

**Die funktionelle Bedeutung des Fas-/Fas-Ligand-Systems
bei der Immunpathogenese der Sepsis**

**Untersuchungen zu Promotorpolymorphismen des Fas-Rezeptors
bei Patienten mit schwerer Sepsis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Guntje Kneiseler
aus Bonn

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Stefan Udo Weber
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Walther Kuhn

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.04.2011

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. A. Hoeft

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
1 EINLEITUNG.....	12
1.1 Epidemiologie.....	13
1.2 SIRS und Sepsis.....	14
1.2.1 Begriffsbestimmungen und Definitionen.....	14
1.2.2 PIRO.....	16
1.2.3 Procalcitonin als Biomarker.....	17
1.2.4 Immunpathogenese der Sepsis.....	18
1.2.5 SIRS im Zusammenhang mit kardiochirurgischen Operationen.....	19
1.3 Apoptose.....	19
1.3.1 Definition.....	19
1.3.2 Bedeutung der Apoptose.....	21
1.3.2.1 Bedeutung der Apoptose in der Immunpathogenese der Sepsis.....	22
1.3.3 Signaltransduktionswege der Apoptose.....	24
1.3.3.1 Der Kaspase-vermittelte Signalweg.....	24
1.3.3.2 Der mitochondriale Signalweg.....	26
1.4 Das Fas-/Fas-Ligand-System.....	27
1.4.1 Fas.....	27
1.4.2 Fas-Ligand.....	28
1.4.2.1 Der membranständige Fas-Ligand.....	28
1.4.2.2 Der lösliche Fas-Ligand.....	28
1.4.3 Bedeutung des Fas-/Fas-Ligand-Systems.....	29
1.4.3.1 Die Bedeutung des Fas-/FasL-Systems in der Sepsis.....	30
1.5 Genetik.....	30
1.5.1 Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) – Definition und Bedeutung.....	30
1.5.2 Bedeutung der Genetik in der Sepsis.....	31
1.5.3 Genetik des Fas-/FasL-Systems.....	32
1.5.3.1 Das Fas-Gen.....	32
1.5.3.2 Promotorpolymorphismen im Bereich des Fas-Gens.....	34
1.5.3.3 Bedeutung der Fas-Promotorpolymorphismen -670 und -1377.....	34
1.6 Fragestellung.....	36
2 MATERIAL UND METHODEN.....	37
2.1 Material.....	37

2.1.1	Patientenkollektiv und Einschlusskriterien	37
2.1.1.1	Kollektiv der septischen Patienten	37
2.1.1.2	Kontrollkollektiv	37
2.1.1.3	Kollektiv der kritisch kranken Patienten ohne Sepsis (SIRS-Patienten).....	37
2.1.2	Kleingeräte und Materialien.....	38
2.1.3	Technische Geräte	38
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien.....	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	DNA-Isolierung.....	40
2.2.2	Echtzeit-PCR mit dem LightCycler®	41
2.2.2.1	Funktionsprinzip.....	41
2.2.2.2	Primer und Sonden	43
2.2.2.3	Durchführung	45
2.2.3	Agarosegelelektrophorese	48
2.2.4	Hardy-Weinberg-Äquilibrium.....	49
2.2.5	Statistik.....	50
3	ERGEBNISSE.....	51
3.1	Primer- und Sondenkombinationen.....	51
3.2	Demographie der Patientenkollektive.....	52
3.2.1	Sepsiskollektiv	52
3.2.2	Kontrollkollektiv der Blutspender	53
3.2.3	SIRS-Kollektiv	53
3.2.4	Vergleich der Kollektive	54
3.3	Ergebnisse der Genotypisierung.....	56
3.3.1	Hardy-Weinberg-Äquilibrium.....	56
3.3.1.1	Beobachtete Genotyphäufigkeit an Position Fas -670 und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	56
3.3.1.2	Beobachtete Genotyphäufigkeit an Position Fas -1377 und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	58
3.3.2	Genotyp- und Allelhäufigkeiten für den SNP an Position Fas -670	59
3.3.2.1	Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -670 der Sepsis- und der Blutspendergruppe.....	59
3.3.2.2	Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 der Sepsis- und der Blutspendergruppe.....	60
3.3.2.3	Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe	61

3.3.2.4	Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe	61
3.3.3	Genotyp- und Allelhäufigkeiten für den SNP an Position Fas -1377	62
3.3.3.1	Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 der Sepsis- und der Blutspendergruppe.....	62
3.3.3.2	Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 der Sepsis- und der Blutspendergruppe.....	63
3.3.3.3	Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe	64
3.3.3.4	Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe	65
3.3.4	Genotyp- und Allelhäufigkeiten innerhalb des Sepsiskollektivs	66
3.3.4.1	Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -670 und Geschlecht.....	66
3.3.4.2	Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 und Geschlecht.....	66
3.3.4.3	Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Geschlecht.....	67
3.3.4.4	Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Geschlecht.....	68
3.3.4.5	Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -670 und das Überleben der Patienten.....	69
3.3.4.6	Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 und Überleben.....	70
3.3.4.7	Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Überleben.....	71
3.3.4.8	Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Überleben.....	72
4	DISKUSSION.....	74
4.1	Patientenkollektive.....	74
4.1.1	Sepsis-, SIRS- und Blutspenderkollektiv	74
4.1.2	Unterschiede der Alters- und Geschlechtsverteilung zwischen den Kollektiven	75
4.1.3	PCT-Werte bei Sepsis und SIRS.....	76
4.1.4	SAPS II-Score bei Sepsis und SIRS	77
4.2	Immunpathogenese der Sepsis und das Fas-/FasL-System.....	77
4.3	Bedeutung der Promotorpolymorphismen Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A bei Patienten mit schwerer Sepsis.....	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	ANHANG.....	84
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	88
8	DANKSAGUNG.....	100

Abkürzungsverzeichnis

Sämtliche Abkürzungen sind bei erster Nennung im Fließtext erklärt

ALI	Acute lung injury, akute Lungenschädigung
ALPS	Autoimmune lymphoproliferative syndrome, autoimmunlymphoproliferatives Syndrom
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Activator protein 1, Aktivator-Protein-1
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1, apoptotische Protease aktivierender Factor-1
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	Adult respiratory distress syndrome, Schocklunge
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation (immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen)
CLP	Caecumligation und Punktion
c-myb	Transkriptionsfaktor (von myeloblast)
CRP	C-reaktives Peptid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DED	Death-effector domain, Todeseffektorbereich
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI, direkt IAP-bindendes Protein mit niedrigem pI
DISC	Death-inducing complex, Tod-induzierender Signalkomplex
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FADD	Fas-associated death domain protein, Fas-assoziiertes Todesdomänenprotein
Fas	Todesrezeptor Fas (APO-1, CD 95)
FasL	Fas-Ligand

FasFP	Fas receptor fusion protein, Fas-Fusionsprotein
FLICE	FADD-like ICE; FADD-ähnliche ICE
F _i O ₂	Fraktion der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration
FRET	Fluorescence resonance energy transfer, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAF	Gamma-interferon activation factor, Gamma-Interferon aktivierender Faktor
GAS	Interferon-gamma activated sequence, Gamma-Interferon aktivierende Sequenz
gld	Generalized lymphoproliferative disease, generalisierte lymphoproliferative Erkrankung
HLM	Herz-Lungenmaschine
IAP	Inhibitor of apoptosis, Inhibitoren der Apoptose
ICU	Intensive care unit, Intensivstation
Il	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
kPa	Kilo-Pascal
lpr	Lymphoproliferative, "Lymphoproliferations-Mutation"
LPS	Lipopolysaccharid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIF	Macrophage migration inhibitory factor, Makrophagen-Migrations-hemmender Faktor
min	Minute(n)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells, nukleärer Faktor "kappa-Leichtketten-Enhancer"-aktivierter B-Zellen
NH ₂	Amino-Gruppe
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid

NOD	Non-Obese Diabetic Mice (Tiermodell für Typ 1 Diabetes)
ns	nicht signifikant
p _a CO ₂	Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
p _a O ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCT	Procalcitonin
PIRO	Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction, Prädisposition, Infektion, (Immun-)Antwort; Organdysfunktion
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
RBC	Red blood cell, Erythrozyten
rel. Häufigkeit	relative Häufigkeit
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure, ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score II
SepNet	Kompetenznetzwerk Sepsis
sFasL	Lösliche Form des Fas-Liganden
siRNA	Small interfering RNA, kleine interferierende DNA
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome, systemisches Inflammationssyndrom
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Smac	Second-mitochondria derived activator of caspases
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus, single nucleotide polymorphism
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
SP-1	Transkriptionsfaktor
TBE Puffer	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TGF	Transforming-Growth-Factor
TLR	Toll-like receptor

TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen (internationales Tumorklassifikationssystem)
U/min	Umdrehungen pro Minute
3'-UTR	3'-untranslatierte Region
5'-UTR	5'-untranslatierter Bereich
z-VAD	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton

1 Einleitung

Trotz einer erheblich verbesserten Intensivtherapie bildet die schwere Sepsis und der septische Schock die Haupttodesursache auf nichtkardiologischen Intensivstationen (ICU) (Andersson, 2005). Auch wenn in den letzten Jahren Behandlungsfortschritte erzielt wurden, sind diese zum Teil in der täglichen intensivmedizinischen Praxis nicht ausreichend umgesetzt. Darüber hinaus ist die schwere Dysregulation der inflammatorischen Antwort, welche für eine Progression der Sepsis verantwortlich gemacht wird, zum Teil nur in Ansätzen aufgeklärt. So blieben in der Vergangenheit auch zahlreiche klinische Studien, die diesem Phänomen entgegenwirken sollten, erfolglos. Vielversprechende präklinische Ansätze durch den Einsatz von Inhibitoren oder monoklonalen Antikörpern gegen proinflammatorische Zytokine [z. B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α oder Interleukin-(II-)1 β] scheiterten an der mangelnden Übertragbarkeit der Ergebnisse experimenteller Studien auf den Menschen.

In der Sepsistherapie wird zwischen den kausalen (antimikrobiellen bzw. operativen Maßnahmen zur Herdsanierung), den supportiven intensivmedizinischen Standardmaßnahmen und den adjunktiven (potenziell zusätzlichen) therapeutischen Ansätzen unterschieden. Trotz enormer klinischer Forschung im Rahmen zahlreicher randomisierter Multizenterstudien zur adjunktiven Therapie der Sepsis und großen koordinierten Forschungsengagements in Netzwerken (z. B. Kompetenznetzwerk Sepsis, SepNet) hat bisher nur eine Studie zur Zulassung eines neuen adjunktiven Sepsistherapeutikums geführt (Bernard et al., 2001).

In den letzten Jahren haben neuere Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Sepsis dazu beigetragen, dem phasenhaften Verlauf der Sepsis Rechnung zu tragen. Das sogenannte PIRO-Modell (Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction) wurde als Grundlage einer neuen Sepsisklassifikation vorgeschlagen, die dem multifaktoriellen Geschehen der Sepsis und der individuellen Prädisposition für die Reaktion auf eine Infektion Rechnung tragen soll. Auch wenn dieses Modell attraktiv und als Hypothese sinnvoll erscheint, ist es bislang nur unzureichend validiert und die möglichen genetischen Grundlagen bisher nur in Ansätzen untersucht.

1.1 Epidemiologie

Im Jahr 1995 wurde das Auftreten einer schweren Sepsis in den USA auf 751.000 Fälle pro Jahr geschätzt. Dies entspricht einer Inzidenzrate von 30 Fällen pro 1.000 Einwohner (Angus et al., 2001). Hierbei beträgt die Mortalität im Mittel 28,6 %, wobei sich die Kosten pro Fall auf 22.100 US-Dollar (\$) belaufen. Demnach betragen die jährlichen durch die Behandlung der schweren Sepsis verursachten Kosten in den USA \$ 16,7 Milliarden (Linde-Zwirble und Angus, 2004).

Während für die USA eine Vielzahl von epidemiologischen Studien durchgeführt wurde, lagen für Deutschland lange keine validen Daten zur Häufigkeit und Bedeutung der Sepsis vor. Im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Kompetenznetzwerks Sepsis (SepNet) wurde im Jahr 2003/04 eine prospektive Querschnittsstudie zur Epidemiologie der Sepsis in Deutschland an 454 Intensivstationen in 310 Krankenhäusern durchgeführt. Demnach beläuft sich die Prävalenz der Sepsis in Deutschland auf 12,4 % und die der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks (im Weiteren als schwere Sepsis bezeichnet) auf 11 % aller gescreenten Intensivpatienten. Auf Deutschland hochgerechnet bedeutet dies, dass pro Jahr 75.000 Einwohner (110 von 100.000) an einer schweren Sepsis und 79.000 (116 von 100.000) an einer Sepsis erkranken. Damit stellt diese die siebthäufigste Krankenhausentlassungsdiagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen dar. Die Krankenhausmortalität der schweren Sepsis (90-Tage-Sterblichkeit) in dieser Untersuchung lag bei 54 %. Mit ca. 60.000 Todesfällen sind septische Erkrankungen somit die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt, aber noch vor der Herzinsuffizienz in Deutschland (Engel et al., 2007). Zwar waren 68 % der Patienten mit schwerer Sepsis älter als 60 Jahre, jedoch verstarben in der Gruppe der 18 – 39-jährigen und 40 – 59-jährigen Patienten immerhin je 46 % gegenüber 60 % in der Gruppe der über 60-jährigen Patienten. Dies unterstreicht, dass die Sepsis nicht eine Erkrankung älterer, multimorbider Patienten ist, sondern auch bei jungen und bisher gesundheitlich wenig kompromittierten Patienten eine erhebliche Herausforderung darstellt.

In dieser Querschnittsstudie wurden die direkten anteiligen Kosten, die alleine für die intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis anfallen, auf ca. 1,77 Milliarden Euro bestimmt. Damit werden ca. 30 % des Budgets für Intensivmedizin in die Behandlung der Sepsis investiert.

1.2 SIRS und Sepsis

1.2.1 Begriffsbestimmungen und Definitionen

Der Begriff der Sepsis ist eine Umschreibung einer gemeinsamen Endstrecke verschiedener Krankheitsverläufe mit multiplen möglichen Ursachen.

Obwohl der Begriff Sepsis eng mit der modernen Intensivmedizin verknüpft ist, handelt es sich um einen sehr alten medizinischen Terminus. Das Wort „Sepsis“ wurde bereits von Hippokrates eingeführt und leitet sich aus dem Griechischen „faul machen“ ab. Eine moderne Sicht der Sepsis entwickelte sich erst durch die Arbeiten von Ignaz Semmelweis (1818 – 1865). Der Intensivmediziner Roger C. Bone definierte die Sepsis 1989 in der noch heute gültigen Form als „eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (Deutsche-Sepsis-Gesellschaft, 2010).

Im Rahmen der ACCP/SCCM Consensus Conference von 1991 wurden Kriterien zur Definition des systemischen Inflammationssyndroms (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), der Sepsis, der schweren Sepsis sowie des septischen Schocks erarbeitet (Bone et al., 1992). Diese wurden im Jahr 2001 durch die SCCM/ESCM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definition Conference überarbeitet und aktualisiert (Levy et al., 2003).

Demnach beschreibt der Begriff SIRS eine systemische Entzündungsreaktion oder die klinischen Antwort auf eine Entzündung (Bone et al., 1992). Die klinischen SIRS-Zeichen wie Fieber, Tachykardie und auch Tachypnoe werden bei vielen Intensivpatienten beobachtet und stellen eher unspezifische Zeichen dar. So ist eine solche systemische Entzündungsreaktion, die in Abwesenheit einer Infektion auftritt, z. B. bei Patienten mit Verbrennungen, Pankreatitis, Ischämien, Polytrauma oder hämorrhagischem Schock zu finden (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003). Weiterhin beobachtet man das fast regelhafte Auftreten eines SIRS in der Kardiochirurgie nach Operationen mit Einsatz einer Herz-Lungenmaschine (HLM) (Butler et al., 1993; Khabar et al., 1997).

Unter dem Begriff der Sepsis wird ein klinisches Syndrom verstanden, welches sowohl durch eine Infektion als auch durch eine systemische Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist (Levy et al., 2003). Die Sepsis kann weiter unterteilt werden in die schwere Sepsis und den septischen Schock. Kennzeichen der schweren Sepsis in dieser Definition ist das Vorliegen einer

Organdysfunktion (Levy et al., 2003). Der Begriff des septischen Schocks bezieht sich hingegen auf einen Zustand akuten Kreislaufversagens, welcher durch persistierende arterielle Hypotension, die nicht durch andere Ursachen zu erklären ist, charakterisiert wird (Levy et al., 2003).

Die Übergänge zwischen Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock sind fließend. Die Diagnose erfolgt durch eine Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organparametern (siehe Tabelle 1) (Reinhart et al., 2006).

I Nachweis der Infektion	
- Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien	
II Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), mindestens 2 Kriterien	
- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$)	
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$	
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($p_a\text{CO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa/bzw. } \leq 33 \text{ mmHg}$)	
- Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10 \%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild	
III Akute Organdysfunktion, mindestens ein Kriterium	
- Akute Enzephalopathie	
- Relative oder absolute Thrombozytopenie (Ausschluss einer Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen)	
- Arterielle Hypoxämie: $p_a\text{O}_2 \leq 10 \text{ kPa}$ unter Raumluft oder ein $p_a\text{O}_2/\text{F}_i\text{O}_2$ -Verhältnis von $\leq 33 \text{ kPa}$ unter Sauerstoffapplikation (Ausschluss einer manifesten Herz- oder Lungenerkrankung als Ursache der Hypoxämie)	
- Renale Dysfunktion	
- Metabolische Azidose	
Sepsis	Kriterien I und II
Schwere Sepsis	Kriterien I, II und III
Septischer Schock	Kriterien I und II sowie für mindestens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den Blutdruck über o. g. Werte zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

Tabelle 1: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock [modifiziert nach Reinhart et al. (Reinhart et al., 2006)].

Diese in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts etablierte Kriterien werden häufig als zu sensitiv erachtet und der Versuch einer Verbesserung resultierte letztendlich in dem Vorschlag eines Klassifikationssystems, dem sogenannten PIRO-Konzept.

1.2.2 PIRO

Im klinischen Alltag sind die oben aufgeführten Kriterien nicht immer hilfreich. In den letzten Jahren haben neuere Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Sepsis dazu beigetragen, dem phasenhaften Verlauf der Sepsis Rechnung zu tragen. So wird derzeit an einer Weiterentwicklung der vorhandenen Kriterien und Definitionen gearbeitet (Levy et al., 2003).

Anhand der bestehenden Definitionen und Diagnosekriterien sind eine präzise Charakterisierung und ein Staging der Patienten nicht möglich (Levy et al., 2003). Klassifikationssysteme, wie beispielsweise das TNM-System [Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen] in der Onkologie, die eine Einteilung der Patienten sowie Aussagen über den klinischen Verlauf und eine stadiengerechte Therapie erlauben, existieren für die Sepsis bislang nicht. Das sogenannte PIRO-Modell wurde als Grundlage einer neuen Sepsisklassifikation vorgeschlagen, die dem multifaktoriellen Geschehen der Sepsis und der individuellen Prädisposition für die Reaktion auf eine Infektion, Rechnung tragen soll (Meisel et al., 2008). Ziel ist folglich die Erfassung des individuellen klinischen Zustandes und einer daraus resultierenden individualisierten Therapie (Meisel et al., 2008).

Das „P“ im PIRO-Konzept steht für „Prädisposition“. Hierunter werden Faktoren wie beispielsweise Begleiterkrankungen, Alter, Geschlecht und Sozialisation subsummiert. Aber auch genetische Faktoren gewinnen zunehmend an Bedeutung (Levy et al., 2003; Meisel et al., 2008).

Das „I“ steht für „Infektion“. Sowohl Lokalisation, Art als auch Ausmaß einer Infektion haben einen signifikanten Einfluss auf die Prognose des Patienten.

Das „R“ steht für „Response“. Die Immunantwort des Wirts ist schwer zu charakterisieren. Mögliche biologische Marker der Ausprägung und des zeitlichen Verlaufs der Immunantwort schließen Procalcitonin (PCT), Interleukin-6 (IL-6) und viele weitere Biomarker ein. Aufgrund der zum Teil parallel ablaufenden und sich gegenseitig beeinflussenden Mediatorsysteme ist bislang jedoch noch kein einzelner „Sepsismarker“ gefunden worden, der das Stadium und den möglichen weiteren Verlauf der Inflammation realistisch abbilden kann.

Das „O“ steht für „Organdysfunktion“. Die Schwere der Organdysfunktion wird als wichtiger prognostischer Faktor in der Sepsis angesehen. Moderne Scoringsysteme (z. B. Scores wie SAPS II, SOFA, APACHE II) können dazu genutzt werden, den Grad der Organdysfunktion zu beschreiben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bislang sowohl eindeutige diagnostische Kriterien als auch Marker (so auch genetische) zur Risikostratifizierung und einer möglichen Individualisierung der Therapie fehlen. Hierbei könnten sich neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Sepsis und genetische Testverfahren als zusätzliche diagnostische Werkzeuge zur Identifizierung von Patienten mit hohem Risiko der schweren Sepsis und der Gestaltung einer individualisierten Therapie als hilfreich erweisen.

1.2.3 Procalcitonin als Biomarker

Procalcitonin ist ein Vorläuferhormon des Calcitonins (Endo et al., 2008). Assicot et al. beschrieben 1993 zum ersten Mal erhöhte Serumkonzentrationen von PCT bei Patienten mit Sepsis und nachgewiesener Infektion (Assicot et al., 1993). Es zeigte sich, dass die PCT-Werte während schweren, generalisierten bakteriellen, parasitären oder auch durch Pilze verursachten Infektionen mit systemischer Beteiligung erhöht waren. Aufgrund dieser Beobachtung wird PCT als Indikator für schwere generalisierte Infektionen und Sepsis angesehen (Reinhart et al., 2000). Selberg et al. beschrieben, dass signifikant höhere Plasmakonzentrationen des PCTs, im Gegensatz zum C-reaktiven Peptid (CRP) oder zur Elastase, bei septischen Patienten im Vergleich mit SIRS-Patienten gemessen wurden (Selberg et al., 2000). In einer 2008 veröffentlichten Arbeit zeigten Endo et al., dass die medianen PCT-Werte von Patienten mit schwerer Sepsis signifikant höher waren als die Werte von Patienten mit Sepsis. Woraus gefolgert wurde, dass PCT möglicherweise auch als Marker zur Diskriminierung zwischen Sepsis und schwerer Sepsis dienen könnte (Endo et al., 2008). Erhöhte PCT-Werte wurden jedoch nicht nur in der Sepsis, sondern auch im Rahmen eines SIRS, unmittelbar nach verschiedenen Operationen, Trauma oder Verbrennungen ohne offensichtliche begleitende Infektion beschrieben (Carsin et al., 1997; Meisner et al., 1998; Mimos et al., 1998; Uzzan et al., 2006). Auch nach kardiochirurgischen Eingriffen wurde ein früher und moderater Anstieg des PCTs beschrieben, wobei höhere Anstiege v. a. bei Patienten mit einer signifikanten inflammatorischen Reaktion beobachtet wurden (Aouifi et al., 1999; Aouifi et al., 2000; Meisner et al., 2002).

1.2.4 Immunpathogenese der Sepsis

Eine Entzündungsreaktion wird durch verschiedene Schädigungen des Wirts (z. B. mikrobielle Infektionen, Trauma, Verbrennung) initiiert. Sinn der entzündlichen Antwort (Immunreaktion) ist es, den Wirt vor schädigenden Folgen der Verletzung zu schützen. Physiologischerweise ist diese durch pro- und antiinflammatorische Faktoren im Gleichgewicht (sogenannte Homöostase).

Sepsis entsteht, wenn eine initial angemessene Immunantwort auf eine Infektion verstärkt und letztlich dysreguliert wird (Cohen, 2002). In der Sepsis kommt es folglich zu einem Versagen der körpereigenen Regulierungskapazität („*Host Defense Failure*“).

Die Sepsis ist durch eine initial überschießende proinflammatorische Immunantwort gekennzeichnet. In dieser frühen Phase kommt es zu einer gesteigerten kardialen Auswurfleistung, einer gesteigerten Gewebepfusion und einem verminderten Gefäßwiderstand (Wesche-Soldato et al., 2005b). Im weiteren Verlauf folgt dann eine antiinflammatorische Gegenregulation (Hotchkiss und Karl, 2003; Oberholzer et al., 2001), in der Gewebedurchblutung, mikrovaskulärer Blutfluss sowie die kardiale Pumpfunktion (Stichwort: septische Kardiomyopathie) vermindert sind. Es entwickeln sich zunehmende Zeichen der Organdysfunktion (Wesche-Soldato et al., 2005b).

Molekularbiologisch kommt es im Rahmen der Entzündungsantwort zu einer Freisetzung klassischer proinflammatorischer Zytokine wie Il-1, Il-6 und TNF- α , aber auch einer Vielzahl weiterer Zytokine und Chemokine durch beispielsweise Monozyten/Makrophagen (Cohen, 2002).

TNF- α und Il-1 werden innerhalb der ersten 30 bis 90 Minuten nach Exposition gegenüber Lipopolysaccharid (LPS), einem Endotoxin gram-negativer Bakterien, freigesetzt und führen zu einer weiteren Aktivierung der inflammatorischen Kaskade. Diese umfasst weitere Zytokine, Chemokine sowie Sauerstoffradikale. Ferner kommt es zu einer vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen, was zu einer Migration von Entzündungszellen ins Gewebe führt. Dies bedingt zusammen mit der Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren eine in der Sepsis häufig beobachtete Permeabilitätsstörung der Kapillaren (sogenanntes „*capillary leak*“) (Cohen, 2002).

Im Rahmen der Gegenregulation während der späten Phase der Sepsis werden antiinflammatorische Zytokine produziert (Kox et al., 2000). Hierzu zählen unter anderem Il-10,

Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β), Il-13 und Il-4. Im Zusammenhang mit diesen komplexen Vorgängen kann es zu einer Immunsuppression kommen.

