

Aus der chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Wolf E. Mutschler

**ANALYSE DER NUKLEÄREN TRANSLOKATION
UND DNA-BINDUNGSAKTIVITÄT VON STAT1 UND
STAT3 IN POLYTRAUMATISIERTEN PATIENTEN IN
DER FRÜHEN POSTTRAUMATISCHEN PHASE**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helen Vester

aus

Ravensburg

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Peter Biberthaler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christopher Heeschen Prof. Dr. Peter Lohse
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD. Dr. Peter Biberthaler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	11.12.2008

In Liebe für die beste Mutter der Welt

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1 Posttraumatische Immunreaktion	8
1.2 Pathophysiologie des posttraumatischen Schocks	11
1.3 Mechanismen der posttraumatischen Entzündungsreaktion	12
1.3.1 Endothelzell-Granulozyten- Interaktion	13
1.3.2 Monozyten/Makrophagensystem	14
1.4 Entzündungsmediatoren	15
1.5 Die Signal Transducer and Activator of Transcription Proteine	17
1.5.1 Die inflammatorische Wirkung von STAT	20
1.5.2 Die Rolle von STAT-Mutationen bei Erkrankungen des Menschen	21
2. ZIELSETZUNG	28
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 Vorbemerkung	30
3.2 Patienten	30
3.3 Blutprobengewinnung	31
3.4 Zellisolation	31
3.4.1 Verarbeitung	31
3.4.2 Isolationsprinzip	32
3.4.3 Monozytenisolation	33
3.4.4 Granulozytenisolation	33
3.4.5 Zellzahl	34
3.5 Trennung von nukleärem und zytosolischem Protein	34
3.6 Validierungen	35
3.6.1 Stimulation	36
3.7 Proteinbestimmung nach Bradford	36
3.8 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	37
3.8.1 Etablierungsversuche	37
3.8.2 Radioaktive Markierung des Oligonukleotids	38
3.8.3 Kontrollen	39
3.8.4 EMSA – Reaktionsgemisch	40
3.8.5 Filmverarbeitung	41
3.9 Klinische Daten	41
3.10 Score Berechnungen	42
3.10.1 Der MOF Score	42
3.10.2 Der <i>Injury Severity Score</i> , ISS	43
3.11 Statistische Analyse	44
4. ERGEBNISSE	45
4.1 Patientenkollektiv	45
4.2 Schweregrad der Verletzungen	45
4.3 MOF	49
4.4 Zellisolation Proteininvalidierung	50
4.5 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	51
4.6 Kontrollkollektiv	52
4.7 STAT1 Aktivität in Monozyten polytraumatisierter Patienten	55
4.7.1 Gesamtkollektiv	55
4.7.2 Einteilung nach Massentransfusion	57
4.7.3 Einteilung nach <i>outcome</i>	58
4.7.4 Einteilung nach NISS	59
4.7.5 Einteilung nach MOF	60
4.8 STAT3 Aktivität in Monozyten polytraumatisierter Patienten	61
4.8.1 Gesamtkollektiv	61

4.8.2 Einteilung nach Massentransfusion.....	63
4.8.3 Einteilung nach <i>outcome</i>	64
4.8.4 Einteilung nach NISS	65
4.8.5 Einteilung nach MOF	67
4.9 STAT1 Aktivität in Granulozyten polytraumatisierter Patienten	68
4.9.1 Gesamtkollektiv.....	68
4.9.2 Einteilung nach Massentransfusion.....	69
4.9.3 Einteilung nach <i>outcome</i>	71
4.9.4 Einteilung nach NISS	72
4.9.5 Einteilung nach MOF	73
4.10 STAT3 Aktivität in Granulozyten polytraumatisierter Patienten	74
4.10.1 Gesamtkollektiv.....	74
4.10.2 Einteilung nach Massentransfusion.....	77
4.10.3 Einteilung nach <i>outcome</i>	78
4.10.4 Einteilung nach NISS	79
4.10.5 Einteilung nach MOF.....	81
5. DISKUSSION	83
5.1 Methodik	83
5.1.1 Studiendesign	83
5.1.2 Patientenkollektiv.....	84
5.1.3 Zellisolation.....	85
5.1.4 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	86
5.2 Posttraumatische Inflamationsreaktion	87
5.3 Immunkompetente Zellen	88
5.3.1 Monozyten.....	88
5.3.2 Granulozyten	89
5.4 STAT Translokation.....	90
5.4.1 Transkriptionsfaktor STAT	90
5.4.2 Die Bedeutung der STAT-Mutationen bei Erkrankungen des Menschen.....	91
5.5 Die STAT1 und STAT3 Aktivität im Kontrollkollektiv	93
5.6 Patientenkollektiv.....	94
5.6.1 Translokation von STAT1	94
5.6.2 Translokation von STAT3	96
5.7 Einteilungen des Patientenkollektivs.....	98
5.7.1 Anatomische Verletzungsschwere	98
5.7.2 MOF	100
5.7.3 Überleben	101
5.7.4 Massentransfusion.....	102
6. SCHLUSSFOLGERUNG	104
7. ZUSAMMENFASSUNG	105
8. LITERATURVERZEICHNIS	111
9. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	124
10. MATERIALIEN	127
10.1 Geräte und Material	127
10.2 Chemikalien	128
11. DANKSAGUNG	130
12. LEBENS LAUF	132

1. EINLEITUNG

In der Bundesrepublik Deutschland verstarben im Jahr 2006 so wenig Verkehrsteilnehmer im Rahmen von Unfällen wie nie zuvor¹. So wurden 2006 nur halb so viele tödlich Verunglückte gezählt (insgesamt 5091 Tote) im Vergleich zum Jahr 1992 (insgesamt 10631 Tote). Die Ursache für den erheblichen Rückgang von Verkehrstoten in der BRD ist von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Im Vordergrund stehen hierbei aktive und passive Sicherheitssysteme in modernen Fahrzeugen, wie zum Beispiel Gurt-Systeme, Airbags, Fahrgastzellen schützende Konstruktionen, etc., sowie die zunehmende Verbesserung präklinischer und klinischer medizinischer Versorgung. Hierzu zählen die Optimierung der Schockraumversorgung und Ausschöpfung der intensivmedizinischen Möglichkeiten, sowie überarbeitete chirurgische Therapiekonzepte (zum Beispiel. das Konzept des „damage control“)^{14,152}. In diesem Zusammenhang konnte die posttraumatische Letalität schwerstverletzter Patienten im Verlauf der letzten Jahrzehnte um etwa 60% reduziert werden¹⁵⁹.

Im Gegensatz dazu ist die Anzahl der schwerst verletzten Patientinnen und Patienten in der jüngsten Vergangenheit kontinuierlich angestiegen¹⁸⁹. Die Ursache hierfür liegt zum einen darin, dass die Sicherheitssysteme der Fahrzeuge zwar tödliche Verletzungen reduzieren können, aber Betroffene dennoch erheblichen Gewalteinwirkungen ausgesetzt sind und somit an ihren Verletzungen nicht unmittelbar versterben, sondern durch die hervorragend verzahnten Rettungssysteme schwerstverletzt in Kliniken gebracht werden. Dies bedeutet, dass ein erheblicher Anteil derjenigen Patienten, die schwerstverletzt in eine Klinik eingeliefert werden, vor kurzer Zeit noch in der Präklinik verstorben wäre.

Zum anderen schützen die Fahrzeugsicherungssysteme zwar die Insassen mehr und mehr, jedoch sind ca. 20% der im Straßenverkehr polytraumatisierten Patienten primär nicht in einem Fahrzeug unterwegs, sondern zum Beispiel als Fußgänger, Fahrradfahrer oder

Motorradfahrer und profitieren somit nicht in gleichem Maße von der kontinuierlichen Verbesserung der Sicherheitskonzepte moderner Fahrzeuge.

Darüber hinaus wird ein erheblicher Anteil polytraumatisierter Patienten außerhalb des Straßenverkehrs, beispielsweise im Rahmen von Arbeitsunfällen, von Verletzungen betroffen oder verunfallt im Zusammenhang mit der zunehmenden Häufigkeit von risikoreichen Trend-Sport-Arten, wie beispielsweise Gleitschirmfliegen, Bungeejumping, etc.

In der Bevölkerungsgruppe der Menschen bis zum 45. Lebensjahr stellt das Polytrauma somit nach wie vor die häufigste primäre Todesursache dar ^{12,52}. Ein Polytrauma ist die Summe mehrerer Verletzungen verschiedener Körperregionen oder Organsysteme, die in ihrer Kombination, unter Umständen aber auch bereits einzeln, lebensbedrohlich sind ¹⁶⁶.

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Unfallereignis versterben bis zu 30% der schwerst verletzten Patienten ¹⁷⁶. Während diese frühe Letalität meist durch das schwere Schädel-Hirn-Trauma und ausgedehnte Massenblutungen nach Verletzungen von großen Gefäßen oder stark durchbluteten parenchymatösen Organen determiniert ist, wird die Spätletalität durch schwere Funktionsstörungen von lebenswichtigen Organen bestimmt ^{52,171}. Zahlreiche Untersuchungen haben deutlich gemacht, dass diese Funktionsstörungen Organsysteme betreffen können, die durch das eigentliche Trauma nicht direkt in Mitleidenschaft gezogen wurden. Somit ist der klinische Verlauf der Patienten weitgehend durch die Entwicklung auf der Intensivstation geprägt ⁴⁸. Weitere 40% der aufgrund eines Polytraumas verstorbenen Patienten, versterben innerhalb von Tagen bis Monaten nach Unfallereignis aufgrund eines Multiorganversagens. Die Spätletalität ist weitgehend auf den Ausfall lebenswichtiger Organe zurückzuführen ¹⁶⁴.

Umfangreiche Untersuchungen haben klar aufgezeigt, dass dieser Immunreaktion des Körpers ein pathophysiologisches Phänomen zugrunde liegt, dessen Auslöser unterschiedliche Ursachen, wie zum Beispiel Unfälle, Schussverletzungen, Verbrennung oder Ähnliches haben kann ^{4,10,164}. Die initial betroffenen Organe induzieren eine Reihe von inflammatorischen Kaskaden, die primär der sofortigen Reparatur des verletzten Gewebes dienen ⁹⁰. Zu diesem

Zweck werden vermehrt proinflammatorisch wirksame Metabolite, wie beispielsweise IL-1, IL-2, TNF- α , IL-6, IL-8 oder toxische Sauerstoffmetabolite (ROI) und Stickstoff NO ausgeschüttet^{4,10,170,174}. Diese liefern die Grundvoraussetzungen für eine schnelle Rekonvaleszenz des betroffenen Gewebes in Form von Angiogenese, Vasodilatation und Makrophagenimmigration. Diese, auf die initial betroffenen Organe begrenzte, Entzündungsreaktion kann jedoch auch zu einer überschießenden generalisierten Inflammationsreaktion führen, die Organe und Gewebe in Mitleidenschaft zieht, welche durch das eigentliche Trauma nicht angegriffen waren. Solch eine überschießende, das gesamte System betreffende, Entzündungsreaktion in der posttraumatischen Phase wird als *Systemic Inflammatory Response Syndrom* (SIRS) bezeichnet^{15,135,136}.

Der zeitliche Ablauf, sowie die zugrunde liegende Pathophysiologie dieser posttraumatischen Immunphänomene werden im nächsten Kapitel näher erläutert.

1.1 Posttraumatische Immunreaktion

Als ursächlich für die Induktion und Aufrechterhaltung der posttraumatischen Organstörung wurde die initiale Ausbildung einer Stressreaktion des Organismus identifiziert. Dabei kommt es nach einem Unfall in Abhängigkeit von der Verletzungsschwere zunächst zu einer generalisierten Entzündungsreaktion, die als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) beschrieben wurde. Für die klinische Definition des SIRS müssen mindestens 2 der folgenden Parameter zeitgleich auftreten, bei jedoch fehlendem Nachweis eines infektiösen Fokus: 1) Herzfrequenz >90/min, 2) Atemfrequenz >20/min bzw. Hyperventilation mit konsekutivem $P_aCO_2 < 32\text{mmHg}$, 3) Temperatur >38°C oder <36°C und 4) Leukozyten >12000/mm³ oder <4000/mm³ oder $\geq 10\%$ juvenile neutrophile Granulozyten^{15,91,121,170}.

In dieser Phase kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung des Immunsystems. Dadurch kann das posttraumatische SIRS primär noch reversible funktionelle Organausfälle bewirken. Ist der Organismus nicht fähig, diese Entzündungsreaktion zu kontrollieren, kann sich daraus

ein *Multiorgandsysfunktionssyndrom* (MODS) entwickeln, welches konsekutiv in einem irreversiblen *Multiorganversagen* (MOF) münden kann ^{37,55,137}. Dieses posttraumatische Phänomen geht noch immer mit einer hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate einher ^{16,48,59,121}. *Rodney et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass die Mortalität bei mehr als 3 betroffenen Organsystemen bereits bei 67% liegt ⁵⁵. Weiterhin konnten *Nast-Kolb et al.* in einer aufwändigen Studie zwar nachweisen, dass die Mortalität des MOF von noch 18% im Jahre 1975 auf schließlich 4% im Jahre 1999 gesenkt werden konnte, die Inzidenz von MODS bzw. MOF hingegen stieg in diesem Zeitraum von 26% (1975) auf 33% (1999) an ¹⁴¹. Ferner versterben noch immer bis zu 50% der Patienten im Behandlungsverlauf, die ein manifestes MODS entwickeln ^{55,141}. Im internationalen Vergleich finden sich, zumindest für alle westlichen Industrienationen, vergleichbare Zahlen bezüglich der Häufigkeit dieser posttraumatischen Komplikation ^{170,172}.

Als kompensatorische Reaktion des Organismus auf das hyperinflammatorische Intervall des SIRS, kann es zu einer hypoinflammatorischen Phase kommen, die in der Literatur als *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome* (CARS) beschrieben ist ¹⁴⁰. Sie zeichnet sich durch Immunsuppression, begleitet von einer Überproduktion antiinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-1RA oder IL-10 aus ¹²¹. In dieser Phase ist das Individuum erheblich infektgefährdet, das Immunsystem weist schwere Funktionsstörungen auf, und die körpereigene Abwehr bietet keinen ausreichenden Schutz. Es kommt folglich zur Ausbildung von nosokomialen Infektionen, Pneumonien und im schlimmsten Fall zu einer manifesten Sepsis. Durch die Infektneigung und Abwehrschwäche kann das Individuum sehr leicht eine späte Form des Multiorganversagens, das so genannte „late onset MOF“, entwickeln ¹⁷¹. Die Entstehung der Infektionen führt ihrerseits erneut zu Phasen der Inflammation mit konsekutiver Immunsuppression was letztlich in einem *circulus vitiosus* aus posttraumatischer Inflammation → Immunsuppression → Infektion → Inflammation → Immunsuppression enden kann ¹⁹⁴. Das zeitliche Geschehen ist noch einmal genauer in **Abb.1** verdeutlicht.

Abb.1: Die Dynamik der Immunantwort nach Polytrauma

Immunantwort nach Polytrauma

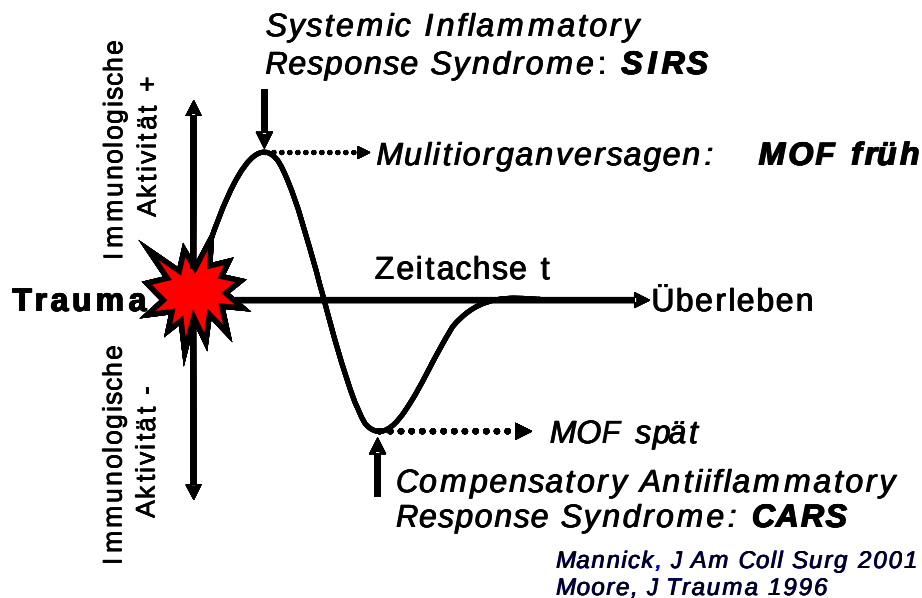


Abb.1: Diese Graphik stellt schematisch die zeitliche Abfolge der posttraumatischen Immunsystemdysfunktionssyndrome dar. Initial nach Trauma kommt es zu einer generalisierten Entzündungsreaktion, dem SIRS, welches zu einer frühen funktionellen Dysfunktion verschiedener Organsysteme führen kann (MOF früh). Als kompensatorische Gegenregulation des Körpers kann es im Folgenden zu einer hypoinflammatorischen Phase kommen, dem CARS. Hier ist der Organismus durch sehr geringe Immunabwehr gekennzeichnet, was ein spätes MOF zur Folge haben kann.

In diesem Zusammenhang hat man bereits Ende der 80er Jahre erkannt, dass die zu frühe Exposition eines polytraumatisierten Patienten gegenüber einem weiteren, das Immunsystem beeinflussenden Ereignis, wie beispielsweise einer lang dauernden Operation oder Bluttransfusionen, zu einer zusätzlichen Freisetzung von inflammatorisch aktiven Metaboliten

führt¹³⁹. Dieses klinisch relevante Problem wurde als „*second-hit*“ Phänomen bezeichnet^{121,137,196}.

1.2 Pathophysiologie des posttraumatischen Schocks

Im Rahmen des traumatischen Ereignisses kommt es zu einer temporären Ischämie mit darauf folgender Reperfusion der betroffenen Region, wobei toxische Sauerstoffmetabolite freigesetzt werden⁵⁶. Dies führt zur Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen. Die sympathoadrenerge Zentralisierung des Kreislaufs, wie beispielsweise beim traumatischen hämorrhagischen Schock, bewirkt eine Ischämie der zentralen Organe und der Extremitäten^{22,56,104,105}.

Hierbei zeigte sich das Lungen- und Nierengewebe als besonders empfindlich gegenüber passageren Ischämiephasen^{38,60,184}. In diesem Zusammenhang kann es zur Ausbildung eines akuten Nierenversagens (ANV)⁵⁷, bzw. eines *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS)^{145,159,190} kommen. Aufgrund der ausgeprägten Sensibilität des respiratorischen und glomerulären Epithels, wurden diese Organe als primäre Schockorgane identifiziert^{38,159,210}.

Des Weiteren erörterten mehrere Studien der vergangenen Jahre, dass der Gastrointestinaltrakt ebenfalls empfindlich auf ischämische Passagen reagiert^{73,83}.

Die Ischämie-Reperfusion des Gastrointestinaltrakts kann sowohl durch direkte Schädigung der Darmwand als auch indirekt durch Zentralisation im Volumenmangelschock induziert werden. Durch die Minderperfusion können Mucosaschäden induziert werden, die pathogenen Keimen die Translokation in das Gewebe und die systemische Zirkulation erleichtern. Dadurch kann es zur Aktivierung des Immunsystems mit konsekutiver Induktion einer generalisierten Inflamationsreaktion kommen^{49,50}. Ferner induziert die Minderperfusion der Leber eine vermehrte Freisetzung immunmodulatorischer Mediatoren, wie beispielsweise den Akut-Phase-Proteinen oder Anti-Akut-Phase-Proteinen. Diese sind stark beteiligt an der

posttraumatischen Inflammationsreaktion^{80,96}. Durch solch eine Induktion verschiedener Inflammationsfaktoren kann aus dem Mono-Organversagen folglich ein MOF resultieren.

1.3 Mechanismen der posttraumatischen Entzündungsreaktion

Die Entwicklung von Entzündungsreaktionen nach hämorrhagisch-traumatischem Schock ist ein komplexer Prozess, der im Folgenden näher erläutert werden soll. Die Inflammationsreaktion wird getragen vom humanen Immunsystem, welches primär zum Schutz des Organismus vor Gefahr von außen konzipiert ist¹²⁵.

Die verantwortlichen Mechanismen, welche dieses sorgfältig austarierte System dazu bringen, von seiner ursprünglichen Rolle als Schutzmechanismus umzuschwenken in ein autoaggressives System, das in der letzten Konsequenz das eigene, tragende Individuum zerstört, sind nur höchst unzureichend verstanden. Jüngste Untersuchungen weisen darauf hin, dass sowohl das unspezifische wie auch das spezifische Immunsystem hierbei substantiell beteiligt sind^{92,107}. Bestandteile des unspezifischen Immunsystems sind physiologische Barrieren, wie beispielsweise Haut- und Schleimhäute, sowie Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und das Komplementsystem. Durch die unspezifische Aktivierung humoraler Kaskadensysteme werden Produkte aus dem Komplementsystem, der Gerinnung, der Fibrinolyse und dem Präkallikrein/Kallikreinsystem stimuliert. Diese aktivieren Granulozyten, Makrophagen und Monozyten zur Diapedese ins Gewebe und zur Synthese inflammatorischer Zytokine²⁰³. Das aktivierte Komplementsystem, das als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems gilt, setzt Komplement-Spaltprodukte wie beispielsweise *C5a* und *Platelet Activating Factor* (PAF)¹⁰⁸ frei. Diese aktivieren ihrerseits zelluläre Bestandteile des Immunsystems⁹⁴. Zu den Produkten der zellulären Mediatoren zählt man Produkte aus dem Arachidonsäuremetabolismus und Zytokine, die von Phagozyten, Lymphozyten und Endothelzellen gebildet werden. Ihnen gemeinsam ist, dass sie

sowohl direkt als auch indirekt, d.h. durch Stimulation von polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten (PMN) und Endothelzellen zu einer Schädigung der Mikrozirkulation führen¹⁰⁸.

1.3.1 Endothelzell-Granulozyten- Interaktion

Die aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten adhären am Endothel postkapillärer Venolen und setzen ihre toxischen Produkte, wie beispielsweise Sauerstoffradikale, Proteasen, Zytokine und Arachidonsäuremetabolite (Leukotrien B₄) frei. Das relative Versagen inhibitorischer Gegenregulatoren führt dabei zu einer generalisierten Störung der Mikrozirkulation und der Permeabilität, was wiederum die Ausbildung einer Organdysfunktion bis hin zum Multiorganversagen zur Folge hat¹⁴⁸. Für die Adhäsion notwendige Voraussetzung ist die Expression von Selektinen (*P-Selektin*, *E-Selektin*) in Endothelzellen und *L-Selektin* auf Lymphozyten. Ferner noch Integrine und immunglobulinähnliche Adhäsionsmoleküle (*ICAM-1*, *PECAM-1*, *VCAM-1*, etc.). Hierbei scheint insbesondere das *ICAM-1* (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) von Bedeutung zu sein. Eine erhöhte Expression dieses Moleküls auf Endothelzellen in Interaktion mit polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten ist mit einer inflammatorischen Fehlregulation assoziiert^{108,177}. Es zeigte sich im posttraumatischen Verlauf auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die ein MOF entwickelten, und solchen, die ohne diese Komplikation blieben¹⁵⁴.

Ferner ist die endotheliale Stickstoffmonoxid-Freisetzung (NO-Freisetzung) ausschlaggebend für die Gefäßpermeabilität. Nach Trauma kommt es deshalb durch unterdrückte NO-Freisetzung zu einer Permeabilitätssteigerung, die bis hin zum *capillary leak syndrom* führen kann^{8,91}.

Die Beteiligung der polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten an der posttraumatischen Entzündungsreaktion wird anhand der Dynamik ersichtlich. *Botha et al.* konnten beispielsweise bei polytraumatisierten Patienten nachweisen, dass bereits 3 Stunden nach

Unfallereignis die zirkulierenden polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten signifikant erhöht waren gegenüber der Vergleichsgruppe. 6 Stunden post trauma jedoch konnten sie einen dramatischen Einsturz verzeichnen. Bei den Patienten, die im posttraumatischen Verlauf ein MOF entwickelten, war der Abfall der zirkulierenden polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten nach 12 Stunden signifikant größer als bei den Patienten ohne Organsystemdysfunktionen²⁵.

Die potentiell zytotoxischen Produkte und Reaktionen der polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten dienen unter physiologischen Bedingungen nicht der Schädigung von Organen, sondern der Elimination eingedrungener Mikroorganismen. Dies erfolgt in der Regel durch eine Kooperation zwischen Phagozyten der unspezifischen Abwehr mit den Zellen und Produkten der spezifischen Immunität. Diese Kommunikation wird durch Botenstoffe, den Zytokinen, vermittelt^{113,142}.

1.3.2 Monozyten /Makrophagensystem

Das unspezifische zelluläre Immunsystem nimmt eine bedeutende Rolle in der posttraumatischen Inflamationsreaktion ein^{60,121}. Dabei kommt insbesondere dem Monozyten/Makrophagen System große Bedeutung zu. Physiologischerweise differenzieren Monozyten unter Zytokineinfluss zu dendritischen Zellen, die Antigene präsentieren können und somit einflussreiche immunmodulatorische Mediatoren darstellen³⁴. Sie können naive T-Zellen stimulieren und Gedächtniszellen akquirieren. Unter dem Einfluss diverser Stimuli können Monozyten aber auch zu Makrophagen differenzieren. Diese besitzen zwar ein größeres Potential zur Expression proinflammatorischer Zytokine, haben aber auch die Fähigkeit verloren T-Zellen zu aktivieren. Ferner exprimieren sie auf ihrer Oberfläche weniger *Major Histocompatibility Complex* der Klasse II (*MHC II*), und die Antigenpräsentation ist ineffizient^{36,47,51,160}.

Die Antigenpräsentation ist eine Voraussetzung für die Aktivierung der T-Lymphozyten. Diese wiederum können Zytokine freisetzen (*Lymphokine*), welche eine erneute Stimulation der antigenpräsentierenden Zellen, sowie die Proliferation der T-Lymphozyten induzieren^{198,215}.

Eine Auswirkung der posttraumatischen Fehlregulation des Monozyten/Makrophagen Systems kann man an der Unfähigkeit erkennen, Antigene zu präsentieren, was zu einem kompletten Versagen des eben erläuterten Kreislaufs führt^{47,69}.

1.4 Entzündungsmediatoren

Besondere Bedeutung bei der posttraumatischen Inflammationsreaktion kommen dabei vor allem den Zytokinen IL-6 (*Interleukin 6*) und IL-8 (*Interleukin 8*) und IL-10, sowie TNF- α oder IFN- γ zu^{76,84}. Zum einen konnten in multiplen Studien Korrelationen zwischen den Plasmaspiegeln von IL-6 und IL-8 und dem Verletzungsmuster der Patienten¹⁸⁸, der Verletzungsschwere⁶⁶, der Ausbildung eines MOFs¹⁵⁴, sowie der Ausbildung eines septischen Schocks (IL-6)¹⁴⁶ und sogar dem *outcome* der Patienten nachgewiesen werden^{141,152,153}. Zum anderen üben IL-6 und IL-8 aber auch einen *Primingeffekt* auf zirkulierende Granulozyten aus. Darunter versteht man, dass bereits geringe Konzentrationen dieser Zytokine die Reagibilität der polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten auf andere inflammatorische Stimuli erheblich potenziert. Dieses Phänomen führt unter anderem zu einer vermehrten Freisetzung von zytotoxischen Stoffen wie Superoxidanionen, Elastase oder Adhäsionsmolekülen^{25,214}.

Eine Quelle proinflammatorischer Zytokine (IL-8, TNF, IL-6), sowie antiinflammatorischer Mediatoren wie z. B. IL-1ra sind die Granulozyten und das Monozyten/Makrophagensystem^{36,69,214}.

Tierversuche konnten zeigen, dass IL-10 durch Unterdrückung und Deaktivierung anderer proinflammatorischer Mediatoren essentiell für die Ausbildung einer adäquaten

Inflammationsreaktion ist ^{18,209}. In der Literatur wurde auch für IL-10 eine Korrelation zwischen dessen Expression und Verletzungsschwere, *outcome*, Sepsis und Entwicklung eines ARDS beschrieben ^{150,153}.

Aus diesen Darlegungen geht hervor, dass sowohl das Monozyten/Makrophagen System als auch die polymorphkernigen neutrophilen Lymphozyten von essentieller Bedeutung für die Ausbildung der posttraumatischen Dysregulation sind. Es konnte vielfach nachgewiesen werden, dass die Konzentrationen von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren in der systemischen Zirkulation von polytraumatisierten Patienten dabei eine tragende Rolle spielen ^{84,121,140}.

Weitgehend ungeklärt hingegen ist jedoch die Frage, welche initialen Steuerungsmechanismen mithilfe welcher Schlüsselmediatoren zur Synthese von biologischen Effektorproteinen wie Zytokinen, Chemokinen, Proteasen, Inhibitoren, Zelloberflächenmoleküle, etc. führen, um somit die posttraumatische Destabilisierung des humanen Immunsystems zu initiieren. In diesem Zusammenhang haben jüngste Veröffentlichungen Hinweise darauf gegeben, dass nukleäre Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NFκβ, eine substantielle Bedeutung für die Ausbildung und Ausprägung posttraumatischer Organfunktionsstörungen aufweisen können ^{3,21,23}.

Die Bedeutung scheint sich aus der Schlüsselposition von Transkriptionsfaktoren für die Fähigkeit eines Organismus auf externe Änderungen der Bedingungen zu reagieren, zu ergeben. Aufgrund der potentiellen Toxizität der körpereigenen Abwehrstoffe, wie z. B. IL-6, TNF-α, etc. ist es für das Individuum riskant, diese Botenstoffe in präformierter Form in seinen Zellen zu lagern. Andere Beispiele aus diesem Zusammenhang, wie z. B. Histamin, verdeutlichen eindrucksvoll die pathologische Konsequenz bei potentieller Fehlfunktion, ausgedrückt im anaphylaktischen Schock. Daher speichert der Organismus die Information über die Bildung dieser Abwehrstoffe auf der DNA und ordert deren Produktion an, wenn eine externe Bedrohung entsteht. Diese Anforderung wird über Transkriptionsfaktoren

vermittelt, die im Zellkern die Bildung von mRNA induzieren können. Somit steuern Transkriptionsfaktoren das inflammatorische Orchester in ganz erheblicher Weise. Um die Frage der intrazellulären Initialmechanismen zu klären, bietet es sich deshalb an, Mediatoren auf der Transkriptions- / Translationsebene zu untersuchen.

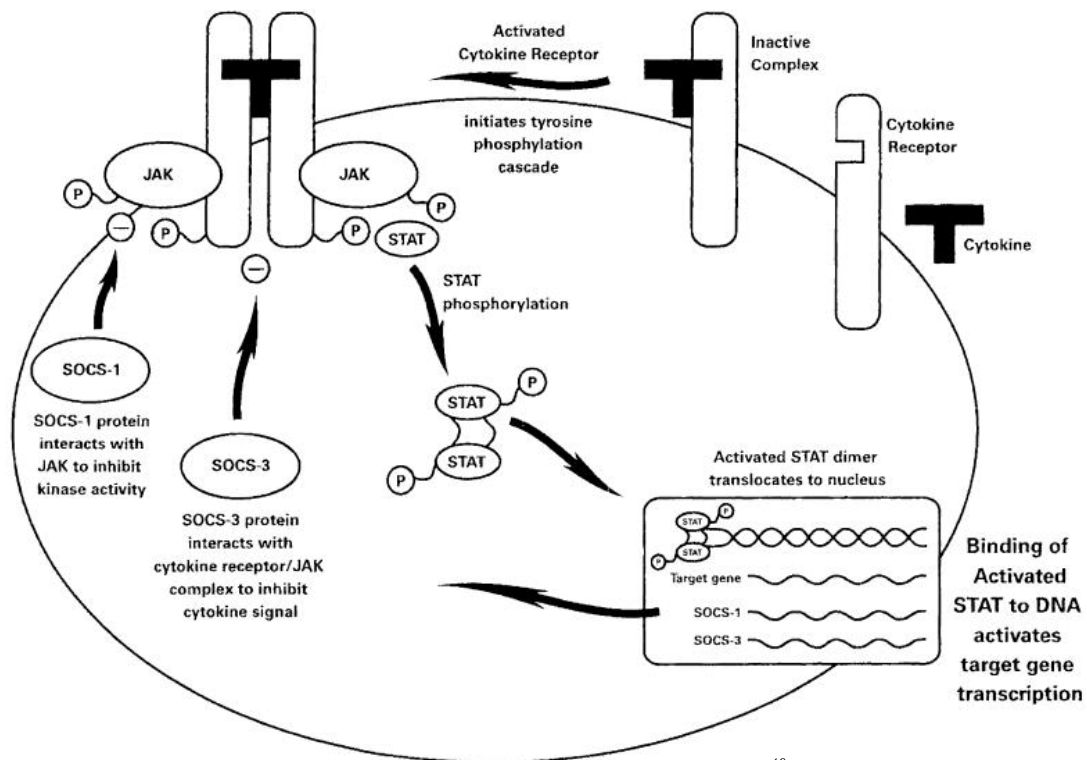
In diesem Zusammenhang sind in jüngster Vergangenheit Faktoren identifiziert worden, die direkt auf pro- und antiinflammatorische Faktoren Einfluss zu nehmen scheinen, die Gruppe der *Signal Transducer and Activator of Transcription* Proteine (STAT)^{45,112,165,185}.

1.5 Die *Signal Transducer and Activator of Transcription* Proteine

Diese zum ersten Mal in den späten 90er Jahren des letzten Jahrhunderts charakterisierte Familie setzt sich aus 7 Mitgliedern zusammen (*STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6*), die an Zellzyklus, Apoptose, Wachstum und der Immunmodulation beteiligt sind^{45,112,165,185}.

Die STAT Proteine liegen inaktiv im Zytoplasma der Zelle, bis sie durch einen extrazellulären Stimulus, wie beispielsweise Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Peptide, aktiviert werden^{44,54}. Dies erfolgt durch die Bindung des jeweiligen extrazellulären Mediators an den entsprechenden Rezeptor²⁹, wie beispielsweise IL-6 an den *gp130* Zytokinrezeptor (siehe **Abb.2**). Die Bindung an den Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung der *Januskinase* (JAK), die wiederum das betreffende STAT-Protein am Tyrosin- oder Serinrest phosphoryliert^{85,116,131}. Der somit aktivierte Transkriptionsfaktor bildet nun Homo- oder auch Heterodimere, transloziert in den Zellkern und induziert dort letztlich die Transkription entsprechender Reportergene^{33,58,78,79}.

Abb. 2: Die Aktivierung der STAT Proteine



⁴⁰Cooney, R.N; Shock 2002

Abb.2: Diese Graphik stellt die zellulären Regelkreise dar, welche nach Induktion der STAT Aktivierung ablaufen. Das entsprechende Zytokin dockt an den korrespondierenden Zytokinrezeptor an und induziert die Bindung der Januskinase (JAK). Das STAT Protein wird durch diese phosphoryliert, um sich dann vom Rezeptor zu lösen und im Zytoplasma Homo- oder Heterodimeren zu bilden. Das aktivierte STAT Dimer transloziert in den Zellkern und bindet dort an die doppelsträngige DNA, um so die Induktion von Reportergenen zu steuern. Ebenfalls abgebildet sind die Inhibitoren SOCS1 und SOCS3 welche diesen Vorgang regulieren.

Dieser Vorgang wird durch hemmende Proteine im Sinne eines negativen Feedback Mechanismus reguliert, wie zum Beispiel durch die *Suppressors of Cytokine Signaling 1-7* (SOCS), die *Cytokine-Inducible SH2 Proteins* (CIS), die *Protein Inhibitors of Activated STAT* (PIAS) und andere. Hierbei sind insbesondere die SOCS Proteine in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt, da sie nicht nur die STAT Aktivität hemmend regulieren, sondern durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor in gleichem Maße den initiiierenden Mediator unterdrücken. SOCS1 wird beispielsweise durch STAT1 aktiviert und unterdrückt folglich die IFN- γ Signaltransduktionskaskade. SOCS3 hingegen wird durch

STAT3 aktiviert, bindet an den *gp130* Zytokinrezeptor und wirkt dort als hemmendes Moment¹⁰⁰. Studien haben jedoch gezeigt, dass aktiviertes SOCS3 auch eine Hemmung von STAT1 bewirkt, und SOCS1 im Gegenzug die Unterdrückung der STAT1 Aktivität induzieren kann⁸⁵ (siehe **Abb.3**).

