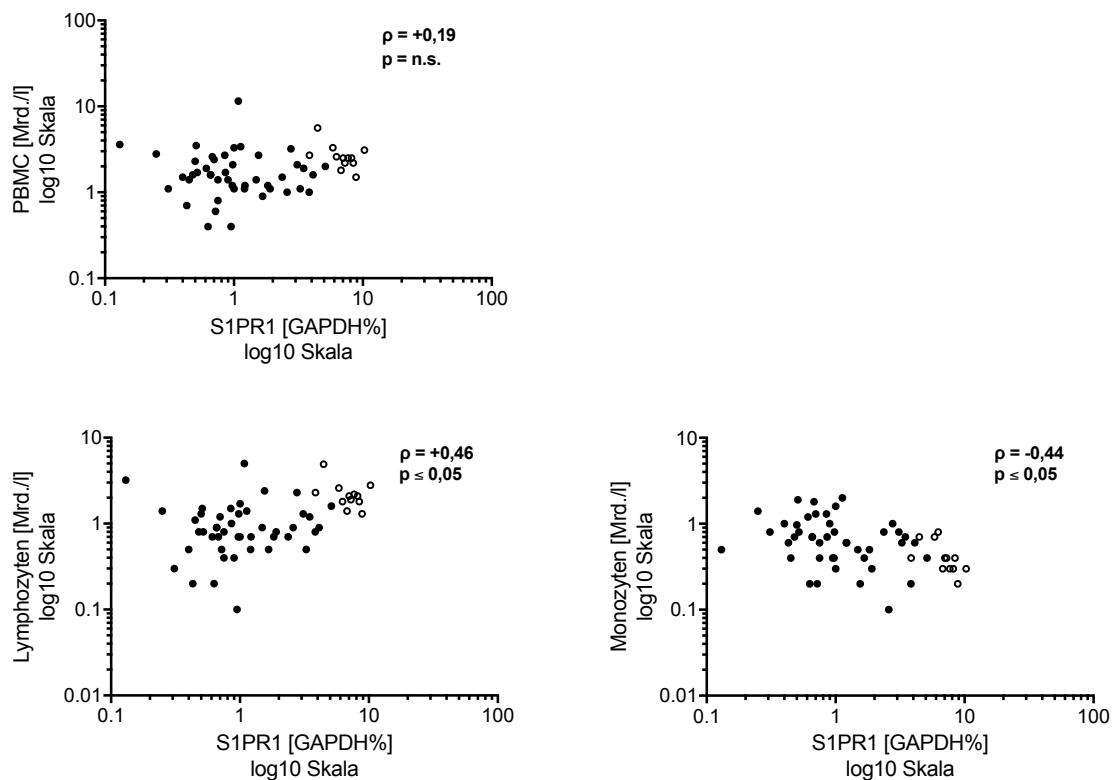


Abbildung 15: Korrelation der S1PR1-Expression mit peripheren mononukleären Blutzellen und Lymphozyten sowie Monozyten. Ermittelt anhand des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman. Kontrollgruppe (Kreise), Signifikanz (p). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; S1PR1, S1P-Rezeptor 1.

3.7. Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung

Fragestellung 1: Wie verändert sich das Differentialblutbild von Sepsis-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte?

Die Sepsis-Patienten zeigten absolute und prozentuale Zellzahl-Veränderungen innerhalb der Leukozytensubpopulationen. Es fand sich eine Leukozytose, begleitet von einer Neutrophilie, einer Lymphopenie sowie einer Monozytose.

Fragestellung 2: Ist die Serum-S1P-Konzentration in dieser Patienten-Kohorte (n=45) verändert?

Die Sepsis-Patienten zeigten im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigte Serum-S1P-Konzentration. Die Serum-S1P-Konzentration in Patienten mit einem septischen Schock war signifikant niedriger als in Patienten anderer klinischer Stadien.

Fragestellung 3: Ist die Expression des S1PR1 in Sepsis-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte verändert?

Die mRNA Expression des S1PR1 war in Sepsis-Patienten im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert.

Fragestellung 4a: Besteht eine Assoziation der Serum-S1P-Konzentration mit der S1PR1-Expression in PBMC?

Die Serum-S1P-Konzentration korrelierte positiv mit der mRNA Expression des S1PR1. Eine verminderte Serum-S1P-Konzentration war mit einem verminderten mRNA-Level des S1PR1 assoziiert.

Fragestellung 4b: Lassen sich Veränderungen im Differentialblutbild, wie eine Lymphopenie, mit der Serum-S1P-Konzentration oder der S1PR1-Expression assoziieren?

Die Serum-S1P-Konzentration sowie die S1PR1-Expression waren mit Veränderungen im Differentialblutbild assoziiert. Die Serum-S1P-Konzentration korrelierte negativ mit der Leukozyten- sowie Neutrophilenzahl und positiv mit der PBMC- und Lymphozytenzahl. Die Monozytenzahl zeigte keinen Zusammenhang mit der Serum-S1P-Konzentration. Die mRNA Expression des S1PR1 zeigte eine positive Korrelation mit der Lymphozytenzahl und eine negative Korrelation mit der Monozytenzahl.

4. Diskussion

Die Sepsis ist eine fehlregulierte Immunantwort, verursacht durch eine Infektion (Singer et al. 2016). Parallel ablaufende pro- und antiinflammatorische Prozesse führen zu einem Ungleichgewicht, das in einer Immunsuppression, einer sog. Immunparalyse, münden und zu Organfunktionsstörungen führen kann (Hotchkiss et al. 2013, Kovach und Standiford 2012).

In der Phase der Immunsuppression kommt es zu zahlreichen Funktionseinschränkungen der Immunzellen (Hotchkiss et al. 2013), die das Risiko an sekundären Infektionen zu erkranken erhöhen und so die hohe Mortalität der Sepsis mitverursachen (Otto et al. 2011). Das Risiko erneut an einer Sepsis zu erkranken bleibt nach einmalig überstandener Sepsis lebenslang erhöht (Arens et al. 2016).

Die Sepsis ist die häufigste Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen und bleibt damit eine medizinische sowie wirtschaftliche Herausforderung (Adhikari et al. 2010, Angus et al. 2001, Gaieski et al. 2013, Lagu et al. 2012). Die hohe Mortalität sowie steigende Inzidenzraten erfordern eine Verbesserung insbesondere der immunologischen Diagnostik und Therapie (Angus et al. 2001, Lagu et al. 2012, Martin et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich die Zusammensetzung der Immunzell-Populationen in der Sepsis verändert und, wie die Serum-S1P-Konzentration sowie der S1PR1 mit Veränderungen der Zellpopulationen im peripheren Blut assoziiert sind.

4.1. Demographische Daten

Die häufigsten Infektionsursachen waren intraabdominelle, gefolgt von respiratorischen und urogenitalen Infektionen (Tabelle 7). Zahlreiche Studien bestätigen eine ähnliche Tendenz, je nach Studie sind respiratorische zuweilen häufiger als abdominelle Infektionen (Angus et al. 2001, Engel et al. 2007, Finfer et al. 2004, Lagu et al. 2012, Ranieri et al. 2012, Silva et al. 2004, Vincent et al. 2006). Dies könnte einerseits daran liegen, dass ein spezifischer Infektfokus häufig nicht identifiziert werden kann. Andererseits wurden ca. 30 % der hier untersuchten Sepsis-Patienten nach chirurgischen Eingriffen auf die Intensivstation aufgenommen, somit ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass intraabdominelle Infektionen überrepräsentiert waren.

Die Länge des Intensiv Aufenthaltes korrelierte mit dem Schweregrad der Erkrankung (Tabelle 6). Dies wurde auch in anderen Studien gezeigt und erscheint wenig überraschend (Pittet et al. 1995). Die Patienten waren im Median neun Tage auf der Intensivstation (Tabelle 6), was andere populationsbasierte Studien ebenfalls berichten (Engel et al. 2007). Die 28-Tages-Mortalität betrug 20 % (Tabelle 6). Die Intensiv-Sterblichkeit, vor allem bei Patienten im septischen Schock, steht somit in Übereinstimmung mit anderen Studien (Moerer et al. 2002).

Die untersuchte Kohorte zeigte, dass die klinischen Schweregrade nicht nur mit der Länge der intensivmedizinischen Behandlung und der Mortalität, sondern darüber hinaus auch mit den intensivmedizinischen Scores assoziiert ist. Es wurden der SAPS II sowie der SOFA Score erhoben. Steigende Punktwerte waren dabei jeweils mit den drei Schweregraden der Sepsis assoziiert (Tabelle 6). Die höchsten Punktwerte konnten für die schwere Sepsis und den septischen Schock ermittelt werden (Tabelle 6). Sowohl der SAPS II als auch der SOFA Score sind gut validiert (Le Gall et al. 1993, Vincent et al. 1998). Der SOFA Score wurde in den neuesten Empfehlungen zur Sepsis-Diagnostik als Goldstandard-Kriterium aufgenommen (Singer et al. 2016). Sowohl ein steigender SAPS II als auch ein steigender SOFA Score sind mit steigender Mortalität verbunden (Ferreira et al. 2001, Le Gall et al. 1993). Letzterer ist im septischen Schock sogar mit einer um bis zu 40 % höheren Mortalität assoziiert (Ferreira et al. 2001). Auch in der hier vorliegenden Kohorte war die Mortalität mit 33% bzw. 20% in der Gruppe B und C deutlich höher als bei Patienten mit einem SIRS (Gruppe A) und bestätigt damit Daten aus der Literatur (Ferreira et al. 2001, Le Gall et al. 1993, Minne et al. 2008). Es ist daher anzunehmen, dass die hier präsentierte Kohorte trotz niedrig erscheinender Patientenzahl, insgesamt eine durchschnittliche intensivmedizinische Patientenzusammensetzung reflektiert.

Insbesondere der SOFA Score zeigt eine gute Vorhersagekraft. Der in den Sepsis-3-Konsensuskriterien vorgeschlagene quickSOFA (qSOFA)-Score, in dem eine erhöhte Atemfrequenz ($\geq 22/\text{min}$), eine veränderte Bewusstseinslage sowie ein erniedrigter systolischer Blutdruck ($\leq 100 \text{ mmHg}$) beurteilt werden, ist ein erster Schritt zur schnelleren Diagnose der Sepsis (Singer et al. 2016). Auch wenn der qSOFA bereits eine schnelle Einschätzung der Patienten in „krank“ und „nicht-krank“ ermöglicht, so fehlt dem SOFA Score eine Analyse des Immunstatus der Patienten, obwohl dieser in der Sepsis charakteristisch verändert ist (Singer et al. 2016).

Dass die Immunantwort in der Sepsis verändert ist, wird bereits seit Ende der neunziger Jahre ausgiebig diskutiert. Entscheidend für das Krankheitsgeschehen in der Sepsis sind

Funktionsstörungen nahezu aller Zellen des Immunsystems (Hotchkiss et al. 2013). Zudem könnte der Einfluss von S1P und S1PR1 auf Immunzellen in der Sepsis von Bedeutung sein. Dass die S1P/S1PR1-Achse vor allem für die Migration von Lymphozyten wichtig ist, ist in der Literatur gut beschrieben (Blaho und Hla 2014). Die Ergebnisse der bereits veröffentlichten Arbeit dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass die Serum-S1P-Konzentration in der Sepsis vermindert ist und mit dem Schweregrad korreliert (Winkler et al. 2015).

Infolgedessen würde die Erweiterung des SOFA Scores um eine Analyse des Immunstatus, z.B. anhand einer differenzierten Analyse der Immunzellpopulationen im Differentialblutbild oder durch die Analyse des S1P-S1PR1-Status, die diagnostische Spezifität möglicherweise noch deutlich verbessern. Somit wäre anhand einer zuverlässigen Erhebung des Immunstatus ein „Immun-Score“ zukünftig denkbar.

4.2. Assoziation Serum-S1P und S1PR1-Expression mit Immunzellen

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Zusammensetzung der Immunzell-Populationen in der Sepsis verändert und, ob die Serum-S1P-Konzentration sowie die Rezeptorexpression des S1PR1 mit Veränderungen der Zellpopulationen im peripheren Blut assoziiert sind.

Die Ergebnisse zeigten zum einen, dass die Serum-S1P-Konzentration in der Sepsis reduziert ist und stimmen mit den bereits publizierten Daten überein (Coldewey et al. 2016, Frej et al. 2016, Gomes et al. 2014, Winkler et al. 2015). Zum anderen wurde gezeigt, dass das Expressionsniveau des S1PR1 in PBMC in der Sepsis erniedrigt ist.

Es fand sich eine negative Assoziation der Serum-S1P-Konzentration mit der Zahl der Neutrophilen und eine positive Assoziation mit der Zahl der Lymphozyten. Die Monozytenzahl hingegen war unabhängig von der S1P-Konzentration verteilt.

Die mRNA Expression des S1PR1 war positiv mit der Serum-S1P-Konzentration assoziiert. Im Differentialblutbild war die mRNA Expression des S1PR1 positiv mit der Zahl der Lymphozyten und negativ mit der Zahl der Monozyten assoziiert.

Im Folgenden sollten mögliche Bedeutungen dieser Assoziationen in der Sepsis diskutiert werden.

4.2.1. S1P und neutrophile Granulozyten

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die Sepsis mit einer Neutrophilie verbunden ist und diese mit einer niedrigen S1P-Konzentration im Serum assoziiert war.

Neutrophile Granulozyten sind die zahlenmäßig dominierende Leukozyten-Subpopulation und gehören zum angeborenen Immunsystem (Kapitel 1.2.1). Im Rahmen einer sog. Linksverschiebung werden vermehrt reife und unreife Neutrophile aus dem Knochenmark ins Blut freigesetzt. In einer prospektiven Observationsstudie wurden im Blut von SIRS- und Sepsis-Patienten ebenfalls vermehrt unreife, aber funktionstüchtige Neutrophile nachgewiesen (Drifte et al. 2013). Im Blut unterteilen sich Neutrophile etwa gleichmäßig in einen Zirkulations- und einen marginalen Randpool. In einer Infektion werden Neutrophile möglicherweise vermehrt aus dem marginalen Rand- in den Zirkulationspool mobilisiert (Summers et al. 2010). In der Sepsis scheint zudem die Apoptose der Neutrophilen verzögert zu sein, so dass sich die Neutrophilen ungewöhnlicher Weise 24 Stunden nach Verlassen des Knochenmarks im Blut befinden und so zur Neutrophilie beitragen (Tama-yo et al. 2012). Damit ist eine Neutrophilie in der Sepsis zu erwarten und wird durch die zuvor beschriebenen Beobachtungen bestätigt.

Eine Neutrophilie in der Sepsis ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Kovach und Standiford 2012). Zum einen kann die Neutrophilie die Entwicklung eines Organversagens negativ beeinflussen (Cohen 2002), zum anderen wurde in klinischen Studien ein erhöhtes Risiko für Sekundärinfektionen, die das Immunsystem in der Sepsis weiter schwächen, beobachtet (Delano et al. 2011, Stephan et al. 2002). In Sepsistiermodellen beobachteten Delano et al., bei erhöhter Anzahl sowie Funktionseinschränkung der Neutrophilen, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Pneumonie (Delano et al. 2011). Auch Stephan et al. beobachteten in 21 schwerkranken Patienten (SAPS II Score >20) mit eingeschränkter neutrophiler Funktion ein erhöhtes Risiko für *Staphylokokkus aureus*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen (Stephan et al. 2002).