1.2.5 SIRS im Zusammenhang mit kardiochirurgischen Operationen

Im Rahmen kardiochirurgischer Operationen unter Verwendung einer Herz-Lungenmaschine wird fast regelhaft eine systemische Entzündungsreaktion im Sinne eines SIRS beobachtet (Butler et al., 1993; Cremer et al., 1996; Czerny et al., 2000; Gu et al., 1998). Als auslösende Faktoren werden das chirurgische Trauma, der Kontakt des Blutes zur künstlichen Oberfläche des extrakorporalen Kreislaufs sowie eine Ischämie-/Reperfusionsschädigung genannt (Butler et al., 1993; Czerny et al., 2000). Wichtige Bestandteile dieser systemischen Entzündungsreaktion sind die Aktivierung des Komplementsystems und der Leukozyten, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie Änderungen im Metabolismus von Stickstoffmonoxid (NO) (Cremer et al., 1996; Gu et al., 1998; Matata et al., 2000). Warum es letztlich im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe zu einer solchen Entzündungsreaktion kommt, ist noch nicht vollständig verstanden bzw. aufgeklärt.

1.3 Apoptose

1.3.1 Definition

Das Wort „Apoptose“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet ursprünglich „Abtropfen“ oder „Abfallen“ im Sinne des Fallens der Blättern von den Bäumen (Ogawa et al., 1995).

Durch Kerr et al. wurde der Begriff der Apoptose 1972 für eine Form des physiologischen, programmierten Zelltodes mit charakteristischer Morphologie eingeführt (Kerr et al., 1972). Morphologisch zeichnet sich diese Art des programmierten Zelltodes durch eine Volumenminderung der betroffenen Zelle, eine nukleäre Kondensation, eine DNA-Fragmentation sowie Veränderungen der Zellmembran mit Abschnürung sogenannter apoptotischer Körperchen („*apoptotic bodies*“) aus (siehe Abbildung 1) (Ogawa et al., 1995; Saikumar et al., 1999). Apoptose ist ein aktiver Prozess zellulärer Selbstzerstörung und betrifft in der Regel einzelne Zellen (Ogawa et al., 1995). Diese Art des Zelltodes erlaubt es dem Organismus, ungewollte oder defekte Zellen im Rahmen eines geordneten Prozesses zellulärer Desintegration zu eliminieren, ohne eine inflammatorische Reaktion auszulösen (Pucci et al., 2000).

Als Form des Zelltodes ist dabei die Nekrose von der Apoptose abzugrenzen. Nekrose tritt z. B. nach Schädigung durch Toxine, physikalische Stimuli oder Ischämie auf. Kennzeichnend sind eine Zellschwellung sowie eine Lyse des nukleären Chromatins (siehe Abbildung 1). Da zumeist größerer Zellgruppen betroffen sind und Zellbestandteile früh in den Extrazellularraum abgegeben werden, wird im Rahmen der Nekrose eine Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes oder des gesamten Organismus hervorgerufen (Saikumar et al., 1999).

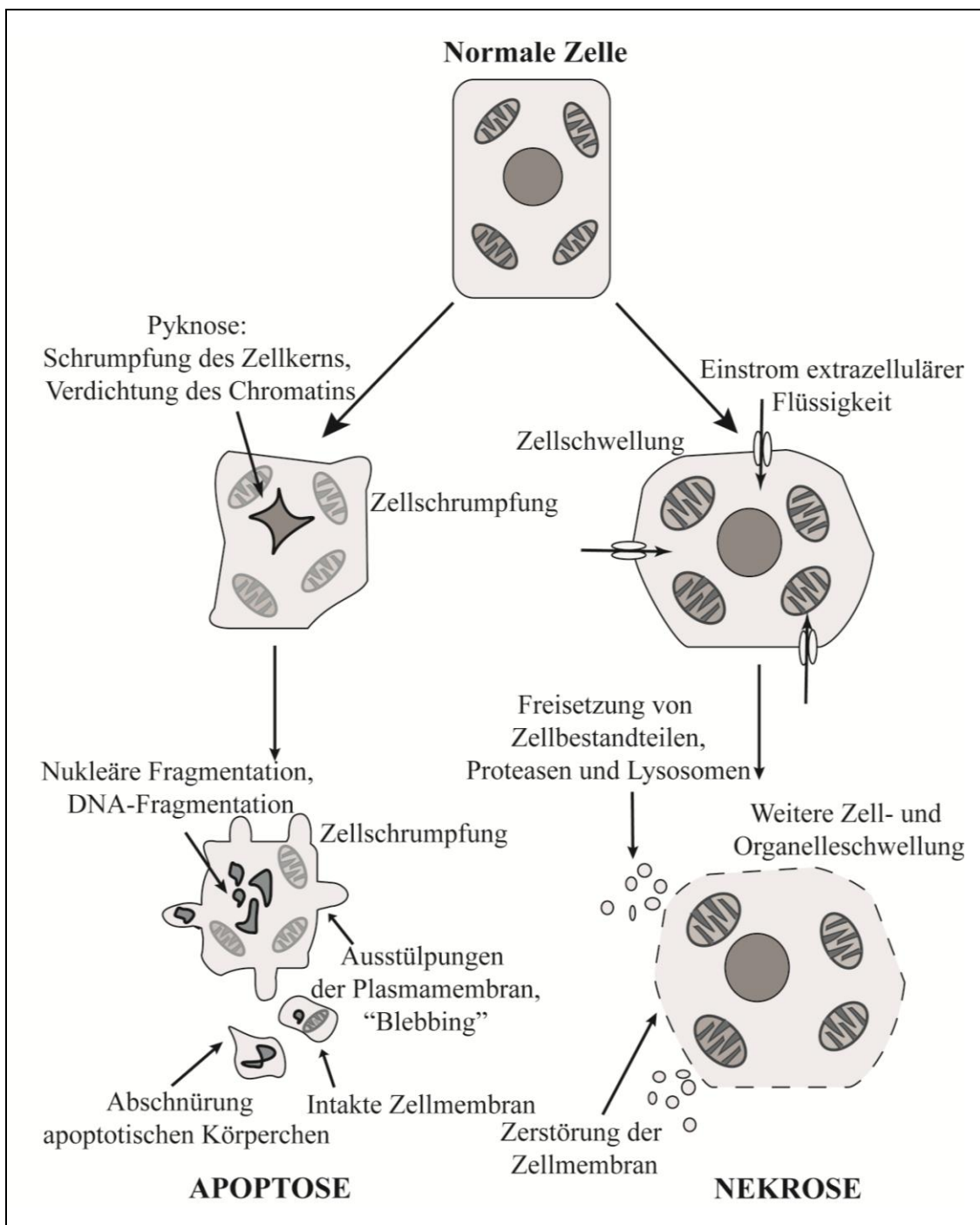


Abbildung 1: Zellveränderungen während Apoptose und Nekrose [modifiziert nach Hotchkiss et al. (Hotchkiss et al., 2009)].

1.3.2 Bedeutung der Apoptose

Apoptose spielt physiologischerweise sowohl während der Entwicklung als auch bei der Aufrechterhaltung einer Homöostase von Zellpopulationen eine Rolle (Saikumar et al., 1999). Als physiologisches Beispiel für die Bedeutung der Apoptose während der

Embryonalentwicklung sei die Eliminierung der vor der Geburt vorhandenen Interdigitalfalten genannt (Jacobson et al., 1997). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung des programmierten Zelltodes findet man im Rahmen der Reifung des Immunsystems z. B. bei der negativen Selektion von T-Zellen im Thymus (Diamantis et al., 2008; Krammer et al., 1994; Reed, 2002).

Eine Dysregulation der Apoptose trägt zu einer Vielzahl von Krankheiten, beispielsweise neurodegenerativen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen oder Tumorerkrankungen, bei (Pucci et al., 2000; Saikumar et al., 1999). Beispielhaft hierfür sei der autoimmunvermittelte Diabetes genannt. Kurrer et al. konnten in einer Studie im Mausmodell zeigen, dass β -Zellen im Bereich entzündlich veränderter Inseln des Pankreas durch Apoptose sterben (Kurrer et al., 1997). In einer weiteren Studie sah man, dass die Expression des Apoptose vermittelnden Fas-Rezeptors pankreatischer β -Zellen einen erheblichen Einfluss auf die Anfälligkeit von NOD-Mäusen für Diabetes hat. Zusätzlich ist sie mit einer kritischen Veränderung im Verlauf des Diabetes, von einer gutartigen Infiltration zu einer Zerstörung der Langerhans-Inseln, assoziiert. In dieser Studie scheint die Fas-vermittelte Apoptose der vorherrschende Mechanismus der T-Zell-vermittelten Schädigung der insulinproduzierenden β -Zellen zu sein (Chervonsky et al., 1997).

1.3.2.1 Bedeutung der Apoptose in der Immunpathogenese der Sepsis

Im Zusammenhang mit der Immunpathogenese der Sepsis kommt der Apoptose von Leukozyten vermehrte Bedeutung zu. So wurde in Tiermodellen der Sepsis gezeigt, dass Sepsis die Apoptose von Zellen des Immunsystems induziert (Ayala et al., 1996; Wang et al., 1994). Hotchkiss et al. konnten im Rahmen einer prospektiven Studie mit 20 an einer Sepsis verstorbenen Patienten nachweisen, dass dies auch für den Menschen zutrifft (Hotchkiss et al., 1999a). Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass Kaspase-3-vermittelte Apoptose eine extensive Lymphozytenapoptose in der Sepsis verursacht und so möglicherweise zu der eingeschränkten Immunantwort im Verlauf der Sepsis beiträgt (Hotchkiss et al., 1999a). In einer weiteren Humanstudie bei Sepsis- sowie Traumapatienten wurde mittels Immunhistochemie ein Kaspase-9-vermittelter schwerer, fortschreitender Verlust von B- und CD₄- T-Helferzellen beobachtet (Hotchkiss et al., 2001). Dieser Befund wird als besonders signifikant angesehen, da er während einer lebensbedrohlichen Infektion auftritt, in der eigentlich eine massive Lymphozytenexpansion erfolgen sollte. Durch die verminderte Anzahl der zur Infektionsbekämpfung zur Verfügung stehenden Immunzellen

könnte dieser beobachtete B- und CD₄-Zellverlust zur Immunsuppression in der Sepsis beitragen (Hotchkiss et al., 2001).

Die mögliche Bedeutung der Lymphozytenapoptose in der Immunpathogenese der Sepsis wird durch verschiedene Studien unterstrichen, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Hemmung der Lymphozytenapoptose das Überleben einer Sepsis verbessert. So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass eine Hemmung der Lymphozytenapoptose - entweder durch Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 („*B-cell lymphoma*“) oder aber auch durch den Kaspaseinhibitoren N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton (z-VAD) - das Überleben einer Sepsis fördert (Hotchkiss et al., 1999b). Weiterhin unterstreichen diese Ergebnisse, dass die aus dem Verlust von Lymphozyten resultierende Immunsuppression ein zentrales pathogenetisches Ereignis im Rahmen der Sepsis ist. In einer anderen tierexperimentellen Studie beobachtete die Arbeitsgruppe um Hotchkiss ein verbessertes Überleben durch Hemmung der Lymphozytenapoptose mittels verschiedener selektiver und unselektiver Kaspaseinhibitoren. Zusätzlich stellten sie bei septischen Mäusen eine Assoziation zwischen einer Hemmung des Zelltodes von Lymphozyten und einer merklichen Reduktion der Bakteriämie fest (Hotchkiss et al., 2000). In einer prospektiven Fall-Kontrollstudie zeigte sich während der frühen schweren Sepsis ein Genexpressionsmuster mit einer Induktion der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bim, Bid und Bak sowie einer Verminderung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl. Diese Konstellation könnte die Empfänglichkeit für den programmierten Zelltod sowie die komplexen immunologischen Dysfunktionen im Rahmen einer Sepsis beeinflussen. Zusätzlich wurde in dieser Studie in allen untersuchten Lymphozytenpopulationen eine Aktivierung von Kaspase-3 beobachtet, wobei gleichzeitig diese Befunde von verminderten Lymphozytenzahlen während der frühen schweren Sepsis begleitet waren (Weber et al., 2008).

Obwohl beim Menschen bislang noch keine umfassenden Untersuchungen hinsichtlich der Apoptose von Lymphozyten in der Sepsis vorliegen, wird aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über mögliche neue Ansätze der immunmodulatorischen Therapie spekuliert (Oberholzer et al., 2001).

1.3.3 Signaltransduktionswege der Apoptose

In der Zelle existieren präformierte Signalaufnehmer und Signaltransduktionswege, die den Prozess der Apoptose vermitteln können. Prinzipiell unterscheidet man hierbei zwei verschiedene, sich jedoch gegenseitig beeinflussende Wege: Zum einen den Kaspase-vermittelten Weg, zum anderen den mitochondrialen Signalweg.

1.3.3.1 Der Kaspase-vermittelte Signalweg

Der Name Kaspase (im Englischen „*caspase*“) leitet sich von zwei katalytischen Eigenschaften dieser Enzymfamilie ab. Das „C“ trägt der Tatsache Rechnung, dass es sich um eine Familie der Zystein-Proteasen handelt. „*Aspase*“ bezieht sich auf die Eigenschaft, Substrate nach der Aminosäure Aspartat zu spalten (Alnemri et al., 1996). Die meisten morphologischen Veränderungen im Rahmen der Apoptose sind durch diese Proteasenfamilie bedingt (Hengartner, 2000). Kaspasen werden als Zymogene (sogenannte Prokaspasen) synthetisiert. Die Umwandlung in eine reife Kaspase erfolgt durch verschiedene Spaltungsschritte (Earnshaw et al., 1999).

Im Rahmen des Kaspase-vermittelten Signalwegs löst ein proapoptotisches Signal die Aktivierung sogenannter Initiator-kaspasen aus, welche dann ihrerseits sogenannte Effektor-kaspasen aktivieren, was dann letztlich zum Zellabbau führt (Thornberry und Lazebnik, 1998). Im Folgenden sei dies anhand der über den Todesrezeptor Fas ausgelösten Signalkaskade veranschaulicht (siehe Abbildung 2).

Durch Bindung spezifischer Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Fas-Rezeptors, welche zur Aktivierung der folgenden Signalkaskade notwendig ist (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Durch die Konformationsänderung wird die Bildung des sogenannten DISC („*death-inducing complex*“, Tod-induzierender Signalkomplex) ausgelöst (Kischkel et al., 1995). Hierbei bindet zunächst das Adaptermolekül FADD („*Fas-associated death domain protein*“, Fas-assoziiertes Todesdomänenprotein; MORT1) mit der sogenannten Todesdomäne an diejenige des Fas-Rezeptors. Die Interaktion zwischen dem Fas-Rezeptor und der FADD ist auf die Assoziation zwischen ihren homologen Todesdomänen zurückzuführen (Chinnaiyan et al., 1995). Über seine DED (Todeseffektorbereich, „*death-effector domain*“) bindet FADD an die Prodomäne der Prokaspase-8 (FLICE, „*FADD-like ICE*“), welche homolog der DED des FADD ist. Durch diese Bindung ist der DISC vollständig. Im nächsten Schritt kommt es zur proteolytischen Aktivierung der Prokaspase-8. Die aktive Kaspase-8 wird aus dem

DISC in das Zytoplasma freigesetzt, wo sie dann ihrerseits zur Aktivierung weiteren Kaspasen beiträgt (Muzio et al., 1996).

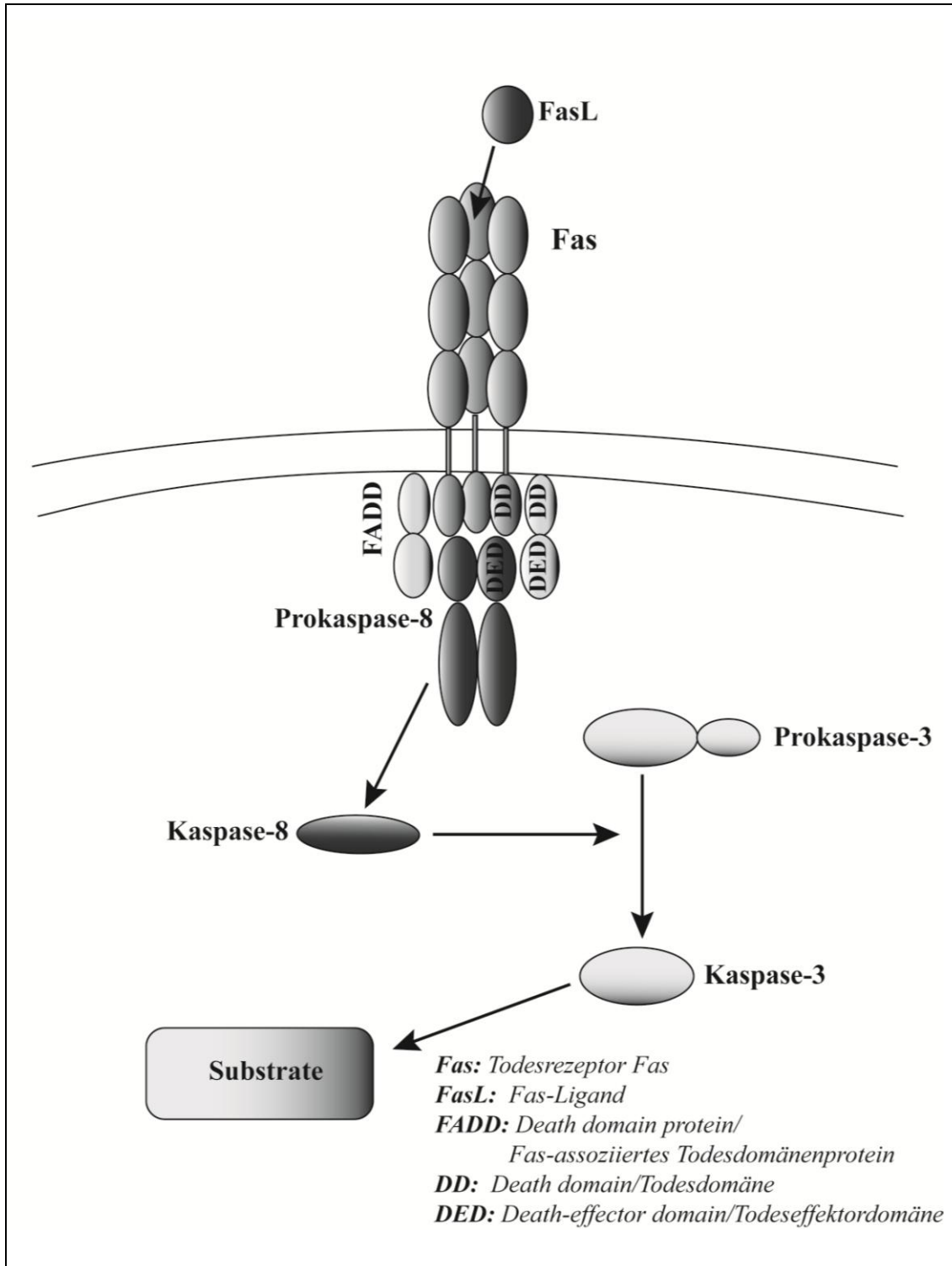


Abbildung 2: Signalkaskade des Fas-/FasL-Systems zur Apoptoseinduktion [modifiziert nach Strasser et al. (Strasser et al., 2009) und Hengartner et al. (Hengartner, 2000)].

Die aktivierte Kaspase-8 spaltet die ruhende Prokaspase-3 proteolytisch, wodurch diese aktiviert wird. Die der Kaspase-3-Aktivierung nachgeschalteten Vorgänge resultieren sowohl in einem geordneten Abbau als auch in einer Beseitigung der apoptotischen Zelle (Hengartner, 2000). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kaspase-3 verschiedene Substrate aktiviert, welche dann eine DNA-Fragmentation zur Folge haben (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997). Weiterhin kommt es im Rahmen der Apoptose zu einer Kaspase-abhängigen Proteolyse peripherer und integraler Proteine der nukleären Membran sowie der Kernporen (Buendia et al., 1999). Vielfach wird bei apoptotischen Zellen eine Externalisierung von Phosphatidylserin auf die äußere Zellmembran beobachtet. Diese trägt dazu bei, dass die apoptotische Zelle durch Phagozyten erkannt und beseitigt werden kann (Fadok et al., 1998).

1.3.3.2 Der mitochondriale Signalweg

Eine andere Möglichkeit, programmierten Zelltod zu vermitteln, stellt der mitochondriale Signalweg dar. Eine wichtige Rolle hierbei spielen Moleküle der sogenannten Bcl-Familie. Diese kann aufgrund struktureller und funktioneller Kriterien in drei Gruppen gegliedert werden. Die Mitglieder der Gruppe I besitzen eine antiapoptotische Aktivität, wohingegen diejenigen der Gruppen II und III Apoptose begünstigen (Hengartner, 2000). Bcl-2 und einige andere Mitglieder dieser Familie befinden sich auf der äußeren Mitochondrienmembran und stabilisieren dort die Barrierefunktion (Green und Reed, 1998; Zamzami und Kroemer, 2001). Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-Familie Bax, Bid und Bad finden sich im Zytosol, Bim in Mikrotubuli und Mitochondrien. Als Reaktion auf proapoptotische Stimuli können diese proapoptotischen Proteine nach Aktivierung in die Mitochondrienmembran einwandern und zur Membranpermeabilisation führen (Martinou und Green, 2001; Zamzami und Kroemer, 2001). Auf diese Art werden unter anderem Zytochrom c, Kaspase-9 und Apaf-1 („*Apoptotic protease activating factor-1*“, apoptotische Protease aktivierender Faktor 1) freigesetzt. In Gegenwart von Zytochrom c und Desoxyadenosintriphosphat (dATP) kommt es zur Bindung zwischen Apaf-1 und Kaspase-9, was zu deren Aktivierung führt (Li et al., 1997; Rodriguez und Lazebnik, 1999; Zou et al., 1997). Dieser Enzymkomplex wird auch Apoptosom genannt (Hengartner, 2000). Die auf diesem Weg aktivierte Kaspase-9 kann nun ihrerseits die Effektor-kaspase-3 aktivieren (Li et al., 1997).

Eine Verbindung beider Signalwege (des Kaspase-vermittelten und des mitochondrialen Signalwegs) besteht durch das proapoptotische Bid, einem Mitglied der Bcl-Familie. Bid ist ein

spezifisches Substrat der aktivierten Kaspase-8. Wird Bid durch Kaspase-8 gespalten, kommt es zu einer Freisetzung seiner potenten proapoptotischen Aktivität, was letztlich zur mitochondrialen Schädigung, Zellschrumpfung und nukleären Kondensation führt (Li et al., 1998).

Um sicher zu stellen, dass eine Zelle entweder vollständigen Zelltod begeht oder um ungewollten Zelltod zu verhindern, bestehen vielfältige Rückkopplungsmechanismen (Hengartner, 2000). So existieren beispielsweise sogenannte IAPs („*Inhibitor of apoptosis*“, Inhibitoren der Apoptose), eine Gruppe von Proteinen, welche potente Inhibitoren der Apoptose darstellen und bestimmte Kaspasen direkt hemmen können (Salvesen und Duckett, 2002). IAPs ihrerseits können durch das mitochondriale Protein DIABLO („*direct IAP-binding protein with low pI*“)/Smac („*second-mitochondria derived activator of caspases*“) antagonisiert werden (Du et al., 2000; Hengartner, 2000; Salvesen und Duckett, 2002; Verhagen et al., 2000).

1.4 Das Fas-/Fas-Ligand-System

1.4.1 Fas

Fas (APO-1, CD 95) ist ein klassisches Typ I transmembranöses Protein. Aufgrund signifikanter Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen wird Fas der Familie der Tumornekrosefaktorrezeptoren zugeordnet (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Suda et al., 1993). Itoh et al. konnten zeigen, dass das reife Fas-Protein ein Molekulargewicht von 36 kDa besitzt und aus 319 Aminosäuren besteht. Fas umfasst eine extrazelluläre, eine transmembrane sowie eine zytoplasmatische Domäne. Im Bereich der N-terminalen Region befindet sich eine Signalsequenz. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 157 Aminosäuren und kann weiter in drei zysteinreiche Untergruppen eingeteilt werden. Die transmembrane Domäne besteht aus 17 und die zytoplasmatische aus 145 Aminosäuren (Itoh et al., 1991; Itoh und Nagata, 1993).

Fas wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, einschließlich aktivierter B- und T-Zellen, Leber, Herz, Thymus und Nieren (Itoh und Nagata, 1993; Nagata, 1997; Watanabe-Fukunaga et al., 1992b).

1.4.2 Fas-Ligand

1.4.2.1 *Der membranständige Fas-Ligand*

Strukturelle Analysen haben gezeigt, dass der Fas-Ligand (FasL) ebenfalls zur Tumornekrosefaktorfamilie gehört (Nagata, 1997; Suda et al., 1993). Das Molekulargewicht von FasL beträgt 40 kDa (Nagata und Golstein, 1995; Tanaka et al., 1995). FasL besitzt keine Signalsequenz im Bereich des NH₂-Terminus, jedoch einen Bereich hydrophober Aminosäuren in der Molekülmitte, was darauf hinweist, dass FasL ein Typ II transmembranöses Protein ist (Nagata und Golstein, 1995; Suda et al., 1993).

FasL wird auf aktivierten T-Zellen sowie auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert (Arase et al., 1995; Rouvier et al., 1993). Außerdem wurde eine konstitutive Expressierung in den Sertoli Zellen des Hodens und im Auge beschrieben (Bellgrau et al., 1995; Griffith et al., 1995).

