
Die Rolle des durch die MAP-Kinasen p38 und JNK aktivierten Transkriptionsfaktors c-Jun in Monozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase

Veit Stöcklein



2011

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik (Innenstadt) der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Wolf E. Mutschler

Die Rolle des durch die MAP-Kinasen p38
und JNK aktivierten Transkriptionsfaktors
c-Jun in Monozyten polytraumatisierter
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

Veit Stöcklein

aus

Landshut

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Biberthaler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Günter Valet
Priv. Doz. Dr. Alexander Faußner
Prof. Dr. Andreas Nüssler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Viktoria Bogner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Hintergrund	1
1.1 Epidemiologie des Polytraumas	1
1.1.1 Die posttraumatische Funktionsstörung des Immunsystems	2
1.1.2 Ursachen posttraumatischer Immunfunktionsstörungen	4
1.1.2.1 Die „two hit“-Theorie	4
1.1.2.2 Die Darmhypothese	5
1.1.2.3 Alarmins	6
1.1.3 Zelluläre Mechanismen	8
1.1.3.1 Zellen des angeborenen Immunsystems	8
1.1.3.2 Zellen des adaptiven Immunsystems	9
1.1.4 Humorale Mechanismen	9
1.1.4.1 Komplementsystem	9
1.1.4.2 Chemokine	10
1.1.4.3 Cytokine	10
1.2 Biochemische Grundlagen	11
1.2.1 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Familie	12
1.2.1.1 p38 MAPK	13
1.2.1.2 C-Jun-N-terminal-Kinase (JNK)	14
1.2.2 Der Transkriptionsfaktor c-Jun	15
2. Fragestellung	19
3. Patienten und Methoden	21
3.1 Studiendesign	21
3.2 Separation von Monozyten	24
3.3 Isolierung nukleären Proteins	26
3.4 Phosphoproteinmessung	27
3.5 Statistische Analyse	32
4. Ergebnisse	35
4.1 Klinische Daten	35
4.2 Ergebnisse der p-p38 MAPK-Messung	43
4.2.1 Zeitlicher Verlauf der p-p38 MAPK-Menge	43
4.2.2 Analyse der p-p38 MAPK-Messung anhand der Verletzungsschwere	44
4.2.3 Analyse der p-p38 MAPK-Messung anhand des Transfusionsbedarfs	45
4.2.4 Analyse der p-p38 MAPK-Messung anhand des Überlebens	46
4.3 Ergebnisse der p-JNK-Messung	48
4.3.1 Zeitlicher Verlauf der p-JNK-Menge	48
4.3.2 Analyse der p-JNK-Messung anhand der Verletzungsschwere	49
4.3.3 Analyse der p-JNK-Messung anhand des Transfusionsbedarfs	50
4.3.4 Analyse der p-JNK-Messung anhand des Überlebens	51
4.4 Ergebnisse der p-c-Jun-Messung	53
4.4.1 Zeitlicher Verlauf der c-Jun-Menge	53
4.4.2 Analyse der p-c-Jun-Messung anhand der Verletzungsschwere	54
4.4.3 Analyse der p-c-Jun-Messung anhand des Transfusionsbedarfs	55
4.4.4 Analyse der p-c-Jun-Messung anhand des Überlebens	56
5. Diskussion	58
5.1 Studiendesign	58
5.1.1 Zeitpunkt der Blutentnahmen	58
5.1.2 Beeinflussung des Studienergebnisses durch operative Eingriffe	59
5.1.3 Verschleppung von Fremdzellen durch Bluttransfusionen	60
5.2 Methodik	62
5.2.1 MACS-basierte Zellseparation	62
5.2.2 Messung der Phosphoproteinkonzentration mittels Bio-Plex-System	64
5.2.3 Messung von Phosphoproteinen ohne Messung des Gesamtproteins	65
5.3 Klinische Daten	66
5.4 Phosphoproteinmessung	68
5.4.1 Phosphorylierte p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (p-p38-MAPK)	68
5.4.1.1 Verletzungsschwere	68
5.4.1.2 Massentransfusion	70
5.4.1.3 Überleben	72
5.4.2 Phosphorylierte c-Jun-N-terminale Kinase (p-JNK)	75
5.4.2.1 Verletzungsschwere	75
5.4.2.2 Massentransfusion	76
5.4.2.3 Überleben	77
5.4.3 Phosphorylierte Form von c-Jun	79
5.4.3.1 Verletzungsschwere	79
5.4.3.2 Massentransfusion	81
5.4.3.3 Überleben	82
5.5 Klinische Relevanz	85
6. Zusammenfassung	88
7. Literaturverzeichnis	92
8. Abkürzungsverzeichnis	102
9. Danksagung	104

1. Einleitung und Hintergrund

1.1 Epidemiologie des Polytraumas

Das Polytrauma wird von *Keel* und *Trentz* so definiert: „Ein Syndrom kombinierter Verletzungen mit einem Injury severity score (ISS) > 17 und anschließendem SIRS [*systemic inflammatory response syndrome*] für mindestens einen Tag, das zu Funktionsstörung oder Versagen von Organen und Organsystemen führt, die nicht direkt verletzt wurden.“ [64]

Das Polytrauma ist eine häufige Ursache von Morbidität und Mortalität. Dies lässt sich an der offiziellen Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes der Bundesrepublik Deutschland ablesen. Im Jahr 2007 starben insgesamt 5170 Personen auf dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland durch Transportmittelunfälle [126]. Weltweit starben im Jahr 2002 sogar 1,2 Millionen Menschen durch solche Unfälle [4]. Von den 5170 Menschen, die hier an Unfällen verstarben, waren 1958 unter 35 Jahre alt, das entspricht einem Anteil von 37,8% [126]. Dies verdeutlicht, dass das Polytrauma häufig junge Menschen betrifft.

Die Menschen, die an den Folgen schwerer Mehrfachverletzungen versterben, sterben zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach dem Trauma. Als Erster beschrieb *Donald Trunkey* diese trimodale Verteilung im Jahre 1983 [132]. Diese klassische Publikation beruhte auf Daten, die im Jahre 1977 im Raum San Francisco erhoben wurden [7]. Trunkey führte aus, dass 45% der Patienten, die durch Trauma versterben, innerhalb von weniger als 60 Minuten nach Eintreten der Verletzungen versterben, d.h. meist noch am Unfallort oder auf dem Transport in die Klinik. Weitere 34% der Patienten verstarben laut Trunkeys Untersuchung innerhalb weniger Stunden nach Aufnahme in eine Klinik. Die übrigen verstorbenen Patienten erlagen ihren Verletzungen innerhalb von Tagen und Wochen nach der ursprünglichen Verletzung.

Neuere Untersuchungen, z.B. von *Sauaia et al.*, *Pang et al.* und *Demetriades et al.* konnten dieses Muster nicht mehr nachweisen [30, 95, 112]. Hier war eine Tendenz zu früherem

Versterben feststellbar, die dritte von Trunkey postulierte Häufung von Todesfällen war nicht feststellbar. Jedoch verstirbt ein wesentlicher Anteil der Patienten nach wie vor Tage und Wochen nach dem Trauma. In einer kürzlich veröffentlichten skandinavischen Studie betrug dieser Anteil 17% [123]. Zwar sind auch in den ersten Tagen nach Trauma noch Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) die vorherrschende Todesursache. Je größer jedoch die zeitliche Distanz zum traumatischen Ereignis wird, desto mehr rückt das Multiorganversagen in den Vordergrund [101]. In diesem Stadium gewinnen die systemischen Konsequenzen des Polytraumas an Bedeutung, die in der Definition des Polytraumas von *Keel* und *Trentz* bereits genannt wurden. In einer niederländischen Studie, die sich auf stumpfes Trauma konzentrierte und daher mit unserer Studie hinsichtlich des Patientenkollektivs vergleichbar ist, war Multiorganversagen für 11% aller Todesfälle verantwortlich [27]. Welche pathophysiologischen Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene für die Entwicklung eines Multiorganversagens wichtig sind, soll im Folgenden erörtert werden.

1.2 Die posttraumatische Funktionsstörung des Immunsystems

Durch Trauma wird das Immunsystem aktiviert. Bei manchen der schwerverletzten Patienten fällt diese Aktivierung so massiv aus, dass es zu einer Überreaktion des Immunsystems kommt. Der Patient entwickelt das sogenannte *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS). Die klinische Diagnose eines SIRS liegt per definitionem vor, wenn zwei oder mehr der in Tabelle 1 (siehe S. 3) aufgeführten Kriterien erfüllt sind. Im Rahmen des SIRS können auch Organe geschädigt werden, die vom ursprünglichen Trauma gar nicht betroffen waren [43].

Tabelle 1: Definition des SIRS anhand von klinischen Parametern nach Bone et al. [18]

Körpertemperatur	> 38°C oder < 36°C
Herzfrequenz	> 90 min ⁻¹
Atemfrequenz	> 20 min ⁻¹ oder P _a O ₂ < 32 mmHg
Leukozytenzahl	> 12000 µl ⁻¹ oder < 4000 µl ⁻¹ oder > 10% unreife Formen

Als Folge kann sich eine Multiorgan dysfunktion bzw. ein Multiorganversagen entwickeln. Diese werden auch als *multiple organ dysfunction syndrome* (MODS) bzw. *multiple organ failure* (MOF) bezeichnet [10]. Als Reaktion auf die überschießende Immunaktivierung im

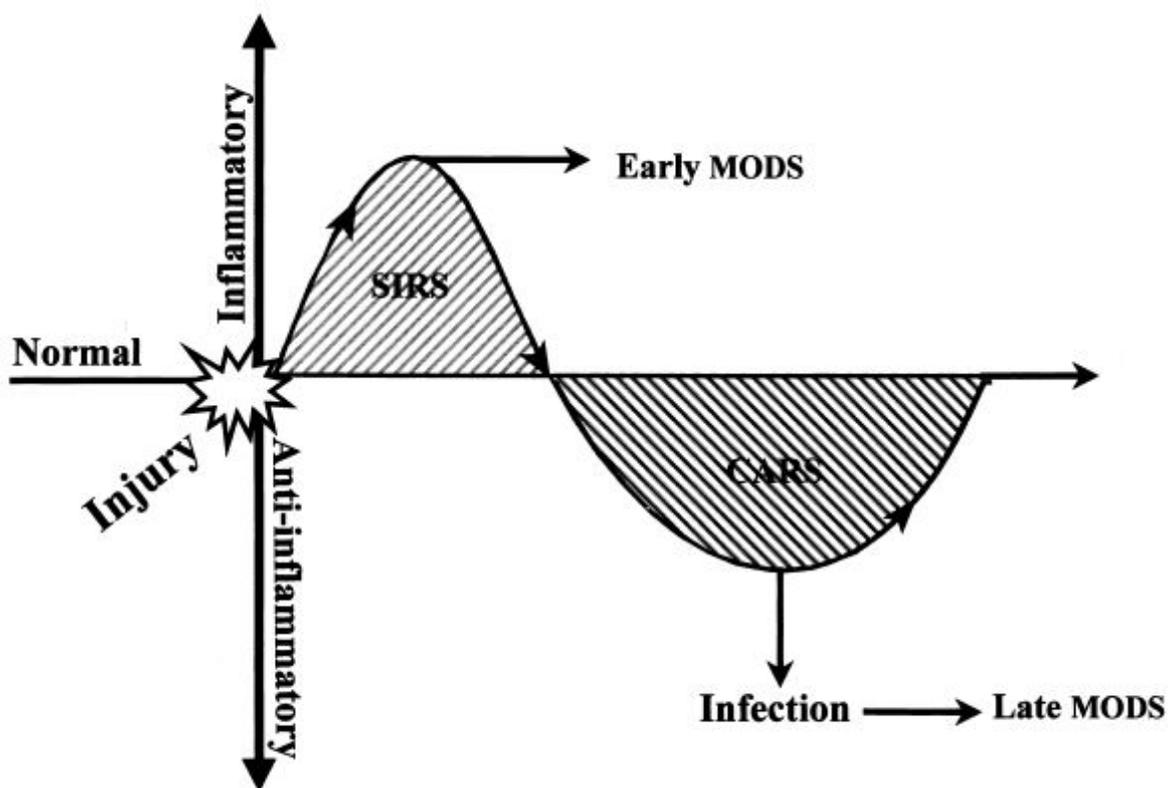


Abb. 1: Bimodales Modell des posttraumatischen Multiorganversagens. Aus Mannick et al. [80]

Rahmen des SIRS kommt es zu einer kompensatorischen Dämpfung der Aktivität des Immunsystems, dem sogenannten *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) [80]. In dieser Phase ist der Patient anfällig für Infektionen, in der Folge kann sich ein spätes Organversagen entwickeln. Klassischerweise werden SIRS und CARS als zwei aufeinander folgende Phänomene beschrieben, die zeitlich getrennt sind [89]. Abbildung 2 verdeutlicht dieses Modell graphisch. Diese strikte zeitliche Trennung wird von anderen

Autoren in Zweifel gezogen. Es wird für möglich gehalten, dass das Immunsystem versucht, SIRS und CARS gegeneinander auszubalancieren und so wieder Homöostase herzustellen. Dies würde bedeuten, dass SIRS und CARS gleichzeitig vorkommen. Für diesen Zustand wurde der Ausdruck *mixed antagonistic response syndrome* (MARS) geprägt [17].

Im Folgenden wird dargestellt, welche Rolle die einzelnen Faktoren des Immunsystems für die Entstehung der genannten Syndrome spielen und welche Theorien bezüglich ihrer Ursachen entwickelt wurden.

1.2.1 Ursachen posttraumatischer Immundefunktionsstörungen

1.2.1.1 Die „two-hit“-Theorie

Prinzipiell liegt der „two hit“-Theorie die Annahme zugrunde, dass das Immunsystem durch erlittene Verletzungen derart sensibilisiert wird, dass es auf ein zweites aktivierendes Ereignis mit einer überschießenden Reaktion antwortet, die zum multiplen Organversagen führen kann [86]. In diesem Modell stellt das erlittene Trauma mit Frakturen, Weichteil- und Organschäden den „*first hit*“ dar. Typische „*second hits*“ sind beispielsweise Hypoxie, Infektionen, Ischämie/Reperfusionsschaden, Bluttransfusionen oder chirurgische Eingriffe [64]. Man nimmt an, dass hauptsächlich Zellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen durch den „*first hit*“ geprimt werden [92]. Unter den Faktoren, die die Zellen sensibilisieren, sind unter anderem *platelet-activating factor* (PAF), C5a, das ein Bestandteil des Komplementsystems ist, *Tumornekrosefaktor* (TNF), Interleukin (IL)-8, Interferon und *Lipopolysaccharid* (LPS) [86]. Arbeiten von *Murphy et al.* sowie *Maung et al.* konnten kürzlich zeigen, dass der *toll-like*

receptor (TLR) 4-Rezeptor und der p38-MAPK-Pathway in die zelluläre Vermittlung der „two-hit“-Antwort des Immunsystems auf Trauma involviert ist [82, 92].

1.2.1.2 Die Darmhypothese

In diesem Modell wird als eine der Ursachen für das posttraumatische SIRS eine Translokation von Bakterien oder von Bestandteilen von Bakterien wie Endotoxin über die Darmmukosa in die systemische Zirkulation angenommen. Man geht hierbei davon aus, dass die Darmmukosa durch Ischämie/Reperfusion im Rahmen des traumatischen Schocks geschädigt ist und daher die Passage von Bakterien möglich ist [29]. Über die Pfortader gelangen Bakterien und Endotoxin zunächst in die Leber, wo sie Kupfferzellen stimulieren. Diese sind in der Wand der Lebersinusoiden lokalisiert, wo sie die Aufgaben von gewebsständigen Makrophagen erfüllen. Die Kupfferzellen schütten Cytokine aus, was zur Entstehung eines SIRS beiträgt [28]. Diese Theorie galt lange als Lehrbuchstandard, ist inzwischen aber zumindest in ihrer ursprünglichen Form umstritten. Verschiedene Studien konnten zwar bakterielle Translokation an Nagetiermodellen nachweisen, jedoch konnten Studien an größeren Tieren wie Schweinen diesen Effekt bereits nicht mehr demonstrieren [78, 90]. Zusätzlich konnten bereits 1991 *Moore et al.* in einer viel beachteten klinischen Studie keinerlei Bakterien oder Endotoxin in der Pfortader von schwerverletzten Patienten nachweisen [87]. Hinzu kamen Hinweise im Tiermodell, dass eine selektive Dekontamination des Darms keine Überlebensvorteile erbringt [60]. Dies führte zu einer Modifizierung der Darmhypothese. Man nahm nun an, dass der Darm weniger als Einfallspforte für Mikroorganismen fungiert, sondern vielmehr als immunologisch aktives Organ Cytokine produziert, die das SIRS mit verursachen. Zusätzlich trage der Darm zum Priming zirkulierender Neutrophiler bei [28]. Weiter wurde die Theorie dahingehend modifiziert, dass

man weniger das Pfortadersystem als den Weg ansieht, auf dem Faktoren, die aktivierende Wirkung auf das Immunsystem haben, die systemische Zirkulation erreichen. Vielmehr wird nun dem lymphatischen System des Darms diese Rolle zugeordnet [28]. Diese Annahme konnte bereits im Großtiermodell validiert werden [117].

Dies bedeutet, dass genügend Hinweise bleiben, die auf eine wichtige Rolle des Darms im Rahmen der Entstehung posttraumatischer Immundysfunktion deuten, auch wenn die These, dass der Darm das alleinige Organ ist, das für die Auslösung eines SIRS verantwortlich ist, weitgehend entkräftet werden konnte.

1.2.1.3 Alarmins

Lange Zeit war in der Traumaforschung die Frage ungelöst, wie die Information, dass eine Verletzung stattgefunden hat, von den Zellen des Immunsystems detektiert wird. Eine mögliche Antwort auf diese Frage gibt das „Danger“-Modell. Dieses neue Konzept von der Funktionsweise des angeborenen Immunsystems besagt, dass das Immunsystem nicht nur zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen unterscheiden kann, sondern auch die Gefahr, die von einem Molekül ausgeht, beurteilen kann [81]. In Bezug auf die Gefährlichkeit eines Antigens wird nicht mehr zwischen körpereigen und körperfremd unterschieden. Dies bedeutet, dass auch körpereigene Antigene, die für das Immunsystem Gefahr signalisieren, von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden und zu einer Aktivierung führen. Antigene, die Gefahr signalisieren, können folglich sowohl exogenen als auch endogenen Ursprungs sein. Allen diesen Antigenen ist gemeinsam, dass sie spezielle molekulare Muster aufweisen, die im Lauf der Evolution vom Immunsystem als gefährlich eingestuft wurden. Diese molekularen Muster werden von sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt. Alle Antigene, die diese Rezeptoren aktivieren können, werden unter dem Begriff der

damage-associated molecular patterns (DAMPs) zusammengefasst. DAMPs, die exogenen und damit zumeist mikrobiellen Ursprungs sind, werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet. DAMPs hingegen, die endogen entstehen, werden als *Alarmins* bezeichnet [13]. Alarmins werden durch Gewebeschäden, die durch das Trauma entstehen, freigesetzt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Alarmins nur aus nekrotischen Zellen stammen, apoptotische Zellen sind keine Quelle von Alarmins. Zellen des Immunsystems können außerdem Alarmins aktiv sezernieren und so die Alarmreaktion des Immunsystems verstärken [139]. Zu den Alarmins zählt unter anderem HMGB1, Heat-shock-Proteine, ATP, Proteine der S100-Familie, Harnsäure und viele weitere Moleküle [13]. In den letzten Jahren mehrten sich die Hinweise, dass es sich bei den PRRs, die hauptsächlich für die Erkennung von Alarmins verantwortlich sind, um Rezeptoren der TLR-Familie handelt [85]. In mehreren Arbeiten kristallisierte sich TLR4 als der Rezeptorsubtyp heraus, der hauptsächlich die Antwort des Immunsystems auf Verletzungen vermittelt [76, 102]. Zusammengefasst erweist sich das „Danger-Modell“ mit der Freisetzung von Alarmins, die von PRRs detektiert werden, als das Modell, das die Entstehung systemischer Inflammation bis hin zum SIRS nach Trauma am schlüssigsten erklärt. Selbst die Darmhypothese kann in dieses Modell integriert werden. Der Darm ist ein großes Organ, mit einer Epitheloberfläche von ca. 100 m² [148]. Zudem ist bekannt, dass die Perfusion im Splanchnicusgebiet nach Behebung eines Schockzustandes zuletzt wieder hergestellt wird [134]. Folgerichtig werden daher viele Zellen im Darm durch Ischämie/Reperfusion geschädigt und setzen somit auch große Mengen an Alarmins frei. Im Tiermodell konnte wiederholt gezeigt werden, dass Lymphe aus dem Magen-Darm-Trakt aktivierende Wirkung auf das Immunsystem hat [117]. Möglicherweise handelt es sich bei den immunogenen Substanzen in der Lymphflüssigkeit auch um Alarmins.

1.2.2 Zelluläre Mechanismen

1.2.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Ein wesentlicher Zelltyp in der Antwort des angeborenen Immunsystems auf Trauma sind die neutrophilen Granulozyten, auch polymorphonukleäre Leukozyten genannt (PMNs). PMNs vermitteln die erste Reaktion des Immunsystems auf das Trauma. Proinflammatorische Cytokine aktivieren die PMNs, dieser Vorgang wird auch „*Priming*“ genannt. Es ist bekannt, dass der Darm bei diesem Vorgang eine wichtige Rolle spielt [28]. Die PMNs werden durch Chemokine wie IL-8 zum Ort des Gewebeschadens rekrutiert, wo sie Proteasen und freie Sauerstoffradikale ausschütten. Die Ausschüttung von freien Sauerstoffradikalen durch PMNs wird als „*respiratory burst*“ bezeichnet [64]. PMNs können auch Organschäden verursachen, so spielen sie beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Lungenschäden im Rahmen des *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) [38]. Zusätzlich gibt es Berichte, dass die Apoptoserate von PMNs nach Trauma vermindert ist [43].

Eine weitere wichtige Zellpopulation des angeborenen Immunsystems in der Antwort des Organismus auf Verletzungen sind Monozyten und Makrophagen. Diese Zellen haben zwei wichtige Funktionen. Zum einen fungieren sie zusammen mit dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen. Makrophagen präsentieren naiven T-Zellen phagozytiertes Antigen und stellen so die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem her. Zum anderen sezernieren diese Zellen nach Aktivierung über PRRs Cytokine, die die Reaktion des Organismus auf die Verletzung entscheidend steuern. Unter diesen Cytokinen sind beispielsweise TNF- α und IL-6 [38].

Man ging lange Zeit davon aus, dass das SIRS von einer Überaktivität des angeborenen Immunsystems verursacht wird, das CARS wurde hingegen dem adaptiven Immunsystem

zugeschrieben. Heute weiß man, dass ein enges Zusammenspiel der beiden Teile des Immunsystems die beiden Phänomene verursacht [80].

1.2.2.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

Zwar wird das Entstehen eines SIRS hauptsächlich durch Zellen der angeborenen Immunität vermittelt, dennoch spielen auch Elemente des adaptiven Immunsystems eine wichtige Rolle. Mehrere Arbeiten konnten den Nachweis erbringen, dass T-Zellen kurze Zeit nach dem Eintreten der Verletzung große Mengen von IFN- γ und TNF- α ausschütten [80]. Dieses Profil der Cytokinproduktion wird auch als der Th1-Phänotyp der CD4+-T-Zellen bezeichnet. Dieser Phänotyp wird gemeinhin als proinflammatorisch betrachtet [38]. Im weiteren klinischen Verlauf verlieren die T-Zellen ihre Fähigkeit zur Produktion der proinflammatorischen Cytokine. Stattdessen wird nun verstärkt IL-4 ausgeschüttet, das charakteristisch für den Th2-Phänotyp von CD4+-T-Zellen ist. [122]. Der Th2-Phänotyp hat dämpfende Wirkung auf das Immunsystem. Dieser Phänotyp wird außerdem mit der Ausprägung des CARS in Verbindung gebracht, während der Th1-Phänotyp eher dem SIRS zugerechnet wird [80].

1.2.3 Humorale Mechanismen

1.2.3.1 Komplementsystem

Zu den immunologischen Folgen schwerer Verletzungen zählt auch die Aktivierung des Komplementsystems. Dies führt zu der Freisetzung der Endprodukte der Komplementkaskade. Dies sind der *membrane attack complex* (MAC) sowie die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a [122]. Die Anaphylatoxine wirken chemotaktisch und aktivierend auf phago-

zytierende Zellen wie PMNs, Monozyten und Makrophagen. Außerdem verstärken sie die Akut-Phase-Reaktion in der Leber [64].

1.2.3.2 Chemokine

Chemokine werden zu den chemotaktisch wirksamen Stoffen gezählt, das heißt, sie sind in der Lage, Immunzellen anzuziehen [108].

Chemokine besitzen daher Bedeutung in der Pathophysiologie der posttraumatischen Immundysfunktion. Sie leiten Immunzellen an den Ort der Verletzung und können Zellen des Immunsystems aktivieren. Eines der wichtigsten Chemokine ist IL-8. Die Ausschüttung von IL-8 wird durch IL-1, TNF- α , C5a, Hypoxie und Reperfusionssphänomene angeregt. IL-8 wird bereits in der frühen posttraumatischen Phase ausgeschüttet. Neben den allen Chemokinen gemeinsamen Funktionen wie Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen ist von IL-8 darüber hinaus bekannt, dass es PMNs vor Apoptose schützen kann. Dies wird unter anderem für die verlängerte Aktivierung des Immunsystems an der Verletzungsstelle verantwortlich gemacht [74].

1.2.3.3 Cytokine

Cytokine sind ein grundlegendes Element der Steuerung des Immunsystems. Ihre Aufgabe ist die Kommunikation zwischen zellulären Komponenten des Immunsystems. Daher spielen sie auch eine gewichtige Rolle bei der Entstehung posttraumatischer systemischer Inflammation. Zu den bekannten proinflammatorischen Cytokinen, deren Rolle in der Entstehung eines SIRS als gesichert gelten darf, zählen TNF- α , IL-1 β und IL-6. Diese Botenstoffe werden von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet. TNF- α wird zusätzlich von T-Zellen produziert,

IL-1 β und IL-6 von Endothelzellen. Diese Mediatoren haben vielfältige Wirkungen im Immunsystem, die die Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündung befördern. TNF- α ermöglicht das Übergehen von PMNs und anderen Effektorzellen des Immunsystems aus der Zirkulation in Gewebe, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen anregt. Außerdem werden Zellen des Immunsystems durch TNF- α aktiviert und die Sekretion weiterer proinflammatorischer Cytokine induziert [74]. IL-1 β erleichtert ebenfalls die Diapedese von PMNs und anderen Immunzellen. Eine weitere wichtige Wirkung von IL-1 β ist die Stimulierung des Knochenmarks, was eine erhöhte Produktion von myeloiden Vorläuferzellen zur Folge hat. IL-1 β kann außerdem ebenfalls Zellen des Immunsystems aktivieren und die Transkription von proinflammatorischen Genen in immunkompetenten Zellen anstoßen [74]. IL-6 greift in die Differenzierung von Lymphozyten ein und aktiviert Zellen des angeborenen Immunsystems. IL-6 wirkt zusätzlich antiapoptotisch auf PMNs. Neben diesen proinflammatorischen Eigenschaften hat IL-6 aber auch Bedeutung für die Regulierung der inflammatorischen Reaktion des Organismus auf Verletzungen und erfüllt somit sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen [74].

1.3 Biochemische Grundlagen

Dieser Untersuchung liegt eine Arbeit von *Biberthaler et al.* zugrunde [14]. Dort konnte der Transkriptionsfaktor c-Jun als zentrales Element der Immunantwort auf schwere Verletzungen identifiziert werden. Darauf aufbauend beschäftigt sich die vorliegende Dissertation mit diesem Transkriptionsfaktor und den Signaltransduktionswegen, die ihn aktivieren. Dies sind Proteinkinasen aus der Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Hierbei handelt es sich um die c-Jun N-terminal Kinase (JNK) und die p38 MAPK. Warum diese Faktoren untersucht wurden, wird nochmals genauer unter Punkt 2 ausgeführt. Im Folgenden

sollen nun biochemische Grundlagen und eine Auswertung der Literatur zu den erwähnten Signaltransduktionswegen dargelegt werden.

1.3.1 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Familie

Hinweise auf die Existenz der MAP-Kinasen ergaben sich erstmals vor etwa zwanzig Jahren. Damals wurden Hinweise entdeckt, dass Insulin und andere Mitogene durch Proteinkinase intrazelluläre Phosphorylierung fördern [6].

Die MAP-Kinasen stellen einen der Hauptwege dar, auf dem extrazelluläre Signale in intrazelluläre Wirkungen umgesetzt werden [50]. Die Kaskade der MAP – Kinasen wird durch verschiedene extrazelluläre Stimuli ausgelöst. Dazu zählen unter anderem Zytokine, Wachstumsfaktoren und zellulärer Stress [50]. Diese Stoffe sind auch als „Mitogene“ bekannt, das heißt, sie sind bekannte Auslöser der Mitose.

Es existieren mindestens vier verschiedene Kaskaden von Proteinkinase in der MAPK-Familie. Die bisher bekannten sind die Extracellular signal-related kinases (ERK) 1 und 2, die c-Jun N-terminal kinases (JNK) 1, 2 und 3, die p38 MAP-Kinasen und ERK5 [20, 21]. JNK und p38 MAPK werden auch als stress-activated protein kinases (SAPK) bezeichnet [21]. Da sich die vorliegende Arbeit, wie oben bereits erwähnt, auf die JNK und die p38-MAPK konzentriert, werden in den folgenden Erläuterungen die ERKs vernachlässigt.

Die Aktivierung der MAPK-Pathways' vollzieht sich prinzipiell in drei Schritten. Dies gilt für alle Mitglieder der MAPK-Familie. Durch das extrazelluläre Signal wird zunächst eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MAP3K) durch Phosphorylierung aktiviert. Die MAPKKKs wiederum phosphorylieren und aktivieren damit eine MAPK-Kinase (MAPKK oder MKK). MAPKKs ihrerseits aktivieren eine für die jeweilige MAPKK spezifische MAP-Kinase [25]. Dieses Prinzip erscheint auf den ersten Blick einfach und linear. Dies ist jedoch

nicht der Fall, da verschiedene Querverbindungen zwischen den einzelnen MAPK- Familien existieren. Diese Querverbindungen werden auch als „crosstalk“ bezeichnet [25].

Im Folgenden soll nun auf die beiden in der vorliegenden Studie untersuchten MAP-Kinasen, JNK und p38-MAPK, genauer eingegangen werden.