Die Wiederherstellung funktionsfähiger neutrophiler Granulozyten stellt einen Therapieansatz in der Sepsis dar. Zum Beispiel konnte bei 24 Patienten, die 36 Stunden nach einer kardiochirurgischen Bypass-OP ein SIRS entwickelten, durch eine Leukofiltration der Neutrophilen die Organfunktion verbessert werden (Treacher et al. 2001). Eine Reduktion der Mortalität in der Sepsis konnte auch durch die Anwendung niedrigdosierter Glucocorticoide, die vermutlich die Aktivierung von Neutrophilen verbessern, sowie durch die Anwendung von aktiviertem Protein C, das die Neutrophilen durch verminderte Expression

endothelialer Adhäsionsmoleküle an der Migration ins Entzündungsgebiet hindert, gezeigt werden (Murakami et al. 1997, Vincent und Abraham 2006). In der klinischen Routine konnten sich diese Methoden jedoch nicht durchsetzen. Aufgrund der Ergebnisse einer Multicenterstudie mit 1690 Patienten, die an einer systemischen Infektion oder an einem Organversagen litten (Bernard et al. 2001), wurde das aktivierte Protein C zur Therapie der Sepsis zugelassen. Nachdem die positiven Ergebnisse von Bernard et al. in einer Multicenterstudie mit 223 Sepsis-Patienten nicht bestätigt werden konnten, wurde das bereits zugelassene Medikament jedoch wieder vom Markt genommen (Ranieri et al. 2012).

Neutrophile Granulozyten sind als Zellen der angeborenen Immunantwort zur Chemotaxis und Phagozytose befähigt (Kapitel 1.2.1). Nach Verlassen des Gefäßsystems durch endotheliale Transmigration erkennen die Neutrophilen chemotaktisch den Ort der Entzündung, bekämpfen pathogene Erreger, z.B. mittels Phagozytose, und tragen zur Freisetzung zahlreicher Zytokine bei.

In der Sepsis sind die Neutrophilen jedoch sowohl in ihrer Migration zum Ort der Infektion als auch in ihrer Emigration aus dem Infektionsgebiet eingeschränkt (Kovach und Standiford 2012). Letzteres führt zur Schädigung des dortigen Gewebes und kann in einem Organversagen enden (Cohen 2002).

Interessanterweise zeigten Zellmigrations-Assays, dass auch das S1P einen Einfluss auf Chemotaxis und Migration der Neutrophilen besitzt. Kawa et al. beobachteten eine Reduktion von Chemotaxis und Migration humaner neutrophiler Zellen bei ansteigender S1P-Konzentration (Kawa et al. 1997). Rahaman et al. isolierten Neutrophile aus Pneumonie-Patienten (n=16) und gesunden Kontrollen (n=10), behandelten diese mit S1P vor und beobachteten ebenfalls eine reduzierte IL-8-vermittelte Chemotaxis der Neutrophilen (Rahaman et al. 2006). Ein veränderter Serum-S1P-Spiegel, wie in der Sepsis vorhanden, könnte somit die Neutrophilenmigration und darüber hinaus die Mortalität in der Sepsis beeinflussen. Möglicherweise sind niedrige S1P-Spiegel daher ein Signal zur verstärkten Migration für die neutrophilen Granulozyten.

Ledgerwood et al. konnten in Mäusen zeigen, dass die S1P-Konzentration im entzündeten Gewebe erhöht ist. Dafür wurde durch Injektion von Allo- oder Adenovirus-Antigenen eine Gewebsinflammation in den Mäusen induziert und die S1P-Konzentration zwei bis sieben Tage nach Induktion der Entzündung durchflusszytometrisch gemessen (Ledgerwood et al. 2008). Ein hoher S1P-Spiegel im Gewebe inhibiert möglicherweise die

Neutrophilenmigration aus dem entzündeten Gewebe. Die dadurch begünstigte neutrophile Organinfiltration könnte ein Erklärungsansatz für ein Organversagen in der Sepsis sein.

Eine Beeinträchtigung des oxidativen Burst, der durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen das intrazelluläre Verdauen phagozytierter Erreger ermöglicht, könnte die Neutralisierung pathogener weiter Erreger behindern (Kovach und Standiford 2012). Wang et al. stimulierten aus Blutspendern isolierte neutrophile Zellen mit S1P und konnten zeigen, dass dies zu einem Anstieg des neutrophilen oxidativen Burst führt (Wang et al. 2015a).

Dementsprechend könnte die Substitution von S1P in septischen Patienten eine modulierende Wirkung auf die Neutrophilen haben. Die genauen Wirkungen einer S1P Therapie in Sepsis-Patienten sind zwar spekulativ. Möglicherweise könnte aber durch eine Modulation des S1P-Gradienten eine Organinfiltration durch neutrophile Granulozyten reduziert oder die Immunkompetenz neutrophiler Granulozyten durch eine Zunahme des oxidativen Burst angeregt werden.

4.2.2. Serum-S1P/S1PR-Expression und Monozyten/Lymphozyten

Eine niedrige S1PR1-Expression in PBMC war mit einer hohen Monozytenzahl, aber mit einer niedrigen Lymphozytenzahl assoziiert. Die Serum-S1P-Konzentration war ebenfalls positiv mit den Lymphozyten (signifikant) und im Trend negativ mit den Monozyten (nicht signifikant) assoziiert.

Es wurde zwar ein Absinken der Rezeptorexpression des S1PR1 in Patienten gegenüber der Kontrolle beobachtet, über den genauen Zelltyp kann jedoch methodenbedingt nur spekuliert werden.

Im Folgenden soll über mögliche Zusammenhänge von S1P, dem S1PR1 und deren Rolle in Monozyten und Lymphozyten in der Sepsis diskutiert werden.

4.2.2.1. Monozyten

Monozyten zirkulieren im Blut und differenzieren beim Verlassen der Blutbahn ins Gewebe zu Makrophagen oder zu dendritischen Zellen. Monozyten interagieren dabei eng mit Zellen des adaptiven Immunsystems (Gordon und Taylor 2005). Es gibt drei Monozyten-Subklassen: klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten, von denen die klassischen und nicht-klassischen am besten untersucht sind (Schmidl et al. 2014). Die nicht-klassischen Monozyten überwachen die Endothel-Integrität und sind für die Auf-

rechterhaltung der endothelialen Integrität essentiell, indem sie bei Bedarf die Angiogenese stimulieren oder für die Akkumulation von Myofibroblasten oder Kollagen sorgen (Carlin et al. 2013, Nahrendorf et al. 2007). Klassische Monozyten migrieren von der Blutbahn ins Gewebe und übernehmen dort eine wichtige Überwachungsfunktion, z.B. indem sie als antigenpräsentierende Zellen die adaptive Immunantwort aktivieren (Carlin et al. 2013, Jakubzick et al. 2013). In der inflammatorischen Phase der Immunantwort differenzieren klassische Monozyten zu Makrophagen (Jakubzick et al. 2013).

Monozyten und Makrophagen exprimieren S1P-Rezeptoren, die abhängig von Zelltyp und Situation deren Migration und Aktivierung steuern (Blaho und Hla 2014). Das S1P-Expressionsmuster untersuchten Duong et al. in humanen Monozyten und induzierten mit dem *Macrophage colony stimulating*-Faktors (M-CSF) eine Differenzierung zu Makrophagen. Mittels *Western Blotting* wurde die Proteinkonzentration gemessen und gezeigt, dass humane Monozyten den S1PR1, S1PR2 und den S1PR4 exprimieren, während der S1PR3 fehlt (Duong et al. 2004). In humanen Makrophagen konnte hingegen S1PR1 bis S1PR4 nachgewiesen werden (Duong et al. 2004). Im Vergleich dazu exprimieren T-Lymphozyten S1PR1 sowie S1PR4 und B-Lymphozyten S1PR1-4 (Blaho und Hla 2014). Diese zellspezifische Rezeptorexpression könnte ein möglicher Erklärungsansatz dafür sein, dass die Serum-S1P-Konzentration positiv mit der Lymphozytenzahl und negativ mit der Monozytenzahl assoziiert ist, da unterschiedliche S1PR aktiviert werden.

In vivo-Studien zeigten, dass der S1PR1 möglicherweise die Migration der Makrophagen aus dem Entzündungsgebiet in afferente Lymphbahnen kontrolliert (Weichand et al. 2013). Da eine S1PR1-Deletion embryonal letal ist (Liu et al. 2000), wurde der S1PR1 gezielt in Monozyten/Makrophagen lebender Mäusen deletiert (Weichand et al. 2013). Im Anschluss daran wurde in diesen Mäusen durch die Applikation von 10 mg/kg Zymosan A eine Peritonitis induziert (Weichand et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der S1PR1 die Makrophagen-Migration induziert. Sechs Tage nach Peritonitis-Induktion akkumulierten von Monozyten abstammende Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit, wenn der S1PR1 deletiert war (Weichand et al. 2013). Auch in Migrationsassays konnte die promigratorische Wirkung des S1P auf Monozyten/Makrophagen gezeigt werden. Interessanterweise sind apoptotische Zellen in entzündetem Gewebe in der Lage Makrophagen zu aktivieren und so die S1PR1-Expression auf humanen Makrophagen zu induzieren (Weis et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass dies über den S1PR1 geschieht, da eine Migration in S1PR1-defizienten Mäusemakrophagen ausblieb (Weichand et al. 2013). Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass eine Hochregulation des S1PR1 in Mak-

rophagen als Sensor für den S1P-Gradienten dienen könnte und apoptotische Zellen die Migration zum Entzündungsort aufrechterhalten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ergaben eine verminderte S1PR1-Expression in PMBC septischer Patienten gegenüber der Kontrolle. Es kann nicht geschlossen werden, dass dies gezielt in den Monozyten der Fall war. Es könnte aber spekuliert werden, dass bei reduzierter Expression des S1PR1 auch die migratorische Kompetenz der Monozyten eingeschränkt ist.

Die verminderte S1PR1-Expression könnte im Rahmen der sog. Endotoxin-Toleranz der Monozyten geschehen. Die Endotoxin-Toleranz gilt als etabliertes Kennzeichen der septischen Immunparalyse und beschreibt die reduzierte Reagibilität der Monozyten nach dem Erstkontakt mit LPS einhergehend mit dem Verlust der immunologischen Kompetenz, z.B. der TNF α -Sekretion (Biswas und Lopez-Collazo 2009, Cavaillon und Adib-Conquy 2006). Dies wurde in zwei prospektiven Observationsstudien mit intensivpflichtigen Sepsis-Patienten (n=23, n=20) bestätigt, denn diese zeigten, dass aus dem Blut isolierte Monozyten nach LPS-Stimulation weniger proinflammatorische Zytokine sezernieren (Munoz et al. 1991). Wohingegen die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine unbeeinträchtigt blieb oder verstärkt war (Rigato und Salomao 2003). Dieser Wechsel der Sekretion proinflammatorischer zur Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wird auch als Leukozyten-Reprogrammierung bezeichnet (Zhang und Morrison 1993).

Die therapeutische Beeinflussung des S1PR1 durch den S1PR1-Agonisten FTY720 führte im Mausmodell zu einer Akkumulation der Monozyten in lymphatischen Organen (Lewis et al. 2013, Singer et al. 2005). Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass FTY720, das zunächst in die aktive Form FTY720-P phosphoryliert wird, bei längerer Gabe eine inhibitorische Wirkung auf die Monozyten besitzt. Bei längerer Gabe führt FTY720-P nämlich zu einer Internalisierung des S1PR1 und somit dazu, dass S1P nicht mehr als Signal erkannt wird (Graler und Goetzl 2004, Mullershausen et al. 2009). Dies wurde auch in mehreren *in vivo* Arbeiten gezeigt (Tabelle 13). Eine Arbeitsgruppe applizierte Mäusen intraperitoneal FT720 (3 mg/kg/Tag), was zu einer Akkumulation von Makrophagen in subkapsulären Sinus mesenterialer Lymphknoten führte (Singer et al. 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte in einem ähnlichen Experiment mit intraperitonealer Gabe von FT720 (0,3 mg/kg/Tag) durchflusszytometrisch ebenfalls eine Akkumulation klassischer Monozyten in Milz und Knochenmark (Lewis et al. 2013). In einer anderen *in vivo* Arbeit wurde anhand eines *Graft versus Host disease* (GvHD)-Mausmodells gezeigt, dass die intraperitoneale Applikation des selektiven S1PR1-Agonisten CYM-5442 (3 mg/kg/Tag) interessanterweise

zu einer reduzierten Akkumulation von Makrophagen im entzündeten Gewebe führt (Cheng et al. 2015).

Ein interessanter Aspekt wäre, dass sich ein Agonismus am S1PR1 protektiv auf entzündetes Gewebe auswirken könnte. Einerseits könnte ein Arrest der Monozyten in den Lymphorganen durch nicht-selektiven Agonismus am S1PR1 eine Gewebeeinfiltration der Monozyten reduzieren. Andererseits könnte ein selektiver Agonismus am S1PR1 die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen im Entzündungsgebiet reduzieren und dadurch eine Gewebeschädigung durch monozytäre Zytokine, wie z.B. dem TNF α , vermieden werden.

Tabelle 13: Überblick über ausgewählte *in vivo* Tierexperimente zur Untersuchung von S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten mit Beeinflussung der Monozyten- bzw. Makrophagenmigration

Studie	Agonisten & Antagonisten	Tiermodell	wichtigste Ergebnisse
Singer et al. (2005)	FTY720 S1PR1,3-5 Agonist →3 mg/kg, i.p.	Mäuse	<ul style="list-style-type: none"> - Akkumulation S1PR1-exprimierender Makrophagen in subkapsulären Sinus mesenterialer Lymphknoten - kein Effekt auf zirkulierende Monozytenzahl
Lewis et al. (2013)	FTY720 S1PR1,3-5 Agonist →0,3 mg/kg, i.p.	Mäuse	<ul style="list-style-type: none"> - Akkumulation klassischer Monozyten in Milz und Knochenmark - Stimulation Monozytenproliferation in Knochenmark
Cheng et al. (2015)	CYM-5442 S1PR1 Agonist → 3 mg/kg, i.p.	Mäuse aGVHD	<ul style="list-style-type: none"> - reduzierte Akkumulation von Makrophagen im entzündeten Gewebe - kein Effekt auf Makrophagenproliferation - in HUVECs konnte CYM-5442 die Monozytenadhäsion und -migration direkt über die CCL2 und CCL7 Synthese von ECs inhibieren

aGVHD, akute Graft vs. Host-Disease; CCL, Chemokinligand; EC, Endothelzelle; HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells; i.p., intraperitoneal; S1PR, S1P-Rezeptor.

4.2.2.2. Lymphozyten

Die septische Lymphopenie ist ein phänotypisches Merkmal von Sepsis-Patienten. Als potenzieller Mechanismus der Lymphopenie wird eine Apoptose der Lymphozyten angenommen. In Mausmodellen der Sepsis wurden apoptotische B- und T-Lymphozyten in lymphatischen sowie in vielen anderen Organen gefunden (Hotchkiss et al. 1997, Wang et al. 1994). In an einer Sepsis verstorbenen Patienten konnte anhand immunhistochemischer Färbungen ebenfalls ein Untergang von B- und T-Zellen in sekundären Lymphorganen (Milz und Lymphknoten) gezeigt werden (Hotchkiss et al. 1999a). Das Fehlen einer Lymphopenie durch den Einsatz von Apoptose-Inhibitoren oder Induktion anti-apoptotischer Proteine untermauert diese Beobachtungen (Hotchkiss et al. 1999b, Oberholzer et al. 2001). In der Sepsis kommt es zudem zu einem Lymphozytenshift. In Kaninchen führte eine LPS-Stimulation zu einer Umverteilung der Lymphozyten aus dem

peripheren Blut in lymphatisches Gewebe (Toft et al. 1993). Yin et al. zeigten in einem Mausmodell der Sepsis eine Lymphozyten-Akkumulation in nicht-lymphatischem Lungengewebe. Während sich 24 Stunden nach einer mittels *cecal ligation and puncture* (CLP) Sepsis-Induktion die Zahl der Lymphozyten in den Lungengefäßen um 50 % reduzierte, verdoppelte sich die Lymphozytenzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (Yin et al. 2000). Auch wenn der programmierte Zelltod eine mögliche Ursache der septischen Lymphopenie zu sein scheint, so könnte es auch sein, dass die Lymphozyten nicht mehr frei aus den Lymphorganen in die Zirkulation migrieren können, weil wichtige Triggerfaktoren für den Austritt fehlen. Dazu könnte auch die bereits beschriebene Funktionseinschränkung der Monozyten beitragen, deren Sekretion von Zyto- und Chemokinen in der Sepsis verändert ist (Munoz et al. 1991, Rigato und Salomao 2003). Weitere Lymphozyten-Migrationsfaktoren, wie beispielsweise das S1P in Interaktion mit seinen Rezeptoren, könnten zu einer reduzierten Lymphozytenzahl in der Peripherie beitragen.