1.4.2.2 *Der lösliche Fas-Ligand*

Die lösliche Form des menschlichen Fas-Liganden (sFasL) ist ein 26 kDa großes Glykoprotein, das aus der extrazellulären Region des Fas-Liganden besteht (Tanaka et al., 1996). Tanaka et al. konnten zeigen, dass Inhibitoren der Metalloprotease die Spaltung von FasL verhindern können. Dies untermauert die Annahme, dass sFasL mittels proteolytischer Spaltung des FasL durch eine Metalloprotease generiert wird (Tanaka et al., 1996). Bereits 1995 konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass die lösliche Form des Fas-Liganden aktiv ist und bei Fas-exprimierenden Zellen durch Bindung und Aktivierung des Fas-Rezeptors eine Zytolyse hervorrufen kann (Tanaka et al., 1995). Sowohl Tanaka als auch Suda beobachteten, dass sich FasL und sFasL hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität unterscheiden. Suda et al. beschrieben, dass FasL sowohl frisch isolierte als auch in vitro aktivierte periphere T-Zellen töten kann, wohingegen sFasL nur letztere tötet. Weiterhin beschrieben sie in dieser Studie, dass die Zelltötung durch FasL von sFasL kompetitiv gehemmt wird. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass durch die Spaltung des membranständigen FasL zumindest eine partielle Herabregulierung seiner Aktivität erfolgt (Suda et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse zeigt auch eine Studie von Tanaka et al.. Sie beobachteten, dass humane Jurkat-Zellen und primäre Maushepatozyten, die niedrige Fas-Level exprimieren, effizient durch FasL getötet werden, jedoch resistent gegenüber sFasL sind. Auch hier wurde eine Hemmung der Zytotoxizität von FasL durch sFasL beschrieben und man kam zu der Schlussfolgerung, dass membrangebundener

FasL die funktionelle Form ist und die Spaltung von FasL dazu dient, seine Aktivität zu vermindern (Tanaka et al., 1998).

1.4.3 Bedeutung des Fas-/Fas-Ligand-Systems

Verschiedene Studien unterstreichen die Bedeutung des Fas-/FasL-Systems bei der Aufrechterhaltung der B- und T-Zell-Homöostase, bei der negativen Selektion von Lymphozyten und bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz zur Prävention von Autoimmunreaktionen (Fukuyama et al., 2002; Hao et al., 2008; Mabrouk et al., 2008; Rathmell et al., 1995; Stranges et al., 2007).

In grundlegenden Arbeiten im Tiermodell wurden Mäuse beschrieben, die phänotypisch durch Lymphadenopathie und Splenomegalie auffallen, verursacht durch eine Akkumulation von nichtmalignen CD4⁺CD8⁻-T-Zellen (Nagata, 1997). Zwei ursächliche Mutationen wurden beschrieben. Zum einen handelt es sich um die Lymphoproliferations-Mutation (*lpr*, „*lymphoproliferative*“), zum anderen um die *gld* (generalisierte lymphoproliferative Erkrankung, „*generalized lymphoproliferative disease*“)-Mutation (Cohen und Eisenberg, 1991; Roths et al., 1984). Bei den *lpr*- und *gld*-Mutationen handelt es sich um Mutationen in dem für Fas bzw. für FasL kodierenden Gen (Takahashi et al., 1994; Watanabe-Fukunaga et al., 1992a). Mutationen des Fas-Gens wurden auch beim Menschen im Zusammenhang mit dem autoimmunlymphoproliferativen Syndrom (ALPS, „Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome“) beobachtet. Der Phänotyp der ALPS-Patienten ähnelt dem der *lpr*- und *gld*-Mäuse. Die Patienten fallen durch Splenomegalie, Lymphadenopathie, Hypergammaglobulinämie, Autoimmunphänome, B-Zelllymphozytose und einer ungewöhnlichen CD4⁺CD8⁻-T-Zellpopulation auf (Rieux-Laucat et al., 1995; Sneller et al., 1997). Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass die Apoptose aktivierter Lymphozyten ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase und der Selbsttoleranz ist (Sneller et al., 1997).

Manche Organe bzw. Gewebe scheinen einen Mechanismus zu besitzen, der sie gegenüber gefährlichen oder ungewollten Ereignissen schützt (Nagata, 1997). Da diese Gewebe (z. B. Augen und Hoden) scheinbar von immunologischen Reaktionen ausgenommen sind, werden sie als „immunologisch privilegiert“ bezeichnet (Green und Ferguson, 2001). Auch hierbei ist das Fas-/FasL-System beteiligt. Bellgrau et al. konnten zeigen, dass die Expression eines

funktionellen FasL durch Sertoli-Zellen zur immunologischen Privilegiertheit des Hodens beiträgt (Bellgrau et al., 1995). Fas-FasL-abhängige Apoptose, die einen Gewebeschaden verhinderte, wurde weiterhin während einer viralen Infektion in das Auge einwandernden Entzündungszellen beobachtet (Griffith et al., 1995). Die konstitutive Expression von FasL auf Hornhauttransplantaten scheint zum Erfolg der Transplantationen beizutragen (Stuart et al., 1997).

Fas-/FasL-vermittelte Apoptose wird mit der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen sowie entzündlicher Erkrankungen in Verbindung gebracht. Hierzu zählen u. a. Autoimmundiabetes, Myokarditis, Hepatitis und Gastritis (Chervonsky et al., 1997; Galle et al., 1995; Ishiyama et al., 1998; Itoh et al., 1997; Kondo et al., 1997; Rudi et al., 1998; Su et al., 2000).

1.4.3.1 Die Bedeutung des Fas-/FasL-Systems in der Sepsis

Die Bedeutung des Fas-/FasL-Systems in Zusammenhang mit der Sepsis wird durch verschiedene tierexperimentelle Studien verdeutlicht.

Chung et al. beobachteten im Mausmodell einen signifikanten Überlebensvorteil für Mäuse, die zwölf Stunden nach Sepsisinduktion mittels Caecumligation und Punction (CLP) eine Infusion mit dem Fas-Fusionsprotein (FasFP, „*Fas receptor fusion protein*“) erhielten, welches eine Blockade des Fas-/FasL-Signalwegs verursacht (Chung et al., 2003). Zusätzlich führt eine Blockade des Fas-/FasL-Signalwegs durch FasFP bei septischen Mäusen zu einer Wiederherstellung der kardialen Auswurfleistung sowie des hepatischen und des intestinalen Blutflusses. Weiterhin wird sowohl eine verminderte Leberschädigung als auch eine unterdrückte Il-10-Produktion beschrieben (Chung et al., 2001). Wesche-Soldato et al. konnten zeigen, dass die Gabe von Fas- und Kaspase-8-siRNA (kleine interferierende RNA, „*small interfering RNA*“) das Überleben septischer Mäuse signifikant verbessert (Wesche-Soldato et al., 2005a).

1.5 Genetik

1.5.1 Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) – Definition und Bedeutung

Unterschiede einzelner DNA-Basen, sogenannte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP, „*Single nucleotide polymorphism*“), machen ungefähr 90 % der humanen Sequenzvarianten aus (Collins

et al., 1998). SNPs sind einzelne Basenpaarpositionen in der genomischen DNA, für die unterschiedliche Sequenzen (Allele) innerhalb von Individuen einer Bevölkerung existieren, wobei das seltenste Allel mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auftritt (Brookes, 1999). SNPs werden mit einer durchschnittlichen Frequenz von ungefähr 1/1.000 im menschlichen Genom beobachtet (Brookes, 1999; Sachidanandam et al., 2001). Die Mehrzahl der SNPs befindet sich in den nichtkodierenden und nur ein kleiner Teil in den kodierenden Regionen des Genoms (Collins et al., 1998; Kim und Misra, 2007). SNPs in nichtkodierenden Regionen können als Marker z. B. im Rahmen vergleichender Studien dienen, wohingegen sie in regulatorischen Regionen auch Transkriptionsraten beeinflussen können. In kodierenden Regionen können SNPs Veränderungen der Proteinstruktur verändern und somit auch die Funktion des Proteins beeinflussen (Kim und Misra, 2007). SNPs haben z. B. im Rahmen von Untersuchungen multifaktorieller Erkrankungen oder von Genkartierungen, u. a. aufgrund ihrer höheren Anzahl und Stabilität gegenüber traditionellen Markern wie beispielsweise dem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP), an Bedeutung gewonnen (Collins et al., 1998; Lin und Albertson, 2004).

1.5.2 Bedeutung der Genetik in der Sepsis

In Zusammenhang mit der Pathogenese der Sepsis werden vermehrt auch genetische Faktoren diskutiert. Dies spiegelt sich u. a. im PIRO-Konzept wieder. So existieren Hinweise auf eine genetische Prädisposition für die Entwicklung und den Verlauf einer schweren Sepsis sowie für die Inzidenz und das Überleben des akuten Lungenversagens (ARDS, „*adult respiratory distress syndrome*“, Schocklunge) (Majetschak et al., 1999; Marshall et al., 2002; Stüber et al., 1996). Sowohl pro- als auch antiinflammatorische Immunantworten tragen im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion und der Sepsis zum Outcome der Patienten bei. Daher sind Gene, die für Proteine kodieren, welche in die Vermittlung von Entzündungsprozessen involviert sind, Kandidatengene, welche den genetischen Hintergrund bestimmen, der für interindividuellen Unterschiede in Hinblick auf infektionsbedingte Entzündungsreaktionen verantwortlich ist (Stüber et al., 2005). Genetische Varianten der Entzündungsmediatoren können demnach die Empfänglichkeit für eine schwere Sepsis, ihren Verlauf und das Überleben beeinflussen. Positive Assoziationen mit der Inzidenz und dem Verlauf der Sepsis konnten für Entzündungsmediatoren wie beispielsweise TNF, Il-6 oder MIF gezeigt werden (Lehmann et al., 2009; Majetschak et al., 1999; Stüber et al., 1996). Erste Untersuchungen bezüglich einer genetischen Prädisposition für individuelle Entzündungsantworten existieren ebenfalls in Hinblick auf Patienten, die sich

kardiochirurgischen Eingriffen unterziehen mussten (Schroeder et al., 2003). Auch für Moleküle der Signaltransduktion bei einer Entzündungsreaktion über Toll-like Rezeptoren (TLR), liegen positive Befunde von Assoziationsstudien vor (Lorenz et al., 2002). Obwohl zahlreiche Arbeiten zum Zusammenhang von verschiedenen genomischen Polymorphismen und dem Schweregrad einer Sepsis oder dem Outcome vorliegen, fehlen bislang Untersuchungen, die den Zusammenhang von Kandidatengen auf die Apoptose von Lymphozyten bei Patienten mit schwerer Sepsis analysieren (Lin und Albertson, 2004).

Die Bedeutung der Aufklärung der Signalwege und der genetischer Grundlagen liegen nicht nur in der Erweiterung des Verständnisses der Immunpathogenese der Sepsis, sondern vielmehr in der möglichen Identifikation von Risikokollektiven. Eine solche Identifikation sollte in der Zukunft letztendlich eine Individualisierung der Therapie ermöglichen. So wäre vorstellbar, dass anhand von genetischen Mustern Patienten erkannt werden, die ein hohes Risiko der Entwicklung einer Sepsis haben und ggf. von einer frühzeitigeren antibiotischen Therapie profitieren könnten. Möglicherweise könnte es so auch gelingen, genetische Merkmale mit einem Vorhersagewert für die Prädisposition einer schweren Sepsis zu versehen.

1.5.3 Genetik des Fas-/FasL-Systems

1.5.3.1 Das Fas-Gen

Das für den humanen Fas-Rezeptor kodierende Gen wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 10q23 lokalisiert (Behrmann et al., 1994; Cheng et al., 1995). Das Fas-Gen besteht aus neun Exons, die durch acht Introns getrennt werden (Behrmann et al., 1994). Das Gen umspannt mehr als 26 kb DNA (Cheng et al., 1995).

Exon 1 umfasst den 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) sowie die für die ersten zehn Aminosäuren der vermeintlichen Signalsequenz kodierende DNA. Der aus drei zysteinreichen Subdomänen bestehende Teil des Fas-Rezeptors wird durch die Exons 2 bis 5 kodiert. Exon 6 kodiert für die transmembrane Region, wohingegen die 36 membrannahen, zytoplasmatischen Aminosäuren durch Exon 7 und Exon 8 kodiert werden. Die kodierende Region für die restliche zytoplasmatische Region des Fas-Rezeptors, einschließlich der Todesdomäne und einer möglichen negativ-regulatorischen Region des Proteins, befindet sich auf Exon 9. Hier findet sich weiterhin die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) (siehe Abbildung 3) (Behrmann et al., 1994; Cheng et al., 1995).

Die Größe der Exons reicht von 25 bp (Exon 8) bis zu mehr als 1439 bp (Exon 9). Das kleinste Intron (Intron V) besteht aus 152 bp, wohingegen das größte Intron, welches Exon 1 und Exon 2 trennt, ungefähr 12 kb umfasst (Behrmann et al., 1994).

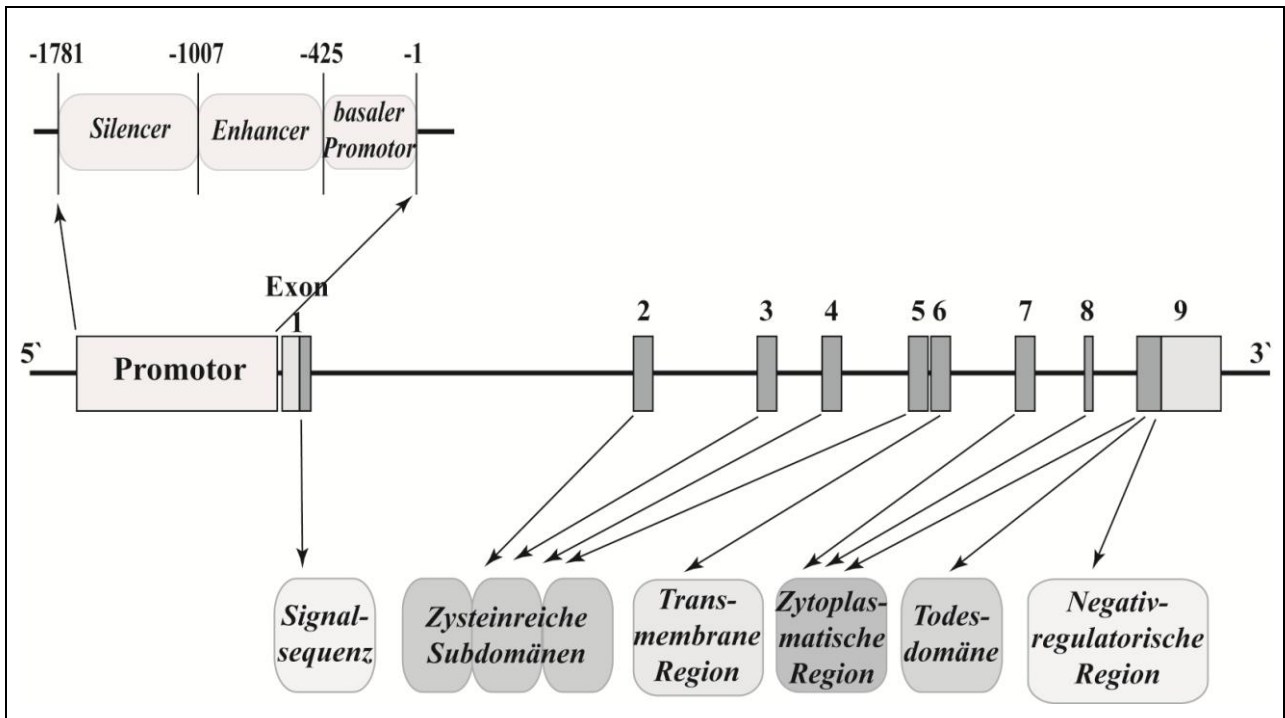


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur des Fas-Gens und der Beziehung zwischen Exons und Struktur des Fas-Rezeptors [modifiziert nach Cheng et al. und Huang et al. (Cheng et al., 1995; Huang et al., 1997)].

Konsensustranskriptionssequenzen wie beispielsweise TATA oder CCAAT in angemessener Entfernung zu den Transkriptionsstartpunkten fehlen, jedoch finden sich stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte sehr GC-reiche Regionen (Behrmann et al., 1994; Cheng et al., 1995). Der hohe GC-Gehalt und das Fehlen einer TATA-Box, zusammen mit dem Vorhandensein verschiedener Transkriptionsstartpunkte sind Charakteristika, die die 5'-flankierende Region des Fas-Gens mit Promotoren anderer in die Wachstumskontrolle involvierter Gene sowie mit denen sogenannter Haushaltsgene teilt (Behrmann et al., 1994). In der Promotorregion wurden Konsensussequenzen verschiedener Transkriptionsfaktorbindungsstellen beschrieben. Hierzu zählen Bindungsstellen für beispielsweise NF- κ B, GAF, AP-1 oder c-myb (Behrmann et al., 1994; Cheng et al., 1995).

Innerhalb von 1,8 kb der 5'-flankierenden Region des Fas-Gens finden sich Silencer- und Enhanceraktivitäten (siehe Abbildung 3). Silencer und Enhancer befinden sich aneinander

angrenzend, ungefähr 600 bp stromaufwärts des am distalsten gelegenen Transkriptionsstartpunkts (an Position -392) (Rudert et al., 1995; Rudert et al., 1998).

1.5.3.2 Promotorpolymorphismen im Bereich des Fas-Gens

Im Bereich der Promotoren findet die Regulation der Gentranskription statt, weshalb Variationen in diesem Bereich von besonderem Interesse sind. Promotoren enthalten sogenannte cis-aktive Elemente. Das sind kurze Sequenzmotive, die spezifisch für die Bindung von DNA-bindenden Proteinen, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, sind. Variationen in diesen Sequenzen können zu einer veränderten Bindung der Transkriptionsfaktoren führen, welches eine verminderte oder erhöhte Gentranskription zur Folge haben kann (Stüber et al., 2005).

Bereits 1997 wurden von Huang et al. zwei Polymorphismen in der Promotorregion des humanen Fas-Gens beschrieben. Hierbei handelt es sich zum einen um einen MvaI-RFLP im Bereich der Enhancerregion, zum anderen um einen Polymorphismus im Bereich der Silencer Region. Im Bereich der Silencerregion zeigt sich ein Bandenshift, der das Resultat einer CG → CA Substitution an Position Fas -1377 ist. Durch diese Substitution entsteht weder eine neue Restriktionsenzymbindungsstelle, noch geht hierdurch eine solche verloren. Allerdings befindet sich an dieser Stelle die Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors SP-1 (CACGCC) und könnte daher dessen Bindung beeinflussen. Der zweite Polymorphismus ist an Position Fas -670 im Enhancerbereich lokalisiert. An dieser Stelle zeigt sich eine GA → GG Substitution, die eine MvaI-Restriktionsstelle bildet. Dieser Polymorphismus tritt im Bereich der Konsensussequenz des nukleären Transkriptionselement GAS auf und könnte daher einen Einfluss auf die Expression des Fas-Gens haben (Huang et al., 1997).

1.5.3.3 Bedeutung der Fas-Promotorpolymorphismen -670 und -1377

Assoziationsstudien existieren bereits in Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen den Fas-Promotorpolymorphismen -670 und -1377 bei Autoimmun- oder Tumorerkrankungen.

Van Veen et al. konnten in einer Studie mit 382 Patienten mit Multipler Sklerose zeigen, dass das G-Allel des Fas -670 Polymorphismus signifikant seltener bei Patienten als in der Kontrollgruppe auftritt. Sie folgerten aus dieser Beobachtung, dass dieser Genotyp das Risiko vermindert, eine Multiple Sklerose zu entwickeln (van Veen et al., 2002). Kanemitsu et al. beobachteten in einer Studie mit 109 Patienten mit systemischen Lupus erythematodes (SLE) eine signifikant höhere

Frequenz des A-Allels an Position -670 in der Patienten- als in den Kontrollgruppe (Kanemitsu et al., 2002). Eine Assoziation zwischen dem Fas-Polymorphismus -670 wird auch für die Karzinogenese von Zervixtumoren beschrieben (Lai et al., 2003). Heterozygote (GA) und homozygote Varianten (AA) des Promotorpolymorphismus an Position Fas -1377 waren in einer Studie an 471 Patienten mit einem signifikant erhöhten Risiko für das Auftreten einer akuten myeloischen Leukämie (AML) assoziiert (Sibley et al., 2003). Marin et al. untersuchten den Effekt von Fas- und FasL-Polymorphismen auf das Outcome von Lebertransplantaten bei 151 Patienten. Patienten, die an Position -670 den Genotyp AA aufwiesen, zeigten eine signifikant geringere Transplantatüberlebensrate als Patienten mit dem GA Genotyp (Marin et al., 2006).

Es existieren eine Reihe weitere Studien, die z. T. positive aber auch negative Assoziationen mit o. g. Polymorphismen beschreiben. Studien, die eine Assoziation zwischen den Fas-Promotorpolymorphismen -670 und -1377 und dem Auftreten oder dem Schweregrad einer Sepsis untersuchen, existieren bislang nicht.

1.6 Fragestellung

Inwieweit Polymorphismen in der Promotorregion des Fas-/FasL-Systems zur Pathogenese der Sepsis beitragen, ist bislang nicht untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen den SNPs Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A in der Promotorregion des Fas-Gens und dem Auftreten einer schweren Sepsis?
2. Haben die SNPs Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A einen Einfluss auf das Outcome der an einer schweren Sepsis erkrankten Patienten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv und Einschlusskriterien

Die Untersuchungen wurden entsprechend den Grundlagen der revidierten Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki (2000) durchgeführt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität geprüft und genehmigt. Die genetischen Analysen erfolgten nach Zustimmung der Patienten bzw. Probanden, dem gesetzlichen Vertreter oder nächstem Angehörigen und wurden pseudonymisiert durchgeführt.

2.1.1.1 Kollektiv der septischen Patienten

In die Genotypisierungsstudie an einem Kollektiv septischer Patienten wurden initial 159 Patienten, die auf einer operativen Intensivstation behandelt wurden, eingeschlossen. Hierbei handelte es sich um Patienten aus unterschiedlichen operativen Fachgebieten mit unterschiedlicher Krankheitsgenese. Die eingeschlossenen Patienten erfüllten alle die Kriterien der schweren Sepsis entsprechend der ACCP/SCCM Consensus Conference von 1991 (Bone et al., 1992). Als Parameter zur Einschätzung der Erkrankungsschwere dienten die SAPS II-Werte bei Studieneinschluss. Als Parameter des Ausmaßes der inflammatorischen Reaktion, diente das Procalcitonin aus dem Routinelabor zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses.

2.1.1.2 Kontrollkollektiv

Als Kontrollgruppe dienten 139 freiwillige kaukasische, gesunde Blutspender. Diese entsprachen den allgemeinen Voraussetzungen für Blutspender. Hierzu zählt, dass Blutspender zum Zeitpunkt der Blutspende gesund sein müssen und dass Erkrankungen zeitweise oder auch generell von der Blutspende ausschließen.

2.1.1.3 Kollektiv der kritisch kranken Patienten ohne Sepsis (SIRS-Patienten)

Als zusätzliches Kontrollkollektiv dienten 88 kardiochirurgische Patienten, bei denen aufgrund einer Koronaren Herzerkrankung (KHK) eine Bypass-Operation durchgeführt werden musste. Diese erfolgte bei einem Teil der Patienten mit und bei dem anderen Teil der Patienten ohne Unterstützung der HLM. Nach der Operation wurde bei den Patienten das Auftreten eines SIRS

entsprechend der Definitionen der ACCP/SCCM Consensus Conference von 1991 (Bone et al., 1992) beobachtet. Vor Operationsbeginn wurde den Patienten routinemäßig Blut abgenommen. In dieser Blutabnahme erfolgte die Bestimmung des PCTs aus dem Standardlabor vor OP-Beginn. Weiterhin wurde in diesem Kollektiv das nach der Operation maximal gemessene PCT aus dem Standardlabor bestimmt. Auf der Intensivstation erfolgte die Bestimmung des SAPS II-Scores bei Aufnahme.

Dieses Kollektiv umfasst eine Gruppe kritisch kranker Patienten ohne Sepsis und wird im Folgenden als „SIRS-Kollektiv“ bezeichnet.

2.1.2 Kleingeräte und Materialien

Produkt	Hersteller
Eppendorf Gefäß, 1,5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg (Deutschland)
Reaktionsgefäßständer, Tube-Rack	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg (Deutschland)
Pipettenspitzen (Filter Tipps, steril)	Axygen, Union City (USA)
PCR Gefäß, 0,2 ml, farblos	Roche, Mannheim (Deutschland)
Light Cycler [®] Capillaries	Roche, Mannheim (Deutschland)
PCR Tubes, 0,2 ml	Biozym, Oldendorf (Deutschland)
Reaktionsgefäße, 1,5 ml, steril	Biozym, Oldendorf (Deutschland)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
24 Well Plate	Nunc, Langenselbold, (Deutschland)
EDTA Monovetten, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)

2.1.3 Technische Geräte

Produkt	Hersteller
Laborfuge 400 g	Kendro Laboratory Products, Osterode (Deutschland)
Zentrifuge	Kendro Laboratory Products, Osterode (Deutschland)
MS2 Minishaker	IKA, Staufen (Deutschland)

Gefrierschrank, Comfort no-frost	Liebherr, Ochsenhausen (Deutschland)
Eismaschine, AF 10	Scotsman, Vernon Hills (USA)
LightCycler [®] 1.5	Roche, Mannheim (Deutschland)
LightCycler [®] Software 3.5	Roche, Mannheim (Deutschland)
LightCycler [®] Carousel Centrifuge	Roche, Mannheim (Deutschland)
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg (Deutschland)
Thermomixer Compact	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg (Deutschland)
Gene Amp PCR_SYSTEM 2400	Perkin Elmer, Connecticut (USA)
Gelkammer	Bio-Rad, München (Deutschland)
Gel-Auswertung: Gel Doc 1000	Bio-Rad, München (Deutschland)
Software 1.14 Molecular Analysis	Bio-Rad, München (Deutschland)
Transilluminator 2020E	Stratagene, Waldbronn (Deutschland)
Polaroidkamera CU5	Desaga, Heidelberg (Deutschland)
Mikrowelle	Siemens, München (Deutschland)
Analysewaage BP 3105	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Spannungsquelle Power Pac 200 und 3000	Bio-Rad, München (Deutschland)
Laborfuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland)
Heraeus Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland)
Mikroplate Reader Modell 550	Bio-Rad, München (Deutschland)

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Agarose, Agarose DNA	Biozym, Oldendorf (Deutschland)
Tris-Borsäure-EDTA Puffer	Sigma, München (Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma, München (Deutschland))
Bromphenol Blau	Sigma, München (Deutschland))
Xylene Cyanol FF	Sigma, München (Deutschland)

15 % Ficoll Typ 400	Pharmacia Biotech, Freiburg (Deutschland)
Marker: Gene Ruler 50 bp und 100 bp	Fermentas MBI , St. Leon-Rot (Deutschland)
Puregene DNA-Isolation Kit (Blood Kit)	Biozym, Oldendorf (Deutschland)
Ethanol 70 %	Merck Darmstadt (Deutschland)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (Darmstadt)
Kit: LightCycler DNA Master Hybridization Probes	Roche, Mannheim (Deutschland)
Primer	TIB Molbiol, Berlin (Deutschland)
Sonden	TIB Molbiol, Berlin (Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Puregene DNA-Isolation-Kits der Firma Biozym aus Ethylendiamintetraacetat-(EDTA-)Vollblut.

