

Aus der

**Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Zentrum für spezielle Chirurgie des Bewegungsapparates**

der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Gewebetrauma-induzierte Apoptose von Immun- und
Parenchymzellen – Die Rolle der T-Zellen***

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tim Drogies

aus Borna

Gutachter:

- 1. Prof Dr. med. W. Ertel**
- 2. Prof. Dr. med. A Pfeiffer**
- 3. Prof. Dr. med. C.-E. Heyde**

Datum der Promotion: 29.01.2010

Tabellen und Bilderverzeichnis	III
Abkürzungen	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Überblick	1
1.2. Thematische Grundlagen	2
1.2.1. Grundlagen der Immunität	2
1.2.2. Polytrauma.....	5
1.2.3. Pathophysiologie des Polytrauma	6
1.2.4. Apoptose.....	9
1.2.5. Immunität durch T-Zellen	13
1.3. Zielstellung.....	15
2. MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1. Materialien, Reagenzien, Geräte, Lösungen	16
2.1.1. Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.2. Geräte und Software.....	18
2.1.3. Puffer und Lösungen	19
2.2. Patienten	21
2.3. Methoden: Materialgewinnung.....	23
2.3.1. Blutaufarbeitung und T-Zell-Isolation	23
2.3.2. Konservierung und Lagerung der isolierten Zellen	24
2.3.3. RNA-Isolation und Quantifizierung	25
2.3.4. Proteinisolation und Quantifizierung	25
2.4. Methoden: Analytische Verfahren	26
2.4.1. TUNEL-Assay	26
2.4.2. Durchflusszytometrie/ FACS.....	27
2.4.3. RT-PCR	29
2.4.4. Western Blot	31
2.4.5. Kaspase-Assays	33
2.4.6. Statistik	34
3. ERGEBNISSE.....	35
3.1. Patienten	35
3.2. Zellzahlen	40
3.3. DNA-Fragmentation.....	41
3.4. Kaspase 3/7	42
3.5. bcl-2 und bax	43
3.6. Fas-Rezeptor (CD95) und TNF-Rezeptor (CD120a).....	45

3.7. Aktivitätsmarker CD25 und CD69	47
3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4. DISKUSSION	50
4.1. Patienten	51
4.2. Zellzahlen und Apoptose	55
4.3. Mitochondriale Apoptose	56
4.4. Rezeptorvermittelte Apoptose	58
4.5. CD25	60
4.6. Schlussfolgerungen	60
4.7. Einschränkungen	61
4.8. Vergleich mit aktuellen Ergebnissen	61
4.9. Ausblick.....	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATUR	66
7. ANHANG	71
7.1. Lebenslauf.....	71
7.2. Publikationsliste	72
7.3. Erklärung.....	73
7.4. Danksagung.....	74

Tabellen und Bilderverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition des systemic inflammatory response syndrome (SIRS).....	7
Tabelle 2: Materialien und Reagenzien	16
Tabelle 3: Plastikmaterial und Reaktionsgefäße.....	18
Tabelle 4: Geräte.....	18
Tabelle 5: Software.....	19
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	19
Tabelle 7: Beispielrechnung ISS für einen Studienpatienten	22
Tabelle 8: Unfallart	22
Tabelle 9: Patienten – Übersicht	22
Tabelle 10: Patienten – Details.....	35
Tabelle 11: Infektionen während des Klinikaufenthaltes.....	36
Tabelle 12: Operationen: Überblick	37
Tabelle 13: Operationen: detailliert.....	37

Bilderverzeichnis

Bild 1: Übersicht über die Aktivierung des Immunsystems nach einem Gewebetrauma .	5
Bild 2: Immunologische Status nach Polytrauma.....	8
Bild 3: Rezeptorvermittelte Apoptose	11
Bild 4: Kaspase-abhängige Apoptose.....	12
Bild 5: Negativselektion von T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	24
Bild 6: FACS: T-Zellen im FSC/SSC und Histogramm mit anti-CD3-PE	24
Bild 7: FACS: Lymphozytengate und Antikörperfärbung	28
Bild 8: Western Blot: Bestimmung der Proteingröße	33
Bild 9: Patienten im SIRS	39
Bild 10: Absolute und prozentuale Leukozytenzahlen nach Polytrauma.	40
Bild 11: T-Zell Anteil und Verhältnis CD4+/ CD8+ Zellen nach Polytrauma.....	41
Bild 12: TUNEL-Analyse: Färbung der T-Lymphozyten zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen	42
Bild 13: TUNEL: Fragmentation der DNA als Hinweis für Apoptose.....	42
Bild 14: Enzymassay: Kaspase 3/7	43
Bild 15: rt-PCR: bcl-2 und bax	44
Bild 16: rt-PCR: Quotient aus bax und bcl-2	44
Bild 17: Western Blot: bcl-2 und bax.....	45
Bild 18: Western Blot: densitometrische Auswertung von bcl-2 und bax	45
Bild 19: FACS: Einzeldarstellung CD95 auf CD4+ Zellen im Verlauf.....	46
Bild 20: FACS: CD95-Expression im Verlauf.....	46
Bild 21: FACS: CD120a-Expression im Verlauf	47
Bild 22: FACS: CD25-Expression im Verlauf.....	48
Bild 23: CD69-Expression im Verlauf	48

Abkürzungen

7-AAD	<u>7</u> - <u>A</u> mino- <u>A</u> ctinomycin- <u>D</u>
AICD	<u>A</u> ctivation- <u>i</u> nduced <u>c</u> ell <u>d</u> eath
AIS	<u>A</u> bbreviated <u>I</u> njury <u>S</u> cale
APAF-1	<u>A</u> poptotic <u>p</u> eptidase <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor 1
APC	<u>A</u> llo <u>p</u> hyco <u>c</u> yanin
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
CARS	<u>C</u> ompensatory <u>a</u> nti- <u>i</u> nflammatory <u>r</u> esponse <u>s</u> ndrome
CD	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
DC	<u>D</u> endritic <u>c</u> ell
DEPC	<u>D</u> iethyl <u>p</u> yro <u>c</u> arbonat
DISC	<u>d</u> eath <u>i</u> nducing <u>s</u> ignalling <u>c</u> omplex
DFG	<u>D</u> eutsche <u>F</u> orschungsgemeinschaft
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
EDTA	<u>E</u> thylenediaminetetraacetic <u>a</u> cid
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbant <u>a</u> ssay
FACS	<u>F</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting, <i>geschützte Handelsmarke von Becton Dickinson</i>
FADD	<u>F</u> as- <u>a</u> ssociated <u>d</u> eath <u>d</u> omain
FBS	<u>F</u> etales <u>b</u> ovines <u>S</u> erum
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyana <u>t</u>
HEPES	<u>H</u> ydroxyethylpiperazine- N'-2- <u>e</u> thane <u>s</u> ulfonic acid
IE	<u>I</u> nternationale <u>E</u> inheiten
IL	Interleukin
ISS	<u>I</u> njury <u>s</u> everity <u>s</u> core
ITS	Intensivtherapiestation
kDa	Kilodalton
MARS	<u>M</u> ixed <u>a</u> nti- <u>i</u> nflammatory <u>r</u> esponse <u>s</u> ndrome
MFI	<u>M</u> ean <u>f</u> luorescence <u>i</u> ntensity
MHC	<u>M</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> lass
MODS	<u>M</u> ulti <u>o</u> rgan <u>d</u> ysfunction <u>s</u> ndrome

MOF	<u>M</u> ulti <u>o</u> rgan <u>f</u> ailure
MOMP	<u>M</u> itochondrial <u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> ermeabilisation
NO	<u>N</u> itric <u>o</u> xide (Stickstoffmonoxid)
PAF	<u>P</u> latelet <u>a</u> ctivation <u>f</u> actor
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
RLU	<u>R</u> elative <u>l</u> ight <u>u</u> nits
RNA	<u>R</u> ibonuclein <u>a</u> cide
SIRS	<u>S</u> ystemic <u>i</u> nflammatory <u>r</u> esponse <u>s</u> ndrome
TC	<u>T</u> RI- <u>C</u> OLOR
TGF	<u>T</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
TNF	<u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor
TRADD	<u>T</u> NF- <u>r</u> eceptor <u>a</u> ssociated <u>d</u> eath <u>d</u> omain
ZNS	<u>Z</u> entralnervensystem
β-ME	<u>B</u> eta- <u>M</u> ercapto <u>e</u> thanol

1. Einleitung

1.1. Überblick

Patienten mit schweren und multiplen Verletzungen stellen höchste Ansprüche an das diagnostische und therapeutische Handeln. Trotz neuester und multimodaler Behandlungsstrategien sind posttraumatische Komplikationen häufig und oft lebensgefährlich. Durch Verbesserungen im initialen Polytraumamanagement und bei der anschließenden intensivmedizinischen Stabilisierung, erweist sich die durch das Trauma ausgelöste Suppression wichtiger Funktionen des Immunsystems zunehmend als Herausforderung in der weiteren Behandlung [1-4]. Diese Arbeit beschreibt einen Teil der immunologischen Abläufe in schwerverletzten Patienten und soll damit das Verständnis dieser Vorgänge erweitern und einen Ausblick auf diagnostische und therapeutische Konsequenzen diskutieren.

Schwere Gewebeschäden entstehen meist durch Krafteinwirkung bei Verkehrsunfällen, Stürzen, Traumen im Rahmen suizidaler Absicht oder vergleichbaren Ereignissen. Dabei kommt es vor allem zu Frakturen und Weichteildefekten der Extremitäten und des Kopfes, sowie zu Verletzungen der inneren Organe, zum Beispiel Lunge, Milz und Leber. Werden die unmittelbaren, schwerwiegendsten Verletzungsfolgen wie primäre Schädigung des ZNS oder ein hämorrhagischer Schock durch massive Blutverluste überlebt, und gelingt die Stabilisierung des Verletzten, spielen für die spätere Mortalität vor allem sekundäre ZNS-Schädigungen und die pathologischen Zustände Sepsis und Multiorgandysfunktion/ -versagen eine entscheidende Rolle. Neben den vielfältigen Veränderungen im Stoffwechsel mit konsekutiver Störung der einzelnen Organfunktionen [5] ist das Ausbleiben einer adäquaten Immunantwort eine wichtige Ursache bei der Entwicklung dieser Verhältnisse [1, 6]. Das zelluläre Immunsystem übernimmt nach Polytrauma wichtige Aufgaben in der Reintegration von Geweben und der Infektabwehr, welche signifikant durch das jeweilige inflammatorische Milieu beeinflusst werden [7]. In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten von humanen T-Lymphozyten nach schwerem Gewebetrauma untersucht und die Ergebnisse im Kontext der bekannten und vermuteten Vorgänge nach Polytrauma besprochen.

1.2. Thematische Grundlagen

1.2.1. Grundlagen der Immunität

Das Immunsystem bewahrt die Integrität des Individuums und benötigt ein breites Spektrum an Effektormechanismen, um Krankheitserreger und körperschädigende Abläufe zu erkennen und limitierend zu beeinflussen. Dabei unterscheidet man grundlegend die Funktionen der angeborenen (unspezifischen) Abwehr von denen der erworbenen (adaptiven) Immunität.

Angeborene Immunität

Zu dieser ersten Gruppe von Mechanismen gehören vor allem physikalische und chemische Barrieren wie Haut, Schleimhäute oder Fieber, und weiterhin die Fähigkeit zur Phagozytose, welche vor allem Zellen des retikuloendothelialen Systems, zum Beispiel Makrophagen und neutrophile Granulozyten, besitzen. Natürliche Killerzellen, eine lymphatische Zelllinie, enthalten zytotoxische Granula und vernichten unter anderem virusinfizierte Zellen. Des Weiteren wirkt die Komplementkaskade als ein durch Kontakt mit bakteriellen Oberflächen oder Antigen-Antikörper-Komplexen ausgelöstes System aus Plasmaproteinen, welches an Mikroorganismen proteolytische Vorgänge verursacht. Durch Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung der Kapillarwände und zelluläre Infiltration mit Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen oder natürlichen Killerzellen entsteht die klassische Entzündungsreaktion mit den Komponenten *calor*, *dolor*, *rubor* und *tumor* (Überwärmung, Schmerz, Rötung und Schwellung).

Bei schwerem Gewebetrauma sind Oberflächen von Epithelien und Endothelien verletzt. Die einsetzende Blutgerinnung ist eng verwoben mit der Komplementkaskade, deren Mitglieder wie Faktor Xa, Thrombin oder tissue factor VIIa-Komplex für ihre proinflammatorischen Wirkungen bekannt sind [8, 9]. Die angeborene Immunität überbrückt die Zeit bis zur Wirkung der erworbenen Immunreaktionen und begrenzt die Infektion oder Schädigung. Die durch sie induzierten Reaktionen der adaptiven Immunität beruhen vor allem auf der Antigenpräsentation durch Zellen der angeborenen Immunität, sowie der Wirkung von Zytokinen und Chemokinen. Zytokine sind kleine, auto-, para- und endokrin wirkende Proteine wie IL (Interleukin)-1, welche ihre Information durch Rezeptorbindung übermitteln. Chemokine sind eine Klasse der Zytokine mit chemotaktischer und entzündlicher Wirkung. Sie sind die wichtigsten Boten

für interzelluläre Kommunikation. IL-8 ist ihr potentester Vertreter. In der Inflammation und bei der Entwicklung der erworbenen Immunantwort sind Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha), IL-1 β und IL-6 und IL-8 von zentraler Bedeutung [3, 10]. Makrophagen als Sekretoren von TNF-alpha, IL-6, Interferon-gamma (IFN-gamma) und weiteren Zytokinen bilden, auch durch die Gegensteuerung durch T-Zellen, einen Drehpunkt in der Regulation zwischen angeborener und erworbener Immunität.

Erworbene Immunität

Die adaptive Immunität zeichnet sich durch Diversität, Spezifität und Gedächtnis aus und ist vor allem antikörpervermittelt und zellulär getragen. Zwei wichtige Zelltypen sind Lymphozyten, welche nach ihrem Prägungsort entweder B- (Bursa, bone) oder T (Thymus)-Lymphozyten genannt werden. Während T-Zellen funktionell assistierend oder direkt vor allem gegen intrazelluläre Krankheitserreger agieren, begründen B-Zellen durch die Produktion von Antikörpern die humorale Immunität. Die antigenspezifische zelluläre Abwehr und Antikörperproduktion sowie die klonale Vermehrung von Effektorzellen sind die zentralen Prinzipien der erworbenen Abwehr.

Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort erfolgt nicht nur über direkten Antigenkontakt, sondern überwiegend durch spezialisierte Zellen, welche Antigene "vorzeigen". Die dendritische Zelle (DC) ist die wichtigste dieser antigenpräsentierenden Zellen (APC). Ein Beispiel für DC sind die Langerhans-Zellen der Haut. Als Teile des angeborenen Immunsystems nehmen dendritische Zellen in Infektionsherden Antigene auf und migrieren anschließend in lokale Lymphareale. Dort reifen sie, ändern grundlegend Morphologie und Funktion und exprimieren kostimulierende und adhäsive Moleküle, um den permanent durch Blut und Lymphgewebe wandernden naiven T-Zellen hocheffizient Antigene zu präsentieren. Diese Präsentation ist Hauptaufgabe der DC, die zahlenmäßige Vernichtung von Antigenen durch Phagozytose spielt eine untergeordnete Rolle. Weitere APC sind gewebständige Makrophagen, die vor allem im Bindegewebe, im Gastrointestinaltrakt, sowie in der Lunge und in Leber und Milz zu finden sind. Sie nehmen ständig Mikroben und partikuläre Antigene auf und können so bei verschiedenen Infektionsformen Immunreaktionen auslösen oder auch nur Phagozytose betreiben (zum Beispiel die Kupffer-Zellen der Leber). Diese Makrophagen können im Gegenzug durch aktivierte T-Zellen für eine verbesserte Immunantwort und Phagozytoseleistung ihrerseits aktiviert werden. Die B-Zellen als dritte wichtige Gruppe der APC wandern durch Lymphgewebe, sammeln sich in

Follikeln und nehmen vor allem lösliche Antigene, zum Beispiel Bakterientoxine, über Antikörperbindung und Phagozytose auf. Die prozessierten Fragmente werden dann über MHC (major histocompatibility complex) Klasse II präsentiert. Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) sind membrangebundene Glykoproteine, welche zentrale Bedeutung unter anderem in der Antigenerkennung durch T-Zellen haben.

T-Zellen

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist weit über das Spektrum der genetischen Codierung hinaus durch Rekombination von Genabschnitten variabel. Mit ihm erkennt die T-Zelle Antigene, die zusammen mit MHC-Proteinen auf der Oberfläche, vor allem von APC, präsentiert werden. Zur Aktivierung ist neben der Erkennung des Antigens ein zweites, kostimulatorisches Signal notwendig, ohne welches die T-Zelle in Anergie fällt und stirbt. Diese Abhängigkeit von der Kostimulation soll eine Aktivierung gegen körpereigene Zellen verhindern. Nach diesem *priming* entwickeln sich CD4+ (positive) T-Zellen weiter zu bewaffneten Effektorzellen, welche entweder in den Lymphfollikeln verbleiben und B-Zellen aktivieren oder an den Ort der Entzündung migrieren und im Gewebe, insbesondere durch die Aktivierung von Makrophagen, zelluläre Immunantworten auslösen. CD8+ T-Zellen sind zytotoxische Zellen, die Antigene erkennen, welche über MHC I präsentiert werden. Sie agieren vor allem gegen virusinfizierte Zellen, in welchen sie den programmierten Zelltod auslösen.

B-Zellen

Der humorale, antikörperbasierte Teil der adaptiven Immunität wird von B-Zellen realisiert. Für die Aktivierung wird ein zweites Signal benötigt. Dieses kommt in den häufigsten Fällen von antigenspezifischen T-Helfer-Zellen und wird entscheidend über CD40 vermittelt. B- und T-Zelle müssen dabei auf dasselbe Antigen reagieren. Manche Antigene können jedoch auch direkt den zweiten Stimulus triggern. In einer zweiten Phase sammeln sich B-Zellen in primären Lymphfollikeln und proliferieren zu Plasmazellen. Diese produzieren Antikörper, welche auf B- und Mastzellen vorkommen oder frei im Plasma vorliegen. Freie Antikörper binden Antigene und markieren sie für weitere Effektoren wie Makrophagen (Opsonierung), oder lösen auf dem klassischen Weg die Komplementkaskade aus. Die Vielfalt der Antikörper ermöglicht das Erkennen einer unüberschaubaren Anzahl von auch neuen Antigenen. Möglich wird diese Vielfalt, wie auch beim T-Zell-Rezeptor, vor allem durch drei Mechanismen: 1) die Gene für die

einzelnen Domänen der Antikörperketten liegen in verschiedenen Varianten vor, 2) die Genregionen sind einer hohen Mutationsrate unterworfen und 3) durch Rekombination von Domänen wird eine weitere Auswahl möglich [11, 12].

Durch das schwere Gewebetrauma werden alle Mechanismen des Immunsystems aktiviert (Bild 1) [8]. Es müssen nicht nur Gewebeschäden mit Hilfe der beteiligten Systeme repariert, sondern vor allem auch eindringende Krankheitserreger erkannt und abgewehrt werden. Nicht nur über offene Wunden, auch bei Operationen (*second hit*) und zusätzlichen Phänomenen wie temporärer Darmatonie und Schädigung der Darmwand, kommt es zur Invasion von Mikroorganismen. Fehlfunktionen oder ein Versagen der Immunantwort können somit besonders dramatische Auswirkungen haben.

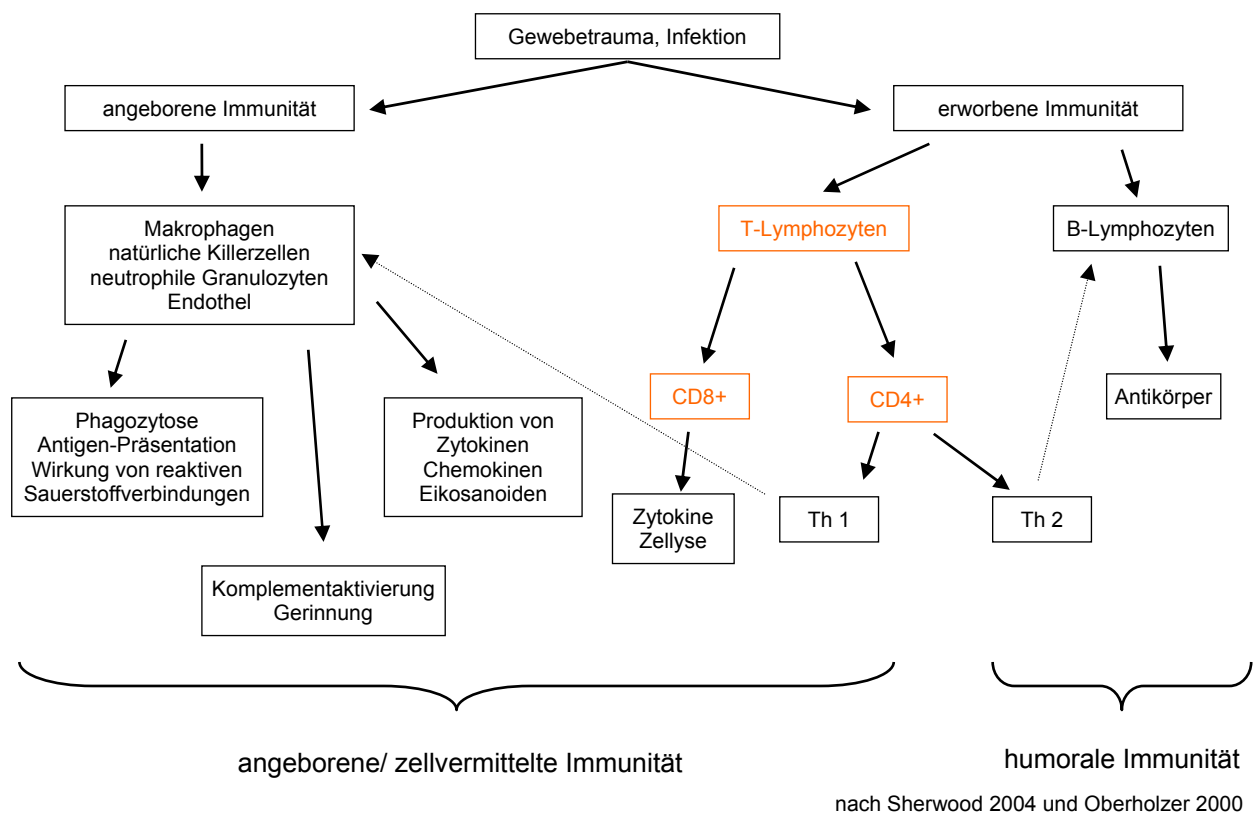


Bild 1: Übersicht über die Aktivierung des Immunsystems nach einem Gewebetrauma

T-Lymphozyten als Gegenstand dieser Arbeit übernehmen eine zentrale Rolle als Effektoren und Steuerungselemente im Geschehen nach schwerem Gewebetrauma.

1.2.2. Polytrauma

Als Polytrauma bezeichnet man nach Tscherne Verletzungen mehrerer Körperregionen, die einzeln oder in ihrer Gesamtheit lebensbedrohlich sind. In Deutschland sind 70 –

80 % der Fälle die Folge eines Verkehrsunfalls, wobei der Altersgipfel zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr liegt. Diagnostik und Therapie erfolgen nach vorbereiteten Organisationsabläufen zeitnah und möglichst in Zusammenarbeit verschiedener Fachdisziplinen wie Unfallchirurgie, Anästhesiologie, Radiologie, Neurochirurgie, Urologie und Gynäkologie. In der Akutphase (3 Stunden) werden unaufschiebbare Sofortoperationen vitaler Indikation durchgeführt. Es schließt sich die intensivmedizinische Stabilisierung in der Primärphase (bis 72 Stunden) an. In dieser Zeit werden Organverletzungen des Thorax, Hohlorganverletzungen des Bauches, offene Frakturen, Kompartmentsyndrome und vergleichbare Schäden operativ versorgt. In der Sekundärphase (3. bis 10. Tag) werden operative Verfahrenswechsel durchgeführt. In diesem Zeitraum kann es zur Entgleisung des Gesamtorganismus bis hin zum Multiorganversagen kommen, welches dann die häufigste Todesursache darstellt [5].

1.2.3. Pathophysiologie des Polytrauma

Die durch das Trauma bedingten Veränderungen im Organismus werden zusammenfassend auch als Postaggressionssyndrom postuliert. Sie haben Einfluss auf die Funktion und die Durchblutung von Organen wie Niere, Lunge und Leber, auf den Stoffwechsel von Glukose, Laktat, Proteinen und Lipoproteinen sowie die Homöostase von Elektrolyten wie Kalium und des Säure-Basen-Status [5, 13]. Auch das Immunsystem ist mit seinen humoralen und zellulären Bestandteilen nach dem Unfall entscheidend involviert, denn eine Immunantwort mit Aktivierung der angeborenen und erlernten Abwehr wird nicht nur durch Antigene und Mikroorganismen induziert. Nach dem *danger model* [14, 15] führen auch endogene Signale der Verletzung wie Hitze-Schock-Proteine und direkte Zellschädigung zu einer Immunantwort. Das Trauma macht in einer Reihe von Geweben zelluläre Strukturen sichtbar, die normalerweise für das Immunsystem nicht zugänglich sind, Gebhard spricht vom "antigenic load" [4]. Weiterhin kommt es gerade nach einem Trauma zur direkten Invasion von Mikroorganismen durch die offenen Verletzungen oder mit zeitlicher Latenz zur sekundären Besiedelung aus dem Gastrointestinaltrakt nach Ischämie und Reperfusion.

Die induzierten immunologischen Vorgänge zeigen anfangs einen aktivierten Verlauf – das angeborene Immunsystem reagiert stark auf die Schädigung. Ausgelöst durch die lokale und systemische Wirkung von Mediatoren wie Zytokinen, Chemokinen,

Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteinen, neuroendokrinen Transmittern und Hormonen wie Katecholaminen und Glukokortikoiden, ist dieses Stadium charakterisiert durch die Produktion von proinflammatorischen Botenstoffen wie TNF-alpha, IL-1, IL-6, IFN-gamma und IL-12 mit Wirkung auf die Blutgerinnung, die Komplementkaskade, die Akute-Phase-Reaktion und das Kallikrein-Kinin-System. Es kommt zu einer Aktivierung immunkompetenter Zellen, vor allem von segmentkernigen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Die Induktion von Adhäsionsmolekülen erlaubt den Zellen am Endothel zu haften, dieses zu durchdringen und lokal im verletzten Gewebe zu akkumulieren. Um das Gleichgewicht zwischen adäquater Immunreaktion und überschießender Selbstschädigung zu erhalten, sowie die Reaktion auf den Ort der Schädigung zu begrenzen, werden auch anti-inflammatorische Signale versandt. Botenstoffe wie IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF-β sind die wichtigsten Mediatoren [10].

Schwer verletzte Patienten haben ein hohes Risiko für eine zu starke Inflammation, insbesondere dann, wenn sie durch eine Operation oder eine Infektionen ein zweites Trauma, einen *second hit* erhalten. Die unkontrollierte und überschießende Produktion von inflammatorische Mediatoren in den geschädigten Gewebemassen und ihr Übertritt in den Blutkreislauf verstärken die systemische Wirkung. Im Zusammenhang mit klinischen Eindrücken wird vom SIRS, dem *systemic inflammatory response syndrome* gesprochen (Tabelle 1) [7, 10, 16-20], diese Bezeichnung stammt ursprünglich aus den Beschreibungen der Vorgänge bei Sepsis. Eine häufige und dramatische Komplikation dieser Patienten ist die Funktionseinschränkung lebenswichtiger Organe im Rahmen eines MODS (multi organ dysfunction syndrome) mit konsekutiver Ausprägung eines Multiorganversagens (MOF). Da hierbei keine Infektion beteiligt sein muss, wird manchmal auch vom "sterilen Schock" gesprochen.

Tabelle 1: Definition des systemic inflammatory response syndrome (SIRS)

1)	Herzfrequenz > 90/ Minute
2)	Atemfrequenz > 20/ Minute, bzw. Hyperventilation mit CO ₂ Partialdruck-Abfall < 32 mmHg
3)	Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C
4)	Leukozyten >12 G/l oder < 4 G/l Blut

Für die Definition SIRS müssen 2 oder mehr Kriterien erfüllt sein. Sepsis ist definiert als SIRS mit entzündlichem Fokus oder einem pathologischem Keimnachweis.

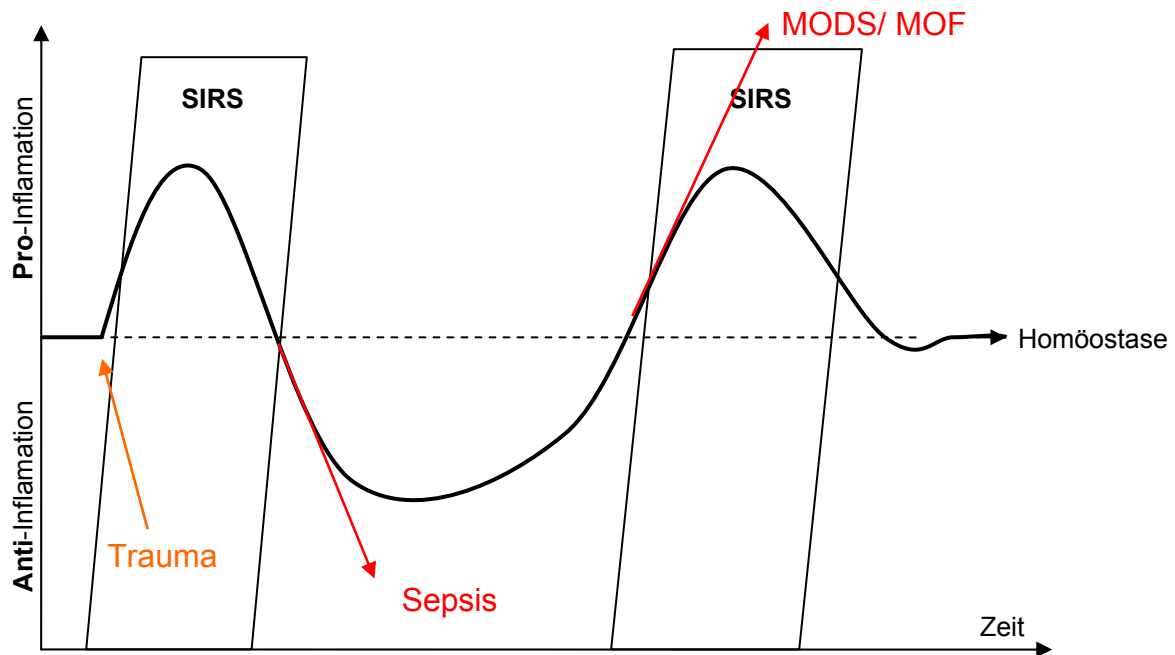


Bild 2: Immunologische Status nach Polytrauma

Im zeitlichen Verlauf durchläuft der Patient verschiedene inflammatorische Phasen. Die initiale, überschießende Inflammation (SIRS) auf den Reiz Trauma wird durch gegenregulatorische Mechanismen abgelöst von einer kompensatorischen Phase, die geprägt ist von mangelnder Reaktivität der beteiligten Systeme. Wird eine überschießende Reaktion nicht unter Kontrolle gebracht, können sich daraus MODS, ARDS und MOF entwickeln.

Durch die Wirkung von TNF alpha, IL-1, IL-6 und weiteren Chemokinen sowie der überschießenden Produktion von distalen Mediatoren wie NO, PAF (Platelet activation factor) und Prostaglandinen kommt es hier zu endothelialen Veränderungen, Mikrozirkulationsstörungen, disseminierter intravasaler Gerinnung und Hypotension mit schlechter Organdurchblutung, gefolgt von nekrotischem Zelltod.

In Bild 2 sind die alternierenden Abläufe der Inflammation gezeigt, welche vor allem von Teilen des Immunsystems getragen werden. Wird die Aktivierung zu stark begrenzt und folgt daraus eine Paralyse des Immunsystems spricht man auch vom CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome), wobei die überschießende Einschränkung von immunologischen Kontrollmechanismen eine Infektion begünstigen und in einer Sepsis enden kann.

In Sepsis wurde die Zunahme der lymphatischen Apoptose, des programmierten Zelltodes, als negativer Einfluss auf die Immunität des Wirtes gezeigt [21]. Der direkte Zusammenhang zwischen Lymphopenie und verringertem Outcome lässt darauf schließen, dass diese Vorgänge den Patienten für sekundäre opportunistische Infektionen, Sepsis, MODS, Multiorganversagen und erhöhte Sterblichkeit prädestinieren [22].

Anders als in septischen Patienten mit unterschiedlichsten Grunderkrankungen sind für die Vorgänge nach schwerem Gewebetrauma Zeitabhängigkeiten und molekulare Abläufe noch nicht umfangreich erforscht. Zu den klinischen Veränderungen bei Ausprägung des SIRS wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit Erklärungen auf zellulärer und molekularer Ebene gesucht, welche die Art und den Ablauf der Immunantwort besser beschreiben. Die Zellen des Immunsystems sind in diesem Stadium in ihren Schlüsselfunktionen beeinträchtigt und können durch Funktionsstörungen, Zellzahlverminderungen und/ oder chronische Aktivierung ihre physiologischen Wirkungen nicht adäquat entfalten. Sie bieten deshalb einen interessanten Fokus für nähere Untersuchungen um das Verständnis über die ablaufenden Vorgänge zu erweitern und gegebenenfalls die Grundlagen für therapeutische Ansätze zu schaffen [23, 24].

1.2.4. Apoptose

Das kontrollierte Absterben von Zellen ist ein wichtiger Regulationsmechanismus für den Organismus. Im Unterschied zur Nekrose, bei der die Membranintegrität zusammenbricht und die Zellbestandteile im Rahmen einer inflammatorischen, pathologischen Reaktion beseitigt werden, ist Apoptose (griech. apoptosis, Fallen von Blättern) charakterisiert durch Fragmentation und Kondensation von Kern und DNA durch endogene Nukleasen, welche die DNA zwischen den Nukleosomen in Fragmente von jeweils 200 Basenpaaren schneiden [25]. Weiterhin sind Veränderungen in der Membranstruktur und das Fehlen einer Entzündungsreaktion kennzeichnend.

Apoptose spielt eine entscheidende Rolle in der Homöostase von Geweben; auch bei Lymphozyten werden darüber die Größe des Zellpools und das Absterben von funktionell unbrauchbaren Zellen gesteuert. Es wird angenommen, dass Apoptose auch während der Inflammation den Schlüsselmechanismus zur Kontrolle von Immunzellen darstellt [25-27].

In Lymphozyten sind zwei wichtige Wege zur Auslösung von Apoptose beschrieben. Der durch Aktivierung ausgelöste Zelltod ist rezeptor-vermittelt und wird aktiv durch die Bindung von Liganden ausgelöst (AICD – activation-induced cell death). Für T-Zellen ist besonders detailliert die Wirkung des Rezeptors Fas (CD95) beschrieben. Ausgelöst werden, wie bei alternativen Induktionswegen auch, Reaktionen von Kaspasen, die untrennbar mit den Abläufen der Apoptose verbunden sind. Kaspasen sind Enzyme, die antiapoptotische Proteine inaktivieren und sich gegenseitig

kaskadenartig aktivieren. Der passive, intrinsische, mitochondriale Weg beruht auf einem Mangel an stimulierenden Überlebensreizen, zum Beispiel durch Wachstums- oder aktivierende Kofaktoren [26].

TNF-Rezeptor vermittelte Apoptose

TNF-alpha bindet in seiner löslichen Form (17 kDa) durch Ligandenbindung an zwei strukturell unterschiedliche Rezeptoren und überträgt damit sowohl inflammatorische als auch apoptotische Signale. Der Rezeptor TNF-R2 (p75) vermittelt Überlebensreize und bedingt eine Aktivierung über die Induktion der Zytokinproduktion. Der Rezeptor CD120a (TNF-R1, p55) ist ein transmembranes Glykoprotein, welches auf der zytoplasmatischen Seite eine sogenannte Todesdomäne aufweist. Diese stellt die Schaltstelle zur Induktion von Apoptose dar. Nach Bindung von trimerem TNF-alpha bildet auch der Rezeptor die trimere Form aus. Durch Protein-Protein-Wechselwirkung binden Adapterproteine wie TRADD (TNF-receptor-associated death domain). Über eine zweite Todesdomäne wird die Kaspase 8 in ihre enzymatisch aktive Form verwandelt und eine Proteasenkaskade aktiviert [25, 26].

Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose

Der Fas-Ligand (FasL) ist ein 40 kDa großes integrales Membranprotein, welches durch Metalloproteinasen in eine lösliche Form prozessiert werden kann. Es wird nach Aktivierung durch Antigene und IL-2 von T-Lymphozyten gebildet. CD95 (Fas-Rezeptor) ist der adäquate Rezeptor für FasL, welches an derselben oder benachbarten Zellen wirkt. Durch die Anlagerung von trimerem FasL konfluiert monomeres Fas in eine ebenfalls trimere Form. Das 45 kDa schwere transmembrane Glykoprotein wird unter anderem auch als APO-1, Fas (antigen) oder TNFRSF6 bezeichnet und gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie. FasL bindet hieran über Vernetzung, was zur Bindung von intrazellulärem FADD (Fas-associated death domain protein) im Bereich der Todesdomäne führt. An FADD wiederum bindet die inaktive Form der Kaspase 8, welche nun durch autokatalytische Vorgänge in die Lage versetzt wird, Effektor-kaspasen zu aktivieren und damit Apoptose über den extrinsischen Weg zu triggern. Dieses Konglomerat wird auch als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet, dessen Schlüsselmoleküle FADD und Kaspase 8 sind [28]. Die über FasL/Fas vermittelten Wirkungen sind deutlich ausgeprägter als die über den TNF-alpha vermittelten Weg [11].

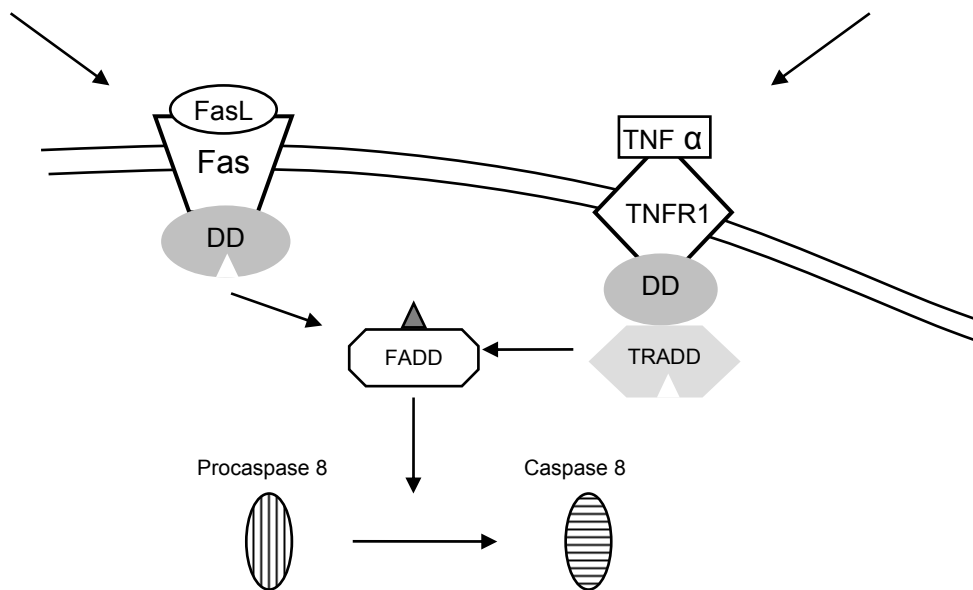


Bild 3: Rezeptorvermittelte Apoptose

Extrazelluläre Signale erkennt der Lymphozyt unter anderem mit spezifischen, transmembranen Rezeptoren, die über ihre zytoplasmatische Domäne intrazellulär Todessignale weiter vermitteln. Entscheidend für die hier gezeigten Wege ist die Einleitung einer Kaspasekaskade über die Aktivierung der Caspase 8.

Mitochondrial vermittelte Apoptose

Bei der Typ 2-Apoptose (intrinsischer Weg, mitochondriale Apoptose) sind die Mitochondrien an der Auslösung von Apoptose beteiligt, indem sie Proteine freisetzen, welche die Aktivierung einer Kaspasekaskade induzieren. Vor allem Cytochrom c ist dabei von Bedeutung. Das Protein ist normalerweise in die oxidative Phosphorylierung als Elektronencarrier eingebunden. Gelangt es bei der Schwellung der Mitochondrien mit Veränderungen der Membranpermeabilität ins Zytosol, bildet es einen Komplex mit Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1), welcher Kaspasen aktivieren kann. Dieser Vorgang wird auch MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilisation) genannt [29]. Bei langsamerem Ablauf können außerdem Veränderungen im Redoxpotential und dem Elektronentransport der oxidativen Phosphorylierung zum Absterben der Zelle im Sinne eines nekrotischen Zelltodes führen. Dieser Weg wird aktiviert durch den Mangel an Wachstumsfaktoren wie IL-2, IL-4, durch NO oder auch externe Stressoren wie Glukokortikoide.

Die Rolle der Kaspasen

Kaspasen sind Cystein enthaltende Aspartat-spezifische Proteasen, von denen einige durch Spaltung von Substraten als Initiatoren für apoptotische Prozesse und die

Aktivierung von weiteren Kaspasen verantwortlich sind [30]. Sie liegen im Plasma als kontinuierlich exprimierte Proenzyme vor, die durch proteolytische Vorgänge in ihre aktive Form überführt werden. Durch die von den oben beschriebenen Rezeptoren vermittelten Signale wird zuerst die Kaspase 8 aktiviert, die ihrerseits die Prokaspase 3 in ihre aktive Form überführt. Dieses Schlüsselenzym der Apoptose wird auch durch die Kaspase 9 aktiviert, welche durch den Apaf-1-Cytochrom c-Komplex aus dem mitochondrialen Weg einbezogen wird. Die Kaspasekaskade mündet in die Aktivierung einer caspase-aktivierbaren DNAse (CAD), die in den Zellkern eindringt und die DNA in charakteristischer Weise spaltet (DNA-Fragmentation) [31].

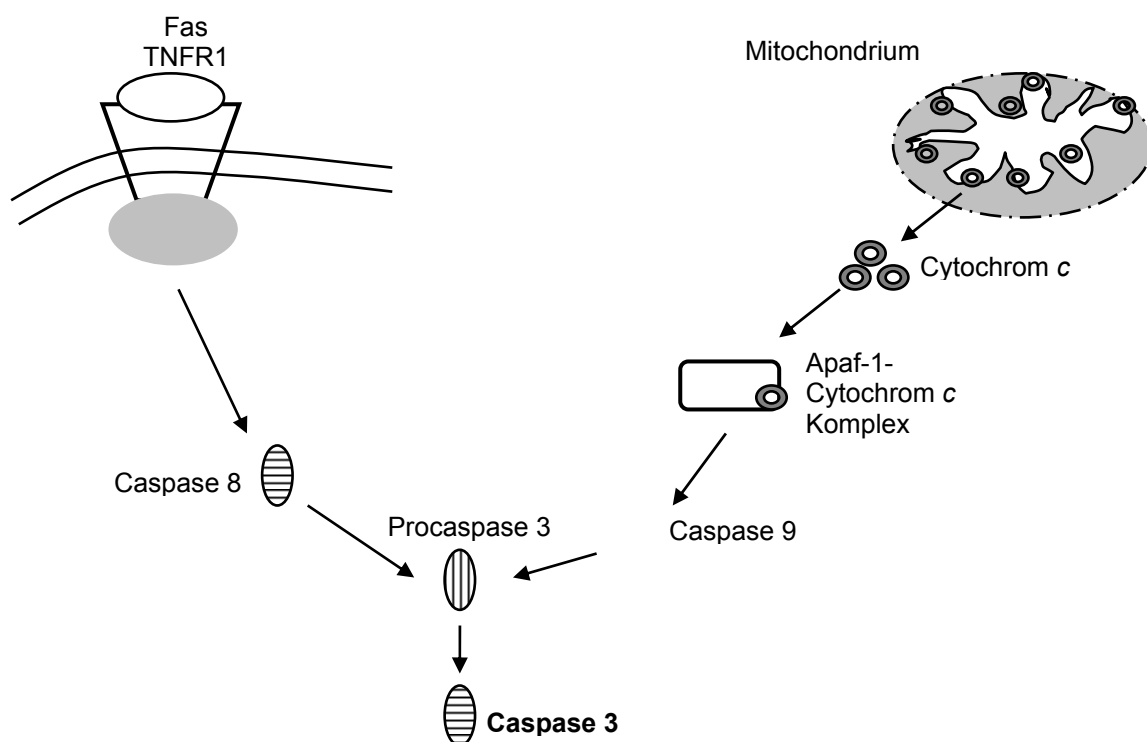


Bild 4: Kaspase-abhängige Apoptose

Zwei breit akzeptierte Wege sind für die Auslösung der Apoptose beschrieben: 1) Rezeptor-vermittelter, extrinsischer Weg, 2) mitochondriale Apoptose durch Permeabilitätsveränderungen der Mitochondrienmembran mit Freisetzung proapoptotischer Faktoren, ausgelöst durch Noxen oder andere Stimuli.

Die Rolle von bcl-2 und bax

In der Zelle liegen Proteine vor, welche die Apoptose-induzierenden Vorgänge am Mitochondrium beeinflussen können. bcl-2 (B-cell-lymphoma 2) ist ein Onkogen, welches in einer Reihe von Geweben exprimiert wird und zu einer Gruppe von Genen gehört, die den Zelltod durch Apoptose beeinflussen [32, 33]. Sie sind charakterisiert durch die bcl-2-Homologie Domänen. Auch bax (bcl-2 associated X protein) gehört der

Familie der bcl-Onkogene an. Die hier untersuchten codierten Proteine bcl-2 alpha und bax alpha gehen heterodimere Verbindungen ein, so dass Funktion und Bedeutung unmittelbar voneinander abhängig sind. Nicht nur die Konzentration entscheidet über die beeinflussten Vorgänge in der Zelle, sondern auch das Verhältnis der Proteine zueinander. Führt der Mangel an stimulierenden Reizen zu einem Anschwellen der Mitochondrien (passiver Weg), kann bcl-2 den programmierten Zelltod verhindern, indem es mit den Membranen interagiert und eine Erhöhung der Permeabilität verhindert. Proteine wie Cytochrom c verbleiben im Mitochondrium und die oben beschriebene Enzymkaskade der Kaspasen wird nicht induziert [25].

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden in den Lymphozyten Hinweise für Apoptose gesucht, sowie repräsentative Wegpunkte in der Initialisierung des programmierten Zelltodes ausgewählt. Dabei wurden Parameter betrachtet, die sowohl den mitochondrialen als auch den rezeptorvermittelten Weg beschreiben können.

1.2.5. Immunität durch T-Zellen

Immunzellen spielen während der Inflammation eine Schlüsselrolle. Funktionelle Einschränkungen, veränderte Zellzahlen und chronische Aktivierung können zu ernsthaften Einschränkungen in der Immunabwehr des verletzten Patienten führen. T-Zellen als entscheidende Effektoren und Regulatoren der adaptiven Immunantwort sind Gegenstand dieser Arbeit.

Sich aus der lymphopoetischen Stammzelle entwickelnd, gelangen T-Zellen aus dem Knochenmark in den Thymus und setzen dort ihre Proliferation fort. Die veränderte Expression des T-Zell-Rezeptors und der Oberflächenmoleküle charakterisiert diese Entwicklung. Proliferation und Überleben dieser Zellen wird über komplexe Systeme und Vorgänge, zum Beispiel durch epitheliale Thymuszellen oder Knochenmark-assoziierte Makrophagen reguliert. Durch positive Selektion werden nur funktionsfähige Lymphozyten vor der Auslese durch programmierten Zelltod bewahrt. In die Peripherie wandern dann kleine, ruhende Zellen aus. Durch Antigenkontakt werden diese naiven Zellen für die Teilnahme an der adaptiven Immunantwort befähigt. Sie entwickeln sich zu bewaffneten Effektorzellen und vermehren sich klonal. Diese Proliferation und Differenzierung wird entscheidend durch das Zytokin IL-2 vermittelt, welches von den Zellen selbst produziert wird. Im Zuge der Aktivierung wird auch der IL-2 Rezeptor gebildet und auf der Oberfläche exprimiert. IL-2 bindet hochaffin und stimuliert die Zellen zu zwei bis drei Teilungen am Tag, so dass eine große Anzahl von

Zellen mit identischem Antigenrezeptor entsteht. Die entstehenden Effektorzellen können weiter unterteilt werden:

CD4⁺ (positive) T –"Helfer"–zellen assistieren anderen Immunzellen, zum Beispiel Makrophagen und B–Lymphozyten, bei der Erfüllung ihrer Aufgaben, wie Phagozytose oder der Antikörperproduktion, in dem sie am T–Zell–Rezeptor über MHC II binden und über direkte und indirekte Interaktion auf die Zielzelle wirken. In einer weiteren Unterteilung der CD4⁺ Zellen werden T_{H1}- und T_{H2} – Zellen unterschieden, die individuelle Zytokinmuster ausschütten und differenzierte Aufgaben erfüllen. Die Entscheidung, zu welcher Subpopulation sich eine Zelle entwickelt und vermehrt, fällt erst nach dem Antigenkontakt. T_{H1}-Zellen stimulieren eine zellulär getragene Immunantwort, in dem sie Makrophagen zu ihren antibakteriellen Wirkungen veranlassen und ihre Differenzierung im Knochenmark auslösen. Sie versenden chemotaktische Signale, aktivieren das Endothel und töten direkt chronisch infizierte Zellen ab. Sie veranlassen B–Zellen zur Produktion von IgG, welches zur Opsonierung von Antigenen und der Aktivierung des Komplementsystems beiträgt. T_{H2} – Zellen triggern die humorale Immunität, in dem sie B–Zellen zur Bildung von IgM und IgE anregen. Weiterhin kennt man regulatorische T-Zellen mit spezifischen Oberflächenmustern und Aufgaben.

CD8⁺ zytotoxische T–Zellen erkennen intrazelluläre Pathogene von Viren und Bakterien und töten die infizierte Zelle spezifisch über Apoptose–induzierende Mechanismen - wie FasL/Fas–Induktion oder Bildung von Perforinen und Granzymen - ab. Sie setzen außerdem Zytokine wie IFN–gamma, TNF–alpha und TNF–beta frei, die weitere Effekte auf die Verteidigungslage des Patienten haben.

T–Zellen greifen in fast jedem Schritt der erworbenen Immunantwort initiiierend oder modulierend ein und regulieren somit fast alle Effektormechanismen entscheidend mit. Die Gefahr, die zum Beispiel von überstimulierten Makrophagen für das Wirtsgewebe ausgeht, verdeutlicht, wie wichtig die adäquate Funktion von T–Zellen im Zustand nach Gewebetrauma ist. Sie koordinieren die anfallenden Aufgaben bei der Abwehr von Infektionen und der Reintegration von verletztem Gewebe und verhindern überschießende, selbstschädigende Wirkungen. Nach schwerem Gewebetrauma werden sie vor allem durch Antigenkontakt und IL–12 (aus Makrophagen und DCs) in die Immunantwort einbezogen. CD4⁺ Zellen produzieren vermehrt Zytokine und verstärken die angeborene Immunantwort. Welches Zytokinmuster dabei ausgeschüttet wird, ist abhängig von der Umgebung und dem Zeitpunkt der Aktivierung. T_{H1} Zellen

produzieren IFN- γ , welches Makrophagen aktiviert, CD8⁺ Zellen in ihren zytotoxischen Funktionen stimuliert und B-Zellen zur Synthese von opsonierenden Antikörpern anregt [8]. Eine T_H2 Antwort wird oft durch die Exposition mit allergischen Antigenen oder dem Befall mit Parasiten ausgelöst und führt zu einer humoralen Immunantwort ohne die Aktivierung von Makrophagen oder unspezifischen Reaktionen.

1.3. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von T-Lymphozyten in den ersten Tagen nach schwerem Gewebetrauma hinsichtlich ihrer Bedeutung in der posttraumatischen zellulären Immunabwehr zu untersuchen. Wichtig erschienen dabei Veränderungen in relativer Zellzahl, Funktionalität und Reaktivität. Dazu waren vor allem die Wege der Apoptose als möglichem Regulationsmechanismus im immunologischen Geschehen genauer zu beleuchten. Die gewonnenen Ergebnisse sollten die Kenntnisse um die Vorgänge in der Zelle nach schwerem Gewebetrauma erweitern und Grundlagen zur weiteren Erforschung relevanter posttraumatischer Prozesse bereitstellen. Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die zunehmenden Möglichkeiten des „Immunmonitoring“ schwer verletzter Patienten, welches die direkte Überwachung der Immunantwort mittels neuester Verfahren und Techniken impliziert, war die Verknüpfung mit dem klinischen Bild und seinen zeitlichen Abläufen, sowie den Auswirkungen der durchgeführten Therapien, zum Beispiel Operationen (*second hit*). Aus den Ergebnissen sollten Ansätze abgeleitet werden für die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte, welche die Prognose von oftmals jungen, schwerverletzten Patienten verbessern können. Nicht zuletzt sollte mit der für diese Arbeit zu schaffenden Infrastruktur und umfangreichen Datenerfassung eine Basis für weitere Projekte und Analysen bereitgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien, Reagenzien, Geräte, Lösungen

2.1.1. Verbrauchsmaterial

Die folgenden Tabellen listen das eingesetzte Verbrauchsmaterial, sowie Reagenzien, Antikörper, Kits (Tabelle 2) und Plastikmaterialien auf (Tabelle 3).

Tabelle 2: Materialien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
<u>Laborchemikalien Grundbedarf</u>		
Albumin Fraktion V, BSA	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxidsulfat	Fluka/ Sigma-Aldrich	Deisenhofen, DE
Aqua bidest	Biochrom AG	Berlin, DE
CaCl ₃	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
EDTA	Acros Organics	Geel, BE
Ethanol	Herbeta	Berlin, DE
FBS	Biochrom AG	Berlin, DE
Glycin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Heparin	Apotheke CBF, Charité	Berlin, DE
HEPES	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
KHCO ₃	Fischer Scientific	Schwerte, DE
Methanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
NaCl	Fluka/ Sigma-Aldrich	Deisenhofen, DE
NaN ₃	Merck	Darmstadt, DE
NaOH	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
NH ₄ Cl	Acros Organics	Geel, BE
NNNN-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka/ Sigma-Aldrich	Deisenhofen, DE
PBS-Dulbecco w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺ Low Endotoxin	Biochrom AG	Berlin, DE
Polimyxin B	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
SDS ultrapure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Tris	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
<u>Blutauarbeitung</u>		
DM-L Ficoll	StemCell Technologies	Vancouver, CA
Isolations-Antikörper RosetteSep Cell Separation Cocktail für T-Zellen	StemCell Technologies	Vancouver, CA
Erythrocyte-Lysis-Buffer	Quiagen GmbH	Hilden, DE
Trypanblau	Merck	Darmstadt, DE
Zählkammer Neubauer improved	Hecht Assistant	Sondheim, DE
<u>TUNEL</u>		
DeadEnd™ Colorimetric System	Promega GmbH	Mannheim, DE

Bezeichnung	Hersteller	Ort
<u>FACS</u>		
7-AAD	Calbiochem, Merck	Darmstadt, DE
Annexin V-FITC	Caltag Laboratories	Burlingame, US
Annexin V-PE	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD3-PE	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD4-FITC	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD8-FITC	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD8-PE	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD25-TC	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD69-APC	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD95-TC	Caltag Laboratories	Burlingame, US
anti-CD120a-APC	Caltag Laboratories	Burlingame, US
Flebogamma hlgG	Grifols Deutschland GmbH	Langen, DE
<u>Proteinisolation</u>		
Complete mini Proteaseinhibitor + EDTA	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Nanoquant (5x) Proteinbestimmungsreagenz	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<u>Western Blot</u>		
Nitrozellulosemembran, Protran BA83 0,2 µm	Schleicher & Schuell	Dassel, DE
Roti-Load Ladepuffer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Blocking Grade Buffer Non-Fat dry milk	Bio-Rad Laboratories	München, DE
bcl-2 (C-2) monoklonaler Antikörper IgG ₁ aus Maus SC-7382, Lot # K1704, 26kDa	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, US
bax (N-20) polyklonaler Antikörper IgG aus Kaninchen SC-493, Lot # A0605, 23kDa	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, US
β-Actin Klon AC-15 monoklonaler Antikörper, 42kDa	Sigma-Aldrich Chemie	München, DE
Sekundäntikörper anti-Maus, HRP-gekoppelt	DakoCytomation	Glostrup, DK
Sekundäntikörper anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	DakoCytomation	Glostrup, DK
Roti-Mark PRESTAINED, Protein-Marker vorgefärbt	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<u>Kaspase-Assays</u>		
Apo-One Caspase Homogeneous Assay	Promega GmbH	Mannheim, DE
Caspase 8 Glo-Assay	Promega GmbH	Mannheim, DE
Caspase 9 Glo-Assay	Promega GmbH	Mannheim, DE
<u>RT-PCR</u>		
RLT-Puffer, RNeasy Lysis Buffer	Qiagen GmbH	Hilden, DE
RNA-Isolationskit, Rneasy-Mini-Kit	Qiagen GmbH	Hilden, DE
QuantiTect Hs_BAX Assay Mix	Qiagen GmbH	Hilden, DE
QuantiTect Hs_BCL2 Assay Mix	Qiagen GmbH	Hilden, DE
QuantiTect Hs_ACTB Assay Mix	Qiagen GmbH	Hilden, DE
RNA-Qualitätsanalyse, RNA 6000 Nano Assay	Agilent Technologies	Böblingen, DE

Tabelle 3: Plastikmaterial und Reaktionsgefäße

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Blutröhrchen Vacutainer heparinisiert	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, DE
Eppendorf Reaktionsgefäße Safe-lock tubes 0,5, 1, 2 ml	Eppendorf GmbH	Hamburg, DE
Objektträger SUPERFROST®	Fischer Scientific GmbH	Schwerte, DE
Reaktionsgefäße Falcon 14 ml	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, DE
Reaktionsgefäße Falcon 50 ml	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH	Hamburg, DE
FACS Röhrchen Falcon	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, DE
Rotilabo Mikrotiterplatte klar	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE

2.1.2. Geräte und Software

Die folgenden Tabellen listen die genutzten Geräte (Tabelle 4) oder Software (Tabelle 5) auf.

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Name	Hersteller	Ort
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies	Böblingen, DE
Chemilumineszenz-messung	LAS 3000 Imaging System	Fujifilm	Düsseldorf, DE
Cytospin	Cytospin 3	Shandon GmbH	Frankfurt, DE
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson	Heidelberg, DE
Eismaschine	ZBE 350-100	Ziegra Eismaschinen GmbH	Isernhagen, DE
Fluoreszenz- & Lumineszenz-Spektrometer, Plattenphotometer	GENiosSpectra	Tecan D GmbH	Crailsheim, DE
Mikroskop	Axioskop 40	Carl Zeiss GmbH	Jena, DE
Pipetten	Eppendorf Reference	Eppendorf GmbH	Hamburg, DE
realtime-PCR	DNA Engine Opticon	MJ Research	Waltham, US
Sicherheitswerkbank	Holtan Laminar Flow	Thermo Fisher	Waltham, US
Thermozykler	Mastercycler	Eppendorf GmbH	Hamburg, DE
Tiefkühlschrank	-70°C	Revco	Asheville, US
Wasseraufbereitung	Simplicity 185	Millipor	Schwalbach, DE
Western Blot Apparatur Dry blotting	EBA-4000	C.B.S Scientific Company Inc	Del Mar, US
Western Blot Apparatur Elektrophorese	DCX-7000	C.B.S Scientific Company Inc	Del Mar, US
Zentrifuge 1	Multifuge 1 S-R	Hereaus	
Zentrifuge 2	Centrifuge 5810R	Eppendorf	Hamburg, DE

Tabelle 5: Software

Software	Name	Hersteller	Ort
Bibliographie	EndNote 9	Thomson Research Soft	Philadelphia, US
Densitometrie	AlphaDigiDoc	Alpha Innotech	San Leandro, US
FACS Steuerung	Cellquest	Becton Dickinson	Heidelberg, DE
FACS Analysesoftware	FlowJo	TreeStar Inc.	Ashland, US
Literaturrecherche	Medline/ Pubmed	/	/
Photometersoftware	Magellan Version 3.11	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim, DE
Statistik	SigmaStat 3.0	SPSS Inc.	Chicago, US
statistische Bilder	SigmaPlot 8.0	SPSS Inc.	Chicago, US
Tabellenkalkulation	Excel	Microsoft	Redmond, US
Textverarbeitung	Word	Microsoft	Redmond, US

2.1.3. Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle sind selbst hergestellte Puffer und Lösungen mit ihren Zusammensetzungen aufgeführt.

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

<u>Ansatz</u>	<u>Zusammensetzung</u>
<u>Blutauferbeitung</u>	
Lösung B	PBS 2 % hitzeinaktiviertes FCS 0,05 % Polymyxin B
<u>FACS</u>	
7-AAD Lösung gebrauchsfertig	1 mg 7-AAD 50 µl Methanol 950 µl PBS
Färbepuffer für die Antikörperbindung an extrazelluläre Epitope	PBS 1 % BSA 1 % hIgG 0,05 % NaN ₃
Bindepuffer	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ pH 7,4 (NaOH)
Fixationslösung	2 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,2

<u>Ansatz</u>	<u>Zusammensetzung</u>
<u>Western Blot</u>	
Proteinlysepuffer	50 mM Tris pH 7,5 150 nM NaCl 1 % NP-40 10 % Glycin 0,2 % SDS Proteaseinhibitor
Elektrophoresepuffer (5-fach)	30,4 g Tris (base) 144 g Glycin 10 g SDS Aqua bidest
Magertrockenmilchlösung	3 % oder 5 % Magertrockenmilchpulver PBS 0,05 % Tween-20
Sammelgel	16,8 % Acrylamidlösung 30 % (37,5:1) 50 % Sammelgelpuffer 32 % Aqua bidest 2 % Ammoniumperoxidsulfat 0,2 % NNNN-Tetramethylethylendiamin
Sammelgelpuffer	0,33 M Tris (base) 1 g SDS Aqua bidest pH 6,8
Transferpuffer	48 mM Tris (base) 30 mM Glycin 0,37 g SDS 20 % Methanol Aqua bidest
Trenngel 12 %	40 % Acrylamidlösung 30 % (37,5:1) 50 % Trenngelpuffer 9 % Aqua bidest 1 % Ammoniumperoxidsulfat 0,1 % NNNN-Tetramethylethylendiamin
Trenngelpuffer	38,5 g Tris (base) 9,3 g Tris-HCl 1 g SDS Aqua bidest pH 8,8
<u>Kaspase-Assays</u>	
Lysepuffer	25 mM HEPES pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 0,1 % Triton X 100 Proteaseinhibitor

2.2. Patienten

In diese Studie wurden volljährige Patienten eingeschlossen, welche die Definition des Polytrauma erfüllten und einen ISS über 20 Punkte erreichten. Dies betraf ausschließlich Patienten, welche im Rahmen des Polytrauma-Managements im Schockraum der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, zwischen September 2003 und Oktober 2005 behandelt wurden. Der Zeitraum zwischen Unfall und der ersten Blutentnahme im Schockraum war abhängig vom Transportmittel in die Klinik (Hubschrauber oder Krankenwagen), aber nie länger als eine Stunde. Die Alarmierung der Mitarbeiter des Labors erfolgte zeitnah, so dass innerhalb der ersten Stunde nach Blutentnahme mit der Aufarbeitung des Materials begonnen werden konnte. Das schriftliche Einverständnis der Patienten wurde nach Aufklärung durch die ärztlichen Kollegen der Arbeitsgruppe eingeholt, entsprechend den Vorgaben der Ethikkommission der Freien Universität Berlin zum Ethikantrag (*Oberhol 1-03*). Abhängig vom Verletzungsmuster geschah dies meist erst einige Zeit nach dem Unfall, gegebenenfalls wurden auch die nächsten Angehörigen um Einwilligung gebeten.

Der ISS-Score [34, 35] dient zur Beurteilung des Schweregrades von Verletzungen. Die sechs Körperregionen Kopf, Gesicht und Hals, Thorax, Abdomen, Extremitäten und Weichteile werden zuerst getrennt nach der AIS, der Abbreviated Injury Scale, bewertet [35-37]. Es werden je nach Schweregrad maximal sechs Punkte vergeben. Die drei höchsten Punkte der einzelnen Regionen werden zunächst einzeln quadriert und anschließend summiert. In Tabelle 7 ist für einen Studienpatienten die Rechnung beispielhaft dargestellt.

Im beobachteten Zeitraum wurden umfangreiche Patientendaten pseudonymisiert gesammelt und in eine eigens entworfene Datenbank übernommen, um im Verlauf der Studie Ergebnisse nach verschiedenen Gesichtspunkten sortieren und bewerten zu können. Im Folgenden sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 einige Charakteristika des Patientenkollektivs näher aufgeschlüsselt.

Tabelle 7: Beispielrechnung ISS für einen Studienpatienten

Bereich	Verletzungen	AIS	ISS*
Kopf	Schädelhirntrauma mit subduraler Blutung und Hirnödem	4	16
Gesicht	LeFort II Fraktur , Trümmerfraktur der Nase, Fraktur der Vorderwände von Sinus frontalis et maxillaris, Fraktur der Hinterwand des Sinus frontalis, Lufteinschlüsse in der Orbita, Fraktur des Os zygomaticum links bis in die Fissura orbitalis inferior	3	9
Hals	/		
Thorax	Lungenkontusion beidseits	3	9
Abdomen			
Extremitäten	Symphysensprengung , Radiusfraktur links, Fraktur des medialen Femurkondylus links	3	
Weichteile	/		
Summe	* die drei höchsten AIS		34

Tabelle 8: Unfallart

Unfallart	¹ Verkehrsunfall						Summe
	VU ¹ PKW	VU Motorrad	VU Fahrrad	VU Fußgänger	Sturz	Sonstiges	
n Patienten	5	4	2	6	7	1	25

Tabelle 9: Patienten – Übersicht

	Patienten	Kontrollen
n	25	18
Altersdurchschnitt	50,1 ± 20,9 Jahre	31,8 ± 8,7 Jahre
Geschlechtsverhältnis m/w	2,1	1,8
Überlebensrate	88 %	/
Dauer des Klinikaufenthalt	51,3 ± 30,3 Tage	/
Dauer der Intensivtherapie	21,6 ± 20,7 Tage	/
Dauer der Intubation	15,2 ± 24,8 Tage	/
Verletzungen		
ISS	31,8 ± 11,7	/
Kopf	n = 18 (72 %)	/
Gesicht	n = 10 (40 %)	/
Thorax	n = 22 (88 %)	/
Abdomen	n = 15 (60 %)	/
Extremitäten	n = 20 (80 %)	/
Weichteile	n = 2 (8 %)	/

2.3. Methoden: Materialgewinnung

2.3.1. Blutaufarbeitung und T-Zell-Isolation

Den Patienten wurde unmittelbar nach dem Trauma (Tag null) sowie an den Tagen eins, drei und fünf jeweils 40 ml Vollblut in heparinisierte Vacutainer-Röhrchen abgenommen. Die Blutentnahme wurde außer am Tag des Unfalls immer morgens durchgeführt. 10 ml wurden für die Gewinnung von T-Zellen verwendet, das verbleibende Volumen für begleitende Projekte über Monozyten und neutrophile Granulozyten. Bei der sich direkt anschließenden Aufarbeitung wurden alle drei Populationen angereichert und konservierende sowie erste analytische Schritte durchgeführt.

Für die Isolation von T-Zellen wurde ein System der Negativselektion von StemCell Technologies verwendet, welches mittels tetramerer Antikörper Immunrosetten aus den unerwünschten Zellen bildet. Diese werden anschließend durch Dichtegradientenzentrifugation von den ungebundenen (T-) Zellen getrennt. Zuerst wurde dazu das Plasma durch Zentrifugieren ohne Bremse bei 400 x g für 10 Minuten abgetrennt und durch Lösung B isovolumisch ersetzt. Es wurden 100 µl Heparin (1.000 IE/ml) sowie 50 µl Isolations-Antikörper für die Negativselektion von CD3-positiven T-Zellen pro Milliliter Blut hinzugefügt und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 1 + 2 mit Lösung B verdünnt und vorsichtig auf das zugehörige DM-L Ficoll aufgeschichtet. Das Material wurde bei 1200 x g für 20 Minuten zentrifugiert, die entstehende Interphase (Bild 5) in Lösung B aufgenommen und erneut 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet anschließend aufgelockert und ein weiteres Mal mit 10 ml von Lösung B gewaschen. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer nach Neubauer ermittelt. Nach wiederholtem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 400 x g wurde der Überstand dekantiert, das Pellet aufgelockert und das verbleibende Volumen bestimmt.

Das Verfahren der Negativselektion wurde gewählt, um die untersuchten Zellen nicht durch Antikörperbindung schon bei der Aufarbeitung zu aktivieren. Die Reinheit lag mit etwa 90 % im Rahmen der vom Hersteller angegebenen Werte (Bild 6).

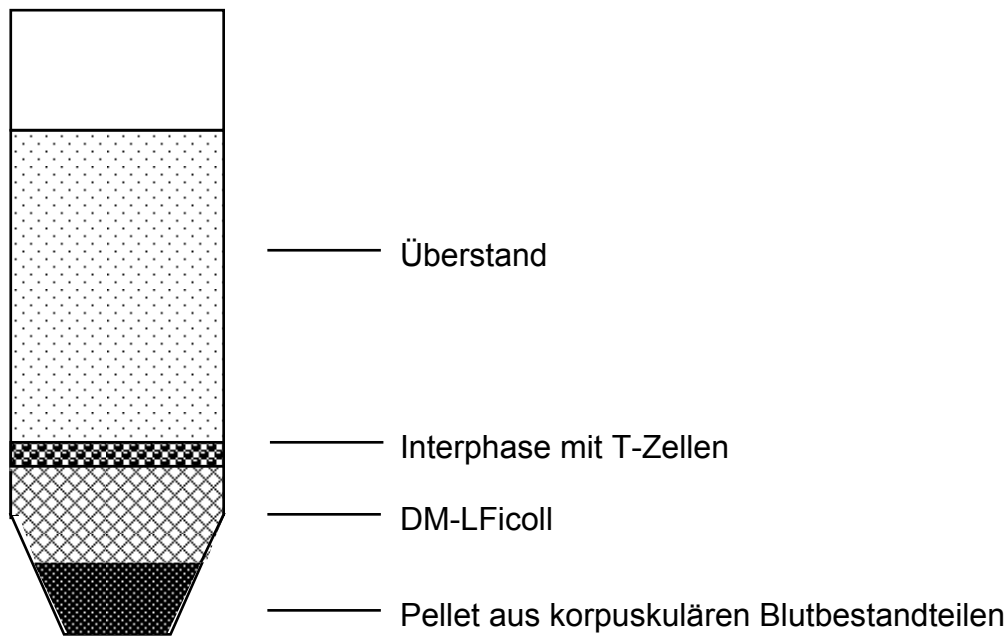


Bild 5: Negativselektion von T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

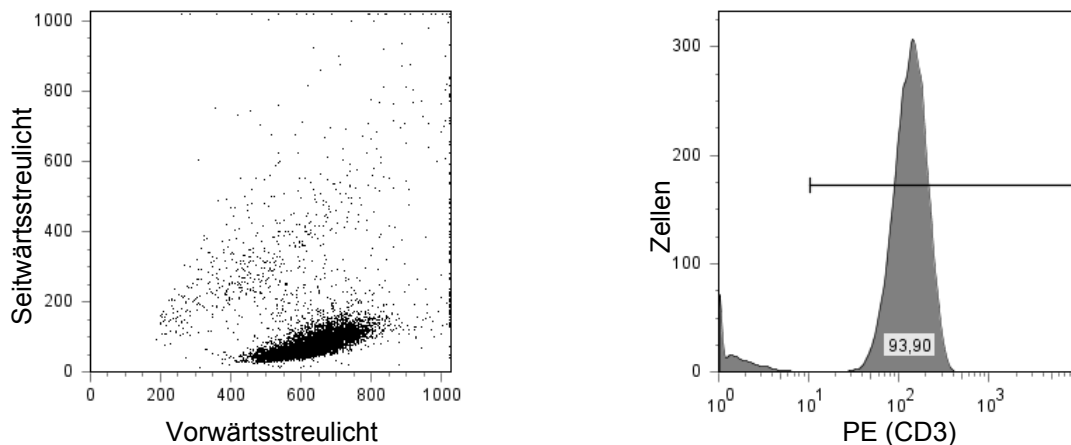


Bild 6: FACS: T-Zellen im FSC/SSC und Histogramm mit anti-CD3-PE

2.3.2. Konservierung und Lagerung der isolierten Zellen

Da einem einzelnen Patienten aufgrund seiner Verletzungen und der resultierenden Kreislauf- und Volumensituation nicht beliebig viel Blut entnommen werden konnte, für manche Methoden aber alle T-Zellen aus 10 ml Vollblut benötigt wurden, nahm die weitere Aufarbeitung der Zellen im Lauf der Studie unterschiedliche Wege:

- 1) Etwa 400.000 Zellen wurden in 270 μ l PBS aufgenommen, mittels einer Cytospin bei 400 U/min auf Superfrost Adhäsionsobjektträger aufgebracht und

luftgetrocknet. Der Bereich der Auftragung wurde markiert. Anschließend wurden die aufgetragenen Zellen 25 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit PBS gewaschen. Die so gewonnenen Präparate wurden später im TUNEL-Verfahren gefärbt.

- 2) Für die Gewinnung von Protein wurde das Pellet in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, noch einmal bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert, vorsichtig trocken gesogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.
- 3) Um RNA zu isolieren, wurde das Pellet mit RLT-Puffer + 1 % β -Mercaptoethanol versetzt und mit einer 18 G-Kanüle homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei -70°C gelagert.

Die hier beschriebenen Schritte bildeten die Grundlagen für die analytischen Verfahren. Im Folgenden werden noch die Verfahren zur Gewinnung von RNA und Protein aus den Zellen näher beschrieben.

2.3.3. RNA-Isolation und Quantifizierung

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy MiniKit von Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurden die mit β -ME und RLT-Puffer homogenisierten Zellen mit 70 % Ethanol versetzt, gemischt und auf das entsprechende Filterröhrchen gegeben. Beim Zentrifugieren bei 8.000 x g für 30 Sekunden wurde die RNA in der Membran des Filterröhrchens gebunden, das Filtrat wurde verworfen. Der Filter wurde dann mit einem Waschpuffer behandelt und im Anschluss jeweils für 30 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Vor der Elution der RNA wurde die Filtermembran einmal für 2 Minuten bei 11.000 x g durch Zentrifugation getrocknet. Anschließend wurde die RNA mit RNAase-freiem Wasser in zwei Elutionsschritten von einer Minute bei 8.000 x g aus dem Filter gewaschen. Qualität und Quantität der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe eines Agilent Bioanalyzer bestimmt. Über dieses Chipsystem mit Gelmatrix wird mittels einer DNA-Ladder die Menge und Güte der gewonnenen RNA über das Verhältnis der ribosomalen Banden evaluiert.

2.3.4. Proteinisolation und Quantifizierung

Für die Untersuchungen im Western-Blot-Verfahren musste der größte Teil des Patientenmaterials zur Proteinisolation genutzt werden, um ausreichende Mengen zu erhalten. Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden zur Proteinisolation

auf Eis aufgetaut, mit 100 µl Proteinlysepuffer für Western Blot versetzt und anschließend mit einer 20 G Kanüle streng auf Eis homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren für 20 Minuten bei 24.000 x g und bei 4 °C wurde der proteinhaltige Überstand vorsichtig abgezogen, gut gemischt, aliquotiert und in Stickstoff eingefroren. Identisch wurde die Isolation der Proteine für die Bestimmung der Aktivität der Kaspasen durchgeführt. Aufgrund der Eigenschaften der Assays musste jedoch ein adaptierter Lysepuffer verwendet werden.

Quantifizierung

Eine kleine Menge der erhaltenen Proteine wurde für die Quantifizierung nach dem Bradford-Protokoll verwendet. Dazu wurde ein Teil der jeweiligen Probe 1 : 20 verdünnt und gemeinsam mit der Standard-Verdünnungsreihe (0 bis 100 µg/ml) einer BSA-Lösung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Mit Roti-Nanoquant (1 : 5 mit H₂O_{dd}) als Färbelösung wurde im Tecan Magellan der Quotient aus der Absorption bei 590 nm und 450 nm bestimmt und die Proteinkonzentration aus dem Verhältnis zur Proteinstandardgeraden unter Abzug der Leerwerte mit einer dafür programmierten Methode automatisiert errechnet.

2.4. Methoden: Analytische Verfahren

2.4.1. TUNEL-Assay

Die lichtmikroskopische Untersuchung der isolierten Zellen erfolgte im so genannten TUNEL-Verfahren. TUNEL ist die Abkürzung für *terminal desoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling* und nutzt die bei Apoptose auftretenden, durch Endonukleasen verursachten Strangbrüche in der DNA. Im DeadEnd Colorimetric TUNEL System von Promega werden biotinylierte Nukleotide durch die TdT an die 3'OH-Enden der unterbrochenen Erbinformation gekoppelt. Daran bindet mit einer Peroxidase aus Meerrettich verbundenes Streptavidin. Das Enzym katalysiert eine Reaktion mit Wasserstoffperoxid und dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB). Mikroskopisch imponieren die apoptotischen Zellkerne anschließend in dunklem Braun. Dieses Verfahren wird in vielen Studien standardmäßig zum Nachweis von apoptotischen Zellen eingesetzt.

2.4.2. Durchflusszytometrie/ FACS

Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei diesem Verfahren werden lebende Zellen in Lösung in einer feinsten Küvette an einem Laser vorbei gesogen, Änderungen der Intensität werden mittels Detektoren, sogenannten Photomultipliern, erfasst und jede Zelle als Einzelereignis wahrgenommen. Abhängig von der technischen Ausstattung können die Zellen nach mehreren Kriterien beurteilt werden. Grundlegend gehören dazu die Größe, welche die Beugung des Lichts beeinflusst (FSC, Forward Scatter) und die Granularität, die Änderungen in der Brechung des Lichts hervorruft (SSC, Side Scatter). Für genauere Untersuchungen können die Zellen vorher mit Farbstoff-gekoppelten Antikörpern verbunden werden. Nach der Anregung dieser Farbstoffe durch den Laser lassen sich über Änderungen in der Fluoreszenz quantitative Aussagen über die Zellbeschaffenheit treffen. So können beispielsweise der Rezeptorbesatz oder andere Oberflächenmerkmale (CD = Cluster of Differentiation) einer einzelnen Zelle gezielt beurteilt werden. In dieser Arbeit wurde das FACS von Becton Dickinson zur Identifikation von Lymphozyten und ihrer Subpopulationen bei gleichzeitiger Aussage über Funktion und Zustand, sowie ihr quantitatives Verhältnis zu anderen Immunzellen angewendet.

Durchführung der FACS-Messung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden dazu Zellen aus Vollblut verwendet. Das Vollblut wurde mit einem Erythrozyten-Lyse-Puffer behandelt, mit Lösung B verdünnt und zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in mehreren Waschschritten mit anschließendem Zentrifugieren gereinigt und die Überstände verworfen. Aus dem verbleibenden Leukozytenkonzentrat (Buffy coat) wurden etwa 50.000 Zellen in ein 1,5 µl Eppendorf-Röhrchen mit 50 µl Färbepuffer aufgenommen und die gewünschten Antikörper hinzu pipettiert. Nach 25 Minuten Inkubation in Dunkelheit und auf Eis wurde, falls nötig, Streptavidin in gleicher Konzentration für eine erneute Inkubation hinzugefügt.

Farbstoffgekoppeltes Streptavidin, ein 53 kDa großes Protein, bindet mit hoher Affinität an biotinylierte Antikörper und kann ebenso zur Markierung von Zellen genutzt werden.

Anschließend wurden die Proben mit 500µl Färbepuffer verdünnt und bei 400 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgezogen und die Zellen somit von überschüssigem, ungebundenem Antikörper

befreit. Nach Resuspension in 400 μ l Färbepuffer wurden die Zellen für die anschließende Messung in FACS-Röhrchen überführt.

Das verwendete Gerät BD FACSCalibur war mit einem zweiten Laser ausgestattet und bot die Möglichkeit, gleichzeitig in vier Kanälen die Fluoreszenz zu messen. Die Software CellQuest Pro diente dabei der Messung von Proben inklusive Kompensation und aller Einstellungen sowie der Steuerung des Gerätes. Die Auswertung und Berechnung von gemessenen Größen sowie deren Abbildung wurden mit der Software FlowJo der Firma TreeStar Inc. durchgeführt.

Im Bild 7 wird beispielhaft die Auswahl der gewünschten Zellen dargestellt. Im FSC/SSC-Plot ergibt sich ein für den Buffy coat typisches Verteilungsmuster. Da für die Untersuchung nur Lymphozyten von Interesse waren, wurde eine Auswahl (Gate) um die Population gelegt. Im rechten Bild sind dann nur noch die Zellen innerhalb des Gates abgebildet, diesmal dargestellt nach Fluoreszenzkanal 1 (FITC) und 2 (PE). Da die Zellen vorher mit anti-CD4-FITC und anti-CD8-PE gekoppelt wurden, werden sie jetzt an unterschiedlichen Stellen im Plot dargestellt. Zur weiteren Auswertung des dritten und vierten Kanals wird jetzt wieder nur mit den Zellen von Interesse, zum Beispiel den CD4+ im rechten unteren Quadranten, weitergearbeitet.

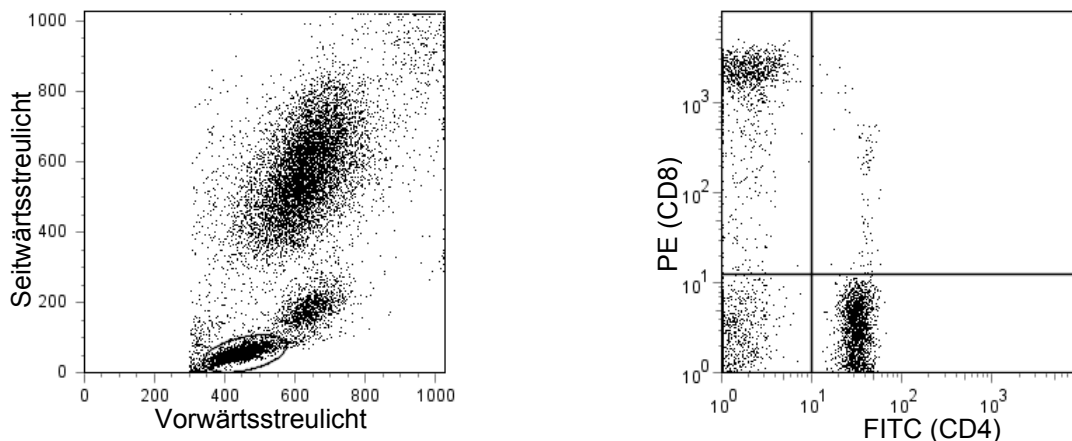


Bild 7: FACS: Lymphozytengate und Antikörperfärbung

Darstellung des Buffy coat im FSC/SSC mit Lymphozytengate und Lymphozyten mit anti-CD4 und anti-CD8.

2.4.3. RT-PCR

Prinzip der realtime-PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist ein enzymatisches in-vitro Verfahren zur einfachen und schnellen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR basiert auf repetitiven Zyklen mit

- Denaturierung durch Schmelzen
- Anlagerung der Primer (annealing)
- Synthese der DNA

Primer sind chemisch synthetisierte Oligonukleotide, die der Basensequenz am Anfang des gewünschten DNA-Abschnitts auf jedem Strang entsprechen. Damit bestimmen sie die Länge des zu amplifizierenden Bereiches. Nach dem Schmelzen des Doppelstranges bei 90–96 °C hybridisieren die Primer bei 40–65 °C sequenzspezifisch mit dem jeweiligen Strang. Bei 72 °C synthetisiert die thermostabile Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* an den Primer anknüpfend den komplementären Strang aus den beigefügten Desoxynukleosid-Triphosphaten dATP, dGTP, dCTP, dTTP. Die Identifizierung der amplifizierten Fragmente erfolgt meist anhand der Größe.

Die Quantifizierung der entstandenen Kopien ist in der normalen PCR aufwändig, bei der realtime-PCR kann die Menge des Produktes einfach nach jedem Zyklus bestimmt werden. Dafür nutzt man zum Beispiel sequenz-spezifische doppelt markierte Proben mit einem Fluorophor und einem Quencher. Im ungebundenen Zustand werden die von den angeregten Fluorophoren ausgesendeten Signale von den Quenchern "geschluckt". Während des Vorgangs des Annealings bei 56 °C entfalten sich die Proben und legen sich ihrer Zielstruktur an. Die angeregten Fluorophore emittieren Signale, die nicht absorbiert werden. Während der Synthese des komplementären DNA-Stranges werden die Proben nun von ihrer Zielsequenz verdrängt und die Quencher näher zu den Fluorophoren gefaltet, so dass es wieder zur Absorption der emittierten Signale kommt. Die Veränderungen in der Signalintensität geben so Aufschluss über die Zahl der entstandenen DNA-Kopien.

cDNA-Synthese

Für die realtime-PCR der Patientenproben muss nach der RNA-Isolation komplementäre cDNA geschrieben werden. Dazu wurden 500 ng RNA mit

oligo-(dT)-Primer mit einem Eppendorf Mastercycler inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde ein Gemisch aus First Strand Buffer, Dithiothreitol, dNTP, DNase und RNase-Inhibitor hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C und anschließender Aktivierung der DNase bei 75 °C synthetisierte die hinzugefügte reverse Transkriptase in 60 Minuten bei 42 °C komplementäre (c)DNA. Bei 94 °C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert und die cDNA bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Durchführung der RT-PCR

Die realtime-PCR wurde mit einer DNA Engine Opticon der Firma MJ Research und den QuantiTect Gene Expression Assays der Firma Quiagen nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde aufgetaut und 30 µg davon zusammen mit den Bestandteilen des Kits (QuantiTect Probe PCR Master Mix, QuantiTect Assay Mix, RNase-freies Wasser) auf ein Volumen von 50 µl in weiße Reaktionsgefäße der Firma Biozym pipettiert. Alle Untersuchungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Das Gerät führte im Anschluss folgende programmierte Methode entsprechend der Vorgaben der Firma Quiagen durch:

- 1) initiale Aktivierung 15 Minuten, 95 °C
- 2) 3-Stufen-Zyklus, 45 mal wiederholt
 - a. Denaturierung: 15 Sekunden, 94 °C
 - b. Anlagerung (annealing): 30 Sekunden, 56 °C
 - c. Verlängerung: 30 Sekunden, 76 °C

Die Ergebnisse wurden als lineare Funktion der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl ausgegeben. Es ergab sich ein Graph mit linear ansteigendem Bereich, in dem die Zahl der DNA-Kopien exponentiell ansteigt. In diesem Abschnitt wurde der Treshold (Schwellenwert der Fluoreszenz) gesetzt. Diese Gerade (der Treshold) hatte einen Schnittpunkt mit der Funktion eines jeden Reaktionsgefäßes: der Treshold cycle (CT), der Schwellenzyklus, an welchem der exponentielle und damit quantifizierbare Anstieg beginnt. Die Unterschiede im CT erlaubten die relative Quantifizierung mit Hilfe der Delta-CT-Methode. Dazu wurde der Mittelwert der beiden Proben (Doppelbestimmung) vom Mittelwert der β -Actin Proben subtrahiert (Housekeeping gene mit bekannter Konzentration). Der erhaltene Wert wird als Delta-CT bezeichnet, das endgültige Ergebnis wurde nach folgender Formel weiter berechnet:

$$\text{relative Expression } (\beta\text{-Actin zu Probe}) = 2^{-\text{Delta-CT}}$$

Diese Werte mit der Einheit RLU (relative light units) wurden zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse aus der RT-PCR genutzt.

2.4.4. *Western Blot*

Prinzip des Western Blot

Der Western Blot oder Immunoblot ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung von Proteinen im Lysat. Zunächst werden die Eiweiße mit dem stark ionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt, um allen die gleiche (negative) Ladung zu verleihen und ihre Sekundärstruktur aufzuheben. Anschließend werden die Eiweiße mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) horizontal aufgetrennt. Dazu wird eine Spannung angelegt und die nun gleichmäßig geladenen Proteine wandern entsprechend ihrer negativen Ladung durch das Gel in Richtung des positiven Pols. Dabei trennen sich die Proteine nach ihrer Größe auf, denn kleine SDS-Proteine gelangen schneller durch die Poren des Polyacrylgels (Molekularsiebeffekt). Nach dieser Elektrophorese, kurz SDS-PAGE, überträgt man die selektierten Proteine, wieder durch das Anlegen einer vertikal wirkenden Spannung aus dem Gel heraus auf einen Träger, zum Beispiel eine Nitrozellulosemembran, um sie dort mit spezifischen Antikörpern inkubieren zu können. Zweit-Antikörper, also Anti-Immunglobuline, gekoppelt mit Radioisotopen oder Enzymen erlauben dann die Detektion der gebundenen Proteine. Zur Bestimmung der Molekulargewichte führt man ein Gemisch aus bekannten Proteinen mit, welche sich parallel auftrennen und die Zuordnung der zu untersuchenden Proben zu Banden der Eichgerade und damit die Einschätzung des Molekulargewichts in kDa erlauben. Ein Dalton entspricht der Masse eines Wasserstoffatoms.

Durchführung des Western Blot

Für den Western Blot wurden aus den Proteinlysaten aus Abschnitt 2.3.4 durch Zusetzen von Aqua bidest Proben mit äquivalenter Proteinkonzentration hergestellt, so dass in den Taschen des Elektrophoresegels endgültig 30 µg Protein enthalten waren. Die Proben wurden vor dem Pipettieren für 5 Minuten bei 95 °C gekocht um die Polypeptidketten zu entfalten. In eine Apparatur der Firma CSO wurde zuerst das

Trenngel gegossen und ausgehärtet, in welchem sich später die Proteine nach ihrer Größe aufteilen. Darüber wurde der Sammelgelpuffer gegossen, in welchem mittels eines Kammes als Platzhalter auch die Taschen für die Aufnahme der Proben entstanden. Beim Durchlaufen des Sammelgels erhielten die Proteine ihre gleichmäßige Ladung. Die Schichtdicke des Gels betrug 1,2 mm.

Nach der Elektrophorese bei 15 V für 1 Stunde und 40 Minuten wurden die Proteine im Semidry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Beim Semidry-Verfahren wirkt die Spannung über feuchtes Filterpapier auf das Gel und die Membran ein, Kathode und Anode sind Metallplatten. Beim Nassblotten hingegen werden Gel und Membran in die Blotapparatur eingespannt und ein Elektrophoresepuffer wirkt als Kathode und Anode. Der Erfolg des Blottens und die gleichmäßige Proteinbeladung der Membran wurde mit einer Ponceau S-Färbung evaluiert. Ponceau S ist anionischer, sehr hydrophiler Disazofarbstoff, welcher die Proteinbanden auf der Membran sichtbar macht.

Die Membran wurde im Anschluss mehrfach mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen, unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5 % Mager trockenmilch-Lösung geblockt. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit primärem, spezifischem Antikörper gegen bcl-2, bax oder β -Actin in der Verdünnung 1 : 200 (bcl-2), 1 : 400 (bax) oder 1 : 2500 (β -Actin) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurde nun mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-gekoppelt, anti-Maus/anti-Kaninchen) in der Verdünnung 1 : 2500 für 60 Minuten inkubiert. Dieser koppelte an den jeweiligen, schon am Protein gebundenen, primären Antikörper. Nach viermaligem Waschen wurde die Membran mit dem chemilumineszierenden Substrat Roti-Lumin der Firma Roth behandelt. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP), das an den Zweitantikörper gebundene Enzym, setzte dabei Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid um. Das dabei entstandene angeregte Anion emittierte Licht, welches mit einem digitalen Imaging System LAS 3000 von Fujifilm erfasst werden konnte. Die densitometrische Auswertung der erhaltenen Bilder erfolgte mit der Software AlphaDigiDoc von Alpha Innotech.

Im Bild 8 wird das Verfahren zur Bestimmung der Proteingröße der sichtbaren Banden beispielhaft dargestellt. Bei jedem Lauf wird ein sogenannter Marker, ein Gemisch aus verschiedenen bekannten Proteinen mitgeführt, welcher dann als sichtbares Muster auf der Membran erscheint. Durch das digitale Overlay kann man die

Banden ihrer Größe nach einordnen und die spezifische Bindung des Antikörpers verifizieren.

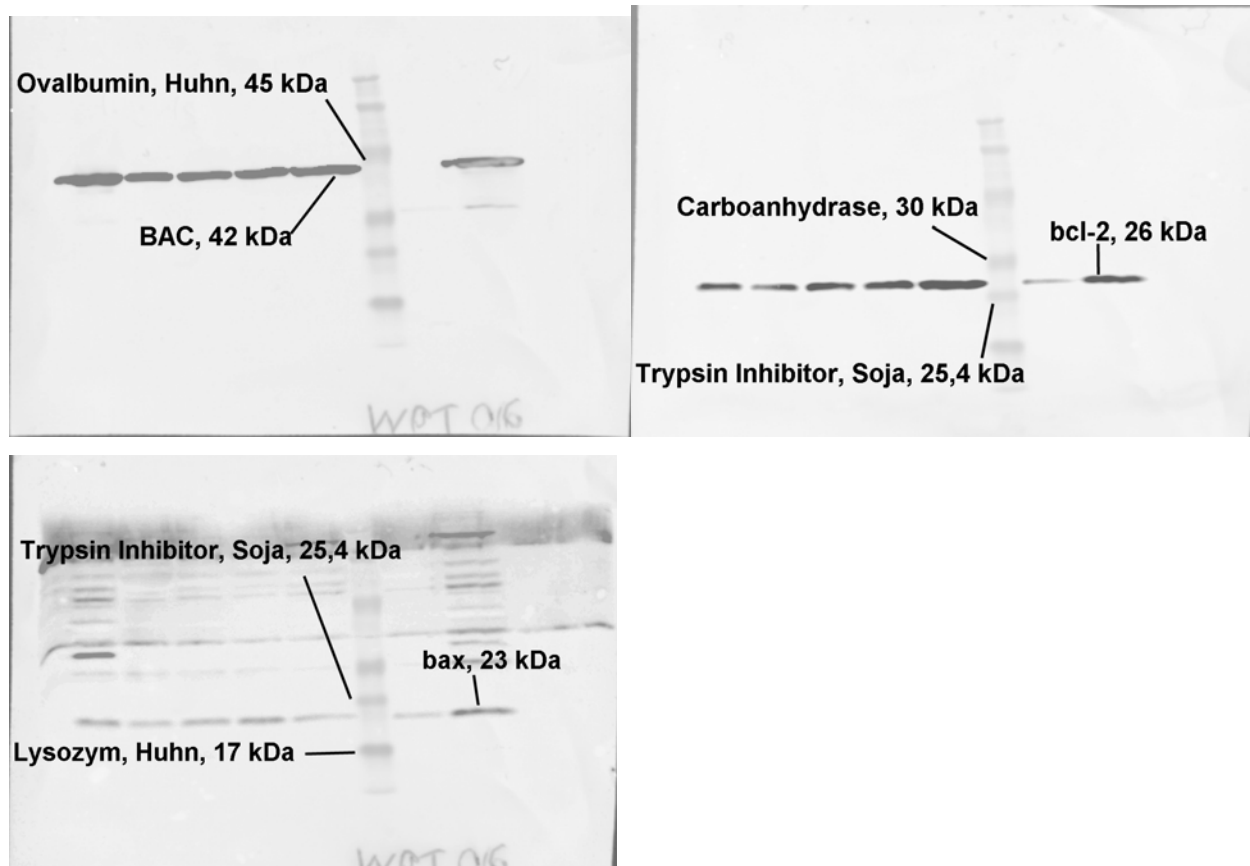


Bild 8: Western Blot: Bestimmung der Proteingröße

Die digitale Auswertung der Western Blots erlaubt diese Kontrolldarstellungen. Über die Aufnahme der Chemilumineszenzmessung wurde das normale Foto der Membran mit dem sichtbaren Marker für die Proteingröße gelegt und mittels Software halb transparent dargestellt. So lassen sich die gemessenen Banden der Größe nach zuordnen.

2.4.5. Kaspase-Assays

Prinzip von Enzymassays

Die oben beschriebenen Kaspasen sind Schlüsselenzyme in den Kaskaden zur Auslösung von Apoptose. Um Enzymaktivitäten zu beurteilen, lässt man die in der Probe vorhandenen Enzyme unter standardisierten Bedingungen (pH, Temperatur, definierte Menge an Substrat und/ oder Kofaktoren) eine Reaktion katalysieren, deren Ergebnis (Substratabfall oder Produktanstieg, Verbrauch von Kofaktoren) gemessen werden kann. Dazu können zum Beispiel chemische Nachweise, spektroskopische oder luminometrische Messungen genutzt werden.

Durchführung der Kaspase-Assays

Es wurde ein Test der Firma Promega mit angepasstem Protokoll benutzt. Zur Bestimmung der Kaspase 3/7 wurde der Apo-ONE Homogeneous Assay genutzt, bei welchem Rhodamin 110 (Z-DEVD-R110) als Substrat dient. Dieses fluoresziert nach dem katalysierten Entfernen der DEVD-Peptide grün (Excitation_{max} 498 nm, Emission_{max} 521 nm). Anders als in den Vorgaben des Herstellers wurde die Aktivität aber nicht in Zellkultur oder gereinigtem Enzym gemessen, sondern nach einem nach Wagner [38] angepassten Protokoll in 30 µg isoliertem Protein. Es wurde ein entsprechend veränderter Protein-Lysepuffer verwendet.

2.4.6. Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit SigmaStat durchgeführt, statistische Bilder wurden mit SigmaPlot erstellt. Alle Angaben zeigen das arithmetische Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit dem Students t-test oder dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. $P < 0,05$ wurde als signifikant definiert. Sterne innerhalb der Bilder zeigen statistisch signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen an, abweichend davon je nach Darstellung. Ø bezeichnet Vergleiche zwischen Patienten- und Kontrollgruppe, bei denen die Teststärke für eine Beurteilung der Signifikanz nicht ausreichte.

3. Ergebnisse

3.1. Patienten

Die Verfahren und Abläufe zum Einschluss von Patienten in die Studie wurden schon in Kapitel 2.2 beschrieben. Durch die Definition Polytrauma und das Einschlusskriterium ISS > 20 konnte eine Homogenität im Verletzungsmuster erreicht werden, welche für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wichtig ist. Der überwiegende Anteil der eingeschlossenen Patienten war an Extremitäten (80 %), Thorax (88 %) und Kopf (72 %) verletzt. Die schwersten Verletzungen traten an Kopf und Abdomen auf. Der ISS als einheitsloser Wert macht auch unterschiedliche Verletzungsmuster skalierbar. Im Mittel ergibt sich für das Kollektiv ein ISS von 31,8. Nach dem Trauma mussten die Patienten durchschnittlich 51,36 Tage stationär bleiben, davon 21,96 Tage intensivtherapiert und 15,24 Tage beatmet. Leider verstarben im Verlauf insgesamt 3 Patienten an den Folgen ihres Unfalls. Die Tabelle 10 zeigt einen umfassenden Überblick über alle eingeschlossenen Studienpatienten. Im linken Teil der Tabelle finden sich dabei die personenbezogenen Daten, mittig Details zur Art und Dauer der Therapie und rechts das Verletzungsmuster, aufgearbeitet nach der Abbreviated Injury Scale (AIS) als Grundlage für den ISS.

Tabelle 10: Patienten – Details

Patient	Alter	Geschlecht	verstorben	Dauer Klinikaufenthalt	Dauer ITS	Dauer Beatmung	intrakranielles Trauma	ISS	Kopf und Hals AIS	Gesicht AIS	Thorax AIS	Abdomen AIS	Extremitäten AIS	Weichteile AIS
1	22	m	nein	47	6	0	ja	41	4	1	3	4	0	0
2	77	m	nein	65	1	0	ja	24	4	1	0	2	2	1
3	39	m	nein	72	10	0	nein	22	0	0	3	0	3	2
4	54	w	ja	4	4	4	ja	75	6	1	0	0	0	0
5	19	m	nein	18	6	3	nein	19	0	1	3	3	0	0
6	83	w	ja	56	56	15	ja	34	4	3	3	0	2	0
7	79	w	nein	64	64	50	ja	36	4	0	4	2	0	0
8	80	w	nein	96	53	42	nein	41	4	0	4	3	2	0
9	40	m	nein	40	25	2	nein	18	0	0	3	0	3	0
10	47	m	nein	90	4	1	nein	26	0	0	1	3	4	0
11	52	w	nein	120	50	109	ja	41	4	0	3	4	3	0
12	34	m	nein	56	2	1	ja	25	4	0	0	0	3	0
13	64	m	nein	12	1	1	ja	24	4	0	2	0	2	0

Patient	Alter	Geschlecht	verstorben	Dauer Klinikaufenthalt	Dauer ITS	Dauer Beatmung	intrakranielles Trauma	ISS	Kopf und Hals AIS	Gesicht AIS	Thorax AIS	Abdomen AIS	Extremitäten AIS	Weichteile AIS
14	71	m	nein	42	25	11	ja	27	3	0	3	2	3	0
15	21	m	nein	33	2	1	ja	27	3	0	3	0	3	0
16	34	m	nein	28	6	1	nein	34	0	0	4	3	3	0
17	57	m	nein	97	52	48	ja	34	4	3	3	2	3	0
18	82	w	nein	93	48	3	nein	29	0	0	3	2	4	0
19	18	m	nein	32	13	6	ja	41	4	0	3	4	0	0
20	41	w	nein	56	19	14	ja	34	3	4	3	0	2	0
21	33	m	nein	23	18	5	nein	43	0	0	3	5	3	0
22	49	m	nein	39	11	7	nein	22	2	2	3	3	2	0
23	42	m	nein	57	43	33	ja	22	3	0	3	0	2	0
24	45	m	nein	27	13	7	ja	27	3	3	3	0	3	0
25	70	w	ja	17	17	17	nein	29	2	1	3	4	2	0
MW	50,1			51,3	21,6	15,2		31,8	2,6	0,8	2,6	1,84	2,2	0,1

Nachfolgend gibt Tabelle 11 Auskunft über entzündliche Komplikationen während des Klinikaufenthalts, um einen Eindruck vom stationären Verlauf zu vermitteln. Führend waren bei diesem Kollektiv Erregernachweise im Bereich der Atemwege und der Lunge, der Hautverletzungen/ Wunden, sowie der Harnwege. Insgesamt erfuhr 64 % aller Patienten im Verlauf eine entzündliche Komplikation. Einen entzündlichen Fokus zusammen mit allen weiteren Kriterien für Sepsis boten drei Patienten.

Tabelle 11: Infektionen während des Klinikaufenthaltes

<i>n</i>	♂ (n=17)	♀ (n=8)	gesamt (n=25)
Pneumonie	1 (5,9 %)	3 (37,5 %)	4 (16 %)
Atemwege	4 (23,5 %)	4 (50 %)	8 (32 %)
Thoraxdrainage	0	1 (12,5 %)	1 (4 %)
Harnwege	3 (17,7 %)	3 (37,5 %)	6 (24 %)
Haut/ Wunde	3 (17,7 %)	2 (25 %)	5 (20 %)
Katheterspitze	1 (4 %)	2 (25 %)	3 (12 %)
Infektionen/ Patient	0,65	1,88	1,08
Sepsis	1 (5,9 %)	2 (25 %)	3 (12 %)
Tod	0	3 (37,5 %)	3 (12 %)

Die folgenden Tabellen zeigen die in den ersten fünf Tagen durchgeführten Operationen: Tabelle 12 im Überblick nach Körperregionen geordnet, Tabelle 13 enthält die detaillierte Auflistung für jeden Patienten. Die meisten chirurgischen Interventionen erfolgten am Tag des Traumas sowie an den Tagen zwei und fünf. Dabei wurden initial vor allem Eingriffe vitaler Indikation durchgeführt und offene Frakturen, Wirbelsäulenverletzungen, Organrupturen und andere Unfallfolgen versorgt. Die Operationen am Tag zwei sind zum Großteil Verfahrenswechsel in der traumatologischen Versorgung und Nachoperationen von Weichteilverletzungen wie zum Beispiel Debridement (Wundanfrischung). Insgesamt wurden 80 % der Patienten direkt nach dem Unfall operativ versorgt und 40 % erneut am zweiten oder fünften Tag nach dem Trauma. Diese Eingriffe bedeuten für den Patienten erneuten Stress und werden auch als *second hit* bezeichnet, der abhängig vom immunologischen Status des Patienten für Komplikationen verantwortlich sein kann.

Tabelle 12: Operationen: Überblick

<i>n</i>	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Kopf/ Hals	4					
Gesicht	5		1			
Thorax	8		3			
Abdomen	5	1	1			
Extremitäten	14		3		2	5
Weichteile	2		2	1		2

Tabelle 13: Operationen: detailliert

Patient	Tag	Operation
1	1	Splenektomie dorsale Stabilisierung der Brustwirbelsäule multisegmentale Spondylodese mit Fixateur interne
2	0	Patellareposition Naht Kopfplatzwunde und Risswunde am Oberarm
3	0	externe Fixation der Femurschaftfraktur links Fasziotomie Ober- und Unterschenkel links Schraubenosteosynthese der Oberschenkelhalsfraktur rechts
4	0	Dekompressionskraniotomie, Hämatomausräumung
5	0	offene Reposition und Plattenosteosynthese des rechten Iliosakralgelenkes Gummiband-Ligatur am rechten Ober- und Unterschenkel Thoraxdrainage rechts
6	0	Naht Riss-Quetschwunde links temporal
7		Keine

Patient	Tag	Operation
8	0	explorative Thorakotomie rechts mit offener Drainage der Brustwand explorative Laparotomie, Zwerchfellnaht
	2	Spondylodese BWK 7/8 von ventral Fixateur externe Tibia rechts
9	0	Thoraxdrainage Reposition Beckenfraktur, Fixateur externe
	5	offene Reposition der Symphysensprengung und Iliosakralgelenksprengung mittels Plattenosteosynthese
10	0	dorsale Spondylodese BWK 12 bis LWK 4 Fixateur externe am distalen Femur und der Tibia links Wunddebridement, temporärer Wundverschluss
	2	Wunddebridement, Exzision Muskel Oberschenkel links
	4	Reposition Mehrfragmentfraktur distaler Femur mit Kondylenplatte links
11	0	Reposition der Beckenfraktur, Fixateur externe Kompressionsschraube proximaler Femur rechts Fixateur externe an distaler Tibia rechts Weichteildebridement an den Extremitäten
	5	Plattenosteosynthese rechter Tibiaschaft Weichteildebridement Oberschenkel
12		Keine
13	5	offene Reposition der Mehrfragmentfraktur und Plattenosteosynthese des Radius links
14	0	Thoraxdrainage beidseits
15	0	geschlossene Reposition Femur und Humerus rechts, Fixateur externe Fasziotomie nach Kompartmentsyndrom
	3	Wunddebridement
16	0	geschlossene Reposition Iliosakralgelenk, rechter und vorderer Beckenring, Fixateur externe
	5	offene Reposition der Beckenfraktur, Plattenosteosynthese
17	0	Reposition mit Zuggurtungsosteosynthese rechter Femurkopf
18	0	offene Reposition Becken, Fixateur externe dorsoventrale Lavage, Sanierung des Retroperitoneums temporärer Bauchdeckenverschluss Thoraxdrainage rechts
	2	ausgiebige Lavage, sekundärer Bauchdeckenverschluss Thoraxdrainage rechts gewechselt
19	0	Splenektomie Thoraxdrainage beidseits Bohrlochtrepantation Kalotte, Implantation intrakranielle Messsonde offene Reposition der Mehrfragmentfraktur des Corpus mandibulae
20	0	Kraniotomie geschlossene Reposition Tibia und Fibula rechts

Patient	Tag	Operation
21	0	Exartikulation rechte Schulter Thoraxdrainage Nierenextirpation mittels medianer Laparatomie Splenektomie
	5	Schulter: Debridement, Dechondrofikation
22	2	geschlossene Reposition BWK 6 und 7 Spondylodese dorsal Th5-8 Thoraxdrainage
23	0	Bohrlochtrepation
	2	offene Reposition Olecranonfraktur
24	0	geschlossene Reposition Symphyse und Radius Rekonstruktion Mittelgesicht
	4	offene Reposition und Plattenosteosynthese der Symphysensprengung offene Plattenosteosynthese Radius links
25	0	Mesenterialnaht Ileumresektion geschlossene Reposition : linker Unterschenkel, Fixateur externe; rechter Unterschenkel , Gips Versorgung Nasenbeinfraktur Thoraxdrainagen beidseits

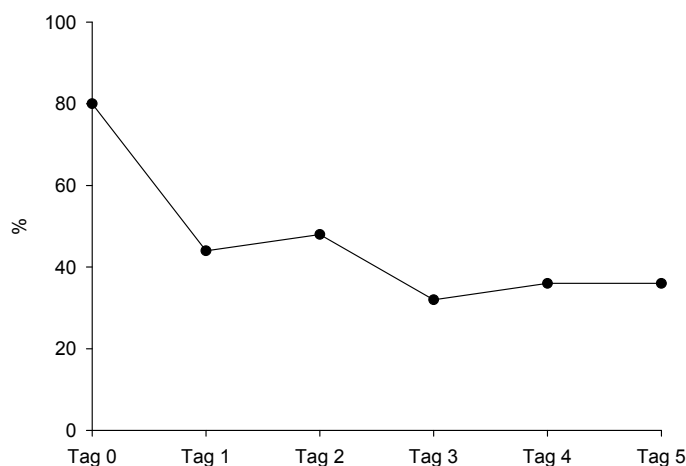


Bild 9: Patienten im SIRS

Dargestellt ist der Anteil (%) an Patienten, die nach den Kriterien des SIRS eine überschießende Inflammation zeigen.

In Bild 9 ist der Anteil der Patienten gezeigt, welche am jeweiligen Tag die Kriterien für eine überschießende Inflammation, SIRS (siehe Kapitel 1.2.3), erfüllten. Initial ließ sich dieser pathologische Zustand bei 80 % der Patienten feststellen, im Verlauf blieben etwa 40 % im SIRS. Auffallend ist, dass männliche Probanden kumulativ an 43 % aller Tage im SIRS sind, weibliche Probanden jedoch an 80 % aller Tage.

3.2. Zellzahlen

Die Bestimmung der korpuskulären Blutbestandteile im Blutbild und entsprechender Subpopulationen im Differenzialblutbild ist eine Standardmethode zur Beurteilung des Immunstatus eines Patienten. Hierbei standen die Analyse der Leukozytenzahl und des jeweiligen Anteils an Lymphozyten im Vordergrund. In Bild 10 A ist die Leukozytenzahl schwer verletzter Patienten in den ersten fünf Tagen nach Trauma dargestellt. Demnach zeigen polytraumatisierte Patienten nach einer initialen posttraumatischen Leukozytose ($14 \pm 1,8$ G/l) eine rasche Rückkehr der Werte in den oberen Referenzbereich (bis 10 G/l). Es ist ersichtlich, dass der Lymphozytenanteil im analogen zeitlichen Verlauf eine davon abweichende Entwicklung nimmt (Bild 10 B). Es kann ein Abfall der Lymphozyten bereits ab Tag 0 gezeigt werden, welcher im gesamten Beobachtungszeitraum signifikant unterhalb des bei gesunden Kontrollprobanden ermittelten Referenzbereichs verläuft.

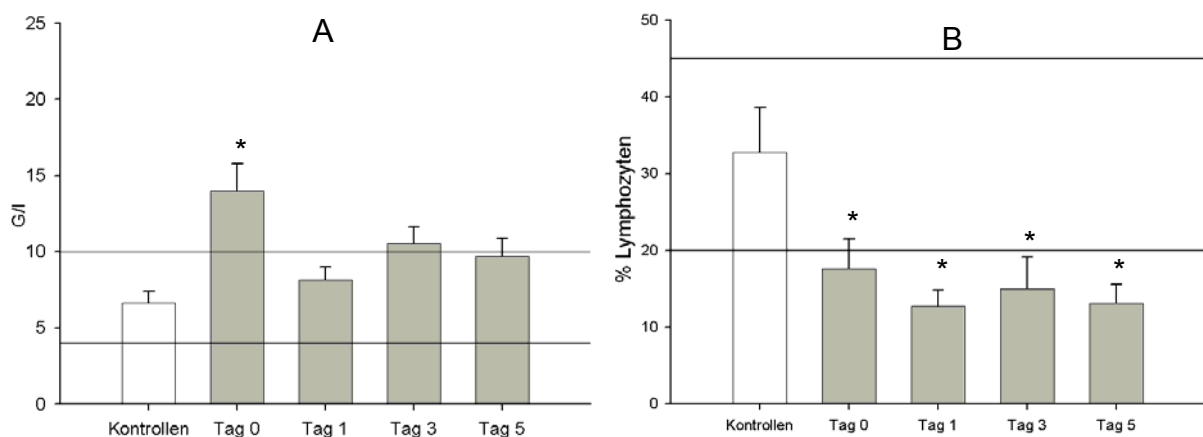


Bild 10: Absolute und prozentuale Leukozytenzahlen nach Polytrauma.

Dargestellt sind in [A] die absoluten Zellzahlen G/l der Leukozyten an den Tagen 0, 1, 3 und 5 von Polytraumapatienten sowie Kontrollen. In [B] ist nach gleicher Art der Anteil in % von Lymphozyten an den Leukozyten aufgetragen. Die horizontalen Linien begrenzen die jeweiligen Referenzbereiche für Erwachsene [39].

Der prozentuale Anteil der T-Zellen an den Lymphozyten bewegt sich in den ersten fünf Tagen ebenfalls unterhalb des Referenzbereichs und erreicht den Wert der Kontrollprobanden vor Ende des Beobachtungszeitraumes nicht wieder. Dabei verändert sich auch – hier nicht signifikant – das Verhältnis aus CD4 positiven Lymphozyten zu solchen, die CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die steigende CD4+/CD8+ Ratio deutet eine anteilig geringere Abnahme der CD4+ Zellen an.

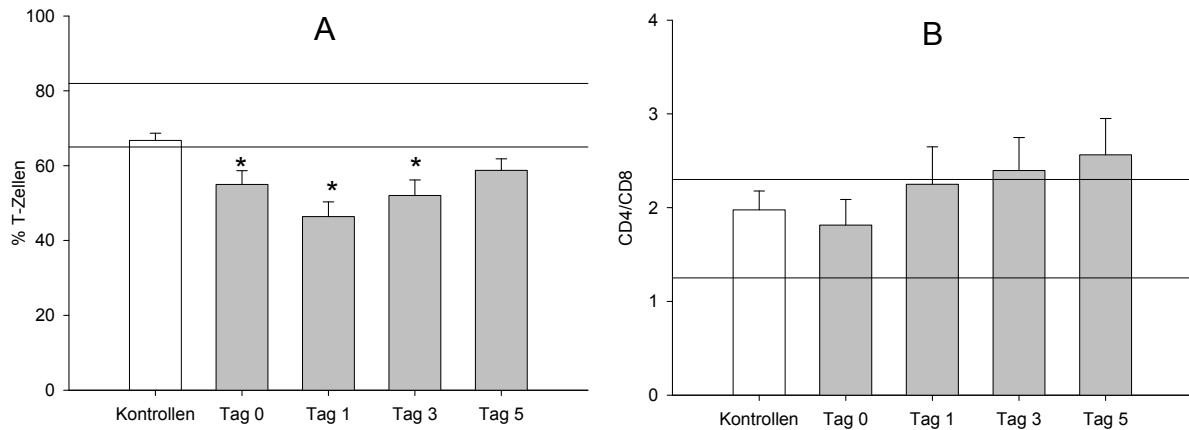


Bild 11: T-Zell Anteil und Verhältnis CD4+/ CD8+ Zellen nach Polytrauma.

Dargestellt ist in [A] der relative Anteil der T-Lymphozyten an den Gesamt-Lymphozyten. [B] zeigt als Quotient das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen. Die horizontalen Linien begrenzen die jeweiligen Referenzbereiche für Erwachsene [39].

3.3. DNA-Fragmentation

Im Kapitel 1.2.4 wurde die Fragmentation der Erbsubstanz durch Kaspase-aktivierbare DNAsen in Fragmente von 200 Basenpaaren als ein charakteristisches Zeichen der Apoptose beschrieben. Diese Veränderungen können zum Beispiel mit dem TUNEL-Verfahren nachgewiesen werden. Die so gefärbten Zellen sollten einen ersten Hinweis geben, ob in den isolierten Zellen Apoptose auftritt. In der mikroskopischen Auswertung zeigte sich vor allem zum Ende des Beobachtungszeitraums ein deutlich gesteigener Anteil an Lymphozyten mit DNA Strangbrüchen, einem typischen Zeichen für programmierten Zelltod. Die identisch bearbeiteten Kontrollen enthielten nahezu keine apoptotischen Zellen. Im Bild 12 sind charakteristische Ausschnitte aus der Färbung eines Patientenpräparates im Vergleich zu einer repräsentativen Kontrolle im zeitlichen Verlauf dargestellt. Der mikroskopisch sichtbare Anteil von Zellen mit braun verfärbtem Zellkern nimmt über den Beobachtungszeitraum gegenüber der Kontrolle deutlich zu. Bild 13 zeigt den prozentualen Anteil von Zellen mit Strangbrüchen in allen gemessenen Patienten- und Kontrollpräparaten. Dargestellt ist der Quotient aus der Zahl der Zellen mit und ohne dieser für die Apoptose charakteristischen Strangbrüche. Auch im Mittel ist bis zum Tag 3 nach Trauma der Anstieg des Anteils der apoptotischen Zellen signifikant.

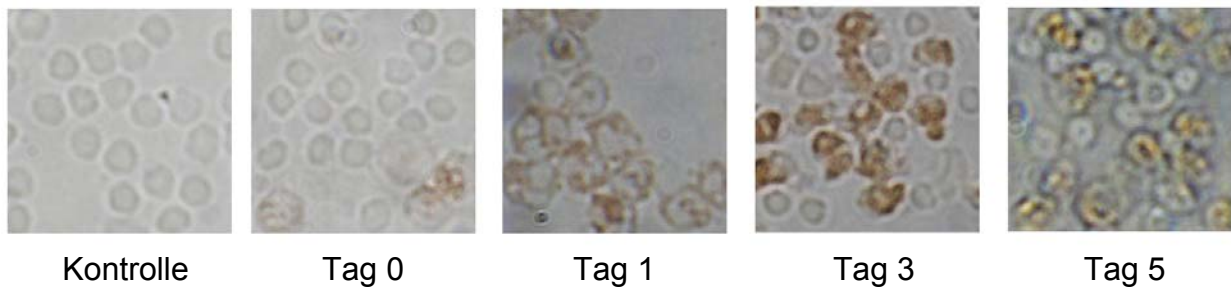


Bild 12: TUNEL-Analyse: Färbung der T-Lymphozyten zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen

Charakteristische Färbung von isolierten T-Lymphozyten eines polytraumatisierten Patienten. Die bräunliche Verfärbung zeigt DNA-Strangbrüche als Zeichen für Apoptose an. Dieser Hinweis auf Apoptose findet sich bei vielen Patienten besonders ausgeprägt am Tag 3.

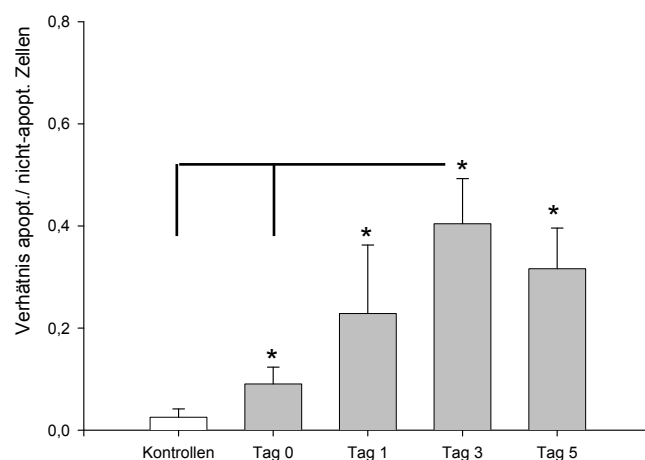


Bild 13: TUNEL: Fragmentation der DNA als Hinweis für Apoptose

Durch Auszählung von Zellen nach TUNEL-Färbung konnte das Verhältnis aus gefärbten (apoptotischen) zu nicht apoptotischen Zellen bestimmt werden. Diese Abbildung zeigt die Zunahme der Apoptoserate in isolierten T-Lymphozyten in den Tagen nach Polytrauma.

3.4. Kaspase 3/7

Kaspasen sind Schlüsselenzyme für die Apoptose in Lymphozyten. Aktivierte Kaspase 8 stellt nach der Interaktion mit FADD einen terminalen Schritt in der Enzymkaskade des extrinsischen Signalweges dar. Kaspase 9, die durch den Komplex aus mitochondrialem Cytochrom c und Apaf-1 aktiviert wird, ist das analoge Enzym in der intrinsischen Signalkaskade. Beide Wege münden in die Aktivierung der Kaspase 3/7, das eigentliche Apoptose-induzierende Schlüsselenzym, welches die gemeinsame Endstrecke einleitet: die Aktivierung von spezifischen DNAsen.

Die Kaspase 3/7 als zentrales Enzym der Apoptosekaskade im intrinsischen und extrinsischen Weg wurde mittels Enzymaktivitätsassay im Zelllysat untersucht. Wie dem Bild 14 zu entnehmen ist, zeigt die Kaspase 3/7 der isolierten T-Lymphozyten polytraumatisierter Patienten eine verstärkte Aktivität zu allen untersuchten Zeitpunkten.

Dabei konnten statistisch signifikante Veränderungen an den Tagen 1 und 5 nach Trauma ermittelt werden.

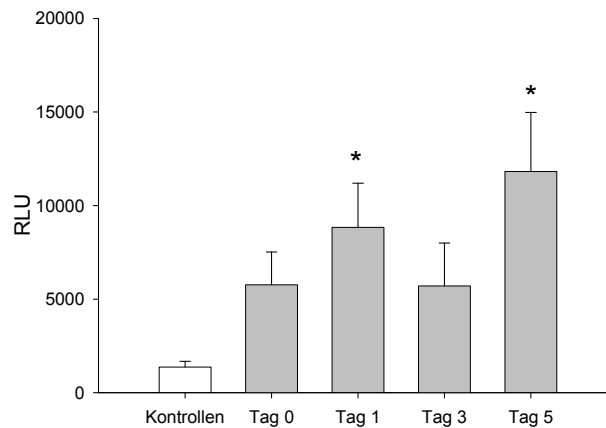


Bild 14: Enzymassay: Kaspase 3/7

Bei den untersuchten Patienten traten vor allem an den Tagen 1 und 5 signifikant veränderte Enzymaktivitäten auf.

3.5. *bcl-2* und *bax*

Die *bcl*-Onkogene *bcl-2* und *bax* sind Proteine, die mit der Mitochondrienmembran interagieren und die mitochondrial vermittelte Apoptose beeinflussen. Durch Anlagerungen von *bcl-2* kann die Permeabilitätszunahme verhindert werden und Cytochrom *c* verbleibt im Mitochondrium. *bcl-2* bildet mit *bax* Heterodimere. Nicht nur die Konzentration, auch das Verhältnis der Proteine zueinander bestimmt über die Auslösung des Signalweges mittels Apaf-1 und Kaspase 9. Beide Proteine wurden auf Ebene der RNA und des Proteins untersucht.

Mittels RT-PCR wurde die relative Expression der *bcl-2* und *bax* Gene ermittelt und diese in Korrelation zu den im Western Blot ermittelten Proteinkonzentrationen gesetzt. Bild 15 A zeigt für *bcl-2* nur unwesentliche Veränderungen in der Genexpression, wobei die Werte geringfügig um die Werte der Kontrollen schwankten. Auch bei der Untersuchung der Genexpression von *bax* kam es zu keiner statistisch signifikanten Veränderung innerhalb der ersten fünf Tage nach Trauma (Bild 15 B). Das Verhältnis der Proteine zueinander blieb ebenfalls ohne signifikante Abweichung zu dem *bcl-2/bax* Quotienten, der aus der gesunden Kontrollgruppe ermittelt wurde (Bild 16).

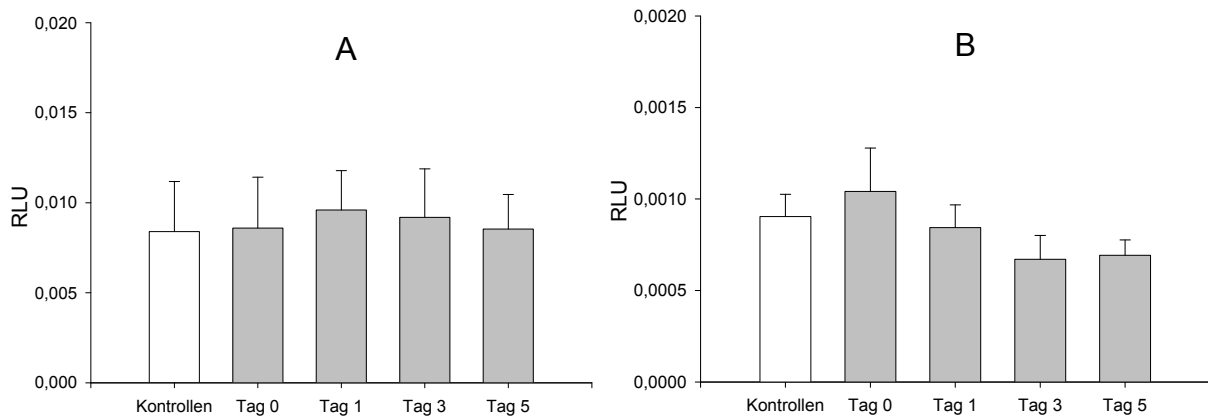


Bild 15: rt-PCR: bcl-2 und bax

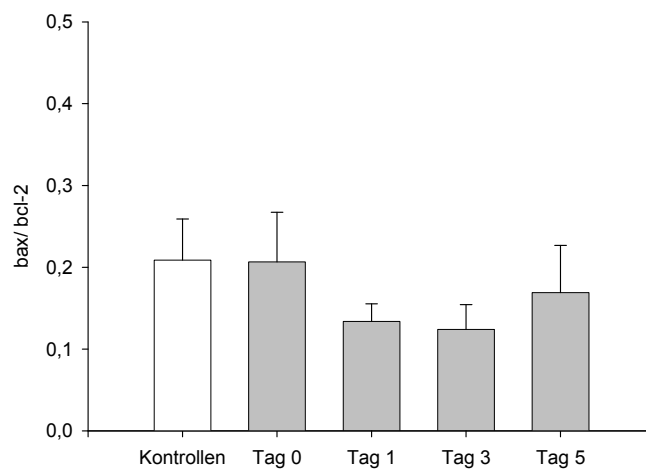


Bild 16: rt-PCR: Quotient aus bax und bcl-2

Die Bilder 15 und 16 zeigen die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung von bcl-2 und bax nach Polytrauma. Bild 15 [A] für bcl-2, lässt wie [B] für bax keine signifikanten Veränderungen erkennen. Auch die Betrachtung des Verhältnisses zueinander ergibt keine Veränderung der Aussage.

Auf Proteinebene wurden die Werte mit den zusätzlich aufgetragenen Kontrollen verglichen, sowie die Veränderungen an den einzelnen Tagen eingeschätzt. Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen, weder im Vergleich zu den Kontrollen noch im Verlauf des Beobachtungszeitraums festgestellt werden.

Bild 17 zeigt einen repräsentativen Western-Blot. Die densitometrische Auswertung aller gemessenen Proben ergab weder im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe noch im posttraumatischen Verlauf eine signifikante Änderung (Bild 18).

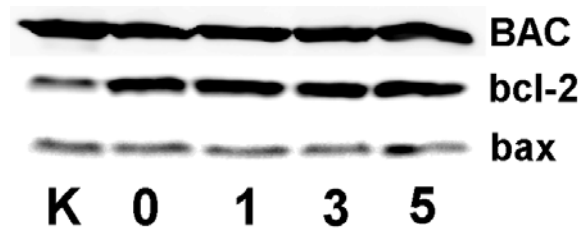


Bild 17: Western Blot: bcl-2 und bax

Die Ergebnisse eines Patienten. β -Actin (BAC) zeigt die gleichmäßige Beladung der Nitrozellulosemembran mit Protein. Bcl-2 und bax verändern sich im Verlauf und zur Kontrolle nur geringfügig.

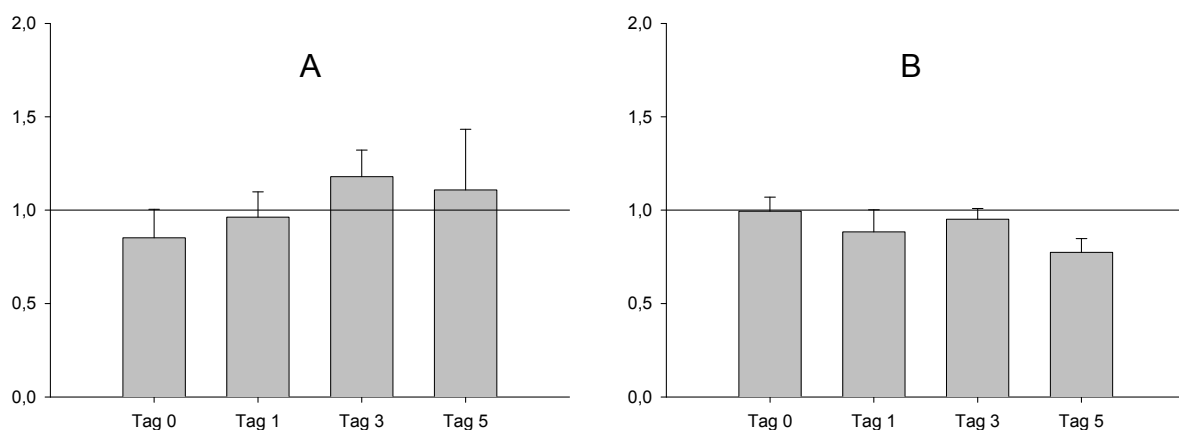


Bild 18: Western Blot: densitometrische Auswertung von bcl-2 und bax

Densitometrische Auswertung aller Western Blot für bcl-2 [A] und bax [B], wobei die mitgelaufene Kontrolle(n) jeweils als Referenz den Wert 1 bekam(en). Die Schwankungen im Verlauf und zu den Kontrollen sind nicht signifikant.

3.6. Fas-Rezeptor (CD95) und TNF-Rezeptor (CD120a)

In der Charakterisierung der Rezeptor-vermittelten Apoptose stellen der Fas-Rezeptor CD95 (Fas-R) sowie der TNF-Rezeptor 1 CD120a (TNFR1) die am besten beschriebenen Rezeptoren mit Todesdomäne dar. CD120a, ein 55 kDa Protein, ist der korrespondierende Rezeptor für TNF- α . Ist der CD120a auf dem Lymphozyten vorhanden, kann das in der Inflammation verstärkt ausgeschüttete TNF- α die Apoptose der Zelle vermitteln. Wird CD95 verstärkt auf der Oberfläche exprimiert, löst die Bindung des Fas-Liganden (FasL) an den Rezeptor über Kopplungsproteine den programmierten Zelltod dieser Zelle aus.

Die vermehrte Expression eines Rezeptors auf der Oberfläche von T-Lymphozyten gibt einen Hinweis darauf, welcher Weg zur Induktion von Apoptose bevorzugt aktivierbar und wie vulnerabel die Zelle für die Signale der Inflammation ist. Die Expression der beiden Rezeptoren wurde durchflusszytometrisch untersucht.

Die Todesrezeptoren CD95 und CD120a machen die Zelle vulnerabel für Signale, die den programmierten Zelltod über den extrinsischen Weg auslösen. Es konnte bei den CD4+ Zellen in dieser Patientengruppe ein signifikanter Anstieg der Expression von CD95 über die ersten drei Messzeitpunkte im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt werden, wobei die durchschnittlich höchste Dichte am Tag eins erreicht wurde. Bei den CD8+Zellen erkennt man in der Gesamtauswertung ebenfalls eine verstärkte Expression von CD95 an allen Tagen. Diese lässt sich aber bei der geringen Größe des Kollektivs und bedingt durch große interindividuelle Unterschiede hier nicht als signifikant darstellen. Für den TNF-Rezeptor CD120a fielen die Unterschiede weit weniger deutlich aus. Der Anstieg der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ist zwar über alle Tage erkennbar, zeigte jedoch im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe sowie im Vergleich untereinander keine signifikanten Unterschiede.

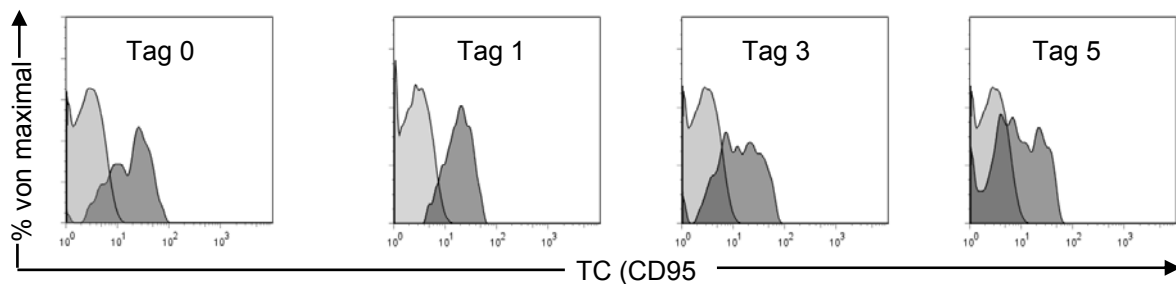


Bild 19: FACS: Einzeldarstellung CD95 auf CD4+ Zellen im Verlauf

Beispielhafte Darstellung eines Patienten und einer Kontrolle im Overlay. Im Vergleich zur Kontrolle hat der Patient an allen Tagen erhöhte Expression von CD95 auf der Oberfläche von CD4+Lymphozyten vermehrt exprimiert.

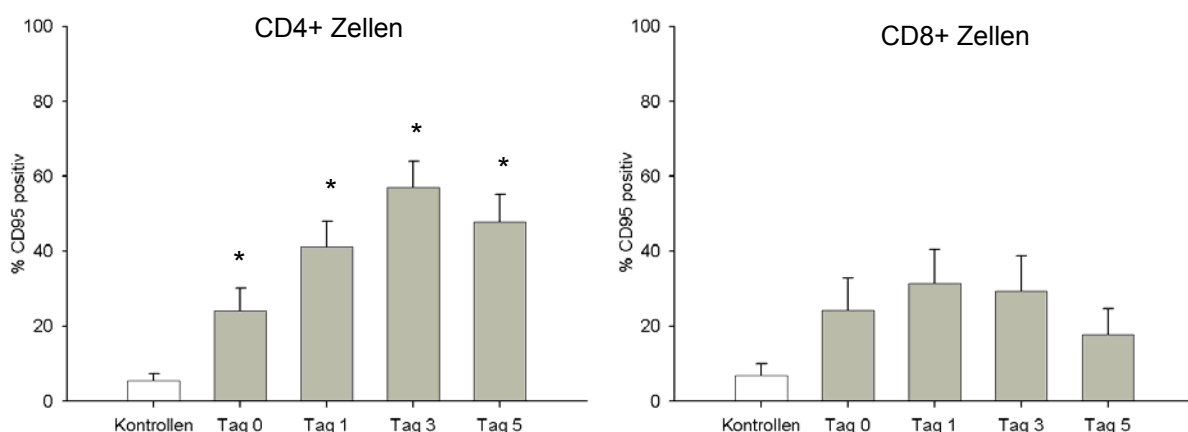


Bild 20: FACS: CD95-Expression im Verlauf

Die Auswertung der FACS-Analysen zeigt zu allen Messzeitpunkten für CD4+ Zellen eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte Expression von CD95 auf der Zelloberfläche. Bei CD8+ Zellen lassen sich die Veränderungen statistisch nicht als signifikant darstellen.

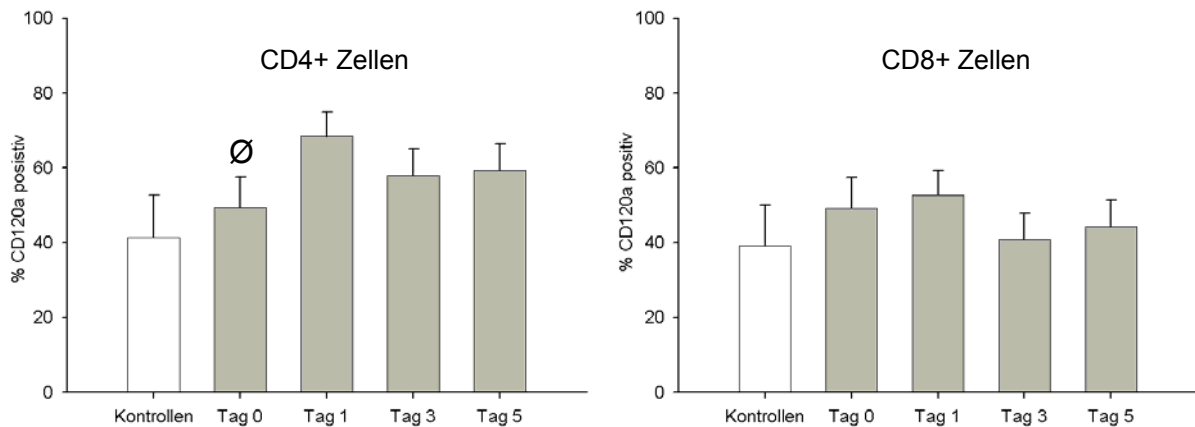


Bild 21: FACS: CD120a-Expression im Verlauf

Der TNF-Rezeptor CD120a wird in den hier vorliegenden Messungen eher gering erhöht auf der Zelloberfläche exprimiert.

3.7. Aktivitätsmarker CD25 und CD69

CD25, auch *T-cell activation antigen (TAC)*, ist identisch mit der alpha-Kette des IL-2 Rezeptors und wird nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert. Bestimmte regulatorische Untergruppen der T-Zellen exprimieren CD25 in einer charakteristischen Art. CD69, auch *early T-cell activation antigen p60*, wird auf bereits aktivierten T-Zellen exprimiert.

Um den Aktivitätszustand der Zellen zu analysieren, wurden diese zwei Oberflächenmarker mittels FACS Analyse auf den isolierten T-Zellen der polytraumatisierten Patienten untersucht. Dabei zeigte sich CD25 zu allen Untersuchungszeitpunkten auf CD4+ T-Lymphozyten verstärkt exprimiert gegenüber der gesunden Kontrollgruppe, wobei an den posttraumatischen Tagen 1, 3 und 5 der Anstieg signifikant war. Für CD69 zeigte sich keine Veränderung. Außerdem war die berechnete Teststärke nicht ausreichend, so dass die Signifikanz nicht abschließend zu beurteilen war.

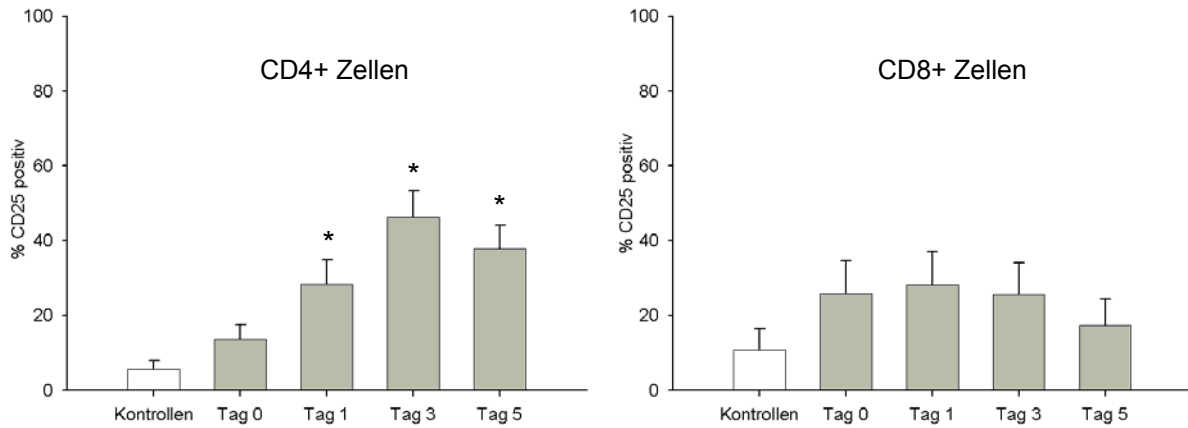


Bild 22: FACS: CD25-Expression im Verlauf

Als Zeichen für eine Aktivierung der T-Zellen wird im Vergleich zur Kontrolle CD25 auf CD4+ Zellen verstärkt, bzw. ab Tag 1 signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle exprimiert.

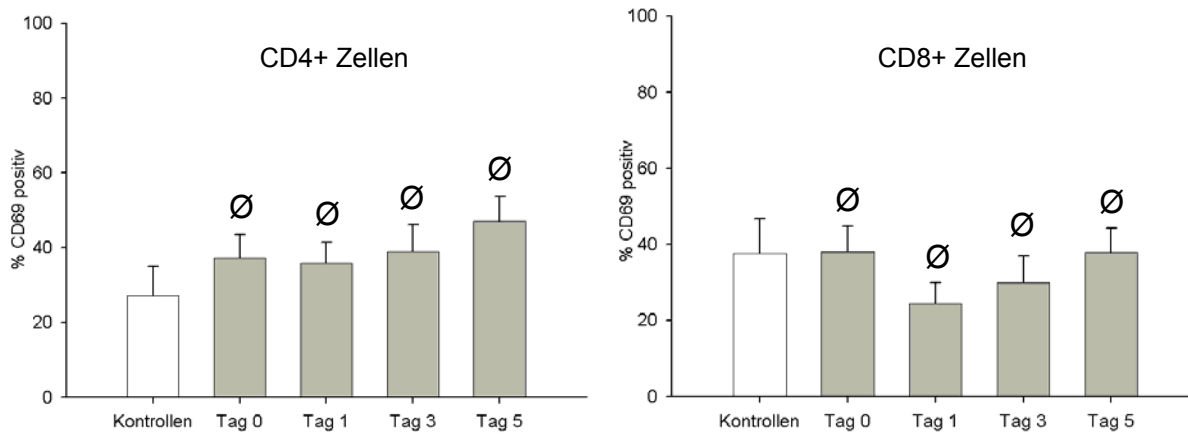


Bild 23: CD69-Expression im Verlauf

Für den Marker CD69 ergeben sich keine Veränderung auf den T-Zell-Subpopulationen, die Teststärke war zur statistischen Beurteilung nicht ausreichend.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Auf den vorstehenden Seiten wurden Resultate der Untersuchung eines Kollektivs vorgestellt, das sich aus Patienten mit klar definierten schweren Verletzungen rekrutierte. Die Betrachtungen beziehen sich auf Veränderungen in der zellulären Immunantwort nach Polytrauma, vor allem auf Zellen der T-lymphatischen Zelllinie. Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Leukozytenzahlen mit initialem Anstieg und einem Verlauf im Referenzbereich lassen sich auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv nachweisen. Die weitere Analyse der leukozytären und lymphatischen Subpopulationen zeigt dabei differenzierte Veränderungen. Eine relative Lymphozytopenie wird durch einen geringeren Anteil von zirkulierenden T-Lymphozyten erklärt. Diese T-Lymphozyten zeigen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ein signifikanten Unterschied in der morphologisch erfassbaren Apoptoserate sowie der Aktivität des Apoptose-induzierenden Schlüsselenzyms Kaspase 3/7. Durchflusszytometrisch nachweisbar wird der Apoptoserezeptor CD95 auf CD4+ Zellen verstärkt exprimiert, wobei der Anstieg von CD25 für eine gleichzeitige Aktivierung dieser Zellen spricht.

Für den Todesrezeptor CD120a und den Aktivitätsmarker CD69 ließen sich keine signifikanten Veränderungen im polytraumatisierten Patientenkollektiv nachweisen. Ebenso konnten für das anti-apoptotische bcl-2 und das pro apoptotische bax, weder auf Transkriptionsebene der m-RNA, noch im intrazellulären Protein, posttraumatische Veränderungen nachgewiesen werden

4. Diskussion

Viele Entwicklungen der letzten Jahrzehnte haben zu einer entscheidenden Prognoseverbesserung von kritisch kranken Patienten beigetragen. Dazu gehören vor allem Fortschritte im Management der Intensivtherapie, Weiterentwicklungen von Operationstechniken, in der Geräteausstattung sowie der pharmakologischen Unterstützung. Die aktuelle Medizin kann mit hohem technischen Aufwand mittlerweile auch instabile Zustände, wie zum Beispiel Sepsis, Organversagen oder Operationen nach schweren Verletzungen über einige Zeit beherrschen und Funktionen wie Herz-Kreislauf, Atmung und Nierenfunktion zeitweise apparativ ersetzen. Im Gegensatz dazu bleiben differenziert wirkende Systeme, zum Beispiel Wundheilung oder neuroendokrine Steuerung, schwer zu beeinflussen, zu kontrollieren oder sind bisher gar unerforscht. Die Polytraumastudie der Arbeitsgruppe soll die immunologischen Abläufe im schwerverletzten Patienten (Polytrauma) bis in die molekulare Ebene genauer analysieren. Der Fokus liegt dabei auf den Immunzellen des peripheren Blutes, die im Rahmen der adaptiven Immunität nach Polytrauma von entscheidender Bedeutung sein müssen. Einen Teilbereich, das Verhalten der T-Zellen, untersuchte diese Arbeit. Der Ausgangspunkt war die These, dass nach schweren Verletzungen Überaktivierung und apoptotischer Zelltod zu einer gestörten Homöostase der Lymphozyten führen. In der Folge, ausgelöst durch systemische Inflammation, kommt es zu gesteigerter Empfänglichkeit gegenüber Infektionen und es können sich Sepsis, MODS und MOF mit den erheblichen Folgen und Risiken für den Patienten entwickeln.

In der Literatur nähert man sich diesem Thema von verschiedenen Seiten. Ganz grundlegend beschreibt zum Beispiel Bone 1996 die nach Trauma oder Infektion ablaufenden Prozesse als Gleichgewicht, abhängig von Aktion und Reaktion der beteiligten Systeme im Körper. Er fordert weitere Forschung, um SIRS und CARS besser zu verstehen [40]. Mannick kommt 2001 in seinem Review zu dem Schluss, dass T-Zellen in der frühen Phase des SIRS nach Unfall eine entscheidende Rolle spielen [19]. So wurden im Tierversuch naive T-Zellen durch Superantigene stimuliert und produzierten, vermutlich analog zu den Verhältnissen nach einem Trauma, große Mengen von Interferon gamma und TNF alpha. Neben seiner Forderung, Messungen immer im zeitlichen Verlauf vorzunehmen und zu beurteilen, misst Mannick der Durchbrechung der Folge von SIRS, CARS und MODS entscheidende therapeutische Bedeutung zu. Im Tiermodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass T-Zellen nach

Trauma größte Mengen an IFN-gamma und TNF-alpha ausschütten, vor allem wenn sie zusätzlich zur Schädigung fremde Antigene erkennen [41, 42]. Weitere Hinweise für diese Annahmen wurden schon in SIRS und Sepsis [21, 43-45], bei elektiv-operativen Eingriffen [46-48] und bei Verbrennungspatienten [49, 50], sowie auch im Tierversuch [51] gezeigt. Auch für Traumapatienten wurden Nachweise für den Verlust an zirkulierenden Lymphozyten und eine gesteigerte Apoptoserate gebracht [22, 23, 52]. Flohé stellt noch 2008 in ihrer Arbeit die grundlegenden Fragen: welche Signale beeinflussen die einzelnen Abläufe und gibt es unterschiedliche Signale für unterschiedliche Verletzungsmuster [53].

Die für diese Arbeit erfolgten Messungen fokussierten deshalb nicht nur auf einen Nachweis der Apoptose und die veränderten Zellzahlen, sondern es wurden neben den zellulären Veränderungen auch Erklärungen auf molekularer Ebene gesucht, um diese Abläufe besser zu beschreiben. Dabei ist die Vielzahl der Einfluss nehmenden Faktoren unüberschaubar. Selbst aktuelle Reviews geben nur einen Überblick über die beteiligten Transmitter, Enzyme und Rezeptoren. Die zitierten Veröffentlichungen generieren Daten aus Patienten, Tiermodellen und In-vitro-Versuchen und beziehen sich dabei auf SIRS, Sepsis, MODS, MOF, Trauma, chirurgische oder Verbrennungspatienten. Auch deshalb war die Fragestellung von Anfang an sehr konkret auf das Patientenkollektiv "Polytrauma ISS > 20" und die beiden bekannten Apoptosewege "intrinsisch" und "extrinsisch" fokussiert. Somit können nun weitere Details der pathophysiologischen Vorgänge bei schwerverletzten Patienten in der frühen Phase ihrer Therapie hinzugefügt und im Kontext interpretiert werden. Sie zeigen deutlich auf weitere Aufgaben und Ansatzpunkte für die Forschung in der Arbeitsgruppe, und auch weit darüber hinaus.

4.1. Patienten

Laut der "Deklaration von Genf" der Generalversammlung des Weltärztebundes von 1948, ist die Gesundheit des Patienten oberstes Gebot beim ärztlichen Handeln. In dem in der vorliegenden Arbeit versucht wurde, Ergebnisse direkt an akut schwer verletzten Patienten zu erarbeiten, sollte diesem Ziel sehr konkret Rechnung getragen werden. Diese Vorgehensweise beinhaltet einerseits die Chance, aussagekräftige, vor allem praxisrelevante, Resultate zu erzielen, bedingt aber auch deutliche methodische Einschränkungen. Ein Reiz liegt zweifellos darin, dass man dort zu Erkenntnissen gelangt, wo auch der Grund zur Forschung überhaupt liegt - am verletzten Patienten.

Ohnehin kann im Reagenzglas die komplexe Wirklichkeit der Immunantwort immer nur teilweise abgebildet werden. Aber auch das Tiermodell birgt neben seiner ethischen Dimension eine Vielzahl von Hindernissen, bevor Effekte für den Menschen nachvollzogen und Therapiestrategien entwickelt werden können. Gerade die Immunantwort bei schwerkranken Patienten ist ein komplex integrierter und vielschichtiger Ablauf, der zahlreiche Interaktionen und Zellen miteinander verbindet.

Natürlich erschwert die Abhängigkeit von einem sehr speziellen Patientenkollektiv und die Vielzahl der beeinflussenden Variablen wie Alter, Geschlecht, Verletzungsmuster, Therapie und weitere individuelle Unterschiede die Interpretation der Resultate. In diese prospektive Studie wurden nur erwachsene, schwerverletzte (polytraumatisierte) Patienten mit einem ISS größer 20 eingeschlossen. Damit wurde das zu untersuchende Kollektiv möglichst genau definiert, um eine große Homogenität für eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Der klinische Verlauf mit intensivmedizinischer Stabilisierung, stabilisierenden und therapeutischen Operationen und der Zusammenarbeit von verschiedenen Fachrichtungen gestaltete sich entsprechend den aktuellen Standards der modernen Intensivmedizin eines Krankenhauses der Maximalversorgung, so dass auch unter diesem Aspekt die Vergleichbarkeit der Resultate als gewährleistet angenommen werden kann.

Insgesamt sind Ergebnisse direkt aus polytraumatisierten Patienten rar, obwohl Verletzungen mit Todesfolge auf Rang zwei der Todesursachenstatistik bei den unter 45jährigen liegt [54]. Wie schon einleitend beschrieben, sind viele der bekannten Abläufe und Veränderungen in septischen Patienten [44, 45] oder im Tiermodell gezeigt worden. Septische Kollektive rekrutieren sich meist aus traumatologischen, elektiv-operativen, internistischen und Verbrennungspatienten. Die Nähe der Vorgänge in Sepsis zu denen im Trauma ergibt sich aber daraus, dass nicht wenige schwerverletzte Patienten einen durch Infektionen komplizierten Verlauf erleben, aus welchem sich nicht selten eine Sepsis entwickelt. Die Grundlagen und die Prädisposition für diese Komplikationen vermutet man in einer Dysfunktion des Immunsystems in den ersten Tagen nach dem Unfall. Für die Einschätzung des klinischen Verlaufes wurden deshalb auch Infektionen und Operationen als wichtige Ereignisse herangezogen. Andererseits muss bemerkt werden, dass ein längerer Beobachtungszeitraum wünschenswert, aber in dieser Untersuchung nicht realisierbar war.

Bei der Beurteilung der Diagnosen und der klinischen Verlaufsparemeter für die einzelnen Patienten wird indes klar, dass eine Patientenkohorte *Polytrauma* weniger eine homogene Einheit darstellt, sondern trotz konkreter Einschlusskriterien, wie auch die eigentliche Therapie, vielmehr eine Einzelfallbetrachtung erfordert. In dem nach Gemeinsamkeiten in der Reaktion des Immunsystems gesucht wurde, musste diese Vorstellung aber vorerst bewusst verlassen werden, allerdings mit dem Ziel die gewonnenen Erkenntnisse wieder individualdiagnostisch oder -therapeutisch anwenden zu können. So unterscheiden sich die Patienten nicht nur im Verletzungsmuster trotz ähnlichem ISS deutlich voneinander, auch der therapeutische Verlauf – Beatmung, Operationen, Flüssigkeitsersatz und pharmakologische Therapie, lässt sich nicht vereinheitlichen und auch aus ethischen Gründen für eine Studie nicht standardisieren. Die Bildung von Gruppen gestaltete sich aufgrund der hier betrachteten Zahl an Patienten schwierig. Bezug nehmend auf beobachtete Unterschiede und Daten aus der Literatur wäre die vergleichende Beurteilung von Patienten mit und ohne Schädel-Hirn-Trauma, männlichen und weiblichen Geschlechts, oder auch nach Lebensalter gruppiert, ein erfolgversprechender Ansatz und sollte unbedingt weiter verfolgt werden. Der Einfluss des Schädel-Hirn-Traumas zum Beispiel, konnte erst kürzlich in unserer Studie an Monozyten gezeigt werden [55].

Zur Beurteilung des inflammatorischen Status und Einschätzung des Risikos für Multi-Organversagen und Outcome lässt sich das Auftreten von SIRS heranziehen. Es beschreibt ätiologisch unabhängig das charakteristische Auftreten von klinischen und Labor-Parametern bei Hyperinflammation. Am Tag des Trauma lag die Prävalenz von SIRS mit 80% über den in der Literatur angegebenen Werten für Patienten auf der Intensivstation [56, 57], der im weiteren Verlauf hohe Anteil von 40 % zeigt deutlich die Gefährdung der Patienten für Komplikationen, die in Form von MOF, Sepsis und Tod leider auch in dieser Patientengruppe auftraten.

Das Durchschnittsalter der Patientengruppe weicht mehr als erwartet von der Kontrollgruppe ab, die parallel akquiriert und bearbeitet wurde und sich entsprechend der beachteten Statistiken aus jüngeren Probanden zusammensetzt. Diese Abweichung kann in der Bevölkerungsstruktur im bürgerlich geprägten Berlin Steglitz seine Ursache finden. Zum Beispiel war der Anteil der über 64jährigen in Berlin Steglitz mehr als doppelt so hoch wie in Berlin Friedrichshain-Kreuzberg (20,3 % vs. 9,9 %, 2004, lt. Statistisches Landesamt Berlin). Weiterhin waren allein vier Patienten 80 Jahre und älter, als sie als Fußgänger (n=3), beziehungsweise Radfahrer (n=1) in einem

Verkehrsunfall verletzt wurden. Eine Konstellation, welche wohl vor allem auch in einer Großstadt mit hohem Verkehrsaufkommen typisch ist. Einige Studien schließen Patienten dieser Altersgruppe aus und lassen damit bewusst Effekte, die eventuell im Alter zum Tragen kommen, außen vor [22, 52, 58]. Um gerade diesen Unterschieden nachzugehen sind aber höhere Fallzahlen notwendig, als sie in der vorliegenden Analyse möglich waren. Mit Veränderung der Altersstruktur und einer Zunahme der körperlichen Aktivität im Alter findet sich auch hier ein interessanter Fokus für weitere Untersuchungen.

Die Geschlechterverteilung von 17 Männern zu 8 Frauen überrascht nicht, weil Männer bei Risikotätigkeiten wie Motorradfahren oder als Bauarbeiter (Stürze) führend sind. In diesem Zusammenhang die Schwerpunkte der Betrachtung geschlechtsspezifisch zu setzen, erscheint bei Betrachtung der Infektionen und der SIRS-Tage sinnvoll. Bei allen Entzündungsschwerpunkten, inklusive Sepsis und Tod, haben Frauen einen prozentual höheren Anteil. Diese Beobachtung lässt sich jedoch mit Daten aus der Literatur nicht vereinbaren. [59, 60], hier wird aufgrund der schützenden hormonellen Konstellation ein besseres Outcome von weiblichen Patienten beobachtet. Auch aufgrund der kleinen Fallzahl erfolgte deshalb keine gesonderte Betrachtung, aber auch hier könnten in weiteren Untersuchungen geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben werden. Infektionen sind typische und gefürchtete Komplikationen bei operativen und schwer kranken Patienten. Insgesamt entfällt bei den gegenwärtig beobachteten Patienten ein Großteil der Infektionen auf Entzündungen der Atemwege. Beatmungsinduzierte Komplikationen sind bei intensivtherapiertem Patientenkollektiv häufig und bedeuten eine zusätzliche Belastung und Gefahr. Weil ARDS (acute respiratory distress syndrome) und ALI (acute lung injury) die häufigsten Manifestationen des MODS sind, stehen sie in der Literatur besonders im Fokus der Aufmerksamkeit. Die Rate der in dieser Arbeit erfassten Infektionen lässt sich mit Werten aus der Literatur vergleichen [22, 58]. Auch in der Abwehr dieser Infektionen spielt die adäquate Funktion und Reaktion der T-Zellen eine entscheidende Rolle, so dass neue Erkenntnisse eine Senkung der Komplikationsrate bewirken können. Allerdings muss man zu bedenken geben, dass in mehreren Studien die Veränderungen in der zellulären Abwehr unabhängig vom klinischen Verlauf waren [23, 52]. Studien, die zu einer positiven Korrelation mit dem klinischen Verlauf kommen, zeigen diese erst mit dem Auftreten von Sepsis und MODS [44, 45, 61].

Das operative Regime entsprach den Standards der aktuellen Medizin in den einzelnen Disziplinen. Die initiale Versorgung im Sinne einer "Damage Control Orthopaedics" erfolgte am Tag des Trauma, sodass eine definitive Stabilisierung zum Beispiel von Frakturen erst im Intervall durchgeführt wurde. Aus immunologischer Sicht muss auch entsprechend den hier gewonnenen Erkenntnissen verstanden werden, dass dieser chirurgische *second hit* den Patienten in einer Phase trifft, die geprägt ist von T-Lymphozytopenie und gesteigerter Apoptoserate. Der Einfluss der chirurgischen Intervention auf die Entwicklung von Infektionen und Komplikationen konnte mit Daten aus dieser Studie schon gezeigt werden [62]. Andere wissenschaftliche Arbeiten, die den *second* oder *third hit* bei schwerkranken Patienten mit in die Überlegungen einbeziehen, sind selten und beurteilen Infektionen nach Trauma als *second hit* [63], beziehungsweise definieren ihn im Tiermodell oft als weiteres Trauma mit Infektion [64]. Untersuchungen über zeitliche Abhängigkeiten und Verläufe im Bezug auf den *second hit* im Behandlungsregime eines Schwerverletzten sind aufgrund der Notwendigkeit für individuelle Strategien kaum zu vergleichen und erschweren auch die Interpretation anderer Ergebnisse. Mit den vorliegenden Fallzahlen ist jedoch eine gruppierte Auswertung nicht sinnvoll möglich.

4.2. Zellzahlen und Apoptose

Die Erhöhung von Leukozytenzahlen im peripheren Blut ist eine seit langem bekannte Reaktion des Körpers auf Stress, Krankheit oder Verletzung [65]. Die deutliche initiale Erhöhung der Leukozyten und der Nachweis von Konzentrationen im oberen Normbereich an den Folgetagen bieten somit keine Überraschung. Die meisten der hier zitierten Studien und Reviews beschreiben aber eine Verringerung der zirkulierenden Lymphozyten und ein verändertes CD4/CD8 Verhältnis in verschiedenen Patientenkollektiven [16, 22, 43, 45, 47, 52, 66]. Die zellvermittelte, adaptive Immunität ist jedoch direkt von der Lymphozytenfunktion abhängig, so dass Störungen der Homöostase entsprechende Konsequenzen für den Kranken bedeuten können. Auch bei den hier bearbeiteten Proben von schwerverletzten Patienten lassen sich diese Daten bestätigen und bestätigen damit gleichwohl den grundsätzlichen Ansatz und Nutzen der Studie. Die verminderte Anzahl an Lymphozyten und T-Zellen im peripheren Blut lässt auf eine Vulnerabilität für Infektionen und Dysfunktionen in der Immunantwort schließen. Im gesunden Menschen verweilt zwar normalerweise nur ein geringer Prozentsatz der Lymphozyten für eine kurze Zeit im Blut, aber alle Lymphozyten des

Organismus zirkulieren täglich zwischen Blutbahn und Gewebe. Trotzdem kann die deutliche Abnahme der nachweisbaren T-Zellen nach Polytrauma nur zum Teil durch Rezirkulationsstörungen, Blutverlust oder die physiologische Migration der Zellen an die Orte der Schädigung und zur Antigenerkennung in die lokalen Lymphareale erklärt werden. Denn in den im Blut nachweisbaren, hier isolierten Zellen, lassen sich mit der TUNEL-Färbung im Verlauf zunehmend DNA-Strangbrüche nachweisen. Zusammen mit der verstärkten Aktivität der Kaspase 3 als Schlüsselenzym der kaspase-abhängigen Apoptose kann daraus geschlossen werden, dass Apoptose zumindest für einen Teil der beobachteten Effekte verantwortlich ist. Die Bedeutung von Kaspase 3/7 im Ablauf der Apoptose wurde erst 2006 im Tiermodell noch einmal eindrücklich gezeigt [67].

Andere Arbeiten unterstützen die Ergebnisse und Einschätzungen. Schroeder und Kollegen zeigten in septischen Patienten und nach großen Operationen vergleichbar gestiegene Level an apoptotischen Lymphozyten [44]. Papathanassoglou und Kollegen fanden Erhöhungen an Fas/FasL in schwerkranken Patienten mit SIRS und MODS [45]. Delogu und Kollegen konnten vermehrt apoptotische Zellen bei chirurgischen Patienten nachweisen [47, 48]. Yamada und Kollegen zeigten im Tierversuch an Hunden einen höheren Anteil an apoptotischen Zellen nach Laparotomie [51]. Eine aktuelle Studie in traumatisch verletzten Patienten zeigt zwar auch die Abnahme der T-Lymphozyten innerhalb von 4 Stunden nach dem Trauma, allerdings sind in dieser frühen Phase CD4+Lymphozyten stärker betroffen [24]. Zumindest im Verlauf bis Tag 5 scheinen CD4+ in der vorliegenden Untersuchung nicht stärker betroffen zu sein.

Welche Signalwege für diese Veränderungen verantwortlich sind, konnte aber vor allem bei Polytraumapatienten bisher noch nicht nachgewiesen werden. Das hier im Zentrum der Aufmerksamkeit stehende kaspase-abhängige Modell unterscheidet den intrinsischen, mitochondrialen Weg von dem durch Aktivierung ausgelösten rezeptorvermittelten Weg.

4.3. Mitochondriale Apoptose

Der Einfluss des intrinsischen Weges auf die Induktion von Apoptose ist Gegenstand verschiedener Studien gewesen, Keller beschreibt es in seinem Review 2006 sogar als den wesentlichen Weg zur Regulation des Lymphozytenpools [68]. bcl-2 wurde als Protoonkogen entdeckt und schützt überraschender Weise an seiner Lokalisation im

Mitochondrium die Zelle vor unterschiedlichen pathologischen Stimuli. Es richtete so den Fokus auf diese Zellorganelle als wichtigen Funktionsträger bei Apoptose. Das erste proapoptotische Protein bax wurde durch seine Interaktion mit bcl-2 entdeckt. Das Verhältnis der beiden Proteine verändert die Schwelle, bei welcher der intrinsische Weg über eine Verstärkung von apoptotischen Signalen an Zellorganellen wie dem Mitochondrium beteiligt wird [69]. Vor allem neuronale Apoptose nach Schädel-Hirn-Verletzungen wird mit der mitochondrialen Apoptose in Verbindung gebracht [70, 71]. Für Immunzellen zeigten zum Beispiel Hu und Kollegen einen Einfluss auf die Apoptose von neutrophilen Granulozyten bei Trauma und Sepsis [72], und Haslinger fand die Induktion von Apoptose auch über den mitochondrialen Weg in Jurkat-T-Zellen (eine immortale Zelllinie) und mononukleären Zellen des peripheren Blutes [73]. In der Milz von Patienten mit Sepsis zeigte Hotchkiss 2001 die Beteiligung des mitochondrialen Weges (Kaspase 9) an der Entstehung von Apoptose [21]. In der gleichen Studie waren als Vergleichsgruppe Traumapatienten (Abdominaltraumen mit Entfernung der Milz innerhalb von 8 Stunden) eingeschlossen. Im Unterschied zu den septischen Patienten zeigten die T-Zellen dieser Patienten keine erhöhte Aktivität dieser Protease.

Im Patientenkollektiv der vorliegenden Studie findet sich für den intrinsischen Weg der Apoptoseauslösung ebenfalls kein Hinweis. Die Genexpression für die Proteine bcl-2 (anti-apoptotisch) und bax (pro-apoptotisch) ist nahezu unverändert. Auch die entsprechenden Proteine zeigen Konzentration entsprechend den Werten der Kontrollen. Die Beurteilung der Proteinkonzentration im Vergleich zur Genexpression ist hier auch deshalb von entscheidender Bedeutung, weil die Proteine erst durch Konformitätsänderungen aktiviert werden, also der Effekt und die Funktionalität nicht nur über die Neusynthese reguliert wird [74]. Nicht signifikant lässt sich sogar ein leichter Anstieg von bcl-2 und Abfall von bax zum Ende des Beobachtungszeitraumes erkennen. Die Zellen scheinen also im Verlauf eher einen Schutz gegen die Permeabilisation der Mitochondrienmembran aufzubauen. Daraus kann nach dem zugrunde gelegten Modell geschlossen werden, dass der mitochondriale, kaspasen-abhängige Weg in den ersten Tagen nach dem Ereignis keinen Einfluss auf die Veränderungen im Lymphozytenrepertoire nach Polytrauma hat. Allerdings gibt es mittlerweile Arbeiten, in denen die direkte Aktivierung von Kaspase 9 ohne die Beteiligung von Apaf-1 gezeigt wird. Die chemisch induzierte Spaltung des Proenzym kann scheinbar die aktive Form herbeiführen und die Enzymkaskade auslösen [75]. Des

Weiteren wird das bcl-2-Familienmitglied *bim* als Protein in der Induktion von Apoptose beschrieben [76, 77], und *bid* – aus derselben Familie, koppelt in einer Art Verstärkerschleife den ACID mit der mitochondrialen Apoptose [68]. Der hier untersuchte Weg deckt demnach erwartungsgemäß nur einen kleinen Teil der Regulationsmechanismen ab, dient aber gerade deshalb als weiterer Baustein zum Verständnis von Apoptose in Lymphozyten.

4.4. Rezeptorvermittelte Apoptose

Die Induktion von Apoptose über externe Todessignale wie TNF-alpha und FasL ist ein gut untersuchtes System und wurde lange als wichtigster Weg zur Regulation des Lymphozytenreservoirs postuliert. Dieser durch Aktivierung ausgelöste Zelltod (AICD) trägt entscheidend zur Regulation des Lymphozytenpools bei, denn nach der Immunantwort stirbt ein Großteil der aktivierten Zellen ab [74, 78]. Andere Arbeiten wiesen den erhöhten Aktivierungszustand von Lymphozyten mit den Veränderungen bei CD25 (der alpha-Kette des IL-2 Rezeptors) und CD69 bei Traumapatienten [52] und auch bei Verbrennungspatienten nach [49]. Auch die eigenen Daten zeigen unter diesen Gesichtspunkten die Aktivierung. CD25 wird auf CD4+ Zellen erhöht exprimiert, CD69 zeigt jedoch bis zum Tag 5 keine signifikante Vermehrung auf der Zelloberfläche. Die überschießende Inflammation im Sinne eines SIRS aber kann durch die beteiligten Mediatoren TNF alpha und FasL frühzeitig zum AICD führen. TNF wird während der Inflammation vor allem von Makrophagen innerhalb von Minuten systemisch und lokal freigesetzt, während FasL, von aktivierten Lymphozyten produziert, eher autokrine oder parakrine Wirkung entfaltet. Werden die Rezeptoren CD95 (Fas) und CD120a (TNFR1) für diese Botenstoffe auf T-Zellen exprimiert, werden die Signale der Inflammation und Aktivierung als Todessignale umgesetzt. Bei kritisch kranken Patienten wurde zuvor schon eine erhöhte Expression dieser Rezeptoren beschrieben. Papathanassoglou u.a. konnten in einem inhomogenen Patientenkollektiv mit SIRS und MODS zeigen, dass die Expression von Fas und FasL auf T-Zellen deutlich gesteigert war und auch mit der Schwere von SIRS und MODS korrelierte [45]. Delogu u.a. zeigten bei allgemein chirurgischen Patienten den Anstieg von apoptotischen Zellen 24h nach dem Trauma und korrelierten dies ebenfalls mit einer erhöhten Expression von Fas und FasL auf T-Zellen [47]. Die eigenen Daten für schwerverletzte Patienten unterstützen diese Ergebnisse, es wurden die beiden am besten untersuchten Rezeptoren betrachtet: Für CD95 ergibt sich schon kurze Zeit nach dem Trauma eine deutlich erhöhte Expression

auf CD4+ Zellen, korrelierend mit dem auch bei den meisten Patienten auftretenden klinischen Zeichen für SIRS. Die Rate der CD95-positiven Zellen bleibt weiter auf hohem Niveau, geht aber am Ende des Beobachtungszeitraumes zurück. Das Ergebnis dieser zeitigen Überexpression findet sich an den folgenden Tagen mit konsekutiv deutlich gestiegenen Anteilen an apoptotischen Zellen, auch wenn sich bei CD8+ Zellen die in der Abbildung sichtbare Erhöhung nicht als signifikant erweist. Um diese Annahmen zu verifizieren, könnte in weiteren Schritten die Sekretion oder Expression von FasL (dem Liganden des Fas-Rezeptor) gemessen werden, sowie in Isolationsversuchen die Vulnerabilität von CD95 exprimierenden Zellen für FasL: aus dieser Stimulation sollte eine erhöhte Apoptoserate folgen. Es bleibt zu bedenken, dass auch der hier untersuchte Aktivierungsweg nur einen Ausschnitt der möglichen Regulationschritte zeigen kann. Zum Beispiel können verschiedenen Varianten des FLICE-Inhibitor-Proteins (c-FLIP) die Verarbeitung von Kaspasen am DISC beeinflussen und Apoptose verhindern [79], um nur einen hier nicht untersuchten Mechanismus zu nennen.

Für den Rezeptor CD120a, welcher auf TNF alpha reagiert, lässt sich das Ergebnis nicht in dieser Deutlichkeit nachvollziehen. Zwar kann man in der Abbildung über alle Tage eine leicht erhöhte Expression erkennen, aber die Unterschiede lassen sich mit den hier vorliegenden Fallzahlen nicht als signifikant ermitteln. Zusammen mit den Angaben aus der Literatur, nach denen die über TNFR1 vermittelten Signale wesentlich schwächer wirken, kann dieser Veränderung untergeordnete Bedeutung zugemessen werden. Auch hier kann in weiteren Versuchen die biologische Wirksamkeit der CD120a Expression auf Lymphozytensubpopulationen durch Stimulation mit TNF untersucht werden. Gupta hat zum Beispiel 2006 gezeigt, dass verschiedene T-Zell- Subpopulationen, in diesem Fall naive und Gedächtnis-T-Zellen unterschiedlich auf derartige Stimuli reagieren [80].

Die Erkenntnisse aus den hier untersuchten polytraumatisierten Patienten sind ein starker Hinweis dafür, dass es in den Tagen nach einem Trauma durch eine überschießende systemische Inflammation zu einer Schwächung der zellulären Immunantwort durch vermehrte apoptotische Prozesse im Pool der T-Zellen kommt. Dabei scheinen die über CD95 vermittelten Wirkungen die wichtigste Ursache zu sein, während mitochondrial ausgelöste Apoptose mit den hier gemessenen Parametern nicht gezeigt werden konnte.

4.5. CD25

Eine Gruppe von Zellen hat in den letzten Jahren in vielen Veröffentlichungen Beachtung gefunden. Sogenannte regulatorische T-Zellen mit immunmodulatorischen Eigenschaften sind bei Allergie, Autoimmunität, Tumorthherapie und eben auch Trauma in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. Ursprünglich wurden diese Zellen durch ihr charakteristisches Färbeverhalten in den CD4+ CD25+ Plots aus der Durchflusszytometrie identifiziert. Während heute weitere Marker wie Neuropilin-1, Fox-P3 oder CTLA4 zur genaueren Erfassung genutzt werden sollten [81, 82], zeigen die CD4+-Zellen einiger Patienten dieser Arbeit eben jene Eigenschaften im CD4+CD25+-Plot, die es erlauben würden, das vermehrte Auftreten von CD4+CD25++ Tregs zu postulieren (Daten nicht dargestellt) [83]. Auch würde diese Annahme die fehlende Expressionsteigerung bei dem Aktivitätsmarker CD69 verständlich machen. Andere Studien kommen zu ähnlichen Ergebnissen, und man vermutet, dass diese Zellen nach Polytrauma besondere Aufgaben wahrnehmen [84-87], wobei auch diese Regulation zu einer verstärkten Immunsuppression führen könnte. Es eröffnet sich damit ein weiterer Ansatz für gezieltere Untersuchungen, denn die Annahme einer in dieser Weise aktiven Zellgruppe, fügt den Überlegungen zur Steuerung der Immunantwort nach Polytrauma eine neue Dimension hinzu.

4.6. Schlussfolgerungen

- 1) Bei schwerverletzten Patienten kommt es nach dem Trauma zu einem signifikanten Abfall von im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten. Diese Beobachtungen können auch mit einer gesteigerten Apoptoserate erklärt werden.
- 2) Bei gleichzeitiger Aktivierung der Zellen ist dabei der rezeptorvermittelte Weg (extrinsische Apoptose), vor allem über CD95, an der Entstehung von Apoptose beteiligt. Aufgrund dieses erhöhten Rezeptorbesatzes sind CD4+ Zellen besonders vulnerabel für apoptotische Signale. Die Signaltransduktion über CD120a (TNF Rezeptor 1) spielt eine untergeordnete Rolle. Der intrinsische, mitochondrial vermittelte Weg ist scheinbar nicht involviert, aber auch ein Schutz vor mitochondrialer Apoptose durch eine erhöhte Konzentration von anti-apoptotischem bcl-2 ist nicht gegeben.

4.7. Einschränkungen

Belastbare Daten aus schwerverletzten Patienten zu erarbeiten gestaltet sich schwierig. Angefangen von der zeitnahen Akquise, über das Einholen der Einverständniserklärung, der Blutabnahme nur für Studienzwecke, der begrenzten Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials bis hin zur Standardisierung der Einschlusskriterien und des therapeutischen Verlaufs kam es immer wieder zu Problemen. Die kleine Fallzahl beschränkte die Möglichkeit, Patienten aussagekräftig zu gruppieren, und erschwerte damit die Auswertung der Daten. Deshalb können durch die Fortführung des Projektes hoffentlich noch mehr Daten generiert werden und neue Beurteilungen hinzukommen. Die vorliegende Untersuchung kann also keine allgemeingültige Aussage zur Funktion von T-Zellen nach Polytrauma liefern, sondern muss unter Einbeziehung der vielen, zum Teil hier zitierten Veröffentlichungen interpretiert werden.

4.8. Vergleich mit aktuellen Ergebnissen

Die Forschung um immunologische Veränderungen bei kritisch kranken Patienten hat in den letzten Jahren weiter an Bedeutung gewonnen. Eine Reihe von Laboratorien versucht weitere Details über den Einfluss des apoptotischen Zelltodes auf die Dysfunktion von Immunsystem und Organen zu gewinnen. Vor allem Studien, welche Patienten mit SIRS oder Sepsis verschiedener Ursachen und mit unterschiedlichen Grunderkrankungen betrachten, scheinen erfolgreich Daten veröffentlichen zu können. Hotchkiss u.a. zeigten 2005 in einer umfangreichen Arbeit deutliche Veränderungen in der zellvermittelten Immunität bei septischen Patienten. Neben der signifikanten Abnahme der zirkulierenden T-Lymphozyten verbunden mit erhöhten morphologischen Zeichen für Apoptose konnte er sowohl bei Kaspase 3 als auch für Kaspase 8 und 9 eine erhöhte Aktivität nachweisen [61]. Zusammen mit Veränderungen bei bcl-2, erlauben diese Ergebnisse beide Induktionswege als aktiv zu postulieren. Das entspricht auch den Ausführungen von Arnold aus 2006, der in seinem Review zur Regulation des T-Lymphozytenpools den intrinsischen Weg der Apoptoseauslösung auch im Rahmen des ACID als aktiviert annimmt [78]. Diese Untersuchungen entsprechen somit nicht den hier vorgelegten Daten. Im Tierversuch kommt Unsinger außerdem zu dem Ergebnis, dass lymphozytäre Apoptose in Sepsis nicht abhängig vom ACID ist und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokinmuster

ausgeschüttet werden. Diese Vermutungen stellen einige grundlegende Annahmen des in dieser Arbeit genutzten Modells in Frage [88].

Weitere interessante Ergebnisse kamen 2004 von Matsushima, er zeigte die verstärkte Aktivierung bei einer Subpopulation der T-Zellen, den gamma-delta T-Zellen bei schwerem SIRS [89]. Diesen speziellen Zellen, die vor allem in dem lymphatischen Gewebe der Darmschleimhaut vorkommen, werden besondere Aufgaben zugeschrieben. Diese Studie sieht ihre Aktivierung als Beleg für ihre in SIRS veränderten Funktionen. Trotzdem wird auch hier eine zahlenmäßig Abnahme gemessen, was auch Venet 2005 bestätigt und in der Reduktion der Zellzahlen und in der Abnahme der Expression von CD3 auf der Oberfläche von T-Zellen im septischen Schock eine Prädisposition für infektiöse Komplikationen vermutet [85]. An Mäusen zeigte Patenaude 2005 in einem Verbrennungsmodell die Abnahme von T-Zellen in der Milz bei gleichzeitigem Anstieg von CD69 auf CD4+ Zellen. Weiterhin konnte bei diesen Zellen gegenüber der CD8+ Population vermehrt Zeichen für Apoptose nachgewiesen werden. Laudanski und Kollegen zeigten 2006 den Abfall von zirkulierenden T-Lymphozyten im Blut von Polytraumapatienten und mit Genexpressions-Analysen die veränderte Aktivität bei 5693 Genen im Vergleich zu den Kontrollen. So konnten die pro-apoptischen Proteine TRAIL-Rezeptor, TWEAKR und FAF1 als vermehrt exprimiert nachgewiesen und die Expression von anti-apoptischen Proteinen als unverändert oder erniedrigt dargestellt werden. Im Vergleich zu Monozyten oder Leukozyten waren deutlich apoptotische Veränderungen zu postulieren [90]. Keel u.a. zeigten 2005 den Einfluss von Thiopental, einem Narkotikum, auf die Apoptoserate von Jurkat-Zellen über einen CD95 unabhängigen Weg [91]. Der Einfluss von Medikamenten wie zum Beispiel Glukokortikoiden darf nicht unterschätzt werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um den Einfluss auf die Immunantwort auch im schwerverletzten Patienten zu klären. Auch in den letzten Jahren wurden T-Zellen als durch Trauma negativ beeinflusste Immunzellen erkannt. Während B-Zellen anstiegen und Monozyten in ihrer Zahl unverändert blieben, beschrieb Yadav 2009 erneut die Abnahme von T-Zellen [24], Flohé vermutet den Einfluss von intrazellulären Calciumionen auf die T-Zell-Funktion [53]. Visser führt 2008 aus, dass die Betrachtung von Immunzellen im Rahmen des Immunmonitorings eher einen Erfolg versprechender Ansatz darstellen könnte, als die Messung von Zytokinen.

4.9. Ausblick

Das wissenschaftliche Interesse an immunologischen Veränderungen im schwer verletzten Patienten ist ungebrochen groß. Aktuelle und neue Techniken wie Durchflusszytometrie, Immunmonitoring, Zellfunktionsanalysen und Gen-Chip-Analysen (Microarray) potenzieren die Möglichkeiten der Forschung. Apoptose und die Wege der Einflussnahme sind nicht nur im Polytrauma oder in Sepsis von Interesse, sondern spielen zum Beispiel auch bei malignen Erkrankungen, AIDS, rheumatoider Arthritis, Allergien oder Morbus Alzheimer eine Rolle. Dabei können vor allem auch zellbiologische Forschungen, welche Veränderungen in einzelnen Rezeptoren, Proteinen oder Enzymen auch strukturell aufklären, an Bedeutung gewinnen. Denn in der Forschung um die Auslösung von Apoptose sind bei weitem noch nicht alle Abläufe geklärt, und es zeigt sich, dass es viele Wahrheiten gibt. Diverse Stoffwechselwege agieren parallel und die Signalübertragung in Lymphozyten ist aufgrund der komplexen Vernetzung einer Vielzahl immunmodulatorischer Zellen (zum Beispiel Monozyten, neutrophile Granulozyten, natürliche Killer- und dendritische Zellen) nicht mit einfachen Modellen zu erklären. Die Abläufe der kaspase-unabhängigen Apoptose und der Einfluss des nekrotischen Zelltodes werden zunehmend in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit gerückt. Kaspasen werden Funktionen bei der Steuerung von Zellzyklen bei aktivierten Zellen zugesprochen und auch im nekrotischen Zelltod sieht man einen effektiven Mechanismus, um naive Zellen zu eliminieren. Jäättelä fokussiert auf Entwicklungen, die mit der Schädigung von Organellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum, den Lysosomen und natürlich auch den Mitochondrien einhergehen. Dem Kalziumanstieg, der Bildung von radikalen Sauerstoffverbindungen und dem Freisetzen von Effektorproteinen ohne die Involvierung von Kaspasen wird dabei verstärkt Bedeutung zugemessen [74]. Der Verlust an Phagozytosefähigkeit durch Erschöpfung der Ressourcen im schwerverletzten Patienten, vor allem im Bereich der Schädigung, ist ein weiterer neuer Ansatz. [92]. Apoptose nach intrakraniellm Trauma mit Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke ist nicht nur für die Region der Verletzung interessant, sondern der systemische Einfluss von Transmittern und neuroendokrinen Mediatoren auch auf Immunzellen bedarf weiterer Klärung [6]. Minambres zum Beispiel zeigte 2005 bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma die Wirkung von lokal gewonnenem Serum auf die Jurkat-T-Zelllinie. Es konnte durch die Inkubation mit lokalem Serum gegenüber zentral gewonnenen Proben eine erhöhte

Apoptoserate induziert werden [93]. Ob dieser Effekt auch systemisch von Bedeutung sein kann, müssen weitere Untersuchungen klären.

Unklar bleibt auch die Bedeutung von vermehrt auftretenden apoptotischen Zellen im Körper und ihre Prozessierung. Ihre Phagozytose führt zu einer überwiegend anti-inflammatorischen Reaktion, welche wiederum die Hypoinflammation, die Immunschwäche, verstärken könnte. Apoptotische Zellen, welche nicht schnell genug abgebaut werden können, gehen in den Zustand sekundärer Nekrose über. Der Abbau dieser Zellen hingegen, triggert möglicherweise die Ausbildung eines SIRS [94]. Die Maskierung von apoptotischen Merkmalen wie Phosphatidylserin durch Annexin V oder die Blockade der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Antikörper gegen TIM4 könnte im Tiermodell Aufschluss über diese Fragen geben [95]. Aus chirurgischer Sicht bringt die schnelle und gezielte operative Kontrolle von Schädigungen Vorteile, indem sie zum Beispiel durch Debridement den Anfall großer Mengen apoptotischer und nekrotischer Zellen verhindert [4]. Nur die ständig wiederholte Zusammenschau vieler Ergebnisse und Projekte kann in kleinen Schritten Aufschluss über wirksame diagnostische und therapeutische Optionen vermitteln.

Therapeutische Interventionen sind nach vielen neuen Erkenntnissen um die pathologischen Abläufe der nächste Interessenschwerpunkt. Die erfolgversprechenden Ideen reichen dabei von der Transduktion von Zellpopulationen mit adenoviralen Vektoren zur Beeinflussung der Expression wichtiger Proteine über Fas-FasL-Signalinhibition mit Fas fusion protein oder Fas siRNA (short interfering RNA) hin zur Blockierung von Kaspasen, zum Beispiel mit antiretroviralen Proteaseinhibitoren, bis zur Einflussnahme auf Mitglieder der bcl-Familie und der anti-Zytokin-Therapie [96]. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass es nicht den einen Schlüssel zur Verhinderung von Apoptose geben wird. Die Einflussnahme an einzelnen Stellen, wie von Chang 2007 berichtet, zeigt, dass es nicht ausreichend ist nur einen Weg zu blockieren oder zu triggern [97]. Wesche und Kollegen fassten 2005 in einem Review unter anderem die aktuellen Therapieoptionen mit dem Ergebnis zusammen, dass noch tieferer Einblick in die Abläufe nötig ist, um gezielter auf bestimmte Zellpopulationen Einfluss nehmen zu können und die klinische Anwendung zum Beispiel von siRNA zu ermöglichen. Während in den letzten 10 Jahren viel Energie in die Erforschung von pathophysiologischen Abläufen in schwerkranken Patienten investiert wurde, ist nun möglicherweise die Zeit für die Verifizierung von therapeutischen Optionen gekommen.

5. Zusammenfassung

Bei der Behandlung schwer verletzter Patienten sind trotz großer Fortschritte beim initialen Polytrauma-Management posttraumatische Komplikationen wie Infektionen häufig und lebensgefährlich. Das schwere Gewebetrauma führt zu einer akuten Überaktivierung des angeborenen Immunsystems und nachfolgender Immunsuppression, in deren Folge es zu Störungen in den defensiven Funktionen der adaptiven Immunantwort kommt. Obwohl schon einige Mechanismen für die Veränderungen auf zellulärer Ebene beschrieben sind, besteht noch weitgehend Unklarheit über die zeitlichen Abläufe und die molekulare Pathogenese. Im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms *"Immune and metabolic modulation induced by severe tissue trauma"* (SPP 1151) beschäftigt sich die Arbeitsgruppe mit dem Focus *"Genetic pathogenesis of tissue injury-induced apoptosis of immunocompetent and parenchymal cells"*. Untersucht wurde hier das Verhalten von T-Lymphozyten. Aus Vollblut wurden T-Zellen isoliert und Messungen an Zellen (Durchflusszytometrie, TUNEL), Protein (Western Blot, Enzym-Assays) und RNA (rt-PCR) durchgeführt. Es wurde bis zu fünf Tage nach dem Unfall nach Veränderungen in der Zellzahl, der Apoptoserate und dem Aktivitätszustand gesucht. Weiterhin wurden Wegpunkte der Induktion von Apoptose untersucht. Bei den Patienten (ISS>20) konnten im Verlauf und im Vergleich zur Kontrollgruppe Veränderungen festgestellt werden. Es waren weniger Lymphozyten im Pool der zirkulierenden Leukozyten und weniger T-Lymphozyten im Pool der Lymphozyten vorhanden, bei erhöhtem Anteil an apoptotischen T-Lymphozyten. Während weder auf der Ebene der Genexpression noch im fertigen Protein bei den pro- und anti-apoptotischen Proteinen bax und bcl-2 Unterschiede gezeigt werden konnten, wurde bei den Todesrezeptoren auf der Oberfläche, vor allem CD95 (Fas Rezeptor) auf CD4+, ein signifikanter Anstieg ihrer Expression verzeichnet. Die in der Apoptosekaskade beteiligten Enzyme Kaspase 3/7 zeigten ebenfalls eine erhöhte Aktivität. Gleichzeitig erhöht war ein Oberflächenmarker für die Aktivierung von T-Zellen, CD25. Das schwere Gewebetrauma führt zu Veränderungen der Zellhomöostase auch bei T-Zellen. Der Abfall der Zellzahlen im Vollblut kann neben der physiologischen Migration auch durch eine erhöhte Apoptoserate erklärt werden. Vor allem der extrinsische Weg, die Induktion von Apoptose über den Todesrezeptor CD95 scheint hierbei im Sinne eines durch Aktivierung ausgelösten Zelltodes (AICD) von Bedeutung zu sein.

6. Literatur

1. Giannoudis, P.V., *Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update*. Injury, 2003. **34**(6): p. 397-404.
2. Baker, C.C., et al., *Epidemiology of trauma deaths*. Am J Surg, 1980. **140**(1): p. 144-50.
3. Lenz, A., G.A. Franklin, and W.G. Cheadle, *Systemic inflammation after trauma*. Injury, 2007. **38**(12): p. 1336-45.
4. Gebhard, F. and M. Huber-Lang, *Polytrauma-pathophysiology and management principles*. Langenbecks Arch Surg, 2008. **393**(6): p. 825-31.
5. Henne-Bruns, D., M. Dürig, and B. Kremer, *Chirurgie Duale Reihe*, Thieme, 2003. **2**.
6. Keel, M. and O. Trentz, *Pathophysiology of polytrauma*. Injury, 2005. **36**(6): p. 691-709.
7. Visser, T., et al., *Postinjury immune monitoring: can multiple organ failure be predicted?* Curr Opin Crit Care, 2008. **14**(6): p. 666-72.
8. Sherwood, E.R. and T. Toliver-Kinsky, *Mechanisms of the inflammatory response*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2004. **18**(3): p. 385-405.
9. Pawlinski, R., et al., *Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3940-7.
10. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states*. Crit Care Med, 2000. **28**(4 Suppl): p. N3-12.
11. Janeway, C., et al., *Immunologie*. Spektrum Lehrbuch, 2002. **5**.
12. Abbas, A. and A. Lichtmann, *Cellular and Molecular Immunology*. Updated Edition, Elsevier, 2005. **5**.
13. Giannoudis, P.V., et al., *Surgical stress response*. Injury, 2006. **37** Suppl 5: p. S3-9.
14. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
15. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
16. *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. Crit Care Med, 1992. **20**(6): p. 864-74.
17. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Intensive Care Med, 2003. **29**(4): p. 530-8.
18. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity*. Shock, 2001. **16**(2): p. 83-96.
19. Mannick, J.A., M.L. Rodrick, and J.A. Lederer, *The immunologic response to injury*, in *J Am Coll Surg*. 2001. p. 237-44.
20. Miller, A.C., R.M. Rashid, and E.M. Elamin, *The "T" in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients*. J Trauma, 2007. **63**(6): p. 1407-17.
21. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6952-63.

22. Menges, T., et al., *Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications*. Crit Care Med, 1999. **27**(4): p. 733-40.
23. Pellegrini, J.D., et al., *Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma*. J Surg Res, 2000. **88**(2): p. 200-6.
24. Yadav, K., et al., *Early immunologic responses to trauma in the emergency department patients with major injuries*. Resuscitation, 2009. **80**(1): p. 83-8.
25. Oberholzer, C., et al., *Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration*. Faseb J, 2001. **15**(6): p. 879-92.
26. Ayala, A., et al., *Fas-ligand mediated apoptosis in severe sepsis and shock*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(9): p. 593-600.
27. Gronski, M.A. and M. Weinem, *Death pathways in T cell homeostasis and their role in autoimmune diabetes*. Rev Diabet Stud, 2006. **3**(2): p. 88-95.
28. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 26-35.
29. Spierings, D., et al., *Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis*. Science, 2005. **310**(5745): p. 66-7.
30. Scheller, C., et al., *Caspase inhibitors induce a switch from apoptotic to proinflammatory signaling in CD95-stimulated T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2002. **32**(9): p. 2471-80.
31. Martin, S.J. and D.R. Green, *Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?* Cell, 1995. **82**(3): p. 349-52.
32. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family: regulators of cell death*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 395-419.
33. Yokoyama, T., et al., *The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes*. Immunol Lett, 2002. **81**(2): p. 107-13.
34. Baker, S.P., et al., *The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care*. J Trauma, 1974. **14**(3): p. 187-96.
35. Ertel, W. and E. Faist, *[Immunologic monitoring after severe trauma]*. Unfallchirurg, 1993. **96**(4): p. 200-12.
36. O'Neill, B., P. Zador, and S.P. Baker, *Indexes of severity: underlying concepts--a reply*. Health Serv Res, 1979. **14**(1): p. 68-76.
37. Civil, I.D. and C.W. Schwab, *The Abbreviated Injury Scale, 1985 revision: a condensed chart for clinical use*. J Trauma, 1988. **28**(1): p. 87-90.
38. Wagner, K.D., et al., *Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Faseb J, 2003. **17**(10): p. 1364-6.
39. Thomas, L., *Labor und Diagnose*. 2005. **6. Auflage**.
40. Bone, R.C., *Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS*. Crit Care Med, 1996. **24**(7): p. 1125-8.
41. Kavanagh, E.G., et al., *Burn injury primes naive CD4+ T cells for an augmented T-helper 1 response*. Surgery, 1998. **124**(2): p. 269-76; discussion 276-7.
42. Kell, M.R., et al., *Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen*. Shock, 1999. **12**(2): p. 139-44.
43. Holub, M., et al., *Changes in lymphocyte subpopulations and CD3+/DR+ expression in sepsis*. Clin Microbiol Infect, 2000. **6**(12): p. 657-60.
44. Schroeder, S., et al., *Increased susceptibility to apoptosis in circulating lymphocytes of critically ill patients*. Langenbecks Arch Surg, 2001. **386**(1): p. 42-6.

45. Papathanassoglou, E.D., et al., *Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival*. Crit Care Med, 2001. **29**(4): p. 709-18.
46. Oka, M., et al., *Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress*. Ann Surg, 1996. **223**(4): p. 434-40.
47. Delogu, G., et al., *Apoptosis and surgical trauma: dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes*. Arch Surg, 2000. **135**(10): p. 1141-7.
48. Delogu, G., et al., *Interleukin-10 and apoptotic death of circulating lymphocytes in surgical/anesthesia trauma*. J Trauma, 2001. **51**(1): p. 92-7.
49. Maldonado, M.D., et al., *Specific changes in peripheral blood lymphocyte phenotype from burn patients. Probable origin of the thermal injury-related lymphocytopenia*. Burns, 1991. **17**(3): p. 188-92.
50. Teodorczyk-Injeyan, J.A., et al., *Immune deficiency following thermal trauma is associated with apoptotic cell death*. J Clin Immunol, 1995. **15**(6): p. 318-28.
51. Yamada, R., et al., *Apoptotic lymphocytes induced by surgical trauma in dogs*. J Anesth, 2002. **16**(2): p. 131-7.
52. Walsh, D.S., et al., *Lymphocyte activation after non-thermal trauma*. Br J Surg, 2000. **87**(2): p. 223-30.
53. Flohe, S.B., S. Flohe, and F.U. Schade, *Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms*. Innate Immun, 2008. **14**(6): p. 333-44.
54. Statistisches_Bundesamt, *Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10*. <http://www.gbe-bund.de>, 2005.
55. Tschoeke, S.K., et al., *Severe head injury promotes early caspase-dependent apoptosis in peripheral blood monocytes from multiply injured patients*. Journal of Organ Dysfunction, 2009.
56. Lausevic, Z., et al., *Predicting multiple organ failure in patients with severe trauma*. Can J Surg, 2008. **51**(2): p. 97-102.
57. Dulhunty, J.M., J. Lipman, and S. Finfer, *Does severe non-infectious SIRS differ from severe sepsis? Results from a multi-centre Australian and New Zealand intensive care unit study*. Intensive Care Med, 2008. **34**(9): p. 1654-61.
58. Spolarics, Z., et al., *Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients*. Crit Care Med, 2003. **31**(6): p. 1722-9.
59. Wen, Q. and L. Su, *[Impact of gender and age on multiple organ dysfunction syndrome and inflammatory cytokines after multiple injuries.]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2009. **29**(2): p. 253-5.
60. Schroder, J., et al., *Gender differences in human sepsis*. Arch Surg, 1998. **133**(11): p. 1200-5.
61. Hotchkiss, R.S., et al., *Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 5110-8.
62. Tschoeke, S.K., et al., *The early second hit in trauma management augments the proinflammatory immune response to multiple injuries*. J Trauma, 2007. **62**(6): p. 1396-403; discussion 1403-4.

63. Ogura, H., et al., *Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients*. J Trauma, 1999. **46**(5): p. 774-81; discussion 781-3.
64. van Griensven, M., et al., *Polymicrobial sepsis induces organ changes due to granulocyte adhesion in a murine two hit model of trauma*. Exp Toxicol Pathol, 2002. **54**(3): p. 203-9.
65. Pinkerton, P.H., et al., *Acute lymphocytosis after trauma--early recognition of the high-risk patient?* J Trauma, 1989. **29**(6): p. 749-51.
66. Murphy, T., et al., *Use of intracellular cytokine staining and bacterial superantigen to document suppression of the adaptive immune system in injured patients*. Ann Surg, 2003. **238**(3): p. 401-10; discussion 410-1.
67. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
68. Keller, A.M. and J. Borst, *Control of peripheral T cell survival: a delicate division of labor between cytokines and costimulatory molecules*. Hum Immunol, 2006. **67**(6): p. 469-77.
69. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
70. Luo, C., et al., *Changes of bcl-x(L) and bax mRNA expression following traumatic brain injury in rats*. Chin J Traumatol, 2002. **5**(5): p. 299-302.
71. Wennersten, A., S. Holmin, and T. Mathiesen, *Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat*. Acta Neuropathol (Berl), 2003. **105**(3): p. 281-8.
72. Hu, Z. and M.M. Sayeed, *Suppression of mitochondria-dependent neutrophil apoptosis with thermal injury*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(1): p. C170-8.
73. Haslinger, B., et al., *Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway*. Cell Microbiol, 2003. **5**(10): p. 729-41.
74. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 416-23.
75. Chen, M., et al., *Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33888-95.
76. Cante-Barrett, K., et al., *Thymocyte negative selection is mediated by protein kinase C- and Ca²⁺-dependent transcriptional induction of bim [corrected]*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2299-306.
77. Hildeman, D.A., et al., *Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 759-67.
78. Arnold, R., et al., *How T lymphocytes switch between life and death*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1654-8.
79. Krueger, A., et al., *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20633-40.
80. Gupta, S., et al., *Differential sensitivity of naive and memory subsets of human CD8+ T cells to TNF-alpha-induced apoptosis*. J Clin Immunol, 2006. **26**(3): p. 193-203.
81. Bruder, D., et al., *Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 623-30.
82. Sakaguchi, *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. 2005.

83. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
84. Murphy, T.J., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2957-63.
85. Venet, F., et al., *Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock*. Critical Care Medicine, 2005. **33**(12): p. 2836-40.
86. MacConmara, M.P., et al., *Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity*. Ann Surg, 2006. **244**(4): p. 514-23.
87. Ni Choileain, N., et al., *Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 225-36.
88. Unsinger, J., et al., *The role of TCR engagement and activation-induced cell death in sepsis-induced T cell apoptosis*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7968-73.
89. Matsushima, A., et al., *Early activation of gammadelta T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome*. Shock, 2004. **22**(1): p. 11-5.
90. Laudanski, K., et al., *Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(42): p. 15564-9.
91. Keel, M., et al., *Thiopental-induced apoptosis in lymphocytes is independent of CD95 activation*. Anesthesiology, 2005. **103**(3): p. 576-84.
92. Wesche, D.E., et al., *Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 325-37.
93. Minambres, E., et al., *Apoptosis of Jurkat cells induced by serum of patients with acute severe brain injury*. Intensive Care Med, 2005. **31**(6): p. 791-8.
94. Gaip, U.S., et al., *Inefficient clearance of dying cells and autoreactivity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **305**: p. 161-76.
95. Miyanishi, M., et al., *Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor*. Nature, 2007. **450**(7168): p. 435-9.
96. Wesche-Soldato, D.E., et al., *The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(4): p. 493-500.
97. Chang, K.C., et al., *Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis*. Faseb J, 2007. **21**(3): p. 708-19.

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

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

7.2. Publikationsliste

Rochow N; Möller S; Fusch G; **Drogies T**; Fusch C: *Levels of lipids in preterm infants fed breast milk*. Clin Nutr. 2009

Tschoeke SK; **Drogies T**; Meyer B; Hellmuth M; Ertel W; Stahel PF; Oberholzer A; Hostmann A: *Severe head injury promotes early caspase-dependent apoptosis in peripheral blood monocytes from multiply injured patients*. Journal of Organ Dysfunction 2009

Drogies T, Ittermann T, Lüdemann J, Klinke D, Kohlmann T, Lubenow N, Greinacher A, Völzke H, Nauck M: *Potassium – reference intervals for lithium-heparin-plasma and serum from a population based cohort*. Laboratoriumsmedizin AKZEPTIERT

7.3. Erklärung

„Ich, Tim Drogies, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Gewebetrauma-induzierte Apoptose von Immun- und Parenchymzellen – Die Rolle der T-Zellen* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

7.4. Danksagung

Mit meiner Danksagung möchte ich alle Personen erreichen, die direkt oder indirekt zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

In der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie am Campus Benjamin Franklin haben Prof. Wolfgang Ertel und alle ärztlichen Kollegen "die Polytraumastudie" sehr engagiert unterstützt. Ohne diese koordinierte Zuarbeit wäre jede Labortätigkeit unmöglich gewesen. Vielen Dank dafür.

Prof. Wolfgang Ertel und PD Dr. Andreas Oberholzer möchte ich für die Vergabe des Themas und die interessanten und guten Vorarbeiten danken. Dr. Oberholzers konstruktive Kritik hat während der Arbeiten den Fokus immer wieder auf die wichtigen Zusammenhänge gelenkt.

Dr. Kevin Tschöke und Dr. Arwed Hostmann haben mich in allen medizinischen und inhaltlichen Fragestellungen unterstützt und dabei entscheidend zur Entwicklung der thematischen Schwerpunkte beigetragen. Für ihren Fleiß und ihr Engagement spreche ich meine Hochachtung aus. Das freundschaftliche Verhältnis machte die Zusammenarbeit sehr angenehm.

Dr. Markus Hellmuth und Anja Voigt haben als Naturwissenschaftler dem unbedarften Medizinstudenten unermüdlich Grundlagen und Fallstricke der Laborarbeit beigebracht und waren stets verlässliche Kollegen und Freunde.

Meinen Eltern Barbara und Ingo Drogies habe ich unendlich viel zu verdanken, nicht zuletzt für diese Arbeit war ihre liebevolle Unterstützung von grundlegender Bedeutung.

An letzter Stelle dieser Aufstellung – an erster Stelle in meinem Herzen – danke ich meiner Frau Stefanie für ihre Hilfe, ihre Geduld, ihre Liebe. Danke!