Der essentielle Einfluss der S1P/S1PR-Achse auf die Migration von Lymphozyten ist gut untersucht. Naive T- und B-Lymphozyten zirkulieren zwischen Blut, Lymphe und sekundären lymphatischen Organen (Kapitel 1.2.2). Die Lymphozytenmigration ist abhängig von der Expression des S1PR1, da die Zellen den S1P-Gradienten über den S1PR1 erkennen (Allende et al. 2004, Matloubian et al. 2004, Sanna et al. 2004). Dass es einen Zusammenhang zwischen S1P und der Lymphozytenzahl gibt, geht u.a. auch auf die Arbeiten von Pappu et al. zurück, die zeigten, dass ein S1P-Gradient für die Migration von Lymphozyten entscheidend ist (Pappu et al. 2007). Generell führt eine niedrige Exposition von S1P gegenüber Lymphozyten zu einer Hochregulation des S1PR1-Rezeptorproteins, während eine anhaltende hohe S1P-Exposition vermutlich eine Herunterregulation des S1PR1 zur Folge hat (Kapitel 1.3.3). Dieser Mechanismus wird durch den S1PR1-Agonisten FTY720 therapeutisch beeinflusst. FTY720 wird durch die SphK zu FTY720-P phosphoryliert, bindet an die S1PR1,3-5 und führt bei längerfristiger Exposition zur Herunterregulation des S1PR1 (Brinkmann et al. 2002, Clemens et al. 2003, Graler und Goetzl 2004, Mandala et al. 2002, Oo et al. 2007). Die Zellen erkennen den S1P-Gradienten nicht mehr und verbleiben in den sekundären Lymphorganen (Brinkmann et al. 2004). Peripher ist dies an einer Lymphopenie erkennbar (Pinschewer et al. 2000, Yanagawa et al. 1998).

Bislang fehlte eine Korrelationsanalyse der S1P-Konzentration mit lymphozytären Zellen in Sepsis-Patienten sowie die Analyse der S1PR1-Expression in humanen Immunzellen in der Sepsis. Basierend auf der oben genannten Literatur wurde erwartet, dass bei niedrigen Serum-S1P-Konzentrationen, wie in der Sepsis, die S1PR1-Expression im Vergleich

zur Kontrolle eher erhöht sei, doch dies war nicht der Fall. Denn entgegen der Erwartung war die S1PR1-Expression in den PBMC von Sepsis-Patienten niedriger als in der Kontrolle. Es wurde jedoch eine positive Korrelation der S1PR1-Expression mit der Lymphozytenzahl im peripheren Blut sowie mit der Serum-S1P-Konzentration gezeigt. Bei positiver Korrelation würden hohe S1P-Konzentrationen im Serum eine Lymphopenie eher ausschließen. Eine Veränderung des S1P-Spiegels, wie sie in den Sepsis-Patienten beobachtet wurde, könnte somit tatsächlich die Entstehung der septischen Lymphopenie mitbeeinflussen, da damit das Migrationssignal für die Lymphozyten abfällt.

Der Zusammenhang zwischen der S1P-Konzentration und der Lymphozytenmigration ist auch im entzündeten Gewebe von besonderer Bedeutung. Ledgerwood et al. zeigten, dass die S1P-Konzentration im entzündeten Gewebe erhöht ist. Dafür wurde durch Injektion viraler Antigene eine Inflammation in Mäusen induziert und die S1P-Konzentration zwei bis sieben Tage nach Induktion der Entzündung im Ohrmuschelgewebe gemessen (Ledgerwood et al. 2008). Dies könnte ein wichtiger Hinweis sein, dass die Serum-S1P-Konzentration in der Sepsis absinkt, während sie im Gewebe möglicherweise erhöht ist, um so die Lymphozytenmigration aus dem Blut in das Gewebe zu ermöglichen. Dies könnte eine septische Lymphopenie somit miterklären. Es wäre interessant zu untersuchen, welche S1P-Konzentration tatsächlich in septisch-entzündeten Organen herrscht, denn dann wäre eine lokale Änderung der S1P-Konzentration möglicherweise ein Regulationsmechanismus um Abwehrzellen verstärkt zum Ort der Entzündung zu locken.

Die Beobachtung, dass PBMC ihren S1PR1 verlieren, steht auch im Zusammenhang mit zwei tierexperimentellen Arbeiten. Diese zeigten, dass die Herunterregulation des S1PR1 auf aktivierten T-Zellen mit einem Verlust der migratorischen Fähigkeiten der Immunzellen einhergeht (Graeler und Goetzl 2002, Matloubian et al. 2004). Eine Arbeitsgruppe aktivierete Mäuse-T-Zellen *in vitro* mittels anti-CD3 und anti-CD28 und beobachtete sowohl eine Herunterregulation des S1PR1 auf den T-Zellen als auch eine reduzierte T-Zell-Migration entlang eines S1P-Gradienten in einem Migrationsassay (Graeler und Goetzl 2002). Eine weitere Arbeit zeigte nach Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin, einem Protein-Antigen, in aus Lymphknoten isolierten T-Zellen die mRNA Expression des S1PR1 und untersuchte die S1P-vermittelte Chemotaxis in einem Migrationsassay (Matloubian et al. 2004). Während es einen Tag nach Immunisierung zu einer Herunterregulation des S1PR1 und einer reduzierten S1P-Sensibilisierung kam, konnte mehrere Tage nach T-Zell-Aktivierung eine Re-Expression des S1PR1 sowie eine wiederhergestellte S1P-Sensitivität beobachtet werden (Matloubian et al. 2004). Somit wäre es möglich, dass die in dieser Arbeit beobachtete Herunterregulation des S1PR1 in PBMC möglicherweise

durch eine T-Zell-Aktivierung zu erklären ist. Die reduzierte S1PR1-Expression auf Lymphozyten könnte möglicherweise einen wichtigen Regulationsmechanismus darstellen, der in der Anfangsphase der Sepsis (<24 Stunden) ggf. einer Hyperinflammation vorbeugen kann und somit eine Art immunsuppressive Antwort auf ein durch proinflammatorische Zytokine überschwemmtes Immunsystem darstellen könnte. In der späten Phase der Sepsis, in der Immunparalyse, könnte dieser Mechanismus womöglich an Wirkung verlieren. Deswegen wäre es darüber hinaus auch interessant, dies in einer longitudinalen Studie zu untersuchen, ob es ggf. zu einer späteren Hochregulierung des S1PR1 in Sepsis-Patienten kommt und wie das den Heilungsverlauf beeinflussen könnte.

Ein solcher Mechanismus, die durch T-Zell-Aktivierung induzierte Veränderung der Rezeptorexpression, ist nicht unwahrscheinlich und andere Untersuchungen zeigten dies z.B. in T-Zellen von Sepsis-Patienten (Yi et al. 2010). Eine Aktivierung der T-Zellen, die in der Sepsis generell mit einer erhöhten Anzahl von Antigenen konfrontiert sind, durch Antigen-Persistenz kann zu einer Erschöpfung sowie nachfolgender Funktionseinschränkung und veränderter Rezeptorexpression, z.B. der Zytokin-Rezeptoren, der T-Zellen führen (Yi et al. 2010). Weitere Untersuchungen von Heidecke et al. ergaben, dass es in der Sepsis zu einer veränderten Sekretion zugunsten anti-inflammatorischer Zytokine kommt. Sie isolierten periphere T-Zellen aus dem Blut von 32 Sepsis-Patienten, stimulierten diese mit anti-CD3 und anti-CD28 und erfassten anhand enzymatischer Immunassays die Zytokinsekretion von $\text{TNF}\alpha$, IL-2, $\text{IFN}\gamma$ sowie IL-4, IL-10 (Heidecke et al. 1999). Die Untersuchungen ergaben, dass die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen reduziert war, während die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine durch $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen konstant blieb (Heidecke et al. 1999). Somit könnten T-Zellen durch eine reduzierte proinflammatorische Zytokinreduktion womöglich einer Hyperinflammation vorbeugen. Boomer et al. beobachteten in der Sepsis darüber hinaus nicht nur eine Veränderung der Zytokinsekretion, sondern auch eine Veränderung der Rezeptorexpression auf T-Zellen. Dazu fand bei 40 Patienten, die an einer schweren Sepsis auf der Intensivstation verstorben waren, postmortem eine Untersuchung von Milz und Lunge statt (Boomer et al. 2011). Die aus der Milz isolierten T-Zellen wurden zum einem mittels anti-CD3 und anti-CD28, zum anderen mit LPS stimuliert und zeigten in beiden Fällen eine reduzierte Zytokinsekretion (Boomer et al. 2011). Interessanterweise kann im Tiermodell parallel dazu durch den nicht-selektiven S1P-Rezeptoragonisten AAL-R die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ($\text{IFN}\alpha$, CCL2, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) sowie eine Akkumulation von Immunzellen in Mäuse-Lungen reduziert werden (Marsolais et al. 2008, Marsolais et al. 2009). Dieser Effekt wird ausschließlich über den S1PR1 reguliert, da der S1PR1-spezifische Agonist CYM 5442 diese Effekte signifikant unterdrückt (Teijaro et al. 2011).

Eine Akkumulation von Immunzellen im entzündeten Gewebe durch die Anwendung von S1PR1-Agonisten wurde von Ledgerwood et al. gezeigt (Ledgerwood et al. 2008). Ein interessanter Aspekt wäre daher, dass das hier erhobene Ergebnis der Herunterregulation des S1PR1 in septischen Patienten einen gegenregulatorischen Mechanismus in der akuten pro-inflammatorischen Phase der Sepsis darstellt und diese Herunterregulation damit möglicherweise Organ-protektiv ist.

In dieser Arbeit konnte nicht differenziert werden, welche Zellpopulation den S1PR1 herunterreguliert, da die Messung der S1PR1-Expression in PBMC, d.h. in allen peripheren mononukleären Zellen, vorgenommen wurde. Es kann daher nicht darauf geschlossen werden, ob die beobachteten Veränderungen innerhalb der Zellpopulationen, die Lymphopenie und die Monozytose, die reduzierte S1PR1-Expression erklären können und, inwieweit sich die Expressionen innerhalb der Zellpopulation verschieben. Dafür ist die qPCR aus PBMC nicht die geeignete Methode. Eine FACS-Sortierung und anschließende mRNA Expressionsmessung oder eine FACS-Analyse der S1PR1-Oberflächenexpression könnte womöglich besser zwischen den Zellpopulationen unterscheiden. Ein S1PR1-Antikörper, anhand dessen eine solche Analyse möglich wäre, sowie ein dafür etabliertes Messprotokoll sind jedoch noch nicht vorhanden. Weiterhin sollte anhand der hier erhobenen Ergebnisse eher eine Methode gefunden werden, die sich ggf. im klinischen Alltag etablieren könnte. Eine FACS-Analyse ist deutlich teurer (Sack 2016), keine Bedside-Methode und für die klinische Routine aktuell eher ungeeignet. Obwohl anhand der qPCR keine Aussagen über die tatsächlich exprimierten Rezeptoren gemacht werden kann, ist davon auszugehen, dass die mRNA Expression auch mit der Proteinbiosynthese, in diesem Falle mit der S1PR1 Oberflächenexpression, korreliert (Guo et al. 2008).

In der Annahme, dass die septische Lymphopenie mit dem Ausmaß der Sepsis assoziiert ist (Chung et al. 2015, Drewry et al. 2014), ist der S1P-Gradient und die Beeinflussung des S1PR1 als möglicher Therapieansatz von besonderem Interesse. Eine Wiederherstellung physiologischer S1P-Konzentrationen durch eine Substitution von S1P wäre naheliegend. Das dies grundsätzlich möglich ist, wurde bereits in Tierexperimenten beschrieben. Pappu et al. zeigten in SphK1,2-defizienten Mäusen, dass das Fehlen des S1P-Gradienten zum Verbleib der T- und B-Lymphozyten in den Lymphorganen und zur Lymphopenie führt. Vier Stunden nach intravenöser S1P-Substitution in den SphK1,2-defizienten Mäusen wurde einerseits eine erhöhte Anzahl an T- und B-Lymphozyten im Blut, andererseits eine S1PR1-Downregulation auf den im Blut zirkulierenden T-Zellen beobachtet (Pappu et al. 2007). Jedoch ist die, in Mäusen beobachtete, kurze Halbwertszeit des S1P von etwa 15 Minuten zu beachten (Venkataraman et al. 2008). Sollte S1P

direkt substituiert werden, so müsste dies ggf. kontinuierlich, z.B. mittels eines Perfusors, geschehen. Weiterhin muss die Bindung des S1P an die entsprechenden Trägermoleküle berücksichtigt werden. Möglicherweise ist die Signaltransduktion des S1P von der Art des Trägermoleküls (HDL, ApoM, Albumin) abhängig (Kapitel 1.3.1). Galvani et al. beobachteten anhand von Signaltransduktionsanalysen in *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC), dass S1P zwar unabhängig vom Trägermolekül die MAPK aktiviert (Abbildung 3), eine S1P-Bindung an ApoM und HDL hingegen andere Signalwege initiiert als an Albumin-gebundenes S1P (Galvani et al. 2015).

Auch der Einsatz von S1P-Agonisten könnte ein therapeutischer Ansatz der Sepsis sein. In zahlreichen Tiermodellen konnte bereits ein antiinflammatorischer Effekt der S1PR1-Agonisten, u.a. in der Sepsis, gezeigt werden (Tabelle 14). So konnte beispielsweise die Substitution der S1PR1-Agonisten AAL-R und CYM-5442 in einem murinen Influenza-Lungenmodell einerseits die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF α), andererseits die Akkumulation angeborener Immunzellen in der Lunge inhibieren (Teijaro et al. 2011). Der S1PR-Agonist FTY720 gilt, wie bereits in Kapitel 1.3.3 beschrieben und vielfach in Mausexperimenten gezeigt, als funktioneller Antagonist. Initial führt FTY720-P zu einer Aktivierung des S1PR1, nach längerer Applikationsdauer aber zu einer Rezeptor-Internalisierung und -Degradation (Graler und Goetzl 2004, Mullershausen et al. 2009). Eine daraus resultierende verminderte Empfindlichkeit der T- und B-Lymphozyten für den S1P-Gradienten (Brinkmann et al. 2004) führt zu einer peripheren Lymphopenie im Blut (Pinschewer et al. 2000, Yanagawa et al. 1998). Eine kurzfristige Gabe des FTY720 in der akuten Phase der Sepsis wäre somit ebenfalls denkbar. Allerdings nur unter großer Vorsicht und Berücksichtigung einer möglichen Verstärkung der septischen Lymphopenie durch die stattfindende Rezeptorinternalisierung des S1PR1 und deren Folgen. Letzteres könnte durch den Einsatz eines kürzlich entwickelten Derivats des FTY720, das FTY720 (S)-Phosphonat, vermieden werden. Wang et al. beobachteten in einem murinen Bleomycin-Lungenmodell nach intraperitonealer Applikation von FTY720 (S)-Phosphonat im Vergleich zur Applikation von FTY720 einerseits eine verbesserte endotheliale Barrierefunktion, andererseits eine nach Rezeptor-Aktivierung fortbestehende Oberflächenexpression des S1PR1 (Wang et al. 2014). Letzteres könnte möglicherweise eine entscheidende Rolle für die Lymphozytenzirkulation spielen, da S1PR1 den Lymphozyten als Sensor des, für deren Migration vorausgesetzten, S1P-Gradienten zwischen Blut bzw. Lymphe und Gewebe dient (Schwab et al. 2005) (Kapitel 1.3.3). Die an Tag sieben durchgeführten Blutbildanalysen von Wang et al. scheinen dies zu bestätigen. Während die Applikation von FTY720 in der Kontrollgruppe eine 45 %ige Reduktion der peripheren Lymphozyten verursachte, wurde nach Applikation von FTY720 (S)-Phosphonat lediglich

eine Reduktion von 7 % beobachtet (Wang et al. 2014). Erstaunlicherweise verursachte die Applikation von FTY720 (S)-Phosphonat in den Bleomycin-infizierten Mäusen sogar einen Anstieg der, in der Inflammation erniedrigten, peripheren Lymphozytenzahlen um etwa 50 %, wohingegen FTY720 eine weitere Reduktion der Lymphozytenzahlen um ca. 17 % verursachte (Wang et al. 2014). Die durch die Anwendung von FTY720 (S)-Phosphonat möglicherweise aufrechterhaltende Lymphozytenzirkulation könnte somit vermutlich einen positiven Einfluss auf die septische Lymphopenie besitzen und darüber hinaus eventuell sogar den immunparalytischen Zustand von Sepsis-Patienten verbessern. Die Anwendung von FTY720 (S)-Phosphonat in Tiermodellen der Sepsis scheint somit vielversprechend und wäre zukünftig wünschenswert.