Die DNA-Isolierung umfasst mehrere Schritte:

1. Lyse der Erythrozyten
2. Lyse der kernhaltigen Zellen
3. RNase-Behandlung
4. Protein-Präzipitation
5. DNA-Präzipitation
6. DNA-Lagerung

Zunächst wurden 300 µl des EDTA-Vollbluts zu 900 µl der Erythrozyten-Lyse-Lösung („*RBC Lysis Solution*“) in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Danach erfolgten eine Inversion des Eppendorf-Röhrchens sowie eine zehnmütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Während der Inkubation wurde ein weiteres Mal invertiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 20 Sekunden (s) bei 12.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert. Das entstandene Leukozytenpellet wurde fünf Sekunden gevortext (schnelles Durchmischen zur besseren Lösung). Danach wurden 300 µl der Zell-Lyse-Lösung („*Cell Lysis Solution*“) hinzugegeben und das Pellet resuspendiert. Daraufhin wurden 1,5 µl der

RNAse A Solution zupipettiert. Nach Inversion (25 x) erfolgte eine erneute 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden 100 µl der Protein-Präzipitations-Lösung („*Protein Precipitation Solution*“) hinzugefügt, 20 s lang gevortext und für drei Minuten (min) bei 12.000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein zweites Eppendorf-Röhrchen übertragen, welches bereits mit 300 µl Isopropanol gefüllt war. Es erfolgte eine mehrfache Inversion bis der DNA-Strang als weißliches Präzipitat sichtbar wurde. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation bei 12.000 U/min wurde der Überstand unter Beachtung des weißen DNA-Pellets dekantiert. Die Reste des Isopropanols wurden über einem sauberen Saugtuch entfernt. Anschließend wurden 300 µl Ethanol 70 % hinzugefügt, invertiert und eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder dekantiert und das verbliebene Ethanol über einem Saugtuch entfernt. Das entstandene Pellet wurde anschließend für 15 min luftgetrocknet. Abschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Hydratations-Lösung („*Hydration Solution*“) und eine Inkubation bei 65°C auf dem Thermomixer für 30 min. Die isolierte DNA wurde bis zur endgültigen Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.2 Echtzeit-PCR mit dem LightCycler®

2.2.2.1 Funktionsprinzip

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion („*Real-Time-PCR*“; „*Polymerase Chain Reaction*“) ermöglicht mit Hilfe sogenannter Hybridisierungssonden die spezifische Detektion von PCR-Produkten und durch die Aufnahme einer Schmelzkurve den Nachweis eines Einzelnukleotidaustauschs.

Die Detektion basiert auf dem sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer („*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“, FRET). Hierbei binden sequenzspezifische, mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide („*Hybridisation Probes*“) in räumlicher Nähe zueinander zwischen den beiden Primern an die Ziel-DNA. Zunächst wird der erste Farbstoff, Fluorescein, angeregt. Dieser emittiert selbst keine Fluoreszenz, sondern dient als Donor („Energieförderer“), welcher seine Energie auf den benachbarten Farbstoff, LC Red 640, überträgt, woraufhin dieser eine rote Fluoreszenz als Lichtsignal emittiert (siehe Abbildung 4). Die Messung erfolgt einmal pro Zyklus der PCR jeweils nach Anlagerung der Primer (sogenannte „*Annealing Phase*“).

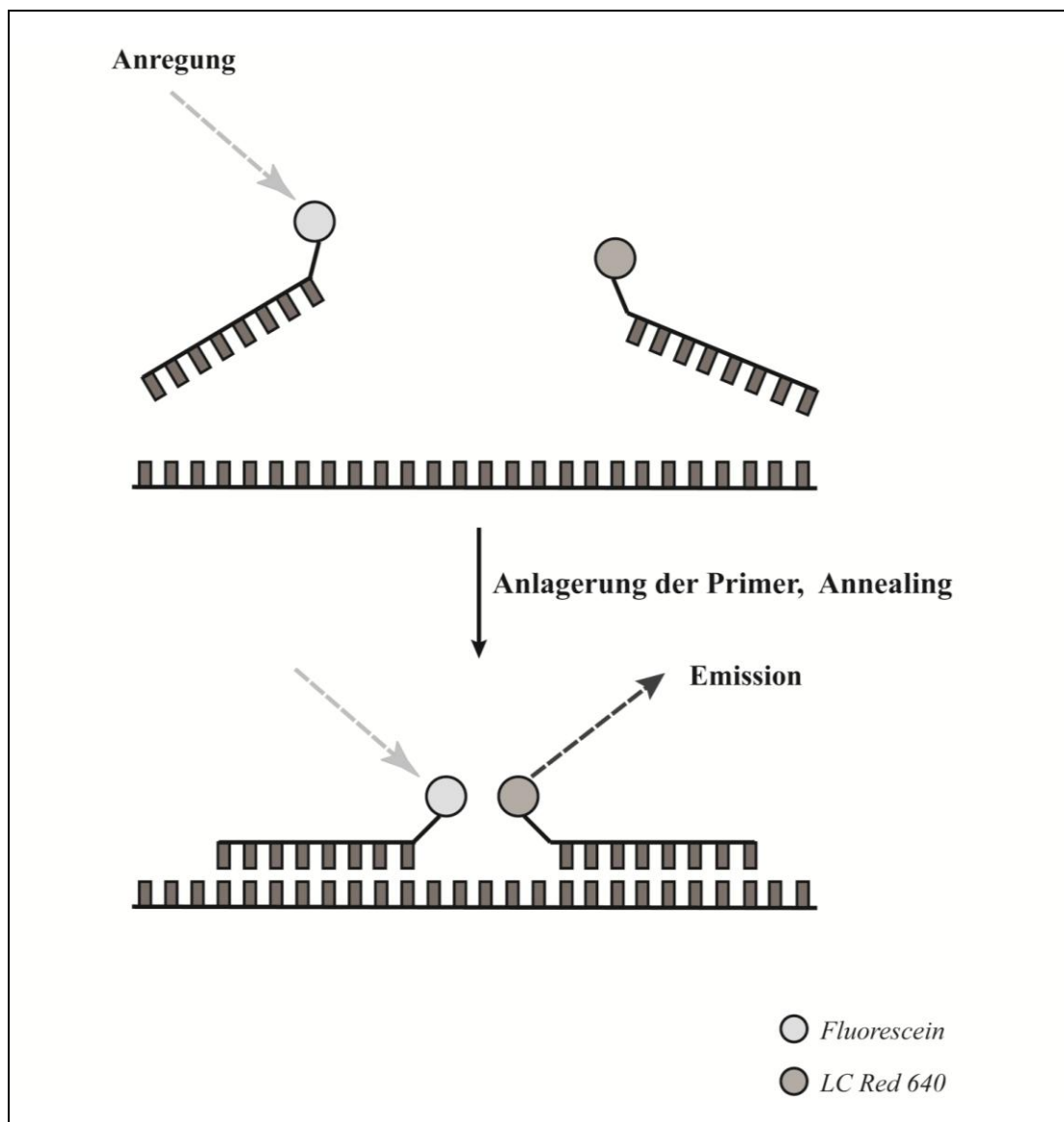


Abbildung 4: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Zwei sequenzspezifische, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide binden in räumlicher Nähe zueinander an die Ziel-DNA. Der erste Farbstoff (Fluorescein) wird angeregt und überträgt seine Energie auf den benachbarten Farbstoff (LC Red 640), woraufhin dieser eine rote Fluoreszenz als Signal emittiert.

Die genotypische Analyse erfolgt durch Schmelzkurvenanalyse der Sensor-Sonde, welche die variable Sequenz überdeckt. Durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung kommt es zu einem Abschmelzen der Sensor-Sonde, wobei ein Fluoreszenzsignal gemessen wird. Jede Änderung der Sequenz unter der Sensor-Sonde führt zu einer Erniedrigung des Schmelzpunkts (siehe Abbildung 5). Der Genotyp wird durch unterschiedliche Schmelzpunkte bestimmt, da mit dem Abschmelzen der Sonde auch das Fluoreszenzsignal stoppt. Eine homozygote Wildtyp-Probe ergibt einen definierten Schmelzpunkt, eine heterozygote Probe zwei Schmelzpunkte und eine

homozygot veränderte mutierte Probe einen einheitlichen Schmelzpunkt bei einer niedrigeren Temperatur.

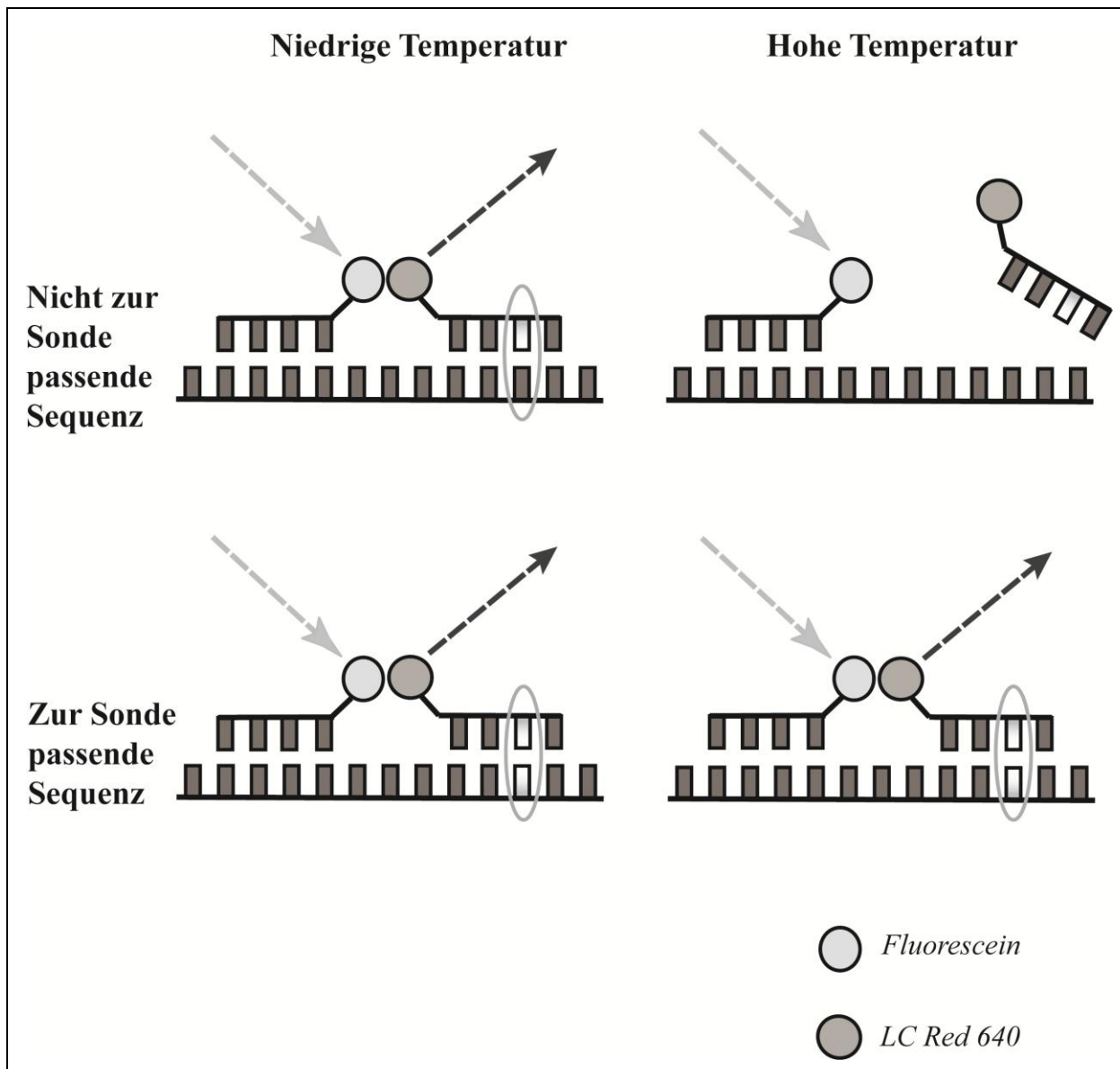


Abbildung 5: Prinzip der Mutationsanalyse mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Durch kontinuierliche Temperaturerhöhung kommt es zu einem Abschmelzen der Sensor-Sonde, wobei ein Fluoreszenzsignal gemessen wird. Jede Änderung der Sequenz unter der Sensor-Sonde führt zu einer Erniedrigung des Schmelzpunkts.

2.2.2.2 Primer und Sonden

Für die Analyse der SNPs an Position Fas -670 und Fas -1377 wurden Hybridisierungssonden und Primer durch die Firma TIB Molbiol konzipiert und kommerziell erworben. Durch TIB

Molbiol wurden mehrere verschiedene Primer- und Sondenpaare zur Verfügung gestellt. In einem ersten Schritt wurden verschiedene Primer- und Sondenkombinationen sowie unterschiedliche Konzentration getestet, um für die geplante Genotypisierung die optimalen Paarungen und Konzentrationen zu finden.

Fas -1377 G/A	
Primer (FAS F)	5`- gATAATACAgAgAATgCCCATATAC
Primer (FAS A)	5`- CCTCCTgAgggCTTTCCA
Sonde (Sensor [A]s)	5` - CAAggCTggCACACCCA - - Fluorescein
Anchor (FAS Anchor)	5`- LC Red670 – gTCTTCCTCATggCACTAACAgTCTACTg - - Phosphatgruppe

Tabelle 2: Endgültige Primerkombination und Hybridisierungs sonden für den SNP an Position Fas -1377 (Sequenzen entsprechend der Genbankeintragsnummer X87625)

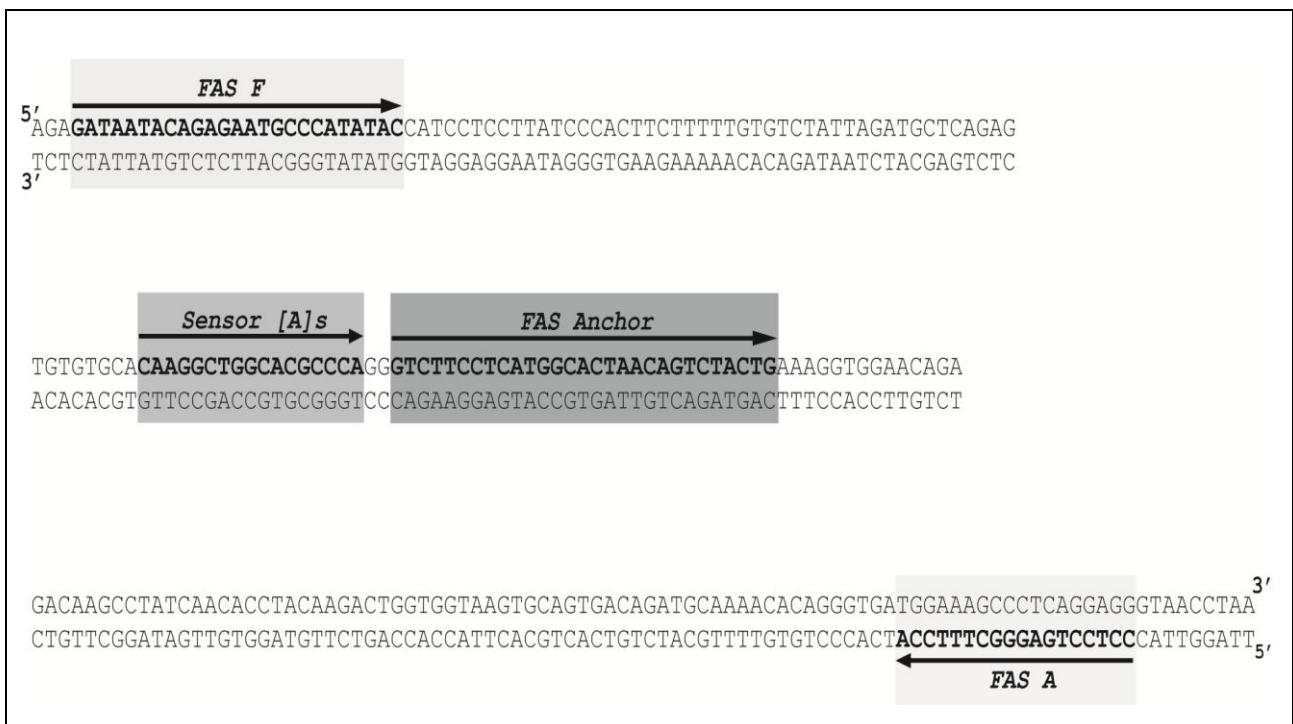


Abbildung 6: Primer- und Sondenlokalisation für den SNP Fas -1377

Fas -670 A/G	
Primer (FAS s)	5` - CTCCCTTTTCAGAgCCCTA
Primer (FAS R)	5` - gTCCATgTTgTggCTgCAA
Sonde (Sensor [A])	5` - LC Red640 – TTCCAgAAACgTCTgTgAgC - - Phosphatgruppe
Anchor (670 Anchor)	5` - CAACATCTgTACTTTTTTCATATggTAACTgTCC - - Fluorescein

Tabelle 3: Endgültige Primerkombination und Hybridisierungs sonden für den SNP an Position Fas -670 (Sequenzen entsprechend Genbankeintragsnummer AY450925)

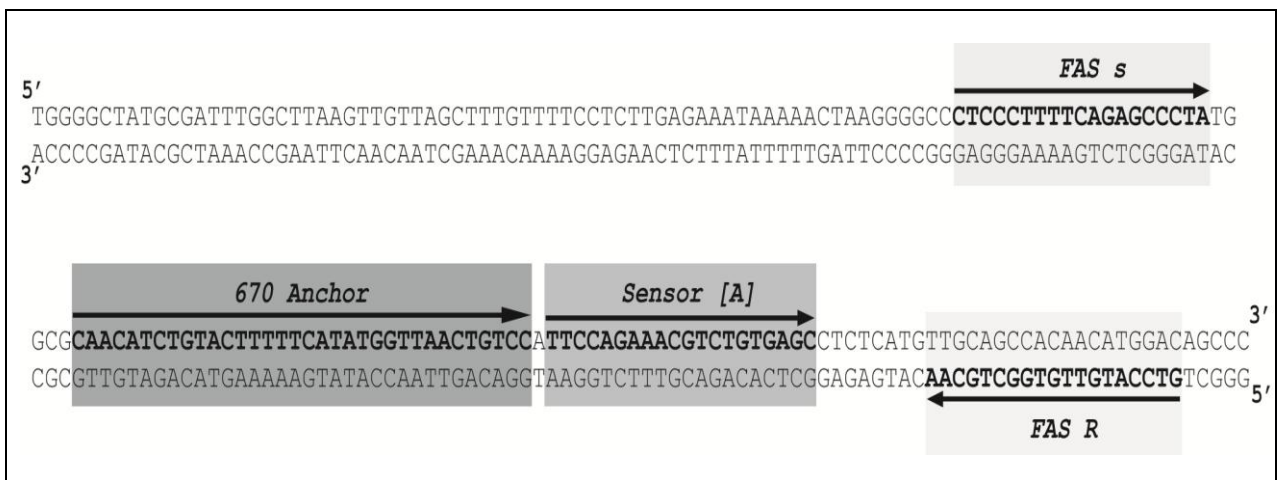


Abbildung 7: Primer- und Sondenlokalisation für den SNP Fas -670

2.2.2.3 Durchführung

Zunächst wurden Sonde und Anchor in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß pipettiert. Daraufhin wurden Aqua destillata (Aqua dest.) sowie Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) hinzugefügt. Nach Zugabe der Primer und des Enzymmixes wurde der so entstandene Mastermix gevortext und kurz zentrifugiert.

Mastermix	μl
Aqua dest.	10,4
MgCl ₂	1,6
Primer forward <i>Für -670: FAS s</i> <i>Für -1377: FAS F</i>	0,5 (10 pmol)
Primer reverse <i>Für -670: FAS R</i> <i>Für -1377: FAS A</i>	0,5 (10 pmol)
Sonde <i>Für -670: Sensor [A]</i> <i>Für -1377: Sensor [A]s</i>	1,5 (3 pmol)
Anchor <i>Für -670: 670 Anchor</i> <i>Für -1377: FAS Anchor</i>	1,5 (3 pmol)
Enzymmix	2
Template	2

Tabelle 4: Reaktionsansatz (Mastermix) pro Kapillare für die Messung mit dem LightCycler®

Es folgte die Vorbereitung der LightCycler®-Kapillaren. In jede Kapillare wurden 18 μl des Mastermixes sowie 2 μl der zu untersuchenden DNA pipettiert und die Kapillaren im Anschluss verschlossen.

Nachdem die Kapillaren im LightCycler®-Karussell positioniert wurden, erfolgte eine Zentrifugation in der LightCycler®-Karussell-Zentrifuge. Hiernach wurde das LightCycler®-Karussell mit den Kapillaren im LightCycler® positioniert und die Messung (Einstellungen siehe Tabellen 5 und 6) durchgeführt.

Jeder Lauf beinhaltete eine Negativkontrolle, die anstelle des DNA-Templates Aqua destillata enthielt. Die komplette Präparation erfolgte auf Eis oder gekühlten Pipettierblöcken.

Programm	Denaturierung der Template-DNA		
Zyklen	1		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
Initiale Denaturierung	95	30	20
Programm	Amplifikation der Ziel-DNA		
Zyklen	35		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
Denaturierung	95	10	20
Annealing	60	10	20
Elongation	72	5	20
Programm	Schmelzkurve		
Zyklen	1		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
Denaturierung	95	20	20
Annealing	40	15	20
Elongation	95	0	0,15
Programm	Kühlphase		
Zyklen	1		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
	40	30	20

Tabelle 5: Einstellungen des LightCycler® zur Bestimmung des SNPs an Position Fas-670

Programm	Denaturierung der Template-DNA		
Zyklen	1		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
Initiale Denaturierung	95	30	20
Programm	Amplifikation der Ziel-DNA		
Zyklen	35		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
Denaturierung	95	10	20
Annealing	55	10	20
Elongation	72	5	20
Programm	Schmelzkurve		
Zyklen	1		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
Denaturierung	95	20	20
Annealing	40	20	20
Elongation	95	0	0,1
Programm	Kühlphase		
Zyklen	1		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Slope/Temp. Transition Time [°C/s]
	40	30	20

Tabelle 6: Einstellungen des LightCycler® zur Bestimmung des SNPs an Position Fas -1377

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Während der Etablierungsphase der Bestimmung der SNPs mit Hilfe des LightCyclers® wurde im Anschluss an die Messung mit dem LightCycler® eine Gelelektrophorese zur Kontrolle der stattgehabten DNA-Amplifizierung durchgeführt.

Nach Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse mittels des LightCyclers® wurden die Kapillaren aus dem Probenkarussell entnommen und mit der Öffnung in beschrifteten Eppendorf-Röhrchen platziert. Es erfolgte eine kurze Zentrifugation, wodurch der Inhalt der Kapillaren in das Eppendorf-Röhrchen überführt wurde. Die Kapillaren wurden hiernach entfernt.

Für jede Probe wurden je 2 µl Beladungspuffer (aus 0,25 % Bromphenol-Blau, 0,25 % Xylenecyanol FF und 15 % Ficoll, Typ 400 in Wasser) vorbereitet. Zu diesem wurden anschließend je 2 µl der entsprechenden Probe zugegeben. Im Rahmen jeder Gelelektrophorese erfolgte ein Ansatz mit 2 µl des Markers Gene Ruler 50 bp bzw. 100 bp anstelle der Probe, welcher als Größenkontrolle für die amplifizierte DNA diente.

Es wurde 1% iges Agarosegel verwendet, welches aus 0,5 g DNA Biozymagaros[®], 50 ml 0,5-fach konzentriertem Tris-Borsäure-EDTA Puffer (TBE Puffer) und 16 µl Ethidiumbromid bestand.

Das Gemisch aus Probe und Beladungspuffer wurde in die Kammern des Agarosegels gefüllt. Danach wurde die gefüllte Agarosekammer an eine Stromquelle mit einer Spannung von 130 Volt (V) angeschlossen. Die Laufzeit betrug 30 min. Anschließend wurden die DNA-Banden mit Hilfe einer UV-Lichtquelle sichtbar gemacht.

2.2.4 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Das Hardy-Weinberg-Gesetz wurde nach seinen Beschreibern, dem britischen Mathematiker Godfrey Herold Hardy und dem deutschen Arzt Wilhelm Weinberg benannt. Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, dass die Genhäufigkeiten und damit die Häufigkeiten der beiden homozygoten Genotypen und des Heterozygoten von Generation zu Generation konstant bleiben (Aichinger und Grimm, 2008; Tariverdian und Buselmaier, 2004). Das Gesetz bezieht sich auf eine sogenannte „ideale Population“. Daher gelten folgende Bedingungen:

- Große Population
- Panmixie
- Keine Selektion oder Mutation
- Keine Migration

Die Bedeutung des Gesetzes liegt darin, dass es die Beziehung zwischen den Häufigkeiten der Allele und denen der Hetero- und Homozygoten formuliert (Tariverdian und Buselmaier, 2004). Mit Hilfe dieses Gesetzes lassen sich Erwartungswerte für Genotyphäufigkeiten errechnen.

Mit folgender Formel kann die Gleichgewichtshäufigkeit der Genotypen ausgedrückt werden:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

wobei p^2 die Häufigkeit des homozygoten Genotyps des dominanten Allels, q^2 die Häufigkeit des homozygoten Genotyps des rezessiven Allels und $2pq$ die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps darstellt.