Ferner sind sowohl SOCS1 als auch SOCS3 an der T-Zell Differenzierung beteiligt. SOCS1 stimuliert darüber hinaus ebenfalls die Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen, wobei auch hier die Interaktion mit den STAT Proteinen eine notwendige Voraussetzung für die adäquate Immunreaktion darstellt^{5,101}.

Abb.3: Die Hemmung der STAT Aktivierung durch SOCS

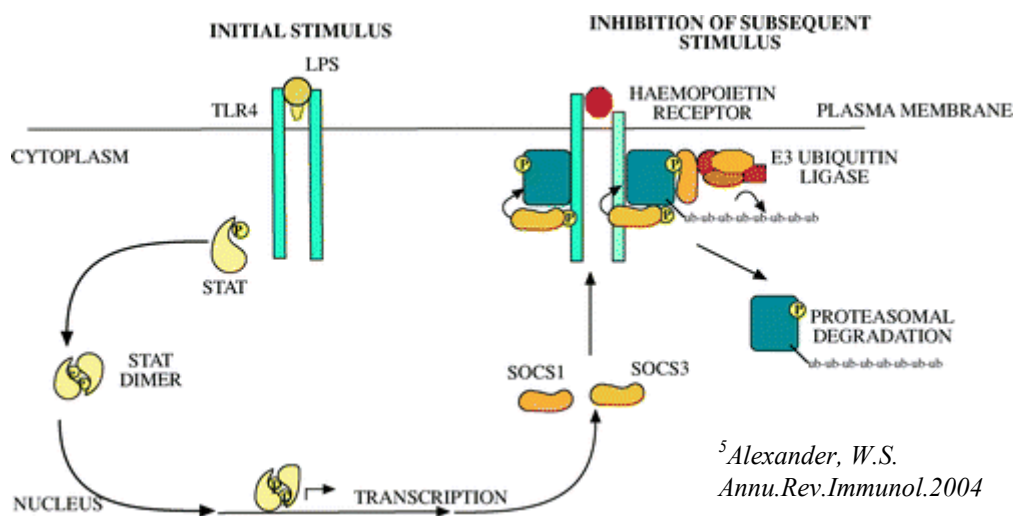


Abb.3: Diese Graphik stellt die Hemmung der STAT Aktivität mit den beteiligten Mediatoren dar. Das STAT Dimer induziert die Transkription der gewünschten Reportergene und führt dadurch wiederum über einen negativen Feedback Mechanismus zur Aktivierung der SOCS Proteine und konsekutiver Hemmung der STAT Aktivität. Hierbei können die SOCS Proteine zum einen, durch Bindung an den Rezeptor STAT direkt hemmen, zum anderen aber ebenso die Bindung der initiiierenden Mediatoren an den Rezeptor unterdrücken.

1.5.1 Die inflammatorische Wirkung von STAT

Die Bandbreite der vom STAT *Pathway* abhängigen Reportergene ist immens. Zahlreiche Studien wurden bereits durchgeführt, um das biologische Potential der Aktivierung, die physiologische Bedeutung und die Aufgaben dieser Transkriptionsfaktoren näher erläutern zu können. Dabei zeigten sich insbesondere STAT1 und STAT3 an Inflammationsreaktionen, an Abwehrmechanismen und an der Immunmodulation beteiligt.

So wird STAT1 beispielsweise vorwiegend durch die IFN Familie aktiviert. Es zeigte sich in Ischämie/Reperusionsmodellen bereits nach 4 Stunden eine erhöhte STAT1 Aktivierung, die bis zu 16 Stunden auf diesem Level blieb ^{186,194}. Mehrere Arbeitsgruppen haben versucht die physiologische Bedeutung von STAT1 mittels knock-out Modellen zu erforschen. Hierbei zeigten Mäuse mit selektivem Knock-out für STAT1 in immunkompetenten Zellen eine erhöhte Anfälligkeit für virale und bakterielle Infektionen. Solche Mäuse waren um das 10 fache anfälliger für pulmonale Infiltrationen und letale Infektionen als die Vergleichsgruppe ⁵⁴, zeigten kein Ansprechen auf IFN Stimulation, und die Induktion einer Lungenfibrose führte zu einer signifikanten Vermehrung der Entzündungszellen im gesamten Lungengewebe ²⁰⁰. In Anbetracht der Tatsache, dass der Lunge bei der Entwicklung der gefürchteten posttraumatischen Komplikationen wie SIRS und MOF eine führende Bedeutung zukommt sind diese Befunde durchaus von besonderer Bedeutung ^{38,159}. *Kumar et al.* konnten mittels EMSA zeigen, dass die artifizielle Induktion einer Sepsis mittels LPS zu einem signifikanten Anstieg der STAT1 DNA-Bindungsaktivität führt ¹⁰². STAT3 wird vorwiegend durch die proinflammatorische Gruppe der IL-6 Zytokine aktiviert und interagiert eng mit IL-10. Der Transkriptionsfaktor zeigte sich in Studien von essentieller Bedeutung für die Ausbildung und Ausprägung von chronisch inflammatorischen Prozessen, wie Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn ¹³⁸, der Akut-Phase –Reaktion initiiert durch die Leber ⁶ und der Induktion und Aufrechterhaltung einer Sepsis ⁷. Mäuse mit komplettem Knock-out für STAT3 überlebten die Embryogenese nicht ¹⁹². Das selektive Knock-out für STAT3 in immunkompetenten

Zellen jedoch führte zu einer erhöhten Zytokinproduktion (signifikant erhöhte Level von TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-6, IL-10) bei erniedrigter Abwehrfunktion gegenüber Bakterien¹²⁴. *Takeda et al.* konnten mittels selektivem Knock-out für STAT3 in Makrophagen und Granulozyten den Ausbruch einer chronischen Colitis bei den Versuchsmäusen provozieren¹⁹¹. Bei dieser chronischen Entzündungsreaktion zeigte sich in mehreren Studien bereits eine zeitliche Korrelation zwischen IL-6, STAT3 und SOCS^{86,179}. Die Arbeitsgruppe um *Gao et al.* konnte zeigen, dass die Antigen-Antikörper vermittelte Entzündungsreaktion der Rattenlunge bereits nach 30 Minuten eine Aktivierung von STAT3 bewirkt, die wiederum die erhöhte Expression von IL-6, IL-10 und SOCS3 im gesamten Lungengewebe zur Folge hat⁶⁵. Auch andere Arbeitsgruppen fanden STAT3 signifikant beteiligt an der Induktion und Aufrechterhaltung diverser Inflamationsreaktionen nach Entzündung, Trauma, Verbrennung, etc.^{96,100,156,178}. Ferner ist der Transkriptionsfaktor ein Schlüsselmediator bei der T-Zell Antwort und bei der Interaktion zwischen spezifischem – und unspezifischem Immunsystem¹²⁸. Des Weiteren ist STAT3 jedoch auch eine notwendige Voraussetzung für die durch IL-10 induzierten antiinflammatorischen Effekte in immunkompetenten Zellen^{18,93,209}.

STAT1 und STAT3 sind befähigt miteinander Homo- und Heterodimere zu bilden wodurch sich die einzelnen Effekte ergänzen, aufheben oder potenzieren können^{70,156}.

Da die Rolle von STAT1 und STAT3 in immunkompetenten Zellen polytraumatisierter Patienten bislang unklar ist, war das Ziel dieser Arbeit die hierbei verantwortlichen Mechanismen näher aufzuklären.

1.5.2 Die Rolle von STAT-Mutationen bei Erkrankungen des Menschen

Sowohl STAT1 als auch STAT3 sind für viele Erkrankungen des Menschen von großer Bedeutung. Erst in den vergangenen Jahren konnten Mutationen des STAT *Pathways* als ausschlaggebend für die Entwicklung und Entstehung von beispielsweise

Immunsystemdefektsyndromen, myeloproliferativen Krankheiten oder Karzinomen charakterisiert werden. Im Folgenden soll eine Auswahl an Krankheitsbildern und die Rolle der Transkriptionsfaktoren bei deren Pathogenese näher erläutert werden.

Die Rolle von STAT3 bei dem Hyper-IgE Syndrom

Ein Beispiel für seltene primäre Immundefekte sind die Hyper-IgE Syndrome (auch Job's, Hiob-, oder Buckley Syndrom genannt). Sie sind durch die klinische Trias (1) Ekzem mit exzessiv erhöhtem Serum-IgE (>2000 IU/ml), (2) rezidivierende Staphylokokken-Infekte der Haut mit Abszessbildungen und (3) Pneumonien mit Pneumatozelenbildung charakterisiert. Aufgrund der Assoziation der immunologischen Symptome mit der Überstreckbarkeit der Gelenke, Skoliose, erhöhter Knochenbrüchigkeit, Persistenz der Milchzähne, Craniosynostosen und auffälliger Fazies gilt das Hyper-IgE Syndrom als Multisystemerkrankung. Ferner bestehen oft mukokutane Candidosen.

Das klassischerweise autosomal dominant vererbte IgE Syndrom (die autosomal rezessive Form unterscheidet sich durch das Fehlen der skelettalen Symptome) weist eine Mutation in den STAT3 codierenden Genen auf. Die T-Zellen erkrankter Personen sind nicht befähigt, in IL-17 produzierende (T_H17) T-Helfer Zellen zu proliferieren und exprimieren weniger *retinoid-related orphan receptor* (ROR)- γt ^{46,132}. Diesem Rezeptor kommt eine bedeutende Rolle bei der Induktion der T_H17 Entwicklung durch STAT3 zu²¹². T_H17 Zellen sind eine durchaus bedeutende Untergruppe der T-Helferzellen, die unabkömmlich ist bei der Bewältigung von bakteriellen Infektionen und von solchen, die durch Pilze hervorgerufen werden.

Minegishi et al. konnten nachweisen, dass auch die sporadische Form des Hyper-IgE Syndroms eine dominant-negative Mutation in dem STAT3 Gen aufweist. Die Arbeitsgruppe konnte 5 verschiedene Mutationen nachweisen, die alle in der STAT3 DNA-Bindungsdomäne lokalisiert waren. Die peripheren Blutzellen dieser Patienten wiesen eine defekte STAT3

Bindung an die DNA auf und waren nicht in der Lage, adäquat auf Zytokine, wie z. B. IL-6 und IL-10 zu reagieren ¹³⁴. Die Arbeitsgruppe um *Renner* konnte ebenfalls Mutationen von STAT3 in Patienten mit Hyper-IgE Syndrom feststellen. Hierbei fanden sie gleichfalls Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne, sowie in der *Src homology 2 domain* (SH2 Domäne). 34 der 35 untersuchten, nicht verwandten Patienten wiesen diese Mutationen auf. Ferner konnte neben einer verminderten Entwicklung von T_H17 Zellen auch eine reduzierte Aktivierung von STAT3 beobachtet werden ¹⁶¹.

Eine weitere Rolle kommt dem TYK2 Protein zu, das zu der Familie der Januskinasen (JAK) gehört. Diese werden benötigt, um die STAT Proteine mittels Phosphorylierung zu aktivieren. In einem, an dem Hyper-IgE Syndrom erkrankten Patienten, konnte das Fehlen von TYK2 und damit verbunden eine pathologische Reaktion der Zellen auf Zytokinausschüttungen (IL-6, IL-12, IL-10, IL-23, IFN) nachgewiesen werden. Durch Induktion des gesunden TYK2 Gens konnte die physiologische Antwort der Zellen auf die Zytokinausschüttung wieder hergestellt werden ¹³³.

Die Rolle von STAT3 und STAT1 bei Immunsystemdefekten

Des Weiteren spielen STAT Proteine eine bedeutende Rolle für die Immunabwehr bei viralen und bakteriellen Infektionen. So zeigen beispielsweise Patienten mit einer dominant-negativen Mutation im STAT3 Gen eine erhöhte Anfälligkeit für rezidivierende Pneumonien. In diesem Zusammenhang konnten *Quinton et al.* zeigen, dass Mäuse mit selektivem knockout für STAT3 bei induzierter E.coli Pneumonie in den Alveolarzellen eine verminderte Neutrophilenimmigration und erhöhte Bakterienzahlen aufwiesen als gesunde Tiere. Ferner wiesen die Mäuse ohne aktiviertes STAT3 in der histologischen Untersuchung eine vermehrte Schädigung des Lungengewebes auf ¹⁵⁷.

Primär genetische Defekte in der Immunabwehr, die zur erhöhten Anfälligkeit für Erkrankungen mit beispielsweise Salmonella, Mycobakterien oder auch Viren wie z. B.

Herpes simplex Virus führen, sind für die betroffenen Patienten oft lebensgefährlich. So können diese Individuen aufgrund eines Defekts in der Zellabwehr, den T-Zellen oder der Zytokinantwort nicht adäquat auf diese Keime reagieren und überstehen ihre Krankheiten oftmals selbst unter Therapie nur langsam. Hierbei spielt die Mutation von STAT1 und der STAT1 *Pathway* unter anderem eine bedeutende Rolle ¹⁵⁵. Bei einer homozygoten Mutation für STAT1, die zu einem kompletten Verlust des Proteins führt, können die Zellen jegliche Signale der Interferone (IFN- α , IFN- γ , etc.) nicht mehr verarbeiten ³². Die gefürchtete Herpes Simplex Encephalitis zeigt ebenfalls einen Zusammenhang mit der fehlenden STAT1 Funktion bzw. einer kompletten Mutation in dem STAT1 Gen ¹⁶⁸. Ferner gibt es weitere Mutationen der IFN Rezeptoren, sowie homo- und heterozygote Mutationen des STAT1 Gens, die das Individuum ebenfalls höchst anfällig für schwere Infektionen machen ¹⁶⁸.

Die Rolle von STAT3 bei myeloproliferativen Neoplasien

Die myeloproliferativen Syndrome, die laut WHO seit 2008 als myeloproliferative Neoplasien bezeichnet werden, beruhen auf der klonalen Expansion einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen im Knochenmark. Die Proliferation ist effektiv, d.h. die vermehrt gebildeten Zellen können ihre physiologische Funktion wahrnehmen, im Gegensatz zu myelodysplastischen Syndromen, bei denen die Zellen in ihrer Funktion gestört sind. Hierzu zählen Chronische myeloische Leukämie (CML), Polycythaemia vera (PV), Essentielle Thrombozythämie (ET), Primäre Myelofibrose (Osteomyelofibrose/-sklerose) (PMF, OMF, OMS), Chronische Neutrophilenleukämie (CNL), Chronische Eosinophilenleukämie (CEL), Hypereosinophiles Syndrom (HES), Mastzellleukämie (MCD), unklassifizierbare Myeloproliferative Neoplasien ¹⁹³. Typisch sind Blutbildveränderungen sowie eine Hepato- und Splenomegalie. Bisherige therapeutische Ansätze sind -mit Ausnahme der allogenen Blutstammzell-transplantation, die jedoch nur für wenige Patienten in Frage kommt- nicht kurativ

und zielen lediglich auf die Kontrolle der Blutbildparameter und damit auf eine Symptomkontrolle ab ¹¹⁰.

Es konnte gezeigt werden, dass der JAK-STAT *Pathway* für die Pathogenese insbesondere von Polycythaemia vera, der essentieller Thrombozythämie und der idiopathischen Myelofibrose von großer Bedeutung ist. Hierbei zeigte sich, dass mehr als 90% der Patienten mit Polycythaemia vera, und jeweils etwa 50% der Patienten mit essentieller Thrombozythämie oder idiopathischer Myelofibrose die JAK2V617F-Mutation tragen ¹¹¹. Die Tyrosinkinase JAK2 aktiviert den STAT *Pathway* und indiziert damit die Differenzierung und Ausreifung der Zellen. Daneben sind inzwischen weitere aktivierende Mutationen sowohl im JAK2-Gen (Exon 12 Mutationen, JAK2D620E) als auch im MPL-Gen (MPLW515-Mutationen), einem Proto-Onkogen, das eine Reihe von Zytokinrezeptoren kodiert, beschrieben. Auch für diese konnte ein pathogenetischer Zusammenhang mit myeloproliferativen Syndromen gezeigt werden ¹¹¹.

Die Rolle von STAT bei der Tumorgenese

In den vergangenen Jahren konnten diverse Mutationen von sowohl den STAT Proteinen selbst, als auch von denen am STAT *Pathway* beteiligten Rezeptoren (z. B. Erythropoietin Rezeptor [EpoR], Thrombopoietin Rezeptor [TpoR], gp130 Zytokinrezeptor oder Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor [G-CSFR]), hemmenden Proteinen (z. B. SOCS, PIAS) und Tyrosinkinasen (z. B. JAK1-3, TYK2) bei der Entstehung von Neoplasien identifiziert werden. Diese sind ausschlaggebend für die STAT Aktivierung und den Ablauf der Signaltransduktionskaskade. Störungen in diesem komplexen Zusammenspiel von aktivierenden und hemmenden Faktoren sind eindeutig mit einer Fehlsteuerung der Zelle verbunden, die je nach Ausprägung zu Apoptose, gestörtem Wachstum oder auch zu einer klonaler Expansion maligner Zellverbände führen kann.

So konnte ein Zusammenhang zwischen Mutationen in der DNA Bindungsdomäne von STAT1 und dem Mamma Karzinom hergestellt werden. Ferner ist der Transkriptionsfaktor an der Pathogenese colorektaler Karzinome ebenfalls beteiligt^{175,181}.

STAT3 wird beispielsweise durch Bindung an den gp130 Rezeptor aktiviert. Mäuse mit homozygotem knock-in für gp130 Y757F ((Y757F/Y757F) Mäuse), einer Mutation des gp130 Rezeptors, die zur Hyperaktivität von STAT3 führte, entwickelten eine Splenomegalie, überschießende Akute-Phase-Reaktionen der Leber und zahlreiche Adenome im Antrum des Magens. Diese Pathologien bildeten sich in gp130 (Y757F/Y757F) STAT3^{+/-} Mäusen vollständig zurück, was die Rolle von STAT3 bei der Bildung von Neoplasien unterstreicht⁸⁷.

Auch die SOCS Proteine als negative Regulatoren der STAT Aktivierung spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Neoplasien. So konnten *Melzner et al.* eine Mutation in beiden, die SOCS1 Box codierenden Allelen bei dem primären mediastinalen B-Zell Lymphom nachweisen. Diese Zellen zeigten ein erhöhtes Level von aktivierter JAK2¹²⁹. Mutationen von SOCS1 konnten auch im Hodgkin Lymphom nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine nukleäre Akkumulation von STAT5²⁰⁶.

Wie bereits vorangehend beschrieben, ist die Tyrosinkinase JAK2 maßgeblich an der Pathogenese myeloproliferativer Erkrankungen wie beispielsweise der Polycythaemia vera oder der essentiellen Thrombozythämie beteiligt. Studien konnten zeigen, dass auch die Entstehung anderer maligner hämatopoetischer Erkrankungen an die Dysfunktion dieser Tyrosinkinasenfamilie gekoppelt ist. Die Arbeitsgruppe um *Walters* entdeckte, dass verschiedene Mutationen der Tyrosinkinase JAK3 erheblich an der Pathogenese der Akuten Megakaryoblastenleukämie (AML-M7) beteiligt sind¹⁹⁹. Eine Deletion im JAK2 Gen spielt eine entscheidende Rolle bei der Akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und eine Mutation von JAK1 konnte bei dem Leiomyosarkom des Uterus gefunden werden. **Tab.1** stellt die Mutationen und Erkrankungen nochmals zusammen.

Tabelle 1: JAK Mutationen und daraus entstehende Krankheitsbilder

Tyrosinkinase	Mutation	Erkrankung	Referenz
JAK2	V617F	Myeloproliferative Neoplasien	^{110,111}
	T875N	Akute Megakaryoblastenleukämie	¹³⁰
	Deletion von IREED, (Position 682-686)	Akute lymphatische Leukämie	¹²⁰
JAK3	A572V	Akute Megakaryoblastenleukämie	¹⁹⁹
	V722I	Akute Megakaryoblastenleukämie	
	P132T	Akute Megakaryoblastenleukämie	
JAK1	G871E (inaktivierend)	Leiomyosarkom Uterus	⁷⁴

Die Rolle des STAT *Pathways* bei der Entstehung von Neoplasien und den Immunsystemdefektsyndromen bestätigt abermals die Bedeutung der zellulären Signaltransduktionskaskaden und die Auswirkungen dieser auf das Leben des Individuums.

Bislang liegen jedoch keine Daten über die Aktivierung von STAT1 und STAT3 in polytraumatisierten Patienten vor. In Anbetracht der Folgen, die eine Fehlfunktion dieser Mediatoren mit sich bringt, ist es von größter Wichtigkeit die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren in solch einem Patientengut zu ermitteln.

2. ZIELSETZUNG

In den vergangenen Jahren ist es gelungen mittels verbesserter Fahrzeugtechniken, verkürzten Rettungszeiten und verbesserten Primärversorgungskonzepten, sowie standardisiertem Schockraum-Management und kontinuierlich optimierter intensivmedizinischer Behandlung, etc. die frühe Mortalität nach schwerem Polytrauma zu senken^{88,159}. Immer weniger Patienten versterben somit an den direkten Traumafolgen. Im weiteren Verlauf jedoch versterben noch immer bis zu 30 % an den Folgen eines posttraumatischen MOF. Somit stellt dieses immunologische Phänomen die schwerwiegendste Komplikation nach Polytrauma dar.

In diesem Zusammenhang haben verschiedene Autoren versucht, jene Faktoren und Mechanismen zu identifizieren, die den Organismus dazu bewegen, seine eigenen, von dem initialen Trauma nicht betroffenen Organe zu zerstören.

Jüngste Veröffentlichungen geben starke Hinweise darauf, dass der gefürchteten Ausbildung einer posttraumatischen Immunsystemdysfunktion mit konsekutivem Organversagen die Fehlfunktion immunkompetenter Zellen (Monozyten, Granulozyten) vorausgeht. Ferner sind intrazelluläre Netzwerke zahlreicher pro- und antiinflammatorischer Mediatoren, die in komplexen Verkettungen miteinander interagieren, daran beteiligt. Die intrazellulären Steuerungsmechanismen, die diese Fehlfunktion induzieren und regulieren, sind bislang jedoch weitgehend unerforscht. Zahlreiche Studien belegen, dass insbesondere Zytokine und ihre Signaltransduktionskaskaden an der Immunantwort beteiligt sind^{94,108,113,121}. Deren initiiierende Steuerung ist jedoch weitgehend unbekannt. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Transkriptionsfaktoren, da diese über die Expression von Reporter- und Effektorgenen entscheiden und sowohl hemmende als auch aktivierende Effekte ausüben können. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf die Bedeutung der STAT Proteine in Inflamationsreaktionen hin^{18,178,185}. Eine vorausgegangene Pilotstudie an einem Kollektiv Traumapatienten konnte mittels eines genomweiten Microarray Screenings die signifikante Veränderung des Transkriptionsfaktors durch den Stimulus „Trauma“

nachweisen²¹. Bislang liegen jedoch noch keine Daten über die Aktivierung von STAT1 und STAT3 in immunkompetenten Zellen polytraumatisierter Patienten vor. Kenntnisse dieser Aktivität wären jedoch klinisch von essentieller Bedeutung für das Verständnis der posttraumatischen Immunreaktion und für die Entwicklung potentieller innovativer Therapiestrategien⁷⁷.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die DNA-Bindungsaktivität dieser Transkriptionsfaktoren in Monozyten und Granulozyten von schwerst verletzten Patienten in der initialen Phase nach Polytrauma, d.h. unmittelbar nach Aufnahme im Schockraum innerhalb von 90min nach Trauma, sowie standardisiert zum Traumazeitpunkt nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h zu analysieren.

Im Detail wurden dabei folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wie verhält sich die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in den Zellen der angeborenen Immunabwehr (Monozyten und PMN-Granulozyten) von gesunden Probanden, sowohl nativ als auch nach artifizieller Stimulation mittels bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS aus E.coli)?
2. Lässt sich die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) nachweisen, und wie verhält sich deren Dynamik innerhalb der frühen posttraumatischen Phase bis 72 Stunden nach Trauma?
3. Lassen sich dabei Ergebnisse der transkriptionalen Aktivität von STAT1 und STAT3 mit dem klinischen Verlauf, der Verletzungsschwere, sowie dem Überleben der Patienten und der Anzahl der erhaltenen Blutkonserven in Verbindung setzen?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Vorbemerkung:

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von 03/2004 bis 08/2006 an der Chirurgische Klinik und Poliklinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Genehmigung dieser prospektiven Studie erfolgte durch die lokale Ethikkommission (AZ: 012/00). Die Arbeit wurde durch die örtliche Stiftung Förderer der Forschung und Lehre (FOEFOLE 117) der Ludwig-Maximilians-Universität München unterstützt, sowie das Forschungsprojekt SFB 469 der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

3.2 Patienten

In diese Studie wurden polytraumatisierte Patienten eingeschlossen, die innerhalb der ersten 90 min nach Unfallereignis den Schockraum unseres universitären Trauma Level I Centers erreichten. Ein weiteres Einschlusskriterium war ein *New Injury Severity Score* (NISS) von mindestens 16 Punkten.

Ausgeschlossen wurden Patienten, die aufgrund langer Bergungszeiten oder Rettungswege das vorgegebene Zeitfenster von 90 min überschritten. Ebenso ausgeschlossen wurden Patienten, deren Zustand bei Eintreffen in der Klinik als so kritisch zu bewerten war, dass selbst durch die kardiozirkulatorisch relativ unbelastende Maßnahme einer Blutentnahme eine möglich negative Auswirkung auf den weiteren Verlauf nicht ausgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus wurden, entsprechend den Vorgaben der Ethikkommission, Strafgefangene, Schwangere und Kinder nicht in die Studie miteinbezogen.

Eine schriftliche Einverständniserklärung entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission lag von allen Patienten nach Wiedererlangung des Bewusstseins, oder falls nicht möglich, von gesetzlichen Vertretern oder nahen Verwandten, vor.

3.3 Blutprobengewinnung

Die Blutprobengewinnung erfolgte standardisiert bei Aufnahme des Patienten im Schockraum (innerhalb der ersten 90min nach Trauma), sowie zum Traumazeitpunkt nach 6, 12, 24, 48 und nach 72 Stunden auf der chirurgischen Intensivstation oder im Operationssaal (siehe **Abb.4**).

Für die hier dargelegte Studie wurden 30ml EDTA Blut benötigt.

Abb.4: Blutabnahmezeitpunkte nach Polytrauma

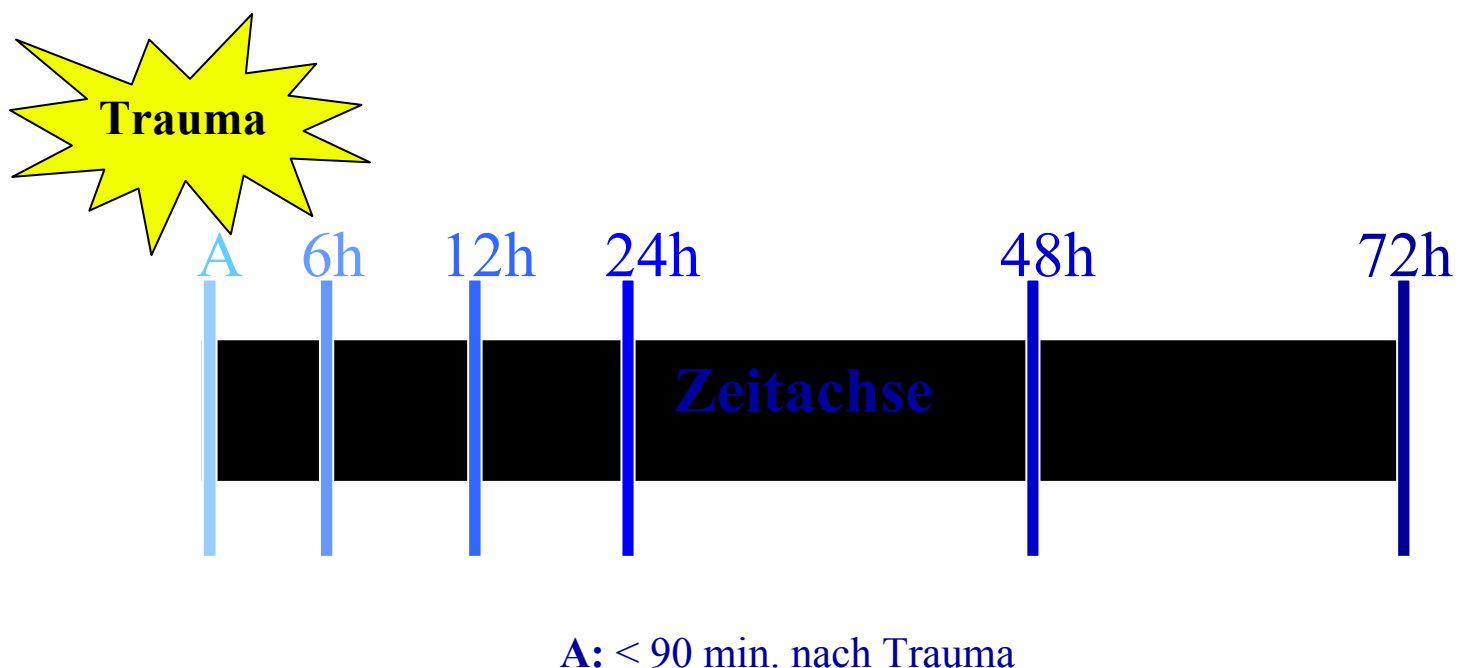


Abb.4: Diese Grafik zeigt die Blutabnahmezeitpunkte nach Unfallereignis. Hierbei steht [A] für die initiale Abnahme innerhalb 90 min nach Trauma noch im Schockraum. Die folgenden Blutprobengewinnungen wurden standardisiert zum Traumazeitpunkt nach 6,12,24,48 und 72 Stunden durchgeführt.

3.4 Zellisolation

3.4.1 Verarbeitung

Das gewonnene EDTA Blut wurde mit einem Erythrozyten Lysepuffer (155mM NH_4CL ; 10mM KHCO_3 ; 0,1mM EDTA; pH 7,2) 10 Minuten inkubiert, dann bei 450g und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend wurden die Überstände verworfen und die Pellets mit 5ml

PBS-Puffer (*phosphat buffered saline*) (2,7mM KCL; 137mM NaCL; 0,01M Phosphatpuffer, pH7,4; 2ml 500mM EDTA; pH 7,4) resuspendiert und mit dem selben Programm erneut zentrifugiert. Der 0,1 M Phosphatpuffer setzt sich zusammen aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 , wobei man 800ml 0,1 M Na_2HPO_4 vorlegt und dieses dann mit NaH_2PO_4 bis auf einen pH von 7,4 titriert.

Wiederum wurden die Überstände verworfen und die Pellets mit 500 μl PBS-Puffer resuspendiert. Das Volumen der gesamten Suspension wurde bestimmt, und es erfolgte die Zellzählung mithilfe einer 1:1000 Verdünnung. Dazu wurde eine Neubauer-Zählkammer mit der materialspezifischen Höhe von 2,5 verwendet. Dabei wurden jeweils beidseits 4 Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert notiert. Aus dieser Zellzahl errechnete sich die Gesamtzellzahl. Hier einmal beispielhaft dargestellt:

Tab.2: Errechnung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Verdünnung:	1:1000
Volumen	800 μl
Gezählte Zellen (MW beider Gesichtsfelder)	125 links / 140 rechts $\rightarrow$ MW = 137,5
Zellen pro μl der Suspension	MW Zellzahl $\times$ Verdünnungsfaktor $\times$ Zählkammerquotient (2,5) $137,5 \times 1000 \times 2,5 = 3,375 \times 10^5 / \mu\text{l}$
Gesamtzellzahl in der Suspension	Zellen pro μl $\times$ gemessenes Volumen $3,375 \times 10^5 / \mu\text{l} \times 800 \mu\text{l} = 2,75 \times 10^8$

Tab.2 ist ein Beispiel für eine Gesamtzellzahl $>1,5 \times 10^8$ Zellen. Die Zellisolation wurde nach den Angaben der Firma durchgeführt.

3.4.2 Isolationsprinzip

Periphere Blutzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifische Antigene. Monozyten typischerweise CD14 und Granulozyten CD15¹⁹⁷. Durch Zugabe von CD14 bzw. CD15 MicroBeads kommt es zu einer magnetischen Antikörpermarkierung. Die Separation der

markierten Zellen von den unmarkierten erfolgt in einem Magnetfeld (MACS[®] MultiStand) mittels eines magnetischen Separators (MiniMACS[™] Separator, MidiMACS[™] Separator) und einer darin eingeklemmten Separationssäule (MACS[®] MS Columns, MACS[®] LS Columns). In dieser werden die magnetisch markierten Zellen festgehalten und können nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld herausgespült werden.

3.4.3 Monozytenisolation

Die errechneten Suspensions-, MicroBeads- und PBS-Volumina wurden vermischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension mit PBS-Puffer auf 15ml aufgefüllt, und es erfolgt eine erneute 10 minütige Zentrifugation bei 450g und anschließend Verwerfen des Überstandes. Danach wurden die Pellets mit 1000µl PBS-Puffer resuspendiert. Davon wurde die Hälfte auf die mit 500µl PBS befeuchtete Säule (MACS[®] MS Columns) gegeben. Danach wurde die Säule dreimal mit jeweils 500µl PBS gespült und anschließend aus dem Magnetfeld genommen, sodass die darin haftenden Monozyten mit 2X 1000µl PBS-Puffer in ein Falcon gespült werden konnten. Bei mehr als 1×10^8 Zellen wurde dies mit zwei Separation Columns durchgeführt, da eine Säule nur Kapazitäten für 1×10^7 magnetisch markierte Zellen aufweist.

3.4.4 Granulozytenisolation

Zu der Zellsuspension, die bei der Monozytenisolation als Rest entstanden ist, wurden CD15 MicroBeads dazugegeben und das Gemisch 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Auffüllung des Falcons mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 15ml und Zentrifugation bei 450g für 10 Minuten. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet mit 1000µl PBS resuspendiert. Die Hälfte der Suspension wurde auf die vorher mit 500µl PBS befeuchtete Säule (MACS[®] LS Columns) gegeben. Nach dreimaliger Spülung mit jeweils 3ml PBS konnte die Säule aus dem Magnetfeld genommen werden und die Granulozyten wurden mit

2X5ml PBS rausgespült. Bei mehr als 1×10^8 Zellen wurde dies mit zwei Separation Columns durchgeführt, da eine Säule nur Kapazitäten für knapp 1×10^8 magnetisch markierte Zellen aufweist.

Zellisoliationspräparate: *MACS Magnetic Cell Sorting of Human Leukocytes* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)

3.4.5 Zellzahl

Mithilfe einer PBS-Verdünnung wurde die Zellzahl der Monozyten und Granulozyten bestimmt. Hierbei zeigte sich in Voruntersuchungen (Daten nicht gezeigt) eine 1:10 Verdünnung für die Monozyten sowie eine 1:100 Verdünnung für die Granulozyten als besonders geeignet. Es wurde wieder die Neubauer-Zählkammer benutzt und der Mittelwert aus den beiden Auszählungen genommen (zwei Felder zu je 4 Gesichtsfelder).

3.5 Trennung von nukleärem und zytosolischem Protein

Die gewonnenen Monozyten- und Granulozytenlösungen wurden dann 10 Minuten bei 450g und 20°C zentrifugiert, und die Überstände verworfen. Es erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten auf Eis mit 250µl Puffer B, wodurch eine Lyse der Zellmembranen herbeigeführt wurde. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 1400 rpm. Der dabei sichtbar werdende Überstand entspricht der freigesetzten zytosolischen Fraktion der lysierten Zellen. In einem folgenden Schritt wurde diese Fraktion, jeweils monozytär und granulozytär, von dem nukleären Extrakt getrennt und in ein Eppendorf Reaktionsgefäße auf Eis gestellt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, um eine höhere Ausbeute zu erhalten, bzw. um die Reinheit der Isolation zu verbessern. Das cytosolische Extrakt weist eine flüssige Konsistenz auf während das nukleäre Extrakt eher zähflüssig ist. Nach erfolgter Trennung wurde das zytosolische Extrakt bei -80 Grad eingefroren. Die verbleibenden Pellets wurden mit eiskaltem Lysepuffer C resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und

anschließend 15 Minuten kräftig geschüttelt. Dies führte über eine chemische und mechanische Lyse der Kernmembranen zur Freisetzung von nukleärem Protein. Das nukleäre Protein der Monozyten und Granulozyten wurde ebenfalls in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -80° eingefroren.

Die Effizienz der Lyse konnte anhand von Ausstrichpräparaten mikroskopisch kontrolliert werden. Waren hierbei noch intakte Kernmembranen sichtbar, wurden die chemischen und mechanischen Lysevorgänge wiederholt, und das Ergebnis wurde erneut mittels Mikroskop kontrolliert.