Basierend auf den Untersuchungen des S1PR-Agonisten und funktionellen Antagonisten FTY720 wurde, unter der Annahme, dass echte S1PR1-Antagonisten ebenfalls eine Rezeptorinternalisierung und einen Verbleib der Lymphozyten in den Lymphorganen verursachen, der Wirkmechanismus von S1PR1-Antagonisten untersucht. Foss et al. zeigten, dass ein Phosphat-Analogon des FTY720 (VPC44116), das antagonistisch an S1PR1 und S1PR3 wirkt, in Mäusen zunächst keinen Verbleib der Lymphozyten in den Lymphorganen induzierte und somit eine möglicherweise andere Wirkung als die funktionellen S1PR-Antagonisten besitzt (Foss et al. 2007). Wurde derselbe S1PR-Antagonist jedoch zusammen mit einem selektiven S1PR1-Agonisten (VPC44152) in die Mäuse injiziert, so wurde das agonistisch verursachte Trapping der Lymphozyten in den Lymphorganen aufgehoben (Foss et al. 2007). Der S1PR-Antagonist VPC44116 könnte somit möglicherweise doch einen positiven Einfluss auf die Lymphopenie besitzen und einen therapeutischen Nutzen in der Sepsis-Therapie haben. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die Modulation an S1P-Rezeptoren häufig auch unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringt. VPC44116 beispielsweise verursachte in Lungen und Nieren der Mäuse ein kapilläres Leck (Foss et al. 2007). Da sich eine gestörte endotheliale Barrierefunktion in der Sepsis ohnehin schon negativ auf das Krankheitsbild der Sepsis-Patienten auswirkt, ist diese Nebenwirkung, gerade in Sepsis-Patienten, nicht zu akzeptieren.

Tabelle 14: Überblick über ausgewählte *in vivo* Tierexperimente zur Untersuchung von S1P und S1P-Rezeptor-Agonisten in der Inflammation

Studie	Agonisten & Antagonisten	Tiermodell	wichtigste Ergebnisse
Marsolais et al. (2009)	AAL-R S1PR1, 3-5 Agonist →0,1 mg/kg i.t.	Maus H1N1-induziertes akutes Lungenversagen	<ul style="list-style-type: none"> - Reduktion proinflammatorischer Zytokine (IFN-α, CCL2, IL-6, TNFα, IFNγ) - keine Akkumulation angeborener und adaptiver IZ im Lungengewebe
Teijaro et al. (2011)	AAL-R S1PR1, 3-5 Agonist →0,2 mg/kg i.t. CYM-5442 S1PR1 Agonist →2 mg/kg/d i.t./oral RP-002 S1PR1 Agonist →3 mg/kg i.t. →6 mg/kg oral	Maus H1N1-induziertes akutes Lungenversagen	<p>AAL-R war effektiver war CYM-5442:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reduktion proinflammatorischer Zytokine (IFN-α, CCL2, IL-6, TNFα, IFNγ) - Inhibierung Rekrutierung angeborener IZ ins Lungengewebe - verbessertes Überleben durch Applikation von RP-002
Gendron et al. (2015)	AAL-R S1PR1, 3-5 Agonist →0,1 mg/kg i.t.	Maus Hausstaubmilben induzierte allergische Entzündung der Atem- wege	<p>AAL-R inhibierte die bronchiale Hyperreagibilität um bis zu 70 %:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reduktion proinflammatorischer Zytokine (IL-5, IL-13) - reduzierte perivaskuläre und peribronchiale Akkumulation monokleärer Zellen
Wang et al. (2015b)	SEW-2871 S1PR1 Agonist →1-30 mg/kg i.p. JTE-01 S1PR2 Antagonist →0,1-10 mg/kg i.p.	Maus Sepsis (CLP)	<p>Dosis- und Zeitabhängige:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reduktion vaskuläre Permeabilität - Verbesserung der Nierenfunktion durch SEW-2871 (6 Stunden nach CLP)
Zhang et al. (2009)	AUY954 S1PR1 Agonist →10 mg/kg i.g.	Ratten akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (EAN)	<ul style="list-style-type: none"> - Reduktion proinflammatorischer Zytokine (IL-17, MMP-9) - Reduktion Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten in periphere Nerven
Wang et al. (2014)	FTY720 S1PR1,3-5 Agonist →0,5 mg/kg, i.p. FTY720(S)-Phosphonat S1PR1,3-5 Agonist →0,5 mg/kg, i.p.	Maus Bleomycin (i.t.)- induziertes Lungenver- sagen	<ul style="list-style-type: none"> - Reduktion vaskuläre Permeabilität; FTY720 (S)-Phosphonat stärker als FTY720 - Reduktion S1PR1-Expression in Lungen nach Aktivierung durch FTY720 - fortbestehende S1PR1-Expression in Lungen nach Aktivierung durch FTY720 (S)-Phosphonat - FTY720 (S)-Phosphonat beeinflusst periphere Lymphozyten weniger als FTY720
Foss et al. (2007)	VPC44152 S1PR1 Agonist →18 mg/kg VPC44116 S1PR1,3 Antago- nist →22 mg/kg	Maus	<ul style="list-style-type: none"> - kein Trapping der Lymphozyten durch VPC44116 - Aufhebung des agonistisch induzierten Trappings der Lymphozyten durch VPC44116 - Reduktion endothelialer Barrierefunktion durch VPC44116 in Lunge und Niere

CCL2, Chemokinligand 2; CLP, Cecal Ligation and Puncture; EAN, experimental autoimmune neuritis; H1N1, Hämagglutinin 1-Neuramidase 1 (Influenza); IL-Interleukin; INF, Interferon; i.g., intragastral; i.p., interperitoneal; i.t., intratracheal; IZ, Immunzelle; MMP-9, Matrix Metalloprotease 9; TNF α , Tumornekrosefaktor α .

Neben der direkten Substitution von S1P oder einem S1PR1-Agonisten kann der Serum-S1P-Spiegel auch indirekt durch die Modifikation der S1P-metabolisierenden Enzyme (Kapitel 1.3.1) beeinflusst werden. Schwab et al. zeigten in Mäusen, dass die Applikation des Vitamin B6-Antagonisten 4-Deoxypyridoxine (DOP) die S1P-degradierende S1P-Lyase inhibiert und durch Trapping der T- und B-Zellen in den Lymphorganen eine Lymphopenie verursachte. Es wurde vermutet, dass die S1P-Lyase indirekt, durch die Erhöhung der S1P-Konzentration im Lymphgewebe, die S1PR1-Expression auf den Lymphozyten reduziert und die Zellen damit den S1P-Gradienten nicht mehr erkennen könnten (Schwab et al. 2005). Funktionell ähnelt dieser Mechanismus dem Wirkmechanismus des FTY720 (Kapitel 1.3.3). Bei der Beeinflussung der S1P-Spiegel in Patienten sollte daher immer berücksichtigt werden, dass eine Erhöhung der S1P-Konzentration, im Sinne eines negativen Feedbacks, auch einen Einfluss auf die S1PR1-Expression haben kann, der dem gewünschten Effekt möglicherweise entgegenwirken kann. Paradoxerweise konnte in mehreren tierexperimentellen Studien durch eine Inhibierung oder ein Fehlen der physiologischerweise S1P-synthetisierenden SphK2 ein Anstieg der S1P-Spiegel im Blut beobachtet werden. Im Blut SphK2-defizienter Mäuse wurden im Vergleich zum Wildtyp zwei- bis dreifach erhöhte S1P-Spiegel beobachtet (Sensken et al. 2010). In diesen SphK2-defizienten Mäusen verursachte die von Schwab et al. beschriebene DOP-induzierte Inhibierung der S1P-Lyase allerdings überraschenderweise im Lymphgewebe reduzierte und im Blut erhöhte S1P-Spiegel sowie erhöhte T- und B-Lymphozytenzahlen im peripheren Blut (Sensken et al. 2010). Somit beeinflusst die SphK2 über die Modifikation des S1P-Konzentrationsgradienten die Zirkulation der Lymphozyten und könnte ebenfalls einen therapeutischen Ansatz der septischen Lymphopenie darstellen. Diese Hypothese wird durch weitere tierexperimentelle Studien untermauert. Kharel et al. beispielsweise applizierten Ratten einen Guanidin-basierten, selektiven SphK2-Inhibitoren und beobachteten ebenfalls eine erhöhte S1P-Konzentration im Blut. Anhand der intravenösen Injektion von markiertem S1P konnte eine verzögerte Eliminierung des S1P aus dem Blut gezeigt werden (Kharel et al. 2015). Sowohl Sensken et al. als auch Kharel et al. vermuteten daraufhin eine von der S1P-Synthese-Funktion unabhängige Beeinflussung des S1P-Spiegels durch die SphK2, die z.B. den S1P-Transport betreffen könnte. Eine Modifikation der SphK2 könnte somit in der Tat eine Methode darstellen, um S1P-Spiegel im Blut und die über den S1P-Gradienten assoziierte Lymphozytenzirkulation zu beeinflussen.

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Beeinflussung der septischen Lymphopenie über die S1P-S1PR1-Achse komplex ist. Es muss bedacht werden, dass eine Modulation der S1P-Konzentration auch immer einen Effekt auf die S1PR1-Expression besitzen kann. Durch die vielen Wechselwirkungen sollten unerwünschte Nebenwirkun-

gen, wie beispielsweise eine Verschlimmerung der Lymphopenie durch die langfristige Anwendung eines S1PR-Agonisten oder die Störung der endothelialen Barrierefunktion berücksichtigt werden und eine Abwägung der therapeutischen Vor- und Nachteile für die Sepsis-Patienten stattfinden. Für eine erfolgreiche therapeutische Beeinflussung der S1P/S1PR-Achse sollte darüber hinaus auch die eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Immunzellen in der Sepsis (Kapitel 4.2) berücksichtigt werden, so dass eine alleinige Wiederherstellung der physiologischen S1P-Konzentration bzw. S1PR1-Expression in Sepsis-Patienten womöglich für eine Verbesserung der Immunlage nicht ausreichend sein könnte. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die S1P-S1PR1-Achse, bei vorsichtiger Interpretation der Daten, neben den von Hotchkiss et al. diskutierten apoptotischen Prozessen (Hotchkiss et al. 1997), die septische Lymphopenie miterklären könnte. Somit könnte die Wiederherstellung der S1P/S1PR1-Achse in der Tat ein zukünftiger therapeutischer Ansatz in der Sepsis sein, um die Lymphopenie zu beeinflussen und den Immunstatus der Patienten somit womöglich zu verbessern.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Sepsis ist gekennzeichnet durch eine gestörte Immunreaktion, sog. Immunparalyse, die mit einer Lymphopenie einhergeht. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) steuert als bioaktives Lipid gemeinsam mit dem S1P-Rezeptor 1 (S1PR1) die Lymphozyten-Migration, die entlang eines S1P-Konzentrationsgradienten zwischen lymphatischem Gewebe (niedrige S1P-Konzentration) und peripherem Blut (hohe S1P-Konzentration) stattfindet. Physiologisch findet bei niedriger S1P-Konzentration eine Hochregulation und bei hoher S1P-Konzentration eine Downregulation des S1PR1 statt, so dass die Lymphozytenzirkulation zwischen Lymphgewebe und Blutzirkulation stattfinden kann.

Ziel: Diese Dissertation sollte vier Fragestellungen beantworten: (1) Ist das Differentialblutbild von Sepsis-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte verändert? (2) Ist die Serum-S1P-Konzentration in Sepsis-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte verändert? (3) Ist die S1PR1-Expression in Sepsis-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte verändert? (4) Sind Serum-S1P-Konzentration und S1PR1-Expression in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) miteinander assoziiert und lassen sich Veränderungen im Differentialblutbild mit der Serum-S1P-Konzentration oder der S1PR1-Expression assoziieren?

Methode: Diese prospektive Kohortenstudie schließt 45 Sepsis-Patienten mit einem *Systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) und/oder Infektion (n=15), einer schweren Sepsis (n=15), einem septischen Schock (n=15) und 20 gesunde Kontrollen ein. Die Serum-S1P-Konzentration wurde mittels Tandem-Massenspektroskopie im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt. Die S1PR1-Rezeptorexpression in PBMC der Sepsis-Patienten wurde mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt. Laborparameter, insbesondere Zellzahlveränderungen im Differentialblutbild, wurden anhand von Routineverfahren gemessen.

Ergebnisse: Sepsis-Patienten (vs. Kontrolle) zeigten erhöhte Leukozyten- ($13 \cdot 10^9/l$ ($10-18 \cdot 10^9/l$), $p \leq 0,05$), Neutrophilen- sowie Monozytenzahlen und erniedrigte Lymphozytenzahlen. Die Serum-S1P-Konzentration in Sepsis-Patienten (vs. Kontrolle) war signifikant niedriger, insbesondere im septischen Schock (278 nmol/l ($229-302 \text{ nmol/l}$), $p \leq 0,05$). Die S1PR1-Expression in Sepsis-Patienten (vs. Kontrolle) war signifikant reduziert ($1,40 \pm 1,40 \text{ GAPDH } \%$, $p \leq 0,05$) und korrelierte positiv mit der Serum-S1P-Konzentration. Die Serum-S1P-Konzentration korrelierte negativ mit der Leukozyten- ($\rho = -0,44$, $p \leq 0,05$) sowie der Neutrophilenzahl ($\rho = -0,43$, $p \leq 0,05$) und positiv mit der Lymphozytenzahl ($\rho = +0,42$, $p \leq 0,05$). Die S1PR1-Expression zeigte eine positive Korrelation mit der Lymphozytenzahl ($\rho = +0,46$, $p \leq 0,05$).

Zusammenfassung: Die Serum-S1P-Konzentration ist in Sepsis-Patienten reduziert. Niedrige S1P-Konzentrationen sind mit niedrigen Lymphozytenzahlen im peripheren Blut septischer Patienten assoziiert. Diese Beobachtung stimmt mit der S1P/S1PR-vermittelten Lymphozyten-Migration in Richtung hoher S1P-Konzentrationen überein. Eine verminderte S1P-Konzentration in Sepsis-Patienten könnte somit zur phänotypischen Lymphopenie in der Sepsis beitragen. Die von anderen Forschungsgruppen beschriebene S1PR1-Hochregulation bei niedrigen S1P-Konzentrationen, konnte in den Sepsis-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrolle nicht bestätigt werden. Aufgrund der Expressionsanalyse in PBMC konnte die S1PR1-Expression nicht spezifisch für die Lymphozyten beschrieben werden, so dass eine Interpretation somit erschwert ist. Es werden weitere Experimente benötigt, um zellspezifische Veränderungen der S1PR1-mRNA und -Oberflächenexpression zu untersuchen. Nichtsdestotrotz, kann vorsichtig spekuliert werden, dass eine verminderte S1P-Konzentration und/oder eine reduzierte S1PR1-Expression in Zellen zur veränderten Zusammensetzung der Immunzellen in der Sepsis beitragen.