Genotyp	AA	Aa	aa
Frequenz	p^2	$2pq$	q^2

Tabelle 7: Genotyphäufigkeiten entsprechend des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

2.2.5 Statistik

Die vorliegende Arbeit ist eine genetisch-epidemiologische Assoziationsuntersuchung, die anhand einer Fall-Kontrollstudie vorgenommen wurde. Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit Hilfe der Software von GraphPad Prism 5. Für die Darstellung der Alters- und Geschlechtsverteilung sowie der PCT- und SAPS II-Werte wurde eine deskriptive Statistik verwendet. Der Vergleich der Kollektive hinsichtlich Alter, PCT- und SAPS II-Werten erfolgte durch den Mann-Whitney U-Test. Dieser ist ein Test zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen. Der U-Test ist ein Homogenitätstest zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmungen zweier Verteilungen. Genotyphäufigkeiten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (χ^2 -Test) verglichen. Zur Auswertung der Allelhäufigkeiten wurde Fishers exakter Test verwendet. Dieser ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel. Er ermöglicht die Berechnung exakter p-Werte und ist auch bei kleiner Probengröße zuverlässig anwendbar. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Primer- und Sondenkombinationen

In einem ersten Schritt wurden im Rahmen der Etablierungsphase unterschiedliche Primer- und Sondenkombinationen getestet. Unterschiede bestanden sowohl in der Länge der Primer und Sonden als auch in der Konzentration. Ziel war es, die idealen Paarungen und Konzentrationen für die geplanten Genotypisierungen zu finden.

Es zeigte sich, dass sich für den SNP an Position Fas -670 die Primerkombination FAS s und FAS R und Sondenkombination Sensor [A] und 670 Anchor am besten eigneten. Dementsprechend wurde diese Kombination für die geplanten Untersuchungen verwendet. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Genotypisierung mit Hilfe dieser Primer- und Sondenkombination ist in Abbildung 8 dargestellt.

Für den SNP an Position Fas -1377 zeigten die Primerkombination FAS F und FAS A und die Sondenkombination Sensor [A]s und FAS Anchor die besten Ergebnisse und wurden dementsprechend für die geplanten Untersuchungen verwendet. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Genotypisierung mit Hilfe der Primer- und Sondenkombination ist in Abbildung 9 dargestellt.

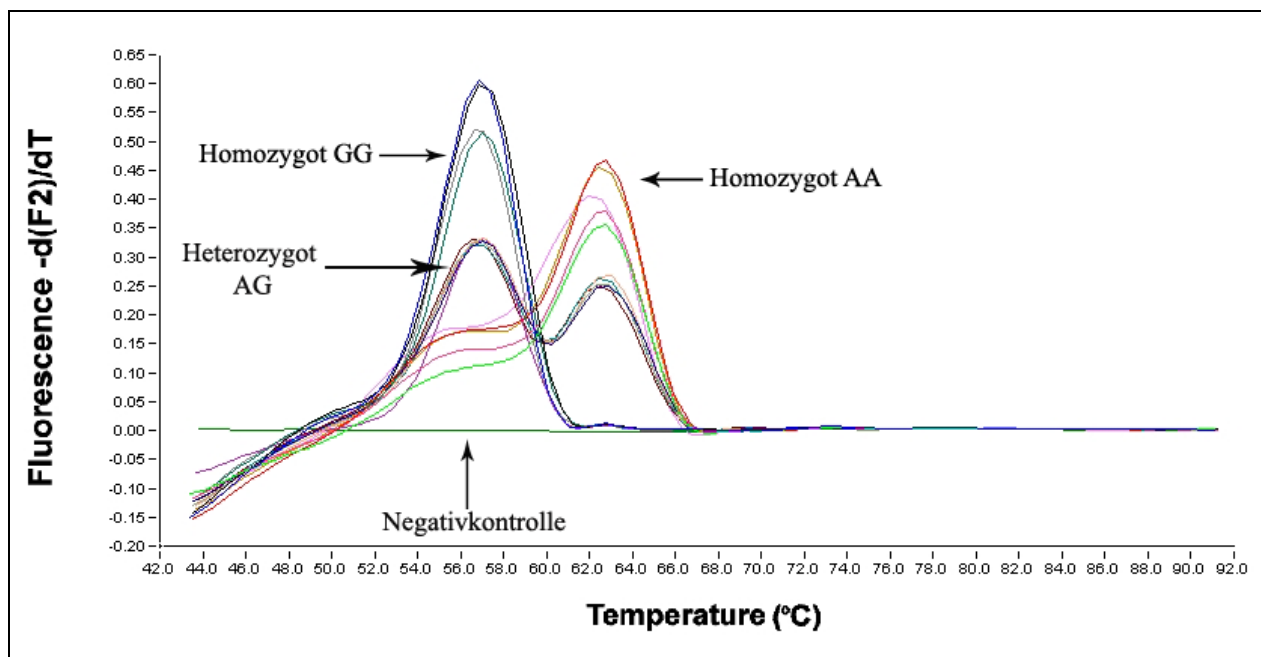


Abbildung 8: Beispiel einer erfolgreichen Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse des SNPs an Position Fas -670

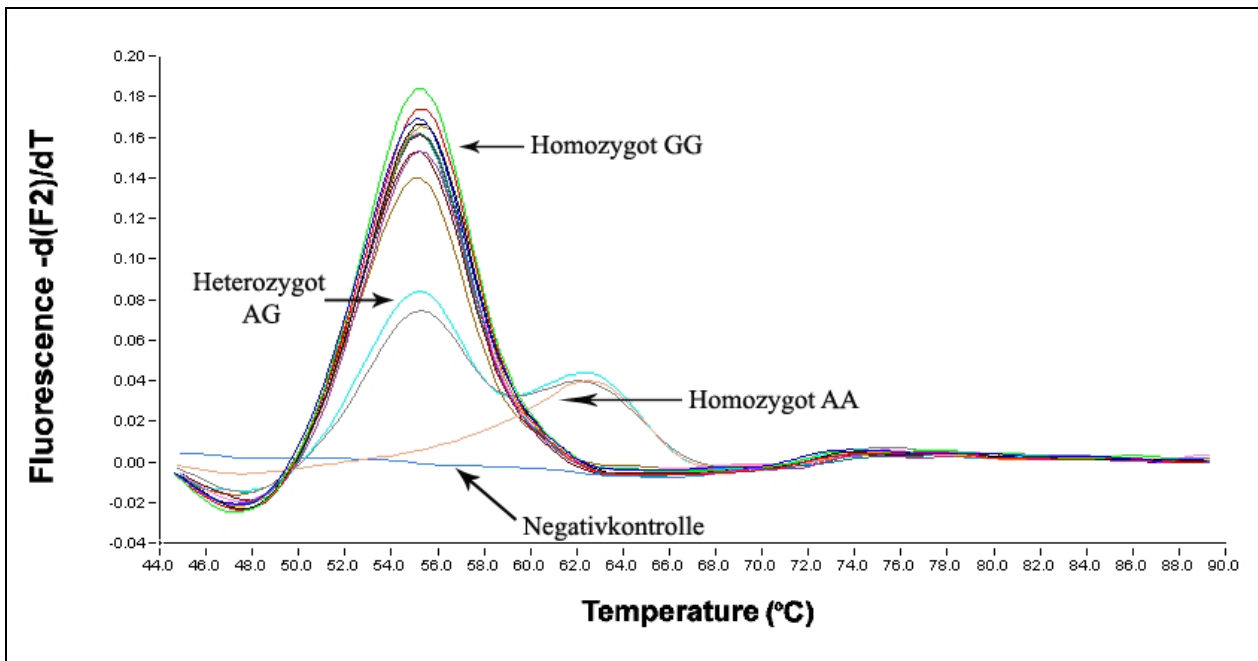


Abbildung 9: Beispiel einer erfolgreichen Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse des SNPs an Position Fas -1377

3.2 Demographie der Patientenkollektive

3.2.1 Sepsiskollektiv

Eine erfolgreiche Genotypisierung des Patientenkollektivs für beide Genotypen war bei 123 der initial eingeschlossenen 159 Patienten möglich. Diese 123 Patienten wurden der weiteren Auswertung zugrunde gelegt.

Die Patienten wurden u. a. aufgrund folgender Krankheitsbilder intensivmedizinisch behandelt: Polytrauma, nekrotisierende Pankreatitis, nekrotisierende Fascitis, Bauchaortenaneurysma, Pneumonie und ARDS.

Für alle untersuchten Kollektive wurden die Mittelwerte des Alters, des PCTs und des SAPS II-Werts bestimmt. Zusätzlich wird im Folgenden die Spanne zwischen minimalem und maximalem Wert in Klammern angegeben.

Die Patienten waren bei Studieneinschluss im Mittel 58 Jahre (18 - 91) alt. Das Sepsiskollektiv umfasste 41 weibliche und 82 männliche Patienten. Der SAPS II-Wert lag bei Studieneinschluss im Mittel bei 54 Punkten (12 – 89). Die zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses gemessenen PCT-Werte aus dem Standardlabor betragen im Mittel 24 ng/ml (0,25 – 386). Im Verlauf der

Sepsis konnte bei 73 Patienten ein Überleben der Erkrankung dokumentiert werden, wohingegen 50 Patienten (40,7%) im Rahmen der Erkrankung verstarben.

	Sepsis	Blutspender	SIRS
Alter (Jahre)	58 (18 – 91)	42 (21 – 60) <i>p < 0,0001</i>	65 (35 – 85) <i>p = 0,0083</i>
Geschlecht			
weiblich	41	51	13
männlich	82	74 <i>p = 0,2389</i>	66 <i>p = 0,0091</i>
SAPS II	54 (12 – 89)	-	16 (7 – 25) <i>p < 0,0001</i>
PCT (ng/ml)			
präoperativ	-	-	0,2 (0,08 – 0,6)
auf ICU	24 (0,25 -386)	-	3 (0 -98) <i>p < 0,0001</i>

Tabelle 8: Übersicht über die Charakteristika der untersuchten Kollektive. Vergleich jeweils gegen die Sepsisgruppe. Signifikante Unterschiede zeigten sich hinsichtlich des Alters ($p < 0,0001$ für die Gruppe der Blutspender und $p = 0,0083$ für die SIRS-Gruppe, Mann-Whitney U-Test), der Geschlechtsverteilung ($p = 0,0091$ für die SIRS-Gruppe, Fishers exakter Test), der Höhe des SAPS II-Scores ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-Test) und des PCTs auf ICU ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-Test).

3.2.2 Kontrollkollektiv der Blutspender

Bei den als Kontrollkollektiv dienenden gesunden Blutspendern war eine erfolgreiche Genotypisierung für beide SNPs bei 125 der ursprünglich 139 eingeschlossenen Probanden möglich. Diese 125 Blutspender wurden der weiteren Auswertung zugrunde gelegt.

Das Alter der Blutspender betrug im Mittel 42 Jahre (21- 60). Es wurden 51 weibliche und 74 männliche Probanden eingeschlossen.

3.2.3 SIRS-Kollektiv

Eine erfolgreiche Genotypisierung der 88 eingeschlossenen kardiochirurgischen Patienten war bei 78 Patienten für den SNP an Position Fas -670 und bei 73 Patienten für den SNP an Position Fas -1377 möglich.

Das Alter der Patienten betrug bei Studieneinschluss im Mittel 65 Jahre (35 – 85). Das Kollektiv umfasste 13 weibliche und 66 männliche Patienten. Vor Anästhesiebeginn erfolgte eine Bestimmung des PCTs. Dieses betrug im Mittel 0,2 ng/ml (0,08 – 0,6). Das im Verlauf der postoperativen Behandlung auf der Intensivstation gemessene maximale PCT betrug 3 ng/ml (0 – 98). Der mittlere SAPS II-Wert in diesem Kollektiv lag bei 16 Punkten (7 – 25).

3.2.4 Vergleich der Kollektive

Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollkollektiv der Blutspender und der Sepsisgruppe zeigte sich hinsichtlich der Altersverteilung. Die Gruppe der Blutspender war mit im Mittel 42 Jahren jünger als die Gruppe der septischen Patienten mit 58 Jahren ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-Test). In Bezug auf die Geschlechtsverteilung ergab sich kein signifikanter Unterschied.

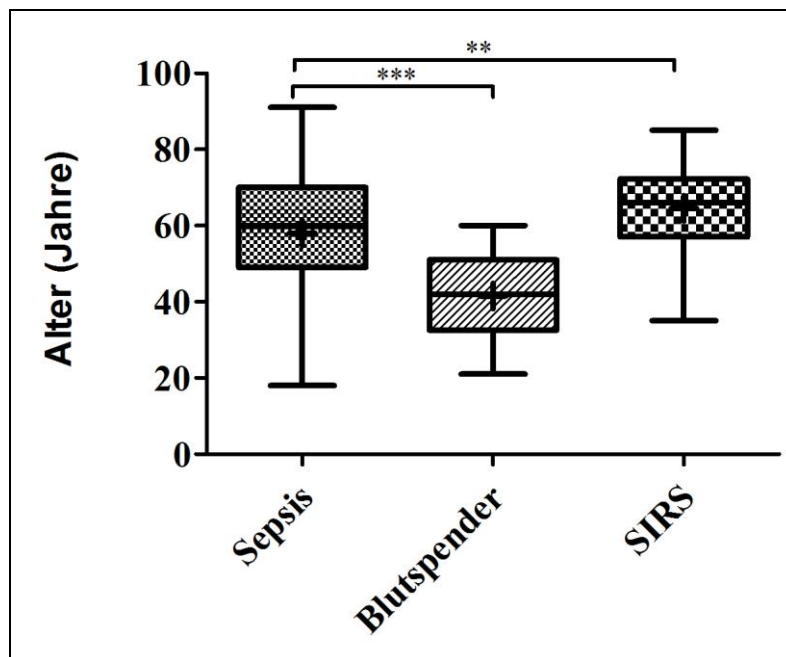


Abbildung 10: Altersverteilung der Kollektive. Dargestellt ist die Altersverteilung des Sepsiskollektivs, der Blutspender- und der SIRS-Gruppe. Die Box stellt jeweils den Bereich zwischen der 25 %- und 75 %-Perzentile dar. Die Linie innerhalb der Box beschreibt den Median. Das Kreuz (+) symbolisiert die Lage des Mittelwerts. Die Whiskers (Linienendpunkte) oberhalb und unterhalb der Box symbolisieren die maximalen bzw. minimalen Werte. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Altersverteilung bestanden sowohl zwischen dem Sepsis- und dem Blutspenderkollektiv ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-Test) als auch zwischen Sepsis- und SIRS-Kollektiv ($p = 0,0083$, Mann-Whitney U-Test).

Im Vergleich des Sepsiskollektivs mit der SIRS-Gruppe ergaben sich signifikante Unterschiede sowohl hinsichtlich des Alters ($p = 0,0083$, Mann-Whitney U-Test) als auch hinsichtlich der Geschlechtsverteilung ($p = 0,0091$, Fishers exakter Test). Zusätzlich wiesen die Sepsispatienten signifikant höhere SAPS II- und PCT-Werte während des ICU-Aufenthalts auf (siehe Abbildungen 11 und 12) (jeweils $p < 0,0001$, Mann-Whitney U-Test). Die präoperativ gemessenen PCT-Werte in der Gruppe der kritisch kranken Patienten ohne Sepsis zeigten keine Erhöhung.

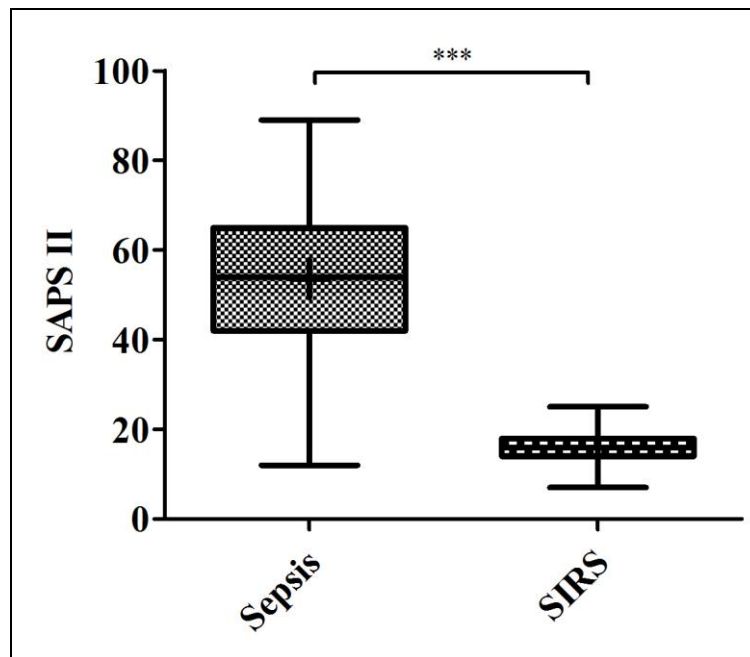


Abbildung 11: Vergleich SAPS II-Werte der Sepsis- und der SIRS-Gruppe. Dargestellt ist die Verteilung der SAPS II-Werte innerhalb der beiden Gruppen. Die Box stellt jeweils den Bereich zwischen der 25 %- und 75 %-Perzentile dar. Die Linie innerhalb der Box beschreibt den Median. Das Kreuz (+) symbolisiert die Lage des Mittelwerts. Die Whiskers (Linienendpunkte) oberhalb und unterhalb der Box symbolisieren die maximalen bzw. minimalen Werte. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Höhe des SAPS II-Scores mit höheren Werten in der Sepsisgruppe ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-Test).

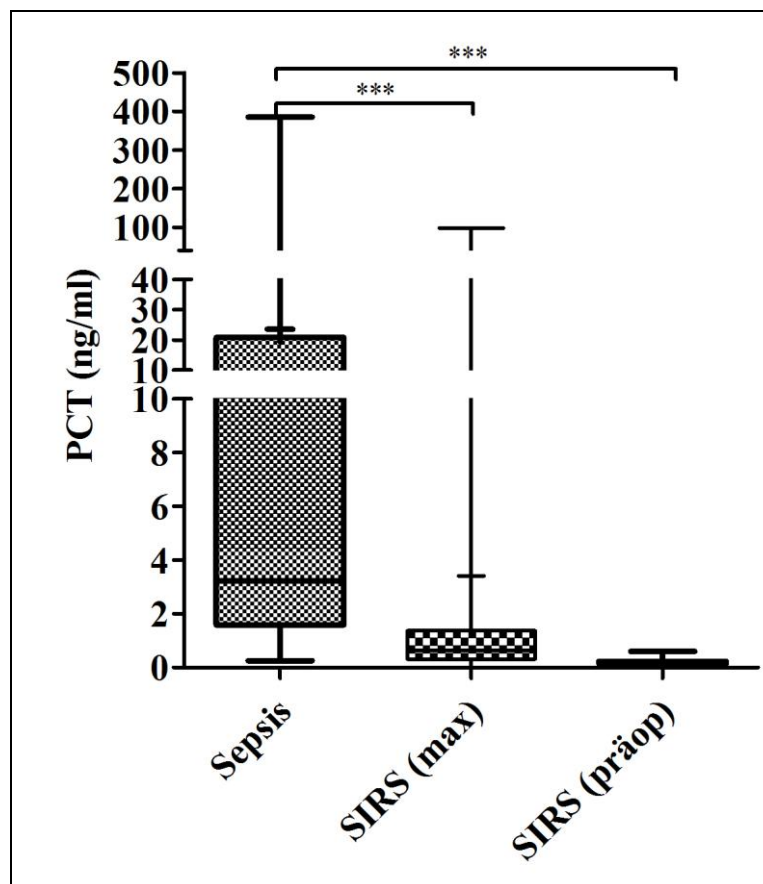


Abbildung 12: Vergleich der PCT-Werte der Sepsis- und der SIRS-Gruppe. Dargestellt sind die auf der ICU bestimmten PCT-Werte des Sepsis- sowie des SIRS-Kollektivs. Für das SIRS-Kollektiv sind zusätzlich die präoperativ bestimmten PCT-Werte aufgetragen. Die Box stellt jeweils den Bereich zwischen der 25 %- und 75 %-Perzentile dar. Die Linie innerhalb der Box beschreibt den Median. Das Kreuz (+) symbolisiert die Lage des Mittelwerts. Die Whiskers (Linienendpunkte) oberhalb und unterhalb der Box symbolisieren die maximalen bzw. minimalen Werte. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den maximalen auf der ICU gemessenen PCT-Wert der SIRS-Gruppe in Vergleich mit dem PCT-Wert der Sepsisgruppe zum Einschlusszeitpunkt ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-Test).

3.3 Ergebnisse der Genotypisierung

3.3.1 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

3.3.1.1 Beobachtete Genotyphäufigkeit an Position Fas -670 und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die tatsächlich beobachtet Genotypverteilung an Position Fas -670 des Sepsiskollektivs, des Blutspenderkollektivs und des SIRS-Kollektivs wurden mit der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Genotypverteilung verglichen.

In allen drei untersuchten Kollektiven entsprach die beobachtete Genotyphäufigkeit der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Genotyphäufigkeit für den SNP an Position Fas -670. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Sepsisgruppe: $p = 0,7419$, Blutspendergruppe: $p = 0,9683$, SIRS-Gruppe: $p = 0,9468$, χ^2 -Test). Das Hardy-Weinberg-Gesetz war in den untersuchten Kollektiven für die Genotypverteilung an Position Fas -670 somit erfüllt.

Sepsis	AA	AG	GG	p-Wert
Beobachtete Genotyphäufigkeit	40	55	28	0,7419
Erwartete Genotyphäufigkeit	37	61	25	

Tabelle 9: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 im Sepsiskollektiv. Das Hardy-Weinberg-Gesetz ist erfüllt. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Genotyphäufigkeit vor ($p = 0,7419$, χ^2 -Test).

Blutspender	AA	AG	GG	p-Wert
Beobachtete Genotyphäufigkeit	36	60	29	0,9683
Erwartete Genotyphäufigkeit	35	62	28	

Tabelle 10: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 im Blutspenderkollektiv. Das Hardy-Weinberg-Gesetz ist erfüllt. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Genotyphäufigkeit vor ($p = 0,9683$, χ^2 -Test).

SIRS	AA	AG	GG	p-Wert
Beobachtete Genotyphäufigkeit	28	36	14	0,9468
Erwartete Genotyphäufigkeit	27	38	13	

Tabelle 11: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 im SIRS-Kollektiv. Das Hardy-Weinberg-Gesetz ist erfüllt. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Genotyphäufigkeit vor ($p = 0,9468$, χ^2 -Test).

3.3.1.2 Beobachtete Genotyphäufigkeit an Position Fas -1377 und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die tatsächlich beobachtete Genotypverteilung an Position Fas -1377 des Sepsiskollektivs, des Blutspenderkollektivs und des SIRS-Kollektivs wurden mit der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Genotypverteilung verglichen.

In allen drei untersuchten Kollektiven entsprach die beobachtete Genotyphäufigkeit der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Genotyphäufigkeit für den SNP an Position Fas -1377. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Sepsisgruppe: $p = 0,8363$, Blutspendergruppe: $p = 0,8218$, SIRS-Gruppe: $p = 1,0000$, χ^2 -Test). Das Hardy-Weinberg-Gesetz war in den untersuchten Kollektiven für die Genotypverteilung an Position Fas -1377 somit erfüllt.

Sepsis	AA	AG	GG	p-Wert
Beobachtete Genotyphäufigkeit	2	21	100	0,8363
Erwartete Genotyphäufigkeit	1	22	99	

Tabelle 12: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 im Sepsiskollektiv. Das Hardy-Weinberg-Gesetz ist erfüllt. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Genotyphäufigkeit vor ($p = 0,8363$, χ^2 -Test).

Blutspender	AA	AG	GG	p-Wert
Beobachtete Genotyphäufigkeit	3	22	100	0,8218
Erwartete Genotyphäufigkeit	2	25	99	

Tabelle 13: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 im Blutspenderkollektiv. Das Hardy-Weinberg-Gesetz ist erfüllt. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Genotyphäufigkeit vor ($p = 0,8218$, χ^2 -Test).

SIRS	AA	AG	GG	p-Wert
Beobachtete Genotyphäufigkeit	1	15	57	1,0000
Erwartete Genotyphäufigkeit	1	15	57	

Tabelle 14: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 im SIRS-Kollektiv. Das Hardy-Weinberg-Gesetz ist erfüllt. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Genotyphäufigkeit vor ($p = 1,0000$, χ^2 -Test).

3.3.2 Genotyp- und Allelhäufigkeiten für den SNP an Position Fas -670

3.3.2.1 Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -670 der Sepsis- und der Blutspendergruppe

Verglichen wurde das Auftreten der Genotypen AA, AG und GG für den SNP Fas -670 im Sepsiskollektiv mit dem Auftreten im Kontrollkollektiv der Blutspender. Der Genotyp AA war an dieser Position bei 40 Sepsispatienten [relative (rel.) Häufigkeit = 0,325] und bei 36 Blutspendern (rel. Häufigkeit = 0,288) nachweisbar. Der Genotyp AG lag bei 55 (rel. Häufigkeit = 0,447) Sepsispatienten und bei 60 (rel. Häufigkeit = 0,480) Blutspendern vor. Bei 28 (rel. Häufigkeit = 0,228) Sepsispatienten und bei 29 (rel. Häufigkeit = 0,232) Blutspendern wurde der Genotyp GG bestimmt.

Hinsichtlich der Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 zeigten sich demnach keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Sepsis- und dem Kontrollkollektiv der Blutspender ($p = 0,8068$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
Sepsis	40 (0,325)	55 (0,447)	28 (0,228)	0,8068
Blutspender	36(0,288)	60 (0,480)	29 (0,232)	

Tabelle 15: Genotyphäufigkeit an Position Fas -670 Sepsiskollektiv vs. Blutspender. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten der Genotypen und in Klammern die relativen Häufigkeiten der Genotypen im Sepsis- bzw. Blutspenderkollektiv. Es zeigte sich keine signifikant unterschiedliche Genotypverteilung zwischen den beiden Kollektiven ($p = 0,8068$, χ^2 -Test).

3.3.2.2 Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 der Sepsis- und der Blutspendergruppe

In der Sepsisgruppe trat das A-Allel an Position Fas -670 mit einer absoluten Häufigkeit von 135 (rel. Häufigkeit = 0,549) auf. In der Gruppe der Blutspender betrug die absolute Häufigkeit 132 (rel. Häufigkeit = 0,528). Die absolute Frequenz des G-Allels war 111 in der Sepsisgruppe (rel. Häufigkeit = 0,451) und 118 (rel. Häufigkeit = 0,472) in der Kontrollgruppe der Blutspender.