Die für die Proteinextraktion verwendeten Lysepuffer enthalten:

Puffer B: 10ml Puffer A, 10µl 10mM DTT, 40µl 1mM PMSF, 100µl PIC, 40µl 0,4%NP40 auf 10ml H₂O

Puffer C: 10ml 20mM HEPES pH 7,9; 8ml 0,4M NaCl; 0,2ml 1mM EDTA

Puffer A: 5ml 10mM HEPES pH 7,9; 1ml 10mM KCL; 10 ml 0,1 mM EDTA, mit H₂O bidest auf 100ml auffüllen.

PIC: 2 ml Antipain (10 mg in 2 ml H₂O); 0,8 ml Aprotinin (10 mg in 0,8 ml H₂O); 0,8ml Leupeptin (10 mg in 0,8 ml MeOea); 125µl Pepstatin (2 mg in 250 µl MeOH); 1.5 ml Bestatin (20mg in 2 ml MeOH); 2 ml Phosphoramidon (10 mg in 2,5 ml MeOea); 2 ml Trypsin Inhibitor (50 mg in 10 ml 50% MeOH)

Wie bereits in der Literatur vorbeschrieben^{21,23}.

3.6 Validierungen

Als Vergleichsgruppen dienten gesunde Normalprobanden, deren Geschlecht und Alter in etwa mit den eingeschlossenen Patienten übereinstimmte. Ihnen wurden ebenfalls 30ml EDTA Blut abgenommen. Die Zellisolation erfolgte nach demselben Isolationsprotokoll. Dabei wurden pro Proband mindestens drei Blutproben gewonnen, und die Ergebnisse dieser Daten als Mittelwert aus allen drei Messungen ermittelt. Diese Nativproben dienten als

Negativkontrolle um die Dynamik der transkriptionalen Aktivitätsänderung nach Trauma gegenüber der Ausgangsaktivität zu verdeutlichen.

3.6.1 Stimulation

Um eine Aussage über die Ausprägung und den Schweregrad der Veränderung transkriptionaler Aktivität von STAT nach einem schweren Polytrauma treffen zu können, benötigt man außer der nativen Kontrollgruppe noch eine positive Kontrollgruppe. Hierfür erfolgte die Inkubation der Zellen mittels bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS aus E.coli, Sigma), wie bereits mehrfach in der Literatur vorbeschrieben^{69,178}. Deshalb wurden zusätzlich zu den Nativkontrollen weitere 30 ml EDTA Blut von denselben Normalprobanden mit 10%igem LPS (1mg pro ml) für 3h lang unter stetigem Drehen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zellisolation nach oben beschriebenem Protokoll. Auch hierbei wurden Mehrfachmessungen (n=3) durchgeführt und jeweils die Mittelwerte (MW±SEM) bestimmt.

3.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Mithilfe des Eppendorf BioPhotometers (Eppendorf, Deutschland) erfolgte die Proteinbestimmung anhand einer BSA-Standardkurve. Absorptionsmessungen wurden bei 260, 280 und 320 nm durchgeführt. Zur Gewinnung der BSA Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von 2mg/ml BSA mit 1.953µg/ml BSA als Konzentration mit der höchsten Verdünnung angefertigt^{27,62}. Aus der entstehenden Standardparabel wurde die Gleichung $X = (Y + 0,0021) / 0,0007$ abgeleitet, wobei X für die Proteinkonzentration in µg/ml und Y für die gemessene Extinktion stehen. Mithilfe dieser konnten die Proteinkonzentrationen bestimmt werden^{27,61,62}. Zur Extinktionsbestimmung wurden Verdünnungen von den einzelnen Proteingemischen mit Puffer C (nukleär) oder Puffer B (cytosol) von 1:50 oder 1:10 angefertigt, die bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt

wurden. Für jede Messung wurde eine neue Eppendorf Küvette (Eppendorf, Deutschland) verwendet um Verunreinigungen zu vermeiden.

3.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Trauma induzierte Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren führt zur Phosphorylierung und Translokation der *Signal Transducer And Activator of Transcription* (STAT) Proteine. Im Zellkern binden diese aktivierten Transkriptionsfaktoren an die DNA und induzieren dadurch die Transkription diverser Reportergene.

Mittels EMSA kann die Aktivierung von STAT durch dessen Bindung an sequenzspezifische DNA-Bindungsstellen untersucht werden: Die Proteinlysate wurden zusammen mit einem P₃₂- radioaktiv markierten Oligonukleotid (DNA-Sonde) aus einer konservierten, für STAT1 bzw. STAT3 spezifischen Promotorsequenz inkubiert. Befindet sich aktives STAT3/1 im Proteinextrakt so bilden sich DNA-Proteinkomplexe mit dem Oligonukleotid. Um Proteine abzufangen, die unspezifisch an die DNA binden wurde ein *Poly-[dIdC]* (Polydesoxyinosindesoxycytidinsäure, Roche, Mannheim) hinzugefügt. Bei der anschließenden Auftrennung mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese unter nativen, nicht-denaturierenden Bedingungen haben die DNA-Proteinkomplexe ein höheres Molekulargewicht als die freie Sonde und laufen deshalb langsamer im Gel. Sie bilden eine retardierte Bande, welche autoradiographisch visualisiert wird.

3.8.1 Etablierungsversuche

Zunächst erfolgten Versuchsreihen mittels Proben freiwilliger Probanden zur Protokolletablierung. Dafür wurde nukleäres Protein (0,5 – 8 µg) der Probanden in aufsteigender Reihenfolge des EMSA-Verfahrens gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Kontrollreihen wurden in verschiedenen Konzentrationen der zugehörigen Substanzen, bei verschiedener Temperatur, sowie zu verschiedenen Inkubationszeiten getestet. Anhand von

Probandenproben wurde das Verfahren etabliert, wobei sich das Optimum bei 4µg nukleärem Protein nachweisen ließ. Auf der Grundlage dieser Versuchsreihe erfolgte im Anschluss die Analyse der Polytraumaproben nach standardisiertem Protokoll.

3.8.2 Radioaktive Markierung des Oligonukleotids

Es wurden folgende doppelsträngige Oligonukleotide einer für STAT1/3 spezifischen Konsensussequenz verwendet^{20,53,89,103}:

(Santa Cruz Biotechnology, USA)

Die core Sequenz ist jeweils hervorgehoben.

SIE sense: 5' -- GTG CAT **TTC CCG TAA** ATC TTG TCT ACA -- 3'
 antisense: 3' -- CAC GTA **AAG GGC ATT** TAG AAC AGA TGT -- 5'

STAT3 sense: 5' -- GAT CC **T TCT GGG AAT TCC** TAG ATC -- 3'
 antisense: 3' -- CTA GGA **AGA CCC TTA** AGG ATC TAG -- 5'

STAT1 sense: 5' -- CAT GTT ATG CAT **ATT CCT GTA AGT** G -- 3'
 antisense: 3' -- GTA CAA TAC GTA **TAA GGA CAT TCA** C-- 5'

STAT1 und STAT3 interagieren miteinander und bilden vor der Translokation in den Zellkern gemeinsame Komplexe, so genannte Homo-oder Heterodimere. Um die DNA-Bindungsaktivität der heterogeneren Komplexe, wie beispielsweise einem STAT1/STAT3 Heterodimer, detektieren zu können, eignet sich das *sis-inducible element* (SIE Oligonukleotid), da STAT1 und STAT3 nachgewiesenerweise mit gleich starker Affinität an diese bestimmte DNA Sequenz binden¹⁴⁴.

Um gezielt nur die Aktivität der spezifischen homogenen STAT1- oder STAT3- DNA-Komplexe zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die oben genannten STAT3 bzw. STAT1 Oligonukleotide verwendet.

Die doppelsträngigen Oligonukleotide der konsensuellen Oligonukleotidsequenz wurden mit Hilfe von Polynukleotid-T₄-Kinase, in T₄-Polynukleotid-10x Puffer (Promega, Mannheim)

am 5'-Ende einer radioaktiven Phosphorylierungsreaktion unterzogen. Der Markierungsansatz enthielt 39µl Tris-EDTA Puffer pH 8,0, 5µl H₂O bidest, 1µl 10X Polynukleotidkinase Puffer (Promega, Mannheim), 1µl Polynukleotidkinase T₄, 2µl STAT1/3 spezifisches Oligonukleotid und 2µl radioaktives γ -(³²P)-dATP (~50000 cpm) (HWZ: 14,3d, Hartmann Analytik, Braunschweig, Deutschland).

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

10X TE-Puffer pH 8,0: Es wurden 100mM Tris-CL und 10mM EDTA pH 8,0 vorgelegt und mit konzentrierter Salzsäure bis zum gewünschten pH titriert. Diese Methode wurde bereits mehrfach von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt ^{23,144}.

3.8.3 Kontrollen

Um die Validität der Methodik zu überprüfen, wurden standardisiert in jedem Testansatz Positiv-, Negativkontrollen, sowie Kompetitionen mittels spezifischer und unspezifischer Oligonukleotide mit Hilfe kommerzieller, synthetischer Komponenten durchgeführt.

Die Positivkontrolle enthielt 5µl H₂O bidest, 2µl Binding5XBuffer, 2µl Sonde und 2µl HelaNuclear Extrakt (Promega, München). Dabei diente der HelaNuclear Extrakt als synthetisch hergestellter Proteinersatz. Die Negativkontrolle enthielt nur 7µl H₂O bidest, 2µl Binding5XBuffer und 2µl Sonde, sodass für die Sonde kein komplementäres Protein zur Verfügung stand, und folglich keine Bande entstehen konnte. Für die spezifische Kompetition wurden 4µl H₂O bidest, 2µl Binding5XBuffer, 2µl HelaNuclear Extrakt (Promega, München) sowie 1µl der ungelabelten, nachzuweisenden konsensuellen STAT1- bzw. STAT3-Oligonukleotide für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurden 2µl Sonde zugefügt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei erfolgt die Komplexbildung zwischen Protein und dem unmarkierten Oligonukleotid, sodass keine Bande entstehen kann.

Für die unspezifische Kompetition wurden 2µl Binding5XBuffer, 2µl HelaNuclear Extrakt (Promega, München), sowie 1µl unspezifischer Oligonukleotide, z. B. *AP-2* (Promega, Mannheim, Deutschland) (sense: 5'- GAT CGA ACT GAC CGC CCG CGG CCC GT-3', antisense: 3' – CTA GCT TGA CTG GCC GGC GCC GGG CA – 5') mit 4µl nukleasefreiem H₂O für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 1µl Sonde beigelegt und es erfolgte erneut eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Da das unspezifische Oligonukleotid nicht mit derselben DNA- Bindungsdomäne interagiert, bleibt die Komplexbildung unbeeinflusst (vgl. **Abb.5** page 44).

3.8.4 EMSA – Reaktionsgemisch

Zur Bildung der DNA-Protein-Komplexe wurde ein Reaktionsgemisch aus insgesamt 5µl Puffer C und 4µg nukleärem Protein jeweils monozytär und granulozytär mit 2µl H₂O bidest, 2µl Binding5XBuffer und 2µl Sonde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 15µl eines Bromphenolfarbstoffes (1/3 Bromphenolblau; 1/3 TBE – Puffer; 1/3 Glycerin; mit H₂O auf 10 ml auffüllen)

Hinzugelegt, und die Proben in die Taschen eines 4%igen Polyacrylamidgels pipettiert.

Der Binding 5X Buffer setzt sich zusammen aus:

5X Precursor	500 µl
H ₂ O	250 µl
Poly(dI-dC)	250 µl

Precursor pH 7,5

40% Glycerin	20 ml
10mM MgCL ₂	102 mg
5mM EDTA	93 mg
500mM NaCL	1,46 g
100mM Tris HCL	788 mg
a.d. 50 ml H ₂ O	

Zur Herstellung dieses Gels wurden 26 ml H₂O vorgelegt und unter ständigem Rühren 7,5ml 5XTBE, 4ml 38%iges Acrylamid, 225µl 10%iges frisches Ammoniumperoxodisulfat (APS, Sigma, Taufkirchen) als Radikalstarter sowie 37,5µl Tetramethyldiamin (TEMED, Sigma,

Taufkirchen) als Radikalstabilisator hinzugegeben ¹⁴⁷. Vor der Probenzugabe wurde das Gel eine halbe Stunde lang bei 100V in der Gelkammer (peqLab) aktiviert. Als Kammerpuffer diente 0,5XTBE. Die Proben wurden schließlich bei 135V eine Stunde lang aufgetrennt bis die freien Oligonukleotide, sichtbar als blaue Bromphenolbande den Boden des Gels erreicht hatten, um eine möglichst gute Auftrennung zu erzielen. Das Gel wurde anschließend auf 3MM Whatman-Papier (Schubert & Weiss, München) für 45 bis 60 Minuten bei 80°C vakuumgetrocknet (Bio-Rad, München) und in einer Röntgenkassette (Amersham, Braunschweig) mit einem Röntgenfilm (Kodak, BioMax) bei -20°C für 24h exponiert.

3.8.5 Filmverarbeitung

Die Röntgenfilme wurden nach genau 24h entwickelt (Maschine: Kodak) und eingescannt (hp psc 1210). Mittels Adobe Photoshop (Adobe Photo Deluxe, Edition 3.0) erfolgte die densitometrische Auswertung. Dabei wurden von den gewonnenen Banden die unterschiedlichen Flächen markiert, und deren Pixelanzahl bestimmt. Die so gewonnenen quantitativen Pixel wurden als [Arbitrary Units] gezählt und als MW±SEM dargestellt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Sigma Plot 8.0 (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA).

3.9 Klinische Daten

Das klinische Management der Patienten erfolgte während dieser Studie sowohl prä- als auch innerklinisch nach den derzeit gültigen Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) ¹². Die klinischen Daten wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten der Blutabnahmen erfasst. Hierbei wurden die Initialdaten der Patienten dem standardisiert angefertigten Schockraumprotokoll ¹⁴¹ und dem Notarztbericht entnommen. Die weiteren Daten entstammen den Intensivbögen, OP- Protokollen, Anästhesieberichten, Radiologiebefundungen, etc..

Erfasst wurden insbesondere Parameter, die benötigt wurden, um für jeden Patienten sowohl MOF als auch NISS- Score berechnen zu können. Dies waren insbesondere Vitalparameter, sowie serologische und hämatologische Parameter und Beatmungsparameter. Diese werden in den folgenden Kapiteln zur Berechnung der klinischen Scores noch einmal näher erläutert. Des Weiteren wurden Geschlecht, Alter, das 90-Tage-Überleben auf der Intensivstation, sowie die Dauer der Beatmung notiert.

3.10 Score Berechnungen

3.10.1 Der MOF Score

Der modifizierte MOF Score dient der Einteilung der Patienten hinsichtlich ihrer funktionellen Verletzungsschwere. Dies bietet eine Möglichkeit, das posttraumatische Organversagen quantitativ zu erfassen. Somit wurden zu jedem Blutabnahmezeitpunkt zusätzlich die Parameter zur Berechnung des MOF Scores nach *Goris* in der Modifikation nach *Lefering* dokumentiert ¹⁰⁹. In ihn fließen die vitalen Funktionen der Organe Lunge, Herz/Kreislauf, Leber, Niere und Blut ein, wobei Einzelpunktzahlen von 0 bis 2 Punkten für das jeweilige Organsystem vergeben werden. 0 Punkte bedeuten eine uneingeschränkte bzw. nur minimal eingeschränkte Funktion, 2. Punkte stehen für ein Organversagen. Die genaue Berechnung ist in **Tab.3** näher erläutert.

Tab.3: Daten zur Berechnung des MOF Scores.

Organsystem	Organdysfunktion 1 Punkt	Organversagen 2 Punkte
Pulmonal	PEEP $\leq$ 10 und FiO ₂ $\leq$ 0,4	PEEP $>$ 10 und FiO ₂ $>$ 0,4
kardiozirkulatorisch	BP _{syst} $\geq$ 100mmHg, Dopamin als Sedierung	BP _{syst} $<$ 100mmHg, Suprarenin, Noradrenalin als Sedierung
Renal	Serumkreatinin $\geq$ 2mg/dl ($\geq$ 150 μ mol/l)	Dialyse
Hepat.	GOT $\geq$ 25 units/l	GOT $\geq$ 50 units/l
	Billirubin $\geq$ 2mg/dl($\geq$ 34 μ mol/l)	Billirubin $\geq$ 6mg/dl($\geq$ 100 μ mol/l)
Blut	Leukozyten $\geq$ 30000	
	Thrombozyten $\leq$ 50000	Leukozyten $\geq$ 60000 oder $\leq$ 2500

Tab.3: Mit dem modifizierten MOF Score kann das posttraumatische Organversagen quantitativ erfasst werden. Die einzelnen Organsysteme werden je nach Funktionseinschränkung jeweils mit 0 bis 2 Punkten versehen, und die Summe aller Punkte ergibt den MOF Score. 0 Punkte bedeuten eine uneingeschränkte bzw. nur minimal eingeschränkte Funktion.

3.10.2 Der Injury Severity Score, ISS

Der *Injury Severity Score* (ISS) ist eine Einteilung des Verletzten hinsichtlich der anatomischen Verletzungsschwere. Bei der klassischen ISS Berechnung nach *Greenspan*⁶⁸ wird der Patient in 6 Körperregionen eingeteilt (1. Hals/Kopf, 2. Gesicht, 3. Thorax, 4. Abdomen/innere Organe, 5. Extremitäten und Becken, 6. „External“). Für jede Verletzung gibt es einen vorgegebenen Punktwert, der sich auf einer Skala zwischen 1 (unwesentliche Verletzung) und 5 (maximal kritische Verletzung mit geringer Überlebenswahrscheinlichkeit) befindet. Der Wert, der jeweils höchstdotierten Verletzung aus den drei schwerst verletzten Regionen wird potenziert, und die Summe aus den dreien ergibt den ISS. Dieser Scorewert stellt eine seit vielen Jahren etablierte Methode dar, um die Traumaschwere zu klassifizieren und erlaubt Aussagen über voraussichtliche Mortalität und Morbidität¹⁸⁷.

Die Dokumentation erfolgt im Folgenden anhand des *New Injury Severity Score* (NISS) in der Modifikation nach *Osler*¹⁵¹. Der NISS ist eine überarbeitete Version des ISS und berücksichtigt im Vergleich zum klassischen ISS die drei schwersten Verletzungen

ungeachtet der betroffenen Körperregion. Die anatomische Verletzungsschwere wird somit weitaus realistischer betrachtet ^{11,72}.

3.11 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als [Arbitrary Units, AU] gemäß ihrem Mittelwert (MW) $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Sämtliche statistischen Analysen wurden unter Verwendung des Software Pakets Sigma Stat TM, Version 3.0 (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels ANOVA on Ranks gefolgt vom Student-Newman-Keuls (SNK) oder vom Kruskal-Wallis test und dem Mann-Whitney U test(rank-sum test) auf statistische Unterschiede überprüft. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Patientenkollektiv

Insgesamt konnten 26 polytraumatisierte Patienten in diese Studie eingeschlossen werden. Das Alter reichte von 18 bis 71 Jahren, das mittlere Alter lag bei $41,5 \pm 2,6$ (MW $\pm$ SEM). 16 Patienten waren männlichen und 10 weiblichen Geschlechts.

Eingeschlossen wurden alle Patienten mit einem NISS > 16 Punkten, die innerhalb der ersten 90 Minuten nach Unfallgeschehen die Klinik erreichten. Hierbei lag das mittlere Zeitintervall zwischen Unfall und initialer Blutabnahme bei $80,4 \pm 6,6$ min.

Es handelte sich meist um Hochrasanztraumen auf Landstrasse/Autobahn mit PKW und Motorrad oder um Kollisionen von Fahrradfahrer/Fußgänger mit PKW oder LKW. Der posttraumatische Verlauf wurde mittels MOF Score¹⁰⁹ beschrieben. 8 Patienten, 5 Frauen und 3 Männer, erlagen den Folgen des Traumas innerhalb der ersten 90 Tage.

4.2 Schweregrad der Verletzungen

Untenstehende Tabelle führt die Patienten im Einzelnen mit zugehörigem Verletzungsmuster, Alter, erhaltenen Transfusionen während des 72 stündigen Blutabnahmezeitraumes und *New Injury Severity Score* auf.

Tabelle 4: Verletzungsmuster des Patientenkollektivs mit zugehörigem NISS und erhaltenen Blutprodukten

PT Nummer	Geschlecht	Alter	Verletzungsmuster	NISS	EK	FFP	TK
PT 1	M	34	Intrakranielles und subdurales Hämatom bilateral, Lungenkontusion, Hämatopneumothorax bds., A.iliaca Ruptur, retroperitoneales Hämatom, Organquetschungen, Skapulafraktur, Beckenfrakturen, multiple Extremitätentrümmerfrakturen	57	53	65	11
PT 2	W	39	Skalpierungsverletzung, multiple HWK und BWK Frakturen, Lungenkontusionen bds., Augenverletzung	50	9	18	2
PT 3	W	32	Intrakranielles und subdurales Hämatom, Lungenkontusion, Pneumothorax, Rippenserienfraktur, Nasenfraktur, Milzriss, multiple Beckenfrakturen, multiple Weichteilschäden	66	6	10	0
PT 4	W	63	Multiple Extremitätentrümmerfrakturen, offen, Femoralvenenabriss	27	14	15	8
PT 5	M	62	Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Milzruptur, intraabdominelle Blutungen, Darmquetschungen, Femurfraktur	27	9	12	3
PT 6	M	45	Thoraxtrauma, Amputationsverletzung untere Extremität, dislozierte Femurfraktur	19	30	20	5
PT 7	M	51	Epidurales- und subarachnoidales Hämatom, Schädelfraktur, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, LWK Frakturen, Skapulafraktur	29	9	4	2
PT 8	W	48	Gehirnödem, Dens Axis Fraktur, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Zwerchfellriss, Nierenriss mit Gefäßstielabriss, Milzruptur, multiple Beckenfrakturen, multiple LWK Frakturen	57	32	35	4
PT 9	M	40	subdurales Hämatom, Le Fort II Fraktur, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, multiple Beckenfrakturen, Tibiafraktur	50	18	13	0

PT Nummer	Geschlecht	Alter	Verletzungsmuster	NISS	EK	FFP	TK
PT 10	W	25	Epidurales Hämatom, SAB, Schädelbasisfraktur, HWK Fraktur, N. opticus Einklemmung, Rippenserienfraktur, Lungenkontusion, Pneumothorax, Pankreasquetschung, Milzruptur, Frakturen an den oberen Extremitäten, Beckenfrakturen	57	9	20	3
PT 11	M	57	intracerebrales Hämatom frontotemporal, Gesichtsschädelfrakturen, Rippenserienfraktur, Hämatothorax, Sternumfraktur, Ileumdevaskularisation, Femur- und Tibiafraktur	57	29	38	7
PT 12	W	51	Subdurales Hämatom, SAB, Rippenserienfraktur, Hämatopneumothorax, Leberriß, Hochspannungsverbrennung	57	17	12	0
PT 13	M	39	Rippenserienfraktur, LWK Fraktur, Amputation Unterschenkel	17	23	22	6
PT 14	W	42	SAB, Gehirnödem, subdurales Hämatom, Nasenseptumfraktur, Radius- und Ulna Trümmerfraktur	41	5	10	2
PT 15	M	40	HWK Fraktur, multiple LWK Frakturen, dislozierte, fragmentierte Scham- und Sitzbeinfrakturen, Pilonfraktur, OSG-und Talusfraktur	41	2	2	0
PT 16	W	71	Beckenfraktur, retroperitoneales Hämatom, Femurfraktur, massivste Weichteilverletzungen an Extremitäten	29	28	29	6
PT 17	M	18	Schädelkontusion mit Mittellinienverlagerung, subdurales Hämatom, Lungenkontusion bds., Klavikulafraktur	48	6	18	1
PT 18	M	32	Spannungspneumothorax, Lungeneinriß, Femur-und offene Tibiafraktur	43	9	11	1
PT 19	W	51	SHT II°, SAB, cerebrales Ödem, Hämatopneumothorax, Femurfraktur offen bds.	50	15	18	0
PT 20	M	49	Rippenserienfraktur, Hämatopneumothorax, Lungenkontusion, Unterschenkelamputation unterhalb des Knies, Femurfraktur	33	38	35	8
PT 21	M	32	Orbitafraktur, A. posterior Verschluss, Pneumothorax, Mesenteriumverletzungen, Aortendissektion Leberruptur >3Segmente, Sigmaruptur, Femur-und Tibiafraktur	48	58	85	10

PT Nummer	Geschlecht	Alter	Verletzungsmuster	NISS	EK	FFP	TK
PT 22	W	28	Rippenserienfraktur, Pneumothorax, Vaginalquetschung, offene Femurfraktur, Beckenfraktur mit retroperitonealem Hämatom, Decollement beider Oberschenkel und Becken	34	39	42	7
PT 23	M	39	Rippenserienfraktur, Pneumothorax, subkapsuläres Milzhämatom, subkapitale Humerusfraktur	24	2	0	0
PT 24	M	33	Rippenserienfraktur, Lungenkontusion, Mesenteriariss, Humerusfraktur, offene Tibiafraktur	34	13	9	2
PT 25	M	37	Rippenfraktur, Milzruptur, A.Mesenterica Ruptur, Urethraabriss, V.iliaca Ruptur, open book Fraktur, Femur Trümmerfraktur, Radiusluxation	50	44	42	5
PT 26	M	23	Schädelkontusion frontal, Lungenkontusion, Pneumothorax, multiple BWK Frakturen	24	1	0	0

4.3 MOF

Der MOF Score wurde zu jedem Blutabnahmezeitpunkt neu bestimmt. Die objektive Bestimmung eines Multiorganversagens wurde bei >4Punkten festgelegt. Eine Übersicht der Patienten mit den MOF Scores zu jedem Abnahmezeitpunkt, sowie das *outcome* innerhalb von 90 Tagen nach Traumaereignis sind in **Tab.5** dargestellt.

Tabelle 5: MOF Score und Mortalität

PT Nummer	A	6h	12h	24h	48h	72h	verstorben
PT 1	3	4	7	6	5	6	nein
PT 2	5	6	4	5	5	4	nein
PT 3	6	5	5	5	5	5	nein
PT 4	4	5	6	8	5	5	ja
PT 5	1	6	5	5	4	4	nein
PT 6	4	5	5	5	5	5	nein
PT 7							nein
PT 8	6	6	6	5	5	†	Ja
PT 9	6	6	5	5	†	†	Ja
PT 10	4	6	5	5	5	5	Nein
PT 11	6	7	8	8	6	6	Nein
PT 12	3	6	5	5	5	3	Ja
PT 13	4	4	3	3	5	5	Nein
PT 14	2	4	5	3	3	3	Nein
PT 15	5	4	5	5	4	2	Nein
PT 16	6	8	8	3	†	†	Ja
PT 17	5	7	7	5	4	3	Nein

PT Nummer	A	6h	12h	24h	48h	72h	verstorben
PT 18	2	4	6	5	5	5	Nein
PT 19	5	3	5	4	5	†	Ja
PT 20	4	4	6	6	6	6	Ja
PT 21	6	7	7	7	6	6	Ja
PT 22	6	6	7	7	5	5	Nein
PT 23	4	5	5	5	6	4	Nein
PT 24	5	5	7	5	6	6	Nein
PT 25	6	6	7	5	5	5	Nein
PT 26	4	6	6	5	5	5	Nein

Tab.5: Überblick über die Patienten mit entsprechenden MOF Werten zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten sowie deren outcome innerhalb von 90 Tagen posttraumatisch. Polytrauma Nr.7 konnte bei dieser Einteilung nicht miteinbezogen werden, da die klinischen Daten nur fragmentär vorhanden waren, und eine Scoreberechnung nicht komplett möglich war.

4.4 Zellisolation und Proteininvalidierung

Aus den 30ml entnommenem EDTA-Vollblut wurden, wie bereits im Material und Methoden Teil beschrieben, die Monozyten und Granulozyten isoliert. Daraus wiederum erfolgte die Separation des zytosolischen und nukleären Proteins. Zur Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität mittels EMSA diente der nukleäre Extrakt. Zur Festlegung der eingesetzten Proteinmenge wurden diverse Validierungsversuche durchgeführt. Untenstehendes Bild zeigt ein EMSA Film mit verschiedenen Mengen an Protein. Die eingesetzte Menge Protein wurde anhand dieses Ergebnisses auf 4 µg festgelegt.

Abb.5: Ergebnis des Validierungsversuchs zur Proteinmengenbestimmung

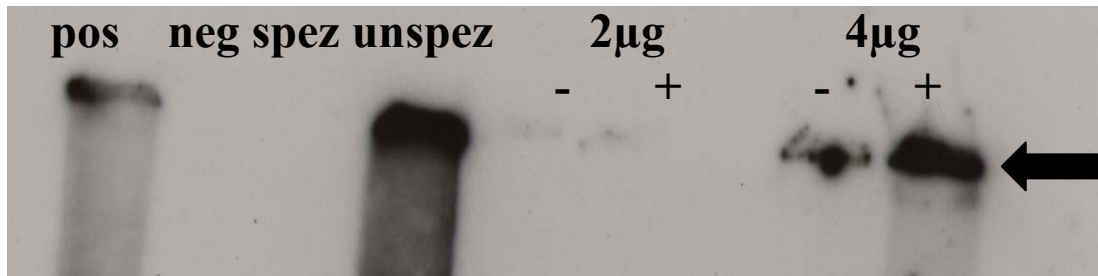


Abb.5: Validierungsversuch zur Detektion der idealen Proteinmenge, die, wie deutlich zu erkennen ist, bei 4µg eingesetztem Protein lag (→). Standardisiert wurden bei jedem Versuch die auf der linken Hälfte des Gels abgebildeten Kontrollen durchgeführt. Dies sind im Einzelnen (von links nach rechts) die Positiv- und Negativkontrolle, sowie die spezifische Konkurrenz und die unspezifische Konkurrenz (siehe auch Kapitel 3.8.3.). Die Validierungsversuche wurden jeweils mit nativen (-) Proben und mit LPS stimulierten (+) Proben durchgeführt.

4.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Die Auswertung der EMSA Ergebnisse ermöglichte eine sehr anschauliche Darstellung der Dynamik dieser Transkriptionsfaktoren innerhalb der frühen posttraumatischen Phase. Des Weiteren wurde die transkriptionale Aktivität der Patienten mit der des Kontrollkollektivs verglichen. So konnte eine Aussage über die Quantität des Stimulus Trauma zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten gemacht werden. Schließlich erfolgte noch die Untersuchung auf Unterschiede im Traumakollektiv bei Einteilungen nach anatomischer und funktioneller Verletzungsschwere, *outcome* und Massentransfusion.

Alle Ergebnisse sind in [Arbitrary Units] gemäß Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Sie sind im Folgenden immer zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten bestimmt, wobei „A“ für die Initialabnahme bei Aufnahme steht. Bei dem Kollektiv der Normalprobanden gilt: KO+ ist die mit LPS stimulierte Positivkontrolle und KO- die Nativkontrolle.

Die EMSA-Bilder wurden alle standardisiert 24h lang belichtet. Danach erfolgte das Einscannen und die quantitative Auswertung mittels Computer gestützter Pixelzählung.

4.6 Kontrollkollektiv

Als Kontrollen dienten 6 freiwillige junge Probanden, 3 weibliche und 3 männliche, die sich aus freien Stücken zur Blutabnahme bereit erklärten. Alle Probanden waren gesund und hatten kein Trauma erlitten. Blutabnahmen erfolgten mindestens dreimal, sodass die Ergebnisse den Mittelwerten aus den drei Messungen entsprechen.

Zusätzlich zu den Nativuntersuchungen erfolgte eine 4 stündige Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), gewonnen aus E.coli Bakterien, (siehe Material und Methoden Teil). Zahlreiche Untersuchungen in der Vergangenheit haben aufgezeigt, dass LPS ein maximaler Stimulus für das Immunsystem ist ^{69,178}.

Abb.6 zeigt exemplarisch der EMSA Film zweier Kontrollprobanden sowohl nativ, als auch nach 4-stündiger LPS Stimulation. Ebenso mit auf dem Bild sind die Negativ- und Positivkontrolle, die bereits in Abschnitt 3.8.3 ausführlich besprochen wurden.

Die stimulierten Proben weisen im Gegensatz zu den nativen deutlich stärkere Banden auf, was hier mit zwei Pfeilen gekennzeichnet ist.

Abb.6: Darstellung der stimulierten und unstimulierten Kontrollen

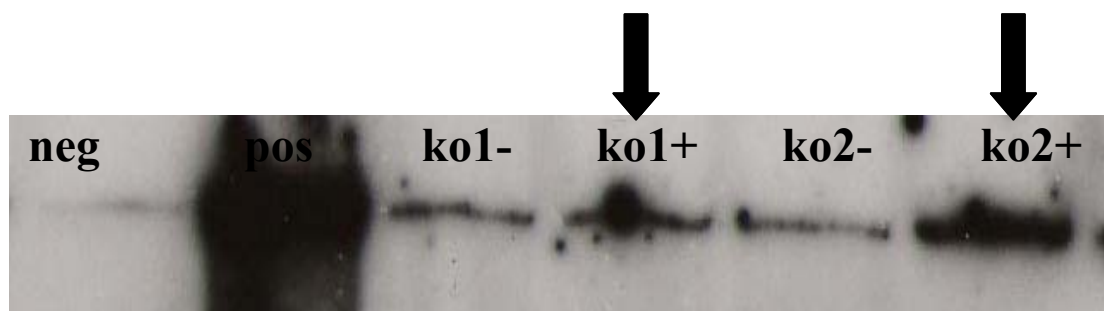


Abb.6: Dies ist beispielhaft der EMSA Film von 2 Kontrollprobanden (ko1 und ko2). Man kann deutlich erkennen, dass die Stimulation mittels LPS (ko1+ bzw. ko2+) stärker geschwärzte Banden hervorruft (→) als die nativen (ko1- bzw. ko2-) Proben. Ebenfalls wieder mit abgebildet sind die Negativ- und die Positivkontrollen (siehe Abschnitt 3.8.3)

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung mittels densitometrischer Vermessung der Schwärzung des Röntgenfilms sind in den folgenden Graphen dargestellt.

Untenstehende Graphik zeigt die Auswertung der Kontrollprobanden in Monozyten und Granulozyten sowohl nativ als auch stimuliert. In **Tabelle 6** sind die Ergebnisse der Computer gestützten quantitativen Pixelauswertung.

Abb.7: STAT3 und STAT1 Aktivität in Monozyten von Normalprobanden

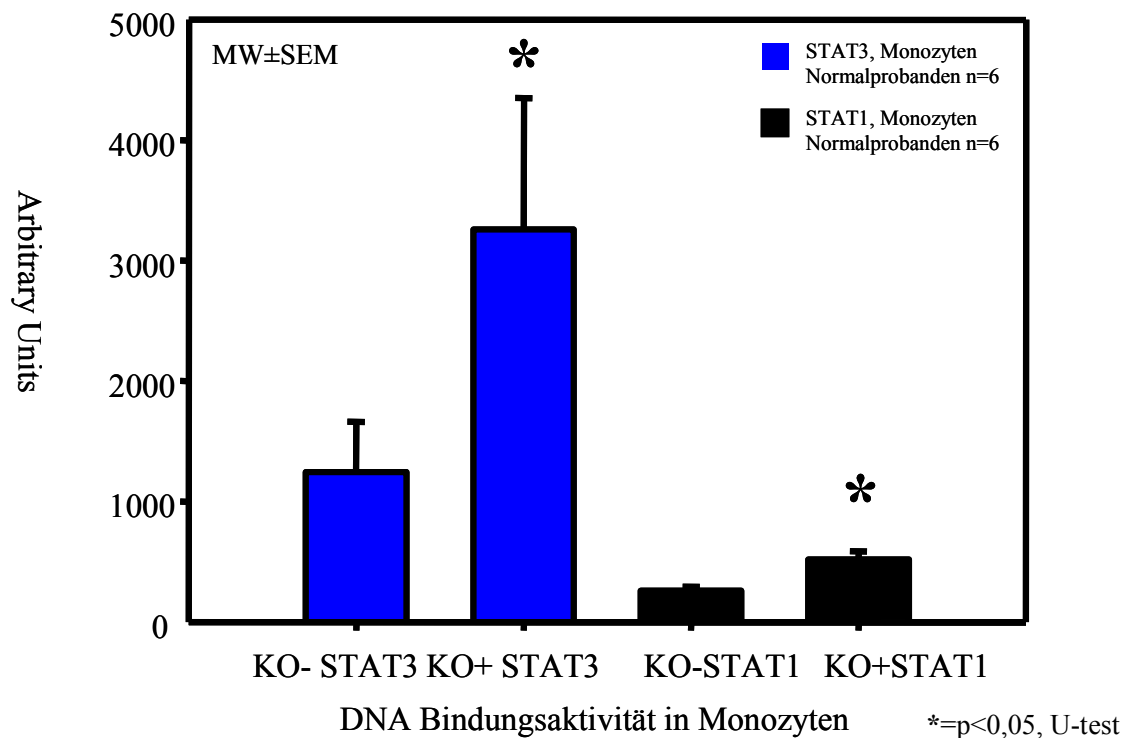


Abb.7: Dies ist die graphische Darstellung der STAT3 bzw. STAT1 DNA Bindungsaktivität in Monozyten von Normalprobanden(KO), jeweils nativ (KO-), als auch LPS stimuliert (KO+). Man kann deutlich erkennen, dass die Aktivität der Transkriptionsfaktoren nach Stimulation deutlich zunimmt. Sowohl bei STAT3 als auch bei STAT1 waren dieser Unterschied signifikant (*=p<0,05 Mann-Whitney U test, KO-STAT1 vs. KO+STAT1 und KO-STAT3 vs. KO+STAT3). Auf der Y-Achse sind die Ergebnisse in [Arbitrary Units] gemäß MW±SEM angegeben.

Abb.8: STAT3 und STAT1 Aktivität in Granulozyten von Normalprobanden

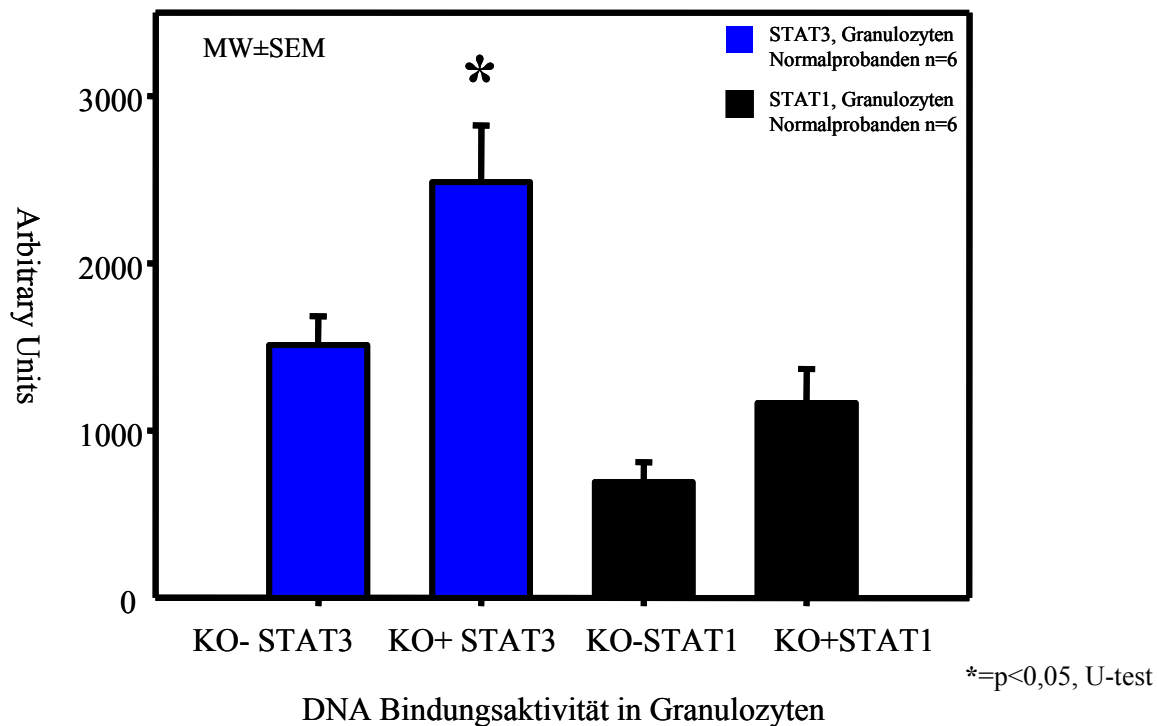


Abb.8: Diese Graphik zeigt die STAT3 bzw. STAT1 DNA Bindungsaktivität in Granulozyten von Normalprobanden (KO). Auch hier einmal nativ (KO-), als auch LPS stimuliert (KO+). Man kann auch bei den Granulozyten deutlich erkennen, dass die Aktivität der Transkriptionsfaktoren nach Stimulation deutlich zunimmt. Dieser Aktivitätsunterschied war bei STAT3 signifikant (*=p<0,05 Mann-Whitney U test, KO-STAT3 vs. KO+STAT3). Auf der Ordinate sind die Ergebnisse in [Arbitrary Units] gemäß MW±SEM angegeben.

Tab.6: densitometrische Auswertung der STAT3 und STAT1 Aktivität in den Normalprobanden

Arbitrary Units AU Probanden n=6	nativ		LPS	
	STAT1	STAT3	STAT1	STAT3
Monozyten	259±34	1243±420	517±70*	3258±1094*
Granulozyten	692±120	1511±174	1164±204	2485±340 *

*=p<0,05 in U-test nativ vs. LPS

Aus **Abb.8** geht hervor, dass die LPS Stimulation in beiden Zellpopulationen eine signifikante Erhöhung der nukleären STAT Translokation gegenüber der Nativkontrolle bewirkt.

Lediglich bei STAT1 in den Granulozyten konnte keine Signifikanz verzeichnet werden. Die korrespondierenden Daten zu den Graphen sind in **Tab.6** dargestellt.

4.7 STAT1 Aktivität in Monozyten polytraumatisierter Patienten

4.7.1 STAT1 Aktivität in Monozyten anhand des Gesamtkollektivs

Zur Veranschaulichung ist hier der EMSA Film eines polytraumatisierten Patienten abgebildet. Deutlich darauf zu erkennen sind die Positivkontrolle zur Kontrolle der Methode, sowie die Banden zu allen Abnahmezeitpunkten. **Abb.9** zeigt exemplarisch, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors nach 48 und 72 Stunden höher ist im Vergleich zur Aufnahme (→).

Abb.9: Exemplarischer EMSA Film eines Patienten

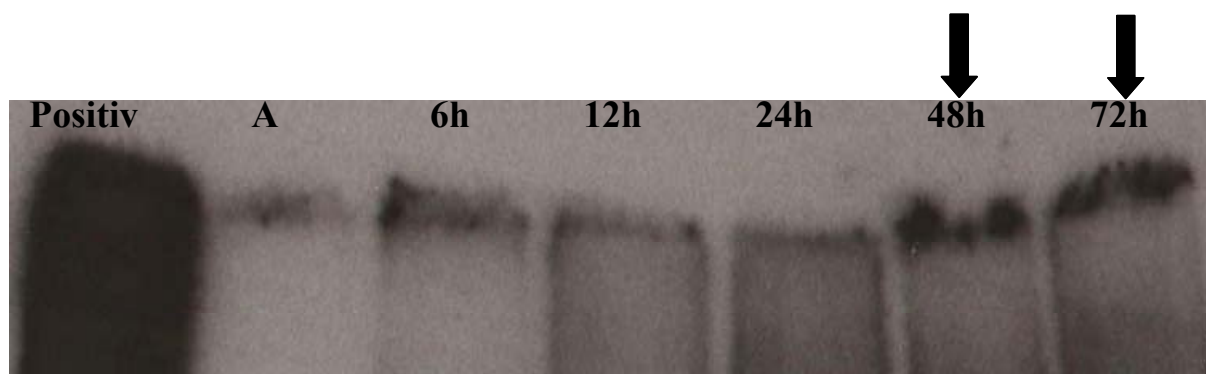


Abb.9: Dies ist exemplarisch der EMSA Film eines polytraumatisierten Patienten. Man kann deutlich eine stärkere Bandenschwärzung nach 48 und 72 Stunden (siehe →) erkennen, was die gesteigerte Aktivität von STAT1 zu diesen Zeitpunkten ausdrückt. Links auf dem Gel ist die Positivkontrolle abgebildet und daneben die Blutabnahmezeitpunkte A (bei Aufnahme), sowie zum Traumazeitpunkt nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h.

Von den abgebildeten Banden wurden die unterschiedlichen Flächen markiert, und deren Pixelanzahl bestimmt. Diese wurden als [Arbitrary Units] gezählt und als $MW \pm SEM$ dargestellt (**Tab.7**). Die unten abgebildete Graphik (**Abb.10**) zeigt die quantitative Auswertung.

Tab. 7: densitometrische Auswertung der Bandenschwärzung

	KO-	A	6h	12h	24h	48h	72h
[AU] n=26	259±34	397±78	494±109	478±120	416±87	474±84	493±115

Tab. 7: Diese Tabelle zeigt das Ergebnis der densitometrischen Auswertung der Aktivität von STAT1 in Monozyten polytraumatisierter Patienten (n=26).

Die Translokation von STAT1 in das nukleäre Kompartiment der Monozyten fand sich im gesamten Beobachtungszeitraum signifikant erhöht gegenüber der Nicht-Stimulierten-Kontrolle.

Abb.10: STAT1 Aktivität in Monozyten polytraumatisierter Patienten

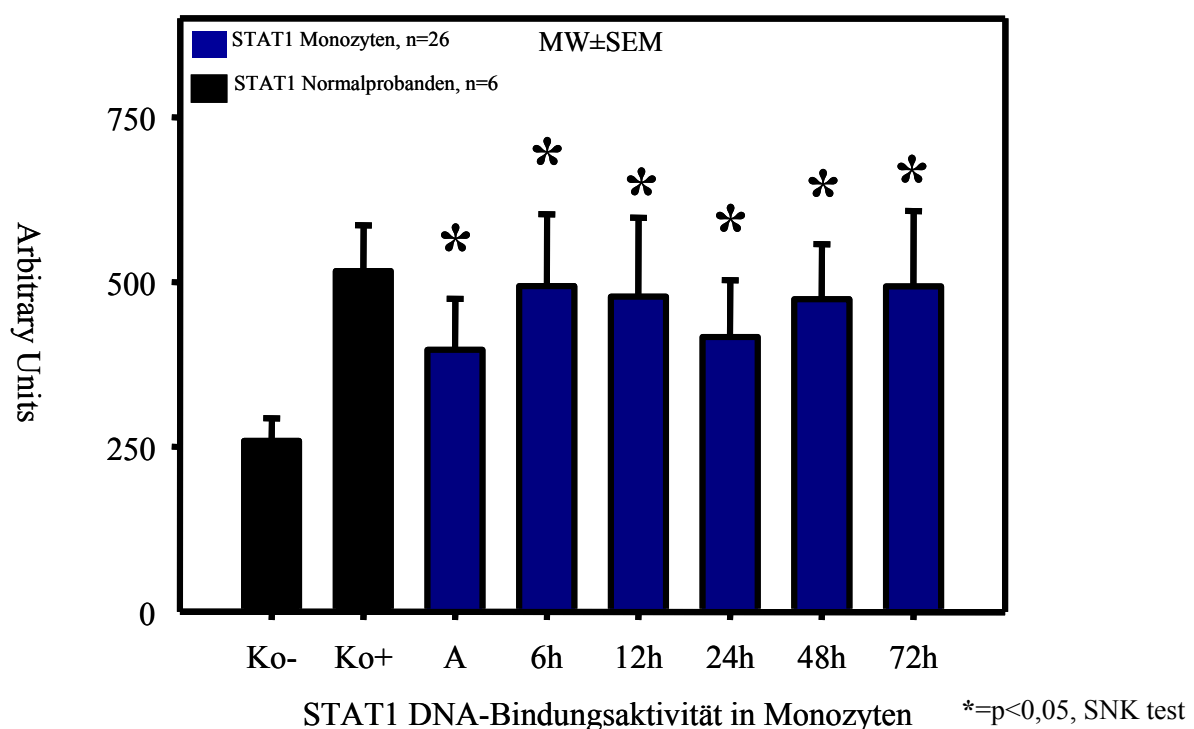


Abb. 10: Nukleäre Translokation von STAT1 in Monozyten des Gesamtkollektivs, sowie in den Normalprobanden nativ (KO-) und LPS stimuliert (KO+). Die STAT1 DNA-Bindungsaktivität war während des gesamten Beobachtungszeitraumes signifikant erhöht gegenüber der Nativkontrolle: *=p<0,05 im Student-Newman-Keuls (SNK) test, STAT1 A-72h vs. KO-.

4.7.2 Aktivität von STAT1 in Monozyten von Patienten: Patienten mit/ohne Massentransfusion

Diese Graphik veranschaulicht die STAT1 DNA-Bindungsaktivität in Patienten mit einem erhöhten Transfusionsbedarf in der Initialphase und in denen, die weniger Erythrozytenkonzentrate erhielten. Es ist klar erkennbar, dass eine Massentransfusion, festgelegt als >10 Erythrozytenkonzentrate in den ersten 24 Stunden, im gesamten Beobachtungszeitraum mit einer reduzierten Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 einhergeht.

Abb.11: Einteilung der Patienten hinsichtlich Massentransfusion

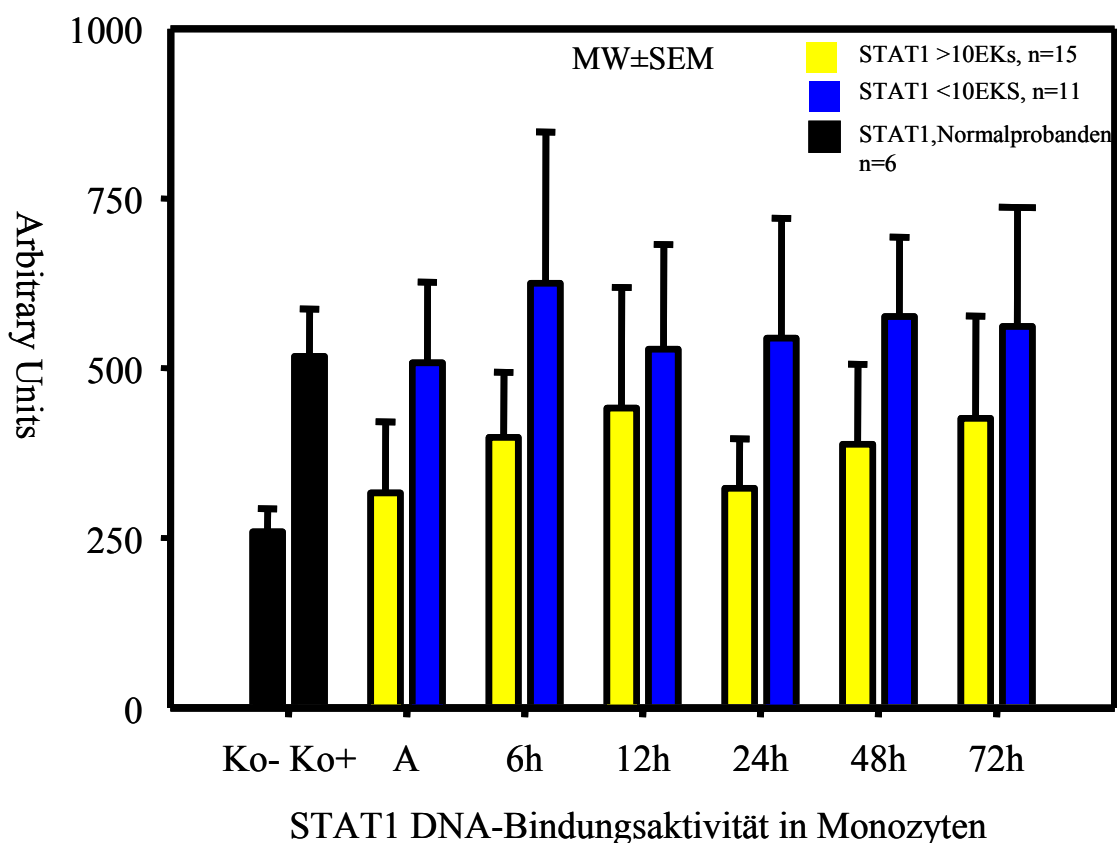


Abb.11: Diese Graphik zeigt die Einteilung des Patientenkollektivs nach dem Kriterium der Massentransfusion. Es ist deutlich zu erkennen, dass Patienten, die mehr als 10 Erythrozytenkonzentrate erhalten haben, während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine verminderte Aktivität von STAT1 in den Monozyten vorweisen. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Tab.8: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Monozyten:Einteilung nach Massentransfusion

[AU]						
Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
>10EKS/ 24 h	316±102	398±96	441±178	323±73	388±118	426±151
<10EKS/ 24 h	508±119	625±223	528±154	544±177	576±117	561±178

4.7.3 Aktivität von STAT1 in Monozyten von Patienten: Einteilung nach outcome

In der **Abb.12** ist die Einteilung der Patienten nach ihrem Überleben innerhalb von 90 Tagen post trauma dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass die verstorbenen Patienten eine reduzierte Aktivität von STAT1 während des gesamten Beobachtungszeitraumes aufweisen. Dieser Unterschied war zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Trauma signifikant.

Tab.9: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Monozyten: Einteilung nach outcome

[AU]						
Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
<i>überlebt</i>	466±451	594±150	612±164	495±119	523±108	517±136
<i>verstorben</i>	238±61	268±68	177±23*	241±52	327±71	387±183

*= p<0,05, Anova on Ranks; überlebt vs. verstorben

Abb.12: Einteilung der Patienten hinsichtlich ihres outcomes

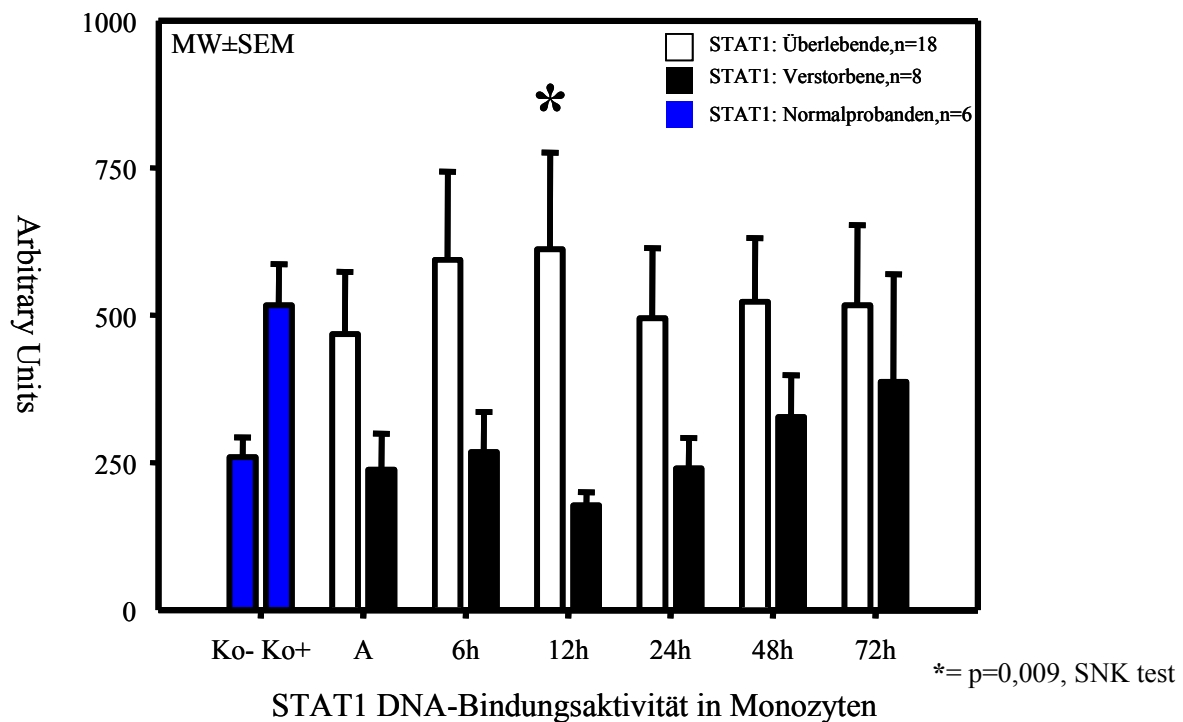


Abb.12: Diese Graphik zeigt die Aktivität von STAT1 in den Monozyten verstorbener Patienten im Vergleich zu der Aktivität von Patienten, die überlebt haben. Man kann deutlich erkennen, dass die Verstorbenen gegenüber den Überlebenden eine reduzierte DNA-Bindungsaktivität aufweisen. Dieser Unterschied war zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Traumaereignis signifikant (*= p= 0,009 im SNK test 12 h Überlebende vs. 12h Verstorbene)

4.7.4 Aktivität von STAT1 in Monozyten von Patienten: Einteilung nach NISS

Die **Abb.13** stellt die Auswertung des Patientenkollektivs nach anatomischer Verletzungsschwere, ausgedrückt mittels *New Injury Severity Score*, dar. Das Gesamtkollektiv wurde aufgeteilt in Patienten mit einem NISS größer 41 Punkten und Patienten mit niedrigeren Punktwerten. Hierbei war 41 der Median.

Dabei ist kein Unterschied zwischen den Patienten mit einem NISS>41 Punkten und denen mit einem kleineren Scorewert auszumachen. Die entsprechende densitometrische Auswertung der Bandenschwärze in Arbitrary Units [AU] ist in **Tab.10** abgebildet.

Abb.13: STAT1 in Monozyten: Einteilung der Patienten nach NISS

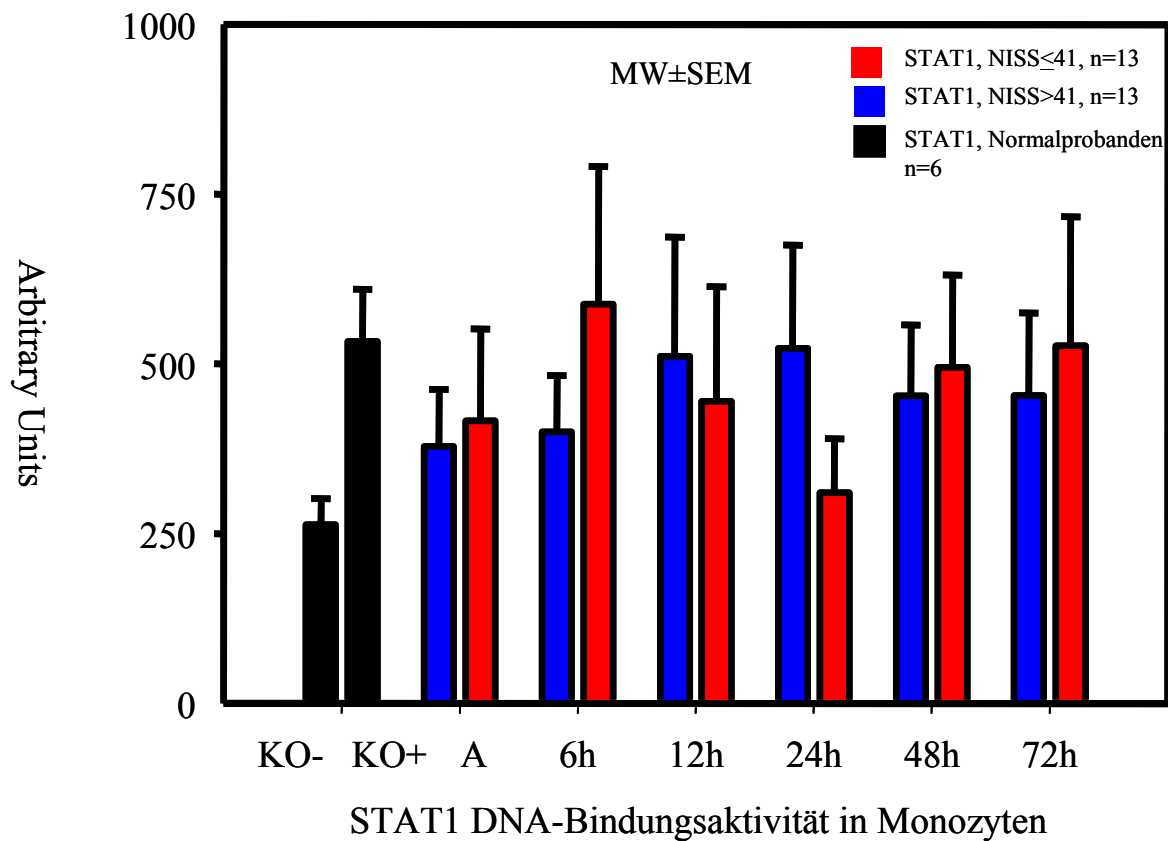


Abb.13: Diese Graphik zeigt die Aktivität von STAT1 in den Monozyten von Patienten mit einem NISS größer 41 im Vergleich zu der Aktivität von Patienten, die einen niedrigeren NISS aufwiesen. Hierbei konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden.

Tab.10: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Monozyten:Einteilung nach NISS

[AU]		A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=26							
NISS>41		378±83	340±83	511±176	523±151	453±104	453±121
NISS≤41		416±135	588±203	445±169	310±187	495±135	527±189

4.7.5 Aktivität von STAT1 in Monozyten von Patienten: Einteilung nach MOF

Die Einteilung der Patienten hinsichtlich ihrer MOF Werte ist graphisch in **Abb.14** dargestellt.

In **Tab. 11** finden sich die dazugehörigen Daten in Arbitrary Units gemäß Mittelwert und Standardabweichung. Es fanden sich in den Monozyten bei STAT1 keine wesentlichen Unterschiede in den beiden Patientensubgruppen.

Abb.14: STAT1 in Monozyten: Einteilung der Patienten nach MOF

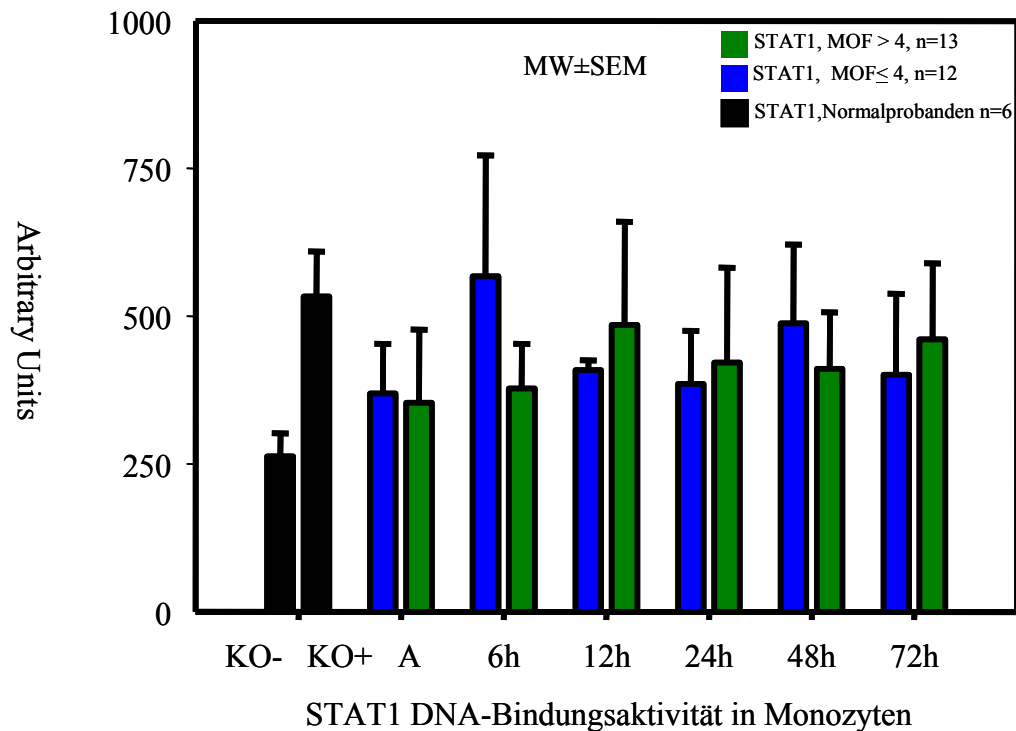


Abb.14: Diese Graphik zeigt die Einteilung der Patienten nach ihrem MOF Score. Hierbei konnte kein deutlicher Unterschied zwischen Patienten mit einem MOF Score größer 4 und denen mit einem MOF Score kleiner 4 Punkten festgestellt werden.

Tab:11: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Monozyten:Einteilung nach MOF

[AU] Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
MOF≤4	369±83	567±204	409±169	385±90	488±134	401±137
MOF>4	354±125	377±77	485±177	422±162	411±97	461±127

4.8 STAT3 Aktivität in Monozyten polytraumatisierter Patienten

4.8.1 STAT3 Aktivität in Monozyten anhand des Gesamtkollektivs

Abb.15 ist das Ergebnis eines EMSA Versuches mit Monozyten eines polytraumatisierten Patienten und einem STAT3 spezifischen Oligonukleotid. Wie gewünscht kann man deutliche Banden bei der Positiv- und der unspezifischen Kontrolle erkennen. Ferner fallen eindeutig schwächere Signale bei den Abnahmen 12 und 72 Stunden post trauma (siehe →) auf.

Abb.15: Exemplarischer EMSA Film zur Detektion der STAT3 Aktivität in Monozyten

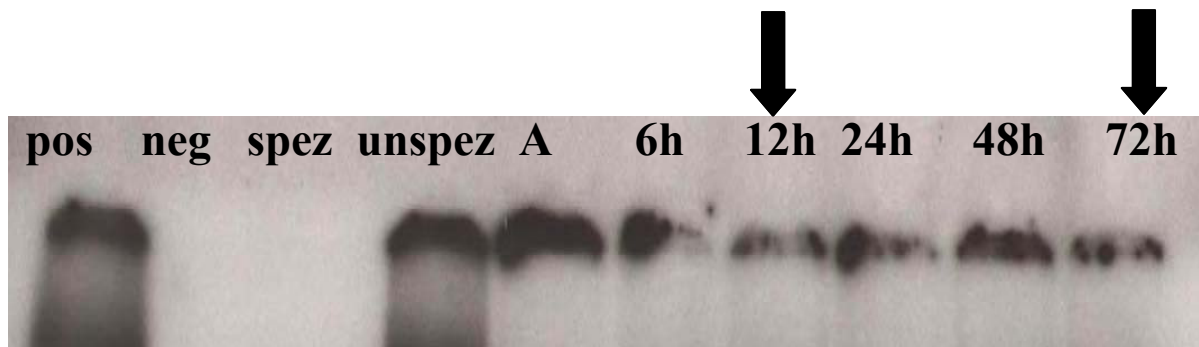


Abb. 15: Diese Abbildung zeigt exemplarisch den EMSA Film eines polytraumatisierten Patienten nach 24stündiger Belichtung. Deutlich zu erkennen sind die Signalintensitätsunterschiede anhand der schwächeren Bandenschwärzung bei 12 und 72h post trauma (siehe →) im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten der Probengewinnung. Ebenfalls mit abgebildet sind die Positiv- und Negativkontrolle, sowie die spezifische und unspezifische Kompetition.

Nach densitometrischer Auswertung dieses EMSA Films wurden die Ergebnisse (**Tab.12**) zur Veranschaulichung in eine Graphik übertragen. Diese ist in **Abb.16** abgebildet.

Tabelle 12: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Monozyten (n=26)

	KO-	A	6h	12h	24h	48h	72h
MW±SEM	1243±420	2640±447	2746±544	2513±462	2953±528	2846±484	2261±556

Wie bereits bei dem Transkriptionsfaktor STAT1 kann man deutlich den Aktivitätsunterschied zwischen der Nativkontrolle und dem Patientenergebnis erkennen.

Abb.16: STAT3 Aktivität in Monozyten polytraumatisierter Patienten

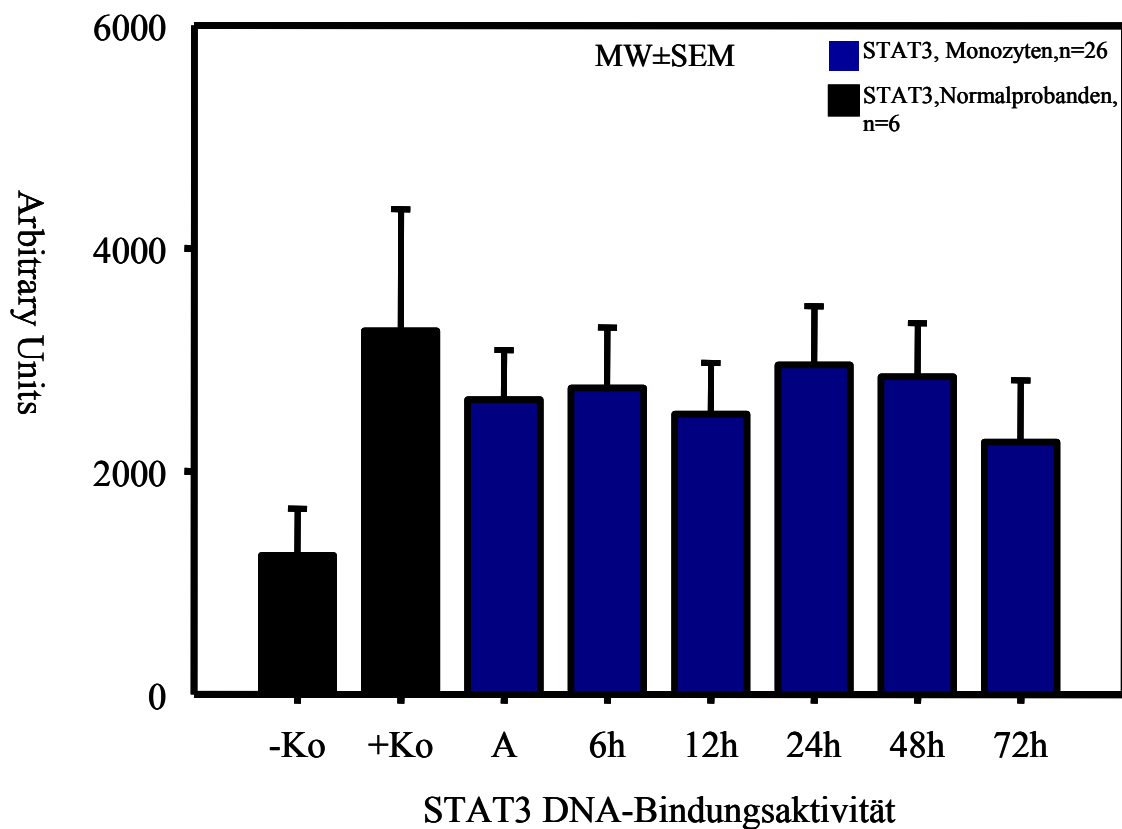


Abb.16: Diese Graphik stellt die nukleäre Translokation von STAT3 in den Monozyten des Gesamtkollektivs dar. Ebenfalls mit aufgeführt sind die Kontrollprobanden, nativ (-Ko) und LPS stimuliert (+Ko). Es ist klar zu erkennen, dass die Nativkontrolle die geringste Aktivität von STAT3 aufweist.

4.8.2 Aktivität von STAT3 in Monozyten von Patienten: Patienten mit/ohne Massentransfusion

Wie bereits bei dem Transkriptionsfaktor STAT1 kann man auch hier ein Aktivitätsunterschied des Transkriptionsfaktors zwischen massentransfunden Patienten und denen, die weniger Erythrozytenkonzentrate erhalten haben, erkennen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren jeweils gegeneinander von der Initialabnahme bis zum 48 Stunden Wert signifikant. In **Tab.13** sind nochmals die Auswertungen der Bandenschwärze dargestellt.

Abb.17: STAT3 in Monozyten:Einteilung der Patienten nach Massentransfusion

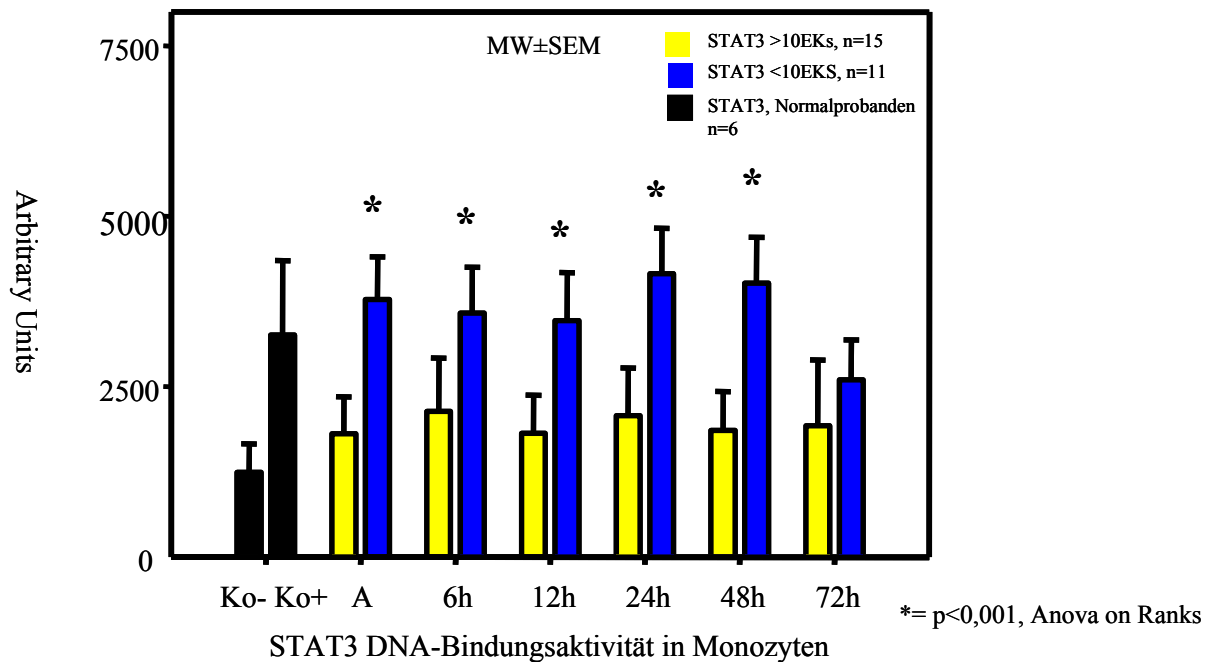


Abb.17: Diese Graphik zeigt die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 in Monozyten von Patienten, die mehr als 10 Erythrozytenkonzentrate während des Beobachtungszeitraumes erhalten haben und von denen, für die weniger Blutprodukte benötigt wurden. Bei diesem Vergleich zeigt sich die Aktivität von STAT3 bei den Massentransfundierte(n) beständig erniedrigt. Bis auf den Zeitpunkt 72 Stunden post trauma ist dieser Unterschied signifikant (*= $p<0,001$ im Anova on Ranks followed by Kruskal-Wallis test, >10EKs vs. <10EKs).

Tab.13: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Monozyten: Einteilung nach Massentransfusion

[AU] Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
>10EKs/ 24 h	1808±543	2135±783	1813±562	2073±703	1857±573	1924±966
<10EKs/ 24 h	3776±629*	3580±674*	3466±709*	4153±674*	4015±675*	2598±587

*= $p<0,001$ Anova on Ranks; <10EKs vs.>10EKs

4.8.3 Aktivität von STAT3 in Monozyten von Patienten: Einteilung nach *outcome*

Die Einteilung des Kollektivs nach dem *outcome*, innerhalb von 90 Tagen post trauma, zeigt deutlich, dass die verstorbenen Patienten eine wesentlich reduzierte STAT3 Aktivität

aufweisen. Der Unterschied zu den überlebenden Patienten war nach 6, 12, 24 und 48 Stunden signifikant.

Abb.18: STAT3 in Monozyten: Einteilung der Patienten nach *outcome*

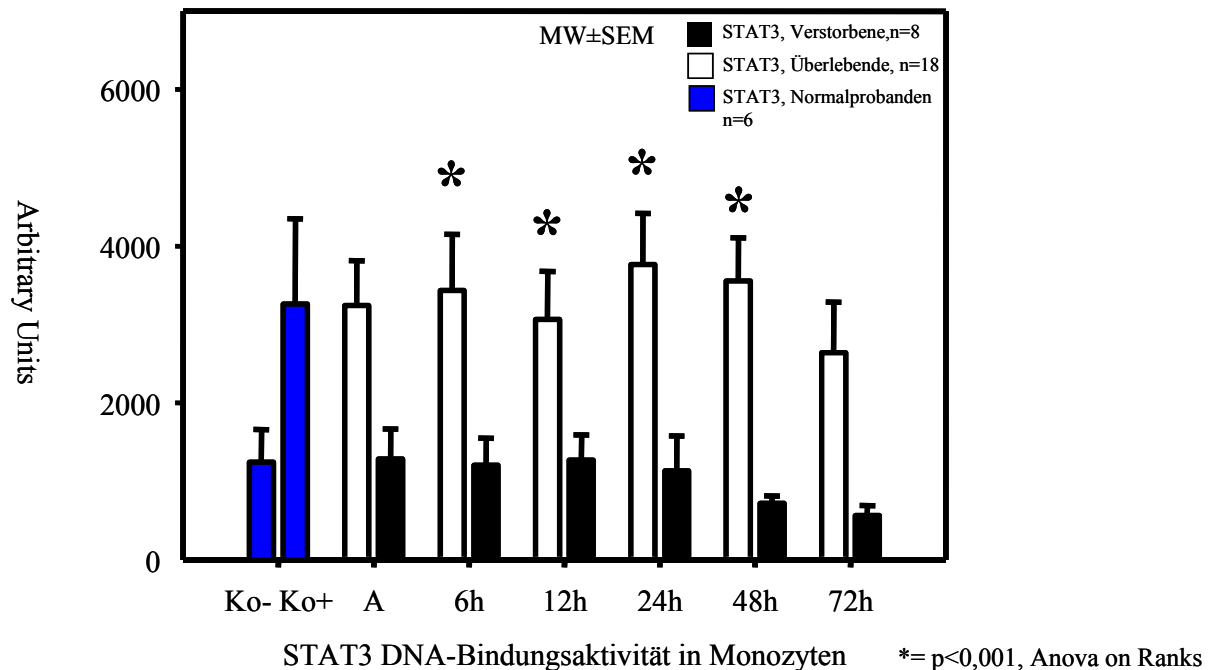


Abb.18: Diese Graphik zeigt die nukleäre STAT3 Translokation in Monozyten von Patienten, die überlebt haben und denen, die verstorben sind. Dabei ist klar zu erkennen, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors bei den verstorbenen Patienten erniedrigt ist. Dieser Unterschied war zu den Zeitpunkten 6, 12, 24 und 48 Stunden post trauma signifikant (* = $p < 0,001$ im Anova on Ranks followed by Kruskal-Wallis test, Überlebende vs. Verstorbene).

Tab.14: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Monozyten: Einteilung nach *outcome*

[AU] Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt	3243±573	3432±719	3064±614	3762±657	3555±551	2638±649
verstorben	1284±384	1204±345*	1272±321*	1133±444*	719±94*	565±126

* = $p < 0,001$, Anova on Ranks; überlebt vs. verstorben

4.8.4 Aktivität von STAT3 in Monozyten von Patienten: Einteilung nach NISS

Diese Graphik stellt die Auswertung des Patientenkollektivs nach anatomischer Verletzungsschwere, ausgedrückt mittels *New Injury Severity Score*, dar. Das

Gesamtkollektiv wurde aufgeteilt in Patienten mit einem NISS größer 41 Punkten und Patienten mit niedrigeren Punktwerten. Hierbei war 41 der Median.

Man kann ganz deutlich erkennen, dass die schwerer verletzten Patienten über den gesamten Beobachtungszeitraum eine niedrigere STAT3 Aktivität aufweisen als Patienten mit einem NISS kleiner 41 Punkten. In **Tabelle 15** sind die Daten der Bandenschwärzung in Arbitrary Units [AU] gemäß Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

Tab.15: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Monozyten: Einteilung nach NISS

[AU]	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=26						
<i>NISS>41</i>	1950±521	1711±429	2130±615	1819±458	2242±506	1687±601
<i>NISS≤41</i>	3331±694	3781±932	2895±698	4087±859	3450±810	2740±890

Abb.19: STAT3 in Monozyten:Einteilung der Patienten nach NISS

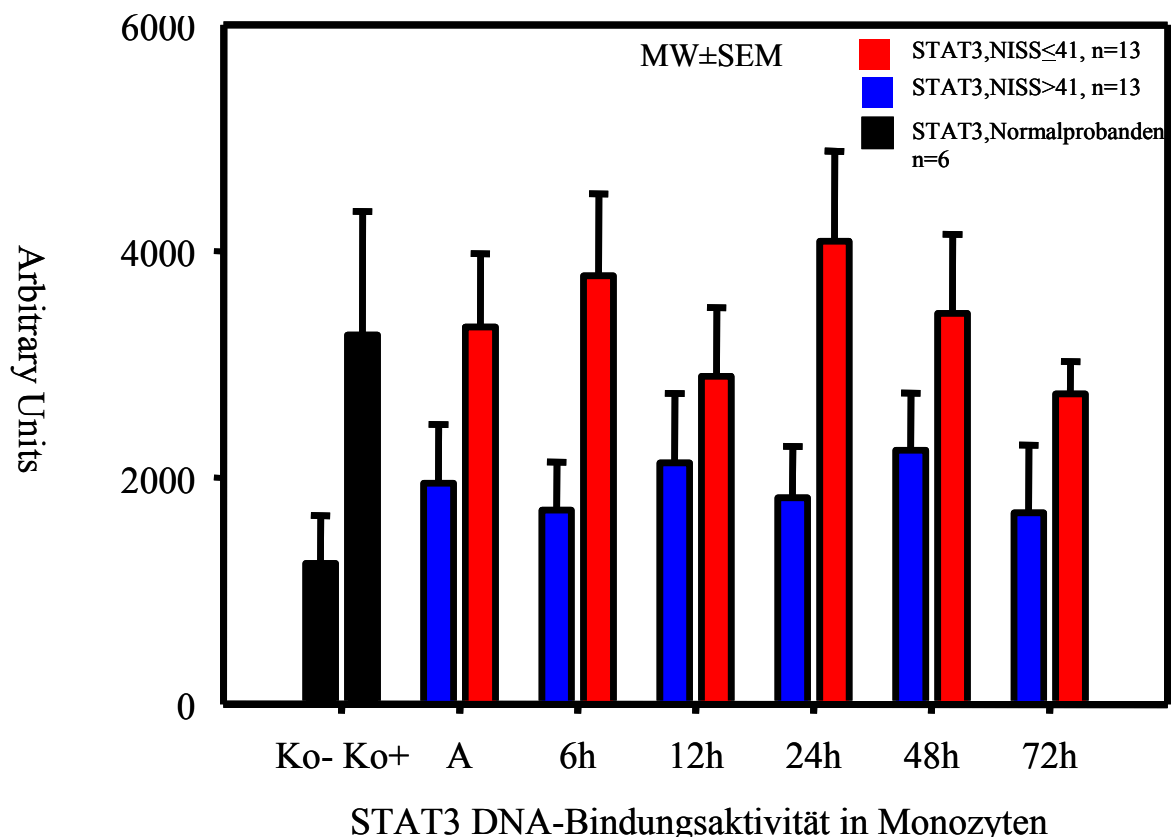


Abb.19: Dies ist die Auswertung der Patienten hinsichtlich ihrer Verletzungsschwere, ausgedrückt in dem NISS. Hierbei wird ersichtlich, dass die Aktivität von STAT3 in Patienten mit einem NISS größer 41 Punkten innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes reduziert ist im Vergleich zu der Aktivität in den leichter verletzten Patienten. Diese Unterschiede waren knapp nicht signifikant ($p = 0,208$ im Anova on Ranks followed by Kruskal-Wallis test, $NISS \leq 41$ vs. $NISS > 41$).

4.8.5 Aktivität von STAT3 in Monozyten von Patienten: Einteilung nach MOF

Untenstehende Graphik veranschaulicht die STAT3 DNA-Bindungsaktivität in Monozyten von Patienten mit einem MOF Wert größer 4 Punkten und solchen, die weniger schwer verletzt waren ($\text{MOF} < 4$). Die densitometrische Auswertung der Bandenschwärzung ist in *Tab. 16* zu sehen.

Abb.20: STAT3 in Monozyten:Einteilung der Patienten nach MOF

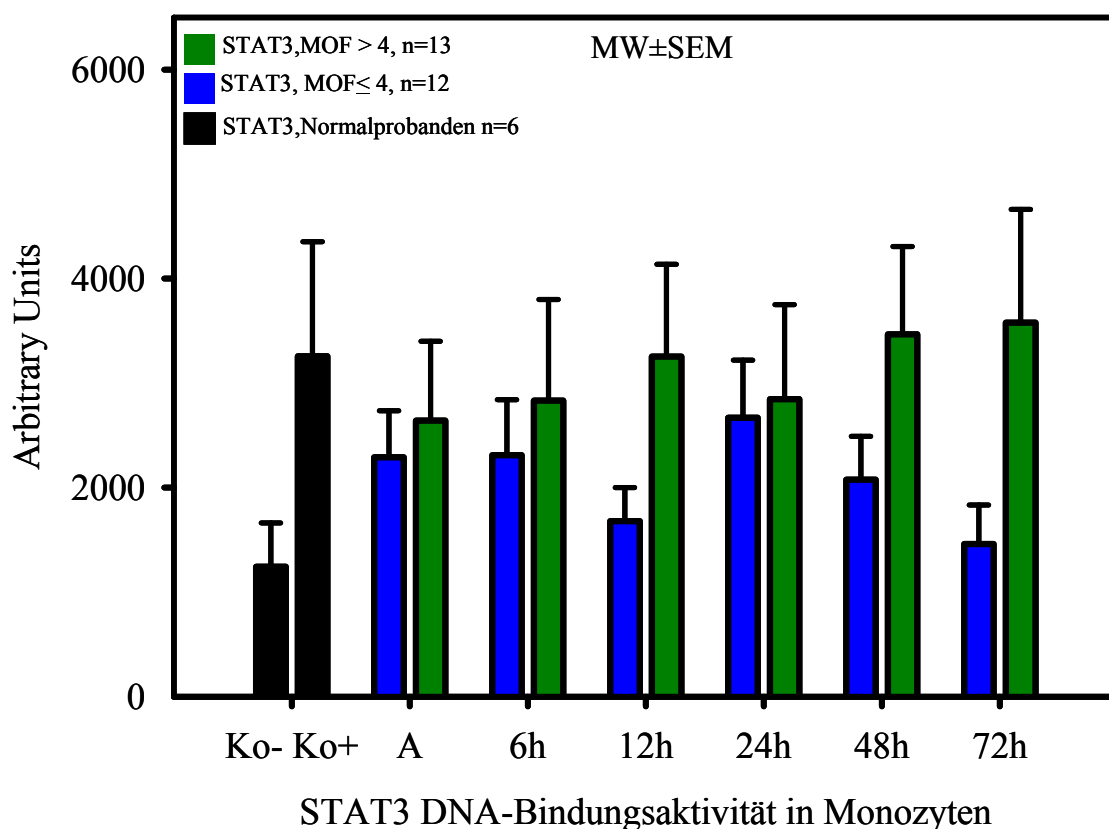


Abb.20: Dies ist die Auswertung der Patienten hinsichtlich ihrer MOF Werte. Es zeigt sich, dass Patienten mit einer geringeren Verletzungsschwere, ausgedrückt in einem $\text{MOF} < 4$, eine geringere Aktivität von STAT3 aufweisen als schwerer verletzte Patienten. Die Unterschiede sind jedoch nur gering.

Tab.16: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Monozyten: Einteilung nach MOF

[AU] Patienten: n=25	A	6h	12h	24h	48h	72h
MOF ≤ 4	2290±447	2311±530	1679±321	2668±553	2076±415	1459±374
MOF > 4	2640±761	2831±970	3253±885	2847±903	3466±921	4013±1450

4.9 STAT1 Aktivität in Granulozyten polytraumatisierter Patienten

4.9.1 STAT1 Aktivität in Granulozyten anhand des Gesamtkollektivs

Bei Aufnahme zeigt sich die STAT1 DNA-Bindungsaktivität in den Granulozyten bereits niedriger als bei der Nativkontrolle und nimmt dann bis zum 12h Wert noch weiter ab. Erst ab der 24h Abnahme beginnt die Aktivität wieder rapide zu steigen, und die 72h Abnahme erreicht sogar fast das Niveau der stimulierten Kontrolle. Diese ist signifikant erhöht gegenüber der Initialabnahme, sowie dem 6 und 12 Stunden Wert ($p < 0,05$ im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, KO+ vs. A-12h). Die Aktivität nach 72 Stunden ist sogar so angestiegen, dass sie signifikant erhöht ist gegenüber allen Abnahmen bis zu einem Tag nach Unfallereignis ($p < 0,05$ im Anova on Ranks followed by SNK test, 72h vs. A-24h). Die densitometrische Auswertung der Bandenschwärze ist in **Tab. 17** wiedergegeben.

Tab.17: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Granulozyten: Patientenkollektiv

[AU] Patienten: n=26	KO-	KO+	A	6h	12h	24h	48h	72h
STAT1 GN	692±120	1164±204#	618±139*#	460±81*#	464±106*#	673±133*	943±150	1137±212*

*= $p < 0,05$ SNK test, STAT1 Granulozyten 72h vs. A-24h

#= $p < 0,05$ Anova on Ranks, KO+ vs. A-12h STAT1 Granulozyten

Abb.21: STAT1 in Granulozyten:Gesamtkollektiv

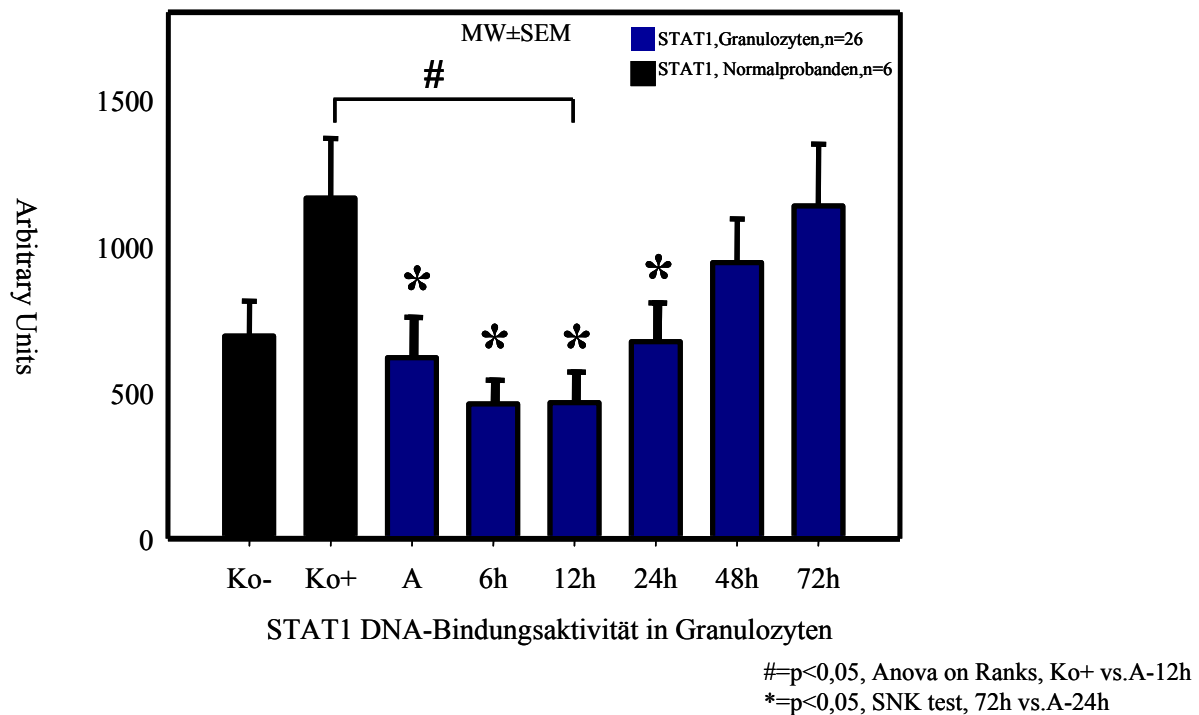


Abb.21: Diese Graphik zeigt die nukleäre Translokation von STAT1 in Granulozyten des Gesamtkollektivs. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors zu dem Zeitpunkt 72h nach Trauma am höchsten ist. Dieser Unterschied ist signifikant gegenüber der Aktivität bei Aufnahme (A), sowie nach 6, 12 und 24 Stunden (*= $p < 0,05$ im Anova on Ranks followed by SNK test, 72h vs. A-24h). Des Weiteren zeigt sich die DNA Bindungsaktivität von STAT1 reduziert gegenüber der stimulierten Kontrolle (Ko+). Auch dieser Unterschied ist signifikant bis zum Zeitpunkt 12 Stunden post trauma ($\neq$ $p < 0,05$ im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, KO+ vs. A-12h).

4.9.2 STAT1 Aktivität in Granulozyten: von Patienten: Patienten mit/ohne Massentransfusion

Diese Graphik zeigt die Auswertung der Patienten hinsichtlich der initialen Massentransfusion. Man kann klar erkennen, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 in den mehr transfundierten Patienten deutlich reduziert ist gegenüber Patienten, bei deren Behandlung weniger Erythrozytenkonzentrate ausreichend waren. Dieser Unterschied war von Aufnahme bis zu 12 Stunden nach Unfallgeschehen signifikant.

Abb.22: STAT1 in Granulozyten:Einteilung der Patienten nach Massentransfusion

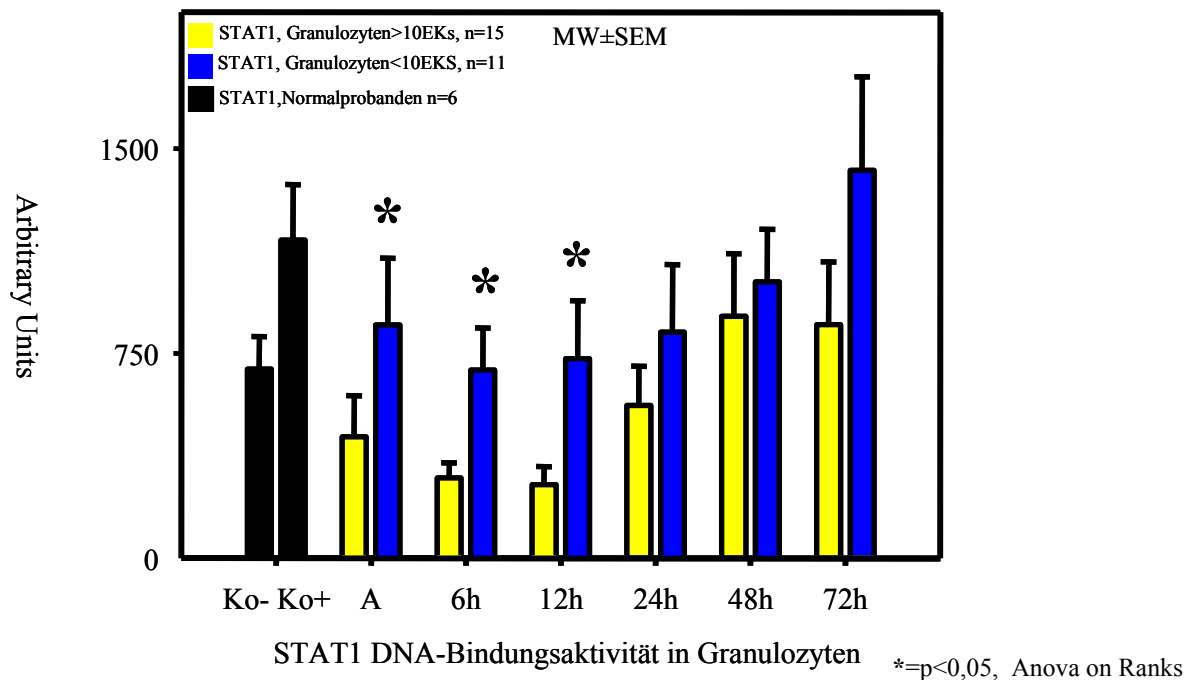


Abb.22: Diese Graphik zeigt die Einteilung des Kollektivs nach Massentransfusion in der Initialphase. Es zeigt sich, dass die Aktivität von STAT1 in den Patienten, die mehr als 10 Erythrozytenkonzentrate erhalten haben, reduziert ist im Vergleich zu der Aktivität in den Patienten, die nicht massentransfundierte worden sind. Dieser Unterschied war bei Aufnahme (A), sowie zum Zeitpunkt 6 und 12 Stunden nach Trauma signifikant (*= $p < 0,05$ im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, <10EKS vs. >10EKS).

Untenstehende Tabelle zeigt die Auswertung der Bandenschwärze auf den entsprechenden Filmen.

Tab.18: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach Massentransfusion

[AU]	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=26						
>10EKS/ 24 h	444±151	293±56	269±66	559±144	822±222	802±207
<10EKS/ 24 h	854±245*	688±155*	730±213*	827±248	1012±193	1420±343

*= $p < 0,05$ Anova on Ranks; <10EKS vs.>10EKS

4.9.3 STAT1 Aktivität in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach *outcome*

Es erfolgte eine Einteilung der Patienten hinsichtlich ihres Überlebens oder Versterbens innerhalb von 90 Tagen post trauma. In **Abb.23** sind diese Ergebnisse mittels einer Graphik veranschaulicht.

Abb.23: STAT1 in Granulozyten:Einteilung der Patienten nach *outcome*

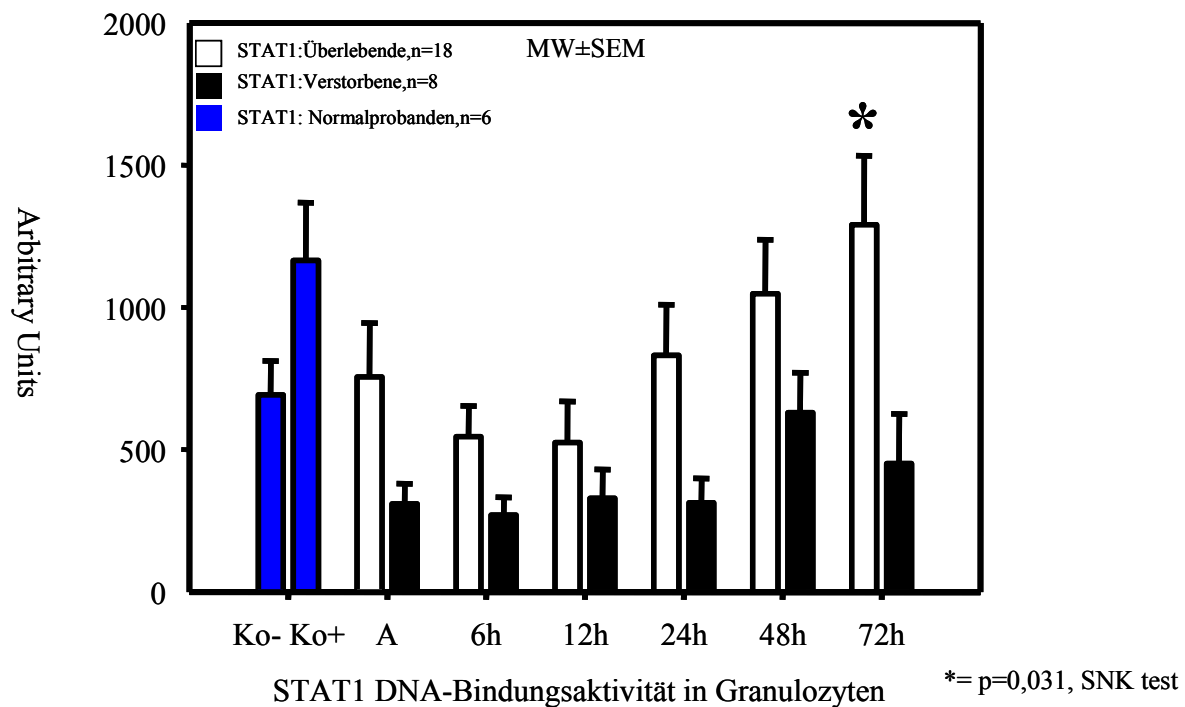


Abb.23: Diese Graphik zeigt die nukleäre Translokation von STAT1 in Granulozyten von verstorbenen Patienten und von solchen, die überlebt haben. Es ist klar zu erkennen, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors in den verstorbenen Patienten während des gesamten Beobachtungszeitraums reduziert ist, sogar bis unter das Niveau der unstimulierten Normalprobanden (Ko-). Der Unterschied zwischen den zwei Gruppen war zum Zeitpunkt 72 Stunden post trauma signifikant (*= $p=0,031$ im Anova on Ranks followed by SNK test, 72h überlebt vs. 72h verstorben).

Es konnte gezeigt werden, dass die verstorbenen Patienten im Vergleich zu denen, die überlebt haben, eine reduzierte STAT1 DNA-Bindungsaktivität aufweisen. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors fällt in diesem Kollektiv sogar bis unter das Niveau der unstimulierten Normalprobanden (Ko-). Die nukleäre Translokation von STAT1 in den Granulozyten

verstorbenen Patienten war im Vergleich zu der Aktivität der Überlebenden zum Zeitpunkt 72 Stunden post trauma signifikant.

Tabelle 19 zeigt die densitometrische Auswertung der Filmschwärzung in Arbitrary Units [AU] gemäß Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.

Tab.19: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach outcome

[AU] Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt	755±190	545±109	524±145	832±178	1048±190	1290±243
verstorben	309±72	270±62	329±102	313±86	539±150	471±172*

*= p=0,031, SNK test; 72h überlebt vs. 72h verstorben

4.9.4 STAT1 Aktivität in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach NISS

In **Abb.24** ist die Auswertung des Patientenkollektivs nach anatomischer Verletzungsschwere, ausgedrückt mittels *New Injury Severity Score*, dargestellt. Wie schon bei den Monozyten gezeigt, wurde das Gesamtkollektiv aufgeteilt in Patienten mit einem NISS größer 41 Punkten und Patienten mit niedrigeren Punktwerten. Die korrespondierenden Werte sind in **Tab.20** dargestellt.

Es zeigten sich hierbei keine eindrucklichen Unterschiede zwischen den beiden Subgruppen.

Tab.20: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach NISS

[AU] Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS>41	1950±521	1711±429	2130±615	1819±458	2242±506	1687±601
NISS≤41	3331±694	3781±932	2895±698	4087±859	3450±810	2740±890

Abb.24: STAT1 in Granulozyten:Einteilung der Patienten nach NISS

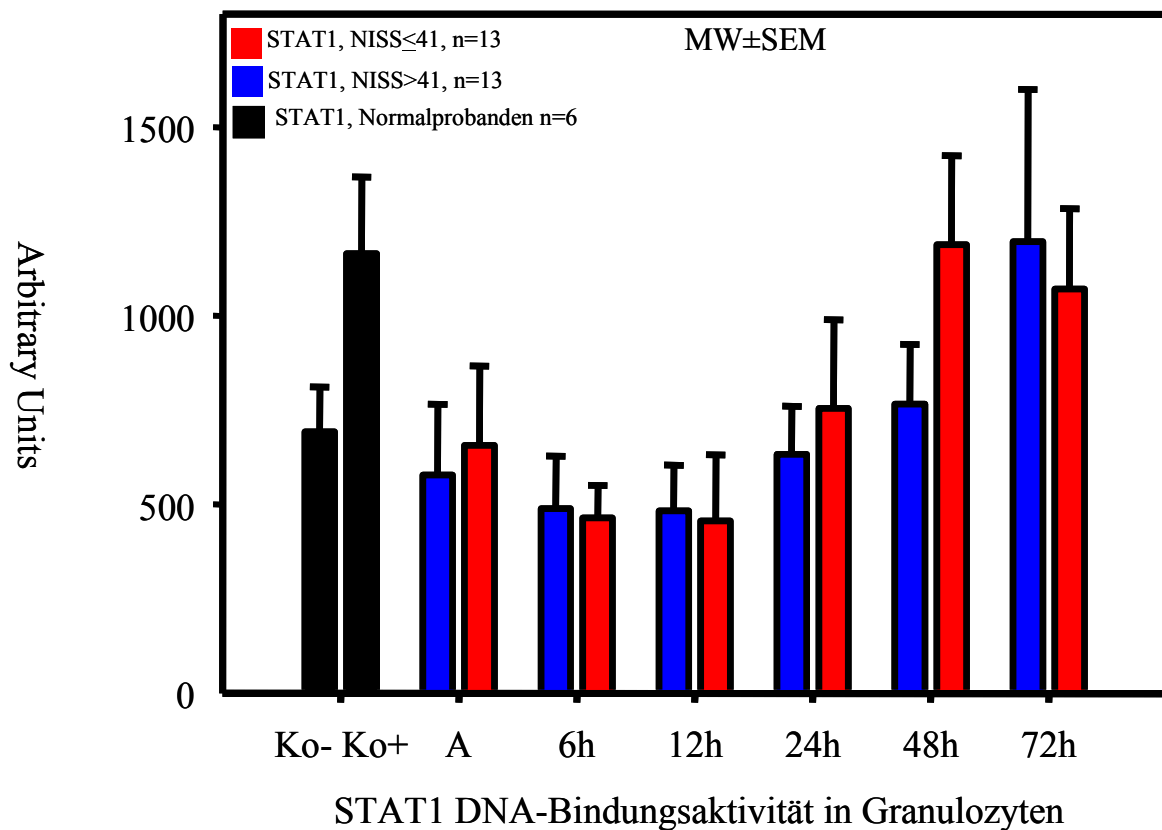


Abb.24: Diese Graphik zeigt die nukleäre Translokation von STAT1 in Granulozyten von Patienten mit einem NISS größer als 41 Punkte und im Vergleich dazu die Translokation von STAT1 in Patienten mit einem NISS von weniger als 41 Punkten. Hierbei zeigten sich keine deutlichen Unterschiede.

4.9.5 STAT1 Aktivität in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach MOF

Die Einteilung der Patienten nach ihrem *Multiple Organ Failure*, MOF, Score ergab keine eindrucklichen Unterschiede der STAT1 DNA-Bindungsaktivität in Patienten mit einem MOF < 4 und solchen mit einem MOF > 4 Punkten. **Tab.21** veranschaulicht die Zahlenwerte der densitometrischen Auswertung.

Tabelle .21: densitometrische Auswertung der STAT1 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach MOF

[AU]	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=25						
MOF ≤ 4	610±179	555±143	438±108	466±97	1033±179	1026±266
MOF > 4	609±237	341±78	500±202	852±259	834±283	1323±406

Abb.25: STAT1 in Granulozyten:Einteilung der Patienten nach MOF

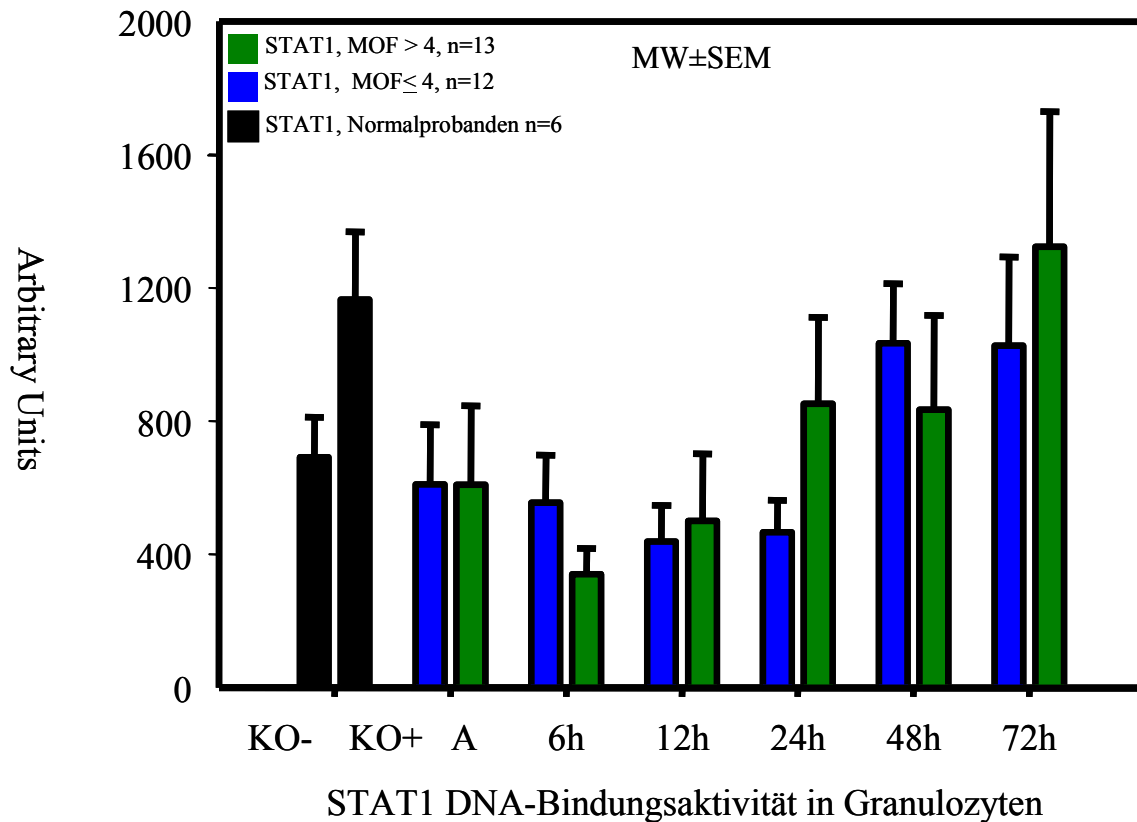


Abb.25: Diese Graphik zeigt die Einteilung der Patienten nach ihren MOF Werten. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen Patienten mit einem Multiorganversagen, also MOF Werten größer 4 Punkten und Patienten mit niedrigeren MOF Werten festgestellt werden.