6. Abstract

Background: Sepsis is characterized by mechanisms contributing to impaired immune response referred as immunoparalysis with lymphopenia as its main clinical symptom. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive lipid. S1P regulated functions include lymphocyte migration, which follows a S1P gradient from low in lymphatic tissue to high in peripheral blood. S1P-receptor 1 (S1PR1) regulates these migratory effects. Under physiologic conditions S1PR1 is upregulated, when S1P concentration is low and down-regulated if S1P concentration is high and via this mechanism lymphocyte circulate between lymphatic tissue and blood circulation.

Aim: This dissertation should answer four questions: (1) Is the differential blood count altered in septic patients compared to healthy controls? (2) Is the serum-S1P concentration in septic patients different compared to healthy controls? (3) Is the expression of S1PR1 in peripheral blood monocytes (PBMC) altered in patients with sepsis? (4) Are serum-S1P concentration associated with S1PR1 expression in PBMC and are phenotypic changes of differential blood count associated with serum-S1P or the expression of S1PR1?

Methods: This single-center prospective-observational study includes 45 patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) plus infection (n=15), severe sepsis (n=15), or septic shock (n=15) and 20 healthy controls. Serum-S1P was measured by mass spectrometry in the Department of Clinical Pharmacology at University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE). Peripheral blood monocytes were collected and analyzed for S1PR1 expression using real-time quantitative PCR (qPCR). Blood parameters including differential blood count were determined by routine assays.

Results: We found increased leucocytes counts in patients with sepsis compared to controls ($13 \cdot 10^9/l$ ($10-18 \cdot 10^9/l$), $p \leq 0,05$). In patients (vs. controls) increased numbers of neutrophils and monocytes were accompanied with reduced lymphocyte counts. Serum-S1P was lower in patients (vs. controls) with lowest levels found in septic shock patients (278 nmol/l ($229-302 \text{ nmol/l}$), $p \leq 0,05$). S1PR1 expression was significant lower in patients compared to controls ($1,40 \pm 1,40 \text{ GAPDH } \%$, $p \leq 0,05$) and serum-S1P concentration correlated positively with S1PR1 expression in PBMC. Serum-S1P was negatively correlated with leucocytes ($\rho = -0,44$, $p \leq 0,05$) and neutrophils ($\rho = -0,43$, $p \leq 0,05$) and positively associated with lymphocytes ($\rho = +0,42$, $p \leq 0,05$). Furthermore, S1PR1 expression was positively associated with lymphocyte numbers ($\rho = +0,46$, $p \leq 0,05$).

Conclusion: Serum-S1P concentration is reduced in patients with sepsis. Low S1P levels are associated with low numbers of lymphocytes measured in the peripheral blood of sep-

tic patients. This result agrees with S1P/S1PR1 mediated migration of lymphocytes towards higher S1P concentration in blood. As S1P in septic patients is low this may contribute to the phenotypic changes in septic patients, which have been found lymphopenic. Other research groups described, when the migratory signal of S1P is low, lymphocytes do upregulate the S1PR1. We did not observe upregulation of S1PR1 in patients compared to healthy controls. With no doubt this is difficult to interpret, as from our expression data in PBMC we cannot conclude that this is lymphocyte specific. Further studies are needed to investigate cell type specific changes of S1PR1 mRNA and surface expression. However, with caution one may speculate that either reduced S1P concentration and/or reduced S1PR1 expression in cells may contribute to sepsis induced alteration in the immune cell composition.

7. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylcyclase
ACCP	American College of Chest Physicians
ACN	Acetonitril
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ApoM	Apolipoprotein M
apTZ	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	Sphingosin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARS	Compensatory anti inflammatory response syndrome
CCL2	Chemokinligand 2
CCR2	Chemokinrezeptor 2
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD14	Cluster of Differentiation 14
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD69	Cluster of Differentiation 69
CD8	Cluster of Differentiation 8
cDNA	complementary DNA
CH ₂ O ₂	Ameisensäure
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CoA	Coenzym A
CPT	Cell Preparation Tube
CRP	C-reaktives Protein
C _T	Cycle of Threshold
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin
DOP	4-deoxypyridoxine
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
EAN	Experimental autoimmune neuritis
EDG-1	Endothelial differentiation gene-1
EDG-3	Endothelial differentiation gene-3
EDG-5	Endothelial differentiation gene-5
EDG-6	Endothelial differentiation gene-6

EDG-8	Endothelial differentiation gene-8
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPIC	European Prevalence of Infection in intensive Care
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales Kälber-Serum
Fc ϵ	Fragment crystallizable ϵ
FTY720-P	phosphorylierte Form des FTY720
g	mittlere Erdbeschleunigung
G-Protein	Guanosintriphosphat bindende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	Glasgow-Coma-Scale
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPCR	Guanosintriphosphat bindendes Protein gekoppelter Rezeptor
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GTP	Guanosintriphosphat
H1N1	Hämagglutinin1-Neuramidase1
HDL	High-density lipoprotein
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB 1	High-mobility group box-1-Protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
i.g.	intrastral
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
INF	Interferon
INR	International Normalized Ratio
IQR	Interquartilsabstands
ITS	Intensivstation
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KH	Krankenhaus

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KLF2	Krüppel-like factor 2
LDL	Low-density lipoprotein
LPB	LBS-Bindeprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LPP	Lipidphosphatase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating-Faktor
MAP	mittlerer arterieller Druck
MAPK	Mitogen-activated protein-Kinasen
MD2	Myeloid differentiation factor 2
MHC	Major histocompatibility complex
mmHg	Blutdruck in Millimeter Quecksilbersäule
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
mRNA	messenger RNA
n.a.	nicht anwendbar
n.s.	nicht signifikant
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear factor κB
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
p	Signifikanz
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCT	Procalcitonin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRR	Pattern recognition receptor
PTX	Pertussis-Toxin
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

rcf	relative centrifugal force
rpm	revolutions per minute
RT-PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren
S1PR1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-1
S1PR2	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-2
S1PR3	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-3
S1PR4	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-4
S1PR5	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-5
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score II
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	Standardabweichung
SepNet	Sepsis Competence Network
SphK	Sphingosin-Kinase
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SLO	sekundäre lymphatische Organe
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SPP	Sphingosin-Phosphatase
SPT	Serin-Palmitoyl-Transferase
T _{H1}	T-Helferzelle vom Typ 1
T _{H17}	T-Helferzelle vom Typ 17
T _{H2}	T-Helferzelle vom Typ 2
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
T _{Reg}	T-Regulatorzelle
TSST-1	Toxic shock syndrome Toxin-1
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
ZNS	zentrales Nervensystem
ρ	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

8. Anhang

8.1. Material

Tabelle 15: Übersicht über verwendete Chemikalien unter Angabe des Herstellers

Produkt	Hersteller
Ameisensäure (CH ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
D-erythro-sphingosine-1-phosphate (d17:1)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Ethanol 96-100 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälber-Serum (FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Isopropanol 100 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
LiChrosolv® Acetonitril 80 % (ACN)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
LiChrosolv® Methanol	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
LiChrosolv® Water	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Phosphate buffered saline (PBS) 1x	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
RLT-Puffer	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
S1P (S9666 Sigma)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Sigmacote®	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
β-Mercaptoethanol 1%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 16: Übersicht über verwendete Primer der Firma Sigma-Aldrich

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
GAPDH	TCCTGCACCACCAACTGCTT	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
S1PR1	ATCATGGGCTGGAAGTGCATCA	CGAGTCCTGACCAAGGAGTAGAT

Tabelle 17: Übersicht über verwendete Kits und Mixes unter Angabe des Herstellers

Produkt	Hersteller
GeneJET™ Purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

Tabelle 18: Übersicht über verwendete Puffer unter Angabe der Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer: (1x), ohne Calcium und Magnesium	NaCl 8000 mg/l, KCl 200 mg/l, Na ₂ HPO ₄ 1150 mg/l, KH ₂ PO ₄ 200 mg/l ad 1000 ml mit Aqua bidest. pH nach Rekonstitution ist 7,3-7,7
RLT-Puffer: Lysis-Puffer	Enthält Guanidium Isothiocyanat und β-Mercaptoethanol

Tabelle 19: Übersicht über sonstig verwendetes Material unter Angabe des Herstellers

Produkt	Hersteller
S-Monovette® 7,5 ml Z-Gel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 7,5 ml K2E-Gel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 4,0 ml LH-Gel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate 8 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
PICO50 Probennehmer	Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
PP-Microplatte, 96 well, U-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Säule Zorbax SB-C8	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
BD Eclipse™ Sicherheitsinjektionskanülen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Injekt®-F Feindosierungsspritzen, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorf-Tubes, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Tubes und -Caps, 0,1 ml	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

Tabelle 20: Übersicht über verwendete Geräte unter Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
Blutgasanalyse-Gerät <i>ABL90 Flex</i>	Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
Column Oven (LC) <i>Prostar 510</i>	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
Massenspektrometer <i>MS 1200</i>	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
Photometer <i>Epoch Mikroplatten Spektralphotometer</i>	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
Pumpen (LC) <i>Prostar 210</i>	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
RT-PCR-Gerät <i>Rotor Gene Q, 72 Well Rotor</i>	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Thermocycler <i>T100™ Thermal Cycler</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, California, USA
Thermomixer <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank <i>UM 800</i>	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach
Vortexer <i>Certomat MV</i>	B. Braun Biotech International GmbH
Vortexer <i>Vortex Genius 3</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zentrifuge <i>Centrifuge 5810</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge <i>Centrifuge 5425 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge <i>Colour Sprout Mini-Zentrifuge</i>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Tabelle 21: Übersicht über verwendete Software unter Angabe des Herstellers

Software	Hersteller
Statistik-Software <i>Graphpad Prism 6.0h®</i>	Graphpad Software®, La Jolla, USA
S1P-Software <i>MS Data Review®</i>	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
Photometer-Software <i>Gen5™ V2.00.18</i>	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
PCR-Software <i>Rotor-Gene Q Series V2.3.1</i>	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

8.2. Einverständniserklärung

Einwilligung für Patienten zur klinischen Studie CySep

Sphingosin-1-Phosphat, neue Zytokine und prädisponierende genetische Polymorphismen in der Sepsis – Korrelation der Zytokinspiegel und Prädispositionen mit dem klinischen Outcome bei intensivpflichtigen, septischen Patienten.

Sponsor/ Leiter der klinischen Prüfung:

PD Dr. med. Stefan Kluge

Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Patientenaufkleber

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Martinistr. 52

20246 Hamburg

Ich habe die schriftliche Information zur oben genannten Studie erhalten. Mir wurde eine Kopie meiner unterschriebenen Einwilligungserklärung ausgehändigt. Ich habe beide Dokumente gelesen und verstanden. Ich wurde ausführlich – mündlich und schriftlich - über das Ziel, den Verlauf der Studie, Chancen und Risiken der Behandlung, meine Rechte und Pflichten und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.

Ich willige ein, dass während der klinischen Prüfungen meine persönlichen Daten und die medizinische Befunde erhoben werden. Die Erhebung, Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach den gesetzlichen Bestimmungen.

Die im Rahmen der Studie nach Ihrer Einverständniserklärung erhobenen persönlichen Daten, insbesondere Befunde, unterliegen der Schweigepflicht und den datenschutzrechtlichen Bestimmungen. Sie werden in Papierform und auf Datenträgern in der Klinik für Intensivmedizin des UKE aufgezeichnet und pseudonymisiert (verschlüsselt)¹ für die Dauer von 10 Jahren gespeichert. Bei der Pseudonymisierung¹ (Verschlüsselung) werden der Name und andere Identifikationsmerkmale (z.B. Teile des Geburtsdatums) durch z.B: mehrstellige Buchstaben- oder Zahlenkombinationen, auch Code genannt, ersetzt, um die Identifizierung des Studienteilnehmers auszuschließen oder wesentlich zu erschweren.

Zugang zu dem „Schlüssel“, der eine persönliche Zuordnung der Daten ermöglicht, haben neben den Studienleitern nur noch die Mitarbeiter der Studie. Studienbedingte Blut- und Urinproben sowie alle elektronischen Aufzeichnungen werden nur in pseudonymisierter¹ Form aus der intensivmedizinischen Klinik herausgegeben und zur Auswertung im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie bzw. einem Messinstitut des UKE herangezogen. Die Codierungsliste verbleibt unter Verschluss in der Klinik für Intensivmedizin des UKE.

Die Auswertung und Nutzung der Daten durch den Studienleiter und seine Mitarbeiter erfolgt in pseudonymisierter¹ Form. Eine Weitergabe der erhobenen Daten im Rahmen der Studie erfolgt nur in anonymisierter² Form. Gleiches gilt für die Veröffentlichung der Studienergebnisse.

Die Studienteilnehmer haben das Recht, über die von ihnen erhobenen personenbezogenen Daten Auskunft zu verlangen und über möglicherweise anfallende personenbezogene Ergebnisse der Studie ggf. informiert oder nicht informiert zu werden. Es ist im Rahmen unserer Studie allerdings nicht geplant, dem einzelnen Studienteilnehmer seine Ergebnisse auszuhändigen, da die mögliche Krankheitsbedeutung der vorgesehenen Marker im Einzelfall vor Abschluss der Gesamtstudie und ggf. weiterführender Untersuchungen noch unklar ist und daher diese Ergebnisse im Einzelfall noch nicht interpretiert werden können.

Diese Studie ist durch die zuständige Ethik-Kommission beraten worden. Der zuständigen Landesbehörde kann ggf. Einsichtnahme in die Studienunterlagen gewährt werden.

Sobald der Forschungszweck es zulässt, wird der Schlüssel gelöscht und die erhobenen Daten damit anonymisiert². Im Falle des Widerrufs der Einverständniserklärung werden die bereits erhobenen Daten ebenfalls gelöscht oder anonymisiert² und in dieser Form weiter genutzt. Ein Widerruf bereits anonymisierter² Daten ist nicht möglich.

¹Pseudonymisieren ist das Ersetzen des Namens und anderer Identifikationsmerkmale durch ein Kennzeichen zu dem Zweck, die Identifizierung des Betroffenen auszuschließen oder wesentlich zu erschweren (§3 Abs. 6a Bundesdatenschutzgesetz).

²Anonymisieren ist das Verändern personenbezogener Daten derart, dass die Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmaren natürlichen Person zugeordnet werden können (§3 Abs. 6 Bundesdatenschutzgesetz).

Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen. Diese wurden mir zufriedenstellend und vollständig beantwortet. Zusätzlich zur schriftlichen Information wurden folgende Punkte besprochen:

Ich wurde darüber informiert, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig ist und dass ich meine Einwilligung jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir dadurch Nachteile bei der weiteren Behandlung entstehen.

Ich erkläre hiermit meine freiwillige Einwilligung zur Teilnahme an der oben genannten Studie. Ich wurde über die Datenschutzrechte informiert. Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, die über mich erhoben werden, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach den gesetzlichen Bestimmungen.

Ort/Datum (eigenhändig) Name, Vorname der/des Patientin/Patienten und Unterschrift

Bestätigung der aufklärenden Ärztin/ des aufklärenden Arztes

Die Patientin/ Der Patient wurde von mir nach den Vorschriften der ICH-GCP Richtlinien über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Teilnahme an der Studie in mündlicher und schriftlicher Form aufgeklärt. Ich konnte seine/ihre Frage/n zur Zufriedenheit beantworten. Der Patient/ Die Patientin hat ohne Zwang die Einwilligung in die Studienteilnahme erklärt. Eine Kopie der Information und der Einwilligungserklärung habe ich der Patientin/ dem Patienten ausgehändigt.