Statistisch ließ sich hier kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelverteilung innerhalb der beiden Gruppen nachweisen ($p = 0,6534$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
Sepsis	135 (0,549)	111 (0,451)	0,6534
Blutspender	132 (0,528)	118 (0,472)	

Tabelle 16: Allelhäufigkeit an Position Fas -670 Sepsiskollektiv vs. Blutspender. Dargestellt sind die absoluten Allelhäufigkeiten sowie die relativen Häufigkeiten (in Klammern) des Auftretens des A- bzw. G-Allels im Sepsis- und im Blutspenderkollektiv. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelhäufigkeiten in den beiden Kollektiven ($p = 0,6534$, Fishers exakter Test).

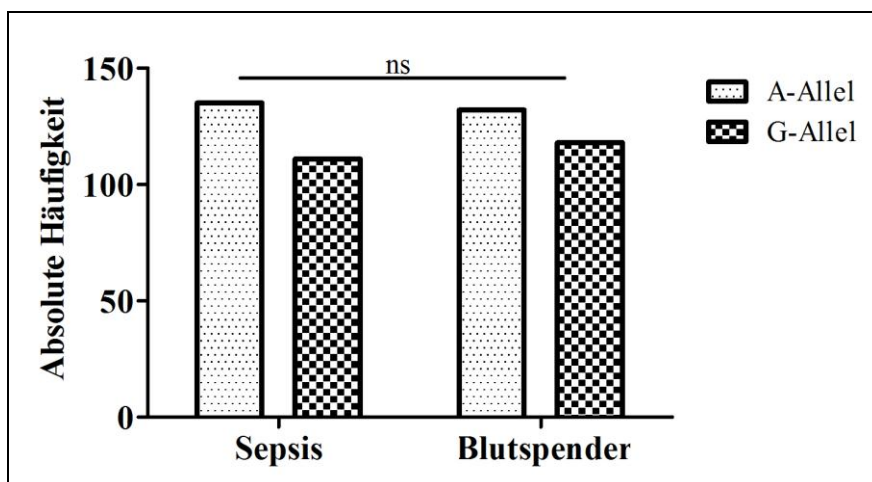


Abbildung 13: Absolute Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 im Sepsis- und im Blutspenderkollektiv. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelhäufigkeit in den beiden Gruppen ($p = 0,6534$, Fishers exakter Test).

3.3.2.3 Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe

In der Sepsisgruppe trat der Genotyp AA an Position Fas -670 mit einer absoluten Häufigkeit von 40 auf. Dies entsprach einer relativen Häufigkeit von 0,325. In der SIRS-Gruppe wurde dieser Genotyp bei 28 Patienten (rel. Häufigkeit = 0,359) beobachtet. Der Genotyp AG trat in der Sepsisgruppe mit einer absoluten Häufigkeit von 55 (rel. Häufigkeit = 0,447) auf. In der SIRS-Gruppe betrug die absolute Häufigkeit 36 (rel. Häufigkeit = 0,462). Für den Genotyp GG wurde in der Sepsis-Gruppe eine absolute Häufigkeit von 28 (rel. Häufigkeit = 0,228), in der SIRS-Gruppe von 14 (rel. Häufigkeit = 0,179) beobachtet.

Zwischen diesen zwei Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Genotypverteilung ($p = 0,7003$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
Sepsis	40 (0,325)	55 (0,447)	28 (0,228)	0,7003
SIRS	28 (0,359)	36 (0,462)	14 (0,179)	

Tabelle 17: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Genotypen sowie die jeweiligen relativen Häufigkeiten in Klammern sowohl für das Sepsis- als auch für das SIRS-Kollektiv. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Genotyphäufigkeit zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,7003$, χ^2 -Test).

3.3.2.4 Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe

Im Sepsiskollektiv betrug die beobachtete absolute Häufigkeit für das A-Allel 135 (rel. Häufigkeit = 0,549), die für das G-Allel 111 (rel. Häufigkeit = 0,51). In der SIRS-Gruppe trat das A-Allel mit einer absoluten Häufigkeit von 111 (rel. Häufigkeit = 0,590) und das G-Allel mit einer absoluten Häufigkeit von 64 (rel. Häufigkeit = 0,419) auf.

Hinsichtlich der Allelhäufigkeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,4701$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
Sepsis	135 (0,549)	111 (0,451)	0,4701
SIRS	92 (0,590)	64 (0,410)	

Tabelle 18: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv. Dargestellt sind die absoluten sowie die relativen (in Klammern) Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 in der Sepsis- und der SIRS-Gruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelhäufigkeit zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,4701$, Fishers exakter Test).

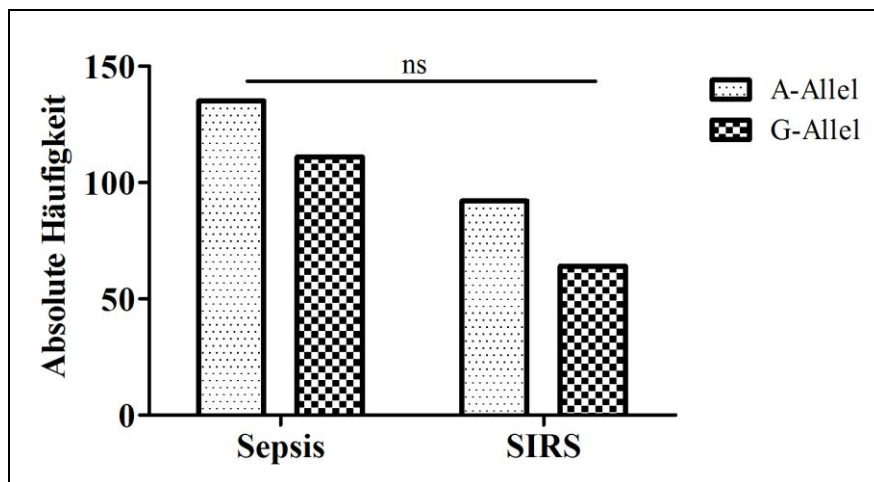


Abbildung 14: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten Allelhäufigkeiten zwischen den beiden Kollektiven ($p = 0,4701$, Fishers exakter Test).

3.3.3 Genotyp- und Allelhäufigkeiten für den SNP an Position Fas -1377

3.3.3.1 Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 der Sepsis- und der Blutspendergruppe

Der Genotyp AA an Position Fas -1377 trat in der Sepsisgruppe bei 2 Patienten auf (rel. Häufigkeit = 0,016), in der Kontrollgruppe der Blutspender bei 3 Probanden (rel. Häufigkeit = 0,024). Der Genotyp AG konnte bei 21 Sepsispatienten (rel. Häufigkeit = 0,171) und bei 22 Blutspendern (rel. Häufigkeit = 0,176) nachgewiesen werden. Der Genotyp GG wurde sowohl bei 100 Sepsispatienten (rel. Häufigkeit = 0,813) als auch bei 100 Blutspendern (rel. Häufigkeit = 0,800) beobachtet.

In Bezug auf die Genotyphäufigkeit an Position Fas -1377 ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Sepsisgruppe und dem Kontrollkollektiv der Blutspender nachweisen ($p = 0,9016$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
Sepsis	2 (0,016)	21 (0,171)	100 (0,813)	0,9016
Blutspender	3 (0,024)	22 (0,176)	100 (0,800)	

Tabelle 19: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. Blutspenderkollektiv. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Genotypen sowie die jeweiligen relativen Häufigkeiten in Klammern sowohl für das Sepsis- als auch für das Blutspenderkollektiv. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Genotyphäufigkeit zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,9016$, χ^2 -Test).

3.3.3.2 Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 der Sepsis- und der Blutspendergruppe

In der Sepsisgruppe trat das A-Allel mit einer absoluten Häufigkeit von 25 (rel. Häufigkeit = 0.102), in der Gruppe der Blutspender von 28 (rel. Häufigkeit = 0,112) auf. Das G-Allel wurde mit einer absoluten Häufigkeit von 221 (rel. Häufigkeit = 0,898) in der Sepsisgruppe und von 222 (rel. Häufigkeit = 0,888) in der Blutspendergruppe beobachtet.

Hinsichtlich der Allelhäufigkeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Kollektiven ($p = 0,7720$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
Sepsis	25 (0,102)	221 (0,898)	0,7720
Blutspender	28 (0,112)	222 (0,888)	

Tabelle 20: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. Blutspenderkollektiv. Dargestellt sind die absoluten sowie die relativen (in Klammern) Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 in der Sepsis- und der Blutspendergruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelhäufigkeit zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,7720$, Fishers exakter Test).

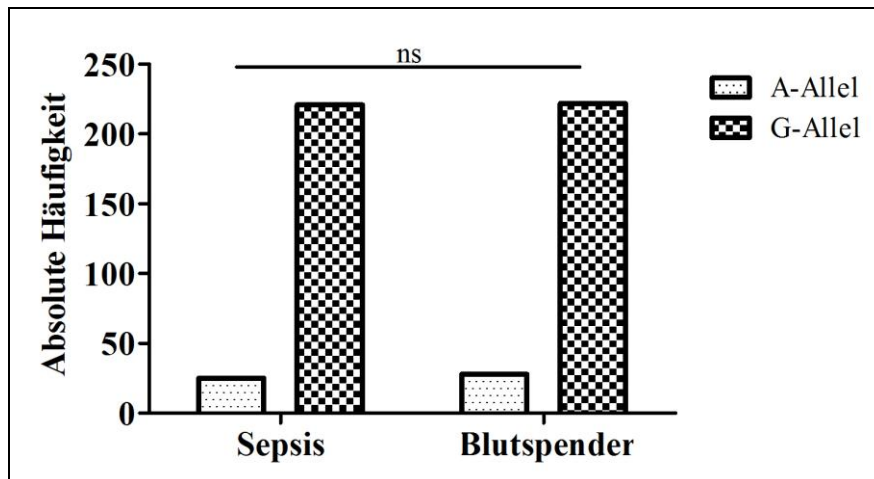


Abbildung 15: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. Blutspenderkollektiv. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten Allelhäufigkeiten zwischen den beiden Kollektiven ($p = 0,7720$, Fishers exakter Test).

3.3.3.3 Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe

In der Sepsisgruppe trat der Genotyp AA mit einer absoluten Häufigkeit von 2 (rel. Häufigkeit = 0,016), der Genotyp AG mit einer absoluten Häufigkeit von 21 (rel. Häufigkeit = 0,171) und der Genotyp GG mit einer absoluten Häufigkeit von 100 (rel. Häufigkeit = 0,813) auf. In der SIRS-Gruppe zeigte sich eine ähnliche Verteilung. Ein Patient wies den Genotyp AA auf (rel. Häufigkeit = 0,014). Bei 15 Patienten wurde der Genotyp AG (rel. Häufigkeit = 0,205) und bei 57 Patienten der Genotyp GG (rel. Häufigkeit = 0,781) beobachtet.

Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Genotyphäufigkeiten zwischen dem Sepsis- und dem SIRS-Kollektiv ($p = 0,8269$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
Sepsis	2 (0,016)	21 (0,171)	100 (0,813)	0,8269
SIRS	1 (0,014)	15 (0,205)	57 (0,781)	

Tabelle 21: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Genotypen sowie die jeweiligen relativen Häufigkeiten in Klammern sowohl für das Sepsis- als auch für das SIRS-Kollektiv. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Genotyphäufigkeit zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,8269$, χ^2 -Test).

3.3.3.4 Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 der Sepsis- und der SIRS-Gruppe

In der Sepsisgruppe wurde das A-Allel an Position Fas -1377 mit einer absoluten Häufigkeit von 25 (rel. Häufigkeit = 0,102) beobachtet. Das G-Allel trat in dieser Gruppe mit einer Frequenz von 221 (rel. Häufigkeit = 0,898) auf. In der SIRS-Gruppe zeigte sich eine absolute Häufigkeit des A-Allels von 17 (rel. Häufigkeit = 0,116) sowie eine absolute Häufigkeit des G-Allels von 129 (rel. Häufigkeit = 0,884).

Hinsichtlich der Allelhäufigkeit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Sepsis- und der SIRS-Gruppe ($p = 0,7359$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
Sepsis	25 (0,102)	221 (0,898)	0,7359
SIRS	17 (0,116)	129 (0,884)	

Tabelle 22: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv. Dargestellt sind die absoluten sowie die relativen (in Klammern) Allelhäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 in der Sepsis- und der SIRS-Gruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelhäufigkeit zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,7359$, Fishers exakter Test).

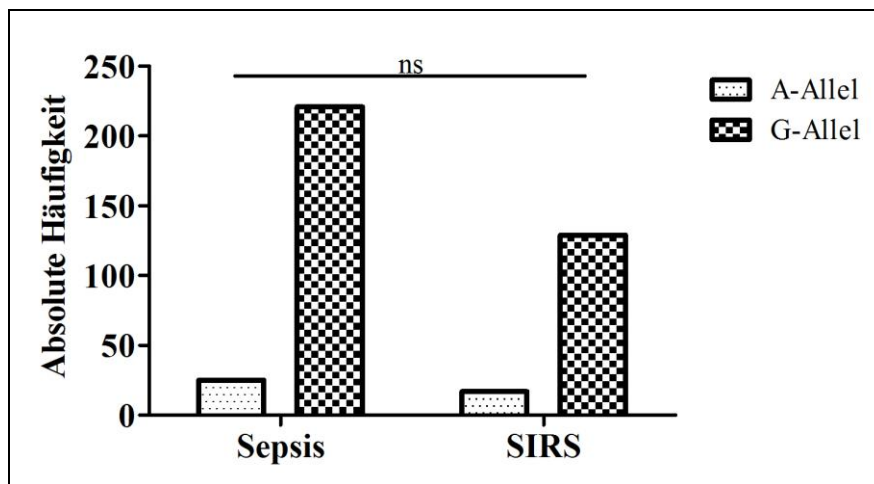


Abbildung 16: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten Allelhäufigkeiten zwischen den beiden Kollektiven ($p = 0,7359$, Fishers exakter Test).

3.3.4 Genotyp- und Allelhäufigkeiten innerhalb des Sepsiskollektivs

3.3.4.1 Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -670 und Geschlecht

Zur Analyse eines möglichen Einflusses des Geschlechts auf die Genotypverteilung, wurde innerhalb des Sepsiskollektivs zwischen weiblichen und männlichen Patienten unterschieden. Es sollte die Genotypverteilung innerhalb dieser Gruppen untersucht werden. Zwölf der weiblichen Sepsispatienten wiesen den Genotyp AA (rel. Häufigkeit = 0,293), 20 den Genotyp AG (rel. Häufigkeit = 0,488) und 9 den Genotyp GG (rel. Häufigkeit = 0,220) an Position Fas -670 auf. Bei den männlichen Patienten wurde der Genotyp AA mit einer Häufigkeit von 28 (rel. Häufigkeit = 0,341), der Genotyp AG mit einer Häufigkeit von 35 (rel. Häufigkeit = 0,427) und der Genotyp GG mit einer Häufigkeit von 19 (rel. Häufigkeit = 0,232) beobachtet.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Genotypverteilung des SNPs Fas -670 zwischen weiblichen und männlichen Patienten in der Sepsisgruppe ($p = 0,8005$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
weiblich	12 (0,293)	20 (0,488)	9 (0,220)	0,8005
männlich	28 (0,341)	35 (0,427)	19 (0,232)	

Tabelle 23: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Geschlecht. Dargestellt sind sowohl die absolute als auch die relative (in Klammern) Genotypverteilung an Position Fas -670 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach Geschlecht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten in Bezug auf die Genotypverteilung ($p = 0,8005$; χ^2 -Test).

3.3.4.2 Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 und Geschlecht

Es wurden die Allelhäufigkeiten zwischen weiblichen und männlichen Sepsispatienten verglichen. Bei den weiblichen Patienten wurde eine absolute Häufigkeit von 44 (rel. Häufigkeit = 0,537) für das A-Allel sowie eine absolute Häufigkeit von 38 (rel. Häufigkeit = 0,463) für das G-Allel beobachtet. Im männlichen Patientenkollektiv betrug die absolute Häufigkeit für das A-Allel 91 (rel. Häufigkeit = 0,555), die für das G-Allel 73 (rel. Häufigkeit = 0,455).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 zwischen weiblichen und männlichen Patienten ($p = 0,7877$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
weiblich	44 (0,537)	38 (0,463)	0,7877
männlich	91 (0,555)	73 (0,445)	

Tabelle 24: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Geschlecht. Dargestellt sind sowohl die absolute als auch die relative (in Klammern) Allelhäufigkeit des SNPs an Position Fas -670 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach Geschlecht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten in Bezug auf die Allelhäufigkeit ($p = 0,7877$, Fishers exakter Test).

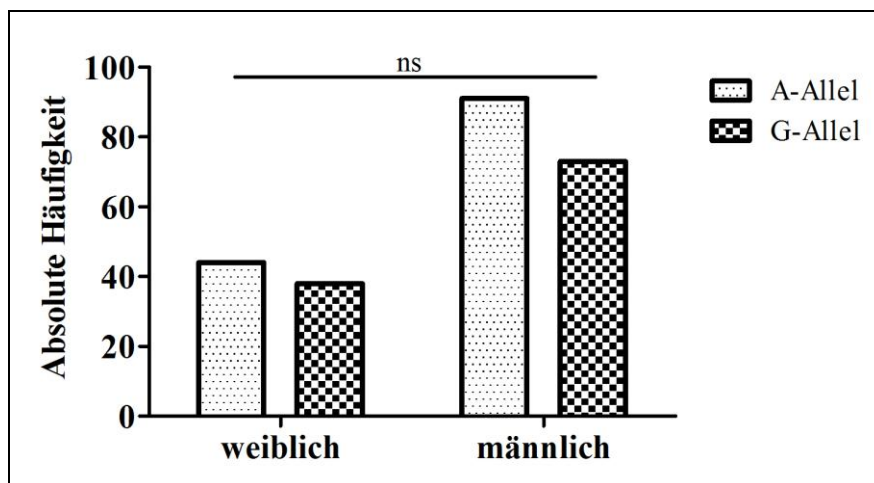


Abbildung 17: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe nach Geschlecht. Dargestellt ist die absolute Allelhäufigkeit an Position Fas -670 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach Geschlecht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten in Bezug auf die Allelhäufigkeit ($p = 0,7877$, Fishers exakter Test).

3.3.4.3 Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Geschlecht

Verglichen wurde die Genotypverteilung an Position Fas -1377 innerhalb des Sepsiskollektivs zwischen weiblichen und männlichen Patienten. Innerhalb des weiblichen Patientenkollektivs trat der Genotyp AA nicht auf, im männlichen Kollektiv bei 2 Patienten (rel. Häufigkeit = 0,024). Der Genotyp AG wurde bei 6 weiblichen (rel. Häufigkeit = 0,146) und bei 15 männlichen Patienten (rel. Häufigkeit = 0,183) beobachtet. Bei 35 weiblichen (rel. Häufigkeit = 0,854) und bei 65 männlichen Patienten (rel. Häufigkeit = 0,793) wurde der Genotyp GG nachgewiesen.

In Bezug auf die Genotyphäufigkeit an Position Fas -1377 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten des Sepsiskollektivs ($p = 0,5119$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
weiblich	0 (0,000)	6 (0,146)	35 (0,854)	0,5119
männlich	2 (0,024)	15 (0,183)	65 (0,793)	

Tabelle 25: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Geschlecht. Dargestellt sind absolute und relative (in Klammern) Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach Geschlecht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten in Bezug auf die Genotypverteilung ($p = 0,5119$, χ^2 -Test).

3.3.4.4 Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Geschlecht

Innerhalb des Sepsiskollektivs wurde das Auftreten von Unterschieden der Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 zwischen weiblichen und männlichen Patienten untersucht. In der weiblichen Patientengruppe trat das A-Allel mit einer absoluten Häufigkeit von 6 (rel. Häufigkeit = 0,073) auf. Die beobachtete Frequenz des G-Alleles betrug 76 (rel. Häufigkeit = 0,927). Das A-Allel wurde mit einer absoluten Häufigkeit von 19 (rel. Häufigkeit = 0,116), das G-Allel mit einer absoluten Häufigkeit von 145 (rel. Häufigkeit = 0,884) innerhalb des männlichen Patientenkollektivs beobachtet.

Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelverteilung an Position Fas -1377 zwischen weiblichen und männlichen Sepsispatienten ($p = 0,3738$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
Weiblich	6 (0,073)	76 (0,927)	0,3738
männlich	19 (0,116)	145 (0,884)	

Tabelle 26: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Geschlecht. Dargestellt sind sowohl die absolute als auch die relative (in Klammern) Allelhäufigkeit des SNPs an Position Fas -1377 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach Geschlecht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten in Bezug auf die Allelhäufigkeit ($p = 0,3738$, Fishers exakter Test).

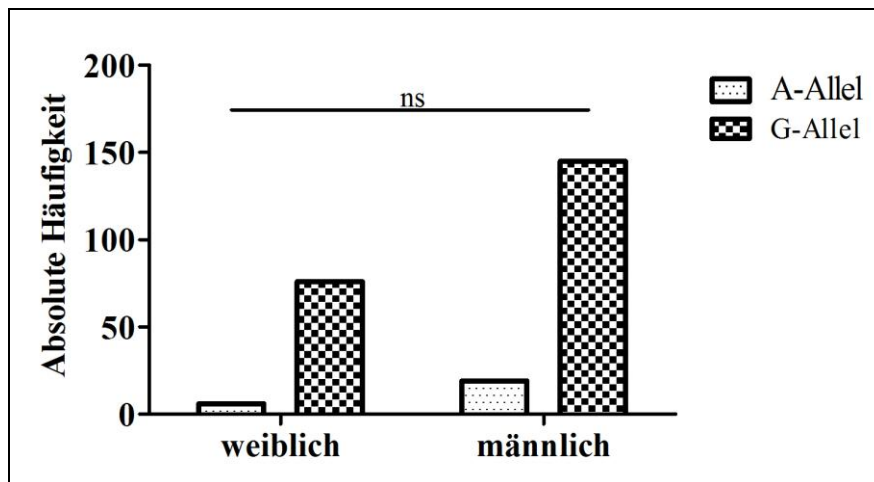


Abbildung 18: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe nach Geschlecht. Dargestellt ist die absolute Allelhäufigkeit an Position -Fas 1377 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach Geschlecht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten in Bezug auf die Allelhäufigkeit ($p = 0,3738$, Fisher exakter Test).

3.3.4.5 Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -670 und das Überleben der Patienten

Untersucht werden sollte, ob der Genotyp einen Einfluss auf das Überleben im Rahmen einer Sepsis hat (bezogen auf die Krankenhausentlassung). Hierzu wurde die Genotypverteilung an Position Fas -670 innerhalb des Sepsiskollektivs zwischen den Patienten, die die Erkrankung überlebten, und denjenigen, die im Rahmen der Sepsis verstarben, untersucht. In der Überleben-Gruppe wiesen 28 Patienten den Genotyp AA (rel. Häufigkeit = 0,384), 31 Patienten den Genotyp AG (rel. Häufigkeit = 0,425) und 14 Patienten den Genotyp GG (rel. Häufigkeit = 0,192) auf. Innerhalb der Gruppe der verstorbenen Patienten wurde der Genotyp AA mit einer absoluten Häufigkeit von 12 (rel. Häufigkeit = 0,240), der Genotyp AG mit einer absoluten Häufigkeit von 24 (rel. Häufigkeit = 0,480) und der Genotyp GG mit einer absoluten Häufigkeit von 14 (rel. Häufigkeit = 0,280) beobachtet.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verteilung der Genotypen und dem Überleben bzw. Versterben im Rahmen der Sepsis ($p = 0,2124$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
Überleben	28 (0,384)	31 (0,425)	14 (0,192)	0,2124
Tod	12 (0,240)	24 (0,480)	14 (0,280)	

Tabelle 27: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Überleben. Dargestellt sind absolute und relative (in Klammern) Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach überlebenden und verstorbenen Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Überleben und Versterben der Patienten im Rahmen der Sepsis in Bezug auf die Genotypverteilung ($p = 0,2124$, χ^2 -Test).

3.3.4.6 Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 und Überleben

Verglichen wurde ein möglicher Unterschied bezüglich der Allelverteilung zwischen Patienten, die eine Sepsis überlebten und denjenigen, die im Rahmen dieser Erkrankung während des Krankenhausaufenthalts verstorben sind. In der Gruppe der überlebenden Patienten trat das A-Allel mit einer Frequenz von 87 (rel. Häufigkeit = 0,596) auf. Dies war häufiger als in der Gruppe der verstorbenen Patienten, in der das Auftreten des A-Allels mit einer Frequenz von 48 (rel. Häufigkeit = 0,480) beobachtet wurde. Die absolute Häufigkeit des G-Allels betrug in der Gruppe der überlebenden Patienten 59 (rel. Häufigkeit = 0,404), in der Gruppe der verstorbenen Patienten 52 (rel. Häufigkeit = 0,520).

Der Unterschied hinsichtlich der Allelhäufigkeit zwischen den beiden Gruppen war jedoch nicht statistisch signifikant, dennoch zeigte sich eine Tendenz zu einer höheren Frequenz des G-Allels in der Gruppe der verstorbenen Patienten ($p = 0,0899$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
Überleben	87 (0,596)	59 (0,404)	0,0899
Tod	48 (0,480)	52 (0,520)	

Tabelle 28: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Überleben. Dargestellt sind absolute und relative (in Klammern) Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach überlebenden und verstorbenen Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Überleben und Versterben der Patienten im Rahmen der Sepsis in Bezug auf die Allelverteilung ($p = 0,0899$, Fishers exakter Test).

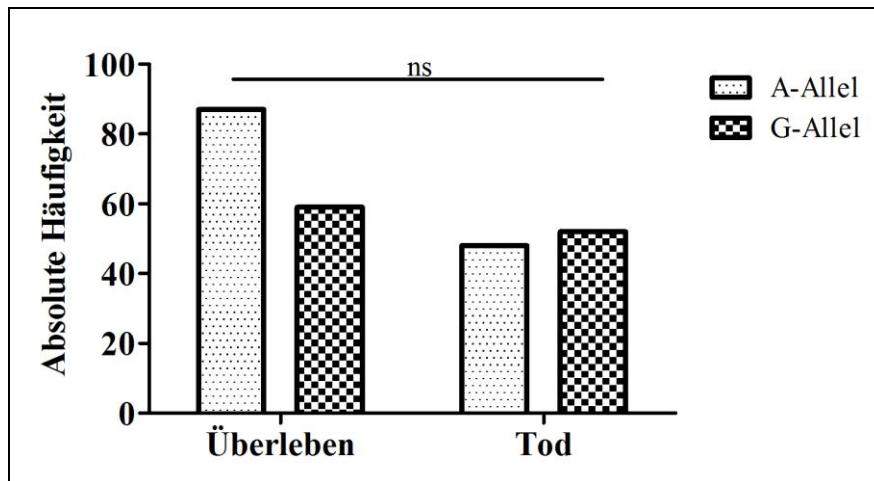


Abbildung 19: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Überleben. Dargestellt sind die absoluten Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach überlebenden und verstorbenen Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Überleben und Versterben der Patienten im Rahmen der Sepsis in Bezug auf die Genotypverteilung, jedoch sieht man einen Trend zum G-Allel in der Gruppe der verstorbenen Patienten ($p = 0,0899$, Fishers exakter Test).

3.3.4.7 Genotyphäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Überleben

Für den SNP an Position Fas -1377 sollte der Einfluss auf das Überleben der Sepsis, bezogen auf den Zeitraum bis zur Krankenhausentlassung, untersucht werden. Hierzu wurde die Verteilung der Genotyphäufigkeiten an dieser Position zwischen den Patienten, die die Sepsis überlebten, und denjenigen, welche im Rahmen der Sepsis verstarben, untersucht. In der Gruppe der überlebenden Patienten wurde der Genotyp AA bei 2 Patienten (rel. Häufigkeit = 0,027), der Genotyp AG bei 10 Patienten (rel. Häufigkeit = 0,137) und der Genotyp GG bei 61 Patienten (rel. Häufigkeit = 0,386) beobachtet. In der Gruppe der verstorbenen Patienten wies kein Patient den Genotyp AA, 11 Patienten den Genotyp AG (rel. Häufigkeit = 0,220) und 39 Patienten den Genotyp GG (rel. Häufigkeit = 0,780) auf.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Genotyphäufigkeiten zwischen den beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,2618$, χ^2 -Test).

	AA	AG	GG	p-Wert
Überleben	2 (0,027)	10 (0,137)	61 (0,836)	0,2618
Tod	0 (0,000)	11 (0,220)	39 (0,780)	

Tabelle 29: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Überleben. Dargestellt sind absolute und relative (in Klammern) Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach überlebenden und verstorbenen Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Überleben und Versterben der Patienten im Rahmen der Sepsis in Bezug auf die Genotypverteilung ($p = 0,2618$, χ^2 -Test).

3.3.4.8 Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -1377 und Überleben

Verglichen wurden die Allelhäufigkeiten in dem Patientenkollektiv, welches die Sepsis überlebte, mit den Allelhäufigkeiten in dem Patientenkollektiv, welches im Rahmen der Sepsis verstarb. In der Gruppe der überlebenden Patienten wies das A-Allel eine Frequenz von 14 (rel. Häufigkeit = 0,096), das G-Allel eine Frequenz von 132 (rel. Häufigkeit = 0,904) auf. Die Häufigkeit des A-Allels betrug 11 (rel. Häufigkeit = 0,110), die des G-Allels 89 (rel. Häufigkeit = 0,890) in der Gruppe der verstorbenen Patienten.

Es bestand kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Allelhäufigkeiten der beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,8305$, Fishers exakter Test).

	A	G	p-Wert
Überleben	14 (0,096)	132 (0,904)	0,8305
Tod	11 (0,110)	89 (0,890)	

Tabelle 30: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Überleben. Dargestellt sind absolute und relative (in Klammern) Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach überlebenden und verstorbenen Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Überleben und dem Versterben der Patienten im Rahmen der Sepsis in Bezug auf die Allelverteilung ($p = 0,8305$, Fishers exakter Test).

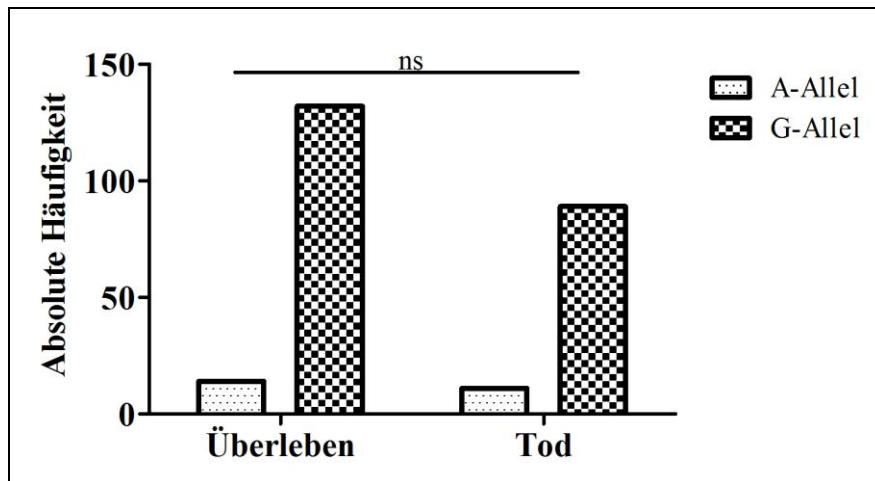


Abbildung 20: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Überleben. Dargestellt sind die absoluten Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 innerhalb des Sepsiskollektivs getrennt nach überlebenden und verstorbenen Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Überleben und Versterben der Patienten im Rahmen der Sepsis in Bezug auf die Genotypverteilung ($p = 0,8305$, Fishers exakter Test).

4 Diskussion

Bei der Immunpathogenese der Sepsis wird der Leukozytenapoptose eine zunehmende Bedeutung beigemessen. Ebenso existieren Hinweise auf eine genetische Prädisposition für die Entwicklung und den Verlauf einer schweren Sepsis. Dies spiegelt sich auch im PIRO-Konzept wieder (Levy et al., 2003). Positive Assoziationen wurden z. B. bereits für TNF, Il-1 β oder MIF gezeigt (Lehmann et al., 2009; Stüber et al., 1996; Watanabe et al., 2010; Wen et al., 2010). Der Fas-Rezeptor spielt in der Signaltransduktion der Rezeptor-vermittelten Apoptose eine zentrale Rolle. Der Beitrag von Polymorphismen in der Promotorregion des Fas-Gens zur Pathogenese der Sepsis ist bislang noch nicht untersucht worden.

Im Rahmen der vorliegenden molekular-epidemiologischen Arbeit wurde daher erstmals untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den bekannten Promotorpolymorphismen Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A und dem Auftreten sowie dem Krankheitsverlauf einer Sepsis besteht.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich keine positive Assoziation zwischen den beiden untersuchten SNPs Fas -670 und Fas -1377 und dem Auftreten einer schweren Sepsis. Die beobachteten Genotypverteilungen entsprachen der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Häufigkeit. Weiterhin bestand keine positive Assoziation zwischen diesen beiden SNPs und dem Überleben im Rahmen der Sepsis, bezogen auf den Zeitraum bis zur Krankenhausentlassung. Jedoch wurde hier ein Trend zum häufigeren Auftreten des G-Allels an Position -670 des Fas-Gens in der Gruppe der verstorbenen Patienten beobachtet.

4.1 *Patientenkollektive*

4.1.1 **Sepsis-, SIRS- und Blutspenderkollektiv**

Es wurde ein Kollektiv septischer Patienten hinsichtlich der Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Fas-Gens an Position Fas -670 und Fas -1377 mit zwei Kontrollkollektiven verglichen. Alle septischen Patienten erfüllten die Kriterien einer schweren Sepsis (Levy et al., 2003) und wurden auf einer operativen Intensivstation behandelt. Die Tatsache, dass unterschiedlichste Krankheitsbilder innerhalb des Kollektivs vorlagen, welche letztlich zu einer schweren Sepsis führten, unterstreicht, dass diese eine gemeinsame Endstrecke verschiedener Krankheitsentitäten darstellt. Als Kontrollkollektiv dienten zum einen gesunde Blutspender. Zum anderen wurde zusätzlich zu dieser Kontrolle ein Kollektiv kritisch kranker (kardiochirurgischer) Patienten

untersucht, welche sich einer Bypass-Operation (mit oder ohne Unterstützung der HLM) unterziehen mussten. Aus der Literatur ist bekannt, dass es im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe zu einer Entzündungsreaktion im Sinne eines SIRS kommt, welche den postoperativen Verlauf beeinflussen kann (Butler et al., 1993; Cremer et al., 1996; Czerny et al., 2000; Gu et al., 1998). Somit stellen diese Patienten kritisch Kranke ohne Infektion dar (in diesem Sinne auch SIRS-Gruppe genannt). Die kardiochirurgischen Patienten dienten als Vergleichskollektiv zum Sepsiskollektiv in Hinblick auf die Schwere der Erkrankung sowie der Ursache der Entzündungsreaktion. Hier wären unterschiedliche Pathomechanismen hinsichtlich der Entzündungsreaktion denkbar und daher auch Unterschiede in Bezug auf eine Assoziation der untersuchten SNPs mit dem Auftreten der Erkrankung möglich.

4.1.2 Unterschiede der Alters- und Geschlechtsverteilung zwischen den Kollektiven

Die untersuchten Patientenkollektive zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Alters. So waren die Blutspender signifikant jünger als die Sepsispatienten ($p < 0,0001$). Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Blutspenderkollektiv aus jungen und gesunden Blutspendern bestand, wohingegen im Sepsiskollektiv eine Vielzahl von Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsgenese und dementsprechend auch unterschiedlichen Lebensalters zusammengefasst war. Ein Unterschied zeigte sich ebenfalls bei den Patienten der SIRS-Gruppe. Diese waren signifikant älter als die der Sepsisgruppe ($p = 0,0083$). Hierbei handelte es sich um Patienten mit einer Koronaren Herzerkrankung (KHK), bei welchen die Indikation zur operativen Revaskularisierung gestellt worden ist. Es ist bekannt, dass die Inzidenz der KHK mit höherem Lebensalter zunimmt und häufiger Männer als Frauen betroffen sind (Castelli, 1984; Hartel, 2007). Dies erklärt sowohl die beobachteten Altersunterschiede als auch das häufigere Auftreten des männlichen Geschlechts in der SIRS-Gruppe im Vergleich zu den anderen Kollektiven. Da das Alter typischerweise keinen Einfluss auf die Genotyp- und Allelhäufigkeiten hat, sind diese Altersunterschiede zwischen den Kollektiven zwar vorhanden, jedoch sollten sie keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit über die Promotorpolymorphismen Fas -670 und -1377 bei Patienten mit schwerer Sepsis haben. Prinzipiell wäre es möglich gewesen, die Kollektive hinsichtlich des Alters anzugleichen. Dies hätte durch eine entsprechende Auswahl an Patienten die Dauer der Studie verlängert, jedoch ohne einen zusätzlichen Informationsgewinn in Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung zu bieten. Außerdem wäre ein möglicher Bias bei der Auswahl der septischen Patienten entstanden.

4.1.3 PCT-Werte bei Sepsis und SIRS

Sowohl bei den Patienten des Sepsiskollektivs als auch bei den Patienten des SIRS-Kollektivs wurden PCT-Werte bestimmt. Das PCT zum Einschlusszeitpunkt lag in der Gruppe der septischen Patienten im Mittel bei 24 ng/ml. Das im Verlauf der Behandlung auf der Intensivstation gemessene maximale PCT in der SIRS-Gruppe betrug im Mittel 3 ng/ml. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven ($p < 0,0001$). Das in der SIRS-Gruppe präoperativ bestimmte PCT betrug im Mittel 0,2 ng/ml und lag somit im Normbereich des Standardlabors, welcher $< 0,5$ ng/ml beträgt.

In Bezug auf diese Beobachtungen kann man sagen, dass die präoperativ normwertigen PCT-Werte des SIRS-Kollektivs verdeutlichen, dass vor der Operation keine schweren Infektionen in diesem Kollektiv vorlagen. Der nach dem kardiochirurgischen Eingriff beobachtete PCT-Anstieg ist mit den aktuellen Daten aus der Literatur vereinbar (Aouifi et al., 1999; Aouifi et al., 2000; Meisner et al., 2002) und am ehesten auf den Eingriff an sich und das postoperative Auftreten eines SIRS zurückzuführen. Vereinzelt höhere PCT-Werte könnten auf einen komplizierten postoperativen Verlauf hinweisen oder auf eine möglicherweise präoperativ nicht entdeckte vorhandene Infektion (z. B. eine beginnende Pneumonie). Die PCT-Anstiege im Sepsiskollektiv sind signifikant höher als die im SIRS-Kollektiv. Die beobachtete große Spannweite der Werte (0,25 – 386 ng/ml) ist darin begründet, dass die jeweils zum Einschlusszeitpunkt vorliegenden PCT-Werte verwendet wurden, wobei die Genese der Sepsis unterschiedlich gewesen ist. Darüberhinaus stellt die Sepsis ein dynamisches Krankheitsbild mit variablen Verläufen dar. So ist es möglich, dass der Einschlusszeitpunkt entweder vor einem PCT-Anstieg, in einem PCT-Anstieg, bereits in einem PCT-Abfall oder während des maximalen PCT-Werts lag. PCT wird als ein geeigneter Parameter zum Nachweis einer schweren Infektion bzw. einer Sepsis gewertet (Endo et al., 2008; Reinhart et al., 2000) und zeigt auch in den hier untersuchten Kollektiven Unterschiede zwischen schwerer Sepsis und SIRS. Dabei weisen erhöhte PCT-Werte am ehesten auf eine bakterielle Infektion hin, können aber auch bei parasitären oder durch Pilze verursachten Infektionen erhöht sein (Reinhart et al., 2000). Da ein septisches Krankheitsbild grundsätzlich aber auch durch eine virale Infektion hervorgerufen werden kann, muss das PCT auch im Rahmen einer Sepsis nicht zwangsläufig erhöht sein.

4.1.4 SAPS II-Score bei Sepsis und SIRS

Sowohl bei den Patienten des Sepsiskollektivs als auch bei den Patienten des SIRS-Kollektivs wurde der SAPS II-Score zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses bestimmt.

Dieser wird wie einige andere Scores auch zur individuellen Risikoabschätzung auf Intensivstationen verwendet. Zur Berechnung des Scores werden 17 Variablen, die neben Laborparametern auch Vitalparameter und Vorerkrankungen umfassen, bestimmt, wobei jeweils der innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme des Patienten am weitesten von der Norm abweichende Wert in die Berechnung des Scores eingeht (Agha et al., 2002; Le Gall et al., 1993). (Auriant et al., 1998). Agha et al. beobachteten auf einer operativen Intensivstation einen mittleren SAPS II-Wert von 29,9. Der beobachtete SAPS II-Score der in dieser Studie verstorbenen Patienten war mit im Mittel 45,7 signifikant höher als der Score der überlebenden Patienten (27,7) (Agha et al., 2002). Für ein anderes Kollektiv an schwerer Sepsis erkrankter Patienten wurde ein SAPS II-Score von im Mittel 40,05 in der Gruppe der überlebenden Patienten und von im Mittel 47,28 in der Gruppe der verstorbenen Patienten berichtet (Gogos et al., 2003).

Der mittlere SAPS II-Score des in dieser Arbeit untersuchten septischen Patientenkollektivs betrug 54 (Spannbreite 12 – 89). Im Vergleich mit den erwähnten Studien unterstreicht der Wert die Erkrankungsschwere der in der vorliegenden Untersuchung eingeschlossenen Patienten mit schwerer Sepsis. Der mittlere SAPS II-Wert im hier untersuchten SIRS-Kollektiv war mit im Mittel 16 Punkten signifikant niedriger ($p < 0,0001$). Dies kann als Ausdruck des im Vergleich zur schweren Sepsis mildereren Verlaufs des postoperativen SIRS interpretiert werden.

In Zusammenschau der hier diskutierten Ergebnisse kann gefolgert werden, dass zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Kollektiven deutliche Unterschiede hinsichtlich der Erkrankungsschwere und dem Ausmaß der systemischen Inflammation bestehen.

4.2 Immunpathogenese der Sepsis und das Fas-/FasL-System

Im Rahmen der Forschungen zur Immunpathogenese der Sepsis wächst das Interesse an der Rolle der Apoptose. Sowohl tierexperimentell als auch in klinischen Studien konnte eine vermehrte Lymphozytenapoptose während einer Sepsis nachgewiesen werden (Ayala et al., 1996; Hotchkiss et al., 1999a; Hotchkiss et al., 2001). Tierexperimentelle Studien, die außerdem zeigen konnten,

dass eine Hemmung der Lymphozytenapoptose das Überleben einer Sepsis verbessert, unterstreichen die mögliche Bedeutung der Lymphozytenapoptose in der Immunpathogenese der Sepsis (Hotchkiss et al., 1999b; Hotchkiss et al., 2000).

In der Literatur mehren sich die Hinweise auf einen Beitrag des Fas-/FasL-Systems im Zusammenhang mit der Sepsis. So zeigte sich im Mausmodell ein Überlebensvorteil durch eine Blockade des Fas-/FasL-Signalwegs (Chung et al., 2003). Die Gabe von Fas- und Kaspase-8-siRNA führte ebenfalls zur Verbesserung des Überlebens im Tiermodell (Wesche-Soldato et al., 2005a). Matsuda et al. konnten in einer aktuellen Studie zeigen, dass die Applikation von FADD-siRNA sowohl vor Apoptose als auch vor einer Inflammation des Lungengewebes schützte und folgerten daraus, dass die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose eine kritische Rolle im Rahmen der Entwicklung einer akuten Lungenschädigung (ALI) während der Sepsis spielt (Matsuda et al., 2009). Signifikant erhöhte Zahlen sowohl apoptotischer mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) als auch Fas-/FasL-positiver Lymphozyten wurden bei septischen Patienten beobachtet (Delogu et al., 2008). Diese Ergebnisse weisen auf die mögliche Bedeutung des Fas-/FasL-Systems im Rahmen der Immunpathogenese der Sepsis hin.

In einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte eine Kaspase-3-Aktivierung bei allen untersuchten Lymphozytenpopulationen in einem Patientenkollektiv mit schwerer Sepsis nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich in dieser Studie ein Genexpressionsmuster mit einer Induktion der proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder Bim, Bid und Bak sowie eine Herabregulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl (Weber et al., 2008). Um die Bedeutung des Fas-/FasL-Systems über die genetische Prädisposition hinaus zu untersuchen, sollte, neben den hier erhobenen epidemiologischen Daten, in einer zukünftigen Studie auch FasL im Blut gemessen und ggf. mit entsprechenden Promotorpolymorphismen korreliert werden. Sinnvoll wäre es auch, die Expression des Fas-Rezeptors zu bestimmen und zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen SNPs des Fas-Gens und der Fas-Rezeptorexpression besteht.

In der Promotorregion des humanen Fas-Gens wurden zwei SNPs beschrieben (Huang et al., 1997). Hierbei handelt es sich zum einen um den SNP Fas -670 A/G, zum anderen um den SNP Fas -1377 G/A. Im Bereich des SNPs Fas -1377 G/A befindet sich die Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors SP-1. Der SNP Fas -670 A/G tritt im Bereich der Konsensussequenz des Transkriptionselement GAS auf. Folglich könnten Änderungen der Basensequenz an diesen Stellen zum einen zu einer veränderten Bindung von SP-1 führen, zum anderen einen Einfluss auf

die Expression des Fas-Gen haben. Diese hätten dann eine funktionelle Bedeutung. Hier sollte in folgenden Studien auch der Einfluss des Genotyps auf die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Die Auswirkungen einer möglicherweise veränderten Bindung der genannten Transkriptionsfaktoren wären gerade in Hinblick auf mögliche Veränderungen in der Signaltransduktionskette sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene interessant. Bislang wurden sowohl positive als auch negative Assoziationen dieser SNPs mit verschiedenen Krankheitsbildern beschrieben (Chiappelli et al., 2006; Kanemitsu et al., 2002; Lai et al., 2003; Marin et al., 2006; Mullighan et al., 2004; Stuck et al., 2003). Studien im Bezug auf die Sepsis existieren bislang nicht.

4.3 Bedeutung der Promotorpolymorphismen Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A bei Patienten mit schwerer Sepsis

Aufgrund der vorhandenen Datenlage sollte der Zusammenhang zwischen den beiden beschriebenen SNPs und dem Auftreten einer Sepsis und dem Outcome der Patienten untersucht werden.

In der vorliegenden Studie war eine erfolgreiche Genotypisierung für beide Genotypen im Sepsiskollektiv bei 123 von insgesamt 159, im Blutspenderkollektiv bei 125 von insgesamt 139 und im SIRS-Kollektiv bei 78 Patienten für den SNP -670 und bei 73 von insgesamt 88 initial eingeschlossenen Patienten für den SNP -1377 möglich. Gründe dafür, dass eine Genotypisierung im Einzelfall nicht erfolgreich war, sind beispielsweise eine unzureichende Menge amplifizierbaren Materials oder ungenügende Sondenbindung. Weiterhin ist es möglich, dass eine unterschiedliche Qualität oder Lagerungsdauer der gewonnenen DNA einen Einfluss auf eine erfolgreiche Genotypisierung hatten.

Das septische Kollektiv wurde weiterhin auf Unterschiede in der Geschlechterverteilung bezüglich beider SNPs untersucht. Hier zeigten sich weder für den SNP Fas -670, noch für den SNP Fas -1377 signifikante Unterschiede hinsichtlich der Genotyp- und der Allelhäufigkeit. Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den beiden SNPs und dem Outcome der Patienten gibt, wurden die Genotyp- und Allelhäufigkeiten der überlebenden mit denen der im Rahmen der Sepsis verstorbenen Patienten verglichen. Im Hinblick auf den SNP Fas -1377 zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede. An Position Fas -670 wurde kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf die Genotypverteilung zwischen überlebenden und verstorbenen

Patienten gesehen. Jedoch zeigte sich ein Trend zum häufigeren Auftreten des G-Allels in der Gruppe der verstorbenen Patienten ($p = 0,0899$). Hierbei ist zu beachten, dass die beiden untersuchten Gruppen mit 73 überlebenden und 50 verstorbenen Patienten möglicherweise zu klein waren, um eine statistische Signifikanz an dieser Stelle zu erreichen. Untersuchungen an einem größeren Kollektiv wären erforderlich, um diesen Trend weiter zu untersuchen und einen möglichen Einfluss des Auftretens des G-Allels an Position Fas -670 auf das Outcome sicher nachweisen zu können. In dieser Hinsicht ist eine fehlende Poweranalyse in der vorliegenden Untersuchung als Einschränkung der Studie zu erwähnen. Es ist zu bedenken, dass das Überleben bzw. Versterben in dieser Untersuchung auf den Zeitraum bis zur Entlassung bezogen ist. Durch Festlegung definierter Endpunkte könnten sich andere Ergebnisse ergeben. Denkbar wären Untersuchungen in Bezug auf eine Assoziation zwischen Genotyp und z. B. der Länge der Behandlung, der benötigten Therapiemaßnahmen, des Überlebens bzw. Versterbens jeweils auf Intensivstation oder auf Normalstation bis zur Entlassung. In vielen Untersuchungen wird aufgrund der einfachen Erfassung jedoch das Überleben bis zum Zeitpunkt der Krankenhausentlassung als sinnvoll und praktikabel erachtet. In Hinblick auf ein Langzeitüberleben nach einer Sepsis wäre es in zukünftigen Studien jedoch auch sinnvoll, längere Zeiträume zu diesem Parameter zu untersuchen. Zu diskutieren wäre auch inwiefern der beobachtete Genotyp einen Einfluss auf die Lebensqualität haben kann. In einer prospektiven Studie wäre dann auch die Bestimmung der Mortalität in Bezug auf die Genotypverteilung möglich.

In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, dass Studien existieren, welche ebenfalls keine positive Assoziation zwischen den untersuchten Promotorpolymorphismen Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A und den in der jeweiligen Studie untersuchten Krankheitsbildern nachweisen konnten. Zhou et al. untersuchten die Assoziation zwischen Fas -1377G/A, Fas -670 A/G und FasL -844 T/C und dem Auftreten eines Kardiakarzinoms. Das Patientenkollektiv in der Studie von Zhou et al. umfasste 262 Patienten. Als Kontrolle dienten 524 gesunde Individuen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gesamtallel- und Genotypverteilung beobachtet werden. Allerdings wiesen, in der Subgruppe der Raucher, Individuen mit Genotyp AG an Position Fas -670 ein geringeres Risiko für die Entwicklung eines Kardiakarzinoms auf als Individuen mit dem Genotyp AA an dieser Stelle (Zhou et al., 2010). In einer weiteren Arbeit wurde die Assoziation zwischen dem Auftreten von Osteosarkomen und den SNPs in der Promotorregion Fas -1377 G/A und -670 A/G sowie SNPs der kodierenden Region untersucht.

Das Patientenkollektiv in dieser Studie umfasste 123 pädiatrische Patienten mit Osteosarkom, das Kontrollkollektiv 510 erwachsene Patienten ohne eine onkologische Erkrankung. Auch hier wurde keine Assoziation zwischen dem Risiko an einem Osteosarkom zu erkranken und den Promotorpolymorphismen Fas -670 und -1377 gefunden (Koshkina et al., 2007). Negative Assoziationen konnten aber nicht nur für Tumorerkrankungen, sondern auch für Autoimmunerkrankungen gezeigt werden. So beobachteten Huang et al keine Unterschiede hinsichtlich Genotyp- und Allelhäufigkeiten des SNPs Fas -1377 zwischen Patienten mit primärem systemischen Lupus erythematodes (n = 86) und dem Kontrollkollektiv (Huang und Manolios, 2000).