4.10 STAT3 Aktivität in Granulozyten polytraumatisierter Patienten

4.10.1 STAT3 Aktivität in Granulozyten anhand des Gesamtkollektivs

Hier ist exemplarisch der EMSA Film eines polytraumatisierten Patienten nach 24-stündiger Belichtungszeit abgebildet (**Abb.26**). Wie bereits auf den vorangegangenen Bilder sind auch hier die Positiv- und Negativkontrolle, sowie die spezifische und die unspezifische Kompetition mit abgebildet.

Es ist klar zu sehen, dass das Maximum der Bandenschwärzung bei 48 und bei 72 Stunden liegt (siehe →). Wie alle Filme wurde auch dieser standardisiert 24 Stunden lang belichtet.

Abb.26: EMSA Film zur Detektion der STAT3 Aktivität in Granulozyten

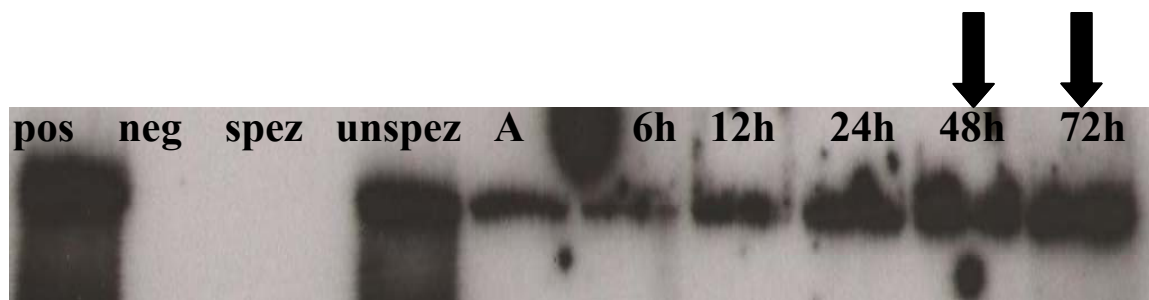


Abb.26: Dies ist exemplarisch der EMSA Film eines polytraumatisierten Patienten zur Detektion der STAT3 DNA-Bindungsaktivität in Granulozyten. Es sind deutliche Banden zu erkennen, wobei das Maximum der Bandenschwärzung zum Zeitpunkt 48 und 72 Stunden liegt (siehe →). Ebenfalls mit abgebildet sind die Positiv- und Negativkontrolle, sowie die spezifische und unspezifische Kompetition.

Die Flächen der Bandenschwärzung wurden erneut ausgemessen, und die Pixelanzahl wurde bestimmt. Die densitometrische Auswertung ist in **Tabelle 22** zu finden. Zur Veranschaulichung wurden die Ergebnisse mittels einer Graphik dargestellt (**Abb.27**).

Tab.22: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Granulozyten (n=26)

	KO+	A	6h	12h	24h	48h	72h
MW±SEM	2485±340	1878±326	1731±273	1583±283	1670±321	2208±324	2343±406

Abb.27: STAT3 in Granulozyten: Gesamtkollektiv

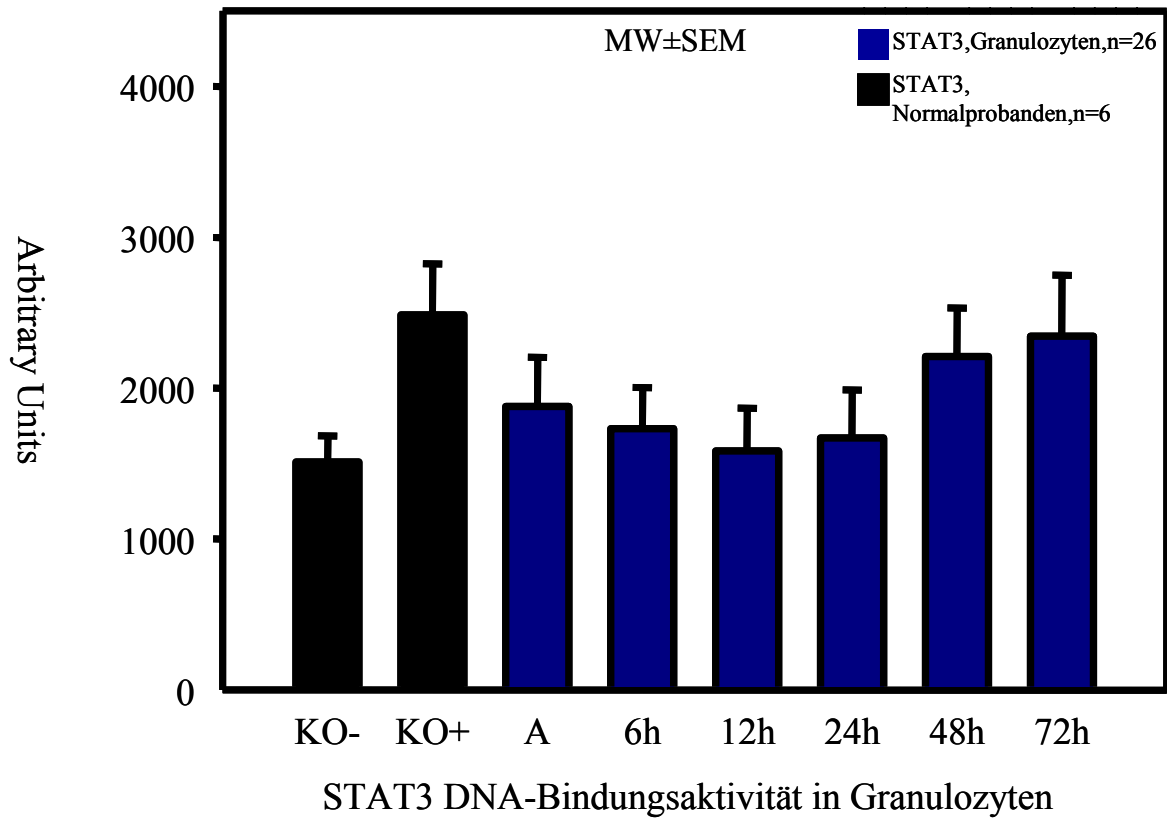


Abb.27: Diese Graphik zeigt die Translokation von STAT3 in das nukleäre Kompartiment der Granulozyten. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors zeigt ein Minimum zum Zeitpunkt 12 Stunden post trauma und ein Maximum bei 48 und 72 Stunden. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes bleibt die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 jedoch erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Ko-). Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0,474$ im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, Granulozytenkollektiv vs. Kontrollen).

Die Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 in das nukleäre Kompartiment der Granulozyten zeigt sich im gesamten Beobachtungszeitraum erhöht gegenüber der Nativkontrolle (Ko-), erreicht jedoch nie das Niveau der stimulierten Kontrolle. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors ist zum Zeitpunkt 12 Stunden post trauma am niedrigsten, um dann bei 48 und 72 Stunden wieder anzusteigen. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0,474$ im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, Granulozytenkollektiv vs. Kontrollen).

4.10.2 STAT3 Aktivität in Granulozyten: von Patienten: Patienten mit/ohne Massentransfusion

Die nukleäre Translokation von STAT1 in den Granulozyten zeigte keine Unterschiede in der Aufteilung des Patientenkollektivs hinsichtlich erhaltener Massentransfusion innerhalb der ersten 24 Stunden (**Abb.28**). Dies ist nochmals mit den korrespondierenden Werten der densitometrischen Auswertung in **Tab.23** dargestellt.

Abb.28: STAT3 in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach Massentransfusion

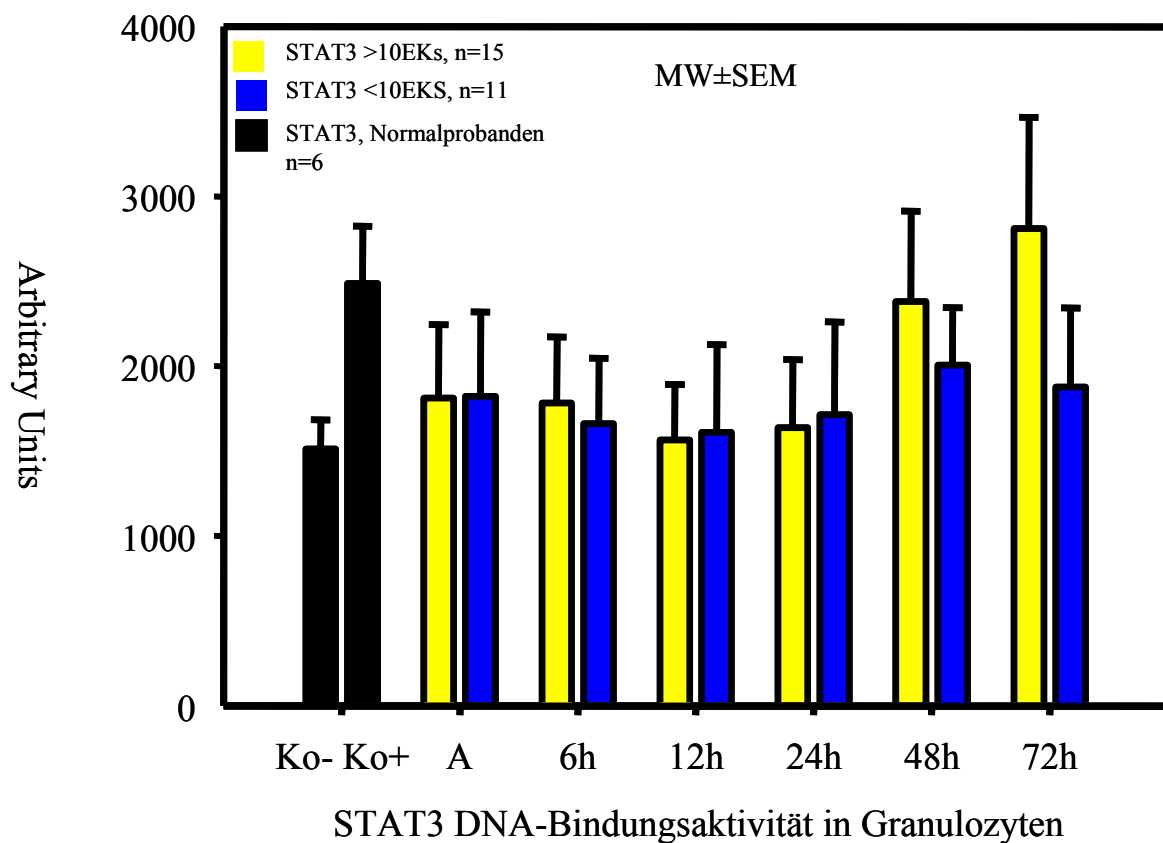


Abb.28: Diese Graphik zeigt die Einteilung des Kollektivs nach Massentransfusion in der Initialphase. Hierbei konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden zwischen den Patienten, die mehr als 10 Erythrozytenkonzentrate innerhalb der ersten 24 Stunden erhalten hatten und Patienten, die mit weniger Blutprodukten ausgekommen sind.

Tab.23: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach Massentransfusion

[AU]	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=26						
>10EKS/ 24 h	1812±340	1782±390	1564±328	1637±402	2379±533	2809±657
<10EKS/ 24 h	1821±498	1660±387	1610±516	1714±546	2005±340	1877±465

4.10.3 STAT3 Aktivität in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach *outcome*

In **Abb.29** ist ein Vergleich zwischen der Aktivität von STAT3 in den Granulozyten von Patienten, die überlebt haben und der Aktivität des Transkriptionsfaktors in den Patienten, die verstorben sind, abgebildet. Es wurde das *outcome* innerhalb von 90 Tagen post trauma berücksichtigt.

Abb.29: STAT3 in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach *outcome*

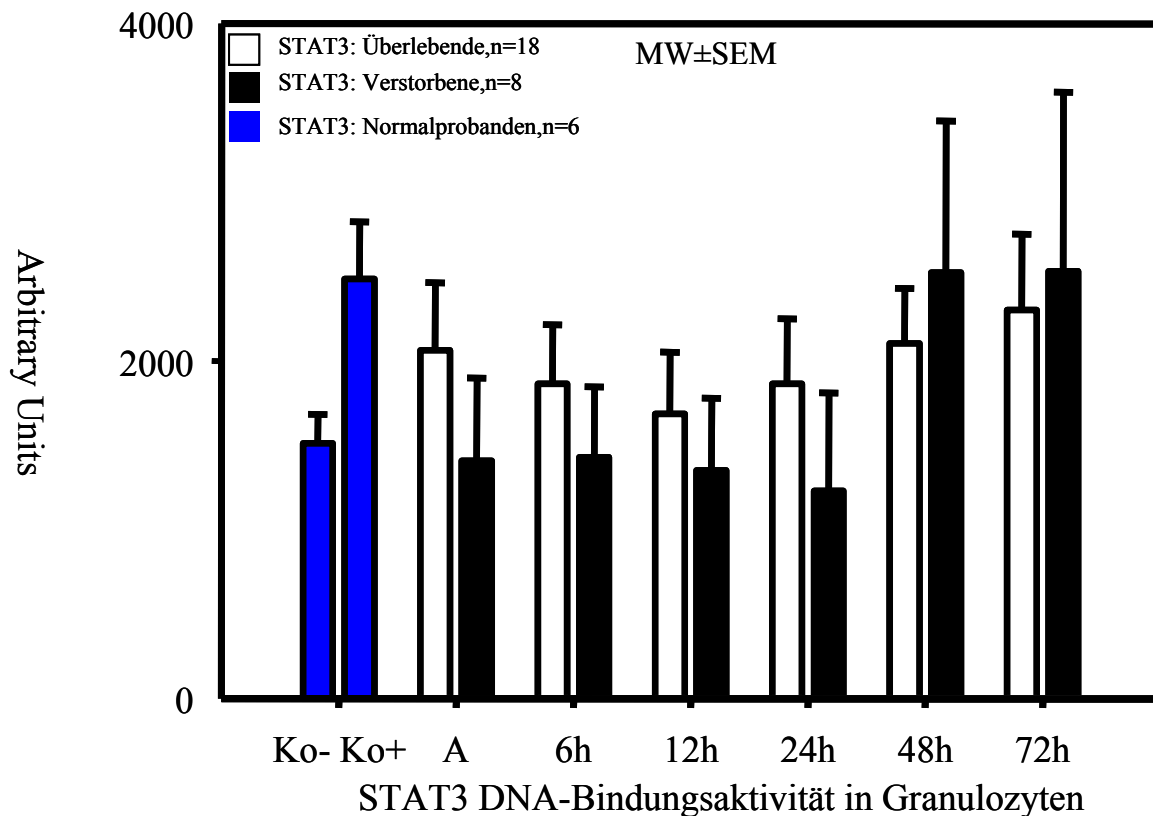


Abb.29: Diese Graphik veranschaulicht die DNA Bindungsaktivität von STAT3 in Granulozyten von verstorbenen und überlebenden Patienten. Es ist zu erkennen, dass die verstorbenen Patienten bereits initial eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors aufweisen. Zum Zeitpunkt 48 und 72 Stunden nach Trauma ist diese jedoch erhöht gegenüber den Überlebenden. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0,695$ im Anova on Ranks test).

Tab.24: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach *outcome*

[AU] Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
<i>überlebt</i>	2062±402	1865±351	1686±366	1865±386	2103±328	2301±451
<i>verstorben</i>	1407±544	1429±417	1352±428	1229±583	2524±898	2531±1063

Diese Auswertung hinsichtlich des *outcomes* der Patienten zeigt eine initiale Reduktion der nukleären Translokation von STAT3 im Vergleich zu den Überlebenden. Zum Zeitpunkt 48 und 72 Stunden post trauma erreicht die Aktivität des Transkriptionsfaktors in den verstorbenen Patienten ein Maximum und übertrifft die Aktivität in den Überlebenden.

4.10.4 STAT3 Aktivität in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach dem NISS

Diese Graphik (**Abb.30**) stellt die Auswertung des Patientenkollektivs nach anatomischer Verletzungsschwere, ausgedrückt mittels *New Injury Severity Score*, dar. Das Gesamtkollektiv wurde aufgeteilt in Patienten mit einem NISS von mehr als 41 Punkten und Patienten mit geringerem Punktwert. Hierbei war 41 der Median.

Man kann ganz deutlich erkennen, dass die schwerer verletzten Patienten über den gesamten Beobachtungszeitraum eine niedrigere STAT3 Aktivität aufweisen als Patienten mit einem NISS kleiner 41 Punkte. Diese Unterschiede waren zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden post trauma signifikant (*= $p < 0,001$ im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, NISS<41 vs. NISS>41).

In **Tabelle 25** sind die densitometrischen Auswertungen der Bandenschwärzungen dargestellt.

Tab.25: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach NISS

[AU] Patienten: n=26	A	6h	12h	24h	48h	72h
<i>NISS>41</i>	1267±392	927±231	663±187	858±188	1677±398	1964±617
<i>NISS≤41</i>	1264±471	2535±387*	2503±397*	2481±532*	2739±479	2659±545

*= p< 0,001 im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, NISS<41 vs. NISS>41

Abb.30: STAT3 in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach NISS

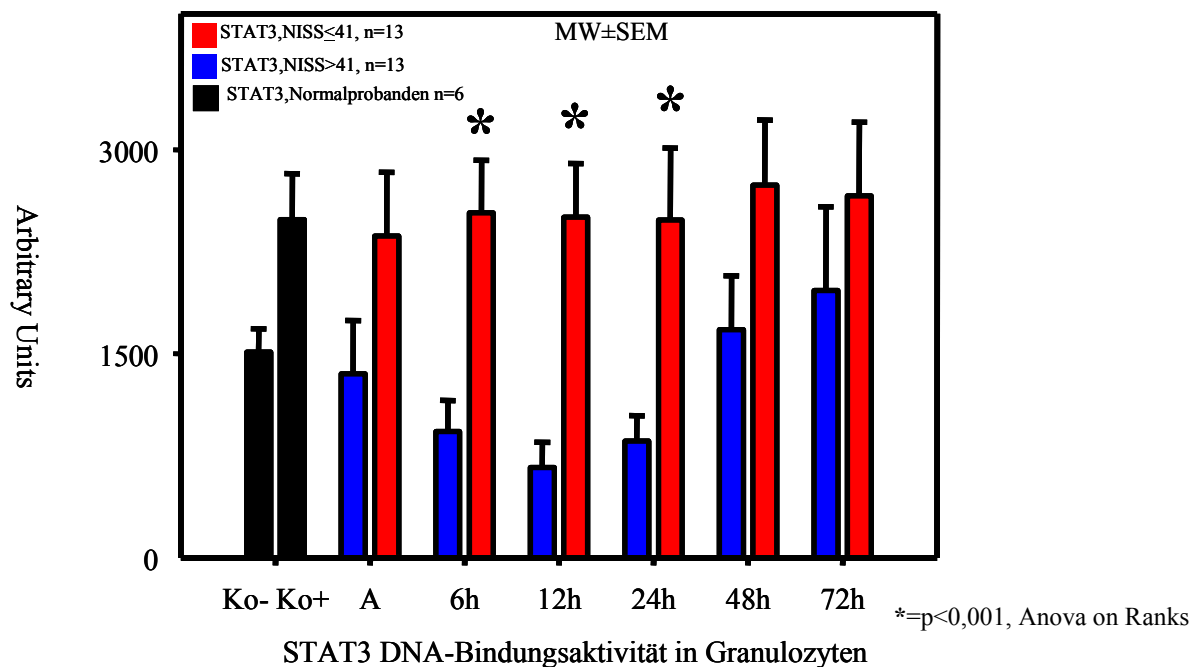


Abb.30: Hier ist die Auswertung der Patienten nach ihrer Verletzungsschwere, ausgedrückt mittels NISS, abgebildet. Sehr eindrücklich ist die Aktivitätsminderung von STAT3 in den Patienten, die einen NISS größer 41 Punkte erreicht haben. Der Unterschied der DNA-Bindungsaktivität von STAT3 zwischen den beiden Patientengruppen zeigte sich zum Zeitpunkt 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma signifikant (*= p< 0,001 im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, NISS<41 vs. NISS>41).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 in den Granulozyten der schwerer verletzten Patienten, ausgedrückt durch einen höheren NISS, im gesamten Beobachtungszeitraum reduziert ist gegenüber den Patienten mit einem NISS kleiner 41 Punkte. Zum Zeitpunkt 6, 12 und 24 Stunden nach Traumaereignis war dieser Unterschied signifikant.

4.10.5 STAT3 Aktivität in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach dem MOF Score

Diese Graphik (**Abb.31**) zeigt die Auswertung des Patientenkollektivs hinsichtlich der funktionellen Verletzungsschwere, ausgedrückt mittels *MOF Score*.

Abb.31: STAT3 in Granulozyten: Einteilung der Patienten nach *MOF Score*

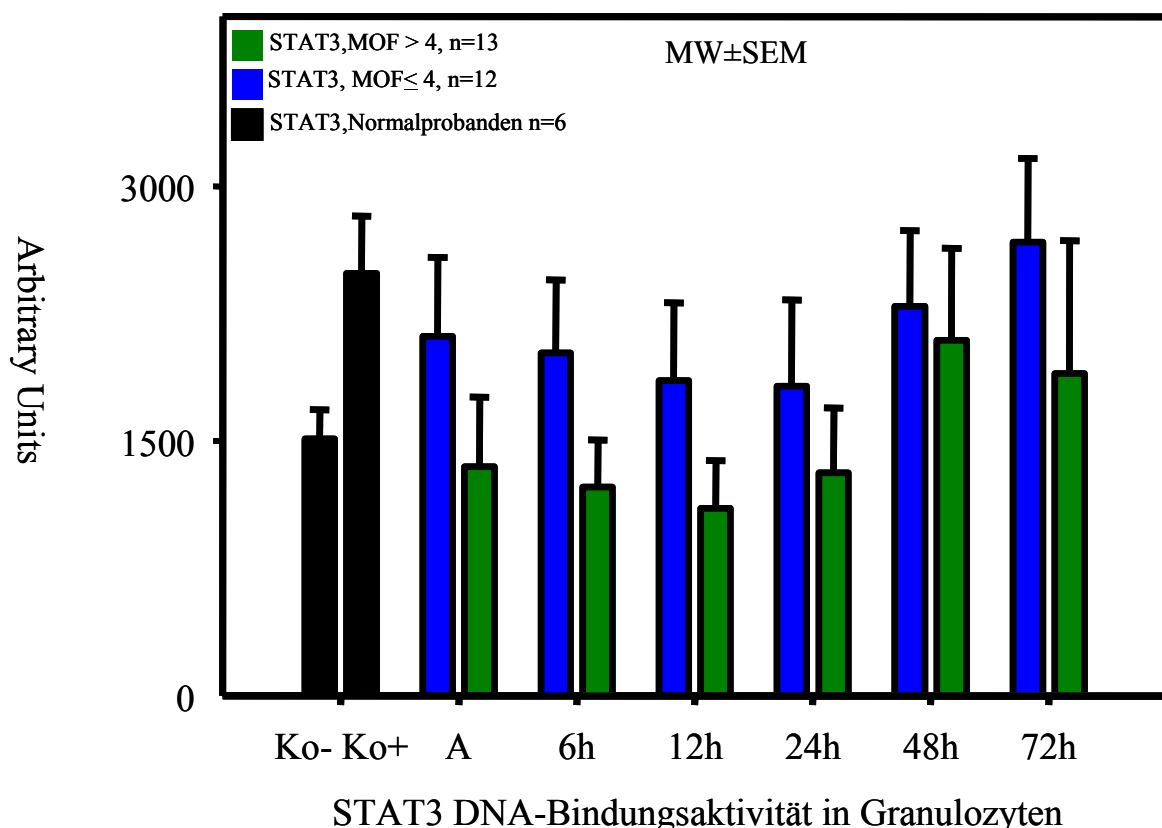


Abb.31: Diese Graphik zeigt die Einteilung der Patienten hinsichtlich ihres MOF Score Wertes. Es ist deutlich zu erkennen, dass die schwerer verletzten Patienten, ausgedrückt in einem höheren MOF Score, während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine reduzierte STAT3 Aktivität haben. Im Gegensatz dazu, ist die Aktivität des Transkriptionsfaktors in den weniger schwer verletzten Patienten durchgehend höher als die Nativkontrolle (Ko-) und zum Zeitpunkt 72 Stunden sogar höher als die LPS stimulierte Kontrolle (Ko+). Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0,282$ im Anova on Ranks test followed by Kruskal-Wallis, MOF>4 vs. MOF <4).

Es zeigt sich, dass die schwerer verletzten Patienten, ausgedrückt durch einen MOF Score Wert größer 4 Punkten, im gesamten Beobachtungszeitraum eine verminderte STAT3 Aktivität aufweisen, verglichen mit den weniger schwer verletzten Patienten. Des Weiteren ist die nukleäre Translokation von STAT3 in den Patienten mit einem MOF kleiner 4 Punkten durchgehend erhöht im Vergleich zur Nativkontrolle (Ko-). Zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Trauma ist sie sogar höher als die LPS stimulierte Kontrolle (Ko+).

Die dazugehörigen Werte der Pixelauszählung in Arbitrary Units finden sich in **Tabelle 26**.

Tab.26: densitometrische Auswertung der STAT3 Aktivität in Granulozyten: Einteilung nach MOF

[AU] Patienten: n=25	A	6h	12h	24h	48h	72h
MOF≤4	2116±465	2018±430	1855±458	1822±510	2292±447	2670±494
MOF>4	1347±413	1228±277	1103±282	1313±381	2091±544	1895±785

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig Erkenntnisse über initiale intrazelluläre Aktivierungsmechanismen in humanen Immunzellen polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase gewonnen werden.

Der Forschungsschwerpunkt lag dabei auf der Analyse der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3. Es ist erstmalig gelungen, deren Translokation in den immunkompetenten Zellpopulationen der Monozyten und PMN-Granulozyten mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA, nachzuweisen. Dabei fand sich in den Validierungsversuchen anhand gesunder Normalprobanden unter nativen Bedingungen eine Grundaktivität beider Transkriptionsfaktoren und unter LPS Stimulation ein signifikanter Anstieg derselben.

In Patienten, die im Verlauf verstorben sind, schwerer verletzt waren oder ein manifestes Multiorganversagen entwickelt haben, zeigte sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine Reduktion der nukleären Translokation beider Transkriptionsfaktoren.

5.1 Methodik

5.1.1 Studiendesign

Die Vorgabe der möglichst frühen Probengewinnung ergab sich aus den Studienergebnissen der letzten Jahre. Verschiedene Untersuchungen der vergangenen Dekaden haben klar aufgezeigt, dass der initialen Phase nach Traumaereignis signifikante Bedeutung für die Dysfunktion humaner Immunzellen des unspezifischen Immunsystems zukommt^{24,60}. Als Ursache für die posttraumatische Entwicklung von Organsystemfunktionsstörungen wird unter anderem eine frühe Fehlregulation des Monozyten/Makrophagen Systems⁷⁵ und der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten als bewiesen angesehen¹²¹. *Botha et al.* konnten an einem Kollektiv von Traumapatienten bereits 6 Stunden nach Unfallereignis eine signifikante Aktivierung der zirkulierenden PMN-Granulozyten nachweisen²⁵. Ein

entscheidender Aspekt der vorliegenden Arbeit ist daher die initiale Blutabnahme, welche innerhalb der ersten 90 Minuten nach Traumaereignis bei Aufnahme in unserer Klinik erfolgte. Auch die folgenden Blutabnahmezeitpunkte folgten eng gestaffelt und wurden standardisiert zum Traumazeitpunkt nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt.

Die kurzen Rettungswege in der Landeshauptstadt München ermöglichten einen frühen Zugang zu den Patienten, die mittels Hubschrauber oder auch bodengebunden in einem Rettungswagen zum Schockraum gebracht wurden. Somit konnten Blutproben zu diesem Studienzwecke noch im Schockraum, unmittelbar nach Erfassung und Stabilisierung der Vitalfunktionen der polytraumatisierten Patienten ^{88,176}, im Rahmen von diagnostisch notwendigen Blutentnahmen oder notwendigen Zugängen (ZVK-Anlage, arterielle Druckmessung) gewonnen werden. Die polytraumatisierten Patienten wurden nach initialer Diagnostik und ggf. Intervention im Schockraum entweder auf die chirurgische Intensivstation verlegt, oder im Falle anschließender Primärversorgung bei lebensbedrohlichen Verletzungen in den Operationssaal gebracht. Dort erfolgten im Verlauf auch die konsekutiven, zeitlich eng gestaffelten Blutabnahmen standardisiert nach Studienprotokoll ^{21,23}.

5.1.2 Patientenkollektiv

In diese Studie wurden ausschließlich Patienten mit stumpfem Polytrauma und einem *NISS* von mindestens 16 Punkten eingeschlossen, die innerhalb der ersten 90 min nach Trauma den Schockraum unserer Klinik erreichen konnten.

Beim Einschluss der Patienten wurde bewusst nicht auf spezifische Verletzungsmuster geachtet, sondern nur auf den Schweregrad, ausgedrückt mittels *New Injury Severity Score*. Dies sollte gewährleisten, dass der Ablauf der Immunantwort auf schweres Polytrauma, und nicht die Inflamationsreaktion auf bestimmte Verletzungen untersucht werden konnte ^{21,23}.

Die Verletzungsschwere, sowie das Alter und die Geschlechterverteilung dieses Kollektivs entsprechen dem Durchschnitt von Traumapatienten in Mitteleuropa ¹². Insbesondere in der nordamerikanischen Literatur findet sich ein großer Anteil penetrierender Verletzungen, während im europäischen Raum das stumpfe Polytrauma verursacht durch Hochrasanztraumen oder Stürze überwiegt ¹⁷¹.

Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* ¹⁶⁵. Pro Abnahmezeitpunkt wurden die klinischen Parameter bestimmt, welche benötigt wurden, um die klinischen Scores NISS und MOF ermitteln zu können.

5.1.3 Zellisolation

Zur Zellisolation wurden aus dem entnommenen EDTA-Vollblut mittels *positiven cell-sortings* durch magnetische Antikörpermarkierung CD14 positive Monozyten und CD15 positive Granulozyten isoliert. Diese Technik hat die theoretische Möglichkeit, dass sie die Immunzellen zusätzlich leicht aktiviert. Das CD14 Epitop auf den Monozyten ist die sensibelste Region für die intrazelluläre Aktivierung der Monozyten. Somit können die Anti-CD14 Antikörper zu einer leichten Aktivierung der Immunzellen führen ⁶⁹. Der Methodik des *positiven cell sortings* stehen noch die *Dichtegradientenzentrifugation* und die Technik des *negativen cell sortings* entgegen. Die Separation durch *Dichtegradientenzentrifugation* mittels *Ficoll* oder *Percoll* wurde von anderen Autoren beschrieben ⁹. Diese Methodik birgt den Nachteil, dass die Immunzellen nachweislich durch den mechanischen Stress der Zentrifugation deutlich mehr aktiviert werden ²¹³. Die Literatur zeigt, dass diese Methodik eine stärkere Aktivierung der Zellen hervorruft als die von uns angewandte MACS-Methode ^{127,173}. *Cotter et al.* ⁴¹ konnten zeigen, dass die *Percoll Dichtegradientenzentrifugation* für bereits ins Gewebe eingewanderte Zellen geeignet ist,

wohingegen zirkulierende Lymphozyten andere Eigenschaften aufweisen. Die negative immunologische Separation ist hoch sensitiv und aktiviert die zu separierenden Zellen nicht. Der Nachteil jedoch ist, dass man ein deutlich größeres Blutvolumen benötigt, um dieselbe Anzahl Zellen zu erhalten ⁴². Angesichts der hämorrhagischen Instabilität des untersuchten Patientenkollektivs, die weitere Blutabnahmen und somit größere zur Verfügung stehende Volumina ausschließt, stellt die Methode der positiven immunologischen Aktivierung mittels MACS einen angemessenen Kompromiss dar. Die Reinheit der Zellisolation, kontrolliert mittels Durchflusszytometrie (Facs = *Fluorescence activated cell scanner*), lag bei >95% (Daten nicht gezeigt).

Die von uns angewandte nukleäre Proteinextraktion, wie in Kapitel 3.5 (page 34) erläutert, wurde schon mehrmals vorher in der Literatur beschrieben ²³ und entspricht dem Standard.

5.1.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Der EMSA ist eine elegante Methode um die sequenzspezifische Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA zu untersuchen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass DNA-Moleküle in einer Gelelektrophorese eine verzögerte Mobilität haben, wenn ein Protein an sie gebunden hat. Diese DNA-Protein-Komplexe werden als spezifische Banden auf einer ihrer Länge entsprechenden Höhe sichtbar. Mittels radioaktiver Markierung des entsprechenden Oligonukleotids wird nach Andockung des zu untersuchenden Proteins die Bande identifizierbar ⁶⁷.

Die Technik des EMSAs ist sehr beliebt, um die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, da sie den Nachweis der Bindung an spezifische DNA-Sequenzen ermöglicht und zusätzlich mittels Analyse der Bandenstärken eine Quantifizierung der Aktivität erlaubt ^{149,217}. Um die biologische Bedeutung der transkriptionalen Aktivität zu erfassen, ist die zusätzliche Bestimmung von Reportergenen hilfreich. Hierbei ist von Interesse, dass möglicherweise die transkriptionale Aktivität gesteigert sein kann, jedoch deren biologische

Antwort aufgrund potentieller traumaspezifischer Umstände reduziert sein kann. Um dies näher aufzuklären ist die Bestimmung von Reporter-genen erforderlich.

Die von mir angewandte Technik des EMSAs ist bereits von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt worden.^{23,144}

5.2 Posttraumatische Inflam-mationsreaktion

In traumatisch verletzten Organen werden inflammatorische Kaskaden ausgelöst, die primär die Reparatur des verletzten Gewebes intendieren. In der frühen posttraumatischen Phase sind dies insbesondere Mediatoren, wie beispielsweise Zytokine, IL-6, IL-1, IL-2, etc., IFN- γ , TNF- α und toxische Sauerstoffmetabolite, die mittels Vasodilatation, Angiogenese und Makrophagenimmigration die entscheidenden Voraussetzungen für eine Wiederherstellung des geschädigten Gewebes liefern^{136,170,174}. Die Freisetzung dieser proinflammatorischen Faktoren kann jedoch zu einer überschießenden generalisierten Entzündungsreaktion führen, sodass auch Organe, die durch das initiale Trauma nicht betroffen waren, in Mitleidenschaft gezogen werden. Dieses Phänomen in der frühen posttraumatischen Phase wird als *Systemic Inflammatory Response Syndrom*, SIRS, bezeichnet^{16,135,136}. Dieses kann zu primär noch reversiblen funktionellen Organausfällen führen. Ist der Organismus jedoch nicht in der Lage, die Inflam-mationsreaktion zu modulieren, so kann ein fließender Übergang in ein *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS, entstehen, dessen Irreperabilität in ein strukturelles *Multiple Organ Failure Syndrom*, MOF, münden kann^{14,39}. Dieses immunologische Phänomen geht noch immer mit einer hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate einher^{48,141,162}.

Des Weiteren wurde unlängst eine auf das SIRS folgende Kompensationsphase des Organismus identifiziert, das *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome*, CARS, das sich insbesondere durch die Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise IL-10 und IL-1ra charakterisiert. In dieser Phase ist der Organismus durch eine

vermehrte Abwehrschwäche, erhöhte Infektionsanfälligkeit und einem steigenden Risiko für die Ausbildung eines späten MOFs gekennzeichnet ¹²¹.

Studien der vergangenen Dekaden haben gezeigt, dass die frühe Fehlregulation des Monozyten/Makrophagen Systems und der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle für die posttraumatische Immunmodulation spielt ^{75,121,169,174}. Hierbei bleibt jedoch unklar, welche initialen Steuerungsmechanismen für die Fehlregulation der Effektorzellen des unspezifischen Immunsystems verantwortlich sind ⁹⁷.

5.3 Immunkompetente Zellen

5.3.1 Monozyten

Monozyten sind im peripheren Blut zirkulierende immunkompetente Zellen, die quantitativ eher einen geringen Anteil der Blutmakrophagen darstellen. Durch Permeation der Gefäßwand sind sie in der Lage, in entzündlich verändertes Gewebe zu immigrieren und dort als Gewebemakrophagen zu Grunde gegangene Zellverbände und Gewebetrümmer zu beseitigen ¹⁶³. Daher kommt den Monozyten insbesondere in der posttraumatischen Phase besondere Bedeutung zu ^{22,60,104,173}. Physiologischerweise differenzieren Monozyten unter Zytokineinfluss zu dendritischen Zellen, die Antigene präsentieren können und somit einflussreiche immunmodulatorische Mediatoren darstellen ³⁴. Die Antigenpräsentation ist eine Voraussetzung für die Aktivierung der T-Lymphozyten. Diese wiederum können selber Zytokine freisetzen (*Lymphokine*), welche eine erneute Stimulation der antigenpräsentierenden Zellen, sowie die Proliferation der T-Lymphozyten induzieren ^{198,215}.

Eine Auswirkung der posttraumatischen Fehlregulation des Monozyten/Makrophagen Systems kann zu der Unfähigkeit führen, Antigene zu präsentieren ^{47,69} bzw. zu einer undifferenzierten Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren ²⁰⁸.

CD 14 ist ein Oberflächenantigen, das auf der Zelloberfläche myeloider Zellen exprimiert wird und die LPS-Aktivierung von CD-14 negativen Zellen, wie z. B. Endo- und

Epithelzellen, vermittelt ¹⁹⁷. Bei der LPS Aktivierung von Monozyten und Makrophagen konnte die Rolle von CD 14 sowohl auf biochemischer als auch auf genetischer Ebene bestätigt werden ^{69,207}.

5.3.2 Granulozyten

Neutrophile Granulozyten repräsentieren ungefähr 50-70% der weißen Blutzellen und stellen eine heterogene Zellgruppe, bestehend aus jungen und älteren Zellen, die wiederum in segmentkernige und hypersegmentierte Subtypen unterschieden werden, des angeborenen Immunsystems dar. Nur ca. 5% des vorhandenen Zellpools befinden sich in der systemischen Zirkulation, wohingegen 90 % im Knochenmark sind und weitere 5% im Bereich der Gefäßwände. Bislang wurde angenommen, ausgereifte Granulozyten seien nicht mehr zur Synthese inflammatorischer Mediatoren befähigt. Die Arbeitsgruppe um *Kobayashi et al.* war davon ausgegangen, dass Granulozyten über ein bestimmtes Arsenal präformierter Metabolite verfügen, die nach Aktivierung freigesetzt werden. Dieses Phänomen wurde als *respiratory burst* oder auch *oxidative burst* beschrieben ⁹⁷. Im Gegensatz dazu konnten *McDonald et al.* zeigen, dass PMN-Granulozyten nach externer Stimulation und konsekutiver NFκB Induktion in der Lage sind, inflammatorische Mediatoren zu synthetisieren ¹²⁷. Ferner kommt es bei einer Dysfunktion zur unregelmäßigen Expression inflammatorischer Mediatoren ^{98,208}. Somit kommen diesen Zellen weitere wichtige immun-regulative Funktionen zu ⁹⁹. Die Daten der vorliegenden Arbeit stützen eher die These, dass Granulozyten durchaus in der Lage sind noch Metaboliten zu bilden. Die potentielle Möglichkeit, dass nicht Granulozyten, sondern andere Zellen für diese Reaktion verantwortlich sein können, wird in der vorliegenden Arbeit durch die hohe Selektivität der MACS-Isolation in Kombination mit der FACS- Kontrollen ausgeschlossen.

5.4 STAT Translokation

5.4.1 Transkriptionsfaktor STAT

Die *Signal Transducer and Activator of Transcription*, STAT Proteine liegen unter physiologischen Umständen inaktiv im Zytoplasma der Zelle, bis sie durch einen extrazellulären Stimulus, wie beispielsweise Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Peptide, aktiviert werden^{44,54}. Dies erfolgt durch die Bindung des jeweiligen extrazellulären Mediators an den entsprechenden Rezeptor²⁹, wie beispielsweise IL-6 an den gp130 Zytokinrezeptor. Die Bindung an den Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung der *Januskinase* (JAK), die wiederum das betreffende STAT-Protein am Tyrosin- oder Serinrest phosphoryliert^{85,116,131}. Der somit aktivierte Transkriptionsfaktor bildet nun Homo- oder auch Heterodimere, transloziert in den Zellkern und induziert dort letztlich die Transkription entsprechender Reportergene^{33,58,78,79}.

Dadurch sind sie wesentlich an essentiellen Vorgängen, wie beispielsweise dem Zellzyklus, Apoptose, Wachstum und der Immunmodulation, beteiligt^{45,112,165,185}.

Die STAT Aktivierung und Translokation in den Zellkern wird durch hemmende Proteine im Sinne eines negativen Feedback Mechanismus reguliert, wie zum Beispiel durch die *Suppressors of Cytokine Signaling 1-7* (SOCS), die *Cytokine-Inducible SH2 Proteins* (CIS), die *Protein Inhibitors of Activated STAT* (PIAS) und andere. Hierbei sind insbesondere die SOCS Proteine in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt, da sie nicht nur die STAT Aktivität hemmend regulieren, sondern durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor in gleichem Maße den initiiierenden Mediator unterdrücken. SOCS1 wird beispielsweise durch STAT1 aktiviert und unterdrückt folglich die IFN- γ Signaltransduktionskaskade. SOCS3 hingegen wird durch STAT3 aktiviert, bindet an den gp130 Zytokinrezeptor und wirkt dort als hemmendes Moment¹⁰⁰. Studien haben jedoch gezeigt, dass aktiviertes SOCS3 auch eine Hemmung von STAT1 bewirkt, und SOCS1 im Gegenzug die Unterdrückung der STAT1 Aktivität induzieren kann⁸⁵.

Zahlreiche Studien der vergangenen Dekade haben klar aufgezeigt, dass insbesondere STAT1 und STAT3 an Inflamationsreaktionen, an Abwehrmechanismen und an der Immunmodulation beteiligt sind ^{7,114,123}. In vorangegangenen Pilotstudien wurde anhand eines genomweiten Microarray Screenings gezeigt, dass die Aktivität von STAT1 und STAT3 durch schwere Verletzungen, wie für Polytrauma typisch, erheblich beeinflusst wird ^{7,21}.

5.4.2 Die Bedeutung der STAT -Mutationen bei Erkrankungen des Menschen

Die bedeutende Rolle des STAT *Pathways* für die reguläre Entwicklung und Ausreifung der Zellen wurde in den vergangenen Jahren anhand mehrerer Krankheitsbilder entdeckt. So zeigen beispielsweise Patienten, die an einem klassischerweise autosomal dominant vererbten Hyper-IgE Syndrom leiden, eine Mutation in den STAT3 codierenden Genen, was dazu führt, dass deren T-Zellen nicht befähigt sind, in IL-17 produzierende (T_H17) T-Helfer Zellen zu proliferieren. Die T_H17 Zellen sind maßgeblich an der körpereigenen Abwehr von bakteriellen Erkrankungen und Pilzinfektionen beteiligt ^{132,134}. Die partielle Aufklärung der Pathophysiologie könnte zum einen eine zeitnahe Diagnosestellung und vor allem neue Behandlungsansätze für Patienten mit Hyper-IgE Syndrom ermöglichen. Bislang noch relativ ungeklärt sind die Ursachen für die skelettalen Veränderungen wie Überstreckbarkeit der Gelenke, Skoliose, erhöhte Knochenbrüchigkeit, Persistenz der Milchzähne oder Craniosynostosen. Auch hier spielt der STAT *Pathway* eine bedeutende Rolle. Zum einen konnte der *receptor activator of nuclear factor kappaß ligand* (RANKL) identifiziert werden, der STAT3 aktiviert und für die Osteoklastogenese verantwortlich ist ¹⁸⁰. Zum anderen zeigten Mäuse mit einem SOCS-1 knockout erhöhte Level von phosphoryliertem STAT1 und zugleich verminderte Knochenbildung und –mineralisierung ². Diese Erkenntnisse lassen neue Therapieansätze, wie beispielsweise Behandlungen mittels diverser Antikörper, bei immunologischen Knochenerkrankungen in greifbare Nähe rücken.

Des Weiteren könnte die Entdeckung der JAK2V617F Mutation bei der Pathogenese mindestens dreier myeloproliferativer Erkrankungen (Polycythaemia vera, essentielle Thrombozythämie, idiopathische Myelofibrose) zu neuen Möglichkeiten bei deren Behandlung führen. Neue in vitro Daten sowie Tierversuche zeigen, dass JAK2-Inhibitoren ein großes therapeutisches Potential sowohl bei JAK2V617F-positiven als auch bei JAK2V617F-negativen myeloproliferativen Syndromen haben. So konnte beispielsweise die Arbeitsgruppe um *Lipka* LS104 als einen ATP unabhängigen Inhibitor von JAK2 identifizieren, der zu einer Apoptose der JAK2V617F-Mutation führt und so ausschließlich bei den betroffenen Patienten zu einem Wachstumsstop der krankhaft veränderten Zellen führt ¹¹⁵. Ein anderer Tyrosinkinase Inhibitor CP-690,550 der von *Manshouri et al.* identifiziert wurde, reduziert die unkontrollierte Zellproliferation um die Hälfte ¹²².

Die Entdeckung von STAT1 und STAT3 und deren Rolle bei der Entstehung diverser Krankheitsbilder hat der Wissenschaft neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Therapieansätzen geliefert. Interferone werden beispielsweise bereits seit Jahren zur Behandlung von Hepatitis B, Hepatitis C, T-Zell Lymphom, Haarzellleukämie und Kaposi Sarkom, etc. verwendet. Die Therapie ist jedoch aufgrund ihrer knochenmarksuppressiven Wirkung mit unangenehmen Nebenwirkungen (z. B. Müdigkeit, grippale Infekte, Fieber, Leukopenie, Thrombopenie, Leberinsuffizienz, etc.) assoziiert, sodass neue Möglichkeiten, wie beispielsweise eine Therapie mit IFNlambda, einem neuen Interferon gesucht werden. IFNlambda führte in Versuchen zu einer verlängerten Aktivierung von STAT1 und STAT2 und führte darüber hinaus zur Apoptose von Zellen, die durch IFN- α nur in ihrem Wachstum gehemmt wurden ¹¹⁸.

Die Arbeitsgruppe um *Nelson* konnte den Wirkstoff Nifuroxazide, der sonst in Antidiarrhoika vorhanden ist, als einen potenten und selektiven Inhibitor von STAT3 in multiplen Myelomzellen identifizieren. Die zytotoxische Wirkung von Nifuroxazide auf die Myelomzellen ist auf deren Abhängigkeit von der STAT3 Aktivierung zurückzuführen ¹⁴³.

Andere Ansätze versuchen die STAT Bindung an die DNA durch Induktion von DNA Einzelsträngen, die dieselbe DNA Bindungssequenz aufweisen wie STAT3, zu verhindern. Diese Taktik zeigt sich bei der Behandlung von Hormon-resistenten Prostatakarzinomen erfolgreich ¹³. Auch an der Entstehung von Glioblastomen ist eine Überaktivierung von STAT3 beteiligt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Patienten mit einem Glioblastom im Vergleich zu gesunden Normalprobanden ein erhöhtes Level von phosphoryliertem STAT3, gekoppelt mit einer reduzierten Aktivität von *Protein Inhibitor of Activated STAT3* (PIAS3), einem physiologischen Inhibitor des Transkriptionsfaktors, aufwiesen. Diese Entdeckung lässt ebenfalls auf neue Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit Glioblastom spekulieren ²⁸.

Anhand dieser Entwicklungen wird deutlich, welches Potential die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 haben. Die Signaltransduktionskaskade bestimmt über Zellwachstum, Differenzierung und Ausreifung der Zellen und ist somit ein bedeutender Angriffspunkt für therapeutische Interventionen. Bislang existierten jedoch keine Daten über die Aktivität von STAT1 und STAT3 in humanen Immunzellen polytraumatisierter Patienten in der initialen posttraumatischen Phase.

5.5 Die STAT1 und STAT3 Aktivität im Kontrollkollektiv

Um eine Aussage über die Trauma induzierte Änderung der DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 machen zu können, wurden gesunden Normalprobanden als Vergleichsgruppe untersucht.

Die Blutproben wurden sowohl nativ, als auch nach 4 stündiger LPS Stimulation im Brutschrank, weiterverarbeitet. Das, von vielen Arbeitsgruppen verwendete, LPS ist ein

potenter Aktivator der körpereigenen Immunantwort. Die Stimulation mit LPS führt zu einer überschwänglichen Inflamationsreaktion^{69,71}. Auch in der vorliegenden Arbeit kann man deutlich die Unterschiede zwischen der Nativkontrolle und der stimulierten Kontrolle erkennen. Sowohl die STAT1 als auch die STAT3 Aktivität nimmt in beiden Zellpopulationen erheblich zu. Mit Ausnahme der nukleären Translokation von STAT1 in den Granulozyten waren die Unterschiede signifikant. Dies stimmt mit Ergebnissen aus der Literatur überein. *Kumar et al.* konnten beispielsweise mittels EMSA zeigen, dass die Induktion einer Sepsis mittels LPS zu einem signifikanten Anstieg der STAT1 DNA-Bindungsaktivität führt¹⁰².

Deutlich zu erkennen ist auch, dass sowohl in Monozyten als auch in Granulozyten quantitativ mehr STAT3 an die DNA bindet als STAT1. Verschiedene Autoren konnten in diesem Zusammenhang auch das Phänomen beobachten, dass STAT3 den Effekt von STAT1 inhibiert^{156,186}. Wir können letztlich nicht sicher sagen, worauf die ungleiche Aktivierung zurückzuführen ist.

Obschon die Transkriptionsfaktoren physiologischerweise latent im Cytoplasma der Zelle liegen bis sie phosphoryliert werden¹³¹, konnten wir in den Normalprobanden eine Basisaktivität von STAT1 und STAT3 detektieren. Auch zeigte sich im Vergleich zu den Monozyten eine vermehrte STAT1 Expression in den Granulozyten.

5.6 Patientenkollektiv

5.6.1 Translokation von STAT1

Die nukleäre Translokation von STAT1 fand sich in den Monozyten während des gesamten Beobachtungszeitraumes signifikant erhöht gegenüber der Nativkontrolle (259±34 vs. 397±78, 494±109, 478±120, 416±87, 474±84, 493±115 [AU], $p < 0,05$ im SNK test, KO- vs. STAT1 A-72h). Die frühe Aktivierung von STAT1 mit konsekutivem Anstieg der nukleären Translokation nach Trauma steht im Einklang mit Erkenntnissen aus der Literatur. Es zeigte

sich beispielsweise in einem Ischämie/Reperfusionsmodellen bereits nach 4 Stunden eine erhöhte STAT1 Aktivierung, die bis zu 16 Stunden auf diesem Level blieb ^{186,194}. Ein Grund dafür ist sicherlich die rasche Aktivierung durch Interferone, welche bedeutend an der Inflamationsreaktion beteiligt sind ¹¹⁷. *Samy et al.* konnten zeigen, dass ein hämorrhagischer Schock mit einer sofortigen Aktivierung und konsekutiver Phosphorylierung von STAT1 einhergeht¹⁶⁷.

In den Granulozyten dagegen, zeigt sich die initiale Aktivität von STAT1 niedriger als die der Nativkontrolle, reduziert sich nochmals bis zur 6 Stunden Abnahme um danach langsam wieder auf ein Maximum bei 72 Stunden anzusteigen. Das Aktivitätsausmaß, das in der Positivkontrolle detektiert wurde, wird dabei jedoch nicht erreicht.

Die Reduktion der transkriptionalen Aktivität von STAT1 in der initialen posttraumatischen Phase von Aufnahme (A) bis zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Trauma ist signifikant gegenüber der Positivkontrolle (1164±204 vs. 618±139, 460±81, 464±106 [AU]; p<0,05 Anova on Ranks test, KO+ vs.A-12h) und der Aktivität zum Zeitpunkt 72 Stunden (1137±212 vs. 618±139, 460±81, 464±106 [AU]; p<0,05 SNK test, 72h vs. A-24h). Während in den Monozyten das Level der nukleären Translokation im Beobachtungszeitraum verhältnismäßig homogen bleibt, kann man in der Granulozytenpopulation nach 6 und 12 Stunden ein Aktivitätseinbruch mit konsekutivem Anstieg bis zu einem Maximalwert bei 72 Stunden erkennen. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Anzahl zirkulierender *polymorphkerniger neutrophiler Lymphozyten* nach 3 Stunden post trauma ansteigt, um nach 6 und 12 Stunden einen dramatischen Einsturz zu verzeichnen. Dieser zeigte sich deutlich gravierender in den Patienten mit Multiorganversagen ²⁵. Möglicherweise ist der Grund für die Abnahme der zirkulierenden Zellen die Diapedese in das Gewebe und die Organe. Dies würde auch die Mehrinfiltration in die Organe mit Reduktion der Konzentration in der systemischen Zirkulation in den Patienten mit Multiorganversagen erklären.

Bei der Aufteilung des Patientenkollektivs hinsichtlich klinischer Parameter des Multiorganversagens, der Verletzungsschwere, erhaltener Massentransfusion und dem *outcome* konnte man eine deutliche Reduktion der transkriptionalen Aktivität verzeichnen.

5.6.2 Translokation von STAT3

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation von STAT3 in Monozyten und Granulozyten von polytraumatisierten Patienten durch das Ereignis „Trauma“ weit über das Niveau der Negativkontrolle hinaus stimuliert wird. Der starke Anstieg bereits in der Initialabnahme lässt darauf schließen, dass dieser Transkriptionsfaktor offensichtlich direkt nach Trauma aktiviert wird. Diese Hypothese steht in Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So zeigte sich STAT3 im Verbrennungsmodell bereits nach 1 Stunde ²⁰², in einer Inflamationsreaktion der Lunge sogar schon nach 30 Minuten ^{65,178} erhöht. STAT3 liegt physiologischerweise latent im Cytoplasma vor und wird durch entsprechende extrazelluläre Mediatoren aktiviert. Hierzu gehören insbesondere IL-6 und IL-10 ^{183,211}. In der Literatur kann man IL-6 mehrfach als Marker für die Verletzungsschwere der Patienten, deren *outcome* oder auch als Sepsisparameter finden ^{66,71,119}. Bereits initial nach Trauma konnten erhöhte IL-6 Spiegel detektiert werden, wobei *Hensler et al.* zeigten, dass diese nach 6 Stunden ein Peak erreichen ⁸². Dem unspezifischen Immunsystem wird eine bedeutende Rolle für die Ausbildung des posttraumatischen Immunsystemdysfunktionssyndroms zugeschrieben. IL-6 ist beteiligt an der Interaktion zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem, indem es beispielsweise mitwirkt an der Lymphozytenaktivierung, der Monozyten/Makrophagendifferenzierung, der Kontrolle von T-Zellen und der IL-2 abhängigen Zellproliferation ^{36,128}. Dabei erfolgt die Signaltransduktion durch Bindung an den gp130 Zytokinrezeptor, was eine Aktivierung der *Januskinase* und von STAT3 zur Folge hat. Der negative Feedback Regulator wiederum, das SOCS3, wird durch STAT3 aktiviert und inhibiert den gp130 Zytokinrezeptor mittels Dephosphorylierung. Dieser Kreislauf ist

ausschlaggebend für eine adäquate Immunantwort^{12 101}. Die initial bereits erhöhte STAT3 Aktivität stimmt mit den beobachteten IL-6 Ausschüttungen nach Trauma überein^{66,142}.

IL-6 und IL-8 werden Aktivitätsmaxima nach 6 und 12 Stunden post trauma nachgesagt. Dies könnte eine Begründung für die Aktivitätssteigerung von STAT3 nach 24 Stunden sein. In den Monozyten jedoch ist diese nur geringfügig ausgeprägt.

In den Monozyten hingegen weist STAT3 nach 72 Stunden die geringste Translokation auf. Ferner wird der Transkriptionsfaktor in den Monozyten stärker exprimiert als in den Granulozyten. Dies lässt möglicherweise auf eine unterschiedliche Beteiligung der beiden Zellpopulationen an der Induktion dieser Signaltransduktionskaskade schließen. Möglicherweise verfügen aber auch die Monozyten über größere STAT3 Speicher, wohingegen in den Granulozyten nach 12 Stunden eine Neusynthese des Transkriptionsfaktors STAT3 zu erfolgen hat.

Für den Transkriptionsfaktor STAT1 zeigt sich die gleiche posttraumatische Dynamik wie für STAT3, jedoch mit dem Unterschied, dass STAT1 quantitativ weniger Aktivität aufweist als STAT3. Dies stimmt mit den Beobachtungen aus der Literatur überein, dass STAT3 hemmende Wirkung auf STAT1 haben kann^{5,101}.

Es zeigt sich ganz deutlich, dass die Induktion und Aufrechterhaltung der posttraumatischen Inflamationsreaktion durch ein komplexes Netzwerk multipler Mediatoren und Kaskaden initiiert wird. Zusätzlich sind Faktoren, wie beispielsweise iatrogene Eingriffe, genetische Dispositionen, Verletzungsschwere und Infektionen an der Modulation der Immunantwort beteiligt. Die vollständige Klärung der ineinander greifenden und sich zu einem komplexen System verzahnenden Faktoren bedarf noch vieler weiterer Untersuchungen. Aufgrund der vorliegenden Studie lässt sich jedoch ganz klar sagen, dass STAT1 und STAT3 eine Rolle in der posttraumatischen Inflamationskaskade einnehmen, und dass diese unter Umständen

von großer Bedeutung ist, denn eine Reduktion deren Aktivität zeigte sich in beiden Zellpopulationen in Verbindung mit einem schlechten klinischen Verlauf der Patienten.

5.7 Einteilungen des Patientenkollektivs

5.7.1 Anatomische Verletzungsschwere

In der vorliegenden Studie erfolgte die Einteilung der Patienten anhand ihrer anatomischen Verletzungsschwere, ausgedrückt mittels *New Injury Severity Score* (NISS) in der Modifikation nach *Osler* ¹⁵¹. Der NISS ist eine überarbeitete Version des *Injury Severity Scores* (ISS) und berücksichtigt im Vergleich zum klassischen ISS die drei schwersten Verletzungen ungeachtet der betroffenen Körperregion. Die anatomische Verletzungsschwere wird somit weitaus realistischer betrachtet ^{11,72}.

Die Scoringsysteme zur Beurteilung von schwerst verletzten Patienten dienen zum einen der schnellen Einschätzung der Verletzungsausmaße und der Einleitung adäquater Therapiemaßnahmen, zum anderen aber auch der Verlaufskontrolle und der Patienteneinteilung in diverse Gruppen.

Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Scoringsysteme hinsichtlich der zur Beurteilung verwendeten Parameter, wie den physiologischen Variablen und dem anatomischen Verletzungsmuster sowie Kombinationen aus beiden. Ferner spielt der Zeitpunkt, zu dem das entsprechende Scoringssystem eingesetzt wird, eine entscheidende Rolle. So finden im präklinischen Bereich hauptsächlich der *Glasgow Coma Scale* (GCS) und der *Revised Trauma Score* (RTS) Verwendung. Der RTS nach *Champion et al.* enthält den GCS, den systolischen Blutdruck und die Atemfrequenz ³⁵. Die Anwendbarkeit des RTS wird heute jedoch kritisch betrachtet, da er aufgrund der benötigten physiologischen Parameter nicht ubiquitär auf alle Patienten anwendbar ist ⁶⁴.

Nach Abschluss der Primärdiagnostik werden anatomische Scores wie *Injury Severity Score* (ISS), der verbesserte *New Injury Severity Score* (NISS) sowie das *Anatomische Profil* (AP)

benutzt. Die anatomischen Scores bauen auf dem so genannten *Abbreviated Injury Scale* (AIS) auf. Dieser besteht aus einem umfangreichen Katalog mit über 2000 Diagnosen und Symptomen und ordnet allen Einzelverletzungen einen von sechs Schweregraden zu. Die Schweregradeinteilung des AIS erfolgte durch Expertenmeinung mit den Punktwerten 1-6⁶⁸. Insbesondere zur Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit bezüglich Morbidität und Letalität wurden die kombinierten Scoringssysteme wie der *Trauma Injury Severity Score* (TRISS) und der *A Severity Characterization of Trauma* (ASCOT) entwickelt. Schon seit 1987 wird der TRISS zur Abschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit angewandt. Durch eine Verknüpfung von ISS, RTS, Patientenalter und Verletzungsmechanismus werden sowohl physiologische als auch anatomische Parameter verwendet²⁶. Mehrere Variationen des TRISS existieren bereits, da dieses Scoringssystem nicht auf alle polytraumatisierten Patienten anwendbar ist. Ein großes Problem stellt beispielsweise die für den RTS geforderte Atemfrequenz dar, da die Mehrzahl der Schwerstverletzten bereits bei Eintreffen im Schockraum intubiert ist. Im deutschsprachigen Raum wird auch der *Hannover Score for Polytrauma Outcome* (HASPOC) verwendet, der nicht nur die aktuelle Verletzungsschwere, sondern auch Fakten wie das subjektive Befinden und Rehabilitation berücksichtigt^{182,216}. Im Vergleich der verschiedenen Scoringssysteme zeigt sich, dass der NISS am besten geeignet ist, die inhomogene Gruppe der polytraumatisierten Patienten vergleichbar zu machen, da er bei allen Patienten anwendbar ist, und keine physiologischen Parameter, wie beispielsweise Blutdruck, Beatmung, Pulsfrequenz, die durch präklinische Therapien modifiziert wurden, eine Rolle spielen.

Durch das Einschlusskriterium des hohen NISS von größer 16 Punkten, wurde ein Patientenkollektiv analysiert, das aufgrund seiner hohen Inzidenz für ein posttraumatisches MOF (>25%) ein relevantes Problem in der Polytraumaversorgung darstellt^{204,205}.

So konnten *Ertel et al.* an einem retrospektiv analysierten Kollektiv von 1278 Polytraumapatienten bei hohem ISS eine Inzidenz für die Entwicklung eines SIRS mit 80%, sowie für die Entwicklung eines posttraumatischen MODS mit 85% festlegen⁵⁹.

Zur Unterteilung des Patientenkollektivs wurde ein NISS = 41 Punkten gewählt, da dieser Wert den Median repräsentiert. In der granulozytären Zellpopulation zeigte sich die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 in den Patienten mit einem NISS größer 41 Punkten nach 6 (927±231 vs. 2535±387 [AU]), 12 (663±187 vs. 2503±397 [AU]) und nach 24 Stunden (858±188 vs. 2481±532 [AU]) signifikant reduziert gegenüber den leichter Verletzten ($p<0,05$, Anova on Ranks followed by Kruskal-Wallis, NISS<41 vs. NISS>41)). Die Translokation von STAT3 in das nukleäre Kompartiment der Monozyten schwerer verletzter Patienten, ausgedrückt durch einen höheren NISS, war im gesamten Beobachtungszeitraum deutlich reduziert gegenüber den leichter Verletzten.

5.7.2 MOF

Zur Dokumentation der physiologischen Verletzungsschwere wurde der *Multiple Organ Failure Score* nach *Goris* in der Modifikation nach *Lefering* verwendet¹⁰⁹. Dies bietet die Möglichkeit, das posttraumatische Organversagen quantitativ zu erfassen und das Patientenkollektiv in klinische Gruppen einzuteilen (beispielsweise MOF<4Punkte: kein relevantes Multiorganversagen, MOF>4Punkte: relevantes, manifestes Multiorganversagen).

Nichtsdestotrotz wird der *MOF Score* in der Literatur kontrovers diskutiert^{142,159}, da in ihn Parameter eingehen, die durch innerklinische Interventionen, wie beispielsweise der Intubation mit Beatmung, der Catecholamingabe, etc. beeinflusst werden können⁴⁴. Aufgrund der insbesondere in der initialen posttraumatischen Phase vermehrt durchgeführten Maßnahmen gehen die Meinungen über den Zeitpunkt, ab dem von einem Multiorganversagen gesprochen werden darf, auseinander. Einige Autoren sprechen deshalb erst ab 48 Stunden post trauma von einem verwertbaren *MOF Score*³⁹. Da diese Studie

jedoch darauf abzielt, die intrazellulären Regelmechanismen in polytraumatisierten Patienten näher zu identifizieren, und alle diese Patienten initiale Interventionen erfahren, ist der *MOF Score* eine geeignete Möglichkeit, um dieses Kollektiv in Gruppen zu unterteilen. Die Interventionen, wie Catecholamingaben¹⁹ oder Beatmung stellen nicht nur den *MOF Score* in ein kritisches Licht, sondern könnten selbstverständlich auch die Immunreaktion beeinflussen und somit die Ergebnisse potentiell verfälschen. Wir können hierbei nicht unterscheiden, ob die gemessenen Mediatoren als alleinige Antwort auf den Stimulus „Trauma“ diese Dynamik im posttraumatischen Verlauf zeigen, oder ob sie nicht auch durch exogene Faktoren beeinflusst werden. Nichtsdestotrotz war es Ziel dieser Studie, die posttraumatischen Inflammationsreaktionen zu erfassen. Aufgrund standardisierter Behandlungsstrukturen wiesen die eingeschlossenen Patienten alle die gleichen Grundvoraussetzungen, bestehend aus iatrogenen Störfaktoren wie Beatmung, Medikation, etc. auf. Die Komplexität der posttraumatischen Vorgänge in den einzelnen Patienten muss vergleichbar gemacht werden, da sonst keine Aussagen über Unterschiede bezüglich Verletzungsschwere, *outcome*, etc. gemacht werden können.

Unseren Analysen zufolge, wiesen Patienten mit einem relevanten Multiorganversagen, im Vergleich zu denen mit einem $MOF < 4$, während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine reduzierte Translokation von STAT3 in das nukleäre Kompartiment der Granulozyten auf.

5.7.3 Überleben

Anhand der monozytären Analyse konnte in den verstorbenen Patienten eine signifikante Reduktion der transkriptionalen Aktivität von STAT1 (zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Trauma) und von STAT3 (zum Zeitpunkt 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Trauma) nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Granulozytenpopulation ergab ebenfalls eine Reduktion der Aktivität von STAT3 und STAT1 in den verstorbenen Patienten. Die nukleäre Translokation von STAT1 war zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Trauma signifikant reduziert.

Die beiden Transkriptionsfaktoren sind entscheidend an Zellzyklus und Apoptose beteiligt. Verschiedene Arbeitsgruppen haben Untersuchungen zur Identifizierung der Position von STAT1 und STAT3 bei der Carcinogenese und Apoptose durchgeführt^{30,31}. Hierbei konnten *Tomita et al.* feststellen, dass STAT3 wesentlich an Apoptose und Entwicklung akuter lymphatischer Leukämiezellen beteiligt ist¹⁹⁵. *Wang et al.* konnten zeigen, dass STAT3 bei der myokardialen Rekonvaleszenz nach Ischämie/Reperfusion substantielle apoptotische Regulation zukommt²⁰¹. Ferner zeigt sich insbesondere STAT1 entscheidend beteiligt an der Modulation und Induktion von Apoptosevorgängen⁹⁵.

Die polytraumatisierten Patienten unserer Studie wiesen jedoch eine reduzierte Aktivität der für die Apoptose bedeutenden Transkriptionsfaktoren auf. Die Gründe hierfür sind unklar. Eine mögliche Erklärung der diskrepanten Ergebnisse könnte im unterschiedlichen Untersuchungsmaterial liegen. Während die anderen Arbeitsgruppen Tiermodelle oder Zellkulturexperimente verwendet haben, konnten wir mit humanen Zellen arbeiten. Ferner ist bislang noch nicht erforscht, wie schnell die hemmenden Faktoren, wie beispielsweise SOCS Proteine, ausgeschüttet werden und mittels negativen Feedback Mechanismen die Aktivität der STAT Proteine reduzieren.

5.7.4 Massentransfusion

Ein kritischer Aspekt ist die oftmals lebensnotwendige Gabe von Blutprodukten. Zahlreiche Studien haben die Massentransfusion als ein Risikofaktor für die Entstehung eines Multiorganversagens identifiziert. Eine Transfusion von mehr als sechs Erythrozytenkonzentraten hat sich dabei als signifikant erwiesen^{17,81,170}. Letztlich steht dabei jedoch die Stabilisierung des Patienten im Vordergrund. Da es sich hierbei um schwerst

verletzte Patienten handelt, die sich meist im hämorrhagischen Schock befinden, benötigen sie aufgrund ihrer lebensbedrohlichen Situation diese Blutprodukte.

Theoretisch denkbar wäre auch eine Kontamination der entnommenen Blutprobe durch Spenderleukozyten, die das Untersuchungsergebnis verfälschen könnten. Die verwendeten Erythrozytenkonzentrate sind leukozytenfiltriert, d.h. der Leukozytenanteil beträgt ungefähr 5×10^5 Leukozyten pro 300ml¹⁵⁸. Damit liegt der potentiell mögliche Anteil Fremdzellen bei einer mittleren Konzentration von 5×10^6 Leukozyten pro ml unter einer Promille in der Zirkulation des Patienten. Dieser Anteil ist zum einen sehr gering, zum anderen werden solche Fremdzellen sofort immunologisch vom Akutsystem erkannt und eliminiert, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Fremdkontamination sehr gering ist.

Unsere Analysen hinsichtlich der Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 in den beiden Patientengruppen ergab, dass die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors in den Patienten, die massentransfundiert werden mussten, reduziert ist gegenüber denen, die weniger als 10 Erythrozytenkonzentrate erhalten haben. In den PMN Granulozyten zeigte sich der Unterschied in der frühen posttraumatischen Phase, bei Aufnahme (444 ± 151 vs. 854 ± 245 [AU]), nach 6 Stunden (293 ± 56 vs. 688 ± 155 [AU]) und nach 12 Stunden (269 ± 66 vs. 730 ± 213 [AU]) signifikant ($p < 0,05$, Anova on Ranks).

Der Transkriptionsfaktor STAT3 zeigte in den Monozyten ebenfalls eine signifikant reduzierte Aktivität in den Patienten, die eine Massentransfusion erhalten hatten. Hierbei waren die Unterschiede jeweils bei Aufnahme (1808 ± 543 vs. 3776 ± 629 [AU]), nach 6 (2135 ± 783 vs. 3580 ± 674 [AU]), sowie nach 12 (1813 ± 562 vs. 3466 ± 709 [AU]), 24 (2073 ± 703 vs. 4153 ± 674 [AU]) und 48 (1857 ± 573 vs. 4015 ± 675 [AU]) Stunden signifikant ($p < 0,001$, Anova on Ranks).

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- i) In gesunden Normalprobanden lässt sich mittels EMSA eine Basisaktivität von STAT1 und STAT3 in Monozyten und Granulozyten detektieren, und die Stimulation mittels LPS bewirkt einen signifikanten Anstieg der nukleären Translokation von STAT1 und STAT3 in beiden Zellpopulationen.
- ii) Die Analyse der beiden Transkriptionsfaktoren im Patientenkollektiv zeigt, dass bereits bei Aufnahme die Aktivität von STAT3 und STAT1 (Ausnahme: STAT1 in Granulozyten) im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht war, woraus sich eine sehr frühe Aktivierung ableiten ließe.
- iii) Obschon der Stimulus „Trauma“ zu einer signifikant erhöhten Aktivität von sowohl STAT1 als auch von STAT3 führt, weisen die schwerer verletzten Patienten und die Verstorbenen eine deutlich bis signifikant reduzierte DNA-Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren auf.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Destabilisierung des menschlichen Immunsystems nach schwerem Trauma ist aufgrund der häufigen konsekutiven Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens, das noch immer die Hauptursache für die Spätletalität nach Polytrauma darstellt, ein relevantes Problem für das Management dieser Patienten ^{52,171}. Umfangreiche Studien der vergangenen Dekade haben gezeigt, dass frühe immunologische Veränderungen, insbesondere der Zellen des angeborenen Immunsystems, der Monozyten und Granulozyten, nach Trauma dabei eine essentielle Rolle spielen ^{106,214}. Zahlreiche Untersuchungen konnten zwar Ergebnisse bezüglich trauma-induzierter Zytokine präsentieren, die übergeordneten transkriptionalen Steuerungsmechanismen dieser Effektorzellen sind bislang jedoch weitgehend ungeklärt ^{63,126,170}. Als essentielle Transkriptionsfaktoren bei der Induktion posttraumatischer Inflammationskaskaden, konnten *Signal Transducer and Activator of Transcription*, STAT1 und STAT3 identifiziert werden. Diese sind befähigt, nach entsprechender Aktivierung und Phosphorylierung durch die Januskinase, in den Zellkern zu translozieren und dort, nach Bindung an die DNA, die Expression diverser pro- als auch antiinflammatorischer Reportergene zu induzieren. Da die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in Zellen des unspezifischen Immunsystems in polytraumatisierten Patienten bislang jedoch unzureichend charakterisiert ist, waren die Teilziele der vorliegenden Studie wie folgt:

Teilziel 1:

Wie verhält sich die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in Monozyten und Granulozyten von Normalprobanden sowohl nativ, zur Detektion der Basisaktivität, als auch nach artifizieller Stimulation mittels bakteriellem Lipopolysaccharid als Positivkontrolle?

Antwort:

Aus den 30ml Blutproben wurden Monozyten und Granulozyten mittels magnetic beads (CD14, CD15) isoliert. Dann wurden, anhand von Proben gesunder Normalprobanden, ideale Konditionen etabliert, um die nukleäre Translokation von STAT1 und STAT3 mittels *E-*

lectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) nachzuweisen. Die Proben wurden sowohl nativ verarbeitet als auch nach artifizierter Stimulation mittels bakteriellem LPS.

Die dabei ermittelten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tab.27: densitometrische Auswertung der STAT3 und STAT1 Aktivität in den Normalprobanden

Arbitrary Units AU Probanden n=6	nativ		LPS	
	<i>STAT1</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT1</i>	<i>STAT3</i>
Monozyten	259±34	1243±420	517±70*	3258±1094*
Granulozyten	692±120	1511±174	1164±204	2485±340 *

*=p<0,05 in U-test nativ vs. LPS

Deutlich zu erkennen sind die signifikanten Änderungen der STAT1 und STAT3 DNA-Bindungsaktivität in Monozyten und Granulozyten. Unsere Methode liefert somit valide und reproduzierbare Ergebnisse und kann nun am Patienten zum Einsatz kommen.

Teilziel 2:

Lässt sich die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten mittels EMSA nachweisen, und wie verhält sich deren Dynamik innerhalb der frühen posttraumatischen Phase bis 72 Stunden nach Trauma?

Antwort:

Die Proben wurden von n=26 polytraumatisierten Patienten mit einem NISS>16 Punkten, (Median: 41 Punkte) bei Aufnahme (innerhalb 90 Minuten nach Trauma) und dann nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h nach Trauma gewonnen, daraus Monozyten und Granulozyten isoliert, und die STAT1 und STAT3 DNA Bindungskapazität ermittelt.

Tab.28: densitometrische Auswertung der STAT3 und STAT1 Aktivität in den Patienten

[AU]; Patienten : n=26	Monozyten		Granulozyten	
	<i>STAT1</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT1</i>	<i>STAT3</i>
KO-	259±34*	1243±420	692±120	1511±174
KO+	517±70	3258±1094	1164±204#	2485±340
A	397±78*	2640±447	618±139*#	1878±326
6 h	494±109*	2746±544	460±81*#	1731±273
12h	478±120*	2513±462	464±106*#	1583±283
24h	416±87*	2953±528	673±133*	1670±321
48h	474±84*	2846±484	943±150	2208±324
72h	493±115*	2261±556	1137±212*	2343±406

*= p<0,05 SNK test, STAT1 Monozyten A-72h vs. KO-;

STAT1 Granulozyten 72h vs. A-24h

#= p<0,05 Anova on Ranks, KO+ vs. A-12h STAT1 Granulozyten

Die wesentlichen Ergebnisse waren hierbei:

- i) STAT1 zeigte in den Monozyten während des gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikant gesteigerte Aktivität gegenüber der Nativkontrolle (siehe*).
- ii) In den Granulozyten zeigte sich die Aktivität von STAT1 bis zum Zeitpunkt 12 Stunden post trauma signifikant reduziert gegenüber der Positivkontrolle (siehe*).
- iii) Ferner ist die Aktivität von STAT1 zum Zeitpunkt 72 Stunden post trauma signifikant erhöht gegenüber der Aktivität bei Aufnahme (A), sowie nach 6, 12 und 24 Stunden (siehe #). STAT3 zeigte sich dabei in beiden Zellpopulationen im gesamten Beobachtungszeitraum erhöht gegenüber der Nativkontrolle.

Diese Daten lassen sich als frühe Aktivierung des unspezifischen Immunsystems nach Polytrauma interpretieren und gehen somit einher mit der *Danger Signals* Theorie von Matzinger¹²⁵. Die vorliegenden Daten weisen nun erstmals am Patienten nach, dass diese Mechanismen offensichtlich eine tragende Rolle an der Ausbildung und Ausprägung der posttraumatischen Immunfunktionsstörungen haben.

Teilziel 3:

Lassen sich dabei Ergebnisse der transkriptionalen Aktivität von STAT1 und STAT3 mit dem klinischen Verlauf, der Verletzungsschwere, sowie dem Überleben der Patienten und der Anzahl der erhaltenen Blutkonserven in Verbindung setzen?

Antwort:

Hierzu wurden die im Teilziel 2 gewonnen Daten mit substantiellen Eckpunkten des klinischen Verlaufes verglichen, d.h. die Patienten wurden gruppiert in jeweils dichotome Gruppen in Abhängigkeit der Merkmale: Massentransfusion (>10Eks/24h), Verletzungsschwere (NISS), Ausbildung eines Multiorganversagens (MOF-Score>4 Punkten) und des *outcomes* (Versterben 90 Tage nach Trauma).

Aus den hierbei gewonnen Daten lassen sich folgende wesentliche Informationen gewinnen:

Massentransfusion

- i) Die Bindungskapazität von STAT1 in Monozyten ist bei den Patienten, die mehr als 10 Erythrozytenkonzentrate bekommen haben, während des gesamten Beobachtungszeitraumes erniedrigt gegenüber den Patienten, die weniger Blutprodukte benötigt haben (vgl. **Abb.11**, p56). In den Granulozyten war der Unterschied signifikant.
- ii) Im Gegensatz dazu fand sich die Aktivität von STAT3 in Monozyten von massentransfunden Patienten bei Aufnahme, sowie nach 6, 12, 24 und 48 Stunden signifikant reduziert gegenüber den anderen Patienten. (vgl. **Abb.17**, p63).
- iii) Diese signifikante Reduktion (A-12h) fand sich für STAT1 auch in Granulozyten (vgl. **Abb.22**, p69), während STAT3 in den Granulozyten keine Unterschiede zeigte.

Verletzungsschwere

Die Patienten wurden in dichotome Gruppen von NISS>41 und <41 Punkten eingeteilt, und die Bindungsaktivitäten verglichen. Dabei fanden sich im Wesentlichen:

- i) In Monozyten war kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit ausgeprägterer Verletzungsschwere gegenüber solchen mit geringeren Verletzungen zu erkennen (vgl. **Abb.13**, p59; **Abb.19**, p65).
- ii) Im Gegensatz dazu fand sich in Granulozyten die STAT3 Aktivität signifikant reduziert (6h, 12h, 24h, vgl. **Abb.30**, p79). Die STAT1 Aktivität wies ebenfalls keine Unterschiede auf (vgl. **Abb.24**, p72).

Multiorganversagen

Hierfür wurden Patienten in zwei Gruppen mit einem MOF Score>4 oder <4 Punkten eingeteilt, und die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in Monozyten und Granulozyten verglichen.

Die hierbei ermittelten wesentlichen Ergebnisse waren:

- i) In Monozyten fand sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.
- ii) In Granulozyten war die Bindungsaktivität von STAT3 in Patienten mit einem MOF Score von größer 4 Punkten zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant reduziert.

Outcome

Für diese Subgruppenanalyse wurden die Patienten eingeteilt in eine Gruppe, welche innerhalb von 90 Tagen nach dem Trauma am Multiorganversagen verstorben sind und solche, die überlebt haben.

Daraus ließen sich im Wesentlichen folgende Ergebnisse ermitteln:

- i) Die STAT1 Aktivität war in Monozyten verstorbener Patienten deutlich und zum Zeitpunkt 12h post trauma signifikant reduziert.
- ii) Dies geht einher mit einer signifikanten Reduktion von STAT3 in Monozyten zum Zeitpunkt 6h, 12h, 24h und 48h.
- iii) Im Gegensatz dazu war die STAT1 Aktivität in Granulozyten lediglich nach 72h signifikant reduziert in verstorbenen Patienten, während die STAT3 Aktivität keine signifikanten Änderungen aufwies.

Dateninterpretationen, Schlussfolgerungen und Ausblick:

Die vorgelegten Daten stellen eine erstmalige Analyse der intranukleären DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in Zellen des unspezifischen Immunsystems polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase dar. Damit leisten die Daten einen wesentlichen Beitrag zur aktuellen Diskussion über die pathophysiologischen Mechanismen der posttraumatischen Immundefunktionsstörungen und adressieren die gerade in der jüngsten Literatur intensiv diskutierten Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 in ihrer Funktion als Steuerungsorganelle der *Suppressor of Cytokines* (SOCS) Proteine. Die Induktion der Bindungskapazität von STAT1 und 3 in Monozyten und Granulozyten im gesamten Kollektiv weist auf die beginnende systemische Entzündungsreaktion hin, und die Reduktion in massentransfundenen bzw. verstorbenen Patienten auf die bereits postulierte Unfähigkeit des Immunsystems, nach schwererer Verletzung adäquat zu reagieren. Die Daten könnten somit einen potentiellen Schlüsselmechanismus aufzeigen und sind Grundlage weiterer Folgeuntersuchungen. Hierbei soll die Frage nach der biologischen Relevanz als Ausdruck der tatsächlichen SOCS Veränderungen untersucht werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAC Pressemitteilung. 2006.
2. Abe T et al. Osteoblast differentiation is impaired in SOCS-1-deficient mice. *J Bone Miner Metab* 2006; 24: 283-90.
3. Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, Cavaillon JM. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 30-8.
4. Adrie C et al. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation* 2002; 106: 562-8.
5. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 503-29.
6. Alonzi T et al. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1621-32.
7. Andrejko KM, Chen J, Deutschman CS. Intrahepatic STAT-3 activation and acute phase gene expression predict outcome after CLP sepsis in the rat. *Am J Physiol* 1998; 275: G1423-G1429.
8. Angele MK, Chaudry IH. Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 333-41.
9. Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6: 298-305.
10. Ayala A, Chung CS, Grutkoski PS, Song GY. Mechanisms of immune resolution. *Crit Care Med* 2003; 31: S558-S571.
11. Balogh ZJ et al. The new injury severity score is a better predictor of extended hospitalization and intensive care unit admission than the injury severity score in patients with multiple orthopaedic injuries. *J Orthop Trauma* 2003; 17: 508-12.
12. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. *Unfallchirurg* 2000; 103: 355-63.
13. Barton BE, Karras JG, Murphy TF, Barton A, Huang HF. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 11-20.
14. Baue AE. Multiple organ failure--the discrepancy between our scientific knowledge and understanding and the management of our patients. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 441-53.
15. Baue AE. Sepsis, systemic inflammatory response syndrome, multiple organ dysfunction syndrome, and multiple organ failure: are trauma surgeons lumpers or splitters? *J Trauma* 2003; 55: 997-8.
16. Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 1998; 10: 79-89.

17. Beale E et al. Blood transfusion in critically injured patients: a prospective study. *Injury* 2006; 37: 455-65.
18. Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000; 165: 1612-7.
19. Bergmann M et al. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock* 1999; 12: 421-7.
20. Bhanoori M et al. Thiol alkylation inhibits the mitogenic effects of platelet-derived growth factor and renders it proapoptotic via activation of STATs and p53 and induction of expression of caspase1 and p21(waf1/cip1). *Oncogene* 2003; 22: 117-30.
21. Biberthaler P et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock* 2005; 24: 11-9.
22. Biberthaler P et al. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)* 2001; 200: 93-105.
23. Biberthaler P et al. Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock* 2004; 22: 527-32.
24. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125: 680-7.
25. Botha AJ et al. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma* 1995; 39: 411-7.
26. Boyd CR, Tolson MA, Copes WS. Evaluating trauma care: the TRISS method. Trauma Score and the Injury Severity Score. *J Trauma* 1987; 27: 370-8.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
28. Brantley EC et al. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4694-704.
29. Brierley MM, Fish EN. Stats: multifaceted regulators of transcription. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 733-44.
30. Bromberg J, Darnell JE, Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19: 2468-73.
31. Bromberg JF. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays* 2001; 23: 161-9.
32. Bustamante J et al. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 39-48.
33. Calo V et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003; 197: 157-68.

34. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33: S506-S509.
35. Champion HR et al. A revision of the Trauma Score. *J Trauma* 1989; 29: 623-9.
36. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000; 1: 510-4.
37. Ciesla DJ et al. A 12-year prospective study of postinjury multiple organ failure: has anything changed? *Arch Surg* 2005; 140: 432-8.
38. Ciesla DJ et al. The role of the lung in postinjury multiple organ failure. *Surgery* 2005; 138: 749-57.
39. Ciesla DJ et al. Multiple organ dysfunction during resuscitation is not postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 2004; 139: 590-4.
40. Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002; 17: 83-90.
41. Cotter MJ, Muruve DA. Isolation of neutrophils from mouse liver: A novel method to study effector leukocytes during inflammation. *J Immunol Methods* 2006; 312: 68-78.
42. Cotter MJ, Norman KE, Hellewell PG, Ridger VC. A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am J Pathol* 2001; 159: 473-81.
43. Cryer HG. Advances in the understanding of multiple organ failure. *Surg Infect (Larchmt)* 2000; 1: 165-70.
44. Cryer HG et al. Multiple organ failure: by the time you predict it, it's already there. *J Trauma* 1999; 46: 597-604.
45. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277: 1630-5.
46. de Beaucoudrey L et al. Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. *J Exp Med* 2008; 205: 1543-50.
47. De AK, Laudanski K, Miller-Graziano CL. Failure of monocytes of trauma patients to convert to immature dendritic cells is related to preferential macrophage-colony-stimulating factor-driven macrophage differentiation. *J Immunol* 2003; 170: 6355-62.
48. Deitch EA, Goodman ER. Prevention of multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 1471-88.
49. Deitch EA, Rutan R, Waymack JP. Trauma, shock, and gut translocation. *New Horiz* 1996; 4: 289-99.
50. Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006; 11: 520-8.
51. Delneste Y et al. Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* 2003; 101: 143-50.
52. Demetriades D et al. Trauma fatalities: time and location of hospital deaths. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 20-6.

53. Dronadula N, Liu Z, Wang C, Cao H, Rao GN. STAT-3-dependent cytosolic phospholipase A2 expression is required for thrombin-induced vascular smooth muscle cell motility. *J Biol Chem* 2005; 280: 3112-20.
54. Durbin JE et al. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J Immunol* 2000; 164: 4220-8.
55. Durham RM et al. Multiple organ failure in trauma patients. *J Trauma* 2003; 55: 608-16.
56. Ege T, Us MH, Sungun M, Duran E. Cytokine response in lower extremity ischaemia/reperfusion. *J Int Med Res* 2004; 32: 124-31.
57. Eknayan G. Emergence of the concept of acute renal failure. *Am J Nephrol* 2002; 22: 225-30.
58. Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 2004; 20: 23-32.
59. Ertel W et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg* 1998; 101: 520-6.
60. Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 1996; 20: 454-9.
61. Fanger BO. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Anal Biochem* 1987; 162: 11-7.
62. Friedenauer S, Berlet HH. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem* 1989; 178: 263-8.
63. Frink M et al. KERATINOCYTE-DERIVED CHEMOKINE PLAYS A CRITICAL ROLE IN THE INDUCTION OF SYSTEMIC INFLAMMATION AND TISSUE DAMAGE AFTER TRAUMA-HEMORRHAGE. *Shock* 2007; Publish Ahead of Print.
64. Gabbe BJ, Cameron PA, Finch CF. Is the revised trauma score still useful?. *ANZ J Surg* 2003; 73: 944-8.
65. Gao H et al. Stat3 activation in acute lung injury. *J Immunol* 2004; 172: 7703-12.
66. Gebhard F et al. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 2000; 135: 291-5.
67. Green DR, Faist E. Trauma and the immune response. *Immunol Today* 1988; 9: 253-5.
68. Greenspan L, McLellan BA, Greig H. Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart. *J Trauma* 1985; 25: 60-4.
69. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 85-94.
70. Haan S, Keller JF, Behrmann I, Heinrich PC, Haan C. Multiple reasons for an inefficient STAT1 response upon IL-6-type cytokine stimulation. *Cell Signal* 2005; 17: 1542-50.
71. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T. Effect of Enteral Versus Parenteral Nutrition on LPS-Induced Sepsis in a Rat Model. *J Surg Res* 2007.

72. Harwood PJ et al. Which AIS based scoring system is the best predictor of outcome in orthopaedic blunt trauma patients? *J Trauma* 2006; 60: 334-40.
73. Hassoun HT et al. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15: 1-10.
74. Hayashi T, Kobayashi Y, Kohsaka S, Sano K. The mutation in the ATP-binding region of JAK1, identified in human uterine leiomyosarcomas, results in defective interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2. *Oncogene* 2006; 25: 4016-26.
75. Heagy W, Hansen C, Nieman K, Rodriguez JL, West MA. Impaired mitogen-activated protein kinase activation and altered cytokine secretion in endotoxin-tolerant human monocytes. *J Trauma* 2000; 49: 806-14.
76. Heagy W et al. Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2003; 4: 171-80.
77. Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005; 18: 243-9.
78. Heinrich PC et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374: 1-20.
79. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334 (Pt 2): 297-314.
80. Henrion J. Ischemia/reperfusion injury of the liver: pathophysiologic hypotheses and potential relevance to human hypoxic hepatitis. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 336-47.
81. Hensler T et al. Immunologic alterations associated with high blood transfusion volume after multiple injury: effects on plasmatic cytokine and cytokine receptor concentrations. *Shock* 2003; 20: 497-502.
82. Hensler T et al. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J Trauma* 2002; 52: 962-70.
83. Hierholzer C et al. Induced nitric oxide promotes intestinal inflammation following hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G225-G233.
84. Hildebrand F, Pape HC, Krettek C. [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Unfallchirurg* 2005; 108: 793-803.
85. Inagaki-Ohara K, Hanada T, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling and inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 435-42.
86. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 357-68.
87. Jenkins BJ et al. Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. *Nat Med* 2005; 11: 845-52.
88. Kanz KG, Sturm JA, Mutschler W. [Algorithm for prehospital blunt trauma management]. *Unfallchirurg* 2002; 105: 1007-14.
89. Kawakami Y et al. Regulation of dendritic cell maturation and function by Bruton's tyrosine kinase via IL-10 and Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 153-8.

90. Keel M et al. Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J Trauma* 1996; 40: 907-12.
91. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; 36: 691-709.
92. Kell MR, Kavanaugh EG, Goebel A, Soberg CC, Lederer JA. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock* 1999; 12: 139-44.
93. Khadaroo RG et al. Impaired induction of IL-10 expression in the lung following hemorrhagic shock. *Shock* 2004; 22: 333-9.
94. Khreiss T, Jozsef L, Chan JS, Filep JG. Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal* 2004; 16: 801-10.
95. Kim HS, Lee MS. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* 2007; 19: 454-65.
96. Klein D, Einspanier R, Bolder U, Jeschke MG. Differences in the hepatic signal transcription pathway and cytokine expression between thermal injury and sepsis. *Shock* 2003; 20: 536-43.
97. Kobayashi SD et al. An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 315-22.
98. Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1408-18.
99. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 2008; 13: 2400-7.
100. Kong F et al. Thermal injury-induced increases of hepatocyte SOCS3 lead to decreases in STAT3. *Shock* 2002; 18: 374-9.
101. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 2003; 4: 1169-76.
102. Kumar A et al. Human serum from patients with septic shock activates transcription factors STAT1, IRF1, and NF-kappaB and induces apoptosis in human cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 42619-26.
103. Kunz M et al. Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 45651-60.
104. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1653-6.
105. Lai EW, Toledo-Pereyra LH, Walsh J, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R. The role of MAP kinases in trauma and ischemia-reperfusion. *J Invest Surg* 2004; 17: 45-53.
106. Lang R. Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology* 2005; 210: 63-76.
107. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11: 153-9.

108. Lee CC, Marill KA, Carter WA, Crupi RS. A current concept of trauma-induced multiorgan failure. *Ann Emerg Med* 2001; 38: 170-6.
109. Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch Surg* 2002; 387: 14-20.
110. Levine RL, Gilliland DG. JAK-2 mutations and their relevance to myeloproliferative disease. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 43-7.
111. Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 233-9, 510.
112. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 651-62.
113. Liener UC et al. Chemokine activation within 24 hours after blunt accident trauma. *Shock* 2002; 17: 169-72.
114. Lin T, Bost KL. STAT3 activation in macrophages following infection with Salmonella. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 828-34.
115. Lipka DB et al. LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1176-84.
116. Liu WJ, Chang YS, Wang AH, Kou GH, Lo CF. White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the immediate-early gene ie1. *J Virol* 2007; 81: 1461-71.
117. Maher SG, Romero-Weaver AL, Scarzello AJ, Gamero AM. Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem* 2007; 14: 1279-89.
118. Maher SG et al. IFNalpha and IFNlambda differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 1109-15.
119. Makhija P, Yadav S, Thakur A. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 in infants with sepsis. *Indian Pediatr* 2005; 42: 1024-8.
120. Malinge S et al. Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 109: 2202-4.
121. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 237-44.
122. Manshouri T et al. The JAK kinase inhibitor CP-690,550 suppresses the growth of human polycythemia vera cells carrying the JAK2V617F mutation. *Cancer Sci* 2008; 99: 1265-73.
123. Matsukawa A et al. Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J Immunol* 2005; 175: 3354-9.
124. Matsukawa A et al. Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils. *J Immunol* 2003; 171: 6198-205.
125. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-5.
126. McDaniel DO et al. Molecular analysis of inflammatory markers in trauma patients at risk of postinjury complications. *J Trauma* 2007; 63: 147-57.

127. McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 1997; 89: 3421-33.
128. McLoughlin RM et al. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9589-94.
129. Melzner I et al. Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* 2005; 105: 2535-42.
130. Mercher T et al. JAK2T875N is a novel activating mutation that results in myeloproliferative disease with features of megakaryoblastic leukemia in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2006; 108: 2770-9.
131. Meyer T, Marg A, Lemke P, Wiesner B, Vinkemeier U. DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev* 2003; 17: 1992-2005.
132. Milner JD et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008; 452: 773-6.
133. Minegishi Y et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 2006; 25: 745-55.
134. Minegishi Y et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007; 448: 1058-62.
135. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995; 75: 257-77.
136. Moore FA, Moore EE, Read RA. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. *New Horiz* 1993; 1: 538-49.
137. Moore FA et al. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996; 40: 501-10.
138. Mudter J et al. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 64-72.
139. Murphy TJ et al. Linking the "two-hit" response following injury to enhanced TLR4 reactivity. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 16-23.
140. Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, Lederer JA. Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 400-7.
141. Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *J Trauma* 2001; 51: 835-41.
142. Nast-Kolb D et al. Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma* 1997; 42: 446-54.
143. Nelson EA et al. Nifuroxazide inhibits survival of multiple myeloma cells by directly inhibiting STAT3. *Blood* 2008.
144. Niemand C et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 2003; 170: 3263-72.

145. O'Keefe GE, Maier RV. New regimens in the management of posttraumatic respiratory failure. *Curr Opin Pulm Med* 1997; 3: 227-33.
146. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001; 16: 83-96.
147. Ogden RC, Adams DA. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol* 1987; 152: 61-87.
148. Ogura H et al. Enhanced production of endothelial microparticles with increased binding to leukocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma* 2004; 56: 823-30.
149. Ono M, Yu B, Hardison EG, Mastrangelo MA, Tweardy DJ. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-kappa B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock* 2004; 21: 519-25.
150. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-72.
151. Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma* 1997; 43: 922-5.
152. Pape HC et al. Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers. *J Trauma* 2001; 50: 989-1000.
153. Parsons PE et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 2005; 33: 1-6.
154. Partrick DA et al. Jack A. Barney Resident Research Award winner. The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1996; 172: 425-9.
155. Patel SY, Doffinger R, Barcenas-Morales G, Kumararatne DS. Genetically determined susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Pathol* 2008; 61: 1006-12.
156. Qing Y, Stark GR. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* 2004; 279: 41679-85.
157. Quinton LJ et al. Alveolar epithelial STAT3, IL-6 family cytokines, and host defense during *Escherichia coli* pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38: 699-706.
158. Rebulla P et al. White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells. *Transfusion* 1993; 33: 128-33.
159. Regel G, Grotz M, Weltner T, Sturm JA, Tscherne H. Pattern of organ failure following severe trauma. *World J Surg* 1996; 20: 422-9.
160. Relloso M et al. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol* 2002; 168: 2634-43.
161. Renner ED et al. Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 181-7.

162. Rensing H, Bauer M. [Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies]. *Anaesthesist* 2001; 50: 819-41.
163. Robinson CM. Current concepts of respiratory insufficiency syndromes after fracture. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83: 781-91.
164. Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Betz P, Schweiberer L. [Early mortality in polytrauma. A critical analysis of preventable errors]. *Unfallchirurg* 1994; 97: 285-91.
165. Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Lefering R. [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997; 114: 1265-7.
166. Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Schweiberer L. [The injury pattern in polytrauma. Value of information regarding accident process in clinical acute management]. *Unfallchirurg* 1996; 99: 633-41.
167. Samy TS, Ayala A, Catania RA, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage activates signal transduction pathways in mouse splenic T cells. *Shock* 1998; 9: 443-50.
168. Sancho-Shimizu V et al. Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 495-505.
169. Sauaia A et al. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1994; 129: 39-45.
170. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Lezotte DC. Early risk factors for postinjury multiple organ failure. *World J Surg* 1996; 20: 392-400.
171. Sauaia A et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J Trauma* 1995; 38: 185-93.
172. Sauaia A et al. Multiple organ failure can be predicted as early as 12 hours after injury. *J Trauma* 1998; 45: 291-301.
173. Schinkel C et al. Interferon-gamma modifies cytokine release in vitro by monocytes from surgical patients. *J Trauma* 2001; 50: 321-7.
174. Schinkel C et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4: 241-6.
175. Schuebel KE et al. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet* 2007; 3: 1709-23.
176. Schweiberer L, Nast-Kolb D, Duswald KH, Waydhas C, Muller K. [Polytrauma--treatment by the staged diagnostic and therapeutic plan]. *Unfallchirurg* 1987; 90: 529-38.
177. Seekamp A et al. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma* 1998; 44: 874-82.
178. Severgnini M et al. Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L1282-L1292.

179. Sherman CT, Brasier AR. Role of signal transducers and activators of transcription 1 and -3 in inducible regulation of the human angiotensinogen gene by interleukin-6. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 441-57.
180. Sipos W, Pietschmann P, Rauner M. Strategies for novel therapeutic approaches targeting cytokines and signaling pathways of osteoclasto- and osteoblastogenesis in the fight against immune-mediated bone and joint diseases. *Curr Med Chem* 2008; 15: 127-36.
181. Sjoblom T et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314: 268-74.
182. Stalp M, Koch C, Regel G, Krettek C, Pape HC. [Development of a standardized instrument for quantitative and reproducible rehabilitation data assessment after polytrauma (HASPOC)]. *Chirurg* 2001; 72: 312-8.
183. Staples KJ et al. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol* 2007; 178: 4779-85.
184. Stene JK. Renal failure in the trauma patient. *Crit Care Clin* 1990; 6: 111-9.
185. Stephanou A. Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 519-25.
186. Stephanou A et al. Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 10002-8.
187. Stewart TC, Lane PL, Stefanits T. An evaluation of patient outcomes before and after trauma center designation using Trauma and Injury Severity Score analysis. *J Trauma* 1995; 39: 1036-40.
188. Strecker W et al. Biochemical characterization of individual injury pattern and injury severity. *Injury* 2003; 34: 879-87.
189. Süddeutsche Zeitung. Bundesanstalt für Straßenwesen, Bergisch Gladbach. 14-2-2006.
190. Suter PM, Morel DR, Laverriere MC. [Post-traumatic pulmonary insufficiency: therapeutic measures]. *Schweiz Med Wochenschr* 1989; 119: 364-8.
191. Takeda K et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999; 10: 39-49.
192. Takeda K et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3801-4.
193. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; 22: 14-22.
194. Thiel M. [Inflammation and immunoparalysis. What are the differential criteria?]. *Anaesthetist* 2000; 49: 466-71.
195. Tomita M et al. Inhibition of constitutively active Jak-Stat pathway suppresses cell growth of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 2006; 3: 22.

196. Tschoeke SK, Hellmuth M, Hostmann A, Ertel W, Oberholzer A. The early second hit in trauma management augments the proinflammatory immune response to multiple injuries. *J Trauma* 2007; 62: 1396-403.
197. Ulmer AJ, Flad H, Rietschel T, Mattern T. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology* 2000; 152: 37-45.
198. Walsh DS et al. Lymphocyte activation after non-thermal trauma. *Br J Surg* 2000; 87: 223-30.
199. Walters DK et al. Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2006; 10: 65-75.
200. Walters DM et al. Susceptibility of signal transducer and activator of transcription-1-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *Am J Pathol* 2005; 167: 1221-9.
201. Wang M et al. Endothelial STAT3 plays a critical role in generalized myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007.
202. Wang S, Wolf SE, Evers BM. Differential activation of the Stat signaling pathway in the liver after burn injury. *Am J Physiol* 1997; 273: G1153-G1159.
203. Wang X, Zhao H, Andersson R. Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. *J Proteome Res* 2004; 3: 921-9.
204. Waydhas C et al. Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch Surg* 1992; 127: 460-7.
205. Waydhas C et al. Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. *J Trauma* 1996; 40: 624-30.
206. Weniger MA et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 2006; 25: 2679-84.
207. West MA, Baker J, Bellingham J. Kinetics of decreased LPS-stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO₂. *J Surg Res* 1996; 63: 269-74.
208. West MA, Baker J, Bellingham J, Clair L. Discordant reprogramming of LPS-stimulated cytokine gene transcription and secretion by macrophages after LPS pretreatment. *J Surg Res* 1996; 63: 209-14.
209. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 2004; 172: 567-76.
210. Wong HR, Wispe JR. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 1997; 273: L1-L9.
211. Yamauchi K et al. Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *J Neurochem* 2006; 96: 1060-70.
212. Yang XO et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 9358-63.
213. Zahler S et al. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200: 173-9.

214. Zallen G et al. Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines. *J Trauma* 1999; 46: 42-8.
215. Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27: 66-72.
216. Zelle B et al. [Validation of the Hannover Score for Polytrauma Outcome (HASPOC) in a sample of 170 polytrauma patients and a comparison with the 12-Item Short-Form Health Survey]. *Chirurg* 2003; 74: 361-9.
217. Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003; 31: S105-S111.

9. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , akutes Lungenversagen
ANV	Akutes, als posttraumatisch zumeist prärenales, Nierenversagen
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i> , kompensatorische posttraumatische Phase, ausgezeichnet durch Hypoinflammation
CIS	Cytokine-Inducible SH2 Proteins
DNA	Die Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus enthaltende Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribo nucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamino-tetra-acetat
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> , auf radioaktiver Phosphorylierung basierende experimentelle Nachweismethode der nukleären Translokation zytoplasmatischer Proteine
FACS	Fluorescence activated cell scanner
gp130	Glykoprotein 130, Glykoproteinrezeptor an der Außenmembran der Zelle
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
IRS	Ischämie-Reperusions-Syndrome
ISS	<i>Injury Severity Score</i> , Score zur Bewertung des Ausmaßes der anatomischen Verletzungsschwere
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

KHCO ₃	Kaliumbikarbonat
LEI	Leukozyten-Endothel Interaktion
LPS	auf der Oberfläche gram-negativer Bakterien exprimiertes Lipopolysaccharid
MHC I	<i>Major Histocompatibility Complex I</i>
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
MOF	<i>Multiple Organ Failure</i> , Multiorganversagen
MW	Mittelwert
mRNA	messengerRibonucleinsäure
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NISS	<i>New Injury Severity Score</i> , T.Osler ¹⁵¹
PAF	Platelet adhesion factor
PBS	Phosphat buffered saline
PGE 2	Prostaglandin E2
PIAS	<i>Protein Inhibitors of Activated STAT</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
Poly-[dIdC]	Polydesoxyinosindesoxycytidinsäure
ROI	reaktive Sauerstoffmetabolite
SHT	Schädelhirntrauma
SEM	<i>Standard error of the means</i> , Standardabweichung der Mittelwerte
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i> , posttraumatische, systemische Entzündungsreaktion

SOCS	<i>Suppressors of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamin
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>

10. MATERIALIEN

10.1 Geräte und Material

Blutabnahmeröhrchen EDTA	Sarstedt
Blutabnahmeröhrchen Li-Heparin	Sarstedt
Blutabnahmeröhrchen Serum-Gel	Sarstedt
Eppendorf Reaktionsgefäße, Safelock	Eppendorf
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf
Filme	Kodak, Biomax
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr
Gefrierschrank, -80°C	Liebherr
Gelelektrophoresekammer	peqLab
Gelkämme	peqLab
Gelgießstand	peqLab
Handschuhe	Sempermed
Kühlschränke	Liebherr
Mikropipetten	Eppendorf
Mikroskop	Zeiss
Neubauerzählkammer	Superior
pH-Meter	Inolab
Scanner	hp psc 1210
Vortexer	VM4 CAT
Zentrifugen	Jouan/ Eppendorf
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000µl)	Biozym
Spritzen 5ml	Sarstedt
Spritzennadeln	Sarstedt

Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon (Heidelberg, Deutschland)
Whatman-Papier	Schubert & Weiss, München
Röntgenkassette	Amersham, Braunschweig
Brutschrank	Memmert
Waage	Kern GJ

10.2.Chemikalien

Acrylamid	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Antikörper Anti STAT1	Santa Cruz
Antikörper Anti STAT3	Santa Cruz
Antipain	Sigma Aldrich
Aprotinin	Sigma Aldrich
Bestatin	Sigma Aldrich
Binding Buffer 5X	Promega
Bluejuice Farbmarker	Invitrogen
Boric acid	Sigma Aldrich
CD 14-Anitkörper	Miltenyi
CD 15-Anitkörper	Miltenyi
DTT	Sigma Aldrich
Ethylen-diamino-tetra-acetat (EDTA)	Sigma Aldrich
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 5%	Merck
Glycerin	Sigma Aldrich
Hela nukleäres Extrakt	Promega
Hepes	Sigma Aldrich

KCL	Merck
Leupeptin	Sigma Aldrich
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Roche
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NP40	Sigma Aldrich
Oligonukleotide (AP1, STAT1, STAT3, SIE)	Santa Cruz
Pepstatin	Sigma Aldrich
Phosphoramidon	Sigma Aldrich
PMSF	Sigma Aldrich
Polydesoxyinosindesoxycytidinsäure,	Roche, Mannheim
Polynukleotidkinase Puffer	Promega, Mannheim
Polynukleotidkinase T ₄	Promega, Mannheim
Tris-Acetat-EDTA (TAE)	Invitrogen
Tetramethylethyldiamin(TEMED)	Sigma, Taufkirchen
Tris Base	Sigma Aldrich
Trypsin Inhibitor	Sigma Aldrich
γ 32-Phosphor- ATP	Hartmann

11. DANKSAGUNG

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem geschätzten Doktorvater und Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler, für die Überlassung des Themas, das Bereitstellen der Mittel und die uneingeschränkte wissenschaftliche Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. med. Peter Biberthaler bedanken, der mir das Projekt anvertraut hat. Er war stets offen für meine Fragen und stand mir hilfsbereit zur Seite. Durch ihn lernte ich Durchsetzungsvermögen, Beharrlichkeit beim Verfolgen eines Zieles und Konzentration auf das Wesentliche. Er stand mir beständig auch in unbequemen Situationen bei und lehrte mich die Kunst der Wissenschaft. Auch meine rhetorischen und gestalterischen Fähigkeiten, die ich auf mehreren Kongressen präsentieren durfte, verdanke ich ihm.

Des weitern möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. J. Heesemann, sowie insbesondere Herr Dr. med. K. Ruckdeschel und Frau Gudrun Pfaffinger für die Bereitstellung des Isotopenlabors im Max von Pettenkofer Institut bedanken. Dies ermöglichte es mir, unter idealen Bedingungen meine Arbeit durchzuführen.

Herzlichen Dank gilt Herrn OA Dr. med. K-G. Kanz, sowie OÄ Dr. med. Th. Hummel, dem Pflegepersonal und den Ärzten der chirurgischen Notaufnahme, sowie der chirurgischen Intensivstation für die beständige Unterstützung und die freundliche Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich noch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Trauma and Resuscitation*, Frau Julia Stegmaier, Frau Viktoria Bogner, Herrn Michael Matz und Frau Maren

Jenike für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung bedanken. Entscheidend für die erfolgreiche Durchführung dieses Projekts waren unter anderem der Zusammenhalt im Team, das gemeinsame Verfolgen eines Zieles, sowie die Sicherheit, sich auf jeden einzelnen verlassen zu können.

Mein abschließender Dank gilt meiner Mutter, meinem Onkel Gerd Zahner, sowie meinem Freund Julian Siebach für ihre immerwährende Unterstützung, ihr stetiges Verständnis und die konstruktiven Auseinandersetzungen.

12. LEBENSLAUF

Name	Vester
Vorname	Helen
Geburtsdatum:	22. Juni 1981
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch-katholisch

Schulbindung

09/1988 – 07/1992	Beethoven Grundschule, Singen am Hohentwiel
09/1992 – 06/2001	Hegau Gymnasium, Singen am Hohentwiel
	Abschluss: Abitur (1,0)

Hochschulstudium

10/2001	Beginn Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität in München
09/2003	Physikum
2006/2007	Praktisches Jahr
05/2008	Staatsexamen an de LMU München

Beruflicher Werdegang

2008	Approbation als Ärztin
Seit 2008	Assistenzärztin in der Abteilung für Unfallchirurgie am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München (Leitung: Prof. Dr. U. Stöckle)