Ort/Datum (eigenhändig) Name der/des aufklärenden Ärztin/Arztes und Unterschrift

8.3. SAPS II

Variable	Punkte	0	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13
Herzfrequenz*	1/min	70-119		40-69		120-159			≥160			≤40		
Syst. Blutdruck*	mmHg	100-199		≥200			70-99							<70
Temperatur max	°C	<39.0			≥39.0									
paO ₂ /F _i O ₂ **	mmHg							≥200		100-<200		<100		
Urinausfuhr	l/d	≥1.0				0.5- <1.0		60-<180			≥180			
Harnstoff max	mg/dl	<60												
Leukocyten*	10 ⁹ /mm ³	1.0-<2.0			≥20								<1.0	
Kalium*	mmol/l	3, 0-<5.0			≥5.0/<3.0									
Natrium*	mmol/l	125-<145	≥145				<125							
Bicarbonat min	mmol/l	≥20			15-<20			<15						
Bilirubin max	mg/dl	≤4.0				4.0-≤6.0				>6.0				

* Es ist der Wert zu dokumentieren, der die höchste Punktzahl für die Scoreberechnung ergibt.

** Erhebung nur im Falle der maschinellen Beatmung

Wurde ein Laborwert nicht bestimmt, gilt dieser als Normalwert und wird mit 0 Punkten bewertet

Gesamt:
_____ Punkte

Variable	Punkte	0	7	12	15	16	18
Alter des Patienten		<40	40-59	60-69	70-74	75-79	≥ 80

Variable	Punkte	9	10	17
Chronische Leiden*		Metastasierende Neoplasie	Hämatologische Neoplasie	AIDS**

* Bei chronischen Leiden darf nur das mit der höchsten Punktzahl berechnet werden.

** HIV-positiver Patient mit AIDS-Symptomatik (muss als Haupt- oder Nebendiagnose codiert sein)

Variable	Punkte	0	6	8
Aufnahmestatus		Geplant chirurgisch (> 24h)	Medizinisch (≥ 1 Woche ohne OP)	Ungeplant chirurgisch (< 24h)

8.4. SOFA Score

Organdysfunktion Parameter	Punkte				
	0	1	2	3	4
Respiratorische Insuffizienz paO ₂ /F _i O ₂ min mmHg	≥ 400 (nur ohne Beatmung)	< 400 (nur ohne Beatmung)	< 300 (nur ohne Beatmung)	< 200 (mit Beatmung)	< 100 (mit Beatmung)
Gerinnungsstörungen Thrombozyten min 10 ⁹ /mm ³	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leberdysfunktion Bilirubin max mg/dl		1.17 - 1.90	1.91 - 5.93	5.94 - 11.93	> 11.93
Kreislaufinsuffizienz Blutdruck min mmHg	MAP ≥ 70	MAP < 70	Dopamin ≤ 5 mcg/kg/min oder Dobutamin	Dopamin > 5 mcg/kg/min oder Adrenalin/Noradrenalin ≤ 0.1 mcg/kg/min	Dopamin > 15 mcg/kg/min oder Adrenalin/Noradrenalin > 0.1 mcg/kg/min
Störungen des ZNS Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Niereninsuffizienz Serumkreatinin max mg/dl Urinproduktion ml/d	≤ 1.12	1.13 - 1.92	1.93 - 3.38	3.39 - 4.97 oder < 500	> 4.97 oder < 200

8.5. GCS

Prüfung	Reaktion	Punkte
Augenöffnen	Spontan	4
	Auf Aufforderung	3
	Auf Schmerzreiz	2
	Kein Augenöffnen	1
	Voll orientiert, prompt	5
Sprache	Verwirrt, desorientiert	4
	Verworren, unangemessen	3
	Unverständliche Laute	2
	Keine	1
	Adäquat auf Aufforderung	6
	Gezielte Abwehr auf Schmerzreiz	5
Bewegung	ungezielte Abwehr, Massenbewegungen	4
	Beugesynergismen auf Schmerzreiz	3
	Strecksynergismen auf Schmerzreiz	2
	Keine Bewegung	1

[erstellt nach Teasdale und Jennett (1974)]

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung des S1P-Metabolismus.....	18
Abbildung 2:	Darstellung der S1P-Konzentration in Abhängigkeit von der Umgebung.	19
Abbildung 3:	Überblick über die Signaltransduktion der S1P-Rezeptoren 1-5 mit Darstellung der G-Protein-Dissoziation in die α - und β/γ -Untereinheit mit nachfolgenden Aktivierungsketten.....	21
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Lymphozytenzirkulation zwischen Blut, Lymphe und Lymphorganen in Abhängigkeit der S1P-Konzentration und S1PR1-Expression auf den Lymphozyten.....	23
Abbildung 5:	Übersicht der Studien-Kohorte und Studien-Subkohorte unter Angabe der Zeitpunkte der Probennahme.	27
Abbildung 6:	Schematische Darstellung eines BD Vacutainer® CPT-Röhrchens.....	28
Abbildung 7:	Exemplarisches Pipettierschema einer 72 Well-Platte.....	32
Abbildung 8:	Absolute Anzahl der Leukozyten und -Subpopulationen in Kontroll- und Patientengruppe.....	37
Abbildung 9:	Relative Zusammensetzung der Leukozyten in Kontroll- und Patientengruppe.....	37
Abbildung 10:	Serum-S1P-Konzentration in Kontroll- und Patientengruppe.	38
Abbildung 11:	mRNA Expression des S1PR1 in peripheren mononukleären Blutzellen der Kontroll- und Patientengruppe. Die.....	39
Abbildung 12:	Korrelation der Serum-S1P-Konzentration mit der mRNA Expression des S1PR1.....	40
Abbildung 13:	Korrelation der Serum-S1P-Konzentration mit Leukozyten und Neutrophilen.	41
Abbildung 14:	Korrelation der Serum-S1P-Konzentration mit peripheren mononukleären Blutzellen und Lymphozyten/Monozyten.....	41
Abbildung 15:	Korrelation der S1PR1-Expression mit peripheren mononukleären Blutzellen und Lymphozyten sowie Monozyten.....	42

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit Darstellung der wichtigsten Funktionen	13
Tabelle 2:	Übersicht über die wichtigsten pro- und antiinflammatorischen Zytokine	14
Tabelle 3:	Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	30
Tabelle 4:	Reaktionsschritte der cDNA-Synthese.....	30
Tabelle 5:	Mastermix-Reaktionsansatz für die einzelnen Proben.....	32
Tabelle 6:	Charakteristika der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe signifikanter Unterschiede zwischen den Schweregraden	35
Tabelle 7:	Ursachen und Lokalisation der Sepsis in untersuchter Patientenkohorte (n=45).....	36
Tabelle 8:	Absolute Leukozytenzahlen der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe signifikanter Unterschiede zwischen den Schweregraden	36
Tabelle 9:	Serum-S1P-Konzentration der Kontroll- und Patientengruppe sowie der Schweregrade unter Angabe der Signifikanz	38
Tabelle 10:	mRNA Expression des S1PR1 in PBMC der Kontroll- und Patientengruppe sowie der Schweregrade unter Angabe der Signifikanz	39
Tabelle 11:	Korrelation der Immunzell-Populationen mit Serum-S1P-Konzentration der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman und der Signifikanz	40
Tabelle 12:	Korrelation der mRNA Expression des S1PR1 in PBMC mit PBMC sowie Lymphozyten und Monozyten der Kontroll- und Patientengruppe unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman und der Signifikanz.....	42
Tabelle 13:	Überblick über ausgewählte <i>in vivo</i> Tierexperimente zur Untersuchung von S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten mit Beeinflussung der Monozyten- bzw. Makrophagenmigration.....	52
Tabelle 14:	Überblick über ausgewählte <i>in vivo</i> Tierexperimente zur Untersuchung von S1P und S1P-Rezeptor-Agonisten in der Inflammation.....	59
Tabelle 15:	Übersicht über verwendete Chemikalien unter Angabe des Herstellers.....	70
Tabelle 16:	Übersicht über verwendete Primer der Firma Sigma-Aldrich	70
Tabelle 17:	Übersicht über verwendete Kits und Mixes unter Angabe des Herstellers	70
Tabelle 18:	Übersicht über verwendete Puffer unter Angabe der Zusammensetzung	70
Tabelle 19:	Übersicht über sonstig verwendetes Material unter Angabe des Herstellers.....	71
Tabelle 20:	Übersicht über verwendete Geräte unter Angabe des Herstellers	71
Tabelle 21:	Übersicht über verwendete Software unter Angabe des Herstellers	72

11. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. und Sher, A. (1996) *Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature*, 383(6603): 787-93.
- Aderem, A. und Ulevitch, R. J. (2000) *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature*, 406(6797): 782-7.
- Adhikari, N. K., Fowler, R. A., Bhagwanjee, S. und Rubenfeld, G. D. (2010) *Critical care and the global burden of critical illness in adults. Lancet*, 376(9749): 1339-46.
- Alexander, C. und Rietschel, E. T. (2001) *Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J Endotoxin Res*, 7(3): 167-202.
- Allende, M. L., Dreier, J. L., Mandala, S. und Proia, R. L. (2004) *Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. J Biol Chem*, 279(15): 15396-401.
- Ancellin, N. und Hla, T. (1999) *Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. J Biol Chem*, 274(27): 18997-9002.
- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J. und Pinsky, M. R. (2001) *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med*, 29(7): 1303-10.
- Angus, D. C. und van der Poll, T. (2013) *Severe sepsis and septic shock. N Engl J Med*, 369(9): 840-51.
- Annane, D., Bellissant, E. und Cavaillon, J. M. (2005) *Septic shock. Lancet*, 365(9453): 63-78.
- Aoki, S., Yatomi, Y., Ohta, M., Osada, M., Kazama, F., Satoh, K., Nakahara, K. und Ozaki, Y. (2005) *Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. J Biochem*, 138(1): 47-55.
- Arens, C., Bajwa, S. A., Koch, C., Siegler, B. H., Schneck, E., Hecker, A., Weiterer, S., Lichtenstern, C., Weigand, M. A. und Uhle, F. (2016) *Sepsis-induced long-term immune paralysis--results of a descriptive, explorative study. Crit Care*, 20: 93.
- Bai, A., Hu, H., Yeung, M. und Chen, J. (2007) *Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription. J Immunol*, 178(12): 7632-9.
- Bankovich, A. J., Shio, L. R. und Cyster, J. G. (2010) *CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. J Biol Chem*, 285(29): 22328-37.
- Bauer, M., Brunkhorst, F., Welte, T., Gerlach, H. und Reinhart, K. (2006) *[Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. Anaesthesist*, 55(8): 835-45.
- Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W., Fisher, C. J., Jr. und Recombinant human protein, C. W. E. i. S. S. s. g. (2001) *Efficacy and safety of*

- recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med, 344(10): 699-709.*
- Biswas, S. K. und Lopez-Collazo, E. (2009) *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. Trends Immunol, 30(10): 475-87.*
- Blaho, V. A. und Hla, T. (2014) *An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. J Lipid Res, 55(8): 1596-1608.*
- Bochud, P. Y. und Calandra, T. (2003) *Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. BMJ, 326(7383): 262-6.*
- Bone, R. C. (1991) *Let's agree on terminology: definitions of sepsis. Crit Care Med, 19(7): 973-6.*
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. und Sibbald, W. J. (1992a) *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest, 101(6): 1644-55.*
- Bone, R. C., Grodzin, C. J. und Balk, R. A. (1997) *Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest, 112(1): 235-43.*
- Bone, R. C., Sibbald, W. J. und Sprung, C. L. (1992b) *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. Chest, 101(6): 1481-3.*
- Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C., Takasu, O., Osborne, D. F., Walton, A. H., Bricker, T. L., Jarman, S. D., 2nd, Kreisel, D., Krupnick, A. S., Srivastava, A., Swanson, P. E., Green, J. M. und Hotchkiss, R. S. (2011) *Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. JAMA, 306(23): 2594-605.*
- Brindley, D. N. und Pilquill, C. (2009) *Lipid phosphate phosphatases and signaling. J Lipid Res, 50 Suppl: S225-30.*
- Brinkmann, V., Cyster, J. G. und Hla, T. (2004) *FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. Am J Transplant, 4(7): 1019-25.*
- Brinkmann, V., Davis, M. D., Heise, C. E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., Foster, C. A., Zollinger, M. und Lynch, K. R. (2002) *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. J Biol Chem, 277(24): 21453-7.*
- Brunkhorst, F. M. (2006) *[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 41(1): 43-4.*
- Calandra, T. (2001) *Pathogenesis of septic shock: implications for prevention and treatment. J Chemother, 13 Spec No 1(1): 173-80.*
- Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C. C., Cook, H. T., Diebold, S. und Geissmann, F. (2013) *Nr4a1-dependent*

Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. Cell, 153(2): 362-75.

Carlson, C. M., Endrizzi, B. T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M. A., Walsh, E. R., Wani, M. A., Lingrel, J. B., Hogquist, K. A. und Jameson, S. C. (2006) *Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. Nature, 442(7100): 299-302.*

Cavaillon, J. M. und Adib-Conquy, M. (2006) *Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. Crit Care, 10(5): 233.*

Cheng, Q., Ma, S., Lin, D., Mei, Y., Gong, H., Lei, L., Chen, Y., Zhao, Y., Hu, B., Wu, Y., Yu, X., Zhao, L. und Liu, H. (2015) *The S1P1 receptor-selective agonist CYM-5442 reduces the severity of acute GVHD by inhibiting macrophage recruitment. Cell Mol Immunol, 12(6): 681-91.*

Christoffersen, C., Obinata, H., Kumaraswamy, S. B., Galvani, S., Ahnstrom, J., Sevana, M., Egerer-Sieber, C., Muller, Y. A., Hla, T., Nielsen, L. B. und Dahlback, B. (2011) *Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. Proc Natl Acad Sci U S A, 108(23): 9613-8.*

Chu, P., Pardo, J., Zhao, H., Li, C. C., Pali, E., Shen, M. M., Qu, K., Yu, S. X., Huang, B. C., Yu, P., Masuda, E. S., Molineaux, S. M., Kolbinger, F., Aversa, G., de Vries, J., Payan, D. G. und Liao, X. C. (2003) *Systematic identification of regulatory proteins critical for T-cell activation. J Biol, 2(3): 21.*

Chun, J., Goetzl, E. J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K. R., Moolenaar, W., Pyne, S. und Tigyi, G. (2002) *International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. Pharmacol Rev, 54(2): 265-9.*

Chung, K. P., Chang, H. T., Lo, S. C., Chang, L. Y., Lin, S. Y., Cheng, A., Huang, Y. T., Chen, C. C., Lee, M. R., Chen, Y. J., Hou, H. H., Hsu, C. L., Jerng, J. S., Ho, C. C., Huang, M. T., Yu, C. J. und Yang, P. C. (2015) *Severe lymphopenia is associated with elevated plasma interleukin-15 levels and increased mortality during severe sepsis. Shock, 43(6): 569-75.*

Cinar, M. U., Islam, M. A., Proll, M., Kocamis, H., Tholen, E., Tesfaye, D., Looft, C., Schellander, K. und Uddin, M. J. (2013) *Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in porcine PBMCs in response to LPS and LTA. BMC Res Notes, 6: 56.*

Clemens, J. J., Davis, M. D., Lynch, K. R. und Macdonald, T. L. (2003) *Synthesis of para-alkyl aryl amide analogues of sphingosine-1-phosphate: discovery of potent S1P receptor agonists. Bioorg Med Chem Lett, 13(20): 3401-4.*

Cohen, J. (2002) *The immunopathogenesis of sepsis. Nature, 420(6917): 885-91.*

Cohen, J. A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H. P., Khatri, B. O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., Tiel-Wilck, K., de Vera, A., Jin, J., Stites, T., Wu, S., Aradhye, S., Kappos, L. und Group, T. S. (2010) *Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med, 362(5): 402-15.*

Coldewey, S. M., Benetti, E., Collino, M., Pfeilschifter, J., Sponholz, C., Bauer, M., Huwiler, A. und Thiemermann, C. (2016) *Elevation of serum sphingosine-1-phosphate attenuates impaired cardiac function in experimental sepsis. Sci Rep, 6: 27594.*

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S. und Spiegel, S. (1996) *Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate*. *Nature*, 381(6585): 800-3.