1.3.1.1 p38-MAP-Kinase

Die p38-MAP-Kinase wird als Antwort auf extrazelluläre Stimuli wie UV-Strahlung, osmotischen Stress, proinflammatorische Cytokine und Hypoxie aktiviert [104]. Über Tyrosinkinaserzeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird das Signal ins Zellinnere vermittelt [21].

Die Aktivierung der p38 MAPK erfolgt über die oben beschriebene dreiteilige Phosphoproteinkaskade. Bei den für die Aktivierung der p38-MAPK verantwortlichen MKKs handelt es sich um MKK3 und MKK6. Upstream der MKKs findet sich eine Vielzahl von MAP3Ks, die zur Aktivierung von p38 führen [149].

Zu den verschiedenen Substraten von p38 gehören Transkriptionsfaktoren, unter anderem die *activating transcription factor* (ATF)-Familie, p53 und HMGB1. AP-1, dessen Bestandteil c-Jun ist, wird ebenfalls durch p38 reguliert. So bildet beispielsweise ATF-2, das ein Substrat von p38 ist, Heterodimere mit Proteinen der Jun-Familie und erhält so Zugriff auf die AP-1-Bindungsstelle [149]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass p38 auch direkt Einfluss auf c-Jun nimmt. Eine Arbeitsgruppe um *Humar et al.* konnte zeigen, dass p38 c-Jun durch direkte Phosphorylierung reguliert [54].

Die Aktivierung von p38 hat mannigfaltige biologische Wirkungen. Gut dokumentiert ist die proinflammatorische Wirkung des p38-Pathways [22, 50]. Eine zentrale Rolle kommt hier der p38-MAPK bei der Bildung von Cytokinen wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 zu.

Außerdem besitzt p38 proapoptotische Wirkung und wirkt bei der Regulierung des Zellzyklus mit [149].

Als therapeutisches Ziel hat die p38-MAPK in den letzten Jahren das Interesse von Forschern geweckt. Ein Beispiel ist der Morbus Alzheimer, bei dem in jüngerer Zeit die Rolle der durch p38 vermittelten Neuroinflammation untersucht wurde. Hier scheint ein therapeutischer Ansatz durch Hemmung von p38 gegeben [91].

Auch bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis ist die p38-MAP-Kinase in den Fokus der Forschung gerückt. Verschiedene Wirkstoffe befinden sich zur Zeit in diesem Bereich in der präklinischen Erprobung [61, 66, 128].

1.3.1.2 C-Jun-N-terminal-Kinase (JNK)

Verschiedene zelluläre Stressoren können die JNK aktivieren. Dazu zählen unter anderem Hitze, ionisierende Strahlung, oxidativer Stress, DNA-schädigende Substanzen und Reperfusionsschaden. Außerdem können inflammatorische Cytokine zur Aktivierung von JNK führen. Bei diesen handelt es sich beispielsweise um alle Cytokine der TNF-Familie, IL-1 oder TGF- β [68, 143]. Rezeptor-Tyrosinkinasen vermitteln die weitere Aktivierung der Signalkaskade [26]. Die auf diese Weise angestoßene Signaltransduktionskaskade verläuft nach dem bereits beschriebenen dreiteiligen Motiv, das allen MAP-Kinasen gemeinsam ist.

Eine große Zahl von MAP3Ks kann die Aktivierung von JNK initiieren. Welche MAP3K aktiv wird, ist vom Zelltyp und der Art des Stimulus abhängig. Der stärkste bekannte Aktivator ist MEKK1. Unter den MAP3Ks wäre außerdem noch die *transforming growth factor- β activated kinase-1* (TAK-1) hervorzuheben. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass TAK-1 für die Aktivierung der JNK durch inflammatorische Cytokine, Antigenrezeptoren sowie TLR-Rezeptoren notwendig ist [111]. Die MAP3Ks aktivieren MAP2Ks, im JNK-

Pathway handelt es sich hierbei um MKK4 und MKK 7. Diese beiden Kinasen sind wiederum verantwortlich für die Aktivierung der JNK [62].

Die JNK hat ein breites Spektrum von Substraten. Dazu zählen Bestandteile der Zellmembran, Elemente des Cytoplasmas und des Cytoskeletts sowie Substrate aus dem Zellkern. Unter den nukleären Substraten sind vor allem Elemente der transkriptionalen Regulierung. Dazu zählt allen voran c-Jun, aber auch andere Transkriptionsfaktoren wie ATF-2, STAT3, MEF2C oder HSF-1 [6, 21, 62].

Die JNK übt auf diese Weise vielfache physiologische und pathophysiologische Funktionen aus. Zum einen spielt die JNK eine wichtige Rolle in der Regulierung der Apoptose. Dies wird unter anderem durch die AP-1 vermittelte Induktion von FasL vermittelt, einem Transmembranprotein, das in Interaktion mit seinem Rezeptor Apoptose auslösen kann [68], zum anderen spielt JNK eine Rolle in Tumorzellen. Ob die JNK hierbei eher onkogen oder tumorsuppressiv wirkt, ist im Moment noch nicht klar [143]. Weitere pathophysiologische Prozesse, in denen die JNK bisher impliziert wurde, sind Insulinresistenz, Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I und ein Mausmodell der Multiplen Sklerose, Schlaganfall und Herzinfarkt [131, 143]. Im Tierversuch werden bereits die Auswirkungen der medikamentösen JNK-Hemmung auf diese Erkrankungen untersucht [47, 84].

1.3.2 Der Transkriptionsfaktor c-Jun

Bei c-Jun handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor. Zusammen mit jeweils einem anderen Protein der Jun-, Fos-, ATF- oder MAF-Familien bildet c-Jun einen dimeren Komplex, den Transkriptionsfaktorkomplex activator protein-1 (AP-1) [33]. C-Jun wird zu

den *immediate-early genes* gezählt, einer Gruppe von Genen, die von Zellen direkt ohne de-novo-Proteinsynthese als Antwort auf extrazelluläre Stimuli exprimiert werden [130].

Aktiviert wird c-Jun wie oben beschrieben über MAP-Kinase-Pathways als Antwort auf proinflammatorische Signale, Wachstumsfaktoren und zelluläre Stressoren. Sowohl p38 als auch JNK besitzen die Fähigkeit, c-Jun zu aktivieren, aber auch eine Vielzahl anderer Proteinkinasen wie die ERK ist dazu in der Lage [33, 54, 143]. Jedoch wird c-Jun nicht nur auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene reguliert. Ein weiterer Mechanismus der Regulation von c-Jun ist beispielsweise die Zusammensetzung des jeweiligen AP-1-Dimers. Von dem Zusammenspiel mit dem jeweiligen Partner im Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 ist die Funktion, die c-Jun ausübt, ganz entscheidend abhängig [33].

Innerhalb der DNA binden AP-1-Komplexe, die Jun-Proteine beinhalten, an *AP-1 DNA recognition elements*, die auch als *TPA response elements* (TREs) bekannt sind, und an *cAMP response elements* (CREs) [119, 120].

Einer der Prozesse, in die c-Jun involviert ist, ist die Onkogenese. Dies wird darauf zurückgeführt, dass unter den Zielgenen, die durch c-Jun hochreguliert werden, viele Gene sind, die die Zellproliferation fördern. Dazu zählen beispielsweise Cyclin D1 oder p53 [9].

C-Jun besitzt weitere Eigenschaften, die im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumorwachstum Bedeutung haben. So konnte gezeigt werden, dass c-Jun wichtig für die Angiogenese durch Tumorzellen ist [150].

C-Jun spielt als Komponente von AP-1 auch eine Rolle bei der Regulierung der Apoptose. Interessanterweise kann c-Jun unter bestimmten Umständen proapoptotische Eigenschaften zeigen. So wird beispielsweise das proapoptotische FasL-Gen durch AP-1 reguliert [33, 120].

Der für die Pathogenese der systemischen Entzündungsreaktion nach Trauma relevanteste Bereich, in dem AP-1 regulatorische Funktionen ausübt, ist das Immunsystem. Aktiviert wird AP-1 unter anderem durch die proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-1 und ist somit

Teil der transkriptionellen Antwort auf proinflammatorische Stimuli [120]. Ein weiterer immunologischer Vorgang, der durch AP-1 beeinflusst wird, ist die T-Zellaktivierung. Hier wird die Produktion von IL-2 durch AP-1 gesteuert. IL-2 ist notwendig für die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen sowie für die Ausprägung von Reaktionen des Immunsystems, die durch T-Zellen vermittelt werden [39]. Auch die Aktivierung von B-Zellen kann AP-1 induzieren [39]. Außerdem wird die Produktion von Cytokinen durch AP-1 gesteuert. Man nimmt an, dass unterschiedliche AP-1-Aktivierungsprofile für die unterschiedliche Cytokinproduktion von Th1- und Th2-CD4+-T-Zellen verantwortlich sind. Es existieren auch Hinweise, dass die Produktion von TNF- α und IFN- γ durch AP-1 im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren gesteuert wird [39].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AP-1 und besonders seine Komponente c-Jun in die Regulierung von Vorgängen wie der Apoptose, dem Zellwachstum und der Ausprägung von Reaktionen des Immunsystems eingebunden ist. Alle diese Mechanismen sind in die Entstehung eines multiplen Organversagens involviert. Dieser Umstand betont die Bedeutung des Transkriptionsfaktors c-Jun für die Pathophysiologie des multiplen Organversagens. In Abbildung 2 sind die Mechanismen der Aktivierung von c-Jun graphisch gezeigt. Dabei werden folgende Abläufe dargestellt: Alarmine aktivieren an der Zelloberfläche Rezeptoren der TLR-Familie. Dies führt zum Andocken cytosolischer Adapterproteine an den Rezeptor. Dadurch werden Proteinkinasen an den Rezeptor rekrutiert. Durch deren Aktivierung werden die Phosphoproteinkaskaden der p38 MAPK- und JNK-Pathways angestoßen. P38 MAPK und JNK aktivieren wiederum c-Jun. C-Jun modifiziert die Transkription der Zelle, was zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine in den Extrazellulärraum führt.

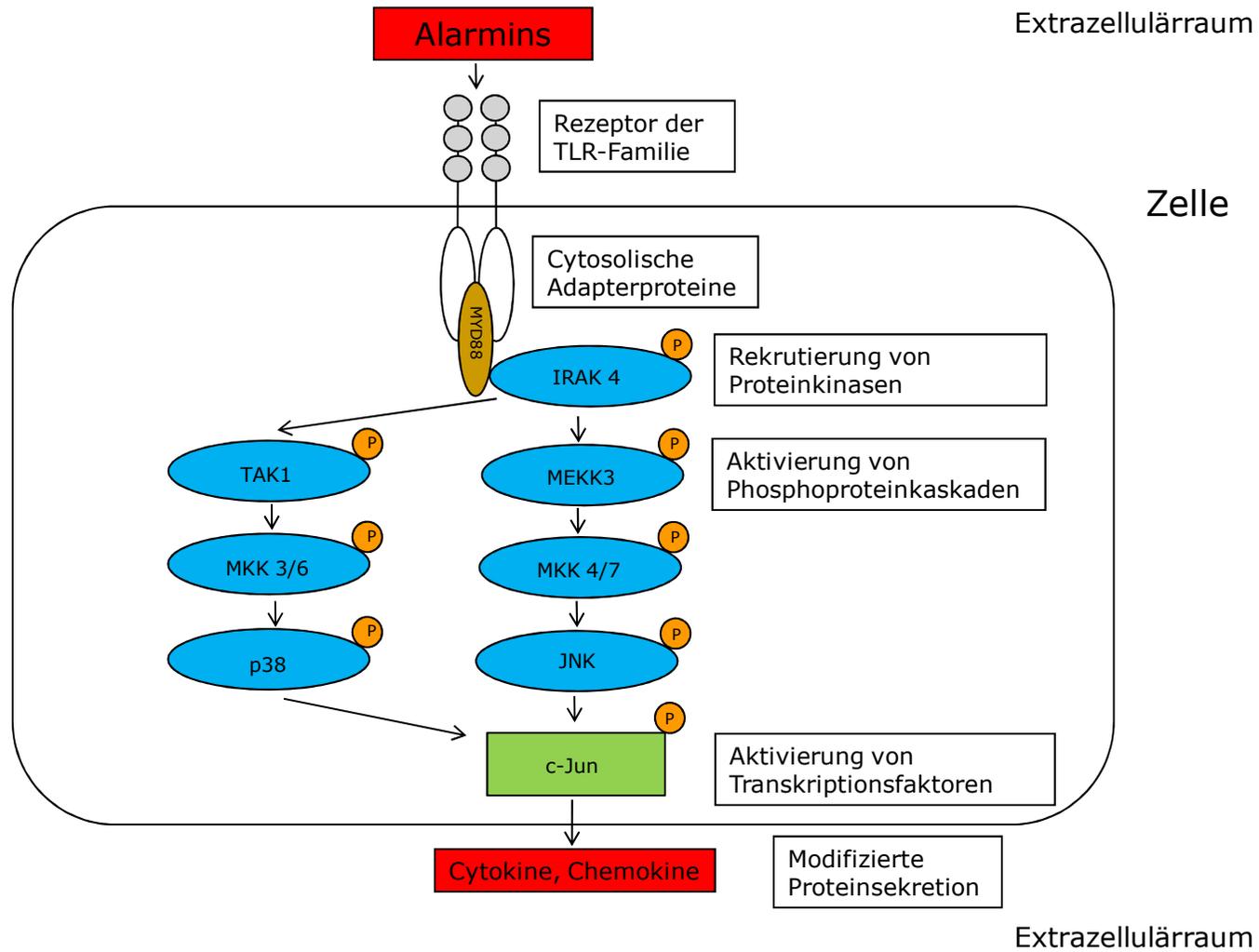


Abbildung 2: Aktivierung von c-Jun durch p38 MAPK und JNK in einer Zelle des angeborenen Immunsystems
 Modifiziert nach: Gaestel et al. [41]

2. Fragestellung

Die Vorarbeiten zur vorliegenden Dissertation von *Biberthaler et al.* konnten zeigen, dass Patienten, die an den Folgen der posttraumatischen Immundysfunktion versterben, spezifische mRNA-Expressionsmuster in im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten zeigen [14].

In dieser Studie konnte mittels einer genomweiten Analyse der mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten demonstriert werden, dass verstorbene Patienten eine signifikant erhöhte Aktivierung von Signaltransduktionsnetzwerken zeigen, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun führen. Es existieren also deutliche Hinweise, dass c-Jun entscheidend in die Pathogenese der posttraumatischen Immundysfunktion involviert ist. Es ist allerdings bekannt, dass transkribierte RNA nicht zwangsläufig entsprechend in Protein umgesetzt wird. Lediglich Protein ist aber auch pathophysiologisch wirksam. Zusätzlich müssen die meisten Signaltransduktionsproteine und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert werden, um biologisch aktiv zu sein [58]. Um die Bedeutung des Ergebnisses einer erhöhten Expression von c-Jun auf mRNA-Ebene korrekt einschätzen zu können, war daher eine Bestimmung der tatsächlichen Menge an aktiviertem, d.h. phosphoryliertem, c-Jun-Protein notwendig. Zwangsläufig ergibt sich auch die Frage, welche Faktoren für die Aktivierung von c-Jun verantwortlich sind. Wie oben dargelegt, ist bekannt, dass die MAP-Kinasen p38 MAPK und JNK c-Jun aktivieren. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, zu untersuchen, ob auch Signaltransduktionselemente upstream von c-Jun abhängig von klinischen Parametern aktiviert werden und somit phosphoryliert vorliegen. Aus den dargelegten Überlegungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Existiert eine zeitliche Dynamik in der Konzentration der aktivierten Form des Transkriptionsfaktors c-Jun und der MAP-Kinasen p38 und JNK in Monozyten polytraumatisierter Patienten?
- Korreliert die Menge an aktiviertem c-Jun und an aktivierter p38 MAPK und JNK in Monozyten polytraumatisierter Patienten mit klinischen Parametern?
- Lässt sich ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Aktivierung von c-Jun und der Menge an aktivierter p38 MAPK und JNK herstellen?

3. Patienten und Methoden

3.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde unter dem Aktenzeichen 012/00 von der Ethikkommission der Universität München genehmigt. In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, die mit einem Polytrauma, dessen Schwere eine Einstufung nach Injury Severity Score [8] von 16 Punkten und mehr rechtfertigte, den Schockraum der Chirurgischen Klinik (Innenstadt) der Universität München erreichten. Eine weitere Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war, dass die Patienten den Schockraum innerhalb von 90 Minuten nach dem Traumazeitpunkt erreichten. Verstarb der Patient innerhalb von 24 Stunden nach Trauma, wurde er aus der Studie ausgeschlossen.

Ausschlusskriterien waren Alter unter 18 Jahren, Schwangerschaft und penetrierendes Trauma. Außerdem wurden keine Strafgefangenen in unsere Studie aufgenommen.

Ziel der Studie war es, die intrazellulären Mechanismen der generalisierten Störungen des Immunsystems, die nach schwerem Trauma auftreten, zu untersuchen. Endpunkt unserer Studie war das Überleben 90 Tage nach dem Trauma.

Aufgrund der Schwere ihrer Verletzungen und der damit einhergehenden Intubation und Analgosedierung waren die Patienten zunächst nicht in der Lage, in die Teilnahme an der Studie einzuwilligen. Daher wurde die Einverständniserklärung von den Patienten eingeholt, sobald sie dazu wieder in der Lage waren. Gegebenenfalls wurde das Einverständnis von den Angehörigen oder Betreuern der Patienten gegeben.

Zu sechs Zeitpunkten wurde den Patienten Blut abgenommen, zumeist aus arteriellen Kanülen. Zu diesen Zeitpunkten wurden die Blutentnahmen durchgeführt: direkt nach Aufnahme in den Schockraum (0 Stunden) und jeweils 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach

dem Zeitpunkt des Traumas. Für die vorliegende Arbeit wurde den Patienten insgesamt 40 ml Blut abgenommen. Hierfür wurden 4 Probenröhrchen der Firma BD Diagnostics (Franklin Lakes, NJ, USA) à 10 ml Fassungsvermögen mit jeweils 18 mg Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zur Antikoagulation verwendet. Das entnommene Blut wurde direkt im Anschluss an die Abnahme im Chirurgischen Forschungslabor der Chirurgischen Klinik (Innenstadt) der Universität München weiterbearbeitet.

Teil der vorliegenden Studie war es auch, durch die Auswertung der Patientenakten eine Vielzahl klinischer Parameter zu erfassen. Dazu zählten demographische Daten des Patienten wie Alter und Geschlecht, das Verletzungsmuster, Beatmungsdaten wie FiO_2 und Beatmungsdrücke und Labordaten wie der Hämoglobinwert, die Konzentration an C-reaktivem Protein, usw. Aus diesen Angaben wurde zu jedem Abnahmezeitpunkt der Multiple Organ Failure Score nach Goris et al. berechnet [72]. Ein Multiorganversagen liegt nach diesem Scoringssystem vor, wenn ein Punktwert von ≥ 4 Punkten erreicht wird. Auf ein einzelnes Organsystem bezogen, liegt bei einem zugeordneten Wert von 1 Punkt eine Dysfunktion des Organsystems vor, bei einem Wert von 2 Punkten ein Organversagen. Außerdem wurde die Anzahl der transfundierten Blutprodukte erhoben.

Des Weiteren wurde detailliert der Injury Severity Score berechnet [8]. Zwar hat eine kürzlich erschienene Arbeit von *Harwood et al.* gezeigt, dass der ISS dem New Injury Severity Score (NISS) in Bezug auf die Vorhersage der Mortalität unterlegen ist [48]. Dennoch wurde in dieser Studie der ISS verwendet, da dieses Scoring-System im Moment noch weiter verbreitet ist und daher eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien eher gegeben ist. Die Berechnung des ISS erfolgte nach dem Handbuch der Association for the Advancement of Automotive Medicine [23]. Hierzu wird der Körper des Verletzten in folgende sechs Regionen unterteilt: Kopf/Hals, Gesicht, Thorax, Abdomen und Becken, Extremitäten und Beckengürtel sowie Haut. Die Verletzungen des Patienten werden zunächst den anatomischen

Regionen zugeordnet. Anschließend wird die Schwere der Verletzung nach der *Abbreviated Injury Scale* (AIS) quantifiziert [42]. Zu den einzelnen Stufen der AIS siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Stufen des *Abbreviated Injury Scale* (AIS)

AIS-Stufe	Schweregrad der Verletzung
0	Keine Verletzung
1	Gering
2	Moderat
3	Ernst
4	Schwer
5	Kritisch
6	Nicht überlebbar

Anschließend wird der höchste AIS-Wert jeder anatomischen Region bestimmt. Die höchsten drei AIS-Werte aller Regionen werden anschließend quadriert. Die Addition der Quadrate der AIS-Werte ergibt den *Injury Severity Score* (ISS). Ein Beispiel für die ISS-Berechnung anhand des Patienten 1 dieser Studie zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Beispiel einer ISS Berechnung

Anatomische Region	Verletzung	AIS	AIS ²	ISS
Kopf/Hals	Bilaterales intrakranielles Hämatom	5	25	25
	Subdurales Hämatom	4	16	
Gesicht	Keine Verletzung	0	0	
Thorax	Hämatopneumothorax beidseits	4	16	16
	Lungenkontusion einseitig	3	9	
Abdomen/Becken	Ruptur der A. iliaca interna	4	16	16
	Kontusion von Ileum und Jejunum	2	4	
	Nierenkontusion	2	4	
Extremitäten/Beckengürtel	Femurfraktur rechts	3	9	
	Tibiafraktur rechts	2	4	
	Fraktur von Acetabulum, Os sacrum und Os pubis	2	4	
Haut	Keine Verletzung	0	0	
				57

3.2 Separation von Monozyten

Direkt nach der Blutabnahme im Schockraum oder auf der Intensivstation wurden aus dem gewonnenen EDTA-Vollblut die Monozyten extrahiert.

Hierzu war es zunächst notwendig, die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Um dies zu erreichen, wurden je 10 ml Blut mit 40 ml Erylysepuffer aufgefüllt und für 10 – 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Erylysepuffer setzte sich wie folgt zusammen: zu 1000 ml Aqua destillata wurden 10,375 g NH_4Cl , 1,25 g KHCO_3 sowie 2,25 ml 5% EDTA-Lösung zugegeben. Hierauf folgte eine Zentrifugation des Gemisches für 10 Minuten bei 450 g und 20° C. Nach Abgießen des Erylysepuffers verblieb ein Zellpellet. Durch erneutes Auffüllen mit jeweils 5 ml Erylysepuffer, Schwenken und Abgießen sollten etwaige verbliebene Erythrozyten zerstört werden. Abschließend wurden die Pellets durch Auffüllen mit 5 ml phosphate buffered saline (PBS)-Puffer und erneute fünfminütige Zentrifugation bei 450 g und 20° C nochmals gewaschen. Die Bestandteile des PBS-Puffers (pH 7,4) waren: 1000 ml Aqua destillata, 0,25 g KCl, 10g NaCl, 1,8g Na_2HPO_4 , 0,3g KH_2PO_4 , sowie 2,25 ml 5% EDTA-Lösung.

Die entstandenen Zellpellets wurden mit 500 μl PBS-Puffer resuspendiert und das Volumen der Zellsuspension wurde durch möglichst genaues Aufziehen mit einer 1000 μl -Pipette bestimmt.

10 μl der Zellsuspension wurden anschließend im Verhältnis 1 : 1000 mit PBS-Puffer verdünnt. 10 μl der Verdünnung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus der so ermittelten Zellzahl pro μl Suspension und dem Gesamtvolumen der Zellsuspension konnte die in der Zellsuspension enthaltene Gesamtzellzahl berechnet werden. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl auf $1,5 \times 10^8$ Zellen standardisiert. Die überschüssigen Zellen wurden bei – 80° C konserviert.

Ziel des nächsten Schritts war es, aus der leukozytären Zellsuspension die Monozyten zu isolieren. Hierzu wurde das sogenannte *magnetic cell separation* (MACS)-Verfahren verwendet. Prinzipiell wird bei MACS-basierter Zellseparation die gewünschte Zellpopulation mit superparamagnetischen Partikeln, so genannten Microbeads, markiert, die auf der Oberfläche Antikörper tragen, die gegen ein für die Zielzellpopulation charakteristisches Antigen gerichtet sind. Im Falle von Monozyten handelt es sich bei dem charakteristischen Antigen um *cluster of differentiation* (CD) 14. Die markierenden Partikel sind lediglich 50 nm groß und nicht biologisch aktiv, so dass sie nachfolgende Experimente mit den gewonnenen Zellen nicht stören.

Für die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Versuche wurde das MiniMACS-Cell-Separation-System der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach verwendet. Dieses System hat seine Leistungsfähigkeit in Bezug auf die Reinheit der separierten Zellfraktion wiederholt unter Beweis gestellt [70]. Es hat inzwischen seinen Weg von der Forschung in die Klinik gefunden und findet unter dem Namen CliniMACS dort Anwendung, wo Zellpopulationen aus Vollblut isoliert werden müssen, z.B. im Bereich der Stammzelltransplantation zur Behandlung der Leukämie [32]. Das für diese Dissertation verwendete Monozytenisoliationsprotokoll ist für Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe in Bezug auf die Reinheit der gewonnenen Monozytenfraktion mit Hilfe von anti-CD14-Färbung zytometrisch validiert worden. Die Reinheit der Monozytenfraktion lag in diesen Versuchen mit gesunden Personen bei $87\% \pm 3$ ($n=3$, Durchschnitt \pm SEM) [14].

Zu der erythrozytendepletierten Zellsuspension wurden im nächsten Schritt 300 μ l der kommerziell erhältlichen „*anti-human CD14 MicroBeads*“ der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach (Katalognummer 130-050-201), hinzugefügt. Der für die Microbeads verwendete Antikörper war vom Isotyp Maus IgG2a, die Klonnummer wird von der Herstellerfirma nicht angegeben. Das Volumen der Mischung aus Zellsuspension und

Microbeads wurde mit PBS auf 1500 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit den Microbeads für 15 Minuten bei 4° C. Nun wurde die Zellsuspension in zwei Portionen aufgeteilt und auf zwei MACS-Säulen gegeben. Die Säulen wiederum wurden in Separatoren eingebracht. Hierbei handelt es sich um Geräte, die mit starken permanenten Magneten ausgerüstet sind. Mit den magnetischen Microbeads markierte Zellen bleiben aufgrund des Magnetfeldes im Filter der Säule hängen. Um alle nicht markierten Zellen zu entfernen, wurde die Säule im Magnetfeld dreimal mit 500 µl PBS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Monozyten wurden mit zwei Mal 1000 µl PBS-Puffer aus der Säule ausgespült.

Abschließend wurde die Zahl der gewonnenen Monozyten unter dem Mikroskop mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und dokumentiert

3.3 Isolierung nukleären Proteins

Nach erfolgreicher Isolierung der Monozyten wurde im nächsten Schritt die cytosolische Proteinfraction der Zellen von der nukleären Fraktion getrennt.

Zunächst wurde die im vorherigen Schritt gewonnene Monozytensuspension bei 450 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das verbleibende Zellpellet wurde mit 250 µl eines speziellen Puffers resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Puffer wurde auf folgende Weise hergestellt: 5 ml 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 1 ml 10 mM KCl und 10 ml 0,1 M EDTA wurden zu einem Basispuffer vermischt. Zu 10 ml dieses Basispuffers wurden 10 µl 10 mM Dithiothreitol (DTT), 40 µl 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 40 µl NP-40 und 100 µl eines Proteaseinhibitorkomplexes zugegeben. Der Proteaseinhibitorkomplex wurde aus folgenden Inhaltsstoffen hergestellt: 10 mg Antipain (gelöst in 2 ml Aqua destillata), 10 mg

Aprotinin (gelöst in 0,8 ml Aqua destillata), 10 mg Leupeptin (gelöst in 0,8 ml Aqua destillata), 1 mg Pepstatin (gelöst in 0,125 ml Aqua destillata), 15 mg Bestatin (gelöst in 1,5 ml Methanol), 8 mg Phosphoamidon (gelöst in 2 ml Methanol) und 50 mg Trypsininhibitor (gelöst in 2 ml 50% Methanol).

Durch das in dem Puffer enthaltene NP-40, ein Detergens, wurde die Phospholipidmembran der Zellen zerstört und die Zellinhalte freigesetzt. Die nukleären Membranen bleiben hierbei zunächst weitgehend intakt. Durch weitere Inhaltsstoffe des Puffers wie den Proteaseinhibitor-Komplex wurde verhindert, dass die freigesetzten Proteine abgebaut werden oder anderweitig beschädigt werden.

Anschließend wurde die Zellsuspension in Eppendorfgläser überführt und für fünf Minuten bei 4° C und 1400 g zentrifugiert. In den erhaltenen Überständen befand sich die cytosolische Proteinfraction. Die Überstände wurden bei – 80° C eingefroren.

Die verbliebenen Pellets stellten die nukleäre Fraction dar. Sie wurden mit 100 µl eines weiteren Puffers resuspendiert. Dieser Puffer wurde auf folgende Weise hergestellt: 10 ml 20 mM HEPES (pH 7,9), 8 ml 0,4 M NaCl und 0,2 ml 1 mM EDTA wurden vermischt. Anschließend wurde die entstandene Suspension für 15 Minuten auf einem Vortexgerät gelagert. Dieser Schritt diente der mechanischen Zerstörung der verbliebenen Zellkernmembranen und somit der Freisetzung des nukleären Proteins. Die Eppendorfgläser mit der Suspension des nukleären Proteins wurden nun bei – 80 ° C gelagert. Mit den nukleären Proteinen wurden die weiteren Experimente durchgeführt.

3.4 Phosphoprotein – Messung

Aus den oben aufgeführten Gründen haben wir uns für die vorliegende Arbeit für die Messung von drei Proteinen entschieden. Hierbei handelt es sich um c-Jun, JNK und die p38

MAP-Kinase. Diese Proteine wurden in ihrer phosphorylierten, d.h. aktivierten Form gemessen.

Die Messungen der Phosphoproteinkonzentrationen wurden am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Leipzig durchgeführt.

Zur Messung der Menge der in den nukleären Proben enthaltenen Phosphoproteine wurde das kommerziell erhältliche Bio-Plex Phosphoprotein Detection-System der Firma Bio-Rad, Hercules, CA, USA benutzt. Das Bio-Plex-System wurde bereits mehrfach in aufwändigen Studien benutzt, beispielsweise in einer Arbeit über eine mögliche Gentherapie für das Pankreaskarzinom [77].

Dem Bio-Plex-System liegt die Luminex-Technologie, die von der Firma Luminex Corp., Austin, TX, USA an die Firma Bio-Rad lizenziert wird, zugrunde. Hierbei handelt es sich um eine Form des Immunoassays. Immunoassays sind analytische Verfahren, die benutzt werden, um Zielmoleküle in komplex zusammengesetzten Proben nachzuweisen [59]. Immunoassays wurden erstmals von *Berson* und *Yalow* im Jahre 1959 beschrieben, damals in Form eines Radioimmunoassays, der zum Nachweis von humanem Insulin radioaktives Iod-131 benutzte [147]. Im Gegensatz dazu benutzt die Luminex-Technologie sphärische Partikel, die speziell eingefärbt sind und an Antikörper gekoppelt sind, sogenannte Beads, und Fluoreszenzmarker, um die Zielmoleküle sichtbar zu machen.

Die gegen das Zielmolekül gerichteten Antikörper werden kovalent an die Beads gebunden. Alle Reaktionen finden auf der Oberfläche der Beads statt. Die Beads haben für jedes einzelne Zielmolekül eine unterschiedliche spezielle Färbung, die sich aus einer Mischung aus roten und orangefarbenen Fluoreszenztönen zusammensetzt. Damit wird erreicht, dass verschiedene Zielmoleküle in einem einzigen Ansatz gemessen werden können. Nachdem die Antikörper auf den Beads das gewünschte Molekül gebunden haben, wird ein fluoreszenz-markierter

Nachweisantikörper zugegeben. Dieser bindet an den Bead-Zielmolekülkomplex. Es bildet sich ein so genannter „Sandwich“-Immunkomplex, in dem das Zielmolekül von den beiden Antikörpern umschlossen wird. Anschließend wird der Ansatz in einem Flow-Cytometer gemessen. Das Gerät registriert auf einem Kanal mittels eines Lasers, der die Fluoreszenzfarbstoffe anregt, die Färbung des Beads und kann damit das gebundene Molekül identifizieren. Auf einem zweiten Kanal wird durch einen Laser unterschiedlicher Wellenlänge die Intensität der Nachweisfluoreszenz gemessen. Damit ist eine Aussage über die Quantität des an die Beads gebundenen Zielmoleküls möglich [59, 138, 145]. Zur Veranschaulichung des Prinzips der Luminex-Technologie siehe Abbildung 3.

Die verwendeten Luminex-Kits wurden von der Firma Bio-Rad auf Bestellung angefertigt (Artikelnummer X700006400). Es handelte sich dabei um sogenannte „3-plex“-Kits, mit denen drei verschiedene Phosphoproteine in einem Ansatz detektiert werden können. Die in den Kits verwendeten Antikörper wurden von der Firma Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA zugeliefert. Weitergehende Information wie der Isotyp oder die Klonnummer der verwendeten Antikörper werden von der Firma Bio-Rad als vertraulich betrachtet und nicht angegeben. Außerdem wurde das „Bio-Plex Phosphoprotein Detection Reagent Kit“ der Firma Bio-Rad (Artikelnummer 171-304004) verwendet. Dieser Kit enthielt Assaypuffer (Artikelnummer 9-704160), Waschpuffer (Artikelnummer 171-304550), Antikörperverdünnungslösung (Artikelnummer 9-704165), Resuspensionspuffer (Artikelnummer 9-704166) und 100X Streptavidin-PE (Artikelnummer 171-307020). Die genaue Zusammensetzung dieser Reagenzien wird vom Hersteller als vertraulich eingestuft und nicht an den Endkunden herausgegeben.

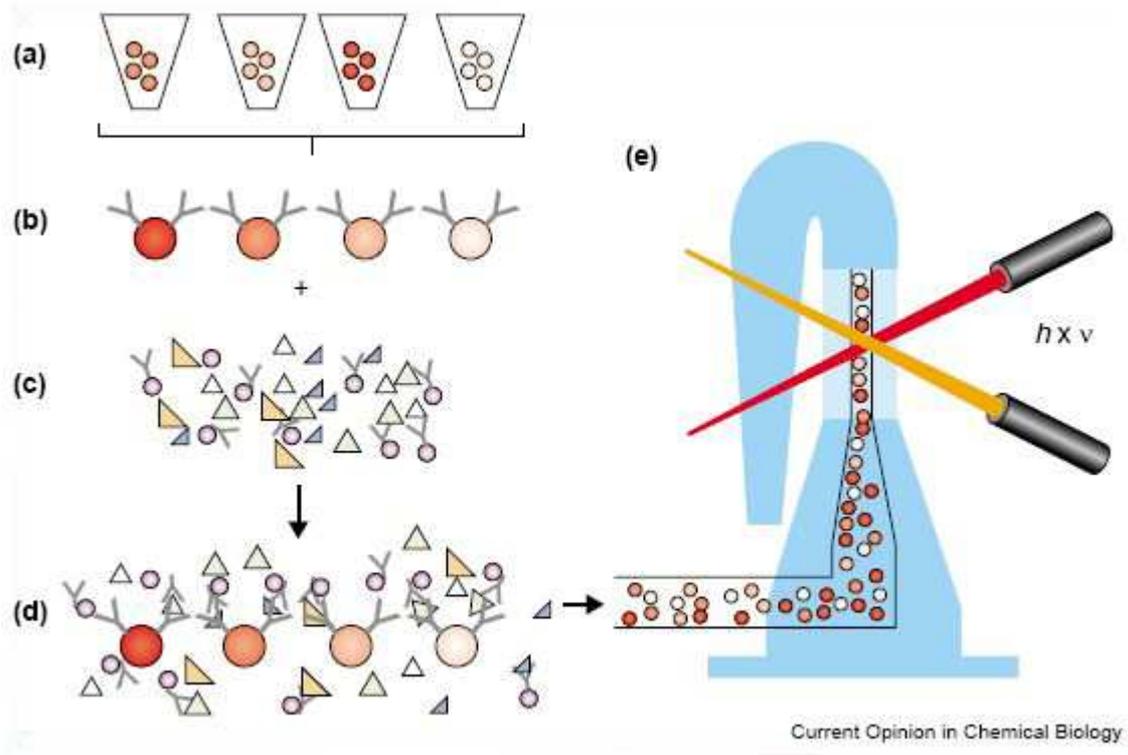


Abbildung 3: Prinzip der Luminex-Technologie

- a) Gegen das Zielmolekül gerichtet Antikörper werden an charakteristisch gefärbte Beads gebunden
- b) Die verschiedenen Beads werden in einen Ansatz mit dem Analyt und
- c) fluoreszenzmarkierten Nachweisantikörpern inkubiert
- d) Es bilden sich Sandwichimmunkomplexe, die mittels
- e) eines Flowcytometers identifiziert und quantifiziert werden.

Aus Joos et. al. [59]

Die Messungen fanden auf Platten mit 96 Vertiefungen, so genannten „wells“ statt. Für die Experimente wurden Filterplatten verwendet, die es erlauben, durch Anlegen eines Vakuums, die Flüssigkeit aus den wells zu entfernen, während die Feststoffe zurückgehalten werden. Bei dem verwendeten Vakuumgerät handelte es sich um ein „Bio-Plex suspension array system“-Gerät des Herstellers Bio-Rad. Zur Vorbereitung der Filterplatten für das Experiment wurden zunächst alle verwendeten wells auf der Filterplatte mit 100 µl Waschpuffer gefüllt und die Flüssigkeit mit dem Vakuumgerät abgesaugt. Des Weiteren wurden die vom Hersteller gelieferten an Beads gekoppelten Antikörper im Verhältnis 1 : 50 mit Waschpuffer verdünnt. Nun wurden zunächst 50 µl des verdünnten Beadassays in jedes well gegeben und die Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend folgten zwei Waschschritte. Hierfür wurden alle verwendeten wells wieder mit 100 µl Waschpuffer gefüllt und die Flüssigkeit mittels Vakuum

abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden 50 µl der nukleären Proteinsuspension in die wells gegeben. Dieser Ansatz wurde nun über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Flüssigkeit in den wells per Vakuumfiltration abgesaugt, gefolgt von drei Waschschrritten. Als nächstes wurde der vom Hersteller gelieferte Nachweisantikörpermix im Verhältnis 1 : 25 mit Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Diese Antikörpermischung enthielt drei verschiedene biotinylierte sekundäre Antikörper, die jeweils gegen Epitope eines der drei Zielmoleküle gerichtet waren. Von der verdünnten Nachweisantikörperlösung wurden je 25 µl in die wells gegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation. Nach erneuter Vakuumfiltration wurden die Platten drei Waschschrritten unterzogen. Zur Vorbereitung des nächsten Schritts wurde die vom Hersteller gelieferte 100X Streptavidin-PE-Lösung im Verhältnis 1 : 100 mit Waschpuffer verdünnt. Streptavidin war in dieser Lösung mit Phycoerythrin (PE), einem Fluoreszenzfarbstoff, konjugiert. Streptavidin-PE bildet sehr starke Bindungen mit Biotin [75]. Da die Nachweisantikörper biotinyliert waren, band das fluoreszenzmarkierte Streptavidin an die Nachweisantikörper. Auf diese Weise konnten die Nachweisantikörper vom Flow-Cytometer registriert werden. 50 µl der verdünnten Streptavidin-PE-Lösung wurden nun in die wells gegeben. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten. Um überschüssiges Streptavidin-PE zu entfernen wurden im Anschluss jeweils 100 µl Resuspensionspuffer in die wells gegeben und die Flüssigkeit mit Hilfe des Vakuumgeräts abgesaugt. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Nach abschließender Zugabe von 125 µl Resuspensionspuffer und 30-sekündiger Inkubation war der Ansatz bereit zur Datenakquirierung.

Hierfür wurden ein Luminex 100-Gerät des Herstellers Bio-Rad, Hercules, CA, USA, und die mit dem Gerät gelieferte Software verwendet. Direkt bevor die Platten in das Gerät gegeben wurden, wurden die Platten für 30 Sekunden auf ein Vortexgerät gegeben, um die Beads

gleichmäßig im Analysat zu verteilen. Die resultierenden Daten wurden von dem Gerät zunächst im Microsoft Excel-Dateiformat gespeichert.

3.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der wurden die gewonnenen Daten aus der Exceldatei mit den Rohdaten in das Programm SigmaStat in der Version 3.5 der Firma Systat Inc., Chicago, IL, USA transferiert. Bei allen angewendeten statistischen Verfahren wurde $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 8.0. In den graphischen Darstellungen repräsentieren alle angegebenen Werte die durchschnittliche Fluoreszenzintensität, die in MESF-Einheiten angegeben ist. MESF steht für *molecules of equivalent soluble fluorochrome* [115]. Alle angegebenen Werte stellen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität +/- den *standard error of mean* in der jeweiligen Gruppe dar.

Zunächst wurden die Durchschnittswerte der Phosphoproteinmenge zu den sechs Abnahmezeitpunkten ermittelt. Auf diese Weise konnte der Verlauf der Phosphoproteinmenge im gesamten Patientenkollektiv über den Beobachtungszeitraum von 72 Stunden beurteilt werden.

Anschließend wurde geprüft, ob zwischen den sechs Abnahmezeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede feststellbar waren. Da die ermittelten Messwerte nicht normalverteilt waren, kam ein nicht-parametrisches Testverfahren, die Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, zum Einsatz. Hierbei werden den einzelnen Werten Ränge zugeordnet und anschließend die statistischen Berechnungen durchgeführt [40]. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden die sechs Gruppen miteinander verglichen.

Im nächsten Schritt wurden die Patienten anhand ihrer klinischen Merkmale in dichotome Gruppen eingeteilt. Bei diesen Parametern handelte es sich um das Überleben des Patienten, die Verletzungsschwere sowie die Menge an übertragenen Erythrozytenkonzentraten (EKs).

Bei einer deskriptiven statistischen Analyse der Daten wurde festgestellt, dass der mediane ISS-Wert im Patientenkollektiv 34 Punkte beträgt. Dieser mediane Wert wurde als die Grenze für die dichotome Aufteilung des Patientenkollektivs gewählt. Folglich wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt, eine mit $ISS \leq 34$, die andere mit $ISS > 34$.

Bezüglich des Transfusionsbedarfs wurden gemäß der Definition der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie alle Patienten, die zehn EKs und mehr erhalten hatten, in die Gruppe massentransfundierter Patienten eingeteilt [53]. In die Gruppe der Patienten, die keine Massentransfusion erhalten hatte, wurden die Patienten eingeteilt, denen neun oder weniger EKs übertragen worden waren.

Auch die auf diese Weise aufgeteilten Messwerte waren nicht normalverteilt. Daher wurde ein weiteres nicht-parametrisches Testverfahren, der Mann-Whitney-U-Test, benutzt, um jeweils die beiden Gruppen miteinander zu vergleichen [40]. Auch bei diesem Test handelt es sich um ein rangbasiertes Verfahren, bei dem den einzelnen Messwerten innerhalb der Gruppe Ränge zugewiesen werden. Im Gegensatz zur Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, die die Analyse mehrerer Gruppen erlaubt, kann der Mann-Whitney-U-Test aber nur zum Vergleich von zwei Gruppen herangezogen werden. Einen Überblick über das Design der Studie gibt Abbildung 4.

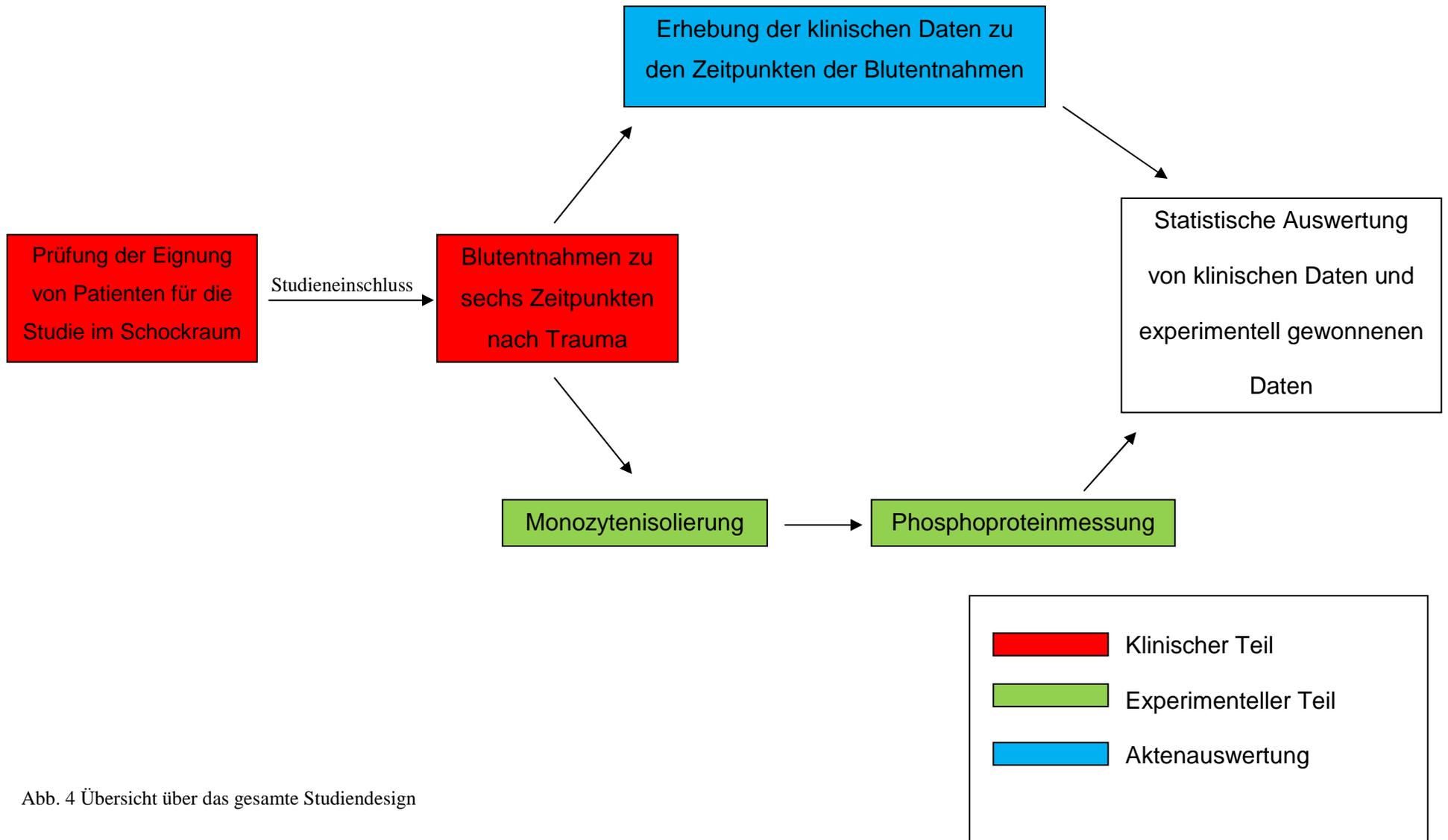


Abb. 4 Übersicht über das gesamte Studiendesign

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

Insgesamt wurden 37 Patienten, 22 männliche und 15 weibliche, in die Studie eingeschlossen. Damit waren 59,4% der Patienten männlich, 40,5% waren weiblich.

Sieben Patienten verstarben innerhalb der follow-up-Periode von 90 Tagen, 30 Patienten überlebten. Der Anteil an verstorbenen Patienten betrug somit 18,9%.

Das durchschnittliche Alter aller Patienten betrug 44,1 Jahre mit einer Standardabweichung von 15,2 Jahren. Die Patienten waren zwischen 18 und 84 Jahre alt.

Die mittlere Verletzungsschwere, quantifiziert mittels Injury Severity Score (ISS), betrug im $35,1 \pm 2,5$ Punkte (Mittel \pm Standard error of mean), wobei die Werte im Bereich zwischen 17 und 66 Punkten lagen.

In der Gruppe mit $ISS \leq 34$ Punkten befanden sich 21 Patienten, in der Gruppe mit $ISS > 34$ Punkten 16 Patienten.

Bei allen Patienten der Studie lag zu mindestens einem der sechs Abnahmezeitpunkt ein MOF-Score von > 4 Punkten vor. Per definitionem ist bei einem Wert von > 4 Punkten ein Multiorganversagen gegeben [72]. Eine Auswertung der Daten anhand des Kriteriums Multiorganversagen war daher nicht möglich.

16 Patienten benötigten eine Massentransfusion. Im Durchschnitt erhielten die Patienten dieser Gruppe $29,4 \pm 3,5$ Erythrozytenkonzentrate (Mittel \pm SEM). Die Menge an transfundierten Erythrozytenkonzentraten lag in der Gruppe der Patienten, die eine Massentransfusion erhalten hatten, zwischen 13 und 58 Einheiten.

21 Patienten erhielten weniger als zehn EKs. In dieser Gruppe wurden durchschnittlich $5,1 \pm 0,8$ Einheiten (Mittel \pm SEM) transfundiert, wobei zwischen 0 und 9 Erythrozytenkonzentrate übertragen wurden. 1 EK entspricht einer Menge von 300 ml Blut.

Die demographischen und klinischen Daten, die die Patienten näher charakterisieren, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Klinische Merkmale der Patienten

Nummer	Verletzungsmuster	Geschlecht	Alter	Verstorben	ISS	Massentransfusion
1	Schädelhirntrauma (SHT) mit bilateralem intrakraniell und subduralem Hämatom, Lungenkontusion, Hämatopneumothorax beidseits, Ruptur der A. iliaca interna, Kontusion von Ileum und Jejunum, Nierenkontusion, Fraktur von Acetabulum, Os sacrum und Os pubis, multiple Frakturen beider unteren Extremitäten	Männlich	34	Nein	57	Ja (53 EKs)
2	Dislozierte Halswirbelkörper (HWK)- Fraktur mit komplettem Querschnittssyndrom, weitere multiple HWK-Frakturen, beidseitige Lungenkontusionen	Weiblich	39	Nein	45	Nein (9 EKs)
3	SHT mit bilateralem subduralem Hämatom, Lungenkontusion, Pneumothorax mit Rippenfraktur, Milzruptur, Acetabulumfraktur, Beckenfraktur, Ruptur eines Seitenastes der A. iliaca communis, Humerusfraktur	Weiblich	32	Nein	66	Nein (6 EKs)
4	Komplexe Femurfrakturen beidseits, einseitig offen, Ruptur der V. femoralis, weitere Weichteilverletzungen	Weiblich	63	Ja	21	Ja (14 EKs)
5	Beidseitige Lungenkontusionen, Milzruptur, Femurfraktur	Männlich	62	Nein	27	Nein (9 EKs)
6	SHT mit epiduralem Hämatom und Subarachnoidalblutung, Schädelfraktur, Lungenkontusion rechts, LWK-Frakturen, Scapulafraktur	Männlich	51	Nein	29	Nein (9 EKs)

Fortsetzung Tab. 4: Klinische Merkmale der Patienten

Nummer	Verletzungsmuster	Geschlecht	Alter	Verstorben	ISS	Massentransfusion
7	SHT mit subduralem Hämatom und Hirnödem, Fraktur des Axis, Lungenkontusion mit Rippenfrakturen, Ruptur des Diaphragma, Nierenruptur mit schwerer Gefäßverletzung, Leberruptur in zwei Segmenten, Milzruptur, komplexe Beckenfraktur mit Beteiligung von Os pubis und Os ischiadicum, multiple LWK-Frakturen	Weiblich	48	Ja	50	Ja (32 EKs)
8	SHT mit subduralem Hämatom, Subarachnoidalblutung und Fraktur der Schädelbasis, dislozierte HWK-Fraktur mit Quetschung des Rückenmarks, beidseitige Lungenkontusionen mit Pneumothorax links und Rippenfrakturen, Myokardkontusion, Milzruptur, Pankreaskontusion, komplexe und offene Frakturen der oberen Extremität, Beckenfraktur mit Beteiligung von Acetabulum und Os pubis	Weiblich	25	Nein	50	Nein (9 EKs)
9	Schweres SHT mit traumatischer Subarachnoidalblutung und intracerebraler Blutung, Hämatothorax beidseits, schwere Verletzung der Mesenterialgefäße, Frakturen von Femur und Tibia	Männlich	57	Nein	57	Ja (29 EKs)
10	Schweres SHT mit beidseitigem subduralem Hämatom, Subarachnoidalblutung und Impressionsfraktur, Hämatothorax mit Rippenserienfraktur, Leberruptur	Weiblich	51	Ja	45	Ja (17 EKs)

Fortsetzung Tab. 4: Klinische Merkmale der Patienten

Nummer	Verletzungsmuster	Geschlecht	Alter	Verstorben	ISS	Massentransfusion
11	Rippenserienfraktur, LWK-Fraktur, Amputation der linken unteren Extremität	Männlich	39	Nein	17	Ja (23 EKs)
12	Schweres SHT mit subduralem Hämatom, Subarachnoidalblutung und Hirnödem, beidseitige Lungenkontusionen, Frakturen des Unterarms	Weiblich	42	Nein	41	Nein (5 EKs)
13	HWK-Fraktur, LWK-Frakturen, komplexe Beckenfraktur, Pilon-tibiale-Fraktur	Männlich	40	Nein	29	Nein (2 EKs)
14	Becken- und Femurfrakturen, retroperitoneales Hämatom, schwere Schnittverletzung der Kopfschwarte	Weiblich	71	Ja	20	Ja (28 EKs)
15	SHT mit subduralem Hämatom und Contusio cerebri, beidseitige Lungenkontusionen	Männlich	18	Nein	36	Nein (6 EKs)
16	Spannungspneumothorax, Lungenriss, multiple Frakturen der unteren Extremität	Männlich	32	Nein	34	Nein (9 EKs)
17	SHT mit subduralem Hämatom, Subarachnoidalblutung und Hirnödem, Hämatorpneumothorax, beidseitige Femurfrakturen	Weiblich	51	Ja	43	Ja (15 EKs)
18	Lungenkontusion, Hämatorpneumothorax mit Rippenserienfraktur, Amputation rechte untere Extremität unterhalb des Knies, Femurfraktur	Männlich	49	Ja	24	Ja (38 EKs)

Fortsetzung Tab. 4: Klinische Merkmale der Patienten

Nummer	Verletzungsmuster	Geschlecht	Alter	Verstorben	ISS	Massentransfusion
19	Verschluss der A. cerebri posterior, Pneumothorax, Riss des Mesenteriums, Aortendissektion, Leberruptur, Riss des Colon sigmoideum, Femurfraktur, Tibiafraktur	Männlich	32	Ja	34	Ja (58 EKs)
20	Pneumothorax mit Rippenserienfraktur, Abriss der Vagina, Beckenfraktur, retroperitoneales Hämatom, Femurfraktur, Ablederungsverletzung Becken	Weiblich	28	Nein	34	Ja (39 EKs)
21	Pneumothorax mit Rippenserienfraktur, subkapsuläres Milzhämatom, Humerusfraktur	Männlich	39	Nein	24	Nein (2 EKs)
22	Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Riss des Mesenteriums, Devaskularisation des Ileums, Humerusfraktur, offene Tibiafraktur	Männlich	33	Nein	34	Ja (13 EKs)
23	Rippenfraktur, Milzruptur, Riss des Mesenteriums, Abriss der Urethra, Riss der V. iliaca, Open-book-Beckenfraktur, Femurfraktur	Männlich	37	Nein	42	Ja (44 EKs)
24	Lungenkontusion, bilateraler Pneumothorax, Lungenriss, Hämatomediastinum, multiple Frakturen von Brustwirbelkörpern	Männlich	23	Nein	21	Nein (1 EK)
25	Galeahämatom, HWK-Fraktur, Pneumothorax mit Rippenfrakturen, Milzruptur, LWK-Fraktur, multiple Frakturen der unteren Extremität	Männlich	41	Nein	22	Nein (8 EKs)
26	Beidseitige Lungenkontusionen, Hämatothorax, Lungenriss, Rippenserienfraktur, Scapulafraktur, Fibulafraktur	Männlich	43	Nein	20	Nein (0 EKs)

Fortsetzung Tab. 4: Klinische Merkmale der Patienten

Nummer	Verletzungsmuster	Geschlecht	Alter	Verstorben	ISS	Massentransfusion
27	Schwere Beckenfraktur, retroperitoneales Hämatom, Amputation der linken unteren Extremität unterhalb des Knies, Harnblasenriss, Riss der Urethra, Riss eines Ureters, LWK-Frakturen	Weiblich	48	Nein	35	Ja (21 EKs)
28	SHT mit intracerebraler Blutung und Schädelfraktur, Abriss der Kopfschwarte, HWK-Fraktur, BWK-Fraktur, Hämatopneumothorax, Pleurariss, Rippenreihenfraktur, multiple LWK-Frakturen, Beckenfraktur, retroperitoneales Hämatom, Psoashämatom, Frakturen der oberen Extremität, multiple Frakturen der unteren Extremität	Männlich	29	Nein	41	Ja (30 EKs)
29	Bilaterale Lungenkontusionen, Lungenriss, Pneumothorax, Rippenreihenfraktur, Leberkontusion, Femurfraktur, offene Fraktur des Radius	Männlich	51	Nein	29	Nein (6 EKs)
30	SHT mit cerebellärer Blutung und Schädelkalottenfraktur, Densfraktur, HWK-Frakturen, LeFort II-Fraktur, Claviculafraktur, Rippenreihenfraktur, Schenkelhalsfraktur	Männlich	65	Nein	27	Nein (0 EKs)
31	Dislozierte BWK-Fraktur mit komplettem Querschnittssyndrom, Pneumothorax, Rippenreihenfraktur, retroperitoneales Hämatom, LWK-Fraktur	Weiblich	61	Nein	34	Nein (0 EKs)
32	SHT mit Subarachnoidalblutung und Schädelkalottenfraktur, BWK-Fraktur, LWK-Fraktur, multiple Frakturen der unteren Extremität	Weiblich	65	Nein	27	Ja (16 EKs)

Fortsetzung Tab. 4: Klinische Merkmale der Patienten

Nummer	Verletzungsmuster	Geschlecht	Alter	Verstorben	ISS	Massentransfusion
33	Schweres SHT mit subduralem Hämatom, Subarachnoidalblutung und Schädelbasisfraktur, Lungenkontusion, multiple BWK-Frakturen, Leberkontusion, Pankreaskontusion, retroperitoneales Hämatom	Männlich	27	Nein	38	Nein (3 EKs)
34	BWK-Frakturen, Lungenkontusion, Hämatothorax, Rippenserienfraktur, Leberriß, LWK-Fraktur, Frakturen des Schultergürtels und der oberen Extremität, Beckenfraktur, Fraktur der unteren Extremität, Amputation des linken Vorfußes	Männlich	60	Nein	29	Nein (6 EKs)
35	HWK-Fraktur, Hämatothorax, Rippenserienfraktur, multiple Frakturen der LWS, retroperitoneales Hämatom, Trümmerfraktur des Os sacrum, offene Fraktur des linken Unterschenkels, weitere multiple Frakturen der unteren Extremität	Weiblich	35	Nein	36	Nein (8 EKs)
36	Schweres SHT mit epiduralem Hämatom und Schädelkalottenfrakturen, multiple BWK-Frakturen, Le-Fort III – Fraktur, Orbitabodenfraktur, beidseitige Lungenkontusionen, Pneumothorax, Rippenserienfraktur, Beckenfraktur, Frakturen des Schultergürtels und der oberen Extremität	Männlich	30	Nein	50	Nein (8 EKs)
37	Traumatische Perikardtamponade, bilaterale Lungenkontusionen, Pneumothorax, Milzruptur, BWK-Fraktur	Weiblich	84	Nein	29	Nein (0 EKs)

4.2 Ergebnisse der p-p38 MAPK-Messung

4.2.1 Zeitlicher Verlauf der p-p38 MAPK-Menge

Um den zeitlichen Verlauf der p-p38-MAPK-Menge zu ermitteln, wurden die Messwerte aller 37 Patienten zu den sechs Abnahmezeitpunkten gemittelt (siehe Abbildung 5).

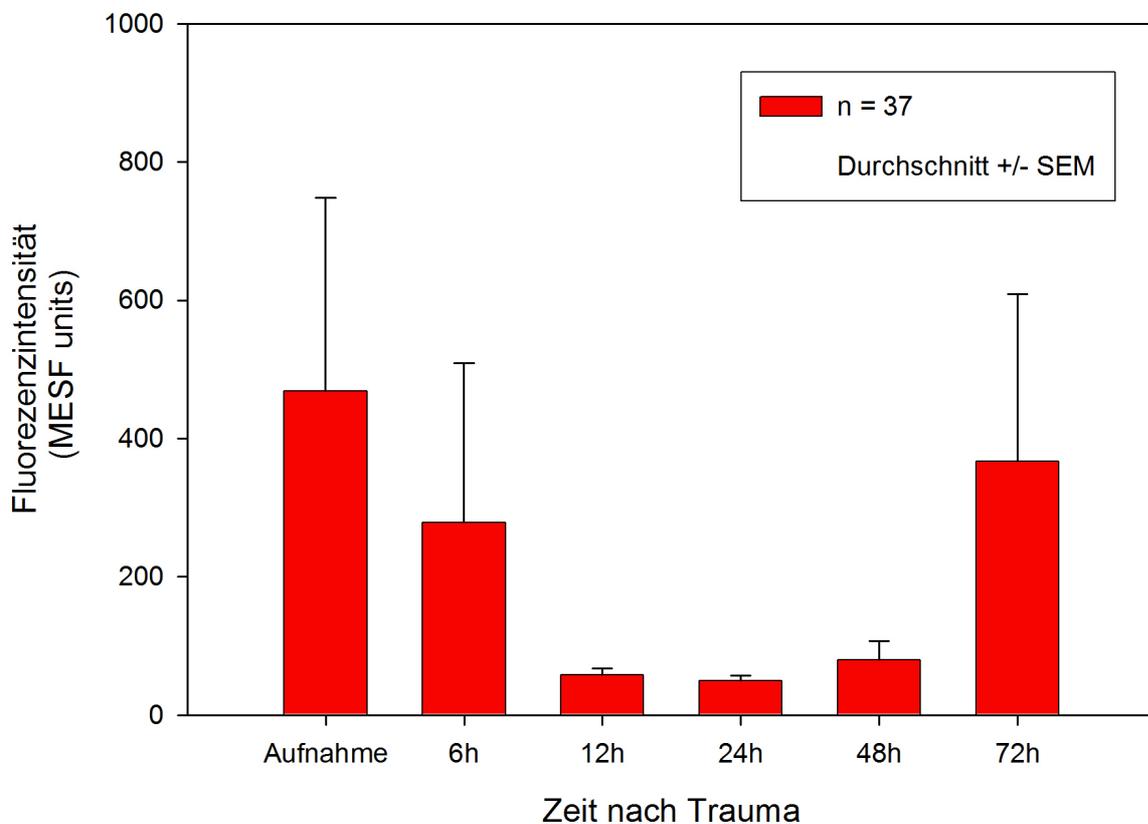


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der p-p38-MAPK-Expression im gesamten Patientenkollektiv

Dabei zeigt sich zum Zeitpunkt 0 Stunden, d.h. zur Aufnahme in den Schockraum, ein erster Höhepunkt der Proteinkonzentration. Der Wert fällt zum Zeitpunkt 6 Stunden stark ab, um schließlich zum Zeitpunkt 12 Stunden den Tiefpunkt der Proteinaktivierung im Beobachtungszeitraum von 72 Stunden zu erreichen. Zum nächsten Abnahmezeitpunkt, 24

Stunden nach Trauma, ist die Proteinkonzentration auf diesem niedrigen Niveau unverändert. 48 Stunden nach Trauma findet sich ein leichter Anstieg der Phosphoproteinmenge, der im zweiten Höhepunkt der gemessenen Phosphoproteinmenge 72 Stunden nach Trauma endet. Die sechs Abnahmezeitpunkte wurden statistisch mittels Kruskal-Wallis one-way analysis of variance verglichen. Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

4.2.2 Analyse der p-p38 MAPK-Messung anhand der Verletzungsschwere

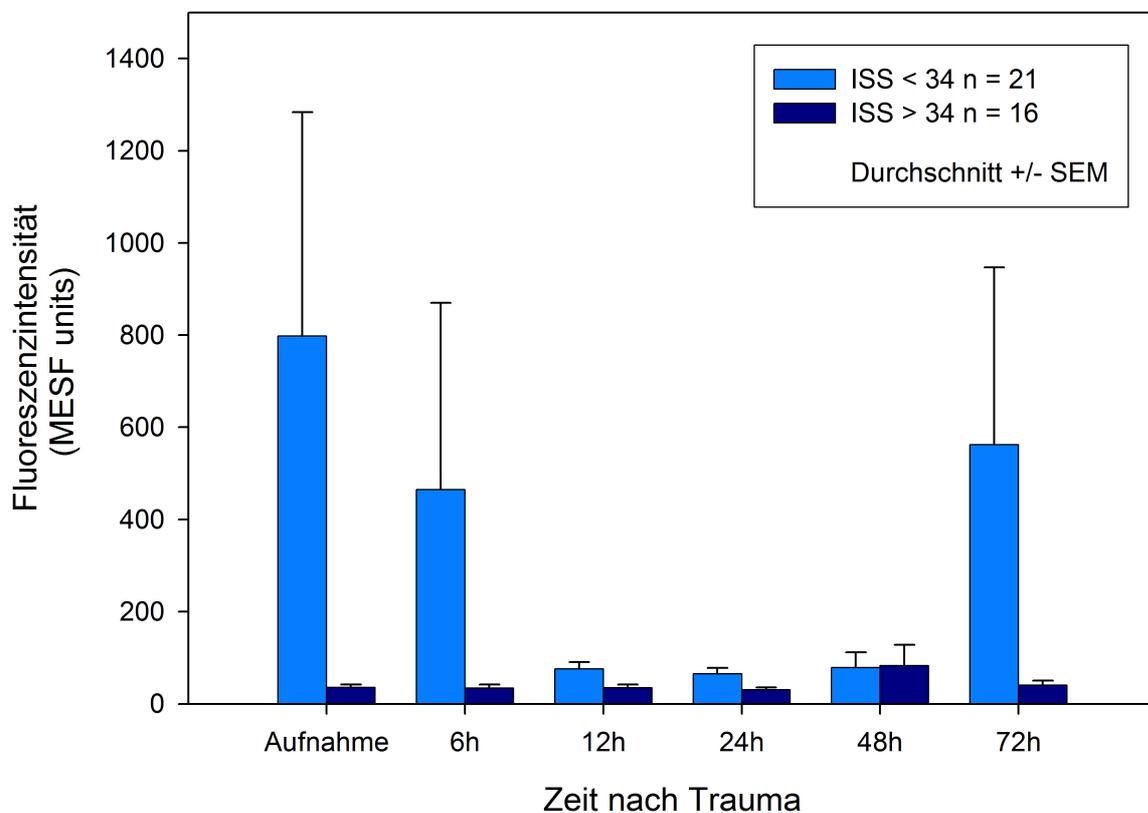


Abbildung 6: Verlauf der p-p38-MAPK-Expression im nach Verletzungsschwere eingeteilten Patientenkollektiv

Zu fünf von sechs Abnahmezeitpunkten zeigten die Patienten, die in der Gruppe mit $ISS \leq 34$ eingeordnet wurden, höhere Phosphoproteinwerte als Patienten mit $ISS > 34$ (siehe Abbildung 6).

Die p-p38 MAPK-Menge ist zu 0, 6 und 72 Stunden in der Gruppe mit niedrigem ISS stark erhöht, in der Gruppe mit hohem ISS ist sie hingegen über den gesamten Zeitraum von 72 Stunden kaum nachweisbar.

Ein Vergleich der beiden Gruppen mit Mann-Whitney-U-Test konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen.

4.2.3 Analyse der p-p38 MAPK-Messung anhand des Transfusionsbedarfs

Die Gruppe massentransfundierter Patienten zeigt zu allen sechs Abnahmezeitpunkten höhere Werte als die Gruppe der Patienten, die keine Massentransfusion benötigten (siehe Abbildung 7).

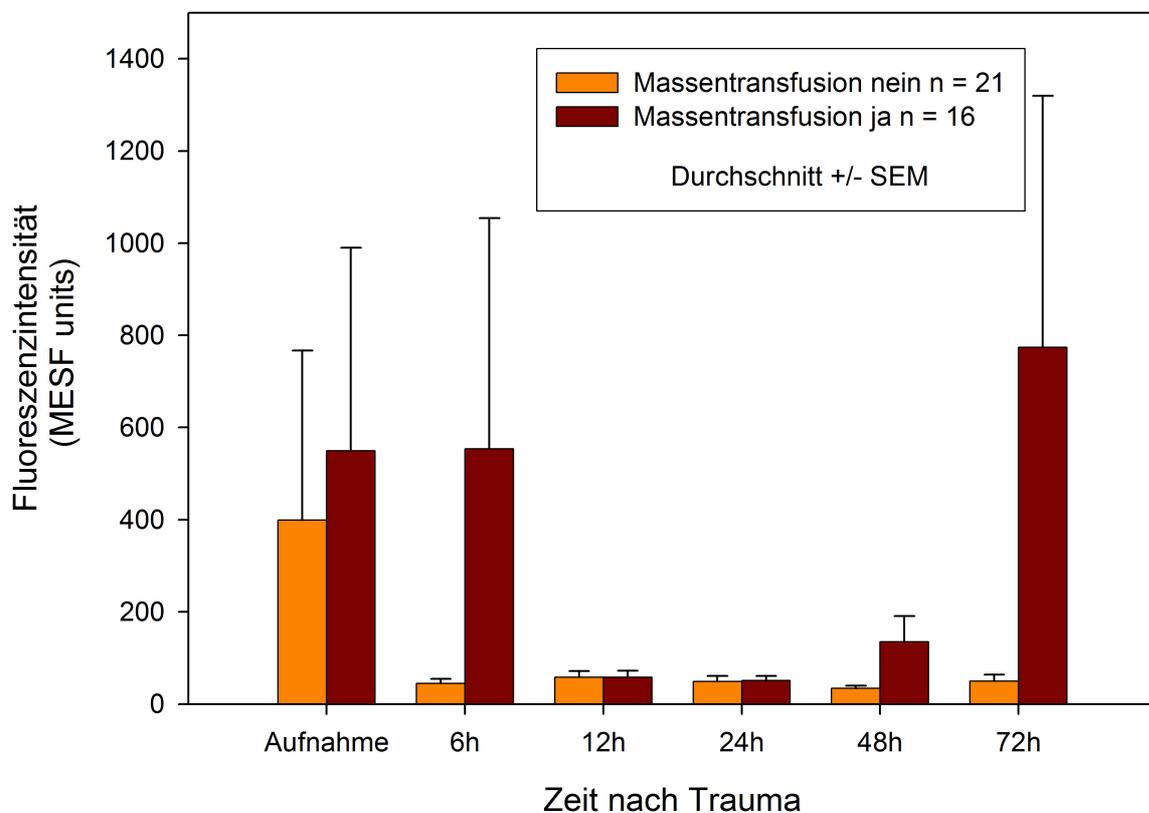


Abbildung 7: Verlauf der p-p38 MAPK-Expression im nach Transfusionsbedarf eingeteilten Patientenkollektiv

Die Gruppe, die keine Massentransfusion erhalten hatte, zeigt lediglich zum Zeitpunkt 0 Stunden eine mäßige Erhöhung der Proteinkonzentration. Zu allen folgenden Abnahmezeitpunkten ist nur eine geringe p-p38 MAPK-Menge nachweisbar.

Hingegen ist in der Gruppe, die eine Massentransfusion erhalten hat, zum Zeitpunkt 0 Stunden die Phosphoproteinmenge stark erhöht. Zur nächsten Blutentnahme, 6 Stunden nach dem Unfallzeitpunkt, ist die durchschnittliche Phosphoproteinmenge weiter auf dem gleichen hohen Niveau. In den 12 und 24 Stunden nach Trauma isolierten Monozyten ist lediglich eine geringe Aktivität von p-p38 MAPK feststellbar. Zum Zeitpunkt 48 Stunden jedoch findet sich wieder ein erneuter Anstieg der Phosphoproteinmenge. Zum letzten Abnahmezeitpunkt 72 Stunden nach dem initialen Trauma wird wieder ein dem Zeitpunkt null Stunden vergleichbares hohes Niveau erreicht.

Die statistische Analyse dieser Ergebnisse mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigen.

4.2.4 Analyse der p-p38 MAPK-Messung anhand des Überlebens

Vergleicht man die Messwerte der beiden Gruppen, fallen zu mehreren Abnahmezeitpunkten gravierende Unterschiede in der Phosphoproteinmenge zwischen den beiden Patientengruppen auf (siehe Abbildung 8).

Zum Zeitpunkt 0 Stunden ist die p-p38-MAPK-Konzentration in Monozyten verstorbener Patienten stark erhöht. In Zellen überlebender Patienten hingegen zeigt sich nur eine geringe Erhöhung der Phosphoproteinmenge. Sechs Stunden nach Trauma ist die Aktivität der p-38-MAPK in Zellen verstorbener Patienten weiter stark erhöht, während Zellen überlebender

Patienten nur noch äußerst wenig p-p38-MAPK nachweisbar ist. Zu den Zeitpunkten 12 Stunden und 24 Stunden sind die Proteinlevels in beiden Patientengruppen sehr niedrig.

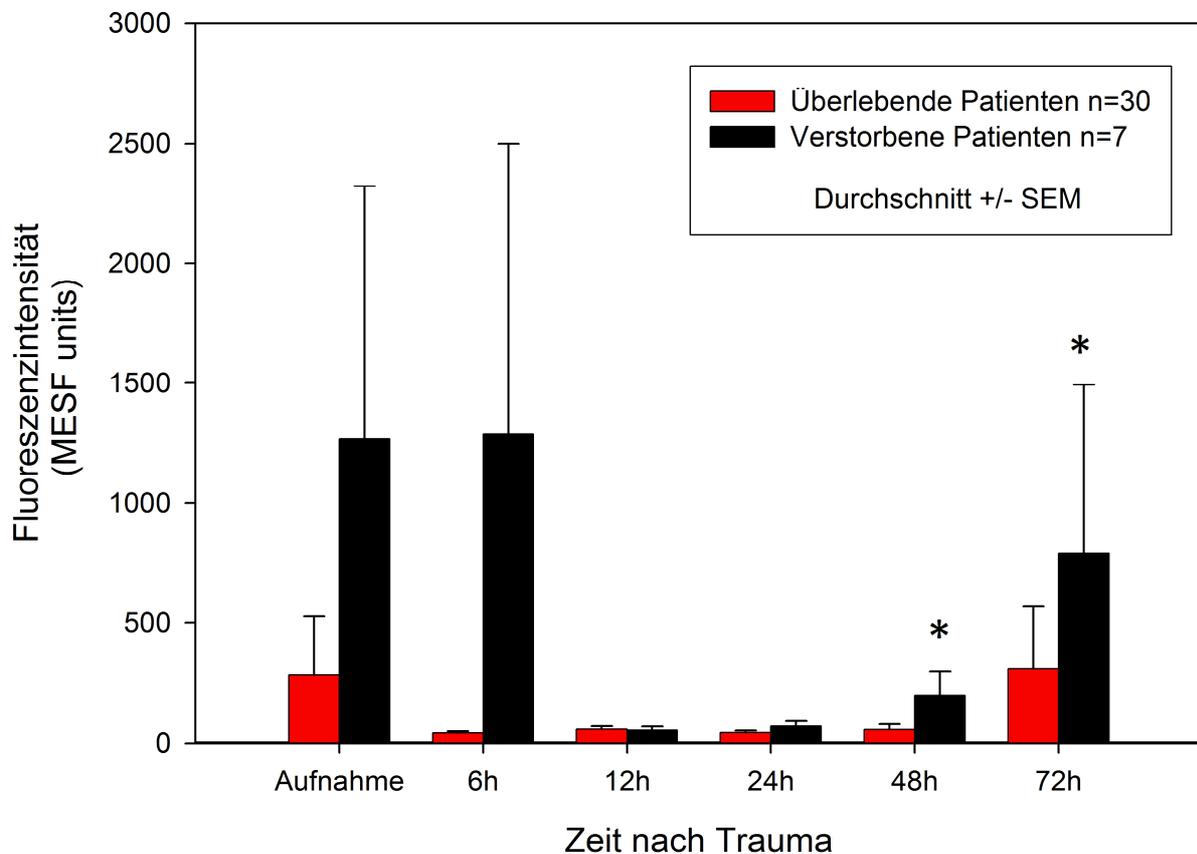


Abbildung 8: Verlauf der p-p38-MAPK-Expression im nach Überleben eingeteilten Patientenkollektiv
* $p \leq 0,05$ Mann-Whitney-U-Test

Zum Abnahmezeitpunkt 48 Stunden ist wieder eine leichte Erhöhung der p-p38-MAPK-Menge in der Gruppe verstorbener Patienten festzustellen, in der Gruppe überlebender Patienten findet sich diese nicht. 72 Stunden nach dem Unfallzeitpunkt ist die Aktivität der p-p38 MAPK auch in der Gruppe überlebender Patienten wieder geringfügig erhöht. In der Gruppe verstorbener Patienten findet sich ebenfalls ein weiterer Anstieg der Phosphoproteinkonzentration, dieser ist deutlich ausgeprägter als der in der Gruppe der überlebenden Patienten.

Der Vergleich der Gruppen zu allen Zeitpunkten mittels Mann-Whitney-U-Test erbrachte das Ergebnis, dass zu den Zeitpunkten 48 Stunden ($p=0,017$) und 72 Stunden ($p=0,024$) die Aktivität von p-p38-MAPK in Zellen verstorbener Patienten statistisch signifikant höher war als in Zellen überlebender Patienten.

4.3 Ergebnisse der p-JNK-Messung

4.3.1 Zeitlicher Verlauf der p-JNK-Menge

Eine zeitliche Dynamik der p-JNK-Menge ist kaum auszumachen, die Messwerte schwanken nur wenig (siehe Abbildung 9).

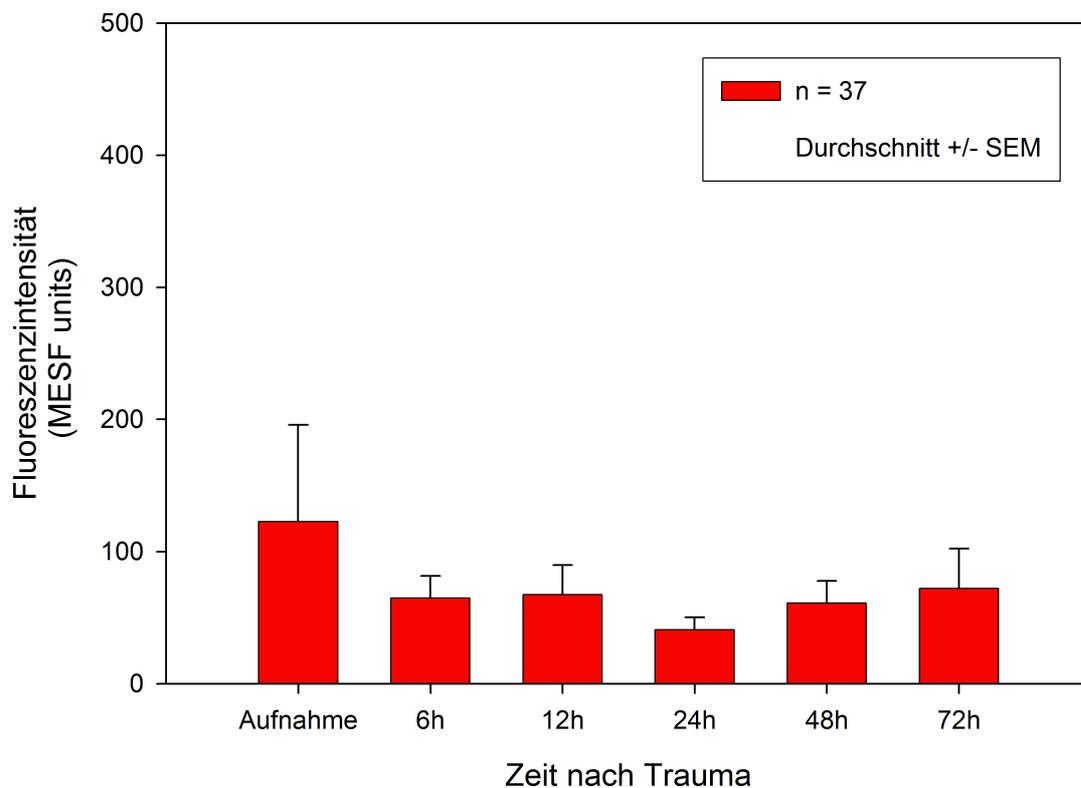


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der p-JNK-Expression im gesamten Patientenkollektiv

Zum Zeitpunkt 0 Stunden ist über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Stunden die höchste Proteinkonzentration festzustellen. Sechs Stunden nach Trauma fallen die Werte gering ab und verharren zu allen anderen Abnahmezeitpunkten in etwa auf diesem Niveau. Ein Test auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe der Kruskal-Wallis one way analysis of variance verlief negativ.

4.3.2 Analyse der p-JNK-Messung anhand der Verletzungsschwere

Patienten mit geringerer Verletzungsschwere ($ISS \leq 34$) zeigen bis auf einen Zeitpunkt – 48 Stunden – höhere p-JNK-Werte als schwerer verletzte Patienten ($ISS > 34$) (siehe Abbildung 10).

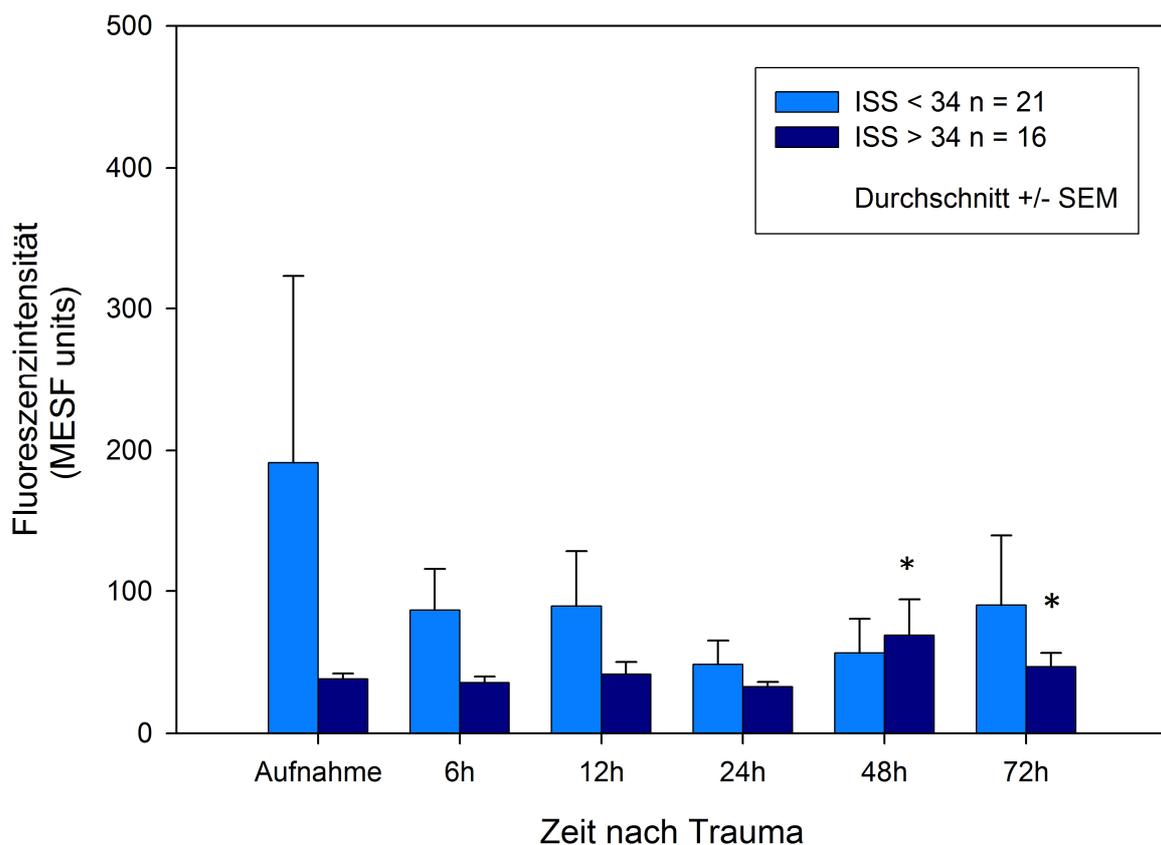


Abbildung 10: Verlauf der p-JNK-Expression im nach Verletzungsschwere eingeteilten Patientenkollektiv
* $p \leq 0,05$ Mann-Whitney-U-Test

In Zellen geringer Verletzter wurde die höchste Proteinkonzentration im gesamten Untersuchungszeitraum zum Zeitpunkt null Stunden nachgewiesen. Von dort fällt die p-JNK-Menge kontinuierlich ab, bis zum Zeitpunkt 72 Stunden, wo sie wieder mäßig ansteigt.

Der Mann-Whitney-U-Test ergab zu zwei Abnahmezeitpunkten, 48 und 72 Stunden, einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Zum Zeitpunkt 48 Stunden war die p-JNK-Menge in der Gruppe mit höherem ISS größer ($p \leq 0,024$), 72 Stunden nach Trauma war sie hingegen in der Gruppe mit niedrigerem ISS größer ($p \leq 0,024$).

4.3.3 Analyse der p-JNK-Messung anhand des Transfusionsbedarfs

Die Gruppe der massentransfunden Patienten zeigt zu zwei Zeitpunkten, null Stunden und 72 Stunden, eine stark erhöhte p-JNK-Menge. Zu den übrigen Zeitpunkten fallen die Messwerte im Vergleich ab (siehe Abbildung 11).

Die Gruppe der Patienten, die keine Massentransfusion erhalten hatten, zeigt keine Spitzen der p-JNK-Menge. Die Werte dieser Gruppe sind im Vergleich zur Gruppe, die eine Massenübertragung von Erythrozytenkonzentraten erhalten hatten, niedriger. Dies gilt nicht für die Zeitpunkte 12 Stunden und 24 Stunden.

Ein statistischer Vergleich der beiden Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigen.

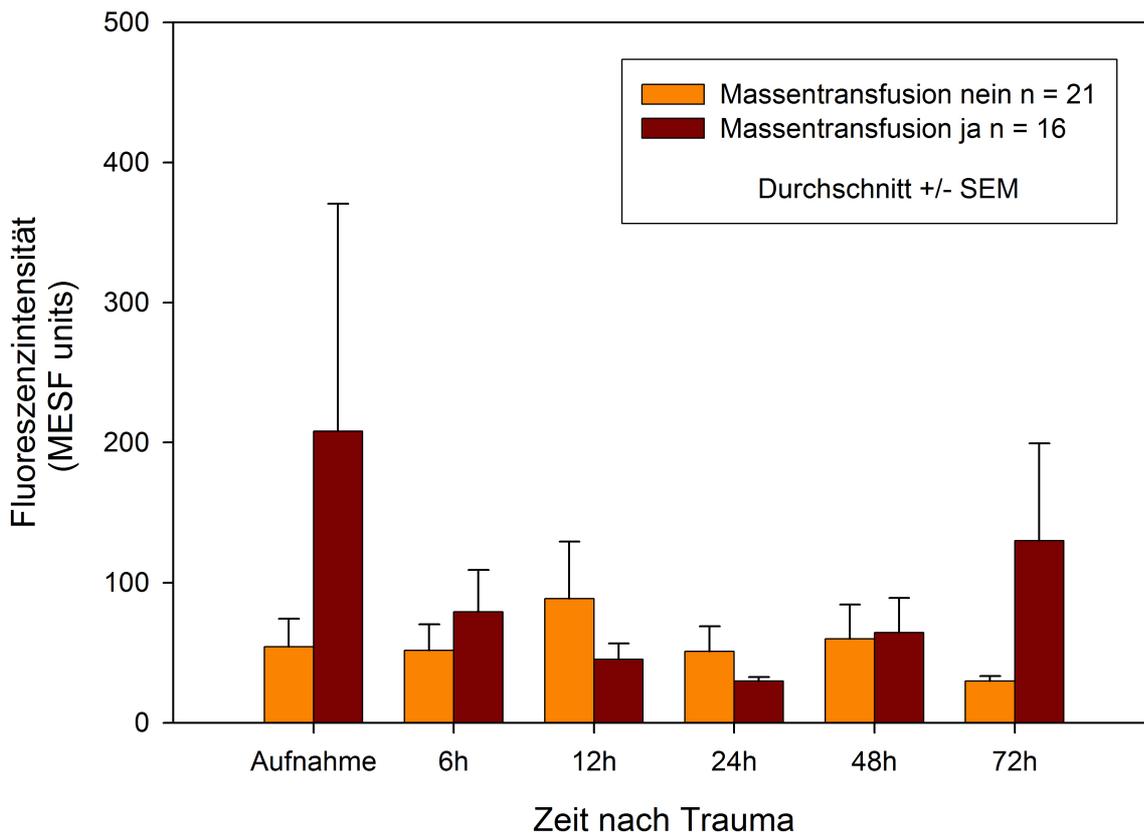


Abbildung 11: Verlauf der p-JNK-Expression im nach Transfusionsbedarf eingeteilten Patientenkollektiv

4.3.4 Analyse der p-JNK-Messung anhand des Überlebens

Es zeigt sich, dass in Zellen überlebender Patienten die Proteinkonzentration von p-JNK im gesamten untersuchten Zeitraum von 72 Stunden auf niedrigem Niveau stabil bleibt. Änderungen der p-JNK-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit zeigen lediglich Monozyten verstorbener Patienten (siehe Abbildung 12).

Bei diesen findet sich zum Zeitpunkt null Stunden eine stark erhöhte Proteinkonzentration. Diese fällt sechs Stunden nach Trauma wieder stark ab. Bis zum Zeitpunkt 72 Stunden sind die Messwerte konstant niedrig. 72 Stunden nach Trauma findet sich dann ein starker Wiederanstieg der p-JNK-Konzentration.

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der p-JNK-Konzentration zwischen den beiden Gruppen war zum Zeitpunkt null Stunden ($p \leq 0,050$) mittels Mann-Whitney-U-Test nachzuweisen, wobei die Gruppe der verstorbenen Patienten höhere Werte aufwies als die Gruppe der überlebenden Patienten. Sechs Stunden nach Trauma war zudem eine Tendenz zu einer statistisch signifikant erhöhten p-JNK-Menge in Monozyten verstorbenen Patienten ($p \leq 0,057$) vorhanden.

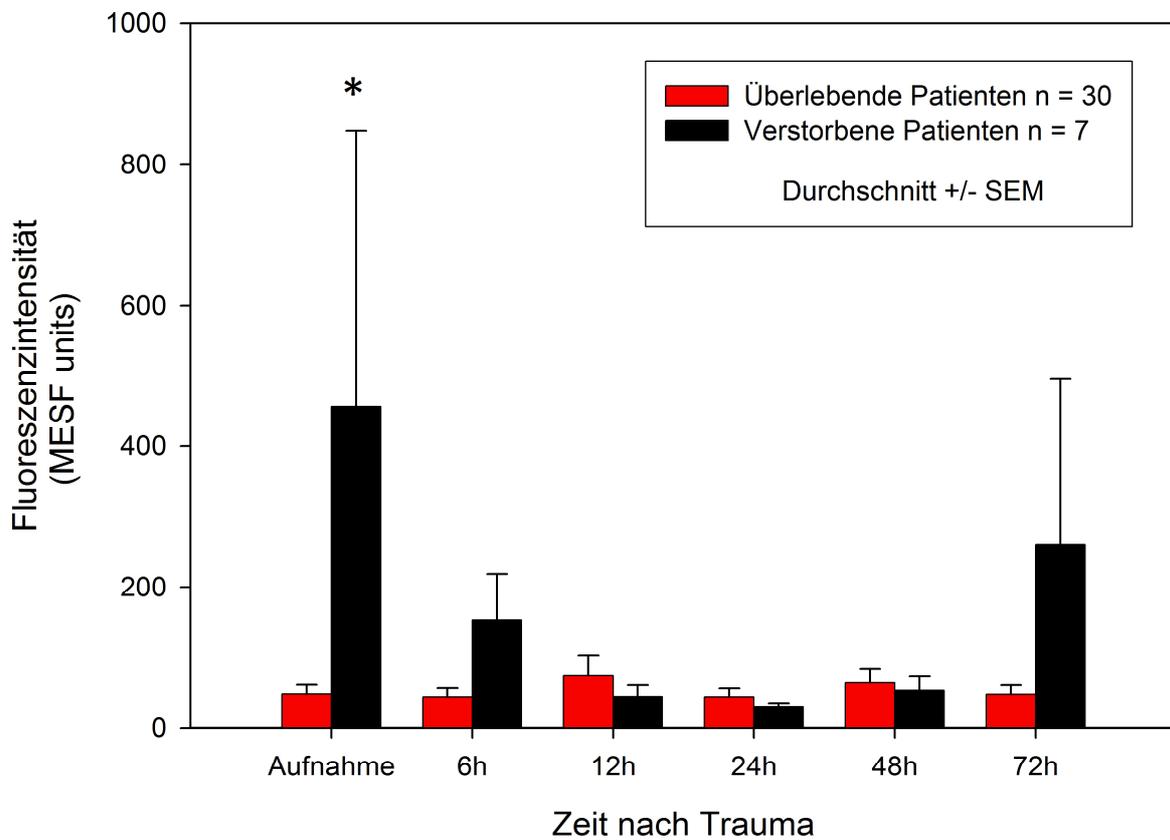


Abbildung 12: Verlauf der p-JNK-Expression im nach Überleben eingeteilten Patientenkollektiv

4.4. Ergebnisse der p-c-Jun-Messung

4.4.1 Zeitlicher Verlauf der p-c-Jun-Menge

Eine zeitliche Dynamik der p-c-Jun-Menge ist im gesamten Patientenkollektiv nicht eindeutig auszumachen (siehe Abbildung 13). Die Messwerte sind im Großen und Ganzen stabil bis zum Abnahmezeitpunkt 72 Stunden nach Trauma. Hier findet sich ein leichter Anstieg der p-c-Jun-Menge.

Ein Test auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Abnahmezeitpunkten mittels der Kruskal-Wallis one way analysis of variance erbrachte kein positives Ergebnis.

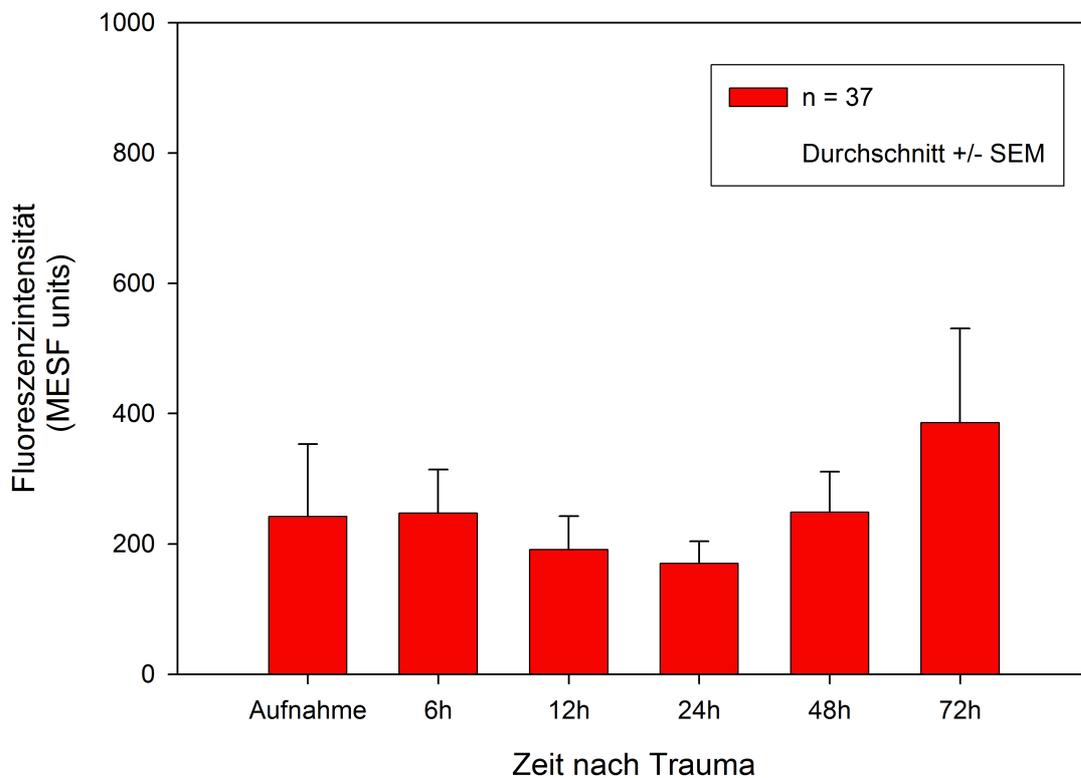


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der c-Jun-Expression im gesamten Patientenkollektiv

4.4.2 Analyse der p-c-Jun-Menge anhand der Verletzungsschwere

Weniger schwer verletzte Patienten zeigen zu allen Zeitpunkten höhere p-c-Jun-Werte (siehe Abbildung 14). In dieser Gruppe findet sich der Spitzenwert der p-c-Jun-Konzentration zum Zeitpunkt 72 Stunden.

In der Gruppe der schwerer verletzten Patienten wurden auf niedrigem Niveau konstante Werte gemessen, lediglich zum Zeitpunkt 48 Stunden findet sich eine mäßige Erhöhung der p-c-Jun-Menge.

Ein Vergleich der beiden Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test erbrachte zu keinem Zeitpunkt den Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede.

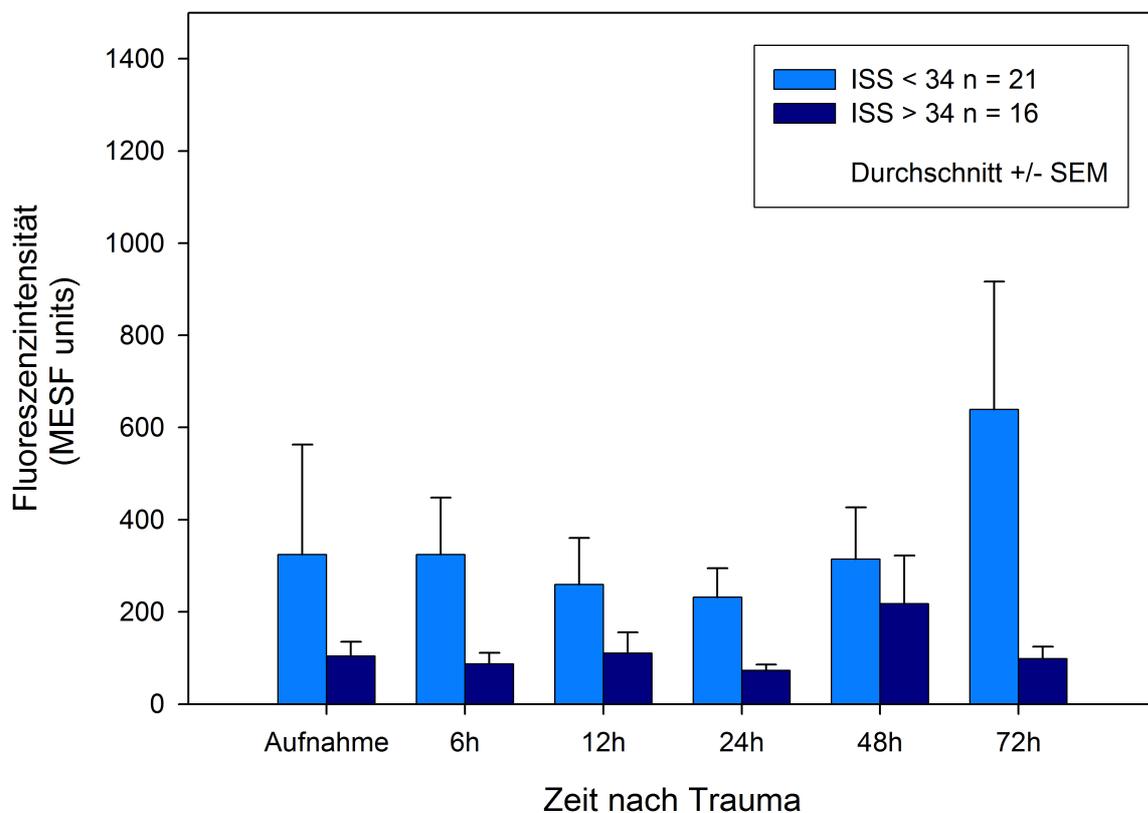


Abbildung 14: Verlauf der c-Jun-Menge im nach Verletzungsschwere eingeteilten Patientenkollektiv

4.4.3 Analyse der p-c-Jun-Menge anhand des Transfusionsbedarfs

Die Messwerte der Patienten, die eine Massentransfusion erhalten hatten, sind zu fünf von sechs Zeitpunkten höher als die von Patienten, die keine Massentransfusion erhalten hatten (siehe Abbildung 15). Die Ausnahme stellt der Zeitpunkt sechs Stunden dar, zu dem sich die nachgewiesene p-c-Jun-Menge in beiden Gruppen auf niedrigem Niveau bewegt.

In der Gruppe, die eine Massenübertragung von Erythrozytenkonzentraten erhalten hatte, ist zum Ende des Untersuchungszeitraums, 48 und 72 Stunden nach Trauma, ein starker Anstieg der p-c-Jun-Menge festzustellen.

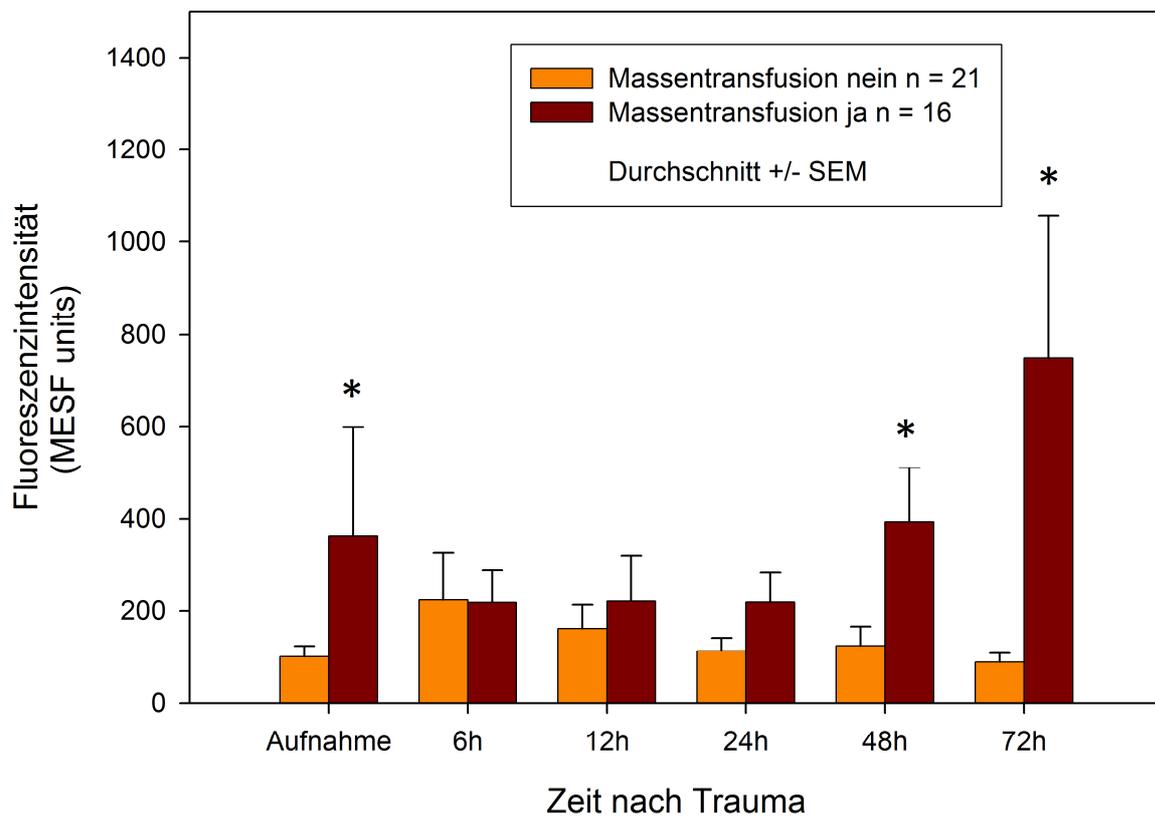


Abbildung 15: Verlauf der c-Jun-Expression im nach Transfusionsbedarf eingeteilten Patientenkollektiv
* $p \leq 0,05$ Mann-Whitney-U-Test

Eine statistisch signifikant höhere Konzentration von p-c-Jun in der Gruppe der massentransfunden Patienten ließ sich mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests zu drei

Zeitpunkten feststellen: null Stunden ($p \leq 0,048$), 48 Stunden ($p \leq 0,013$) und 72 Stunden ($p \leq 0,050$).

4.4.4 Analyse der p-c-Jun-Menge anhand des Überlebens

Die Ergebnisse der Messung der Proteinkonzentration von p-c-Jun zeigen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 16). Die Gruppe der verstorbenen Patienten zeigt bereits zum Zeitpunkt null Stunden erhöhte c-Jun-Aktivität. In Zellen überlebender Patienten hingegen lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur eine geringe p-c-Jun-Konzentration nachweisen.

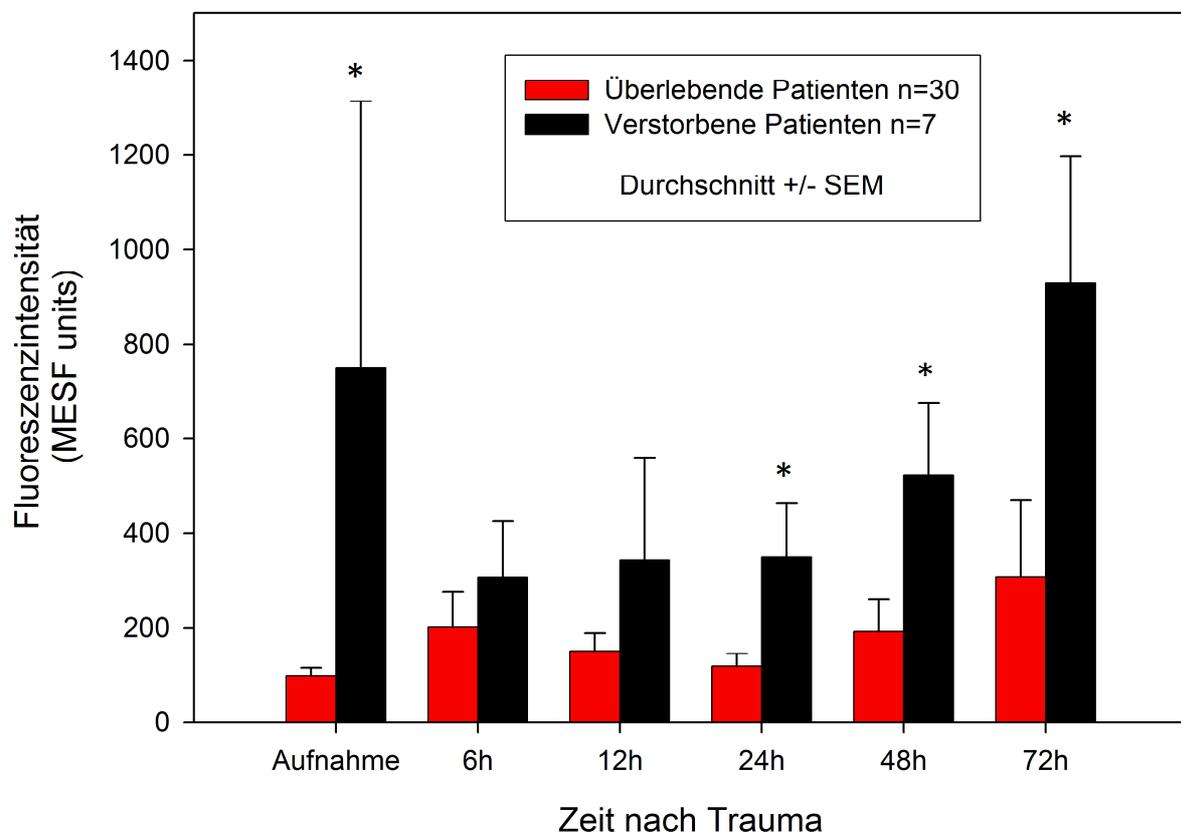


Abbildung 16: Verlauf der p-c-Jun-Menge im nach Überleben eingeteilten Patientenkollektiv
* $p \leq 0,05$

Anschließend, 6 Stunden nach der initialen Verletzung, fällt die p-c-Jun-Menge in der Gruppe verstorbener Patienten ab. Zu den beiden folgenden Abnahmezeitpunkten 12 und 24 Stunden bleibt die p-c-Jun-Menge weitgehend stabil. Zum Zeitpunkt der nächsten Blutentnahme 48 Stunden nach Trauma steigt die p-c-Jun-Menge in beiden Gruppen wieder an, wobei die p-c-Jun-Menge in der Gruppe der verstorbenen Patienten weitaus stärker ansteigt. Zum Zeitpunkt 72 Stunden findet sich ein weiterer Anstieg der c-Jun-Aktivierung, der in der Gruppe der verstorbenen Patienten zum Höhepunkt der c-Jun-Aktivierung im Untersuchungszeitraum von 72 Stunden führt.

Der Mann-Whitney-U-Test konnte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigen. Zum Zeitpunkt 0 Stunden ist die Aktivierung von c-Jun in der Gruppe verstorbener Patienten statistisch signifikant gegenüber der Gruppe der überlebenden Patienten erhöht ($p \leq 0,018$). Das Gleiche gilt für die Zeitpunkte 24 Stunden ($p \leq 0,014$), 48 Stunden ($p \leq 0,021$) und 72 Stunden ($p \leq 0,014$).

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit präsentiert die Ergebnisse der Untersuchung eines zentralen intrazellulären Signaltransduktionswegs in Monozyten polytraumatisierter Patienten.

Dabei konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen und Transkriptionsfaktoren mit klinischen Parametern wie Überleben und Transfusionsbedarf in engem Zusammenhang stehen könnte.

Diese Ergebnisse sollen nun in einen pathophysiologischen Zusammenhang eingeordnet werden und die Bedeutung der Ergebnisse für das Verständnis der posttraumatischen Immundysfunktion bei schwerstverletzten Patienten soll diskutiert werden.

5.1 Studiendesign

5.1.1 Zeitpunkt der Blutentnahmen

Mannick et al. weisen in einem bemerkenswerten Review der immunologischen Reaktion auf Verletzungen auf die Notwendigkeit serieller Messungen in der Traumaforschung hin. Dies sei notwendig, da die immunologischen Veränderungen bei polytraumatisierten Patienten dynamisch und schnellen Veränderungen unterworfen seien und daher der Zeitpunkt der Messung das Ergebnis entscheidend beeinflusse [80]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die frühe posttraumatische Phase herausragende Bedeutung für die Entwicklung einer posttraumatischen Störung des Immunsystems besitzt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Cytokin IL-6 bei polytraumatisierten Patienten bereits an der Unfallstelle erhöht war und dass bei allen Patienten der betreffenden Studie bereits zwölf Stunden nach dem traumatischen Ereignis das Akut-Phase-Protein CRP erhöht war [44]. Eine weitere

Studie konnte einen signifikanten Anstieg des proinflammatorischen Mediators HMGB-1 bereits eine Stunde nach der Verletzung demonstrieren [100].

Aus diesen Umständen ergeben sich Anforderungen an eine klinisch-experimentelle Studie der Traumaforschung. Zum einen sollte der Zeitpunkt der ersten Blutentnahme möglichst nahe am Trauma liegen, zum anderen sollte, besonders in den ersten 24 Stunden, die Frequenz der Probenentnahme möglichst engmaschig sein.

Bezüglich des ersten Punktes sollte daher idealerweise die erste Blutentnahme bereits an der Unfallstelle erfolgen. Dies ist aber aufgrund verschiedener logistischer und anderer Schwierigkeiten schwer praktikabel. Als Kompromiss wurde daher in dieser Studie festgelegt, dass die initiale Blutentnahme nicht mehr als 90 Minuten nach dem Unfallzeitpunkt erfolgen darf.

Zum zweiten Punkt ist anzumerken, dass sich die Patienten der vorliegenden Studie, besonders in den ersten 24 Stunden post Trauma, zumeist in einer vulnerablen klinischen Situation befinden. Daher ist, um eine Belastung der Patienten durch die Blutentnahmen unter allen Umständen zu vermeiden, eine hohe Frequenz der Blutentnahmen in diesem Zeitraum nicht zulässig. Deshalb wurde bestimmt, den Patienten direkt nach Aufnahme in unseren Schockraum sowie 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma Blut für die Monozyten-separation zu entnehmen.

5.1.2 Beeinflussung des Studienergebnisses durch operative Eingriffe

Operative Eingriffe haben, ebenso wie das initiale Trauma, eine aktivierende Wirkung auf das Immunsystem [36, 96, 98]. Um die Effekte eines solchen „second hits“ auf das Immunsystem und die allgemeine Belastung des häufig instabilen Patienten zu verringern, wird heute zumeist nach den Prinzipien der „*damage control surgery*“ (DCS) und „*damage control*

orthopedic surgery“ (DCOS) verfahren. Diese Konzepte beinhalten, dass zunächst auf eine definitive Versorgung der jeweiligen Verletzung verzichtet wird, um die klinische Situation des Patienten zunächst stabilisieren zu können. Die definitive Versorgung erfolgt dann im Intervall [55, 93]. *Pape et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass eine provisorische Versorgung von Femurfrakturen mittels Fixateur externe keine signifikant vermehrte IL-6-Produktion nach sich zog und dass eine definitive Versorgung der Fraktur durch intramedulläre Nagelung fünf Tage nach dem Unfall nur eine geringe Erhöhung des IL-6-Levels verursachte [97]. Dennoch ist ein Einfluss der operativen Versorgung der Patienten in unserer Studie auf das immunologische Geschehen sicherlich vorhanden. Lediglich fünf der 37 Patienten benötigten keine operative Versorgung in den ersten 24 Stunden nach Trauma. Da das Ausmaß und die Dauer der Operationen selbstverständlich individuell extrem variierten, muss eine gewisse Beeinflussung des Ergebnisses unserer Studie durch operative Eingriffe angenommen werden.

5.1.3 Verschleppung von Fremdzellen durch Bluttransfusionen

Die Patienten dieser Studie erhielten – so wie alle Patienten auf dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland – Erythrozytenkonzentrate, die filtriert und bestrahlt worden waren, um den Gehalt an Spenderleukozyten zu minimieren. Dieses Verfahren eliminiert 99,9% aller Leukozyten aus der Blutkonserve [37]. Aufgrund der geringen Menge an residualen Fremdzellen erscheint dieses Verfahren ausreichend zu sein, um zu verhindern, dass Spenderzellen das Ergebnis dieser Studie verfälschen. Interessanterweise existieren jedoch Untersuchungen, die klar aufzeigen, dass filtrierte Erythrozytenkonzentrate ähnliche immunologische Effekte haben wie konventionell hergestellte Konserven.

Dies konnte am Beispiel des sogenannten „*Transfusion-associated microchimerism*“ (TA-MC) gezeigt werden. Bei TA-MC handelt es sich um das Überleben einer Population von Spenderleukozyten im Körper des Empfängers. TA-MC scheint besonders bei Traumapatienten relativ häufig zu sein [37]. In einer Studie von *Utter et al.* hatte eine Reduzierung des Leukozytengehalts der Konserven mittels Filtration keinen Effekt auf die Inzidenz von TA-MC. Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist die pathophysiologische Bedeutung von TA-MC unklar. Diskutiert wird die Assoziierung mit Autoimmunerkrankungen und chronischer graft-versus-host-disease [136]. Dennoch scheint die Existenz des Phänomens TA-MC der Beleg zu sein, dass Spenderleukozyten selbst über leukozytenfiltrierte Erythrozytenkonzentrate in den Körper des Empfängers gelangen können. Andererseits existieren Berichte aus dem Bereich der forensischen Medizin, dass selbst bei Verstorbenen, die vor ihrem Tod mehr als 60 Erythrozytenkonzentrate erhalten hatten, nicht genug Fremdzellen in postmortal gewonnenem Blut enthalten waren, um das Ergebnis einer DNA-Analyse zu verfälschen [46]. Voraussetzung war, dass die verwendeten Erythrozytenkonzentrate leukozytenfiltriert waren.

In der Zusammenschau ergeben sich aus der Literatur keine Hinweise auf eine mögliche relevante Verschleppung von Fremdzellen durch die Übertragung von Erythrozytenkonzentraten.

Selbst falls es zu einer hypothetischen Verschleppung von Fremdzellen gekommen wäre, dürften sehr wenige Fremdleukozyten in die für unsere Studie verwendete isolierte Zellpopulation gelangt sein. Zum einen, weil mit der MACS-Methode eine hochspezifische Isolierungsmethode für Monozyten verwendet wurde, die die Wahrscheinlichkeit minimiert, dass andere Leukozyten verschleppt werden, zum anderen, weil Monozyten lediglich zwischen vier und acht Prozent der Gesamtleukozyten ausmachen und erwiesenermaßen

99,9% aller Fremdleukozyten filtriert werden [11, 37]. Dies bedeutet rein rechnerisch, dass die hypothetische Zahl verschleppter Fremdmonozyten verschwindend gering ist.

Zusammenfassend ist daher davon auszugehen, dass ein verfälschender Effekt durch die Verschleppung von Fremdzellen in dieser Untersuchung zu vernachlässigen ist.

5.2 Methodik

5.2.1 MACS-basierte Zellseparation

Gängige biomedizinische Verfahren zur Isolierung von mononukleären Zellen sind die Dichtegradientenzentrifugation, die magnetische Zellseparation (magnetic cell separation – MACS) und die Zellseparation mittels Adhärenz. Welches Verfahren zur Zellisolierung gewählt wird, kann Einfluss auf das biologische Verhalten der gewonnenen Zellen haben.

Bereits seit mehr als zwanzig Jahren ist bekannt, dass die Separation von Monozyten mit Hilfe der Adhärenz an Oberflächen diese aktivieren kann [49]. Daher erschien dieses Verfahren für unsere Zwecke nicht geeignet.

Rodenburg et al. untersuchten in einer Studie mit Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis, wie sich die Methode der Zellisolation auf die mRNA-Expression von Cytokinen in Monozyten auswirkt [107]. Dabei konnte demonstriert werden, dass Monozyten, die mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert worden waren, erhöhte mRNA-Levels von TNF- α , IL-1 β und IL-8 zeigten. In Monozyten, die mit Hilfe von magnetischen antiCD14-Beads gewonnen worden waren, war dies nicht der Fall. Die Cytokin-mRNA war noch stärker erhöht, wenn an die Dichtegradientenzentrifugation noch zusätzlich Zellseparation mittels Adhärenz angeschlossen worden war. Aus diesen Ergebnissen lässt sich zum einen schließen, dass die Dichtegradientenzentrifugation für unsere Studie ungeeignet war, da wir Monozyten

benötigten, die in ihrem immunologischen Verhalten möglichst wenig durch die Isolierungsschritte des Experiments beeinflusst wurden, zum anderen konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass magnetische Zellseparation kaum Einfluss auf die Cytokinexpression der Monozyten hatte und diese damit unsere Anforderungen hinsichtlich eines möglichst immunologisch neutralen Verhaltens des Separationsverfahrens erfüllte.

Die Reinheit der durch magnetische Zellseparation isolierten Monozyten betrug in der Studie von *Rodenburg et al.* > 90%. Die mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation hingegen gewonnenen Zellen waren lediglich zu 25% Monozyten, was einen weiteren Separationsschritt mittels Adhärenz nötig machte [107]. Die geringe Reinheit der durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen war ein weiteres Argument gegen die Verwendung dieses Verfahrens.

Folglich wurde der Entschluss gefasst, die magnetische Zellseparation (magnetic cell separation, MACS) zur Monozytenisolierung zu verwenden.

Bei der MACS-Technik unterscheidet man zwischen positiver und negativer Zellseparation. Bei der positiven Zellseparation wird die gewünschte Zellfraktion isoliert, indem die MACS-Partikel direkt an ein charakteristisches Epitop der Zellen binden. Dies ist die in dieser Untersuchung verwendete Technik.

Bei der negativen Zellseparation hingegen werden alle nicht erwünschten Zellen markiert und entfernt. Bei der Isolierung von Monozyten könnte dies beispielsweise durch gegen Lymphozyten gerichtete Beads erreicht werden [35]. Dies hat den Vorteil, dass die eigentlichen Zielzellen vom Separationsvorgang völlig unberührt bleiben und die Möglichkeit einer Beeinflussung des immunologischen Zustands der isolierten Zellen durch die Separationsprozedur noch weiter minimiert wird. Die Reinheit der auf diese Weise isolierten Monozytenfraktion ist jedoch niedriger als durch positive Zellseparation gewonnene Monozyten [35, 107]. Schwerer noch wiegt der Umstand, dass bei negativer Zellseparation

ein geringerer Anteil der Monozyten aus dem peripheren Blut isoliert werden kann als mit der positiven Zellseparation. Dies bedeutet, dass bei negativer Zellseparation ein höheres Volumen an entnommenem Blut benötigt wird, um die gleiche Zahl an isolierten Monozyten zu erreichen. Dies hätte jedoch eine unzulässige Belastung der Patienten in unserer Studie bedeutet.

Infolge dieser Überlegungen wurde die positive Zellseparation mittels MACS-Technologie für diese Studie ausgewählt, da diese Technik geringe Aktivierung der Zielzellen, hohe Reinheit der isolierten Zellfraktion und geringes benötigtes Volumen an peripherem Blut verbindet.

5.2.2 Messung der Phosphoproteinkonzentration mittels Bio-Plex-System

Proteine können in biomedizinischen Anwendungen auf verschiedene Arten nachgewiesen werden. Zu den gebräuchlichsten Verfahren zählen der Western Blot und ELISA. Beiden Verfahren ist gemeinsam, dass immer lediglich ein einzelner Faktor in einer Probe untersucht werden kann. Da in der vorliegenden Studie aber in rund 200 Proben drei Faktoren untersucht wurden, käme man bei der Verwendung von Western Blot oder ELISA auf eine Zahl von mehr als 600 einzelnen Messungen. Dies hätte einen sehr großen zeitlichen Aufwand bedeutet. Dazu kommt, dass das Volumen der Patientenproben teilweise limitiert war und für so viele Messungen gar nicht ausgereicht hätte.

Diese Problematik wird durch die Verwendung des Bio-Plex Phosphoprotein Detection Systems umgangen. Alle drei Faktoren können mit diesem System in einem Ansatz gemessen werden. Außerdem können durch die Verwendung einer Platte mit 96 Vertiefungen, sogenannten „wells“, 88 Proben in einem Arbeitsschritt gemessen werden. Acht der 96 wells werden für die Messung von Standardproben und Positivkontrollen benötigt. Damit wird die

für die Experimente benötigte Zeit minimiert und auch das benötigte Probenvolumen ist so gering wie möglich.

5.2.3 Messung von Phosphoproteinen ohne Messung des Gesamtproteins

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Rolle der MAP-Kinasen p38 und JNK sowie des durch sie aktivierten Transkriptionsfaktors c-Jun in Monozyten polytraumatisierter Patienten untersucht.

Dabei wurden die phosphorylierten, d.h. die aktivierten Formen der einzelnen Faktoren gemessen. Dies stellt eine gewisse Limitierung der Studie dar. In Studien, die ebenfalls den Aktivierungszustand von MAP-Kinasen untersuchten, wurden häufig sowohl die Gesamtkonzentration des Proteins gemessen als auch die Konzentration der phosphorylierten Form [3, 67, 129]. Verfügt man über diese Informationen, so kann man beurteilen, ob eine erhöhte Konzentration der phosphorylierten Form der Proteine auf eine Phosphorylierung bereits in der Zelle vorhandener Proteine zurückzuführen ist oder ob die erhöhte Phosphoproteinkonzentration durch eine Neusynthesierung des jeweiligen Proteins verursacht wurde. Eine verstärkte Neusynthesierung wäre an einer erhöhten Proteingesamtkonzentration ablesbar. Somit wäre eine Aussage möglich, ob das extrazelluläre Signal lediglich auf der Ebene des Phosphorylierungsstatus von Proteinen die zelluläre Aktivität beeinflusst oder ob die Signaltransduktionswege auch bereits auf translationaler Ebene modifiziert werden. Eine derartige Beurteilung des zellulären Geschehens ist in dieser Studie nicht möglich.

5.3 Klinische Daten

59,4% der Patienten der Studie waren männlich, 40,5% weiblich. Damit liegt der Anteil männlicher Patienten unter dem Prozentsatz, der in vergleichbaren Patientenkollektiven angegeben wird. *Aldrian et al.* untersuchten in einer prospektiven Studie die epidemiologischen und klinischen Charakteristika der polytraumatisierten Patienten, die an der Universität von Wien im Zeitraum von 1992 bis 2002 behandelt wurden. Hier waren 67,5% der Patienten Männer [2]. Für das Jahr 2007 gibt der Jahresbericht des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) einen Anteil männlicher Patienten von 73% an. Der Prozentsatz männlicher Patienten liegt im gesamten bisher erfassten Patientenkollektiv des Traumaregisters bei 72% [116]. *Probst et al.* analysierten in ihrer Studie die Polytraumaversorgung an der Medizinischen Hochschule Hannover über drei Dekaden. Die Autoren geben das Verhältnis männlicher zu weiblicher Patienten im Zeitraum 1975 – 1984 mit 2,7:1 (entspricht 72,9% männlicher Patienten), im Zeitraum 1985 – 1994 mit 2,9:1 (74,4%) und im Zeitraum 1995 – 2004 mit 2,1:1 (67,7%) an [103].

Über die Gründe für die Überrepräsentation weiblicher Patienten in dieser Studie lässt sich nur spekulieren. Vermutlich ist sie bei der geringen Größe der Stichprobe von 37 Patienten zufällig.

Anzumerken ist, dass bekannt ist, dass sich das Geschlecht des Patienten auf die Ausprägung der Immunantwort nach Trauma auswirkt [5]. So konnte beispielsweise eine Gruppe um *Sperry* zeigen, dass männliche Patienten nach schweren Verletzungen weitaus stärker das proinflammatorische Cytokin IL-6 exprimieren [124]. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass das Ergebnis dieser Studie durch die Unterrepräsentation von Männern beeinflusst wird. Das durchschnittliche Alter der Patienten in unserer Studie betrug 44,1 Jahre. In der Studie von *Aldrian et al.* war das Durchschnittsalter 37,5 Jahre [2]. Das Traumaregister der DGU

gibt für 2007 43,2 Jahre an, im gesamten Patientenkollektiv des Traumaregisters lag der Durchschnittswert bei 41,5 Jahren [116]. Damit liegt das durchschnittliche Alter der Patienten unserer Studie im Bereich von Vergleichskollektiven.

Die Mortalität lag in dieser Studie bei 18,9%. Das Traumaregister der DGU weist für das Jahr 2007 eine Mortalität der erfassten Patienten von 12% aus. Bei allen bisher im Traumaregister erfassten Patienten lag die Mortalität bei 14% [116]. Die höhere Mortalität in der vorliegenden Studie lässt sich dadurch erklären, dass die Patienten in einem universitären Level I-Traumacenter rekrutiert wurden, dem zumeist schwerer verletzte Patienten mit schlechterer Prognose zugewiesen werden. Dies wird dadurch gestützt, dass *Probst et al.* für die Jahre 1995 bis 2004 an der Medizinischen Hochschule Hannover eine Mortalität von 18% angeben. Dies deckt sich gut mit der Mortalität in der vorliegenden Studie.

Die durchschnittliche Verletzungsschwere, quantifiziert mittels Injury Severity Score (ISS), lag in dem für diese Studie untersuchten Patientenkollektiv bei 35,1 Punkten. Bei den Patienten, die im Jahr 2007 Eingang ins Traumaregister fanden, wurde ein durchschnittlicher ISS von 24,4 Punkten ermittelt. Bei allen bisher im Traumaregister erfassten Patienten betrug der ISS 24,1 Punkte [116]. *Probst et al.* geben für die Jahre 1995 – 2004 einen durchschnittlichen ISS von 31,4 Punkten an. In der Studie von *Aldrian et al.* lag der durchschnittliche ISS bei 34,3 Punkten [2].

Damit liegt der durchschnittliche ISS in der vorliegenden Studie über den im Traumaregister ermittelten Wert. Allerdings hatten von den Patienten, die im Jahr 2007 ins Traumaregister eingetragen wurden, lediglich 74% einen ISS von ≥ 16 Punkten [116]. Ein ISS von weniger als 16 Punkten war aber ein Ausschlusskriterium für diese Studie. Aus diesem Umstand lässt sich die Diskrepanz zwischen dem ISS-Wert des Patientenkollektivs des Traumaregisters und dieser Studie erklären. *Probst et al.* und *Aldrian et al.* führten ihre Studien an Institutionen durch, die der Klinik, an der die Patienten dieser Studie rekrutiert wurden, vergleichbar sind.

Die von diesen Autoren ermittelten durchschnittlichen ISS-Werte liegen im Bereich des Durchschnittswerts dieser Studie.

Zusammenfassend entsprechen die klinischen Charakteristika der Patienten dieser Studie in Bezug auf Alter, Verletzungsschwere und Mortalität maßgeblichen Vergleichskollektiven. Eine Ausnahme bildet die Geschlechterverteilung, denn in unserer Studie finden sich mehr weibliche Patienten.

Besonders zu erwähnen ist, dass alle Patienten der Studie zu einem oder mehreren Zeitpunkten des Beobachtungszeitraumes von 72 Stunden einen MOF-Score von > 4 Punkten aufwiesen und daher nach der Definition von *Lefering et al.* an einem Multiorganversagen litten. Daher war eine Einteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Parameter „Multiorganversagen“ nicht möglich.

5.4 Phosphoproteinmessung

5.4.1 Phosphorylierte p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (p-p38-MAPK)

5.4.1.1 Verletzungsschwere

Teilt man das Patientenkollektiv nach Verletzungsschwere ein, so ergibt sich, dass die Patienten, deren ISS ≤ 34 Punkte war, beinahe durchweg eine höhere Aktivierung von p38-MAPK zeigen als Patienten mit einem ISS > 34 Punkte. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht gezeigt werden.

Dieses Ergebnis ist mit der Literatur nicht in Einklang zu bringen. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass mit steigender Verletzungsschwere auch die Konzentration proinflammatorischer Mediatoren ansteigt.

Gebhard et al. untersuchten die Konzentration von IL-6 im Plasma von Traumapatienten. Dabei zeigte sich, dass die IL-6-Konzentration umso höher war, je schwerer die Verletzungen der Patienten waren [44].

Erst vor kurzem konnten diese Ergebnisse von einer Studie aus Dänemark bestätigt werden. Auch in dieser Untersuchung konnte eine positive Korrelation zwischen IL-6-Konzentration und Verletzungsschwere nachgewiesen werden [127].

Da der p38-MAPK-Pathway zu den intrazellulären Signaltransduktionswegen zählt, die für die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine verantwortlich sind, würde man erwarten, dass die p-p38-MAPK-Menge ebenfalls gesteigert ist.

Dieser Frage ging eine kürzlich publizierte Untersuchung nach. Dabei gelang es, eine erhöhte Aktivierung der p38-MAPK mit steigender Verletzungsschwere in Verbindung zu bringen. Die höchste Aktivierung der p38-MAPK konnte bei Patienten nachgewiesen werden, die einen ISS-Wert von > 25 Punkten aufwiesen [141].

Somit stellt sich die Frage, weshalb diese Ergebnisse in dieser Untersuchung nicht reproduziert werden konnten. Möglicherweise ist dies auf die doch limitierte Patientenzahl in unserer Studie zurückzuführen. Die eben zitierte Studie [141], die die p38-MAPK-Aktivierung untersuchte, konnte sich auf ein Patientenkollektiv von 150 Patienten stützen. In unserer Studie finden sich lediglich 37 Patienten. Anzumerken bliebe auch, dass zwar die Patienten mit geringerer Verletzungsschwere zwar im Durchschnitt zu fünf von sechs Zeitpunkten höhere p-p38-MAPK-Werte aufweisen als schwerer verletzte Patienten. Dennoch erreichen die Unterschiede nie statistische Signifikanz.

Die Auswertung der Ergebnisse dieser Studie anhand der Verletzungsschwere wird außerdem dadurch erschwert, dass es schwierig ist einen validen cut-off-Wert zu finden mithilfe dessen man das Patientenkollektiv dichotom einteilen kann. In der Literatur ist auch kein allgemein akzeptierter cut-off-Wert publiziert. In der vorliegenden Studie wurde als Kompromiss der

medianer ISS-Wert des Patientenkollektivs als cut-off-Wert verwendet. Dies kann dennoch die Auswertung der Daten beeinträchtigt haben. Für eine Auswertung unserer Daten mittels eines alternativen statistischen Verfahrens, beispielsweise mit Hilfe der *multivariate regression analysis*, war unser Patientenkollektiv zu klein.

5.4.1.2 Massentransfusion

Auch bei der Aufteilung des Patientenkollektivs nach der Anzahl der übertragenen Blutprodukte ergeben sich zwei Höhepunkte der p-p38-MAPK-Menge. Zunächst findet sich zum Zeitpunkt 0 Stunden in beiden Gruppen eine erhöhte p-p38-MAPK-Aktivität. Sechs Stunden nach Trauma ist die p-p38-MAPK bereits nur noch in Monozyten von Patienten nachweisbar, die eine Massentransfusion von Erythrozytenkonzentraten erhalten haben. Der zweite Höhepunkt der p-p38-MAPK-Menge findet sich lediglich in Monozyten massentransfundierter Patienten zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden. Patienten, die keine Massentransfusion erhalten haben, zeigen diesen Anstieg der p-p38-MAPK-Menge nicht.

Somit scheint die Transfusion von mehr als zehn Erythrozytenkonzentraten eine Aktivierung des p38-MAPK-Pathways zu verursachen, die über die Aktivierung durch das Trauma hinausgeht, die in beiden Gruppen zum Zeitpunkt 0 Stunden nachzuweisen ist. Dies lässt vermuten, dass Bluttransfusionen Eigenschaften besitzen, die das Immunsystem beeinflussen.

Diese These wird sowohl durch klinische als auch durch experimentelle Studien gestützt.

Eine kürzlich erschienene Untersuchung von *Escobar et al.* konnte die Aktivierung proinflammatorischer Gene in Empfängerleukozyten durch Erythrozytenkonzentrate *in vitro* nachweisen [34]. *Bogner et al.* konnten in einer genomweiten mRNA-Microarraystudie eine Aktivierung proinflammatorischer Gene bei polytraumatisierten Patienten zeigen [15].

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die p38-MAPK auch eine Rolle für die Aktivierung von Neutrophilen in Erythrozytenkonzentraten spielt [24].

Die experimentellen Belege für den immunologischen Effekt, den selbst leukozytenfiltrierte Blutkonserven haben, werden auch durch die Ergebnisse klinischer Studien untermauert. Seit langem ist bekannt, dass Bluttransfusionen das Risiko für Infektionen bei verletzten Patienten erhöhen [1]. *Nathens et al.* untersuchten in einer randomisierten Studie mit 1864 Patienten, die nach Trauma Infusionen erhielten, ob leukozytenfiltrierte Blutkonserven die Inzidenz infektiöser Komplikationen verringern. In dieser Studie konnte keine statistisch signifikante Reduktion der Infektionsrate durch Leukozytenfiltration nachgewiesen werden [94].

Außerdem konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass das Risiko, ein Multiorganversagen zu entwickeln, durch die Transfusion von Blutprodukten dosisabhängig gesteigert wird [88]. Da es sich bei dieser Studie um eine reine Datenbankanalyse handelte, konnte keinerlei Aussage über mögliche zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismen getroffen werden. Es liegt allerdings nahe, dass es sich hierbei um eine Aktivierung des Immunsystems durch die Bluttransfusionen handelt, wie sie in den beiden oben genannten experimentellen Studien demonstriert werden konnte.

Da der p38-MAPK-Pathway gut dokumentierte proinflammatorische Eigenschaften besitzt, erscheint eine Aktivierung dieses intrazellulären Signaltransduktionswegs durch Massentransfusion, wie sie in unserer Studie gezeigt werden konnte, plausibel. Leider konnten keine statistisch signifikanten Effekte der Massentransfusion gezeigt werden, auch wenn eine klare Tendenz zu einer höheren p-p38-MAPK-Menge in massentransfundierten Patienten vorliegt.

5.4.1.3 Überleben

Bei der Analyse des Verlaufs der p-p38-MAPK in Monozyten verstorbener und überlebender Patienten lassen sich zu allen sechs Abnahmezeitpunkten höhere p-p38-MAPK-Werte bei verstorbenen Patienten feststellen.

Bereits der Ausgangswert der p-p38-MAPK-Aktivierung zu den Zeitpunkten 0 und 6 Stunden ist in Monozyten verstorbener Patienten stark erhöht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von *Rosengart et al.* [109]. In dieser Studie wurden Zellen von schwerverletzten Patienten durch bronchoalveoläre Lavage gewonnen und anschließend auf die Expression von p-p38-MAPK untersucht. Dabei konnte eine Gruppe von Patienten identifiziert werden, deren Zellen eine erhöhte Aktivität von p-p38-MAPK aufwiesen. Diese Gruppe hatte eine höhere Wahrscheinlichkeit, ein Multiorganversagen zu entwickeln, als Patienten ohne erhöhte p-p38-MAPK-Aktivität.

Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es zunächst zu einer Herabregulierung des p-p38-MAPK-Signalwegs; zu den Zeitpunkten zwölf und 24 Stunden ist kaum Aktivität nachweisbar. Die Beendigung des p38-Signals wird durch MAP-Kinase-Phosphatasen (MKPs) vermittelt. Im Falle von p38 handelt es sich hier um die MKP-1 [140]. 48 Stunden nach Trauma kommt es zu einem Wiederanstieg der p-p38-MAPK-Menge bei verstorbenen Patienten, der sich zum Zeitpunkt 72 Stunden fortsetzt.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass der erneute Anstieg der Aktivierung von p38-MAPK 48 Stunden nach Trauma Ausdruck eines „second hit“-Phänomens ist. Die durch das Trauma gepimten Monozyten aktivieren als Antwort auf Insulte wie Operationen oder Infektionen erneut den proinflammatorischen p38-MAPK-Pathway. Dies ist bei Patienten, die versterben, stärker ausgeprägt; zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden nach Trauma ist der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen statistisch signifikant.

Diese stärkere erneute Aktivierung von p38-MAPK bei verstorbenen Patienten kann zu dem späteren negativen Outcome beitragen.

Gestützt wird diese Theorie des „second hits“ von den Arbeiten mehrerer Autoren. *Alexander et al.* untersuchten die Rolle von MAP-Kinasen in einem Mausmodell für thermische Verletzungen. Hierbei wurde die Reaktion von Monozyten auf LPS-Stimulation untersucht. Mäuse in der Verbrennungsgruppe reagierten im Vergleich zu nicht verletzten Tieren mit statistisch signifikant erhöhten p-p38-MAPK-Werten [3]. Dieses Ergebnis kann man so interpretieren, dass man die LPS-Stimulation mit einem „second hit“ gleichsetzt, der eine erhöhte p-p38-MAPK-Menge nach sich zieht. Dies würde die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen.

Thobe et al. beschäftigten sich mit der Rolle von MAP-Kinasen in der durch TLR-Rezeptoren initiierten intrazellulären Signaltransduktion nach hämorrhagischem Schock in einem Mausmodell [129]. Es zeigte sich, dass die p-p38-MAPK in unstimulierten Kupfferzellen von Mäusen, die hämorrhagischem Schock ausgesetzt waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Zusätzlich konnte auch in dieser Studie demonstriert werden, dass Stimulation der Zellen mit Agonisten der verschiedenen TLR-Rezeptoren – Zymosan für TLR-2, LPS für TLR-4 und CpG-DNA für TLR-9 – eine erhöhte Cytokinproduktion in Zellen von Tieren der Verletzungsgruppe hervorruft. Die Agonisten der TLR- Rezeptoren können hier mit Mediatoren eines „second hit“ gleichgesetzt werden.

In einer weiteren Arbeit von *Maung et al.* aus der Arbeitsgruppe von *Lederer* konnte demonstriert werden, dass Verbrennungsverletzungen bei Mäusen eine verstärkte TNF- α -Ausschüttung als Antwort auf LPS-Stimulierung hervorruft. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hierfür eine Aktivierung des p38-MAPK-Pathways notwendig ist [82]. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass der p38-MAPK-Pathway für die zelluläre Vermittlung von „second hit“-Phänomenen notwendig ist.

Diese Arbeiten untermauern die Ergebnisse dieser Studie in zwei Punkten. Zum einen wird das Ergebnis bekräftigt, dass Trauma eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs verursacht, zum anderen wird wieder bestätigt, dass ein „second hit“ nach Trauma eine verstärkte Immunantwort verursacht.

Eine Publikation aus unserer Arbeitsgruppe gibt jedoch Anlass, die Theorie des zweiten Anstiegs der Phosphoproteinmenge als Ausdruck eines „second hit“ zu überdenken und zu erweitern.

Kirchhoff et al. untersuchten die Cytokinsynthesekapazität von Monozyten polytraumatisierter Patienten [65]. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Zeitraum zwischen 12 und 48 Stunden nach Trauma die Fähigkeit von Monozyten, Cytokine nach LPS-Stimulation zu synthetisieren, stark eingeschränkt war. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Studie, dass die p-p38-MAPK in diesem Zeitraum supprimiert war. Dieser Umstand scheint jedoch darauf hinzuweisen, dass die Monozyten im genannten Zeitraum nur eingeschränkt auf „second hits“ reagieren können. Im weiteren Verlauf war in der Studie von *Kirchhoff et al.* ab 48 Stunden nach Trauma die Funktion der Monozyten wiederhergestellt. Auch dies bestätigt die Ergebnisse dieser Studie, die einen Wiederanstieg der p-p38-MAPK-Menge nach 48 Stunden zeigen.

Schon lange wird darüber berichtet, dass neben einer stark überschießenden Immunreaktion bei Polytraumapatienten auch ein Zustand der Immunsuppression durch das Trauma ausgelöst wird [133]. Eine Erklärung, die sich in der Literatur für dieses anscheinend paradoxe Phänomen findet, ist, dass verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf das Trauma reagieren. So wird beispielsweise Kupfferzellen eine erhöhte Aktivität nach Trauma nachgesagt, manche Autoren halten diese gewebsständigen Makrophagen der Lebersinusoiden für die Verursacher von Multiorganversagen bei Traumapatienten [51]. Dagegen gibt es Hinweise, dass

dendritische Zellen und Splenozyten eher mit einer verminderten immunologischen Kapazität auf Trauma reagieren [63].

Neben dem Zelltyp scheint nun auch der Faktor Zeit eine Rolle dafür zu spielen, wie eine Zelle auf die immunologischen Ereignisse Trauma und „second hits“ reagiert. Wann der „second hit“ eintritt, ist möglicherweise entscheidend für die Reaktion des Immunsystems. Aus Gründen, über die sich nur spekulieren lässt, scheint der p38-MAPK-Pathway in der frühen posttraumatischen Phase unterdrückt zu sein, was sich in verminderter Cytokinsynthesekapazität niederschlägt.

Im weiteren Verlauf erholt sich die Funktion der Monozyten wieder. Warum bei verstorbenen Patienten die wiederhergestellte Monozytenfunktion zu einer statistisch signifikant erhöhten Aktivierung der durch p38-MAPK vermittelten zellulären Signaltransduktion führt, bleibt unklar. Diskutiert werden muss hier das Ausmaß eventueller „second hits“ sowie eine stärkeres Priming der verantwortlichen Immunzellen durch das ursprüngliche Trauma, beispielsweise durch eine differentielle Aktivierung des Komplementsystems [113].

5.4.2 Phosphorylierte Jun N-terminale Kinase (p-JNK)

5.4.2.1 Verletzungsschwere

Die Analyse der p-JNK-Menge im nach Verletzungsschwere unterteilten Patientenkollektiv ergibt kein einheitliches Bild. Zunächst, bis zum Zeitpunkt 48 Stunden post Trauma, sind die p-JNK-Werte von Patienten mit einem ISS von ≤ 34 Punkte höher als von Patienten mit schwereren Verletzungen (ISS > 34 Punkte). Zum Zeitpunkt 48 Stunden jedoch ist die p-JNK-Konzentration in Patienten mit schwereren Verletzungen statistisch signifikant erhöht gegenüber Patienten, die leichter verletzt worden waren. Das genau umgekehrte Bild zeigt

sich zum nächsten Zeitpunkt 72 Stunden nach Trauma. Hier ist nämlich wiederum die p-JNK-Menge in Monozyten von Patienten mit leichteren Verletzungen statistisch signifikant erhöht. Die Interpretation dieses Ergebnisses fällt nicht leicht. Der JNK-Pathway wird allgemein als wichtig für die Vermittlung der zellulären Effekte von Trauma beziehungsweise Ischämie und Reperfusion angesehen [69].

Daher erscheint die Annahme naheliegend, dass die p-JNK-Menge mit der Verletzungsschwere korreliert. In der Literatur finden sich hingegen keine Studien, in denen dies gezeigt werden konnte. Dies ist auch in unserer Studie offensichtlich nicht gelungen.

5.4.2.2 Massentransfusion

Die Analyse der p-JNK-Menge in Abhängigkeit von der Menge an transfundierten Erythrozytenkonzentraten präsentiert sich uneinheitlich. In der Gruppe von Patienten, die eine Massentransfusion erhalten hatten, zeigt sich das bekannte, bereits bei der Diskussion der p-p38-MAPK-Messung beschriebene, zweigipflige Expressionsmuster mit einem ersten Expressionspeak bei 0 Stunden und anschließendem Abfall und Wiederanstieg der Expression zum zweiten Peak der Expression 72 Stunden nach Trauma. In der Gruppe der Patienten, die keine Massentransfusion erhalten hatten, zeigt sich hingegen kaum zeitliche Dynamik, auch das Ausgangsniveau der p-JNK-Menge bei 0 Stunden ist weit niedriger als in der massentransfundierten Gruppe. Statistische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren nicht nachweisbar.

Wieder legt dieser Verlauf der JNK-Aktivierung die Vermutung nahe, dass es durch die Bluttransfusionen zu einer Aktivierung des JNK-Pathways kommt. Wie bereits oben beschrieben, finden sich in der Literatur zahlreiche Anhalte dafür, dass Transfusionen eine Aktivierung des Immunsystems auslösen [1, 34, 88]. So konnte eine Studie, in der

polymerisiertes humanes Hämoglobin anstatt von Erythrozytenkonzentraten in der Stabilisierung von Traumapatienten eingesetzt wurde, zeigen, dass die systemische Entzündungsreaktion vermindert war, was eine reduzierte Produktion von Cytokinen wie IL-6 zur Folge hatte [57]. Als ursächlich für diesen proinflammatorischen Effekt wurden Lipide identifiziert, die in den Blutkonserven akkumulieren [121].

Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, neben der Aktivierung von p38-MAPK auch eine Aktivierung des zweiten proinflammatorischen Signaltransduktionswegs der MAPK-Familie, nämlich des JNK-Pathways anzunehmen. Leider zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie dies nicht eindeutig. Zwar ist zu mehreren Zeitpunkten insbesondere zu 0 Stunden und 72 Stunden eine deutliche Tendenz zu einer höheren p-JNK-Menge in massentransfunden Patienten festzustellen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erreichen jedoch nie statistische Signifikanz. Wie schon bei der Diskussion der Ergebnisse der p38-MAPK-Messung angemerkt, kann dies an der relativ hohen Schwelle zur Definition der Massentransfusion liegen. Diese Grenze wurde in der vorliegenden Dissertation bei zehn transfunden Einheiten festgelegt, andere Autoren sehen sie niedriger, nämlich bei sechs Einheiten [88].

5.4.2.3 Überleben

Die Analyse der p-JNK-Messung in Monozyten verstorbener Patienten zeigt ebenfalls einen zweigipfligen Verlauf. Zum Zeitpunkt 0 Stunden lässt sich eine erhöhte p-JNK-Menge feststellen, zur nächsten Blutentnahme sechs Stunden nach Trauma kommt es bereits wieder zu einem Abfall der Konzentration von p-JNK. Der zweite Peak der Aktivierung findet sich zum Zeitpunkt 72 Stunden. In Monozyten überlebenden Patienten konnte zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte p-JNK-Menge beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach den Ergebnissen dieser Studie in Monozyten verstorbener Patienten der JNK-Signaltransduktionsweg durch Trauma aktiviert wird. In überlebenden Patienten scheint dies nur in geringem Maße der Fall zu sein.

Dieser Verlauf der Phosphoproteinmenge mit einer fehlenden p-JNK-Expression zwischen zwölf und 48 Stunden nach Trauma bestätigt die Beobachtung von *Kirchhoff et al.*, dass die Monozytenfunktion im gleichen Zeitraum supprimiert war [65].

Die zeitliche Dynamik der p-JNK-Menge, die in dieser Untersuchung beobachtet werden konnte, deckt sich interessanterweise auch mit dem Verlauf der p-p38-MAPK-Aktivierung. P38 und JNK werden also parallel durch das Trauma aktiviert. Dies erscheint plausibel, denn beide MAP-Kinasen sind in die Kontrolle der Transkription von proinflammatorischen Cytokinen involviert, die im Zustand der posttraumatischen Hyperinflammation verstärkt ausgeschüttet werden [56]. Eine gleichzeitige Aktivierung der beiden Pathways ist außerdem in der Literatur beschrieben [149].

Es ist bekannt, dass der JNK-Pathway in Rahmen von Ischämie/Reperfusion aktiviert wird. Dies konnte mehrfach am Tiermodell gezeigt werden [12, 135]. Die Rolle der JNK im Szenario des hämorrhagischen Schocks ist in der Leber gut untersucht. *McCloskey et al.* konnten zeigen, dass ein hämorrhagischer Schock zu einer Zunahme der JNK-Phosphorylierung um das Doppelte führt [83].

Studien von *Lehnert et al.* sowie *Relja et al.* untersuchten, welche Rolle die JNK nicht nur für die Vermittlung von Endorganschäden hat, sondern auch wie sich die Aktivierung der JNK auf die systemische Inflammationsreaktion auswirkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der JNK mittels eines Peptidinhibitors sowohl den Endorganschaden an Herz und Leber verringerte, als auch die systemische Entzündungsreaktion, quantifiziert anhand der IL-6-Konzentration, verminderte [73, 105]. Dies unterstützt eine zentrale These dieser

Dissertation, die besagt, dass der JNK-Pathway für die Vermittlung der systemischen Entzündungsreaktion nach Trauma essentiell ist.

Bezüglich des zweiten Aktivitätspeaks zum Ende des Beobachtungszeitraums, der auf „second hits“ zurückzuführen sein könnte, finden sich in der Literatur Studien, die zu den Ergebnissen dieser Studie im Widerspruch stehen. *Alexander et al.* konnten zeigen, dass in einem Mausmodell thermischer Verletzungen, die p-JNK in Monozyten von Tieren der Verletzungsgruppe nach LPS-Stimulierung supprimiert war. Die p38-MAPK hingegen war verstärkt aktiviert [3]. Dies könnte bedeuten, dass der JNK-Pathway in diesem Tiermodell in geringerem Maße als der p38-Signaltransduktionsweg auf „second hits“ reagiert. Dies war in dieser Studie nicht der Fall.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, dass bei verstorbenen Patienten eine erhöhte Expression der p-JNK feststellbar war. Dennoch konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Expression von p-JNK und Tod nach Trauma demonstriert werden.

5.4.3 Phosphorylierte Form von c-Jun

5.4.3.1 Verletzungsschwere

Patienten, die einen ISS-Wert von ≤ 34 Punkten aufwiesen, zeigten zu allen Zeitpunkten eine höhere Aktivierung von c-Jun. Zum Zeitpunkt 72 Stunden findet sich der Höhepunkt der Expression in dieser Gruppe.

Dieses Ergebnis ist ähnlich zu den Ergebnissen bezüglich der MAP-Kinasen p38 und JNK, die ebenfalls in der Gruppe der leichter verletzten Patienten höher exprimiert waren. Der funktionelle Zusammenhang zwischen der Aktivierung sowohl von p38 als auch von JNK und

der Aktivierung von c-Jun ist gut dokumentiert [54, 143, 149]. Daher ist auch eine höhere Aktivierung von c-Jun in der Gruppe der leichter verletzten Patienten zu erwarten. Dies konnte bestätigt werden.

In der Literatur finden sich allerdings zahlreiche Hinweise, dass das Ausmaß der posttraumatischen Immundysfunktion positiv mit der Verletzungsschwere korreliert. Mehrere Studien unter anderem von *Wutzler et al.* und *Gebhard et al.* konnten beispielsweise eine positive Korrelation der IL-6-Konzentration mit der Verletzungsschwere nachweisen [44, 146]. Es ist bekannt, dass AP-1 bzw. c-Jun als Teil dieses Transkriptionsfaktorkomplexes eine große Rolle für die Expression von IL-6 spielt [73]. Daher liegt es nahe, anzunehmen, dass auch die Aktivierung von c-Jun in Abhängigkeit von der Verletzungsschwere zunimmt. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden.

Eine Untersuchung von *Bogner et al.* konnte allerdings auch keine Korrelation von IL-6 mit der Verletzungsschwere demonstrieren. Lediglich ein Zusammenhang der Verletzungsschwere mit dem anti-inflammatorischen Cytokin IL-10 konnte nachgewiesen werden [16]. Einschränkend ist hier anzumerken, dass diese Untersuchung an Serummaterial vorgenommen wurde. Daher sind die Ergebnisse dieser Studie und unserer Studie nur begrenzt vergleichbar.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivierung des MAP-Kinasen/c-Jun-Pathways von der Verletzungsschwere unabhängig sein könnte. Eine Aktivierung dieses Pathways könnte folglich ein Zeichen für eine von der Verletzungsschwere unabhängige, immunologisch vermittelte Gefährdung, des Patienten sein.

5.4.3.2 Massentransfusion

Zu allen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraums von 72 Stunden ist die Aktivierung von c-Jun in der Gruppe der massentransfundierten Patienten höher als in der Gruppe der Patienten, die keine Massentransfusion erhalten hatten. Der zeitliche Verlauf der Expression zeigt den schon bekannten zweigipfligen Verlauf mit dem ersten Peak der Expression zum Beginn des Beobachtungszeitraums bei null Stunden sowie mit dem zweiten Peak zum Ende bei 72 Stunden.

Sowohl p38-MAPK als auch JNK zeigen in dem nach Transfusionsbedarf aufgeteilten Patientenkollektiv einen sehr ähnlichen Verlauf, der Expressionspeaks bei 0 und 72 Stunden aufweist. Es war daher zu erwarten, dass ein solches Aktivierungsmuster von p38-MAPK und JNK in einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf der c-Jun-Aktivierung münden würde, da p38 und JNK bekannte Aktivatoren von c-Jun sind. Somit lässt sich die Vermutung aufstellen, dass p38 und JNK auch im klinischen Szenario der Massentransfusion für die Aktivierung von c-Jun verantwortlich sind.

Wie bereits ausgeführt, beruht die vorliegende Untersuchung auf einer genomweiten mRNA-Microarraystudie. In dieser Studie wurde unter anderem die Veränderung der mRNA-Expressionsmuster in Monozyten polytraumatisierter Patienten in Abhängigkeit von der Menge der übertragenen Erythrozytenkonzentrate untersucht [15]. Dabei konnte ein funktionelles Netzwerk von Genen identifiziert werden, das abhängig davon, ob die Patienten eine Massentransfusion erhalten hatten, differentiell exprimiert wurde. Der zentrale Faktor dieses Netzwerks war c-Jun, das bei Patienten, die massentransfundiert worden waren, hochreguliert war. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen nun auch eine höhere Menge phosphorylierten c-Juns nach. Folglich konnte demonstriert werden, dass eine differentielle Expression von c-Jun auf mRNA-Ebene auch eine differentielle Aktivierung des

entsprechenden Proteins nach sich zieht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch Faktoren, die c-Jun aktivieren, nämlich die MAP-Kinasen p38 und JNK, in Monozyten von massentransfunden Patienten stärker aktiviert sind. Dieser Zusammenhang erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die p-c-Jun-Menge hingegen war in den beiden Gruppen statistisch signifikant verschieden. So war zu den Zeitpunkten 0, 48 und 72 Stunden nach Trauma die Aktivierung von c-Jun in Monozyten von Patienten, die eine Massentransfusion erhalten hatten, statistisch signifikant erhöht.

Aus verschiedenen klinischen und experimentellen Studien ist bekannt, dass Bluttransfusionen das Immunsystem aktivieren und zusätzlich unabhängige Risikofaktoren für einen ungünstigen klinischen Verlauf sind [57, 79, 88]. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass c-Jun durch Bluttransfusionen aktiviert wird. Aufgrund der zentralen Rolle, die c-Jun in der transkriptionalen Regulierung der Entzündung spielt, scheint somit ein möglicher Mechanismus identifiziert, der für die Ausprägung der negativen klinischen Folgen von Bluttransfusionen verantwortlich sein könnte.

5.4.3.3 Überleben

C-Jun ist zu allen Zeitpunkten bei Patienten, die an ihren Verletzungen verstorben sind, stärker aktiviert, als bei Patienten, die überlebten. Auch hier ist ein zweigipfliger Aktivierungsverlauf nachweisbar, mit einem ersten Peak zum Zeitpunkt der Aufnahme des Patienten in den Schockraum und einem zweiten Anstieg der Phosphoproteinmenge nach 48 Stunden. Allerdings streuen die Werte in der Gruppe der verstorbenen Patienten zum Zeitpunkt null Stunden nicht unerheblich. Daher muss die Aussagekraft der Messungen zu diesem Zeitpunkt relativiert werden.

Wieder zeigt sich, dass p38 und JNK, die beide c-Jun aktivieren, einen ähnlichen zeitlichen Verlauf haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass die MAP-Kinasen p38 und JNK c-Jun in Monozyten von Patienten, die verstorben sind, aktivieren.

Bezüglich des zweigipfligen Verlaufs der Aktivierung wurde unter Punkt 5.4.1.3 die Hypothese aufgestellt, dass es sich hier um den Ausdruck eines „second hit“-Phänomens handelt. Es stellt sich nun die Frage, welche molekularen Mechanismen dem zugrunde liegen. Aufgrund der kurzen Zeit zwischen Trauma und dem Zeitpunkt der ersten Messung von p-c-Jun ist es unwahrscheinlich, dass der erste Anstieg der p-c-Jun-Menge auf de-novo-Synthese zurückzuführen ist. Da in der vorliegenden Studie nur die phosphorylierte Form von c-Jun gemessen wurde, ist eine definitive Aussage hierüber nicht möglich. Hierzu wäre eine Messung der Gesamtproteinkonzentration von c-Jun, d.h. eine Messung des phosphorylierten und des nicht phosphorylierten Proteins, nötig gewesen. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass der erste Anstieg der Aktivierung durch die Phosphorylierung von bereits in der Zelle vorhandenem c-Jun verursacht wird, d.h. durch posttranslationale Modifikation präformierten c-Juns. *Devary et al.* konnten diesen Umstand in einem Zellkulturexperiment demonstrieren, in dem die Stressreaktion von Zellen auf UV-Bestrahlung untersucht wurde [31]. Auch im Tiermodell konnte dieser Effekt bereits gezeigt werden [73]. Es ist bekannt, dass c-Jun autoregulatorische Eigenschaften besitzt. Dies bedeutet, dass die transkriptionale Aktivität des c-Jun-Gens durch die Phosphorylierung von c-Jun-Protein, das in der Zelle vorhanden ist, stimuliert wird [62]. Dies könnte bedeuten, dass der zweite Peak im Verlauf der p-c-Jun-Menge auch unabhängig von „second hits“ entstehen könnte. Vielmehr könnte der zweite Aktivierungsgipfel die Folge der initialen Aktivierung präformierten c-Juns sein. Somit wäre der zweite Peak Ausdruck einer de-novo-Synthese von c-Jun, ausgelöst durch autoregulatorische Eigenschaften von c-Jun.

In der genomweiten mRNA-Microarraystudie von *Biberthaler et al.*, die dieser Arbeit zugrunde liegt, wurde untersucht, ob traumaspezifische mRNA-Expressionsmuster existieren. Dabei konnte der Nachweis geführt werden, dass ein Netzwerk von Genen abhängig davon, ob der Patient überlebte oder verstarb, differentiell exprimiert wurde. Im Zentrum dieses Netzwerks befand sich der Transkriptionsfaktor c-Jun. Dieser war in Monozyten verstorbener Patienten signifikant stärker exprimiert [14]. Wiederum stellte sich die Frage, ob eine erhöhte Expression von c-Jun auf mRNA-Ebene auch eine erhöhte Menge aktivierten und damit biologisch wirksamen Proteins bedingt. Dies konnte nachgewiesen werden. Zu vier Zeitpunkten, nämlich zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden war c-Jun in Monozyten verstorbener Patienten statistisch signifikant höher aktiviert als in Zellen überlebender Patienten. Wir konnten also zeigen, dass auch abhängig vom klinischen Parameter „Überleben“ auf eine differentielle mRNA-Expression eine differentielle Aktivierung des betreffenden Genprodukts folgt.

Die Rolle, die c-Jun in verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen spielt, die bei polytraumatisierten Patienten vorkommen können, ist gut dokumentiert.

Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass AP-1 mit c-Jun als wesentlichem Baustein durch hämorrhagischen Schock in der Leber aktiviert wird [106, 118]. Andere Autoren berichten dies auch über die Niere [110]. Das kann als Hinweis darauf angesehen werden, dass c-Jun wesentlich an der Vermittlung von Endorganschäden, verursacht durch Hypoxie, die durch hämorrhagischen Schock ausgelöst wurde, beteiligt ist. Dies wird durch Berichte gestützt, dass die JNK, die ein bekannter Aktivator von c-Jun ist, durch Hypoxie in der Leber aktiviert wird [83]. Auch Ischämie mit anschließender Reperfusion aktiviert c-Jun in der Leber [144].

Alle diese Arbeiten beschäftigen sich mit dem der Aktivierung von c-Jun und dem damit verbundenen Endorganschaden. Jedoch finden sich in der Literatur kaum Belege für die

systemische Rolle von c-Jun. Lediglich indirekt kann auf die Rolle von c-Jun geschlossen werden. So wurde durch die Hemmung der JNK, deren Funktion bekanntermaßen die Aktivierung von c-Jun ist, die systemische Entzündungsreaktion in einem Tiermodell des hämorrhagischen Schocks gedämpft [105].

In der Zusammenschau finden sich in der Literatur gute Belege für eine wichtige Funktion von c-Jun im pathophysiologischen Geschehen bei polytraumatisierten Patienten. Dies unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation. Es konnten gezeigt werden, dass die Aktivierung von c-Jun hochsignifikant Patienten, die verstarben, von Patienten, die überlebten, zu trennen vermochte. Ob c-Jun bei verstorbenen Patienten tatsächlich eine wichtige pathophysiologische Rolle einnimmt, welche Faktoren upstream von c-Jun diese differentielle Aktivierung bedingen oder auch ob genetische Polymorphismen verantwortlich sein könnten, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch im Dunkeln [45, 52].

5.5 Klinische Relevanz

In dieser Untersuchung konnten Faktoren identifiziert werden, die mit negativen klinischen Ergebnissen in Zusammenhang zu stehen scheinen. Es liegt die Frage nahe, ob eventuell eine selektive Hemmung der betreffenden Pathways von Vorteil wäre.

Bezüglich der p38-MAPK existiert eine Arbeit, die sich damit beschäftigt, wie sich eine Hemmung der p38-MAPK auf die Cytokinproduktion verschiedener Zelllinien und in verschiedenen Tiermodellen auswirkt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Effekt einer Hemmung von p38 stark vom Zelltyp abhängt. So wurde die Cytokinproduktion in Makrophagen durch p38-Hemmung gesteigert, in anderen Zelllinien wurde sie hingegen gedämpft [137]. Eine weitere Arbeit untersuchte, wie sich die Hemmung von p38 nach der Infusion von LPS im Menschen auswirkt. Die Bedeutung dieser Arbeit liegt darin, dass die

Auswirkungen der p38-Hemmung auf systemische Inflammation untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass durch die Verabreichung eines p38-Hemmstoffs die Cytokinproduktion im Plasma der Probanden vermindert werden konnte [19]. Diese Ergebnisse lassen eine klinische Anwendbarkeit von p38-Inhibitoren im klinischen Szenario der akuten systemischen Inflammation zumindest vermuten.

Ähnliche Berichte gibt es über die JNK, hier gibt es allerdings noch keine Versuche am Menschen. Arbeiten, die weiter oben schon ausführlich diskutiert werden, legen den Schluss nahe, dass auch eine Hemmung der JNK klinischen Nutzen erbringen könnte. Dies gilt besonders für die Studie von *Relja et al.*, die aufzeigen konnte, dass JNK-Hemmung mit dem Peptidinhibitor D-JNKI-1 selbst dann die systemische Inflammation abmildern kann, wenn der Inhibitor erst nach der Induktion des hämorrhagischen Schocks in den Versuchstieren appliziert wird [105]. Da dieser Versuchsaufbau der tatsächlichen klinischen Situation recht nahe kommt, weckt dieses Ergebnis die Hoffnung auf klinische Relevanz.

Wenn man sich allerdings in Erinnerung ruft, dass die MAP-Kinase-Signaltransduktionswege eng miteinander verbunden sind und in ein kompliziertes Netzwerk biologischer Funktionen eingebunden sind, kommen Zweifel auf, ob die Hemmung eines einzelnen Elements im komplexen biologischen System des schwerkranken Patienten wirklich effektiv sein kann. Erfolgversprechender scheint hier der Ansatz zu sein, mittels genomweiter Screeningverfahren einen Überblick über die immunologische Gesamtsituation des Patienten zu erhalten. Es existieren bereits mehrere Arbeiten, die sich Chip-basierter Technologien bedient haben, um dieses Ziel zu erreichen [14, 71]. Zusätzlich wurden kürzlich Anstrengungen unternommen, ein auf Genomscreening beruhendes Scoringssystem zu entwickeln, das eine Aussage über die Prognose schwerverletzter Patienten erlaubt [142]. Hinzu kommen immer mehr Hinweise, dass auch genetische Polymorphismen die Antwort des Immunsystems auf schwere Verletzungen mitbestimmen [114].

Mit einer Kombination aller eben erwähnten Ansätze könnte man einen möglichst umfassenden individuellen Überblick über den Immunstatus polytraumatisierter Patienten zu erhalten und diesen für eine möglichst exakte Risikostratifizierung nutzen. Damit könnten diese Patienten speziell angepassten Therapieschemata zugeführt werden, die darauf abzielen, die Folgen von posttraumatischer Immundysfunktion abzumildern. Unter den Therapieoptionen, denen besonders gefährdete Patienten zugeführt werden könnten, sind operative Versorgungspläne nach dem „*damage control*“-Prinzip [97] sowie immunmodulatorische medikamentöse Therapien [125]. Diese Therapien könnten somit exakt auf den Immunstatus des Patienten abgestimmt werden. Darüber hinaus existieren Patienten, bei denen allein aufgrund der Einschätzung der klinischen Situation durch den behandelnden Chirurgen unklar ist, ob sie eher von einem „*damage control*“-Ansatz oder von einem „*early total care*“-Therapieplan profitieren [99].

Mithilfe von Immunmonitoring, das sich auf die oben erwähnten Methoden stützt, wäre es möglich, diese Frage anhand von objektiven Kriterien zu beantworten.

6. Zusammenfassung

Die posttraumatische Immundysfunktion ist in Form einer systemischen Entzündungsreaktion nach wie vor eine wesentliche Ursache von Morbidität und Mortalität bei schwerverletzten Patienten. Mononukleäre Zellen haben durch die Ausschüttung von Cytokinen und die Präsentation von Antigenen eine wesentliche Rolle in der Entstehung dieser Störungen der Immunfunktion. In den letzten Jahren konnten durch die Entwicklung des „Alarmin“-Konzepts wesentliche Erkenntnisse darüber gewonnen werden, auf welche Weise das angeborene Immunsystem im Rahmen einer schweren Verletzung aktiviert wird. Welche Signaltransduktionswege dabei im subzellulären Bereich aktiviert werden, ist jedoch noch weitgehend unklar. Vorangehende Arbeiten konnten mittels genomweiten mRNA-Screening den MAP-Kinasenpathway und den von MAP-Kinasen aktivierten Transkriptionsfaktor c-Jun als wesentliche Komponenten der intrazellulären Signalübertragung in Monozyten nach Polytrauma identifizieren. Die wesentliche Zielsetzung dieser Arbeit war daher, auf translationaler Ebene die Rolle von c-Jun sowie die Funktion der c-Jun aktivierenden MAP-Kinasen p38 und JNK näher zu untersuchen. Im Detail ergab sich folgende Fragestellung:

- Existiert eine zeitliche Dynamik in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun und der MAP-Kinasen p38 und JNK in Monozyten polytraumatisierter Patienten?
- Korreliert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun und der MAP-Kinasen p38 und JNK in Monozyten polytraumatisierter Patienten mit klinischen Parametern?
- Lässt sich ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Aktivierung von c-Jun und einer erhöhten Phosphorylierung der c-Jun aktivierenden Faktoren p38 MAPK und JNK herstellen?

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde ein in mehreren vorangegangenen Studien bewährtes Studiendesign gewählt. 37 Patienten mit einem ISS > 16 Punkten und stumpfen Verletzungen wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Sieben der 37 Patienten verstarben innerhalb der follow-up-Periode von 90 Tagen. Den Patienten wurden zu sechs Zeitpunkten EDTA-Vollblut entnommen: direkt nach Aufnahme in den Schockraum der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Eintreten der Verletzungen. Aus dem gewonnenen Material wurde mittels positiver magnetischer Zellseparation die monozytäre Fraktion isoliert. Aus den Monozyten wurde das nukleäre Protein extrahiert, welches mittels des kommerziell erhältlichen Bio-Plex Phosphoprotein Detection Systems der Firma Bio-Rad auf die vorhandene Menge der phosphorylierten Form von p38 MAPK, JNK und c-Jun untersucht wurde.

Die Ergebnisse beantworten die Fragestellung auf folgende Weise:

- Eine zeitliche Dynamik der Phosphoproteinmenge im gesamten Patientenkollektiv lässt sich vor allem bei der p-p38 MAPK feststellen. Die Aktivierung von p38 zeigt einen deutlich bimodalen Verlauf mit Spitzenwerten zur Aufnahme in den Schockraum (0 Stunden) und zum Ende des Beobachtungszeitraum (72 Stunden). Bei der p-JNK und p-c-Jun zeigen sich im gesamten Patientenkollektiv weniger starke Schwankungen. Die p-JNK zeigt kaum zeitliche Dynamik, auch p-c-Jun zeigt lediglich zu 72 Stunden einen leichten Anstieg der Expression.
- Eine Korrelation klinischer Parameter mit der Phosphoproteinmenge konnte mehrfach demonstriert werden. So zeigt sich bei der Analyse der p-p38-MAPK-Menge in Bezug auf das Überleben der Patienten, dass vor allem zu Beginn und zum Ende des

Beobachtungszeitraums starke Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen auftreten. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden sind diese statistisch signifikant.

Bei der statistischen Analyse der p-JNK-Menge konnte zum Zeitpunkt 0 Stunden ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten herausgearbeitet werden. Allgemein sind die durchschnittlichen Werte der p-JNK-Menge bei verstorbenen Patienten zu Beginn und zum Ende des untersuchten Zeitraums höher als bei überlebenden Patienten. Die p-c-Jun-Menge war zu vier von sechs Zeitpunkten bei verstorbenen Patienten statistisch signifikant erhöht. Die höchsten Werte der p-c-Jun-Menge finden sich zu Beginn und zum Ende des untersuchten 72 Stunden-Zeitraums.

Zwischen dem klinischen Parameter „Massentransfusion“ und der Aktivität aller drei untersuchten Phosphoproteine lassen sich signifikante Korrelationen nachweisen. Die p-p38 MAPK zeigt ein Aktivierungsprofil, das bei massentrandfundierten Patienten eine starke Erhöhung der gemessenen Werte gegenüber nicht massentrandfundierten Patienten zu Beginn und zum Ende des 72-Stunden-Zeitraumes aufweist. Statistische Signifikanz erreichen die Unterschiede nicht. Die p-JNK zeigt ein ähnliches Profil, auch hier konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Bei der Analyse der p-c-Jun-Menge lassen sich hingegen zu mehreren Zeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede herausarbeiten. Zum Zeitpunkt null Stunden ist die Aktivierung von c-Jun in Monozyten massentrandfundierter Patienten statistisch signifikant gegenüber nicht massentrandfundierten Patienten erhöht. Auch zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden konnte eine signifikante Erhöhung der Aktivierung in der massentrandfundierten Gruppe demonstriert werden.

Keine große Aussagekraft erreichte die Analyse der Messergebnisse anhand der Verletzungsschwere. Leichter verletzte Patienten zeigten bei allen drei untersuchten Faktoren höhere Phosphoproteinmengen. Statistische Unterschiede zwischen den beiden

Gruppen lassen sich bei der p-p38-MAPK und bei p-c-Jun nicht nachweisen. Bei der p-JNK ist zum Zeitpunkt 48 Stunden die Aktivierung in Monozyten von Patienten mit größerer Verletzungsschwere statistisch signifikant erhöht, zum Zeitpunkt 72 Stunden ist der Wert der leichter verletzten Patienten statistisch signifikant erhöht.

- Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war, zu prüfen, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Aktivierung von p38 MAPK und JNK sowie der Aktivierung von c-Jun nachweisbar ist. Dies konnte im Zusammenhang mit den klinischen Parametern „Überleben“ und „Massentransfusion“ gezeigt werden. Bei verstorbenen Patienten findet sich eine gleichsinnige Aktivierung von p38 MAPK und JNK einerseits und c-Jun andererseits zu Beginn und zum Ende des untersuchten Zeitraums. Ein vergleichbares Aktivierungsmuster findet sich auch, wenn man die Patienten nach dem klinischen Parameter „Massentransfusion“ in zwei Gruppen unterteilt. Für diese beiden klinischen Parameter erscheint daher eine Aktivierung von c-Jun durch p38 MAPK und JNK wahrscheinlich.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der MAP-Kinasen/c-Jun-Pathway in Monozyten polytraumatisierter Patienten abhängig von klinischen Parametern differentiell aktiviert ist. Dies ist ein Hinweis auf einen möglichen pathophysiologischen Mechanismus, der für die Entwicklung posttraumatischer Immundysfunktion Bedeutung besitzen könnte.

7. Literaturverzeichnis

1. Agarwal, N., J.G. Murphy, C.G. Cayten, and W.M. Stahl, *Blood Transfusion Increases the Risk of Infection After Trauma*. Archives of Surgery, 1993. **128**(2): p. 171-177.
2. Aldrian, S., F. Koenig, P. Weninger, V. Vécsei, and T. Nau, *Characteristics of polytrauma patients between 1992 and 2002: What is changing?* Injury, 2007. **38**(9): p. 1059-1064.
3. Alexander, M., T. Daniel, I.H. Chaudry, and M.G. Schwacha, *MAP kinases differentially regulate the expression of macrophage hyperactivity after thermal injury*. Journal of Cellular Physiology, 2004. **201**(1): p. 35-44.
4. Ameratunga, S., M. Hajar, and R. Norton, *Road-traffic injuries: confronting disparities to address a global-health problem*. The Lancet, 2006. **367**(9521): p. 1533-1540.
5. Angele, M.K., M.G. Schwacha, A. Ayala, and I.H. Chaudry, *Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock*. Shock, 2000. **14**(2): p. 81-90.
6. Avruch, J., *MAP kinase pathways: The first twenty years*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1150-1160.
7. Baker, C.C., L. Oppenheimer, B. Stephens, F.R. Lewis, and D.D. Trunkey, *Epidemiology of trauma deaths*. The American Journal of Surgery, 1980. **140**(1): p. 144-150.
8. Baker, S.P., B. O'Neill, W. Haddon, and W.B. Long, *The Injury Severity Score: A method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care*. The Journal of Trauma - Injury, Infection, and Critical Care, 1974. **14**(3): p. 187 - 196.
9. Bakiri, L., D. Lallemand, E. Bossy-Wetzel, and M. Yaniv, *Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression*. EMBO Journal, 2000. **19**(9): p. 2056-2068.
10. Baue, A.E., *MOF, MODS, and SIRS: what is in a name or an acronym?* Shock, 2006. **26**(5): p. 438-449.
11. Bauer, C., *Blut: Ein flüssiges Organsystem*, in *Lehrbuch der Physiologie*, R. Klinke and S. Silbernagl, Editors. 2003, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 199.
12. Bendinelli, P., R. Piccoletti, P. Maroni, and A. Bernelli-Zazzera, *The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion*. FEBS Letters, 1996. **398**(2-3): p. 193-197.
13. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. Journal of Leukocyte Biology, 2007. **81**(1): p. 1-5.
14. Biberthaler, P., V. Bogner, H.V. Baker, M.C. López, P. Neth, K. Kanz, W. Mutschler, M. Jochum, and L. Moldawer, *Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome*. Shock, 2005. **24**(1): p. 11 - 19.
15. Bogner, V., H.V. Baker, K.-G. Kanz, L.L. Moldawer, W. Mutschler, and P. Biberthaler, *Hemorrhage and Subsequent Allogenic Red Blood Cell Transfusion are Associated With Characteristic Monocyte Messenger RNA Expression Patterns in Patients After Multiple Injury-A Genome Wide View*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 2009. **67**(4): p. 792-801.
16. Bogner, V., L. Keil, C. Kirchhoff, B. Leidel, W. Mutschler, and P. Biberthaler, *Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome*

- in multiple injured patients*. European Journal of Medical Research, 2009. **14**(7): p. 284-291.
17. Bone, R.C., *Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS*. Critical Care Medicine, 1996. **24**(7): p. 1125-1128.
 18. Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald, *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-1655.
 19. Branger, J., B. van den Blink, S. Weijer, J. Madwed, C.L. Bos, A. Gupta, C.-L. Yong, S.H. Polmar, D.P. Olszyna, C.E. Hack, S.J.H. van Deventer, M.P. Peppelenbosch, and T. van der Poll, *Anti-Inflammatory Effects of a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor During Human Endotoxemia*. Journal of Immunology, 2002. **168**(8): p. 4070-4077.
 20. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
 21. Chen, Z., T.B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M.H. Cobb, *MAP Kinases*. Chemical Reviews, 2001. **101**(8): p. 2449-2476.
 22. Chi, H., S.P. Barry, R.J. Roth, J.J. Wu, E.A. Jones, A.M. Bennett, and R.A. Flavell, *Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(7): p. 2274-2279.
 23. Committee on Injury Scaling, *The Abbreviated Injury Scale 1990 Revision Update 98*. 1998, Des Plaines, IL: Association for the Advancement of Automotive Medicine.
 24. Costantini, T.W., J. Deree, J.O. Martins, W.H. Loomis, V. Bansal, and R. Coimbra, *Pentoxifylline attenuates leukoreduced stored blood-induced neutrophil activation through inhibition of mitogen-activated protein kinases*. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2009. **32**(1): p. 74-81.
 25. Cuschieri, J. and R.V. Maier, *Mitogen - activated protein kinase (MAPK)*. Critical Care Medicine, 2005. **33**(12 (Suppl.)): p. S417 - S419.
 26. Davis, R.J., *Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 239-252.
 27. de Kneegt, C., S.A.G. Meylaerts, and L.P.H. Leenen, *Applicability of the trimodal distribution of trauma deaths in a Level I trauma centre in the Netherlands with a population of mainly blunt trauma*. Injury, 2008. **39**(9): p. 993-1000.
 28. Deitch, E.A., *Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: What is important in human beings?* Surgery, 2002. **131**(3): p. 241-244.
 29. Deitch, E.A., *The Role of Intestinal Barrier Failure and Bacterial Translocation in the Development of Systemic Infection and Multiple Organ Failure*. Archives of Surgery, 1990. **125**(3): p. 403-404.
 30. Demetriades, D., B. Kimbrell, A. Salim, G. Velmahos, P. Rhee, C. Preston, G. Gruzinski, and L. Chan, *Trauma Deaths in a Mature Urban Trauma System: Is "Trimodal" Distribution a Valid Concept?* Journal of the American College of Surgeons, 2005. **201**(3): p. 343-348.
 31. Devary, Y., R.A. Gottlieb, T. Smeal, and M. Karin, *The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of src tyrosine kinases*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1081-1091.
 32. Dykes, J.H., J. Toporski, G. Juliusson, A.N. Békássy, S. Lenhoff, A. Lindmark, and S. Scheduling, *Rapid and effective CD3 T-cell depletion with a magnetic cell sorting*

- program to produce peripheral blood progenitor cell products for haploidentical transplantation in children and adults.* Transfusion, 2007. **47**(11): p. 2134 – 2142.
33. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.* Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(11): p. 859-868.
 34. Escobar, G.A., A.M. Cheng, E.E. Moore, J.L. Johnson, C. Tannahill, H.V. Baker, L.L. Moldawer, and A. Banerjee, *Stored Packed Red Blood Cell Transfusion Up-regulates Inflammatory Gene Expression in Circulating Leukocytes.* Annals of Surgery, 2007. **246**(1): p. 129-134.
 35. Flø, R.W., A. Næss, F. Lund-Johansen, B.O. Mæhle, H. Sjørnsen, V. Lehmann, and C.O. Solberg, *Negative selection of human monocytes using magnetic particles covered by anti-lymphocyte antibodies.* Journal of Immunological Methods, 1991. **137**(1): p. 89-94.
 36. Flohé, S., S. Flohé, F. Schade, and C. Waydhas, *Immune response of severely injured patients – influence of surgical intervention and therapeutic impact.* Langenbeck's Archives of Surgery, 2007. **392**(5): p. 639-648.
 37. Flohé, S., P. Kobbe, and D. Nast-Kolb, *Immunological reactions secondary to blood transfusion.* Injury, 2007. **38**(12): p. 1405-1408.
 38. Flohé, S.B., S. Flohé, and F.U. Schade, *Deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms.* Innate Immunity, 2008. **14**(6): p. 333-344.
 39. Foletta, V.C., D.H. Segal, and D.R. Cohen, *Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1.* Journal of Leukocyte Biology, 1998. **63**(2): p. 139-152.
 40. Gaddis, G.M. and M.L. Gaddis, *Introduction to biostatistics: Part 5, statistical inference techniques for hypothesis testing with nonparametric data.* Annals of Emergency Medicine, 1990. **19**(9): p. 1054-1059.
 41. Gaestel, M., A. Kotlyarov, and M. Kracht, *Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation.* Nature Reviews Drug Discovery, 2009. **8**(6): p. 480-499.
 42. Garthe, E., J.D. States, and N.K. Mango, *Abbreviated Injury Scale Unification: The Case for a Unified Injury System for Global Use.* Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1999. **47**(2): p. 309-323.
 43. Gebhard, F. and M. Huber-Lang, *Polytrauma-pathophysiology and management principles.* Langenbeck's Archives of Surgery, 2008. **393**(6): p. 825-831.
 44. Gebhard, F., H. Pfetsch, G. Steinbach, W. Strecker, L. Kinzl, and U.B. Bruckner, *Is Interleukin 6 an Early Marker of Injury Severity Following Major Trauma in Humans?* Archives of Surgery, 2000. **135**(3): p. 291-295.
 45. Giannoudis, P.V., M. van Griensven, E. Tsiridis, and H.C. Pape, *The genetic predisposition to adverse outcome after trauma.* J Bone Joint Surg Br, 2007. **89-B**(10): p. 1273-1279.
 46. Graham, E., M. Tsokos, and G. Ruttly, *Can post-mortem blood be used for DNA profiling after peri-mortem blood transfusion?* International Journal of Legal Medicine, 2007. **121**(1): p. 18-23.
 47. Guan, Q.H., D.S. Pei, Y.Y. Zong, T.L. Xu, and G.Y. Zhang, *Neuroprotection against ischemic brain injury by a small peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase (JNK) via nuclear and non-nuclear pathways.* Neuroscience, 2006. **139**(2): p. 609-627.
 48. Harwood, P.J., P.V. Giannoudis, C. Probst, M. Van Griensven, C. Krettek, H.-C. Pape, and The Polytrauma Study Group of the German Trauma Society, *Which AIS Based Scoring System is the Best Predictor of Outcome in Orthopaedic Blunt Trauma Patients?* The Journal of Trauma - Injury, Infection, and Critical Care, 2006. **60**(2): p. 334-340.

49. Haskill, S., C. Johnson, D. Eierman, S. Becker, and K. Warren, *Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes*. J Immunol, 1988. **140**(5): p. 1690-1694.
50. Herlaar, E. and Z. Brown, *p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease*. Molecular Medicine Today, 1999. **5**(10): p. 439-447.
51. Hildebrand, F., W.J. Hubbard, M.A. Choudhry, M. Frink, H.-C. Pape, S.L. Kunkel, and I.H. Chaudry, *Kupffer Cells and Their Mediators: The Culprits in Producing Distant Organ Damage after Trauma-Hemorrhage*. American Journal of Pathology, 2006. **169**(3): p. 784-794.
52. Hildebrand, F., H.C. Pape, G.M. van, S. Meier, S. Hasenkamp, C. Krettek, and M. Stuhmann, *Genetic predisposition for a compromised immune system after multiple trauma*. Shock, 2005. **24**: p. 518 - 522.
53. Huber - Wagner, S., M. Qvick, T. Mussack, E. Euler, M.V. Kay, W. Mutschler, K.G. Kanz, and Working Group on Polytrauma of the German Trauma Society (DGU), *Massive blood transfusion and outcome in 1062 polytrauma patients: a prospective study based on the Trauma Registry of the German Trauma Society*. Vox sanguinis, 2007. **92**(1): p. 69 - 78.
54. Humar, M., T. Loop, R. Schmidt, A. Hoetzel, M. Roesslein, N. Andriopoulos, H.L. Pahl, K.K. Geiger, and B.H.J. Pannen, *The mitogen-activated protein kinase p38 regulates activator protein 1 by direct phosphorylation of c-Jun*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2007. **39**: p. 2278-2288.
55. Jaunoo, S.S. and D.P. Harji, *Damage control surgery*. International Journal of Surgery, 2009. **7**(2): p. 110-113.
56. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-1912.
57. Johnson, J.L., E.E. Moore, R.J. Gonzalez, N. Fedel, D.A. Partrick, and C.C. Silliman, *Alteration of the Postinjury Hyperinflammatory Response by Means of Resuscitation with a Red Cell Substitute*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 2003. **54**(1): p. 133-140.
58. Johnson, L., *The regulation of protein phosphorylation*. Biochemical Society Transactions 2009. **37**(Pt. 4): p. 627-41.
59. Joos, T.O., D. Stoll, and M.F. Templin, *Miniaturised multiplexed immunoassays*. Current Opinion in Chemical Biology, 2002. **6**(1): p. 76-80.
60. Kahlke, V., F. Fandrich, K. Brotzmann, P.M. Zabel, and J. Schroder, *Selective decontamination of the digestive tract: Impact on cytokine release and mucosal damage after hemorrhagic shock*. Critical Care Medicine, 2002. **30**(6): p. 1327-1333.
61. Kaminska, B., *MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2005. **1754**(1-2): p. 253-262.
62. Karin, M. and E. Gallagher, *From JNK to Pay Dirt: Jun Kinases, their Biochemistry, Physiology and Clinical Importance*. IUBMB Life, 2005. **57**(4-5): p. 283-295.
63. Kawasaki, T., M.A. Choudhry, M.G. Schwacha, S. Fujimi, J.A. Lederer, K.I. Bland, and I.H. Chaudry, *Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(3): p. C754-764.
64. Keel, M. and O. Trentz, *Pathophysiology of polytrauma*. Injury, 2005. **36**(6): p. 691-709.
65. Kirchhoff, C., P. Biberthaler, W. Mutschler, E. Faist, M. Jochum, and S. Zedler, *Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to*

- organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study.* Critical Care, 2009. **13**(3): p. R88.
66. Kumar, S., J. Boehm, and J.C. Lee, *p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases.* Nature Reviews Drug Discovery, 2003. **2**(9): p. 717-726.
 67. Kwon, M.P., A. Chen, and J.V. Bonventre, *Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment.* The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(15): p. 11870 - 11876.
 68. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation.* Physiological Reviews, 2001. **81**(2): p. 807-869.
 69. Lai, E.W., L.H. Toledo-Pereyra, J. Walsh, F. Lopez-Neblina, and R. Anaya-Prado, *The Role of MAP Kinases in Trauma and Ischemia-Reperfusion.* Journal of Investigative Surgery, 2004. **17**(1): p. 45-53.
 70. Lara, O., X. Tong, M. Zborowski, S.S. Farag, and J.J. Chalmers, *Comparison of two immunomagnetic separation technologies to deplete T cells from human blood samples.* Biotechnology and Bioengineering, 2006. **94**(1): p. 66 - 80.
 71. Laudanski, K., C. Miller-Graziano, W. Xiao, M.N. Mindrinos, D.R. Richards, A. De, L.L. Moldawer, R.V. Maier, P. Bankey, H.V. Baker, B.H. Brownstein, J.P. Cobb, S.E. Calvano, R.W. Davis, R.G. Tompkins, and Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program, *Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(42): p. 15564-15569.
 72. Lefering, R., R.J.A. Goris, E.J. van Nieuwenhoven, and E. Neugebauer, *Revision of the multiple organ failure score.* Langenbeck's Archives of Surgery, 2002. **387**(1): p. 14 - 20.
 73. Lehnert, M., B. Relja, V. Sun-Young Lee, B. Schwestka, D. Henrich, C. Czerny, M. Froh, T. Borsello, and I. Marzi, *A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase modulates hepatic damage and the inflammatory response after hemorrhagic shock and resuscitation.* Shock, 2008. **30**(2): p. 159-165.
 74. Lenz, A., G.A. Franklin, and W.G. Cheadle, *Systemic inflammation after trauma.* Injury, 2007. **38**(12): p. 1336-1345.
 75. Lesch, H.P., M.U. Kaikkonen, J.T. Pikkarainen, and S. Ylä-Herttua, *Avidin-biotin technology in targeted therapy.* Expert Opinion on Drug Delivery, 2010. **7**(5): p. 551-564.
 76. Levy, R.M., J.M. Prince, R. Yang, K.P. Mollen, H. Liao, G.A. Watson, M.P. Fink, Y. Vodovotz, and T.R. Billiar, *Systemic inflammation and remote organ damage following bilateral femur fracture requires Toll-like receptor 4.* American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2006. **291**(4): p. R970-976.
 77. Li, M., R. Zhang, F. Li, H. Wang, H.J. Kim, L. Becnel, Q. Yao, C. Chen, and W.E. Fisher, *Transfection of SSTR-1 and SSTR-2 Inhibits Panc-1 Cell Proliferation and Renders Panc-1 Cells Responsive to Somatostatin Analogue.* Journal of the American College of Surgeons, 2005. **201**(4): p. 571 - 578.
 78. Luyer, M.D., W.A. Buurman, M.h. Hadfoune, T. Wolfs, C. van't Veer, J.A. Jacobs, C.H. Dejong, and J.W.M. Greve, *Exposure to bacterial DNA before hemorrhagic shock strongly aggravates systemic inflammation and gut barrier loss via an IFN- γ -dependent route.* Annals of Surgery, 2007. **245**(5): p. 795-802.

79. Malone, D.L., J. Dunne, J.K. Tracy, A.T. Putnam, T.M. Scalea, and L.M. Napolitano, *Blood transfusion, independent of shock severity, is associated with worse outcome in trauma*. J Trauma, 2003. **54**: p. 898 - 905.
80. Mannick, J.A., M.L. Rodrick, and J.A. Lederer, *The immunologic response to injury*. Journal of the American College of Surgeons, 2001. **193**(3): p. 237-244.
81. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-305.
82. Maung, A.A., S. Fujimi, M.L. Miller, M.P. MacConmara, J.A. Mannick, and J.A. Lederer, *Enhanced TLR4 reactivity following injury is mediated by increased p38 activation*. Journal of Leukocyte Biology, 2005. **78**(2): p. 565-573.
83. McCloskey, C.A., M.V. Kameneva, A. Uryash, D.J. Gallo, and T.R. Billiar, *Tissue hypoxia activates JNK in the liver during hemorrhagic shock*. Shock, 2004. **22**(4): p. 380-386.
84. Milano, G., S. Morel, C. Bonny, M. Samaja, L.K. von Segesser, P. Nicod, and G. Vassalli, *A peptide inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and infarct size in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(4): p. H1828-1835.
85. Mollen, K.P., R.J. Anand, A. Tsung, J.M. Prince, R.M. Levy, and T.R. Billiar, *Emerging paradigm: Toll-like receptor 4 - Sentinel for the detection of tissue damage*. Shock, 2006. **26**(5): p. 430-437.
86. Moore, E.E., F.A. Moore, A.H. Harken, J.L. Johnson, D. Ciesla, and A. Banerjee, *The two-event construct of postinjury multiple organ failure*. Shock, 2005. **24 Supplement**(1): p. 71-74.
87. Moore, F.A., E.E. Moore, R. Poggetti, O.J. McAnena, V.M. Peterson, C.M. Abernathy, and P.E. Parsons, *Gut Bacterial Translocation via the Portal Vein: A Clinical Perspective with Major Torso Trauma*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1991. **31**(5): p. 629-638.
88. Moore, F.A., E.E. Moore, and A. Sauaia, *Blood transfusion. An independent risk factor for postinjury multiple organ failure*. Archives of Surgery, 1997. **132**: p. 620 - 624.
89. Moore, F.A., A. Sauaia, E.E. Moore, J.B. Haenel, J.M. Burch, and D.C. Lezotte, *Postinjury Multiple Organ Failure: A Bimodal Phenomenon*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1996. **40**(4): p. 501-512.
90. Morales, J., P. Kibsey, P.D. Thomas, M.J. Poznansky, and S.M. Hamilton, *The effects of ischemia and ischemia-reperfusion on bacterial translocation, lipid peroxidation, and gut histology: studies on hemorrhagic shock in pigs*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 1992. **33**(2): p. 221-227.
91. Munoz, L., H. Ranaivo, S. Roy, W. Hu, J. Craft, L. McNamara, L. Chico, L. Van Eldik, and D.M. Watterson, *A novel p38alpha MAPK inhibitor suppresses brain proinflammatory cytokine up-regulation and attenuates synaptic dysfunction and behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model*. Journal of Neuroinflammation, 2007. **4**(1): p. 21.
92. Murphy, T.J., H.M. Paterson, S. Kriynovich, Y. Zang, E.A. Kurt-Jones, J.A. Mannick, and J.A. Lederer, *Linking the "two-hit" response following injury to enhanced TLR4 reactivity*. Journal of Leukocyte Biology, 2005. **77**(1): p. 16-23.
93. Nast-Kolb, D., S. Ruchholtz, C. Waydhas, B. Schmidt, and G. Taeger, *Damage Control Orthopedics*. Der Unfallchirurg, 2005. **108**(10): p. 804-811.
94. Nathens, A.B., T.A. Nester, G.D. Rubenfeld, R. Nirula, and T.B. Gernsheimer, *The effects of leukoreduced blood transfusion on infection risk following injury: a randomized controlled trial*. Shock, 2006. **26**(4): p. 342-347.

95. Pang, J.-M., I. Civil, A. Ng, D. Adams, and T. Koelmeyer, *Is the trimodal pattern of death after trauma a dated concept in the 21st century? Trauma deaths in Auckland 2004*. *Injury*, 2008. **39**(1): p. 102-106.
96. Pape, H.-C., M.V. Griensven, F.F. Hildebrand, C.T. Tzioupis, K.L. Sommer, C.C. Krettek, and P.V. Giannoudis, *Systemic Inflammatory Response After Extremity or Truncal Fracture Operations*. *The Journal of Trauma - Injury, Infection, and Critical Care*, 2008. **65**(6): p. 1379-1384.
97. Pape, H.-C., K. Grimme, M. van Griensven, A.H. Sott, P. Giannoudis, J. Morley, O. Roise, E. Ellingsen, F. Hildebrand, B. Wiese, and C. Krettek, *Impact of Intramedullary Instrumentation versus Damage Control for Femoral Fractures on Immunoinflammatory Parameters: Prospective Randomized Analysis by the EPOFF Study Group*. *The Journal of Trauma - Injury, Infection, and Critical Care*, 2003. **55**(1): p. 7-13.
98. Pape, H.-C., R.E. Schmidt, J. Rice, M. van Griensven, R. das Gupta, C. Krettek, and H. Tscherne, *Biochemical changes after trauma and skeletal surgery of the lower extremity: Quantification of the operative burden*. *Critical Care Medicine*, 2000. **28**(10): p. 3441-3448.
99. Pape, H.-C., P. Tornetta, III, I. Tarkin, C. Tzioupis, V. Sabeson, and S.A. Olson, *Timing of Fracture Fixation in Multitrauma Patients: The Role of Early Total Care and Damage Control Surgery*. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgery*, 2009. **17**(9): p. 541-549.
100. Peltz, E.D., E.E. Moore, P.C. Eckels, S.S. Damle, Y. Tsuruta, J.L. Johnson, A. Sauaia, C.C. Silliman, A. Banerjee, and E. Abraham, *HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans*. *Shock*, 2009. **32**(1): p. 17-22.
101. Pfeifer, R., I.S. Tarkin, B. Rocos, and H.-C. Pape, *Patterns of mortality and causes of death in polytrauma patients--Has anything changed?* *Injury*, 2009. **40**(9): p. 907-911.
102. Prince, J.M., R.M. Levy, R. Yang, K.P. Mollen, M.P. Fink, Y. Vodovotz, and T.R. Billiar, *Toll-like receptor-4 signaling mediates hepatic injury and systemic inflammation in hemorrhagic shock*. *Journal of the American College of Surgeons*, 2006. **202**(3): p. 407-417.
103. Probst, C., H.-C. Pape, F. Hildebrand, G. Regel, L. Mahlke, P. Giannoudis, C. Krettek, and M.R.W. Grotz, *30 years of polytrauma care: An analysis of the change in strategies and results of 4849 cases treated at a single institution*. *Injury*, 2009. **40**(1): p. 77-83.
104. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulations and properties of MAPKs*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3097 - 3099.
105. Relja, B., B. Schwestka, V.S.-Y. Lee, D. Henrich, C. Czerny, T. Borsello, I. Marzi, and M. Lehnert, *Inhibition of c-Jun N-terminal kinase after hemorrhage but before resuscitation mitigates hepatic damage and the inflammatory response in female rats*. *Shock*, 2009. **32**(5): p. 509-516.
106. Rensing, H., H. Jaeschke, I. Bauer, C. Patau, V. Datene, B.H.J. Pannen, and M. Bauer, *Differential activation pattern of redox-sensitive transcription factors and stress-inducible dilator systems heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic and endotoxic shock*. *Critical Care Medicine*, 2001. **29**(10): p. 1962-1971.
107. Rodenburg, R.J.T., F.H.J. van den Hoogen, L.B.A. van de Putte, and W.J. van Venrooij, *Peripheral blood monocytes of rheumatoid arthritis patients do not express elevated TNF [alpha], IL-1[beta], and IL-8 mRNA levels. A comparison of monocyte isolation procedures*. *Journal of Immunological Methods*, 1998. **221**(1-2): p. 169-175.
108. Rollins, B.J., *Chemokines*. *Blood*, 1997. **90**(3): p. 909-928.

109. Rosengart, M.R., A.B. Nathens, A. Saman, M.J. Neff, I. Garcia, T.R. Martin, and R.V. Maier, *Mitogen - activated protein kinases in the Intensive Care Unit: Prognostic Potential*. *Annals of Surgery*, 2003. **237**(1): p. 94 - 100.
110. Saito, T., I. Matsumoto, S. Goto, N. Kamada, R. Motoki, and P.A. Wilce, *The Differential Induction of Two Immediate Early Genes, c-fos and c-jun , After Systemic Hypovolemic Shock/Resuscitation in the Rat Liver and Kidney*. *Surgery Today*, 1998. **28**(6): p. 608-617.
111. Sato, S., H. Sanjo, K. Takeda, J. Ninomiya-Tsuji, M. Yamamoto, T. Kawai, K. Matsumoto, O. Takeuchi, and S. Akira, *Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses*. *Nature Immunology*, 2005. **6**(11): p. 1087-1095.
112. Sauaia, A., F.A. Moore, E.E. Moore, K.S. Moser, R. Brennan, R.A. Read, and P.T. Pons, *Epidemiology of Trauma Deaths: A Reassessment*. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 1995. **38**(2): p. 185-193.
113. Schaeffer, V., J. Cuschieri, I. Garcia, M. Knoll, J. Billgren, S. Jelacic, E. Bulger, and R. Maier, *The priming effect of C5a on Monocytes is predominately mediated by the p38 MAPK pathway*. *Shock*, 2007. **27**(6): p. 623-630.
114. Schroeder, O., K.M. Schulte, J. Schroeder, A. Ekkernkamp, and R.A. Laun, *The -1082 interleukin-10 polymorphism is associated with acute respiratory failure after major trauma: a prospective cohort study*. *Surgery*, 2008. **143**: p. 233 - 242.
115. Schwartz, A., A.K. Gaigalas, L. Wang, G.E. Marti, R.F. Vogt, and E. Fernandez-Repollet, *Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity*. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 2004. **57**(1): p. 1-6.
116. Sektion Intensiv- und Notfallmedizin und Schwerverletztenversorgung, *Traumaregister der DGU: Jahresbericht 2008*. 2008, Berlin: Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie.
117. Senthil, M., M.M. Brown, D.-Z. Xu, Q. Lu, E. Feketeova, and E.A. Deitch, *Gut-lymph hypothesis of systemic inflammatory response syndrome/multiple-organ dysfunction syndrome: validating studies in a porcine model*. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 2006. **60**(5): p. 958-967.
118. Seth, P., S.V. Sundar, R.K. Seth, G.S. Sidhu, S.C. Sharma, D.K. Kulshreshtha, and R.K. Maheshwari, *Picroliv Modulates Antioxidant Status and Down-Regulates AP1 Transcription Factor After Hemorrhage and Resuscitation*. *Shock*, 2003. **19**(2): p. 169-175.
119. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. *Nature Cell Biology*, 2002. **4**: p. E131-136.
120. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 in cell proliferation and survival*. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2390-2400.
121. Silliman, C.C., N.F. Voelkel, J.D. Allard, D.J. Elzi, R.M. Tuder, J.L. Johnson, and D.R. Ambruso, *Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. **101**(7): p. 1458-1467.
122. Smith, J.W., R.L. Gamelli, S.B. Jones, and R. Shankar, *Immunologic Responses to Critical Injury and Sepsis*. *J Intensive Care Med*, 2006. **21**(3): p. 160-172.
123. Søreide, K., A. Krüger, A. Vårdal, C. Ellingsen, E. Søreide, and H. Lossius, *Epidemiology and Contemporary Patterns of Trauma Deaths: Changing Place, Similar Pace, Older Face*. *World Journal of Surgery*, 2007. **31**(11): p. 2092-2103.
124. Sperry, J.L., R.S. Friese, H.L. Frankel, M.A. West, J. Cuschieri, E.E. Moore, B.G. Harbrecht, A.B. Peitzman, T.R. Billiar, R.V. Maier, D.G. Remick, J.P. Minei, and the Inflammation and the Host Response to Injury Investigators, *Male Gender is*

- Associated With Excessive IL-6 Expression Following Severe Injury*. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 2008. **64**(3): p. 572-579.
125. Stahel, P.F., W.R. Smith, and E.E. Moore, *Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma*. Injury, 2007. **38**(12): p. 1409-1422.
 126. Statistisches Bundesamt, *Gesundheit. Todesursachen in Deutschland. Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen*. Fachserie 12 Reihe 4, 2008.
 127. Stensballe, J., M. Christiansen, E. Tønnesen, K. Espersen, F.K. Lippert, and L.S. Rasmussen, *The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2009. **53**(4): p. 515-521.
 128. Thalhamer, T., M.A. McGrath, and M.M. Harnett, *MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation*. Rheumatology, 2008. **47**(4): p. 409-414.
 129. Thobe, B.M., M. Frink, F. Hildebrand, M.G. Schwacha, W.J. Hubbard, M.A. Choudhry, and I.H. Chaudry, *The role of MAPK in Kupffer cell toll-like receptor (TLR) 2-, TLR4-, and TLR9-mediated signaling following trauma-hemorrhage*. Journal of Cellular Physiology, 2007. **210**(3): p. 667-675.
 130. Thomson, S., L.C. Mahadevan, and A.L. Clayton, *MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 1999. **10**(2): p. 205-214.
 131. Tran, E.H., Y.-T. Azuma, M. Chen, C. Weston, R.J. Davis, and R.A. Flavell, *Inactivation of JNK1 enhances innate IL-10 production and dampens autoimmune inflammation in the brain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(36): p. 13451-13456.
 132. Trunkey, D.D., *Trauma*. Scientific American, 1983. **249**(2): p. 20-27.
 133. Tschoeke, S.K. and W. Ertel, *Immunoparalysis after multiple trauma*. Injury, 2007. **38**: p. 1346 - 1357.
 134. Tsukamoto, T., R. Savanh Chanthaphavong, and H.-C. Pape, *Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma*. Injury, 2009. **41**(1): p. 21-26.
 135. Uehara, T., X. Xi Peng, B. Bennett, Y. Satoh, G. Friedman, R. Currin, D.A. Brenner, and J. Lemasters, *c-Jun N-Terminal Kinase Mediates Hepatic Injury after Rat Liver Transplantation*. Transplantation, 2004. **78**(3): p. 324-332.
 136. Utter, G.H., A.B. Nathens, T.-H. Lee, W.F. Reed, J.T. Owings, T.A. Nester, and M.P. Busch, *Leukoreduction of blood transfusions does not diminish transfusion-associated microchimerism in trauma patients*. Transfusion, 2006. **46**(11): p. 1863-1869.
 137. van den Blink, B., N.P. Juffermans, T. ten Hove, M.J. Schultz, S.J.H. van Deventer, T. van der Poll, and M.P. Peppelenbosch, *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition Increases Cytokine Release by Macrophages In Vitro and During Infection In Vivo*. Journal of Immunology, 2001. **166**(1): p. 582-587.
 138. Vignali, D.A.A., *Multiplexed particle-based flow cytometric assays*. Journal of Immunological Methods, 2000. **243**(1-2): p. 243-255.
 139. Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, J.M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K.R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P.E. Molina, N.N. Abumrad, A. Sama, and K.J. Tracey, *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. Science, 1999. **285**(5425): p. 248-251.
 140. Wang, X. and Y. Liu, *Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1*. Cellular Signalling, 2007. **19**(7): p. 1372-1382.
 141. Wang, Y.X., X.Y. Xu, W.L. Su, Q. Wang, W.X. Zhu, F. Chen, G. Jin, Y.J. Liu, Y.D. Li, Y.P. Sun, W.C. Gao, and C.P. Ruan, *Activation and Clinical Significance of p38 MAPK Signaling Pathway in Patients With Severe Trauma*. Journal of Surgical Research, 2009. **161**(1): p. 119-125.

142. Warren, H.S., C.M. Elson, L.H. Hayden, D.A. Schoenfeld, P. Cobb, R.V. Maier, L.L. Moldawer, E.E. Moore, B.G. Harbrecht, K. Pelak, J. Cuschieri, D.N. Herndon, M.G. Jeschke, C.C. Finnerty, B.H. Brownstein, L. Hennessy, P.H. Mason, and R.G. Tompkins, *A Genomic Score Prognostic of Outcome in Trauma Patients*. *Molecular Medicine*, 2009. **15**(7-8): p. 220-227.
143. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007. **19**(2): p. 142-149.
144. Wieland, E., M. Oellerich, F. Braun, and E. Schütz, *c-fos and c-jun mRNA expression in a pig liver model of ischemia/reperfusion: effect of extended cold storage and the antioxidant idebenone*. *Clinical Biochemistry*, 2000. **33**(4): p. 285-290.
145. Wu, A.H.B., *A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry*. *Clinica Chimica Acta*, 2006. **369**(2): p. 119-124.
146. Wutzler, S., M. Maier, M. Lehnert, D. Henrich, F. Walcher, M. Maegele, H. Laurer, and I. Marzi, *Suppression and Recovery of LPS-Stimulated Monocyte Activity After Trauma is Correlated With Increasing Injury Severity: A Prospective Clinical Study*. *The Journal of Trauma - Injury Infection & Critical Care*, 2009. **66**(5): p. 1273-1280.
147. Yalow, R. and S. Berson, *Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods*. *Nature*, 1959. **184**(4699): p. 1648 - 1649.
148. Young, J.A., D.I. Cook, J.M. Lingard, E.W. Van Lennep, and E.A. Wegman, *Funktion des Magen-Darm-Trakts*, in *Lehrbuch der Physiologie*, R. Klinke and S. Silbernagl, Editors. 2003, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 394.
149. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. *Cell Research*, 2005. **15**(1): p. 11-18.
150. Zhang, G., C.R. Dass, E. Sumithran, N. Di Girolamo, L.-Q. Sun, and L.M. Khachigian, *Effect of Deoxyribozymes Targeting c-Jun on Solid Tumor Growth and Angiogenesis in Rodents*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004. **96**(9): p. 683-696.

8. Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BWK	Brustwirbelkörper
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD14	Cluster of differentiation 14
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DCS	Damage control surgery
DCOS	Damage control orthopedic surgery
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	High-mobility group box 1
HWK	Halswirbelkörper
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
JNK	Jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LWK	Lendenwirbelkörper
MACS	Magnetic cell separation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARS	Mixed antagonistic response syndrome
MESF	Molecules of equivalent soluble fluorochrome
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MOF	Multiple organ failure
MPK	MAP kinase phosphatase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin

PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
PRR	Pattern recognition receptor
p-JNK	Phosphorylated Jun N-terminal kinase
p-p38-MAPK	Phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase
SEM	Standard error of mean
SD	Standard deviation
SHT	Schädelhirntrauma
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TA-MC	Transfusion-associated microchimerism
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α

9. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Biberthaler für die Überlassung des Themas bedanken. Außerdem bin ich Herrn Prof. Biberthaler zu sehr großem Dank verpflichtet für seine äußerst wohlwollende und unterstützende Begleitung meines Werdegangs. Sehr vieles durfte ich von Herrn Prof. Biberthaler lernen, sei es im klinischen oder im wissenschaftlichen Bereich. Sein Enthusiasmus für alle Aspekte der akademischen Chirurgie war und ist mir ein großes Vorbild. Auch wären mir viele Türen im In- und Ausland ohne Herrn Prof. Biberthalers Hilfe sicherlich verschlossen geblieben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Viktoria Bogner für die geduldige und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Das wissenschaftliche und experimentelle Rüstzeug für die Anfertigung dieser Dissertation habe ich von Frau Dr. Bogner vermittelt bekommen. Die hervorragende Zusammenarbeit hat mir die Arbeit an dieser Dissertation ganz entscheidend erleichtert.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler für die ständige tatkräftige Unterstützung unserer gesamten Arbeitsgruppe.

Weiter gilt mein herzlicher Dank meinen Mitdoktoranden Leo Keil, Peter Richter und Christian Suren. Wir waren ein gutes Team, in dem man sich stets auf den anderen verlassen konnte.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Notaufnahme und der Intensivstation der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München für die Unterstützung dieses Projekts.

Außerdem möchte ich mich bei unserem Kooperationspartnern vom Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Leipzig bedanken, namentlich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Thiery, Herrn Prof. Dr. Daniel Teupser und Herrn Wolfgang Wilfert.

Mein abschließender und größter Dank gebührt meinen Eltern Rotraud Stöcklein und Prof. Dr. Bernd Stöcklein, meinen Brüdern Lorenz und Benno und meiner Freundin Sophie. Alle meine Anstrengungen wurden durch ihre liebevolle und grenzenlose Unterstützung und ihren Ansporn entscheidend erleichtert.