Zusätzlich zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Promotorpolymorphismen Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A wurden in einem Teil der beschriebenen Publikationen weitere Polymorphismen des Fas-Gens untersucht. So fanden Koshkina et al. zwar keine Assoziation zwischen den genannten Promotorpolymorphismen, konnten aber zeigen, dass der heterozygote Genotyp AG im Exon 3 des Fas-Gens mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein Osteosarkom einhergeht (Koshkina et al., 2007). Zhou et al. untersuchten zusätzlich einen Polymorphismus im Bereich des FasL-Gens, konnten allerdings keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Auftreten eines Kardiakarzinoms feststellen (Zhou et al., 2010). Im Rahmen weiterer Studien zum Zusammenhang zwischen Fas-/FasL-System und der Immunpathogenese der Sepsis ist zu diskutieren, zusätzlich zu Promotorpolymorphismen des Fas-Gens auch Polymorphismen im kodierenden Bereich des Fas-Gens oder Polymorphismen im Bereich des FasL-Gens zu untersuchen.

Wie in der vorliegenden Arbeit auch, handelt es sich in den geschilderten Arbeiten um Fall-Kontrollstudien mit verhältnismäßig kleinen Studienkollektiven. Größere Kollektive könnten z. B. im Rahmen von Multizenterstudien rekrutiert werden. Für genetische Untersuchungen im Rahmen der Sepsis könnte dies z. B. innerhalb bestehender Netzwerke (z. B. SepNet) erfolgen. Zusätzlich gibt es heutzutage neue Hochdurchsatzverfahren, die es ermöglichen mehr als nur eine Genvariation zu untersuchen (Kim und Misra, 2007). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass dennoch immer nur eine limitierte Zahl an Patienten in Studien eingeschlossen werden kann. Ferner stellt die Finanzierbarkeit eine weitere Limitation solch großer Genotypisierungsstudien dar, wobei die Kosten von Genotypisierungsverfahren in Zukunft sicherlich sinken dürften. Generelle Probleme, die bei der Korrelation genetischer Populationsstudien mit klinischen

Ereignissen auftreten können, umfassen beispielsweise eine unzureichende Kollektivgröße, die Heterogenität der Populationsuntergruppen, ethnische Unterschiede hinsichtlich der Allelverteilung einiger genetischer Polymorphismen oder nicht passender Kontrollgruppen (Watanabe et al., 2010). In Bezug auf die vorliegende Arbeit ist zu sagen, dass es sich hier um kaukasische Patientenkollektive handelte. Die Kontrollgruppen in der vorliegenden Arbeit zeigten keinen Unterschied bezüglich der Geschlechtsverteilung zwischen Sepsis- und Blutspenderkollektiv ($p = 0,2389$). Jedoch bestehen aus oben genannten Gründen Unterschiede in der Altersverteilung ($p < 0,0001$). Das SIRS-Kollektiv zeigte signifikante Unterschiede bezüglich beider Parameter. In Bezug auf das SIRS-Kollektiv ist einschränkend anzumerken, dass es sich hier ausschließlich um Patienten mit KHK handelt. Hierbei ist zu beachten, dass auch bei der Pathogenese dieser Erkrankung eine genetische Prädisposition diskutiert wird, die sich auf das Ergebnis dieser Untersuchungen auswirken könnte. Für die untersuchten Fas-Promotorpolymorphismen liegen jedoch aktuell keine Daten diesbezüglich vor. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten ergeben sich jedoch keine Hinweise auf einen genetischen Einfluss der untersuchten SNPs.

Weiterhin zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Größe zwischen Sepsis- und SIRS-Kollektiv. Das SIRS-Kollektiv war mit 88 eingeschlossenen Patienten deutlich kleiner als das Sepsis- und das Blutspenderkollektiv. Hier wurden kritisch kranke Patienten mit einer einzigen Grunderkrankung (KHK) eingeschlossen. Diese Begrenzung zur Definition eines Kollektivs kritisch kranker Patienten ohne Sepsis trägt zu dem beobachteten Unterschied bei. Eine größere Kollektivgröße wäre wünschenswert gewesen. Insbesondere bezüglich der Validierung des beobachteten Trends zum G-Allel an Position Fas -670 in der Gruppe der verstorbenen Sepsispatienten sind größere Patientenzahlen in zukünftigen Studien notwendig.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Genotyp- und der Allelhäufigkeiten für die SNPs Fas -670 und Fas -1377 zwischen den untersuchten Kollektiven zeigten. Die beiden SNPs sind demnach möglicherweise nicht als Marker zur Risikostratifizierung im Rahmen der Sepsis und des PIRO-Konzepts geeignet. Hinsichtlich des häufigeren Auftretens des G-Allels in der Gruppe der verstorbenen Patienten zeigte sich ein Trend. Dieser sollte in einer weiterführenden Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv weiter validiert werden.

5 Zusammenfassung

Die schwere Sepsis und der septische Schock stellen die Haupttodesursachen auf nichtkardiologischen Intensivstationen dar. Im Zusammenhang mit der Immunpathogenese der Sepsis gewinnt die Apoptose von Leukozyten an Interesse. Für die Aktivierung der Signalkaskaden der Apoptose spielen Todesrezeptoren eine zentrale Rolle. Der Fas-Rezeptor ist dabei ein wichtiges Bindeglied in der Signaltransduktionskette. Weiterhin gibt es Hinweise, dass es eine genetische Prädisposition für die Entwicklung und den Verlauf einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks gibt. Inwieweit genetische Varianten im Promotorbereich des Fas-Gens mit dem Auftreten und dem Schweregrad der Sepsis assoziiert sind, ist bislang nicht untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den SNPs Fas -670 A/G und Fas -1377 G/A in der Promotorregion des Fas-Gens und dem Auftreten einer Sepsis besteht. Ferner sollte untersucht werden, ob diese beiden SNPs einen Einfluss auf das Outcome der Sepsispatienten haben. Hierzu erfolgte bei 159 Patienten mit schwerer Sepsis, einem Kontrollkollektiv von 139 Blutspendern und 88 kardiochirurgischen Patienten mit einem SIRS eine Genotypbestimmung mittels Schmelzkurvenanalyse mit Hilfe des LightCyclers[®].

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Genotyp- und Allelverteilung beider SNPs zwischen den Kollektiven. Innerhalb des Sepsiskollektivs ergaben sich weder Unterschiede der Genotyp- und Allelverteilung zwischen männlichen und weiblichen noch zwischen überlebenden und im Rahmen der Sepsis verstorbenen Patienten. Jedoch zeigte sich ein Trend zum häufigeren Auftreten des G-Allels an Position Fas -670 in der Gruppe der verstorbenen Patienten.

Die Fas- 670 A/G und -1377 G/A Promotorpolymorphismen zeigen keine positive Assoziation mit dem Auftreten oder dem Outcome einer Sepsis. An Position Fas -670 existiert ein Trend zu einer höheren Frequenz des G-Allels bei den verstorbenen Patienten. Zur letztendlichen Klärung einer möglichen Assoziation dieses Allels und einer schlechteren Prognose sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen notwendig.

6 Anhang

Abstracts, Poster über diese Arbeit

Poster – 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DAC 2005), 16.-19.04.2005, München

Kneiseler G, Schewe JC, Weber SU, Lehmann LE, Hoeft A, Stüber F.

Der Promotorpolymorphismus -670 A/G des Apoptose-Rezeptors FAS ist nicht mit dem Auftreten und dem Überleben einer Sepsis assoziiert

Abstract CD-ROM - PO 1-3.5

Poster – 2nd International Congress „Sepsis and Multiorgan Dysfunction” der Deutschen Sepsis Gesellschaft, 07. – 10.09.2005, Weimar

Schewe JC, Kneiseler G, Weber SU, Lehmann LE, Kobilay M, Book M, Stüber F.

Fas death receptor gene promotor polymorphisms in Severe Sepsis

Infection 2005; 33 No 9 (Suppl. 1): 44 (060)

Poster – 35th Critical Care Congress of the Society of Critical Care Medicine (SCCM 2006), 07. – 11.01.2006, San Francisco, USA)

Schewe JC, Kneiseler G, Weber S, Lehmann LE, Book M, Hoeft A, Stüber F.

Fas gene promotor polymorphisms do not influence susceptibility to or outcome of severe sepsis

Crit Care Med 2005, Vol. 33, No. 12 (Suppl), A 133 (106-T)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellveränderungen während Apoptose und Nekrose.....	21
Abbildung 2: Signalkaskade des Fas-/FasL-Systems zur Apoptoseinduktion	25
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur des Fas-Gens und der Beziehung zwischen Exons und Struktur des Fas-Rezeptors	33
Abbildung 4: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)	42
Abbildung 5: Prinzip der Mutationsanalyse mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer....	43
Abbildung 6: Primer- und Sondenlokalisation für den SNP Fas -1377.....	44
Abbildung 7: Primer- und Sondenlokalisation für den SNP Fas -670.....	45
Abbildung 8: Beispiel einer erfolgreichen Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse des SNPs an Position Fas -670	51
Abbildung 9: Beispiel einer erfolgreichen Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse des SNPs an Position Fas -1377	52
Abbildung 10: Altersverteilung der Kollektive	54
Abbildung 11: Vergleich SAPS II-Werte der Sepsis- und der SIRS-Gruppe.....	55
Abbildung 12: Vergleich der PCT-Werte der Sepsis- und der SIRS-Gruppe	56
Abbildung 13: Absolute Allelhäufigkeiten für den SNP Fas -670 im Sepsis- und im Blutspenderkollektiv	60
Abbildung 14: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv	62
Abbildung 15: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. Blutspenderkollektiv	64
Abbildung 16: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv ...	65
Abbildung 17: Absolute Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe nach Geschlecht.....	67
Abbildung 18: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe nach Geschlecht ..	69
Abbildung 19: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Überleben	71
Abbildung 20: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Überleben	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock	15
Tabelle 2: Endgültige Primerkombination und Hybridisierungssonden für den SNP an Position Fas -1377 (Sequenzen entsprechend der Genbankeintragsnummer X87625)	44
Tabelle 3: Endgültige Primerkombination und Hybridisierungssonden für den SNP an Position Fas -670 (Sequenzen entsprechend Genbankeintragsnummer AY450925)	45
Tabelle 4: Reaktionsansatz (Mastermix) pro Kapillare für die Messung mit dem LightCycler® .	46
Tabelle 5: Einstellungen des LightCycler® zur Bestimmung des SNPs an Position Fas-670	47
Tabelle 6: Einstellungen des LightCycler® zur Bestimmung des SNPs an Position Fas -1377 ...	48
Tabelle 7: Genotyphäufigkeiten entsprechend des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts	50
Tabelle 8: Übersicht über die Charakteristika der untersuchten Kollektive. Vergleich jeweils gegen die Sepsisgruppe	53
Tabelle 9: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 im Sepsiskollektiv	57
Tabelle 10: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 im Blutspenderkollektiv	57
Tabelle 11: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -670 im SIRS-Kollektiv.....	57
Tabelle 12: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 im Sepsiskollektiv	58
Tabelle 13: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 im Blutspenderkollektiv	58
Tabelle 14: Vergleich der beobachteten und der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten absoluten Genotyphäufigkeiten des SNPs an Position Fas -1377 im SIRS-Kollektiv	59
Tabelle 15: Genotyphäufigkeit an Position Fas -670 Sepsiskollektiv vs. Blutspender.....	59
Tabelle 16: Allelhäufigkeit an Position Fas -670 Sepsiskollektiv vs. Blutspender	60
Tabelle 17: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv	61
Tabelle 18: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv.....	62
Tabelle 19: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. Blutspenderkollektiv.....	63

Tabelle 20: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. Blutspenderkollektiv	63
Tabelle 21: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv	64
Tabelle 22: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 Sepsis- vs. SIRS-Kollektiv	65
Tabelle 23: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Geschlecht.....	66
Tabelle 24: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Geschlecht.....	67
Tabelle 25: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Geschlecht....	68
Tabelle 26: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Geschlecht.....	68
Tabelle 27: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Überleben	70
Tabelle 28: Allelhäufigkeiten an Position Fas -670 in der Sepsisgruppe und Überleben.....	70
Tabelle 29: Genotyphäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Überleben	72
Tabelle 30: Allelhäufigkeiten an Position Fas -1377 in der Sepsisgruppe und Überleben.....	72

7 Literaturverzeichnis

Agha A, Bein T, Frohlich D, Hofler S, Krenz D, Jauch KW. "Simplified Acute Physiology Score" (SAPS II) in the assessment of severity of illness in surgical intensive care patients. *Chirurg* 2002; 73: 439-442

Aichinger E, Grimm T. 100 Jahre Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. *medgen* 2008; 20: 276-281

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171

Andersson J. The inflammatory reflex--introduction. *J Intern Med* 2005; 257: 122-125

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310

Aouifi A, Piriou V, Blanc P, Bouvier H, Bastien O, Chiari P, Rousson R, Evans R, Lehot JJ. Effect of cardiopulmonary bypass on serum procalcitonin and C-reactive protein concentrations. *Br J Anaesth* 1999; 83: 602-607

Aouifi A, Piriou V, Bastien O, Blanc P, Bouvier H, Evans R, Celard M, Vandenesch F, Rousson R, Lehot JJ. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of infection in cardiac surgical patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 3171-3176

Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995; 181: 1235-1238

Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993; 341: 515-518

Auriant I, Vinatier I, Thaler F, Tourneur M, Loirat P. Simplified acute physiology score II for measuring severity of illness in intermediate care units. *Crit Care Med* 1998; 26: 1368-1371

Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, Ayala CA, Chaudry IH. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood* 1996; 87: 4261-4275

Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* 1994; 24: 3057-3062

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995; 377: 630-632

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995; 270: 7795-7798

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101: 1481-1483

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177-186

Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 11): 1743-1753

Butler J, Rucker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 552-559

Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H, Ainaud P, Bohuon C. Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997; 23: 218-224

Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med* 1984; 76: 4-12

Cheng J, Liu C, Koopman WJ, Mountz JD. Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region. *J Immunol* 1995; 154: 1239-1245

Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, Jr., Matis LA. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997; 89: 17-24

Chiappelli M, Nasi M, Cossarizza A, Porcellini E, Tumini E, Pinti M, Troiano L, Franceschi M, Licastro F. Polymorphisms of fas gene: relationship with Alzheimer's disease and cognitive decline. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; 22: 296-300

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-512

Chung CS, Yang S, Song GY, Lomas J, Wang P, Simms HH, Chaudry IH, Ayala A. Inhibition of Fas signaling prevents hepatic injury and improves organ blood flow during sepsis. *Surgery* 2001; 130: 339-345

Chung CS, Song GY, Lomas J, Simms HH, Chaudry IH, Ayala A. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 344-351

- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-891
- Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 243-269
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8: 1229-1231
- Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, Haverich A, Schlag G, Borst HG. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1714-1720
- Czerny M, Baumer H, Kilo J, Lassnigg A, Hamwi A, Vukovich T, Wolner E, Grimm M. Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000; 17: 737-742
- Delogu G, Famularo G, Tellan G, Marandola M, Antonucci A, Signore M, Marcellini S, Moretti S. Lymphocyte apoptosis, caspase activation and inflammatory response in septic shock. *Infection* 2008; 36: 485-487
- Deutsche-Sepsis-Gesellschaft. Geschichte der Sepsis. 2010; Zugriffsdatum 01.06.2010; <http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Was+ist+Sepsis%3F/Geschichte+der+Sepsis?sid=FseumUe4M0unWrpw1118xM&iid=2>
- Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie* 2008; 31: 702-706
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50
- Endo S, Aikawa N, Fujishima S, Sekine I, Kogawa K, Yamamoto Y, Kushimoto S, Yukioka H, Kato N, Totsuka K, Kikuchi K, Ikeda T, Ikeda K, Yamada H, Harada K, Satomura S. Usefulness of procalcitonin serum level for the discrimination of severe sepsis from sepsis: a multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2008; 14: 244-249
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, 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, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606-618

- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998; 5: 551-562
- Fukuyama H, Adachi M, Suematsu S, Miwa K, Suda T, Yoshida N, Nagata S. Requirement of Fas expression in B cells for tolerance induction. *Eur J Immunol* 2002; 32: 223-230
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182: 1223-1230
- Gogos CA, Lekkou A, Papageorgiou O, Siagris D, Skoutelis A, Bassaris HP. Clinical prognostic markers in patients with severe sepsis: a prospective analysis of 139 consecutive cases. *J Infect* 2003; 47: 300-306
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312
- Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 917-924
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270: 1189-1192
- Gu YJ, Mariani MA, van Oeveren W, Grandjean JG, Boonstra PW. Reduction of the inflammatory response in patients undergoing minimally invasive coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: 420-424
- Hao Z, Duncan GS, Seagal J, Su YW, Hong C, Haight J, Chen NJ, Elia A, Wakeham A, Li WY, Liepa J, Wood GA, Casola S, Rajewsky K, Mak TW. Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. *Immunity* 2008; 29: 615-627
- Hartel U. [Gender issues in the epidemiology of cardiovascular diseases]. *Ther Umsch* 2007; 64: 297-304
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999a; 27: 1230-1251
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999b; 96: 14541-14546
- Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000; 1: 496-501

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001; 166: 6952-6963

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-150

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009; 361: 1570-1583

Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997; 34: 577-582

Huang QR, Manolios N. Investigation of the -1377 polymorphism on the Apo-1/Fas promoter in systemic lupus erythematosus patients using allele-specific amplification. *Pathology* 2000; 32: 126-130

Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Shimojo T, Abe S, Fujisaki H, Ito H, Yamakawa K, Kobayashi N, Kasajima T, Marumo F. The Fas/Fas ligand system is involved in the pathogenesis of autoimmune myocarditis in rats. *J Immunol* 1998; 161: 4695-4701

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243

Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993; 268: 10932-10937

Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, Moriwaki M, Nakajima H, Miyagawa J, Namba M, Makino S, Nagata S, Kono N, Matsuzawa Y. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1997; 186: 613-618

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354

Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, Otsuka T, Takeuchi T, Nagayama J, Kuwano M, Hara T. A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29: 1183-1188

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257

Khabar KS, elBarbary MA, Khouqeer F, Devol E, al-Gain S, al-Halees Z. Circulating endotoxin and cytokines after cardiopulmonary bypass: differential correlation with duration of bypass and systemic inflammatory response/multiple organ dysfunction syndromes. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 97-103

Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9: 289-320

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-5588

Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 1997; 3: 409-413

Koshkina NV, Kleinerman ES, Li G, Zhao CC, Wei Q, Sturgis EM. Exploratory analysis of Fas gene polymorphisms in pediatric osteosarcoma patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29: 815-821

Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000; 26 Suppl 1: S124-128

Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 279-289

Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, Katz JD. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 213-218

Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, Yu MH, Yu CP, Liu HS, Chang CC, Chu TY. Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 2003; 103: 221-225

Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993; 270: 2957-2963

Lehmann LE, Book M, Hartmann W, Weber SU, Schewe JC, Klaschik S, Hoeft A, Stüber F. A MIF haplotype is associated with the outcome of patients with severe sepsis: a case control study. *J Transl Med* 2009; 7: 100

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29: 530-538

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489

Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 569-579

- Linde-Zwirble WT, Angus DC. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care* 2004; 8: 222-226
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89: 175-184
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1028-1032
- Mabrouk I, Buart S, Hasmim M, Michiels C, Connault E, Opolon P, Chiocchia G, Levi-Strauss M, Chouaib S, Karray S. Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by Fas death receptor ligand expression on T cells. *Immunity* 2008; 29: 922-933
- Majetschak M, Flohe S, Obertacke U, Schroder J, Staubach K, Nast-Kolb D, Schade FU, Stüber F. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999; 230: 207-214
- Marin LA, Muro M, Moya-Quiles MR, Miras M, Minguela A, Bermejo J, Sanchez-Bueno F, Parrilla P, Alvarez-Lopez MR. Study of Fas (CD95) and FasL (CD178) polymorphisms in liver transplant recipients. *Tissue Antigens* 2006; 67: 117-126
- Marshall RP, Webb S, Hill MR, Humphries SE, Laurent GJ. Genetic polymorphisms associated with susceptibility and outcome in ARDS. *Chest* 2002; 121: 68S-69S
- Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 63-67
- Matata BM, Sosnowski AW, Galinanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 785-791
- Matsuda N, Yamamoto S, Takano K, Kageyama S, Kurobe Y, Yoshihara Y, Takano Y, Hattori Y. Silencing of fas-associated death domain protects mice from septic lung inflammation and apoptosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 806-815
- Meisel C, Hoflich C, Volk HD. [Immune monitoring in SIRS and sepsis based on the PIRO model]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133: 2332-2336
- Meisner M, Tschaikowsky K, Hutzler A, Schick C, Schuttler J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med* 1998; 24: 680-684
- Meisner M, Rauschmayer C, Schmidt J, Feyrer R, Cesnjevar R, Bredle D, Tschaikowsky K. Early increase of procalcitonin after cardiovascular surgery in patients with postoperative complications. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1094-1102
- Mimoz O, Benoist JF, Edouard AR, Assicot M, Bohuon C, Samii K. Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med* 1998; 24: 185-188

- Mullighan CG, Heatley S, Lester S, Rischmueller M, Gordon TP, Bardy PG. Fas gene promoter polymorphisms in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 98-101
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Kramer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365
- Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001; 15: 879-892
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; 267: 10709-10715
- Ogawa N, Dang H, Talal N. Apoptosis and autoimmunity. *J Autoimmun* 1995; 8: 1-19
- Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* 2000; 2: 291-299
- Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, Goodnow CC. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 1995; 376: 181-184
- Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 111-121
- Reinhart K, Karzai W, Meisner M. Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1193-1200
- Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, Gerlach H, Grundling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Werdan K. [Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]. *Anaesthesist* 2006; 55 Suppl 1: 43-56
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268: 1347-1349
- Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999; 13: 3179-3184

Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 1984; 159: 1-20

Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993; 177: 195-200

Rudert F, Visser E, Forbes L, Lindridge E, Wang Y, Watson J. Identification of a silencer, enhancer, and basal promoter region in the human CD95 (Fas/APO-1) gene. *DNA Cell Biol* 1995; 14: 931-937

Rudert F, Lindridge E, Lasham A, Wang Y, Grandison P, Watson J. Silencer and enhancer regions in the human CD95 (Fas/APO-1) gene with sequence similarity to the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter: binding of single strand-specific silencer factors and AP-1 and NF-AT-like enhancer factors. *DNA Cell Biol* 1998; 17: 991-1002

Rudi J, Kuck D, Strand S, von Herbay A, Mariani SM, Krammer PH, Galle PR, Stremmel W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1506-1514

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-933

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107: 489-506

Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401-410

Schroeder S, Borger N, Wrigge H, Welz A, Putensen C, Hoeft A, Stüber F. A tumor necrosis factor gene polymorphism influences the inflammatory response after cardiac operation. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 534-537

Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med* 2000; 28: 2793-2798

Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL, Skibola CF, Smith MT, Morgan GJ. Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2003; 63: 4327-4330

Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middleton LA, Choi Y, Fleisher TA, Lim MS, Jaffe ES, Puck JM, Lenardo MJ, Straus SE. Clinical, immunologic, and genetic features of an

autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 1997; 89: 1341-1348

Stranges PB, Watson J, Cooper CJ, Choisy-Rossi CM, Stonebraker AC, Beighton RA, Hartig H, Sundberg JP, Servick S, Kaufmann G, Fink PJ, Chervonsky AV. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* 2007; 26: 629-641

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009; 30: 180-192

Stuart PM, Griffith TS, Usui N, Pepose J, Yu X, Ferguson TA. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest* 1997; 99: 396-402

Stuck BJ, Pani MA, Besrouf F, Segni M, Krause M, Usadel KH, Badenhoop K. No association of two Fas gene polymorphisms with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 393-396

Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24: 381-384

Stüber F, Klaschik S, Lehmann LE, Schewe JC, Weber S, Book M. Cytokine promoter polymorphisms in severe sepsis. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 7: S416-420

Su X, Hu Q, Kristan JM, Costa C, Shen Y, Gero D, Matis LA, Wang Y. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2000; 164: 2523-2532

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997; 186: 2045-2050

Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; 76: 969-976

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14: 1129-1135

Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S, Hatake K, Drummond AH, Nagata S. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996; 2: 317-322

Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998; 4: 31-36

Tariverdian G, Buselmaier W. Humangenetik. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2004

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316

Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2006; 34: 1996-2003

van Veen T, Kalkers NF, Crusius JB, van Winsen L, Barkhof F, Jongen PJ, Pena AS, Polman CH, Uitdehaag BM. The FAS-670 polymorphism influences susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002; 128: 95-100

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53

Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994; 152: 5014-5021

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992a; 356: 314-317

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992b; 148: 1274-1279

Watanabe E, Buchman TG, Hirasawa H, Zehnbauser BA. Association between lymphotoxin-alpha (tumor necrosis factor-beta) intron polymorphism and predisposition to severe sepsis is modified by gender and age. *Crit Care Med* 2010; 38: 181-193

Weber SU, Schewe JC, Lehmann LE, Muller S, Book M, Klaschik S, Hoeft A, Stüber F. Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit Care* 2008; 12: R128

Wen AQ, Gu W, Wang J, Feng K, Qin L, Ying C, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX. Clinical relevance of IL-1beta promoter polymorphisms (-1470, -511, and -31) in patients with major trauma. *Shock* 2010; 33: 576-582

Wesche-Soldato DE, Chung CS, Lomas-Neira J, Doughty LA, Gregory SH, Ayala A. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood* 2005a; 106: 2295-2301

Wesche-Soldato DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Jones L, Chung CS, Ayala A. The role and regulation of apoptosis in sepsis. *J Endotoxin Res* 2005b; 11: 375-382

Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 67-71

Zhou RM, Wang N, Chen ZF, Duan YN, Sun DL, Li Y. Polymorphisms in promoter region of FAS and FASL gene and risk of gastric cardiac adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 555-561

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413

8 Danksagung

Folgenden Personen danke ich für ihre Unterstützung:

Herrn PD Dr. med. S. Weber für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. F. Stüber für seine Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. A. Hoeft für die Schaffung der strukturellen Voraussetzungen.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Jens-Christian Schewe für die tatkräftige Unterstützung und Anleitung, spannende Diskussionen sowie seine unkomplizierte Betreuung.

Außerdem möchte ich dem ganzen Laborteam - bestehend aus: Makbule Kobilay, Sabine Mering, Angelika Zoons, Dr. rer. nat. Bettina Bayerer, Dr. med. Malte Book, Dr. med. Lutz Lehmann - für ihre Hilfsbereitschaft, Anregungen und Diskussionen danken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für ihre emotionale Unterstützung.