Delano, M. J., Thayer, T., Gabrilovich, S., Kelly-Scumpia, K. M., Winfield, R. D., Scumpia, P. O., Cuenca, A. G., Warner, E., Wallet, S. M., Wallet, M. A., O'Malley, K. A., Ramphal, R., Clare-Salzer, M., Efron, P. A., Mathews, C. E. und Moldawer, L. L. (2011) *Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection*. *J Immunol*, 186(1): 195-202.

Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2012) *Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose*. Bochum [Online im Internet] http://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/030050I_S2e_Multiple_Sklerose_Diagnostik_Therapie_2014-08_verlaengert.pdf [Stand: 26.10.2015, 09:19].

Dinarello, C. A. (1997) *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock*. *Chest*, 112(6 Suppl): 321S-329S.

Dombrovskiy, V. Y., Martin, A. A., Sunderram, J. und Paz, H. L. (2007) *Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003*. *Crit Care Med*, 35(5): 1244-50.

Drewry, A. M., Samra, N., Skrupky, L. P., Fuller, B. M., Compton, S. M. und Hotchkiss, R. S. (2014) *Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality*. *Shock*, 42(5): 383-91.

Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissieres, P. und Pugin, J. (2013) *Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome*. *Crit Care Med*, 41(3): 820-32.

Duong, C. Q., Bared, S. M., Abu-Khader, A., Buechler, C., Schmitz, A. und Schmitz, G. (2004) *Expression of the lysophospholipid receptor family and investigation of lysophospholipid-mediated responses in human macrophages*. *Biochim Biophys Acta*, 1682(1-3): 112-9.

Engel, C., Brunkhorst, F. M., Bone, H. G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., Mayer, K., Oppert, M., Olthoff, D., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T., Bogatsch, H., Hartog, C., Loeffler, M. und Reinhart, K. (2007) *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. *Intensive Care Med*, 33(4): 606-18.

Fang, J. P., Liu, Y., Li, J., Liao, W. F., Hu, Y. H. und Ding, K. (2012) *A novel small molecule, HK-156, inhibits lipopolysaccharide-induced activation of NF-kappaB signaling and improves survival in mouse models of sepsis*. *Acta Pharmacol Sin*, 33(9): 1204-16.

Ferreira, F. L., Bota, D. P., Bross, A., Melot, C. und Vincent, J. L. (2001) *Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients*. *JAMA*, 286(14): 1754-8.

Finfer, S., Bellomo, R., Lipman, J., French, C., Dobb, G. und Myburgh, J. (2004) *Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units*. *Intensive Care Med*, 30(4): 589-96.

Fleig, V., Brenck, F., Wolff, M. und Weigand, M. A. (2011) *[Scoring systems in intensive care medicine : principles, models, application and limits]*. *Anaesthesist*, 60(10): 963-74.

Fleischmann, C., Thomas–Rueddel, D. O., Hartmann, M., Hartog, C. S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U. und Reinhart, K. (2016) *Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus - Analyse der deutschlandweiten fallpauschalenbezogenen Krankenhausstatistik von 2007 bis 2013. Deutsches Ärzteblatt, Jg. 113 Heft 10* 159-166.

Foss, F. W., Jr., Snyder, A. H., Davis, M. D., Rouse, M., Okusa, M. D., Lynch, K. R. und Macdonald, T. L. (2007) *Synthesis and biological evaluation of gamma-aminophosphonates as potent, subtype-selective sphingosine 1-phosphate receptor agonists and antagonists. Bioorg Med Chem, 15(2):* 663-77.

Frej, C., Linder, A., Happonen, K. E., Taylor, F. B., Lupu, F. und Dahlback, B. (2016) *Sphingosine 1-phosphate and its carrier apolipoprotein M in human sepsis and in Escherichia coli sepsis in baboons. J Cell Mol Med.*

Gaieski, D. F., Edwards, J. M., Kallan, M. J. und Carr, B. G. (2013) *Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. Crit Care Med, 41(5):* 1167-74.

Galadari, S., Wu, B. X., Mao, C., Roddy, P., El Bawab, S. und Hannun, Y. A. (2006) *Identification of a novel amidase motif in neutral ceramidase. Biochem J, 393(Pt 3):* 687-95.

Galvani, S., Sanson, M., Blaho, V. A., Swendeman, S. L., Obinata, H., Conger, H., Dahlback, B., Kono, M., Proia, R. L., Smith, J. D. und Hla, T. (2015) *HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. Sci Signal, 8(389):* ra79.

Gendron, D., Lemay, A. M., Tremblay, C., Lai, L. J., Langlois, A., Bernatchez, E., Flamand, N., Blanchet, M. R., Don, A. S., Bosse, Y., Bissonnette, E. und Marsolais, D. (2015) *Treatment with a sphingosine analog after the inception of house dust mite-induced airway inflammation alleviates key features of experimental asthma. Respir Res, 16:* 7.

Gogos, C. A., Drosou, E., Bassaris, H. P. und Skoutelis, A. (2000) *Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. J Infect Dis, 181(1):* 176-80.

Gomes, L., Fernando, S., Fernando, R. H., Wickramasinghe, N., Shyamali, N. L., Ogg, G. S. und Malavige, G. N. (2014) *Sphingosine 1-phosphate in acute dengue infection. PLoS One, 9(11):* e113394.

Gordon, S. und Taylor, P. R. (2005) *Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, 5(12):* 953-64.

Graeler, M. und Goetzl, E. J. (2002) *Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. FASEB J, 16(14):* 1874-8.

Graeler, M., Shankar, G. und Goetzl, E. J. (2002) *Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. J Immunol, 169(8):* 4084-7.

- Graler, M. H., Bernhardt, G. und Lipp, M. (1998) *EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. Genomics, 53(2): 164-9.*
- Graler, M. H. und Goetzl, E. J. (2004) *The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. FASEB J, 18(3): 551-3.*
- Guo, Y., Xiao, P., Lei, S., Deng, F., Xiao, G. G., Liu, Y., Chen, X., Li, L., Wu, S., Chen, Y., Jiang, H., Tan, L., Xie, J., Zhu, X., Liang, S. und Deng, H. (2008) *How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 40(5): 426-36.*
- Hagel, S., Pletz, M. W., Brunkhorst, F. M., Seifert, H. und Kern, W. V. (2013) *[Bacteremia and sepsis]. Internist (Berl), 54(4): 399-407.*
- Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S. und Spiegel, S. (2006) *Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. Biochim Biophys Acta, 1758(12): 2016-26.*
- Hanel, P., Andreani, P. und Graler, M. H. (2007) *Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. FASEB J, 21(4): 1202-9.*
- Hannun, Y. A., Luberto, C. und Argraves, K. M. (2001) *Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. Biochemistry, 40(16): 4893-903.*
- Hannun, Y. A. und Obeid, L. M. (2008) *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat Rev Mol Cell Biol, 9(2): 139-50.*
- Heidecke, C. D., Hensler, T., Weighardt, H., Zantl, N., Wagner, H., Siewert, J. R. und Holzmann, B. (1999) *Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. Am J Surg, 178(4): 288-92.*
- Holthuis, J. C., Pomorski, T., Raggars, R. J., Sprong, H. und Van Meer, G. (2001) *The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. Physiol Rev, 81(4): 1689-723.*
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. und Akira, S. (1999) *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol, 162(7): 3749-52.*
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G. und Payen, D. (2013) *Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. Nat Rev Immunol, 13(12): 862-74.*
- Hotchkiss, R. S. und Nicholson, D. W. (2006) *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. Nat Rev Immunol, 6(11): 813-22.*
- Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Cobb, J. P., Jacobson, A., Buchman, T. G. und Karl, I. E. (1997) *Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. Crit Care Med, 25(8): 1298-307.*
- Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., Tinsley, K. W., Cobb, J. P., Matuschak, G. M., Buchman, T. G. und Karl, I. E. (1999a) *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med, 27(7): 1230-51.*

- Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., Chang, K. C., Cobb, J. P., Buchman, T. G., Korsmeyer, S. J. und Karl, I. E. (1999b) *Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25): 14541-6.
- Hugonnet, S., Harbarth, S., Ferriere, K., Ricou, B., Suter, P. und Pittet, D. (2003) *Bacteremic sepsis in intensive care: temporal trends in incidence, organ dysfunction, and prognosis. Crit Care Med*, 31(2): 390-4.
- Im, D. S., Clemens, J., Macdonald, T. L. und Lynch, K. R. (2001) *Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine1-phosphate receptors. Biochemistry*, 40(46): 14053-60.
- Im, D. S., Heise, C. E., Ancellin, N., O'Dowd, B. F., Shei, G. J., Heavens, R. P., Rigby, M. R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George, S. R. und Lynch, K. R. (2000) *Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. J Biol Chem*, 275(19): 14281-6.
- Ishimaru, N., Yamada, A., Nitta, T., Arakaki, R., Lipp, M., Takahama, Y. und Hayashi, Y. (2012) *CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. Am J Pathol*, 180(1): 199-208.
- Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Ikeda, M., Sano, T., Kihara, A. und Igarashi, Y. (2007) *Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. Biochem Biophys Res Commun*, 357(1): 212-7.
- Jakubzick, C., Gautier, E. L., Gibbings, S. L., Sojka, D. K., Schlitzer, A., Johnson, T. E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., van Rooijen, N., Grainger, J. R., Belkaid, Y., Ma'ayan, A., Riches, D. W., Yokoyama, W. M., Ginhoux, F., Henson, P. M. und Randolph, G. J. (2013) *Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. Immunity*, 39(3): 599-610.
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002) *Innate immune recognition. Annu Rev Immunol*, 20: 197-216.
- Janeway, C. A. J., Travers, P., Walport, M. und al., e. (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. , Principles of innate and adaptive immunity*, New York: Garland Science.
- Johnson, K. R., Johnson, K. Y., Becker, K. P., Bielawski, J., Mao, C. und Obeid, L. M. (2003) *Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. J Biol Chem*, 278(36): 34541-7.
- Kappos, L., Radue, E. W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., Burtin, P. und Group, F. S. (2010) *A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med*, 362(5): 387-401.
- Kawa, S., Kimura, S., Hakomori, S. und Igarashi, Y. (1997) *Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate. FEBS Lett*, 420(2-3): 196-200.

- Kharel, Y., Morris, E. A., Congdon, M. D., Thorpe, S. B., Tomsig, J. L., Santos, W. L. und Lynch, K. R. (2015) *Sphingosine Kinase 2 Inhibition and Blood Sphingosine 1-Phosphate Levels*. *J Pharmacol Exp Ther*, 355(1): 23-31.
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J. und Hannun, Y. A. (2008) *The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling*. *Cell Signal*, 20(6): 1010-8.
- Kovach, M. A. und Standiford, T. J. (2012) *The function of neutrophils in sepsis*. *Curr Opin Infect Dis*, 25(3): 321-7.
- Lagu, T., Rothberg, M. B., Shieh, M. S., Pekow, P. S., Steingrub, J. S. und Lindenauer, P. K. (2012) *Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007*. *Crit Care Med*, 40(3): 754-61.
- Lavoie, P. M., Thibodeau, J., Erard, F. und Sekaly, R. P. (1999) *Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research*. *Immunol Rev*, 168: 257-69.
- Le Gall, J. R., Lemeshow, S. und Saulnier, F. (1993) *A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study*. *JAMA*, 270(24): 2957-63.
- Ledgerwood, L. G., Lal, G., Zhang, N., Garin, A., Esses, S. J., Ginhoux, F., Merad, M., Peche, H., Lira, S. A., Ding, Y., Yang, Y., He, X., Schuchman, E. H., Allende, M. L., Ochando, J. C. und Bromberg, J. S. (2008) *The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics*. *Nat Immunol*, 9(1): 42-53.
- Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S. und Hla, T. (1998) *Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1*. *Science*, 279(5356): 1552-5.
- Lenz, R., Leal, J. R., Church, D. L., Gregson, D. B., Ross, T. und Laupland, K. B. (2012) *The distinct category of healthcare associated bloodstream infections*. *BMC Infect Dis*, 12: 85.
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J. L., Ramsay, G. und International Sepsis Definitions, C. (2003) *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. *Intensive Care Med*, 29(4): 530-8.
- Lewis, N. D., Haxhinasto, S. A., Anderson, S. M., Stefanopoulos, D. E., Fogal, S. E., Adusumalli, P., Desai, S. N., Patnaude, L. A., Lukas, S. M., Ryan, K. R., Slavin, A. J., Brown, M. L. und Modis, L. K. (2013) *Circulating monocytes are reduced by sphingosine-1-phosphate receptor modulators independently of S1P3*. *J Immunol*, 190(7): 3533-40.
- Liu, S. F. und Malik, A. B. (2006) *NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290(4): L622-L645.
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Nava, V. E., Chae, S. S., Lee, M. J., Liu, C. H., Hla, T., Spiegel, S. und Proia, R. L. (2000) *Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation*. *J Clin Invest*, 106(8): 951-61.

- Lo, C. G., Xu, Y., Proia, R. L. und Cyster, J. G. (2005) *Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. J Exp Med*, 201(2): 291-301.
- Maceyka, M., Payne, S. G., Milstien, S. und Spiegel, S. (2002) *Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. Biochim Biophys Acta*, 1585(2-3): 193-201.
- Malek, R. L., Toman, R. E., Edsall, L. C., Wong, S., Chiu, J., Letterle, C. A., Van Brocklyn, J. R., Milstien, S., Spiegel, S. und Lee, N. H. (2001) *Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. J Biol Chem*, 276(8): 5692-9.
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C. L., Rupprecht, K., Parsons, W. und Rosen, H. (2002) *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science*, 296(5566): 346-9.
- Marsolais, D., Hahm, B., Edelmann, K. H., Walsh, K. B., Guerrero, M., Hatta, Y., Kawaoka, Y., Roberts, E., Oldstone, M. B. und Rosen, H. (2008) *Local not systemic modulation of dendritic cell S1P receptors in lung blunts virus-specific immune responses to influenza. Mol Pharmacol*, 74(3): 896-903.
- Marsolais, D., Hahm, B., Walsh, K. B., Edelmann, K. H., McGavern, D., Hatta, Y., Kawaoka, Y., Rosen, H. und Oldstone, M. B. (2009) *A critical role for the sphingosine analog AAL-R in dampening the cytokine response during influenza virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(5): 1560-5.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. und Moss, M. (2003) *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med*, 348(16): 1546-54.
- Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L. und Cyster, J. G. (2004) *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature*, 427(6972): 355-60.
- Mattie, M., Brooker, G. und Spiegel, S. (1994) *Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. J Biol Chem*, 269(5): 3181-8.
- Mayr, F. B., Yende, S., Linde-Zwirble, W. T., Peck-Palmer, O. M., Barnato, A. E., Weissfeld, L. A. und Angus, D. C. (2010) *Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. JAMA*, 303(24): 2495-503.
- Minne, L., Abu-Hanna, A. und de Jonge, E. (2008) *Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: A systematic review. Crit Care*, 12(6): R161.
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G. F., Spiegel, S. und Proia, R. L. (2005) *Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. Mol Cell Biol*, 25(24): 11113-21.
- Moore, J. X., Donnelly, J. P., Griffin, R., Safford, M. M., Howard, G., Baddley, J. und Wang, H. E. (2015) *Black-white racial disparities in sepsis: a prospective analysis of the REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke (REGARDS) cohort. Crit Care*, 19: 279.

- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D. und Seuwen, K. (2009) *Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. Nat Chem Biol*, 5(6): 428-34.
- Munoz, C., Carlet, J., Fitting, C., Misset, B., Bleriot, J. P. und Cavaillon, J. M. (1991) *Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. J Clin Invest*, 88(5): 1747-54.
- Murakami, K., Okajima, K., Uchiba, M., Johno, M., Nakagaki, T., Okabe, H. und Takatsuki, K. (1997) *Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. Am J Physiol*, 272(2 Pt 1): L197-202.
- Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M. und Okajima, F. (2000) *Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. Biochem J*, 352 Pt 3: 809-15.
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. und Miyake, K. (2002) *Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. Nat Immunol*, 3(7): 667-72.
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R. und Pittet, M. J. (2007) *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. J Exp Med*, 204(12): 3037-47.
- Oberholzer, C., Oberholzer, A., Bahjat, F. R., Minter, R. M., Tannahill, C. L., Abouhamze, A., LaFace, D., Hutchins, B., Clare-Salzler, M. J. und Moldawer, L. L. (2001) *Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20): 11503-8.
- Ogawa, C., Kihara, A., Gokoh, M. und Igarashi, Y. (2003) *Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. J Biol Chem*, 278(2): 1268-72.
- Okajima, F. (2002) *Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? Biochim Biophys Acta*, 1582(1-3): 132-7.
- Oo, M. L., Thangada, S., Wu, M. T., Liu, C. H., Macdonald, T. L., Lynch, K. R., Lin, C. Y. und Hla, T. (2007) *Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. J Biol Chem*, 282(12): 9082-9.
- Opal, S. M. und DePalo, V. A. (2000) *Anti-inflammatory cytokines. Chest*, 117(4): 1162-72.
- Opal, S. M., Garber, G. E., LaRosa, S. P., Maki, D. G., Freebairn, R. C., Kinasewitz, G. T., Dhainaut, J. F., Yan, S. B., Williams, M. D., Graham, D. E., Nelson, D. R., Levy, H. und Bernard, G. R. (2003) *Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). Clin Infect Dis*, 37(1): 50-8.

- Otto, G. P., Sossdorf, M., Claus, R. A., Rodel, J., Menge, K., Reinhart, K., Bauer, M. und Riedemann, N. C. (2011) *The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. Crit Care, 15(4): R183.*
- Pahl, H. L. (1999) *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene, 18(49): 6853-66.*
- Pappu, R., Schwab, S. R., Cornelissen, I., Pereira, J. P., Regard, J. B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y. W., Huang, Y., Cyster, J. G. und Coughlin, S. R. (2007) *Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. Science, 316(5822): 295-8.*
- Pfaffl, M. W. (2001) *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, 29(9): e45.*
- Pham, T. H., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C. G. und Cyster, J. G. (2008) *S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. Immunity, 28(1): 122-33.*
- Pinschewer, D. D., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (2000) *FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. J Immunol, 164(11): 5761-70.*
- Rahaman, M., Costello, R. W., Belmonte, K. E., Gendy, S. S. und Walsh, M. T. (2006) *Neutrophil sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors in pneumonia. Am J Respir Cell Mol Biol, 34(2): 233-41.*
- Rangel-Frausto, M. S., Pittet, D., Costigan, M., Hwang, T., Davis, C. S. und Wenzel, R. P. (1995) *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. JAMA, 273(2): 117-23.*
- Ranieri, V. M., Thompson, B. T., Barie, P. S., Dhainaut, J. F., Douglas, I. S., Finfer, S., Gardlund, B., Marshall, J. C., Rhodes, A., Artigas, A., Payen, D., Tenhunen, J., Al-Khalidi, H. R., Thompson, V., Janes, J., Macias, W. L., Vangerow, B., Williams, M. D. und Group, P.-S. S. (2012) *Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. N Engl J Med, 366(22): 2055-64.*
- Reinhart, K., Brunkhorst, F.M. (2010) *S2-Leitlinie: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. 1. Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). Jena [Online im Internet] <http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Informationen+fuer+Mediziner/Leitlinien/Sepsis-Leitlinie-2010?sid=GOsTxNrlvNtFVmBmjyRag&iid=4>.*
- Riedemann, N. C., Guo, R. F. und Ward, P. A. (2003) *The enigma of sepsis. J Clin Invest, 112(4): 460-7.*
- Rigato, O. und Salomao, R. (2003) *Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. Shock, 19(2): 113-6.*
- Rivera, J., Proia, R. L. und Olivera, A. (2008) *The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. Nat Rev Immunol, 8(10): 753-63.*

Rosen, H. und Goetzl, E. J. (2005) *Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network*. *Nat Rev Immunol*, 5(7): 560-70.

Sack, U. (2016) *Zelluläre Diagnostik und Therapie, Hämatologische Diagnostik*, 1. Auflage, Bosten/Berlin: Walter de Gruyter GmbH.

Sanchez, T. und Hla, T. (2004) *Structural and functional characteristics of S1P receptors*. *J Cell Biochem*, 92(5): 913-22.

Sanna, M. G., Liao, J., Jo, E., Alfonso, C., Ahn, M. Y., Peterson, M. S., Webb, B., Lefebvre, S., Chun, J., Gray, N. und Rosen, H. (2004) *Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate*. *J Biol Chem*, 279(14): 13839-48.

Schmidl, C., Renner, K., Peter, K., Eder, R., Lassmann, T., Balwiercz, P. J., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., Carninci, P., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Andreesen, R., Hume, D. A., Hoffmann, P., Forrest, A. R., Kreutz, M. P., Edinger, M., Rehli, M. und consortium, F. (2014) *Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets*. *Blood*, 123(17): e90-9.

Schottmüller, H. (1914) *Wesen und Behandlung der Sepsis*. *Verhandlungen Deutscher Kongress für Innere Medizin*, 31: 257–280.

Schulte, W., Bernhagen, J. und Bucala, R. (2013) *Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view*. *Mediators Inflamm*, 2013: 165974.

Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y. und Cyster, J. G. (2005) *Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients*. *Science*, 309(5741): 1735-9.

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. und Kirschning, C. J. (1999) *Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2*. *J Biol Chem*, 274(25): 17406-9.

Sensken, S. C., Bode, C., Nagarajan, M., Peest, U., Pabst, O. und Graler, M. H. (2010) *Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to lymphopenia*. *J Immunol*, 184(8): 4133-42.

Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdickova, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G. und Matloubian, M. (2006) *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. *Nature*, 440(7083): 540-4.

Silva, E., Pedro Mde, A., Sogayar, A. C., Mohovic, T., Silva, C. L., Janiszewski, M., Cal, R. G., de Sousa, E. F., Abe, T. P., de Andrade, J., de Matos, J. D., Rezende, E., Assuncao, M., Avezum, A., Rocha, P. C., de Matos, G. F., Bento, A. M., Correa, A. D., Vieira, P. C., Knobel, E. und Brazilian Sepsis Epidemiological, S. (2004) *Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study)*. *Crit Care*, 8(4): R251-60.

Singer, II, Tian, M., Wickham, L. A., Lin, J., Matheravidathu, S. S., Forrest, M. J., Mandala, S. und Quackenbush, E. J. (2005) *Sphingosine-1-phosphate agonists increase macrophage homing, lymphocyte contacts, and endothelial junctional complex formation in murine lymph nodes*. *J Immunol*, 175(11): 7151-61.

Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L. und Angus, D. C. (2016) *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. *JAMA*, 315(8): 801-10.

Skoura, A. und Hla, T. (2009) *Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype*. *Cardiovasc Res*, 82(2): 221-8.

Spiegel, S. (2000) *Sphingosine 1-phosphate: a ligand for the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors*. *Ann N Y Acad Sci*, 905: 54-60.

Spiegel, S. und Milstien, S. (2003) *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(5): 397-407.

Stephan, F., Yang, K., Tankovic, J., Soussy, C. J., Dhonneur, G., Duvaldestin, P., Brochard, L., Brun-Buisson, C., Harf, A. und Delclaux, C. (2002) *Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients*. *Crit Care Med*, 30(2): 315-22.

Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M. und Chilvers, E. R. (2010) *Neutrophil kinetics in health and disease*. *Trends Immunol*, 31(8): 318-24.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S. (1999) *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. *Immunity*, 11(4): 443-51.

Tamayo, E., Gomez, E., Bustamante, J., Gomez-Herreras, J. I., Fonteriz, R., Bobillo, F., Bermejo-Martin, J. F., Castrodeza, J., Heredia, M., Fierro, I. und Alvarez, F. J. (2012) *Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors*. *J Crit Care*, 27(4): 415 e1-11.

Teasdale, G. und Jennett, B. (1974) *Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale*. *Lancet*, 2(7872): 81-4.

Tejaro, J. R., Walsh, K. B., Cahalan, S., Fremgen, D. M., Roberts, E., Scott, F., Martinborough, E., Peach, R., Oldstone, M. B. und Rosen, H. (2011) *Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection*. *Cell*, 146(6): 980-91.

Toft, P., Lillevang, S. T., Tonnesen, E., Svendsen, P. und Hohndorf, K. (1993) *Redistribution of lymphocytes following E. coli sepsis*. *Scand J Immunol*, 38(6): 541-5.

Treacher, D. F., Sabbato, M., Brown, K. A. und Gant, V. (2001) *The effects of leucodepletion in patients who develop the systemic inflammatory response syndrome following cardiopulmonary bypass*. *Perfusion*, 16 Suppl: 67-73.

Van Brocklyn, J. R. und Williams, J. B. (2012) *The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: oxidative stress and the seesaw of cell survival and death*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 163(1): 26-36.

van der Poll, T. und Opal, S. M. (2008) *Host-pathogen interactions in sepsis. Lancet Infect Dis*, 8(1): 32-43.

Venkataraman, K., Lee, Y. M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H. L., Parikh, N. S., Habrukowich, C. und Hla, T. (2008) *Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. Circ Res*, 102(6): 669-76.

Vincent, J. L. und Abraham, E. (2006) *The last 100 years of sepsis. Am J Respir Crit Care Med*, 173(3): 256-63.

Vincent, J. L., Bihari, D. J., Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M. H., Wolff, M., Spencer, R. C. und Hemmer, M. (1995) *The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA*, 274(8): 639-44.

Vincent, J. L., de Mendonca, A., Cantraine, F., Moreno, R., Takala, J., Suter, P. M., Sprung, C. L., Colardyn, F. und Blecher, S. (1998) *Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. Crit Care Med*, 26(11): 1793-800.

Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M. und Thijs, L. G. (1996) *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med*, 22(7): 707-10.

Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K. und Investigators, E. I. G. o. (2009) *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA*, 302(21): 2323-9.

Vincent, J. L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J. R., Payen, D. und Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients, I. (2006) *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med*, 34(2): 344-53.

Walton, A. H., Muenzer, J. T., Rasche, D., Boomer, J. S., Sato, B., Brownstein, B. H., Pachot, A., Brooks, T. L., Deych, E., Shannon, W. D., Green, J. M., Storch, G. A. und Hotchkiss, R. S. (2014) *Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. PLoS One*, 9(2): e98819.

Wang, L., Sammani, S., Moreno-Vinasco, L., Letsiou, E., Wang, T., Camp, S. M., Bittman, R., Garcia, J. G. und Dudek, S. M. (2014) *FTY720 (s)-phosphonate preserves sphingosine 1-phosphate receptor 1 expression and exhibits superior barrier protection to FTY720 in acute lung injury. Crit Care Med*, 42(3): e189-99.

Wang, S. D., Huang, K. J., Lin, Y. S. und Lei, H. Y. (1994) *Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. J Immunol*, 152(10): 5014-21.

Wang, Z., Fan, H., Xie, R., Yang, J., Ren, Y., Yang, Y. und Li, W. (2015a) *The Effect of Sphingosine 1-Phosphate/Sphingosine 1-Phosphate Receptor on Neutrophil Function and the Relevant Signaling Pathway. Acta Haematol*, 134(1): 49-56.

- Wang, Z., Sims, C. R., Patil, N. K., Gokden, N. und Mayeux, P. R. (2015b) *Pharmacologic targeting of sphingosine-1-phosphate receptor 1 improves the renal microcirculation during sepsis in the mouse. J Pharmacol Exp Ther*, 352(1): 61-6.
- Weichand, B., Weis, N., Weigert, A., Grossmann, N., Levkau, B. und Brune, B. (2013) *Apoptotic cells enhance sphingosine-1-phosphate receptor 1 dependent macrophage migration. Eur J Immunol*, 43(12): 3306-13.
- Weis, N., Weigert, A., von Knethen, A. und Brune, B. (2009) *Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. Mol Biol Cell*, 20(5): 1280-8.
- Windh, R. T., Lee, M. J., Hla, T., An, S., Barr, A. J. und Manning, D. R. (1999) *Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. J Biol Chem*, 274(39): 27351-8.
- Winkler, M. S., Nierhaus, A., Holzmann, M., Mudersbach, E., Bauer, A., Robbe, L., Zahrte, C., Geffken, M., Peine, S., Schwedhelm, E., Daum, G., Kluge, S. und Zoellner, C. (2015) *Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. Crit Care*, 19(1): 372.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. und Mathison, J. C. (1990) *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science*, 249(4975): 1431-3.
- Xu, R., Jin, J., Hu, W., Sun, W., Bielawski, J., Szulc, Z., Taha, T., Obeid, L. M. und Mao, C. (2006) *Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. FASEB J*, 20(11): 1813-25.
- Yanagawa, Y., Masubuchi, Y. und Chiba, K. (1998) *FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. Immunology*, 95(4): 591-4.
- Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S. und Igarashi, Y. (1995) *Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. Blood*, 86(1): 193-202.
- Yi, J. S., Cox, M. A. und Zajac, A. J. (2010) *T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. Immunology*, 129(4): 474-81.
- Yin, K., Wilmanski, J., Wang, C., Qiu, G. und Tahamont, M. (2000) *Lung compartmentalization of inflammatory cells in sepsis. Inflammation*, 24(6): 547-57.
- Zhang, H., Desai, N. N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G. und Spiegel, S. (1991) *Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. J Cell Biol*, 114(1): 155-67.
- Zhang, X. und Morrison, D. C. (1993) *Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages. J Leukoc Biol*, 54(5): 444-50.

Zhang, Z. Y., Zhang, Z., Zug, C., Nuesslein-Hildesheim, B., Leppert, D. und Schliesener, H. J. (2009) *AUY954, a selective S1P(1) modulator, prevents experimental autoimmune neuritis. J Neuroimmunol, 216(1-2): 59-65.*

Zimmerman, J. E., Kramer, A. A. und Knaus, W. A. (2013) *Changes in hospital mortality for United States intensive care unit admissions from 1988 to 2012. Crit Care, 17(2): R81.*

12. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Christian Zöllner, danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Martin Sebastian Winkler, für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für seine ständige Unterstützung und Hilfs- sowie Diskussionsbereitschaft. Auch für die konstruktive Kritik und für das mühevollen Korrekturlesen möchte ich mich bedanken.

Weiterhin möchte ich der gesamten CySep-Studiengruppe danken. Insbesondere den Study Nurses Brigitte Singer, Birgit Füllekrug und Grit Ringeis sowie Marion Prießler (BTA) danke ich für die zahlreichen Vorbereitungen, die stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre der Zusammenarbeit. Auch bei meinen Mitdotorandinnen möchte ich mich bedanken.

Dr. Günter Daum, Dr. Markus Geissen und Astrid Becker aus dem Labor der Gefäßmedizin gilt mein Dank für die labortechnischen Hilfestellungen und die stete Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung, mit der sie mir das Medizinstudium und damit auch das Verfassen dieser Dissertation ermöglichten. Meinen Geschwistern, meinen Freunden und meinem Freund danke ich für die direkte und indirekte Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen hat.

13. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

14. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: